

قسم البيوكيمياء

N°...../SNV/2018

أطروحة

مقدمة من طرف

ثريا قماز

للحصول على شهادة

دكتوراه علوم

فرع: بيولوجيا

تخصص: بيوكيمياء

الموضوع

التأثير المضاد للأكسدة و التأثير المضاد للالتهاب للنبتتين المستعملتين في الطب الشعبي

Xanthium strumarium و *Hypericum perforatum*

نوقشت بتاريخ 13 / 11 / 2018

أمام لجنة المناقشة

الرئيس	لخميسي عرعار	أستاذ جامعة فرحات عباس سطيف 1
المشرف	عبدالرحمان بغياني	أستاذ جامعة فرحات عباس سطيف 1
المشرف المساعد	صباح بومرفق	أستاذ جامعة برج بوعريريج
الممتحنون	صليحة دحامة	أستاذ جامعة فرحات عباس سطيف 1
	صالح لروي	أستاذ جامعة باتنة
	فطيمة خليفي توهامي	أستاذ جامعة قسنطينة 1

مخبر البيوكيمياء التطبيقية

الإهداء

إلى أبي وأمي

إلى زوجي وإلى أمين ومريم

تشكرات

أحمد الله سبحانه وجل شأنه و أشكره جزيل الشكر الذي بعونه و توفيقه أتممت بحثي هذا. أتقدم بالشكر الخالص لأستاذي الفاضل عبد الرحمان بغياني الذي لم يبخل علي بتوجيهاته ونصائحه القيمة وقد كان حريصا دائما على توفير الإمكانيات اللازمة لفريق البحث. كل الشكر للأستاذة صباح بومرفق جامعة برج بوعرييج على مساعدتها في الإشراف على هذا البحث.

كما أتقدم بجزيل الشكر إلى أعضاء لجنة المناقشة : الأستاذ خميسي عرعار أستاذ بجامعة سطيف 1 على قبوله ترأس لجنة المناقشة والأستاذ صالح لروي أستاذ بجامعة باتنة والأستاذة فطيمة خليفني توهامي جامعة منتوري قسنطينة 1 والأستاذة صليحة دحامنة بجامعة سطيف على قبولهم جميعا أن يكونوا أعضاء في لجنة المناقشة.

أتقدم بكل معاني الشكر إلى سناء عواشرية وعبد الرحيم بن سلامة وإيمان نعمون وإنتصار سراي وكاتيا عبد الوهاب و سوسن قادة و دليلة مسعودي وهشام مزيتي وناصر عمراوي على مساعدتهم لي طوال فترة إنجاز هذا البحث.

كما أتقدم بخالص شكري وتقديري للأستاذة فاطمة بن الشيخ والأستاذة حمادة بوريش والأستاذ اسماعين عميرة والأستاذ الصديق خنوف على كل المساعدات والتوجيهات وعلى توفير كل الإمكانيات والوسائل لإنجاز هذا البحث.

أشكر جميع من أعانني من قريب أو من بعيد خصوصا السيد جمال دالي على مساعدته القيمة خلال إنجاز هذا البحث.

كما أتقدم بخالص شكري وتقديري للأستاذ بشير أوجحيج على تصنيفه العلمي للنببتين والأستاذ Ryszard Amarowicz على قيامه بتحليل المستخلصات الخام باستعمال HPLC على مستوى مخبره ببلونيا.

الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقدير النشاط المضاد للأوكسدة والمضاد للالتهاب لمستخلصات أوراق نباتي الـ *Hypericum perforatum* (HP) و الشبيطة *Xanthium strumarium* (XS). تم استخلاص عديدات الفينول بمذيبات عضوية مختلفة القطبية مما سمح بالحصول على المستخلص الخام (CrE) ومستخلص الكلوروفورم (ChE) ومستخلص إيثيل الأسيتات (EAE) والمستخلص المائي (AqE). أظهر التحليل الكمي لعديدات الفينول والفلافونيدات أن مستخلص EAE لنبات HP يحتوي أعلى كمية من المركبات الفينولية والفلافونيدات. كما أظهر تحليل المستخلص الخام للنبتين بواسطة HPLC وجود عدة مركبات من عديدات الفينول والفلافونيدات. قدرت النشاط المضاد للأوكسدة لمختلف المستخلصات باستعمال عدة اختبارات منها اختبار انحلال أغشية الكريات الحمراء واستحلاب الحديد والقدرة الإرجاعية وإزاحة كلا من جذور الهيدروكسيل وفوق أكسيد الهيدروجين واختبار β -carotene / الحمض لينولييك واختبار إزاحة جذور DPPH. أظهرت نتائج هذه الاختبارات، تميّز مستخلص ChE لكلا النبتين بأعلى فعالية في حماية كريات الدم الحمراء من الانحلال، وأن مستخلص AqE لنبات HP أظهر الفعالية الأكبر في اختبار استحلاب الحديد. أظهر مستخلص EAE لنبات HP، أعلى فعالية إرجاع. تميز مستخلصا ChE و EAE لنبات HP بأعلى قدرة على إزاحة جذور الهيدروكسيل وفوق أكسيد الهيدروجين، على الترتيب. تميزت مستخلصات HP بقدرة عالية على تثبيط أكسدة β -carotene. أخيراً، تميز مستخلص EAE لنبات HP بأعلى قدرة على إزاحة DPPH. أظهر اختبار السمية الحادة أن المستخلص الخام لنبات HP يتميز بقيمة $LD_{50} = 1065.49$ مغ/كغ، أما مستخلص XS فتميز بعدم سميته حتى 5000 مغ/كغ. كما بينت نتائج اختبار السمية تحت الحادة، الذي دام 21 يوماً، أن مستخلص XS كان، عموماً، أكثر فعالية من مستخلص HP إذ رفع من قدرة البلازما الإزاحية لجذور DPPH وقدرة إرجاع البلازما. تم تقييم نشاط إنزيم Catalase ومستويات MDA و GSH في أنسجة كبد وكلى الفئران فأظهرت نتائج تقدير نشاطية إنزيم Catalase في الكبد ارتفاعاً بمعدل 58.35% بعد المعاملة بمستخلص XS كما رفع المستخلصان من مستوى GSH الكلي بمعدل 9.52% و 2.85% لكلا من HP و XS، على الترتيب. خفض HP و XS من مستوى MDA بنسبة 58.38% و 45.5%، على الترتيب. بالنسبة للكلى، سجلت نتائج مماثلة للكبد. في اختبار التأثير السام CCl_4 . أدت معاملة الفئران بـ HP إلى تخفيض نشاطية إنزيم Catalase الكبدية وزيادة معتبرة في النشاطية على مستوى الكلى. لم يتأثر معدل MDA الكبدية بالمعاملة بمستخلص HP لكنه تناقص في الكلى بشكل معتبر. تسببت المعاملة بمستخلص HP في ارتفاع في GSH كبدية والكلى. أدت معاملة الفئران بمستخلص XS إلى زيادة نشاطية إنزيم Catalase الكبدية. حرض XS تزايداً في معدل MDA الكبدية وتناقصاً كبيراً له في الكلى. تسبب XS في زيادة طفيفة في GSH الكبدية والكلوي. أدت المعاملة بمستخلصي HP و XS إلى تخفيض معدل الإنزيمات ناقلة الأمين المصلية (GOT و GPT) والفوسفاتاز القاعدي و bilirubine واليوريا والكرياتينين والغليسيريدات الثلاثية وإلى زيادة معدل الكولسترول. كما أدت المعاملة بـ HP و XS إلى حدوث تثبيط معنوي للوذمة المحرّضة بـ xylene في الأذن بنسب تقارب تلك المسجلة مع الأسبيرين. من جانب آخر، سجل تثبيط للوذمة المحرّضة بزيت croton في الأذن بعد المعاملة بالمستخلصين بـ أعلى من تلك المسجلة مع indometacine. سمح إعطاء جرعات من مستخلص HP و XS في حالة الوذمة المحرّضة بـ carrageenan على القدم بتخفيض سمك الوذمة. تظهر هذه النتائج أن كلا من *H. perforatum* و *X. strumarium* يمكنهما حماية أنسجة الكبد والكلى من الإجهاد التأكسدي الناجم عن CCl_4 بشكل رئيسي بسبب خصائصهما المضادة للأوكسدة، ولديهما قدرة عالية مضادة للالتهاب؛ تدعم هذه النتائج استخدام هاتين النبتين في الطب الشعبي.

الكلمات الدالة : *Hypericum perforatum* ، *Xanthium strumarium* ، عديدات الفينول، مضادات الأوكسدة، مضادات الالتهاب.

Abstract

The objective of this study is to estimate the antioxidant and anti-inflammatory activity of leaf extracts from two plants, *Hypericum perforatum* (HP) and *Xanthium strumarium* (XS). The extraction of the polyphenols was applied using organic solvents with different polarities, four extracts were obtained; crude extract (CrE), chloroformic extract (ChE), ethyl acetate extract (EAE) and aqueous extract (AqE). Quantitative analysis of polyphenols and flavonoids has shown that HP EAE contains the greatest amount of phenolic compounds and flavonoids. Analysis of the crude extracts by HPLC revealed the presence of several flavonoids and polyphenols. Antioxidant activity was evaluated *in vitro* by the use of different tests; haemolysis, iron chelation, reducing power, trapping hydroxyl radicals and hydrogen peroxide, β -carotene / linoleic acid test and DPPH scavenging. Results of these tests demonstrated that, in the case of hemolysis of red blood cells, the ChE extract of both plants showed the greatest efficiency in the protection of Red blood cells from hemolysis. In the iron chelation test, HP's AqE showed high efficiency. In the reducing power test, HP's EAE showed great efficiency. EAE and ChE from HP showed the most important scavenging effect against hydrogen peroxide and hydroxyl radical respectively. The results of the β -carotene / linoleic acid test revealed that HP extracts significantly inhibited the β -carotene oxidation. HP EAE showed the most important scavenging effect against the DPPH radical. The acute toxicity test demonstrated that the crude extract of HP has an LD₅₀ of 1065.49 mg / kg and that of XS is above 5 g / kg. To estimate the sub-acute toxicity of the two crude extracts, the test lasted 21 days. XS doses have generally been more effective than those of HP in the plasma DPPH scavenging and reducing power tests. Catalase activity and MDA and GSH levels were evaluated in the homogenate of the liver and mouse kidneys. The results show an increase in catalase activity in the liver with 58.35% with XS. HP and XS induced increased GSH levels (9.52% and 2.85% respectively), and reduced MDA levels (58.38% and 45.5% respectively). In the homogenates of the kidneys, results similar to those of the livers were recorded. In the CCl₄ toxicity test, treatment of mice with HP induced a decrease in catalase activity in the liver, and a significant increase in this activity in the kidneys. The level of MDA was not influenced by HP in the liver, but was reduced in the kidneys. HP caused an increase in GSH in the liver and kidneys of the mice. Treatment of mice with XS induced an increase in catalase activity in the liver, but was not as effective in the kidneys. XS induced an increase in the level of MDA in the liver, but it greatly reduced this rate in the kidneys. XS caused a small increase in GSH in the liver and kidneys of mice. The treatment of mice with HP and XS induced a decrease in transaminase levels (GOT and GPT), alkaline phosphatase, bilirubin, urea, creatinine and triglycerides, and an increase in cholesterol. Treatment with HP and XS shows significant inhibition of xylene-induced ear edema. These effects are comparable to that of aspirin. In addition, significant inhibition of croton oil-induced ear edema was observed in mice treated with both crude extracts with values significantly greater than that of indometacin. In the case of carrageenin-induced edema in the rat, administered doses of HP and XS generally reduced edema. These results show that *H. perforatum* and *X. strumarium* are both capable of protecting liver and kidney tissue from CCl₄-induced oxidative stress primarily because of their antioxidant properties, and possess high anti-inflammatory activity, which explains their use in traditional medicine.

Key words : *Hypericum perforatum* , *Xanthium strumarium* , polyphenols, antioxidant, anti-inflammatory.

Résumé

L'objectif de la présente étude est d'estimer l'activité antioxydante et anti-inflammatoire des extraits des feuilles de deux plantes, *Hypericum perforatum* (HP) et *Xanthium strumarium* (XS). L'extraction des polyphénols a été appliquée en utilisant des solvants organiques avec différentes polarités, quatre extraits ont été obtenus; extrait brut (CrE), extrait chloroformique (ChE), extrait d'acétate d'éthyle (EAE) et extrait aqueux (AqE). L'analyse quantitative des polyphénols et des flavonoïdes a montré que EAE de HP contient la plus grande quantité de composés phénoliques et de flavonoïdes. L'analyse des extraits bruts, par HPLC, a révélé la présence de plusieurs flavonoïdes et polyphénols. L'activité antioxydante a été évaluée *in vitro* par l'utilisation de différents tests; l'hémolyse des hématies, la chélation du fer, le pouvoir réducteur, le piégeage des radicaux hydroxyl et du peroxyde d'hydrogène, le test du β -carotène/acide linoléique et le test du piégeage du DPPH. Les résultats de ces tests ont démontré que le cas de l'hémolyse des globules rouges, que l'extrait ChE des deux plantes a montré la plus grande efficacité dans la protection des hématies de l'hémolyse. Dans le test de chélation du fer, AqE de HP a montré une grande efficacité. Dans le test du pouvoir réducteur, EAE de HP a montré une grande efficacité. EAE et ChE de HP ont montré le plus important effet piègeur vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène et du radical hydroxyl respectivement. Les résultats du test du β -carotène / acide linoléique ont révélé que les extraits de HP ont considérablement inhibé l'oxydation du β -carotène. EAE de HP a montré le plus important effet piègeur vis-à-vis du radical DPPH. Le test de la toxicité aiguë a démontré que l'extrait brut de HP a un LD₅₀ de 1065.49 mg / Kg et que celle de XS est au-delà de 5 g / kg. Pour estimer la toxicité sub-aiguë des deux extraits bruts, le test a duré 21 jours. Les doses de XS ont été, généralement, plus efficaces que celles de HP, dans les tests du piégeage du DPPH par le plasma et du pouvoir réducteur de ce dernier. L'activité de la catalase et les taux du MDA et du GSH ont été évalués dans l'homogénat du foie et des reins de souris. Les résultats montrent une augmentation, dans le foie, de l'activité de la catalase avec un taux de 58.35 % avec XS. HP et XS ont induit l'augmentation du taux de GSH (9.52 % et 2.85 % respectivement), et la réduction du taux de MDA (58.38 % et 45.5% respectivement). Dans les homogénats des reins, des résultats similaires à ceux des foies ont été enregistrés. Dans le test de la toxicité par CCl₄, le traitement des souris avec HP a induit une diminution de l'activité de la catalase au niveau du foie, et une forte augmentation de cette activité au niveau des reins. Le taux de l'MDA n'a pas été influé par HP dans le foie, mais a été réduit dans les reins. HP a provoqué une augmentation de GSH dans le foie et les reins des souris. Le traitement des souris avec XS a induit une augmentation de l'activité de la catalase au niveau du foie, mais n'a pas été aussi efficace au niveau des reins. XS a induit une augmentation du taux de l'MDA dans le foie, mais il a fortement réduit ce taux dans les reins. XS a provoqué une faible augmentation de GSH dans le foie et les reins des souris. Le traitement des souris avec HP et XS a induit une diminution des taux des transaminases (GOT et GPT), de la phosphatase alcaline, de la bilirubine, de l'urée, de la créatinine et des triglycérides, et une augmentation du cholestérol. Le traitement avec HP et XS montre une inhibition significative de l'œdème de l'oreille induit par le xylène. Ces effets sont comparables à celui de l'aspirine. En outre, une inhibition significative de l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton a été observée chez les souris traitées avec les deux extraits bruts avec des valeurs significativement supérieures à celle de l'indométacine. Dans le cas de l'œdème induit par la carragénine au niveau du pied chez le rat, les doses administrées de HP et XS ont généralement réduit l'œdème. Ces résultats montrent que *H. perforatum* et *X. strumarium* sont tous deux capables de protéger les tissus hépatique et rénal des souris contre le stress oxydatif provoqué par le CCl₄ principalement en raison de leurs propriétés antioxydantes, et possèdent une forte activité anti-inflammatoire, ce qui explique leur utilisation en médecine traditionnelle.

Mots clés : *Hypericum perforatum* , *Xanthium strumarium* , polyphénols, antioxydant, anti-inflammatoires.

قائمة الأشكال

- شكل 1: تفاعل أكسدة arginine لإنتاج citruline وأكسيد الآزوت 7
- شكل 2: مسالك إنتاج و تحويل الجذور الحرة الأوكسجينية 8
- شكل 3: إنتاج جذر فوق الأوكسيد بتدخل إنزيم xanthine oxydase 9
- شكل 4: أهم الجذور الحرة وأنواع الجزيئات المستهدفة من طرفها 11
- شكل 5: أهم الأمراض الناجمة عن الإجهاد التأكسدي 13
- شكل 6: تنظيم إنتاج الجذور الحرة الأوكسجينية من طرف مضادة الأكسدة الإنزيمية و غير الإنزيمية 13
- شكل 7: البنية الكيميائية العامة للفلافونويدات ومختلف الأقسام المنتمة لها 18
- شكل 8: أهم المواقع في بني الفلافونويدات المؤثرة على النشاط المضاد للأكسدة 18
- شكل 9: العوامل المنشطة لمسلك Kinines 22
- شكل 10: بعض تأثيرات الستيرويدات على الخلايا 25
- شكل 11: العلاقة بين آليات تأثير الفلافونويدات والأمراض التي تؤثر عليها 27
- شكل 12: نبات *H. perforatum*؛ أ - الشكل العام، ب- الأزهار، ج - لأوراق 29
- شكل 13: نبات *X. strumarium*؛ أ - الشكل العام، ب- الأوراق، ج - الفاكهة و البذور 30
- شكل 14: مخطط يوضح أزمنة احتباس أهم المواد التي تدخل في تركيب المستخلص الخام لـ *H. perforatum* 50
- شكل 15: مخطط يوضح أزمنة احتباس أهم المواد التي تدخل في تركيب المستخلص الخام لـ *X. strumarium* 51
- شكل 16: التأثير المثبط لانهلال كريات الدم الحمراء من طرف مستخلصات *H. perforatum* و *X. strumarium* بدلالة الزمن 54
- شكل 17: قيم HT_{50} لمستخلصات *H. perforatum* و *X. strumarium* لحماية كريات الدم الحمراء من الانحلال المحرض بـ AAPH 55
- شكل 18: نسب استخلاص الحديد من قبل مستخلصات *H. perforatum* و *X. strumarium* بدلالة التركيز 57
- شكل 19: قيم IC_{50} لمستخلصات *H. perforatum* و *X. strumarium* لاستخلاص الحديد 58

- 60 شكل 20: القدرة الإرجاعية لمستخلصات *H. perforatum* و *X. strumarium* بدلالة التركيز..
- 61 شكل 21: القدرة الإرجاعية لمستخلصات *H. perforatum* و *X. strumarium*
- 62 شكل 22: نسبة تثبيط جذور الهيدروكسيل بمستخلصات *H. perforatum* و *X. strumarium* بدلالة التركيز
- 63 شكل 23: قيم IC_{50} لمستخلصات *H. perforatum* و *X. strumarium* لإزاحة جذور الهيدروكسيل.
- 64 شكل 24: نسبة إزاحة فوق أكسيد الهيدروجين بمستخلصات *H. perforatum* و *X. strumarium*
- 65 بدلالة التركيز.....
- 66 شكل 25: قيم IC_{50} لمستخلصات *H. perforatum* و *X. strumarium* لإزاحة فوق أكسيد
الهيدروجين.....
- 67 شكل 26: قدرة مستخلصات *H. perforatum* و *X. strumarium* على تثبيط أكسدة β -carotene
بدلالة الزمن.....
- 68 شكل 27: مقارنة نسب التثبيط لمستخلصات *H. perforatum* و *X. strumarium* عند 24 ساعة
باستعمال طريقة β -carotene / حمض النولييك.....
- 69 شكل 28: نسبة تثبيط جذور DPPH بمستخلصات *H. perforatum* و *X. strumarium* بدلالة
التركيز.....
- 70 شكل 29: قيم IC_{50} لمستخلصات *H. perforatum* و *X. strumarium* لإزاحة جذور DPPH.
- 71 شكل 30: تقدير LD_{50} عند الفئران المعاملة بالمستخلص الخام لـ *H. perforatum*
- 72 شكل 31: تطور أوزان الفئران خلال 21 يوم
- 73 شكل 32: أوزان كبد وكلية الفئران عند 21 يوم.....
- 74 شكل 33: قيم HT_{50} لمستخلصي *H. perforatum* و *X. strumarium* لحماية كريات الدم الحمراء
من الانحلال المحرض بـ AAPH.....
- 75 شكل 34: تأثير مستخلصي HP و XS على معدل MDA على مستوى A: الكبد و B: الكلى.
- 76 شكل 35: تأثير مستخلصي *H. perforatum* و *X. strumarium* على قدرة البلازما الإرجاعية..
- 77 شكل 36: تأثير مستخلصي *H. perforatum* و *X. strumarium* على نشاطية البلازما المضادة
للأكسدة تجاه جذور DPPH
- 78 شكل 37: تأثير مستخلصي HP و XS على نشاطية catalase على مستوى A: الكبد و B: الكلى.

- 84 شكل 38: تأثير مستخلصي HP و XS على معدل الغلوتاثيون على مستوى أ: الكبد وب: الكلى.
- 86 شكل 39: تطور أوزان الفئران خلال الأيام السبعة.
- 87 شكل 40: أوزان أكباد و كلى الفئران عند اليوم السابع.
- 88 شكل 41: تأثير مستخلصي HP و XS على نشاطية catalase على مستوى أ: الكبد وب: الكلى.
- 90 شكل 42: تأثير مستخلصي HP و XS على معدل MDA على مستوى أ: الكبد وب: الكلى.
- 91 شكل 43: تأثير مستخلصي HP و XS على معدل الغلوتاثيون على مستوى أ: الكبد وب: الكلى.
- 95 شكل 44: تأثير مستخلصي HP و XS على المعدل المصلي لـ GPT و GOT و PAL و bilirubine
- شكل 45: تأثير مستخلصي HP و XS على المعدل المصلي الغليسيريدات الثلاثية (أ) والكولستول (ب).
- 97
- 99 شكل 46: تأثير مستخلصي HP و XS على المعدل المصلي لليوريا (أ) و الكرياتينين (ب).
- شكل 47: تأثير مستخلصي *H. perforatum* و *X. strumarium* على الودمة المحرصة بـ xylene عند
- 100 الفئران.
- شكل 48: تأثير مستخلصي *H. perforatum* و *X. strumarium* على الودمة المحرصة بزيت croton
- 102 عند الفئران.
- شكل 49: حركية تأثير مستخلصي *H. perforatum* (أ) و *X. strumarium* (ب) على الودمة المحرصة
- 104 بـ Carrageenan عند الجرذان خلال 6 ساعات.
- شكل 50: تأثير مستخلصي *H. perforatum* (HP) و *X. strumarium* (XS) على الودمة المحرصة
- 105 بـ Carrageenan عند الجرذان.

قائمة الجداول

- 4 جدول 1: الأهمية البيولوجية للجذور الحرة الأوكسجينية والآزوتية.....
- 24 جدول 2: أمثلة لأمراض مرتبطة بالتهاب.....
- 47 جدول 3: مردود استخلاص مختلف مستخلصات أوراق نبتة *H. perforatum* ومحتواها من عديدات الفينول والفلافونويدات.....
- 48 جدول 4: مردود استخلاص مختلف مستخلصات أوراق نبتة *X. strumarium* ومحتواها من عديدات الفينول والفلافونويدات.....
- 50 جدول 5: أزمنة احتباس أهم الجزئيات المكونة للمستخلص الخام ل HP و تراكيدها.....
- 51 جدول 6: أزمنة احتباس أهم الجزئيات المكونة للمستخلص الخام ل XS و تراكيدها.....
- 72 جدول 7: تحديد LD₅₀ لمستخلص *H. perforatum*.....
- 73 جدول 8: تحديد مختلف الجرعات المميتة للمستخلص الخام ل *H. perforatum*.....
- 92 جدول 9: تأثير رباعي كلوريد الكربون على المؤشرات البيوكيميائية على مستوى الكبد.....
- 94 جدول 10: تأثير مستخلصي HP وXS على المعدل المصلي ل GPT و GOT و PAL و bilirubine... ..
- 96 جدول 11: تأثير مستخلصي HP وXS على المعدل المصلي ل الغليسيريدات الثلاثية والكولسترول.....
- 98 جدول 12: تأثير مستخلصي HP وXS على المعدل المصلي لليوريا والكرياتينين.....

قائمة المختصرات

AAPH	2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) HCl
AqE	Aqueous extract
BHT	2, 6 di-tert-butyl-4-methyl phénol
CAT	Catalase
ChE	Chloroform extract
COX	Cyclooxygenase
CrE	Crude extract
DPPH	2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTNB	5,5'- dithio-bis- [2- nitrobenzoic acid]
EAE	Ethyl acetate extract
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic
GOT	Glutamate oxaloacetate transaminase
GPT	Glutamate pyruvate transaminase
GPx	Glutathion peroxidase
GR	Glutathion reductase
GSH	Gluthathion
GSSG	Oxidized glutathione
HT ₅₀	Half-hemolysis Time
HxE	Hexane extract
HP	<i>Hypericum perforatum</i>
INF	Interferon
IL	Interleukin
LD ₅₀	Lethal dose
LDL	Low density Lipoprotein
LOX	Lipooxygenase
MDA	Malondialdehyde
NOS	Nitric oxide synthase
OECD	Organisation for Economic Co-operation and development)
ROS	Reactive oxygen species
PAL	phosphatase alcaline
PKC	Protein Kinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
SOD	Superoxide dismutase
TBA	Thiobarbituric acid
TCA	Trichloroacetic acid
TNB	5-thio-2-nitrobenzoic acid
TRx	Thioredoxin
XS	<i>Xanthium strumarium</i>

الفهرس

التشكرات

الملخص بالعربية

الملخص بالانجليزية

الملخص بالفرنسية

قائمة الأشكال

قائمة الجداول

قائمة المختصرات

1 المقدمة
3 1. الإجهاد التأكسدي
3 1.1. الجذور الحرة
3 1.1.1. أنواع الجذور الحرة
7 2. 1.1. مصادر الجذور الحرة
10 3. 1.1. الأدوار الفيزيولوجية للجذور الحرة
11 4. 1.1. الجزيئات المستهدفة من طرف الجذور الحرة
12 5. 1.1. الأمراض المرتبطة بالجذور الحرة
13 2. مضادات الأكسدة
14 1.2. مضادات الأكسدة الإنزيمية
15 2.2. مضادات الأكسدة غير الإنزيمية
19 3.2. تأثيرات الفلافونويدات المضادة للأكسدة
21 3. الالتهاب
21 1.3. الالتهاب الحاد
23 2.3. الالتهاب المزمن
23 3.3. الأمراض المرتبطة بالالتهاب
24 4.3. مضادات الالتهاب
24 1.4.3. مضادات الالتهاب غير الستيرويدية
25 2.4.3. مضادات الالتهاب الستيرويدية

263.4.3 مضادات الالتهاب ذات أصل نباتي (الفلافونويدات)
284. نبات <i>Hypericum perforatum</i>
281.4. التركيب الكيميائي
282.4. التأثيرات البيولوجية
295. نبات <i>Xanthium strumarium</i>
311.5. التركيب الكيميائي
312.5. التأثيرات البيولوجية

المواد وطرق العمل

331. المواد
331.1. المواد البيولوجية
332.1. المواد الكيميائية
332. الطرق
331.2. الاستخلاص والتجزئة
342.2. معايرة عديدات الفينول
343.2. معايرة الفلافونويدات
344.2. تحليل المستخلصات الخام باستعمال HPLC
355.2. تقدير النشاط المضادة للأوكسدة في الأنبوب
351.5.2. النشاط المضاد لتحلل كريات الدم الحمراء
352.5.2. إستخلاص الحديد
363.5.2. القدرة الإرجاعية
364.5.2. إختبار إزاحة جذورالهيدروكسيل
375.5.2. إختبار إزاحة الماء المؤكسج
376.5.2. إختبار بيتا-كروتين - الحمض لينولييك
377.5.2. إختبار إزاحة جذور DPPH
386.2. إختبار السمية الحادة
381.6.2. إختبار سمية مستخلص <i>Hypericum perforatum</i>
392.6.2. إختبار سمية مستخلص <i>Xanthium strumarium</i>
397.2. إختبار السمية تحت الحادة

40إختبار تحلل كريات الدم الحمراء.....1.7.2
40اختبار النشاطية المضادة لفوق أكسدة اللييدات.....2.7.2
40إختبار إزاحة DPPH.....2.7.2
40إختبار القدرة الإرجاعية.....3.7.2
41قياس النشاطية الإنزيمية لإنزيم catalase.....4.7.2
41تقدير تركيز الغلوتاثيون الكلي.....5.7.2
41تقدير تركيز البروتينات.....6.7.2
428.2. التأثير المضاد لسمية الكبد بـ (CCl ₄) Carbon tetrachloride.....
42التحاليل البيوكيميائية.....
429.2. التأثير المضاد للالتهاب.....
421.9.2. تخفيف وذمة الأذن بـ Xylene.....
432.9.2. تخفيف وذمة الأذن بزيت Croton.....
443.9.2. تخفيف وذمة القدم بـ carrageenan.....
4510.2. التحليل الإحصائي.....

النتائج والمناقشة

471. الاستخلاص والتجزئة.....
482. معايرة عديدات الفينول والفلافونويدات.....
503. نتائج HPLC.....
524. الأنشطة المضادة للأكسدة في الأنوب.....
521.4. النشاط المضاد لتحلل كريات الدم الحمراء.....
562.4. إستخلاص الحديد.....
583.4. القدرة الإرجاعية.....
614.4. النشاط الإزاحي لجذور الهيدروكسيل.....
645.4. النشاط الإزاحي للماء المؤكسج.....
666.4. إختبار بيتا-كروتين - الحمض لينولييك.....
697.4. النشاط الإزاحي لجذور DPPH.....
725. إختبار السمية الحادة.....
731.5. إختبار سمية مستخلص <i>H. perforatum</i>

73X. strumarium سمية مستخلص	2.5
73إختبار السمية تحت الحادة	6
74أوزان الفئران والأعضاء	1.6
75اختبار انحلال الدم في الحي	2.6
77 (malondialdehyde) تحديد تركيز	3.6
78DPPH قدرة البلازما الإزاحية ل	4.6
80اختبار القدرة الإرجاعية	5.6
81إختبارات النشاطية المضادة للأكسدة	6.6
81 catalase إنزيم	1.6.6
83 تحديد تركيز الغلوتاثيون الكلي	2.6.6
85 التأثير المضاد لسمية الكبد برباعي كلوريد الكربون (CCl ₄) Carbon tetrachloride	7
85أوزان الفئران و الأعضاء	1.7
88إختبارات النشاطية المضادة للأكسدة	2.7
88 catalase إنزيم	1.2.7
89 (malondialdehyde) تحديد تركيز	2.2.7
91 تحديد تركيز glutathione الكلي	3.2.7
92التحاليل البيوكيميائية	3.7
93 الإنزيمات ناقلة الأمين المصلية (GPT و GOT) والفوسفاتاز القاعدي	1.3.7
95الكولسترول والجليسيريدات الثلاثية	2.3.7
97اليوريا والكرياتينين	3.3.7
100الاختبارات المضادة للالتهاب	8
100 تحفيز وذمة الأذن بـ Xylene	1.8
101 Croton بزيت	2.8
103 carrageenan بـ	3.8
107 المناقشة العامة	
119 قائمة المراجع	

المقدمة

يتم إنتاج الأنواع الأكسجينية النشطة (Reactive Oxygen Species, ROS) في الخلايا الطبيعية فهي تقوم بدور وسائط في تفاعلات الدفاع الخلوي المضاد للأكسدة والمضاد للالتهاب إذ تتدخل في آليات البلعمة والموت المبرمج للخلايا وإزالة السمية (Pal و Nimse، 2015). يمكن أن يلحق الإفراط في إنتاج الأنواع الأكسجينية النشطة ضررا بالبروتينات والليبيدات والأحماض النووية مسببا بذلك عددا من الأمراض المزمنة مثل أمراض القلب والأوعية الدموية وتصلب الشرايين والسرطان والشيخوخة (Sisein، 2014).

من جانب آخر، يعتبر الالتهاب آلية دفاع ضرورية لسلامة العضوية، إلا أنه يتدخل في عدد كبير من الأمراض منها مثل التهاب المفاصل والربو والأكزيما والقرص والتهاب الأنف التحسسي وقرحة المعدة والإثني عشر (Wiart، 2006).

يرافق استعمال مضادات الأكسدة ومضادات الالتهاب التركيبية، ظهور آثار جانبية غير مرغوب فيها. إذ وجد أن BHT (butylate hydroxytoluene)، الذي يستعمل كمضاد أكسدة اصطناعي، قد يتسبب في ظهور سرطان الكبد (Gülçin وآخرون، 2010؛ Senguttuvan وآخرون، 2014). أما مضادات الالتهاب غير الستيرويدية وخصوصا مضادات الالتهاب الستيرويدية فتعرف بأنها تتسبب في ارتفاع ضغط الدم الشرياني وعدم انتظام البناء الحيوي للستيرويدات في نهاية العلاج وظهور القرحة على مستوى المعدة والإثني عشر. يمكن أيضا أن تظهر أعراض مزمنة مثل هشاشة العظام وإعتماد عدسة العين وزيادة الوزن (Viatte وآخرون، 2007).

في الآونة الأخيرة، ازداد الاهتمام باكتشاف مضادات أكسدة ومضادات التهاب طبيعية. تستخدم النباتات الطبية على نطاق واسع في الطب التقليدي في جميع أنحاء العالم لتخفيف الآثار الضارة للأنواع الأكسجينية النشطة والأمراض الالتهابية. يرجع هذا التأثير إلى محتوى النباتات من عديدات الفينول (Rathee وآخرون، 2009)، تتواجد المركبات الفينولية مثل الفلافونويدات والأحماض الفينولية والديغ والكومارينات في أجزاء مختلفة من النباتات (الجذور والأوراق والأغصان والأزهار والفواكه). تعود الخصائص المضادة للأكسدة للأحماض الفينولية والفلافونويدات إلى خصائصها المرجعة وقدرتها على استخلاص المعادن وتثبيت فوق أكسدة الليبيدات.

جرت هذه الدراسة على نبتتين طبيتين هما نبات الهيوفاريقون *Hypericum perforatum* ونبات الشبيط

Xanthium strumarium.

نبات *H. perforatum* نبات منبه وفتح للشهية ومدر للبول وطارد للحمى، كما يتمتع هذا النبات بتأثير مطهر ومضاد للالتهاب ومضاد حيوي ومضاد للفيروسات إلا أنه يستعمل بشكل رئيسي في حالة الأرق والقلق والانهيار العصبي والاكتئاب الخفيف (Rahimi و Kiani، 2016). أما *X. strumarium* فيستعمل في الصين والهند وماليزيا لعلاج التهاب الجيوب الأنفية والتهاب الطبلية والصداع والشرى urticaria والتهاب المفاصل (Rad وآخرون، 2013).

تم في هذه الدراسة تحضير مستخلصات مختلفة للنبتين وتقدير محتواها من عديدات الفينول والفلافونويدات. بعد ذلك تم اختبار قدرة مستخلصات *H. perforatum* و *X. strumarium* على إزاحة أنواع مختلفة من الجذور الحرة وتثبيط فوق أكسدة الليبيدات وكذا اختبار التأثير الإستخلاصي للمعادن. شملت هذه الدراسة أيضا اختبارات مختلفة على مستوى الحي (فئران)؛ ابتداء من السمية الحادة للمستخلصين الخامين لتحديد الجرعة القاتلة لـ 50 % من الحيوانات، فالسمية تحت الحادة لتقدير تأثير المستخلصين على معدلات الدفاع المضاد للأكسدة (نشاط إنزيم catalase و تقدير معدل GSH و تقدير التأثير المضاد لفوق أكسدة الليبيدات بتحديد معدل MDA). تقصت هذه الدراسة أيضا قدرة المستخلصين الخامين على حماية الكبد والكلى من التسمم برياعي كلوريد الكربون (CCl₄) بتقدير معدلات الدفاع المضاد للأكسدة وتقدير المؤشرات البيوكيميائية للكبد والكلى.

أخيرا، لاختبار التأثير المضاد للالتهاب للنبتين، تم تحفيز الوذمة على مستوى الأذن بـ Xylene وبنزيت Croton وعلى مستوى القدم بـ carrageenan. سمح قياس سمك الوذمة بتقدير مدى قدرة هذين المستخلصين المضادة للالتهاب.

1. الإجهاد التأكسدي

يتم إنتاج الجذور الحرة بشكل دائم بكميات ضعيفة، لتقوم عموماً بدور وسائط خلوية أوفى الدفاع الخلوي. يتم التحكم في الإنتاج الفيزيولوجي بأنظمة دفاع تتأقلم مع معدل الجذور المتواجد؛ في هذه الحالة، يحدث توازن بين الجذور الحرة و مضادات الأكسدة. إذا اختل هذا التوازن نتيجة لخلل في النظام المضاد للأكسدة أو نقص في مضادات الأكسدة أو نتيجة لإنتاج مفرط للجذور الحرة؛ يؤدي ذلك إلى ما يعرف بالإجهاد التأكسدي (Favier، 2003).

1.1. الأنواع الأكسجينية الحرة

يتم إنتاج الجذور الحرة في الميتوكوندريا حين تستعمل الخلايا الأكسجين لإنتاج جزيئات ATP (Kabel، 2014). الجذر الحر عبارة عن جزيء أو ذرة تحتوي على إلكترون غير مزدوج في المدار الخارجي (Bala و Haldar، 2013). تسبب الجذور الحرة تخریباً للخلايا وذلك بأكسدة لبيدات الأغشية الخلوية والأحماض الأمينية المكونة للبروتينات والأحماض النووية (Bansal و Bilaspuri، 2011).

1.1.1. أنواع الجذور الحرة

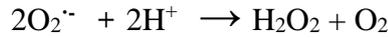
تشمل الجذور الحرة الأكسجينية ROS والجذور الحرة النيتروجينية RNS جذورا مثل: superoxide (O_2^-) والهيدروكسيل (OH^\cdot) والبيروكسيل (RO_2^\cdot) والهيدروبيروكسيل (HO_2^\cdot) والalkoxy (RO^\cdot) وأكسيد النيتروجين nitric oxide (NO^\cdot) و nitrogen dioxide (NO_2^\cdot) وبيروكسيل اللبيدات (LOO^\cdot) ومن جانب آخر تتضمن جزيئات غير جذرية مثل hydrogen peroxide (H_2O_2) و hypochlorous acid ($HOCl$) والأوزون (O_3) و singlet oxygen ($^1\Delta g$) و peroxynitrate ($ONOO^\cdot$) و nitrous acid (HNO_2) و dinitrogen trioxide و lipid peroxide (LOOH) (Sisein، 2014) (جدول 1).

الجدول 1: الأهمية البيولوجية للجذور الحرة الأكسجينية و الآزوتية (Devasagayam وآخرون، 2004).

Reactivity/Remarks	زمن نصف الحياة (ثانية)	الرمز	أنواع الجذور الحرة
أنواع الجذور الأكسجينية			
يتم إنتاجه في ميتوكوندريا خلايا القلب والأوعية الدموية.	⁶⁻¹⁰	$O_2^{\cdot-}$	جذر فوق الأكسيد
يتميز بنشاطية عالية، يتم إنتاجه في حالة زيادة تركيز الحديد.	⁹⁻¹⁰	OH^{\cdot}	جذر الهيدروكسيل
ينتج عن عدة تفاعلات ويسمح بإنتاج جذور فعالة مثل OH^{\cdot} .	ثابت	H_2O_2	فوق أكسيد الهيدروجين
نشط، ينتج عن الليبيدات والبروتينات و DNA والسكريات أثناء الضرر التأكسدي	ثا	RO_2^{\cdot}	جذر البيروكسيل
يتفاعل مع أيونات المعادن الانتقالية لإنتاج الجذور النشطة.	ثابت	$ROOH$	هيدروبيروكسيد عضوي
شديد التفاعل، ينتج أثناء photosensitisation والتفاعلات الكيميائية.	⁶⁻¹⁰	1O_2	الأكسجين الأحادي
ملوث للجو، يمكن أن يتفاعل مع مواد مختلفة منتجا 1O_2 .	ثا	O_3	الأوزون
أنواع الجذور النيتروجينية			
ناقل عصبي و منظم للضغط الدموي، تنتج عنه مؤكسدات نشطة في الحالات المرضية.	ثا	NO^{\cdot}	أكسيد الآزوت
يتكون ابتداء من NO^{\cdot} وجذر فوق الأكسيد، عالي النشاطية.	³⁻¹⁰	$ONOO^{\cdot}$	بيروكسينيتريت
الشكل protonated لـ $ONOO^{\cdot}$.	ثابت إلى حد ما	$ONOOH$	حمض peroxyntrous
يتشكل خلال تلوث الهواء.	ثا	NO_2	ثاني أكسيد الآزوت

أ. جذر فوق الأكسيد ($O_2^{\cdot-}$)

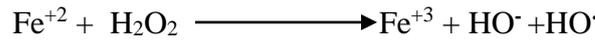
جذر فوق الأكسيد $O_2^{\cdot-}$ جذر حر ابتدائي، يتكون خلال نقل الأيونات على مستوى الميتوكوندريا (Gutowski و Kowalczyk، 2013). تنتج الميتوكوندريا الطاقة عن طريق سلاسل تفاعلات بأربع إلكترونات، محولة بذلك الأكسجين إلى ماء. تتفاعل بعض الإلكترونات التي أفلتت من سلسلة التفاعلات الميتوكوندريا، مباشرة مع الأكسجين مشكلة $O_2^{\cdot-}$. يعتبر $O_2^{\cdot-}$ طليعا لجذور أكسجينية أخرى مثل بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 وجذر الهيدروكسيل OH^{\cdot} والأكسجين الأحادي 1O_2



لجذر فوق الأكسيد القدرة على فوق أكسدة الليبيدات وخفض نشاطية الإنزيمات المضادة للأكسدة مثل catalase والغلوتاثيون بيروكسيد (GPx) وتخریب النيكلوتيد الريبي الضروري لبناء DNA. يعتبر HO_2 الشكل Protoné لـ $O_2^{\cdot-}$ وهو أكثر نشاطية ويمكنه عبور الغشاء وإلحاق أضرار بالأنسجة (Saikat وآخرون، 2010).

ب. جذر الهيدروكسيل (OH^{\cdot})

يتميز جذر الهيدروكسيل OH^{\cdot} بقدرة عالية على التفاعل، تجعله جذرا خطيرا بنصف حياة قصيرة جدا، تقريبا 10^{-9} ثانية. وبالتالي فهو يتفاعل قريبا من موقع تكوينه (Sisein، 2014). يتم إنتاج جذر الهيدروكسيل ابتداء من H_2O_2 بتدخل أيونات Fe^{+2} حسب تفاعل Fenton:



أو عن طريق تفاعل Haber-Weiss في وجود بيروكسيد الهيدروجين و جذر فوق الأكسيد



يتفاعل جذر الهيدروكسيل تقريبا مع كل الجزيئات الموجودة في الخلية؛ سكريات وأحماض أمينية وفوسفوليبيدات و DNA وأحماض عضوية (Gutowski و Kowalczyk، 2013).

ج. الأكسجين الأحادي 1O_2

الأكسجين الأحادي ليس جذرا، إنما هو جزيئة أكسجين في حالة مهيجة. يتكون نتيجة تفاعل بيروكسيد الهيدروجين مع جذر فوق الأكسيد أو مع HOCl.

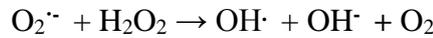


يمكن للأكسجين الأحادي أن يتفاعل مع العديد من الجزيئات مثل DNA والبروتينات والليبيدات (Gutowski وKowalczyk، 2013).

د. الماء المؤكسج H_2O_2

ينتج جزيء الماء المؤكسج (فوق أكسيد الهيدروجين) ابتداء من جذر فوق الأكسيد بتحفيز من إنزيم superoxide dismutase. كما يمكن أيضا لإنزيمات أخرى مثل amino acid oxidase و xanthine oxidase أن تنتج هذا الجزيء.

ينتج جذر الهيدوكسيل عن تفاعل الماء المؤكسج في وجود أيونات معدنية وجذر فوق الأكسيد حسب التفاعل:



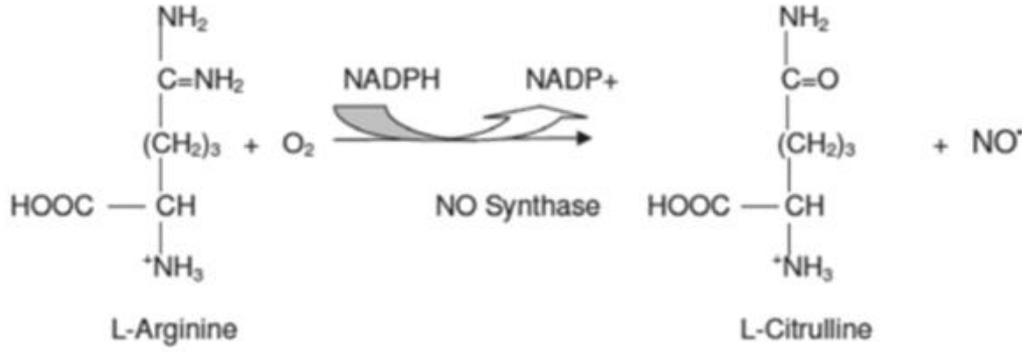
كما يمكن لفوق أكسيد الهيدروجين أن يعطي الأكسجين الأحادي 1O_2 بتفاعله مع جذر فوق الأكسيد أو HOCl. يمكن لبيروكسيد الهيدروجين أن يعبر الغشاء البلازمي بسهولة (Sisein، 2014). لا يعتبر فوق أكسيد الهيدروجين جذرا، إلا أنه يسبب تحريبا ل DNA وتفكك الغشاء البلازمي وتحرير أيونات الكالسيوم داخل الخلية، وينتج عن ذلك تنشيط الإنزيمات المحللة للبروتينات المرتبطة في نشاطها بالكالسيوم (Saikat وآخرون، 2010).

ه. هيدروكسيل الكلور HOCl

هيدروكسيل الكلور ذو طبيعة غير جذرية، يتم إنتاجه بتحفيز من إنزيم myeloperoxidase في الخلايا المتعادلة المنشطة ابتداء من بيروكسيد الهيدروجين، يثبط نشاط α 1-antiproteinase منشطا بذلك الإنزيمات المحللة للبروتينات مثل elastase متسببا بالتالي في تخریب الأنسجة. كما يمكنه تخریب الجزيئات العضوية مباشرة كالبروتينات و DNA والأحماض الدهنية غير المشبعة التي تدخل في تركيب الفوسفوليبيدات (Sisein، 2014).

و. أكسيد الآزوت ($NO\cdot$)

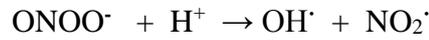
يتم إنتاج جذر أكسيد الآزوت في الأنسجة الحية بتحفيز من إنزيمات nitric oxide synthases (NOSs) التي تستقلب الحمض الأميني arginine إلى citrulline مع إنتاج أكسيد الآزوت (شكل 2).



الشكل 2: تفاعل أكسدة arginine لإنتاج citrulline وأكسيد الأزوت (Kowalczyk و Gutowski، 2013).

جذر أكسيد النتروجين ذو وظائف فيزيولوجية متعددة إذ يتدخل في النقل العصبي وتنظيم الضغط الدموي وارتخاء العضلات الملساء و المناعة. قابل للذوبان في الأوساط المائية و اللييدية وعند تفاعله مع الأكسجين والماء يسمح بتكوين نيترات و أيونات النيتريت.

يمكن أن يتفاعل أكسيد الأزوت مع جذر فوق الأكسيد لتشكيل البيروكسينيتريت (ONOO⁻). يسمح هذا الأخير بإنتاج مركبات سامة مثل جذر الهيدروكسيل وثنائي أكسيد الأزوت (NO₂[•]) (Sisein، 2014).



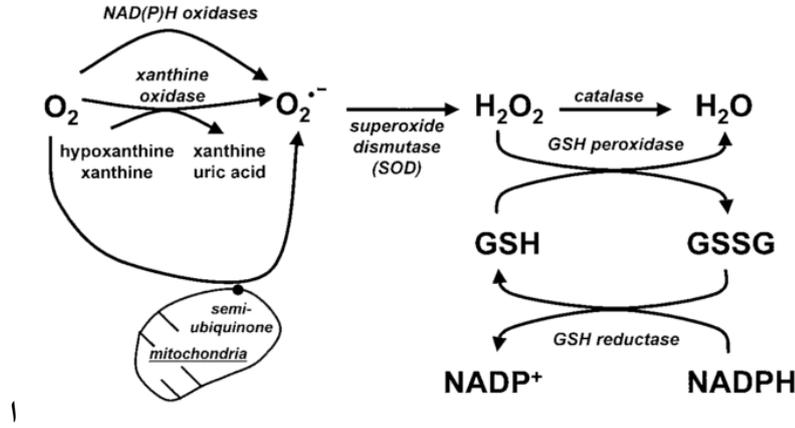
يعتبر البيروكسينيتريت عاملاً مؤكسداً فعالاً، يمكنه تفكيك DNA وأكسدة اللييدات والبروتينات (Gutowski و Kowalczyk، 2013).

تسمى الزيادة في إنتاج الأنواع النيتروجينية بالإجهاد النيتروجيني. يحدث هذا في حالة كون معدل إنتاج هذه الجذور يفوق قدرة النظام على التخلص منها وإزالة مفعولها. ينتج عن هذا الإجهاد تفاعلات تُغير في بني البروتينات وبالتالي تثبط نشاطها الطبيعي (Sisein، 2014).

2.1.1. مصادر الجذور الحرة

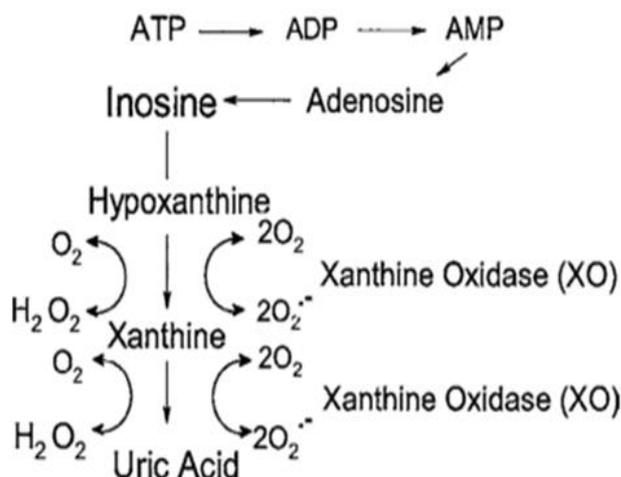
تظهر الجذور الحرة نتيجة عدة مسالك، المصدر الرئيسي لها هو الاستقلاب الخلوي؛ غير أن هذا الأخير لا يعتبر الآلية الوحيدة المحفزة للإجهاد التأكسدي. يلعب الوسط دوراً مهماً في إنتاج الجذور الحرة (كلا من ROS و RNS) مثل تلوث الهواء والإشعاع بالموجات فوق البنفسجية والموجات السينية والموجات gamma (مركبات أو مواد خارجية).

أهم المصادر الداخلية للجذور الحرة هي سيتوكروم P450 وبيروكسيزوم وميكروزوم والتفاعلات المحفزة بالمعادن والخلايا المتعادلة والخلايا الحمضية والخلايا البالعة أثناء الالتهاب وتفاعلات نقل الإلكترونات في الميتوكوندريا (في المركبين I و III) (Muriel و Casas-Grajales، 2015) (شكل 2).



الشكل 2: مسالك إنتاج وتحويل الجذور الحرة الأوكسجينية (Dröge، 2002).

يعتقد أن Ubisemiquinone أهم مصدر لإرجاع الأوكسجين في الأغشية الميتوكوندرية، حيث تولد الميتوكوندريا تقريبا 2-3 نانومول من $O_2^{\bullet -}$ / دقيقة / مغ من البروتين. كما توجد مصادر أخرى لجذر فوق الأوكسيد كإنزيم xanthine oxidase الذي يلعب دورا مهما في أيض البورينات (Rahman، 2007). يحفز إنزيم xanthine oxydase أكسدة الهيدروكسي كسانثين للحصول على الكسانثين الذي ينتج عنه حمض اليوريا. في كلا التفاعلين يتم أكسدة الأوكسجين الجزيئي للحصول على $O_2^{\bullet -}$ في مرحلة أولى وبيروكسيد الهيدوجين في مرحلة ثانية (Terkelbaut وآخرون، 2006) (شكل 3).



الشكل 3: إنتاج جذر فوق الأوكسيد بتدخل إنزيم xanthine oxydase (Valko وآخرون، 2004).

تحفز الخلايا المتهمة زيادة في استهلاك الأوكسجين، ينتج عنها $O_2^{\cdot-}$ و أكسيد الآزوت و H_2O_2 (Rahman، 2007). في الخلايا المتعادلة يولد [NAD(P)H] oxidase أنيون $O_2^{\cdot-}$ الضروري لتخريب البكتيريا (Valko وآخرون، 2004).

تمثل إنزيمات cytochrome P450 مصدرا آخر لإنتاج الجذور الحرة الأوكسجينية خلال إزالة سمية الجزئيات الغريبة وتحويلها إلى مركبات أقل سمية بالنسبة للخلية. حيث يستعمل إنزيم cytochrome P450 الأوكسجين لأوكسدة هذه الجزئيات الغريبة؛ ويتم خلال هذه التفاعلات إنتاج جذور فوق الأوكسيد (Hoey و Butler، 1993). يعتبر الكبد العضو الرئيسي للإنتاج بيروكسيد الهيدوجين من طرف البيروكسيزومات.

من جهة أخرى، يتم بناء الجذور الحرة النيتروجينية بتدخل إنزيمات nitric oxide synthases (NOSs) التي تحفز تحويل الأرجنين إلى سيترولين.

تتواجد إنزيمات NOSs بثلاثة أشكال؛ عصبي (nNOS) و تحفيزي (iNOS) و بطاني (eNOS). يتواجد الشكلان العصبي والبطاني في الخلية بشكل دائم ويتم تنظيم نشاطها عن طريق تركيز الكالسيوم داخل خلوي. في حين يتم بناء الشكل التحفيزي في الخلايا المتهمة بتحفيز من lipopolysaccharides و cytokines وعوامل أخرى (Valko وآخرون، 2007).

لخلايا الجهاز المناعي القدرة على إنتاج أكسيد النيتريك خلال تفاعلات الأوكسدة المحفزة أثناء التفاعلات الإلتهابية. يمكن أن يتفاعل أكسيد النيتريك NO مع $O_2^{\cdot-}$ منتجين جذرا حرا أكثر تفاعلية وهو أنيون بيروكسينيتريت ($ONOO^{\cdot-}$) الذي يسبب فوق الأوكسدة الليبدية وتكسير DNA.

3.1.1. الأدوار الفيزيولوجية للجذور الحرة

يمكن لأغلب الخلايا أن تنتج جذور فوق الأكسيد وبيروكسيد الهيدروجين وأكسيد الآزوت حسب الحاجة (Devasagayam وآخرون، 2004) لأنها عند التراكيز المنخفضة (الضعيفة) أو المعتدلة ضرورية لاستكمال وظائف بعض البنى الخلوية، كما أنها تستعمل كأسلحة في نظام الدفاع عن الجسم (Das Sarma وآخرون، 2010). حيث تنتج الخلايا البالعة (المتعادلة والملتهمة الضخمة والخلايا الأحادية monocytes) الجذور الحرة لهدم الأحياء الدقيقة الدخيلة.

يظهر بشكل جلي دور الجذور الحرة الأكسجينية في النظام المناعي عند المصابين بمرض granulomatous. يتميز هؤلاء المرضى بنقص في نظام NADPH oxidase المرتبط بالغشاء الخلوي، مما يجعلهم غير قادرين على إنتاج جذر O_2^- وبالتالي الإصابة بالالتهابات الدائمة والمتعددة (Pham-Huy وآخرون، 2008).

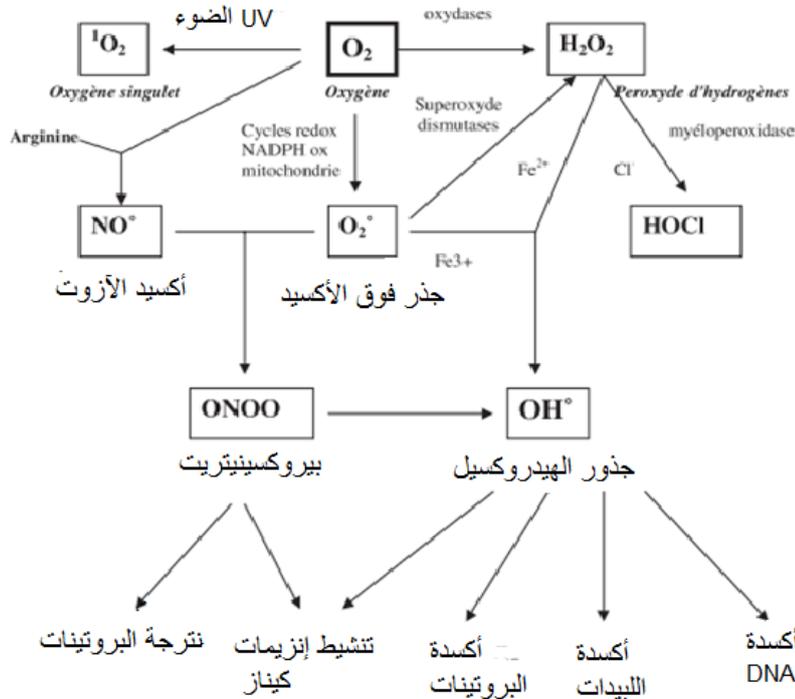
تتميز الجذور الحرة الأكسجينية والنيتروجينية بأدوار فيزيولوجية في عدد من أنظمة نقل الإشارة بين الخلايا. يلعب إنتاجها من طرف نظائر NADPH oxidase في الخلايا غير الملتزمة دوراً مفتاحاً في تنظيم سلسلة التفاعلات داخل الخلايا في أنماط مختلفة منها الخلايا البطانية وخلايا العضلات الملساء الوعائية وخلايا عضلة القلب وخلايا الغدة الدرقية (Valko وآخرون، 2007).

يعتبر أكسيد الآزوت رسولاً لتنظيم جريان الدم وتخثر الدم والنشاط العصبي، كما يتدخل أكسيد النتريت في الدفاع غير النوعي للخلية وقتل العوامل الممرضة والأورام. من جانب آخر، يقوم كلا من جذر فوق الأكسيد وبيروكسيد الهيدروجين بدور الرسول الثاني في تنظيم النشاط الخلوي (Devasagayam وآخرون، 2004)؛ إذ تنشط الجينات المشفرة للعامل NFκB (Valko وآخرون، 2007) وللسيتوكينات TNF و IL1 و IL6 و البروتين p21 والإنزيمات lipoprotein lipase و collagenase و aldose reductase و tyrosine protease و phosphatase و ornithine decarboxylase وتنشط الجينات المشفرة لمنشط plasminogene و Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) (Favier، 2003).

للجذور الحرة أيضاً دور في عملية الإلقاح، إذ تفرز النطاف كميات كبيرة منها لاختراق الغشاء البلازمي للبويضة (Haleng وآخرون، 2007).

4.1.1. الجزئيات المستهدفة من طرف الجذور الحرة

الطبيعة غير المستقرة للجذور الحرة، تجعلها شديدة التفاعل تجاه الجزئيات المكونة للخلايا ك DNA والبروتينات والليبيدات (Haleng وآخرون، 2007) (شكل 4).



الشكل 4: أهم الجذور الحرة وأنواع الجزئيات المستهدفة من طرفها (Favier، 2003).

أ. الحمض الريبي منقوص الأكسجين DNA

تستهدف الجذور الحرة DNA بشكل كبير، إذ بإمكان guanine أن تتفاعل مع OH^{\cdot} لتشكيل 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. يرتبط هذا الأخير مع الأدنين بدل السيتوزين، مؤدياً بذلك إلى ظهور طفرات على مستوى المادة الوراثية مما يسبب الشيخوخة وظهور أمراض مثل السرطان (Favier، 2003).

ب. البروتينات

تتميز الأحماض الأمينية بحساسيات مختلفة تجاه الجذور الحرة، الأكثر تفاعلاً منها الهستيدين والبرولين والتريبتوفان والسيسيتين والتيروزين. ينجم عن أي هجوم على الأحماض الأمينية من طرف الجذور الحرة أكسدة الأحماض، وبالتالي ظهور مجاميع كربونيلية وقطع السلاسل الببتيدية وتكوين جسور ثنائية التيروزين داخل السلاسل وبين السلاسل. أغلب الأضرار لا يمكن إصلاحها ويمكن أن ينجر عنها تغيرات وظيفية مهمة؛ أهمها عدم تعرف

الربطة على مستقبلها أو فقدان النشاطية الإنزيمية. تشكل بعض البروتينات المؤكسدة كتل تتراكم داخل الخلايا وخارجها.

ج. الليبيدات الغشائية

يمكن لجذر الهيدروكسيل أن يهاجم الأحماض الدهنية غير المشبعة إذ ينتزع هيدروجينا من إحدى ذرتي الكربون للرابطة الثنائية، تسمى هذه المرحلة بالمرحلة الابتدائية. يتفاعل الجذر الليبيدي الناتج مع جزيئة أكسجين لتشكيل جذر بيروكسيل (ROO[•]) يمكنه انتزاع بروتون من حمض دهني غير مشبع مجاور (مرحلة الانتشار).

ينتج عن هذه التفاعلات تغير في طبيعة الغشاء البلازمي وفي ميوعة الغشاء التي تؤدي إلى موت الخلية.

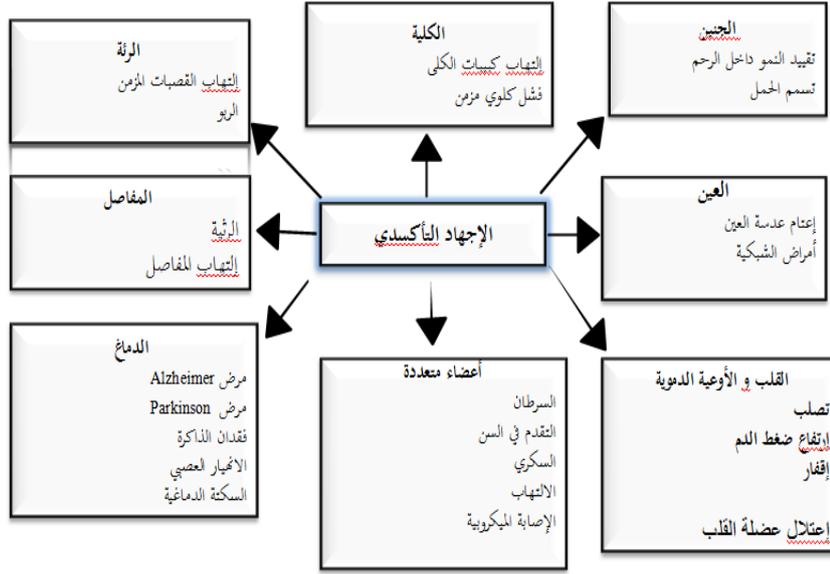
يتم إبطال مفعول البيروكسيدات الناتجة من طرف إنزيم glutathion peroxidase أو تستمر في التأكسد والتحول إلى ألدهيدات (malondialdehyde و 4-hydroxynonenal) تتميز بنشاطية مؤيدة للتعصد pro-atherogenic.

د. الليبيدات البروتينية

يؤدي هجوم الجذور الحرة على الليبيدات البروتينية إلى تشكل LDL مؤكسدة بإمكانها أن ترتبط بمستقبلات متخصصة على الملتهمات العملاقة. تتحول هذه الأخيرة تدريجيا إلى خلايا مزيدة (spumeuse) (دور مهم في المراحل الأولى من تصلب الشرايين. من جانب آخر، بإمكان هذه LDL المؤكسدة أن تنشط المركبات المناعية الناتجة عن المسلك الكلاسيكي للمتممة وبالتالي إفراز السيتوكينات المؤيدة للالتهاب من طرف الملتهمات العملاقة (Saad وآخرون، 2006).

1.1.5. الأمراض المرتبطة بالجذور الحرة

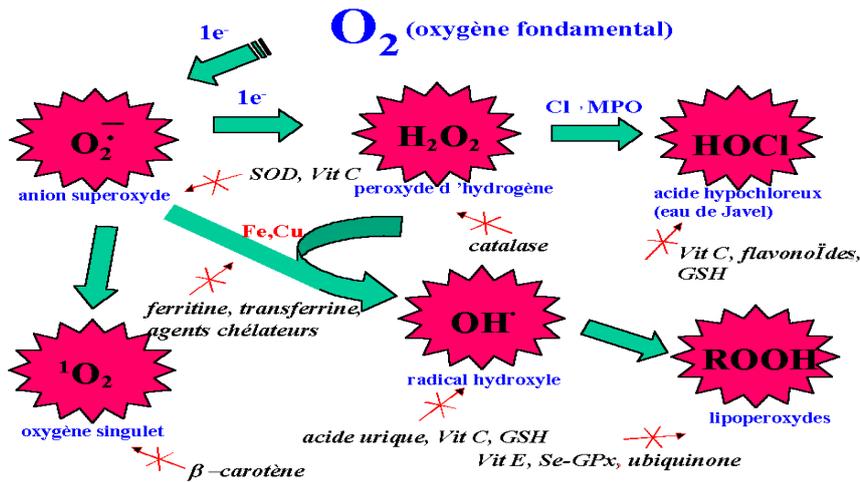
تؤدي التغيرات الناتجة عن استهداف الجذور الحرة لعدد من الجزيئات مثل DNA والبروتينات والليبيدات إلى ظهور العديد من الأمراض المزمنة كالسرطان وتصلب الشرايين atherosclerosis والإقفار ischemia وارتفاع الضغط الدموي والأمراض العصبية (Alzheimer و Parkinson) والربو والتهاب المفاصل وبعض أمراض الكلى والسكري وغيرها (شكل 5) (Pham-Hyu وآخرون، 2008).



الشكل 5: أهم الأمراض الناجمة عن الإجهاد التأكسدي (Pham-Hyu وآخرون، 2008).

2. مضادات الأكسدة

يطلق مصطلح مضاد للأكسدة على أي جزيئة يمكنها تثبيت أو إزالة فعالية الجذور الحرة قبل هجومها على الخلايا. يملك جسم الإنسان أنظمة مضادة للأكسدة عالية التعقيد (إنزيمية وغير إنزيمية)، تعمل بشكل تآزري وبالتنسيق في ما بينها لحماية الخلايا من تحريب الجذور الحرة (شكل 6). قد تكون مضادات الأكسدة داخلية أو يتم الحصول عليها من خارج الجسم، في إطار حمية أو كمكمل غذائي (Sisein، 2014).



الشكل 6: تنظيم إنتاج الجذور الحرة الأوكسجينية من طرف مضادة الأكسدة الإنزيمية وغير الإنزيمية (Haleng وآخرون، 2007).

1.2. مضادات الأكسدة الإنزيمية

1.1.2. إنزيم Superoxide dismutase (SOD)

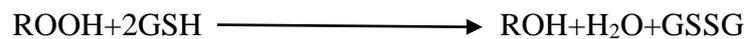
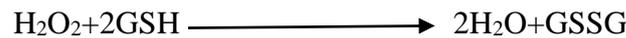
إنزيم فوق أكسيد الديسموتاز أحد أكثر الإنزيمات المضادة للأكسدة فعالية، حيث يلعب دور نظام الدفاع الأول تجاه الجذور الكسجينية إذ يحفز تحويل أنيونات فوق الأكسيد إلى أكسجين و بيروكسيد الهيدروجين (Saikat و آخرون، 2010). يتواجد هذا الإنزيم بشكل نظائر تختلف في ما بينها من حيث طبيعة المعدن الموجود في الموقع النشط و الأحماض الأمينية الداخلة في تركيب البروتين و العوامل المساعدة. تتواجد عند الإنسان ثلاثة نظائر: Cu-SOD و Zn-SOD يتواجدان على مستوى السيتوزول و Mn-SOD الميتوكوندري و SOD خارج خلوي (Tower و Landis، 2005).

2.1.2. إنزيم Catalase

يتواجد هذا الإنزيم في بيروكسيزومات الخلايا الهوائية، فعال جدا في تحفيز تحويل بيروكسيد الهيدروجين إلى ماء و أكسجين؛ بنشاطية جزئية 6-10⁶ دقيقة⁻¹ (Sisein، 2014).

3.1.2. إنزيم Glutathione peroxidase و إنزيم Glutathione transferase

إنزيم Glutathione peroxidase (GPx, EC 1. 11. 1. 19.) مرتبط في نشاطه بالسيلينيوم أما إنزيم Glutathione transferase (GST, EC 2. 5. 1. 18.) فنشاطه غير متعلق بالسيلينيوم. يظهر الاختلاف بينهما في عدد تحت الوحدات و الآلية التحفيزية و ارتباط السيلينيوم بالموقع النشط. تسمح هذه الإنزيمات بالتخلص من البيروكسيدات؛ مواد التفاعل لتفاعل Fenton. تعمل GPx بالتعاون مع الغلوتاثيون على تحفيز تحويل بيروكسيد الهيدروجين أو البيروكسيدات العضوية إلى ماء أو كحول (Saikat و آخرون، 2010) حسب التفاعلين:



يعتبر استقلاب الغلوتاثيون أحد أهم آليات الدفاع المضادة للأكسدة الموجودة داخل الخلية (Saikat و آخرون، 2010).

4.1.2. إنزيمات Thioredoxin (TRX)

يتواجد هذا النوع من البروتينات في كل أنواع الخلايا الحية، تملك موقعا نشطا محافظ عليه (Cys-Gly-Pro-Cys) وتحتوي في حالتها المرجعة على مجموعتي ثيول متجاورتين تتحولان إلى وحدة ثنائي كبريتيد في الحالة المؤكسدة لـ TRX (Sisein، 2014). تتدخل في تخريب البيروكسيدات الليبيدية و بيروكسيد الهيدروجين وفي تجديد الحمض أسكوربيك ابتداء من الجذر أسكوربيل (Haleng وآخرون، 2007).

2.2. مضادات الأكسدة غير الإنزيمية

1.2.2. الغلوتاثيون (GSH) والألبومين

الغلوتاثيون ببتيد ثلاثي (Glu-Cys-Gly) وهو أهم مضاد أكسدة بمجموع ثيول، يتواجد بوفرة في السيتوزول والنواة و الميتوكوندريا. GSH هو الشكل المرجع للغلوتاثيون في حين أن الشكل المؤكسد هو GSSG. ترجع قدرة المركبات بمجموع ثيول المضادة للأكسدة إلى ذرة كبريت التي تتكيف بسهولة مع فقدان إلكترون واحد. يتمثل الدور الواقعي للغلوتاثيون في أنه يعمل كعامل مساعد للعديد من إنزيمات إزالة السموم detoxifying enzymes ويشترك في نقل الأحماض الأمينية عبر الغشاء البلازمي ويزيح جذر الهيدروكسيل والأكسجين الأحادي بشكل مباشر وتجديد الفيتامينات C و E بإرجاعهما إلى شكلهما النشط (Sisein، 2014)، كما أنه عامل مستحلب للمعادن الانتقالية transition.

يحتوي الألبومين على مجاميع ثيول تتميز بخصائص مرجعة تسهل إزاحة الجذور الحرة في البلازما (Haleng وآخرون، 2007).

2.2.2. فيتامين E

يذوب فيتامين E في الدهون ويتواجد بثمانية أشكال. عند الإنسان، α -tocopherol هو الشكل الأكثر نشاطا و أقوى مضاد أكسدة مرتبط بالغشاء. أهم دور للفيتامين E هو حماية الخلية من الأكسدة الليبيدية إذ يتخلى عن هيدروجين لصالح جذر ليبيدي أو جذر بيروكسيل ليبيدي؛ ينتج عن هذا التفاعل جذر α -tocopherol (Haleng وآخرون، 2007). يعمل الفيتامينين E و C معا، حيث يرجع الفيتامين C جذر α -tocopherol محولا إياه إلى الشكل الطبيعي. يمكن لـ α -tocopherol إزاحة الأكسجين الأحادي بمعدل أعلى من β -tocopherol

و γ -tocopherol و σ -tocopherol في حين أن σ -tocopherol أكثر فعالية في إزالة مفعول ثنائي أكسيد النيتروجين وجذر بيروكسينيتريت من α -tocopherol (Sisein، 2014).

3.2.2. فيتامين C

الفيتامين C أو ما يعرف بحمض الأسكوربيك عبارة عن حلقة لاكتون بست ذرات كربون وجزء 2,3-enediol. يرجع نشاط حمض الأسكوربيك المضاد للأكسدة إلى هذا الأخير. يتحول حمض الأسكوربيك أولاً إلى حمض semi-dehydroascorbic بتخليه عن ذرة هيدروجين وإلكترون ثم إلى حمض L-dihydroascorbic بإعطائه مرة ثانية ذرة هيدروجين وإلكترون.

تعتمد الآليات المضادة للأكسدة لحمض الأسكوربيك على إعطائه ذرة هيدروجين للجذور الليبية وإزاحة الأكسجين الأحادي و الجذور القابلة للذوبان في الماء وتحديد α -tocopherol (Sisein، 2014). لحمض الأسكوربيك أدوار أخرى كالمشاركة في تنظيم عمل النظام المناعي وبناء الكولاجين والكريات الحمراء كما يتدخل في آليات استقلاب الحديد (Haleng وآخرون، 2007).

4.2.2. الكاروتينويدات

يتواجد قسمان من الكاروتينويدات : الكاروتينات و xanthophylls، تتكون الكاروتينات من سلسلة هيدروكربونية في حين تحتوي xanthophylls بالإضافة إلى السلسلة الهيدروكربونية على الأكسجين على شكل هيدروكسيل أو ميثوكسيل أو كربوكسيل أو مجاميع كيتو أو إيبوكسي. بنى الكاروتينويدات غير حاوية على حلقات مثل lycopene أو بحلقة واحدة مثل γ -carotene أو بحلقتين مثل α -carotene و β -carotene. تحتوي الكاروتينويدات على روابط مزدوجة مترافقة تمنحها نشاطها المضاد للأكسدة. يسمح هذا النوع من الروابط للكاروتينويدات بإزاحة الأكسجين الأحادي وأن تتفاعل مع الجذور الحرة وأن تزيح الجذور البيروكسيدية وبالتالي تسمح بحماية المواقع المحبة للدهون (Rahman، 2007). ترتبط فعالية الكاروتينويدات بعدد الروابط المزدوجة الموجودة في الجزيئة (Sisein، 2014).

5.2.2. عديدات الفينول

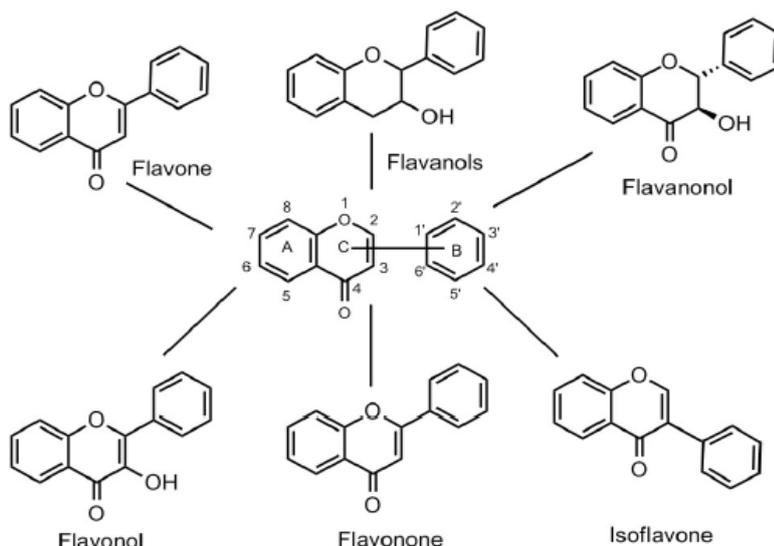
عديدات الفينول أو المركبات الفينولية مستقلبات ثانوية موجودة في كل النباتات. تلعب دورا أساسيا في اجتذاب الملقحات كما تستعملها النباتات لمواجهة الإصابات الناجمة عن الأحياء الدقيقة والتخريب الناتج عن الحشرات (Li وآخرون، 2012).

تحتوي المركبات الفينولية على الأقل مجموعة هيدروكسيل مرتبطة بحلقة عطرية (Tsao، 2010)؛ منها الأحماض الفينولية (C₆-C₁) و (C₆-C₁-C₆) xanthones و anthraquinones أو (C₆-C₂-C₆) stilbenes والفلافونويدات (C₆-C₃-C₆) و (C₆-C₃)₂ Lignans والديباغ (مركبات فينولية بوزن جزيئي عال نسبيا) (Lattanzio، 2013)، و (C₆-C₃) coumarins (Pereira وآخرون، 2009).

تعتمد الآليات المضادة للأكسدة لعديدات الفينول على قدرتها على التخلي عن هيدروجين (Sisein، 2014) واستخلاص أيونات معدنية، كما يمكنها تخفيض فوق أكسدة اللييدات وتثبيت النيترات وبالتالي تفادي تكوين المركبات النتروجينية المطفرة (Li وآخرون، 2012). إلا أن عديدات الفينول تصبح مسببة للأكسدة في ظروف معينة كزيادة تركيزها أو زيادة تركيز الأيونات المعدنية أو الأس الهيدروجيني العالي (Sisein، 2014).

6.2.2. الفلافونويدات

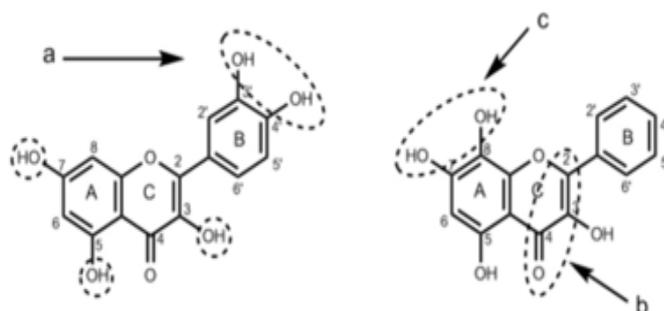
تعتبر الفلافونويدات أوسع قسم من المستقلبات الثانوية النباتية (Sisein، 2014). تحتوي الفلافونويدات على حلقتي بنزين مرتبطتين فيما بينهما بحلقة pyran غير متجانسة. تختلف الفلافونويدات فيما بينها من حيث مواقع ارتباط المجاميع هيدروكسيل و ميثوكسيل و الغليكوزيدية إن وجدت. تشمل الفلافونويدات عدة تحت مجموعات منها flavones و flavonols و flavanones و flavanonols و anthocyanins (Rahman، 2007) (شكل 7).



الشكل 7: البنية الكيميائية العامة للفلافونويدات ومختلف الأقسام المنتمية لها (Artanti و Banjarnahor ، 2014).

العلاقة بنية - وظيفة

أجريت العديد من الأبحاث باستعمال فلافونويدات طبيعية للربط بين بنية الفلافونويدات ونشاطها المضاد للأوكسدة، حيث تم إثبات ارتباط بني كيميائية مميزة بنشاط الفلافونويدات المضاد للأوكسدة؛ من بين هذه البنى مجاميع الهيدروكسيل (a) و الرابطة الثنائية بين ذرتي الكربون رقم 2 و 3 المرتبطة بمجموعة كربونيل على الكربون رقم 4 (b) و مجاميع O-methyl (c) (Bubols و آخرون، 2013) (شكل 8).



الشكل 8: أهم المواقع في بني الفلافونويدات المؤثرة على النشاط المضاد للأوكسدة (Artanti و Banjarnahor ، 2014).

تعطي مجموعة الهيدروكسيل الحرة ذرة هيدروجين للجزيء الجذري، مم يسمح باستقرار هذا الأخير وبظهور جذر phenoxyl مستقر نسبياً. ترجع إزاحة كلا من الجذور الحرة الأكسجينية والأزوتية بشكل أقصى إلى مجموعة هيدروكسيل الحلقة B. تعطي مجاميع الهيدروكسيل هيروجين وإلكترون لجذر الهيدروكسيل وجذر peroxy و جذر peroxy nitrite مم يسمح باستقرار هذه الجذور وظهور جذر فلافونويد مستقر نسبياً (Heijnen وآخرون، 2001).

أكدت العديد من الدراسات أهمية ارتباط وجود الرابطة غير المشبعة بين الكربونين 2 و 3 و مجموعة الكربونيل على الكربون رقم 4 حيث أن غياب أحدهما أو كلاهما يؤدي إلى تخفيض النشاط المضاد للأكسدة بشكل معتبر (Liu و Wollfe، 2008).

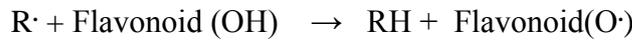
وجود المجاميع O-methyl ميزة أخرى للنشاطية المضادة للأكسدة؛ إذ أن flavones الممثلة أكثر ثباتاً أثناء استقلالها في الكبد وتتميز بامتصاصية أعلى على مستوى الأمعاء. لوحظت هذه الخصائص مع 5,7- dimethoxyflavone و 5,7,4-trimethoxyflavone (Walle وآخرون، 2007).

3.2. تأثيرات الفلافونويدات المضادة للأكسدة

يمكن للفلافونويدات أن تمنع الضرر الناتج عن الجذور الحرة بطرق عديدة منها:

1.3.2. الإزاحة المباشرة للجذور الحرة

تؤثر الفلافونويدات مباشرة على الجذور الحرة بالتفاعل مع الجزء الأكثر فعالية في الجذر. يتدخل في هذا التفاعل وظيفة الهيدروكسيل عالية النشاط الموجودة في الفلافونويدات و يصبح الجذر معطلا حسب التفاعل:



يمكن لبعض الفلافونويدات إزاحة superoxides مباشرة في حين يمكن لفلافونويدات أخرى أن تزيح الجذر بيروكسينيتريت عالي الفعالية و الذي يؤكسد LDL ويخرب لبيدات الغشاء البلازمي. يتميز كلا من Epicatechin والروتين بقوة إزاحة عالية؛ قد تعود فعالية الروتين إلى نشاطها المثبط لإنزيم xanthine oxidase (Nijvelt وآخرون، 2001). كما يثبط الفلافونويد silibin الجذر NO بشكل مرتبط بالتركيز (Dehmlow وآخرون، 1996). بتأثيرها على الجذور الحرة، يمكن للفلافونويدات تثبيط أكسدة LDL في المختبر. وبحمية جزيئات LDL، يمكن أن يكون للفلافونويدات تأثير وقائي تجاه مرض تصلب الشرايين.

2.3.2. تثبيط إنزيم xanthine oxidase

في مرحلة الاحتقان يتفاعل إنزيم xanthine oxidase مع جزيئات الأوكسجين منتجا جذور فوق الأوكسيد. يثبط كلا من quercetin و silibin نشاط إنزيم xanthine oxidase و بالتالي يخفضان الضرر الناتج عن الإجهاد التأكسدي (Chang وآخرون، 1993). كما بين Cos ورفقاؤه (1998) في دراسة شملت 30 فلافونويدا أن الفلافون luteolin هو الأكثر فعالية في تثبيط xanthine oxidase.

3.3.2. إستخلاص المعادن مثل الحديد

تنتج فوق أكسدة الليبيدات عن تفاعل الجذور الحرة الأوكسجينية مع الحديد حسب تفاعل Fenton. يتميز quercetin باستخلاصه للحديد وبالتالي فهو يثبط بشكل مباشر فوق الأوكسدة الليبيدية (Durga وآخرون، 2014).

4.3.2. تنشيط الإنزيمات المضادة للأوكسدة

يعتبر تنشيط الإنزيمات المضادة للأوكسدة آلية أخرى تعمل من خلالها الفلافونويدات كمضادات أكسدة. من بين هذه الإنزيمات UDP-glucuronosyltransferases و sulfotransferases و N-acetyltransferases و glutathione S-transferases و methyltransferases (Artanti و Banjarnahor، 2014). يمكن للفلافونويد silymarin أن يخفض من معدل فوق الأوكسدة الليبيدية ويزيد نشاطية كل من superoxide dismutase و glutathione peroxidase و catalase (Soto وآخرون، 2003).

5.3.2. تخفيض تحرير إنزيم بيروكسيداز

من ميزات الفلافونويدات أنها تخفض تحرير إنزيم بيروكسيداز؛ يثبط هذا التخفيض إنتاج الجذور الحرة الأوكسجينية من طرف الخلايا المتعادلة بالتداخل مع تنشيط α_1 -antitrypsin (Nijvelt وآخرون، 2001).

قد تؤثر الفلافونويدات عن طريق تخفيف الإجهاد التأكسدي الناجم عن أكسيد النيتريك و زيادة معدلات الحمض uric و الرفع من الخصائص المضادة للأوكسدة للجزيئات المضادة للأوكسدة منخفضة الوزن الجزيئي.

ينتج الإجهاد التأكسدي من الإفراط في إنتاج ROS / RNS من جانب ونقص مضادات الأوكسدة الإنزيمية وغير الإنزيمية من جهة أخرى. يلعب الإجهاد التأكسدي دوراً رئيسياً في تطور الأمراض المزمنة مثل السرطان والتهاب

المفاصل والشيخوخة واضطرابات المناعة الذاتية وأمراض القلب والأوعية الدموية والأعصاب أي أن هناك علاقة حميمة بين الإجهاد التأكسدي والدفاع المناعي).

يحتوي جسم الإنسان على العديد من الآليات لمواجهة الإجهاد التأكسدي من خلال إنتاج مضادات الأكسدة، التي يتم إنتاجها طبيعيًا في الموقع، أو يتم توريدها خارجًا من خلال الأطعمة و / أو المكملات الغذائية. تعمل مضادات الأكسدة الذاتية والخارجية من خلال منع وإصلاح الأضرار الناجمة عن ROS، وبالتالي يمكن أن تعزز نظام المناعة (Hussain وآخرون، 2016).

3. الالتهاب

الاستجابة الالتهابية رد فعل فيزيولوجي للعضوية للدفاع تجاه أي عدوان أو هجوم يسبب تغييرا نسيجيا. أول دور للاستجابة الالتهابية هو القضاء على أو عزل العامل المعتدي (بكتيريا أو فيروس أو طفيلي أو نسيج مصاب) عن بقية الجسم وإصلاح النسيج في أقصر فترة. الالتهاب المسمى في هذه الحالة إتهاب حاد، ظاهرة مفيدة للعضوية تسمح لها أن تسترجع حالتها الفيزيولوجية. يتدخل الجانب السلبي للاستجابة الالتهابية في حالة استمرارها لتتحول إلى التهاب مزمن. يتحتم في هذه الحالة اللجوء إلى العلاج الدوائي (Weill وآخرون، 2003).

1.3 الالتهاب الحاد

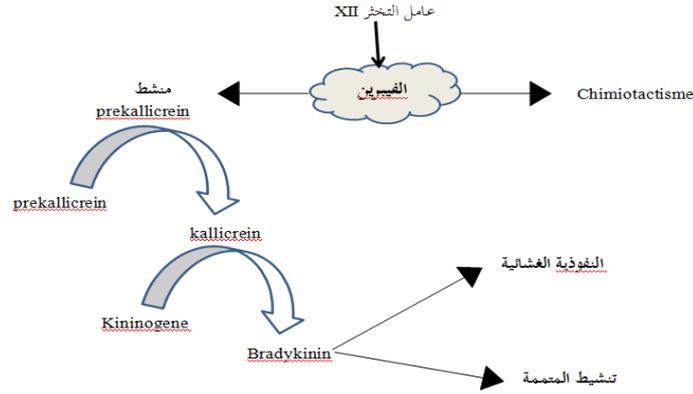
يتميز بأربعة مظاهر نموذجية: تورم (tumor) وألم (dolor) وحرارة (calor) واحمرار (color)، يمكن أن يرافق هذا التفاعل إصابات وظيفية موضعية حسب درجة الإصابة (Janeway وآخرون، 2003). يتم الالتهاب الحاد خلال ثلاث مراحل رئيسية (Weill وآخرون، 2003):

- 1- مرحلة وعائية فورية، في حدود دقائق، تتميز بتغيرات على مستوى الأوعية الدموية الشعيرية المحلية.
- 2- مرحلة خلوية تتمثل في تجنيد العديد من الخلايا. تسمح هذه التعبئة بالقضاء على الكائنات الدقيقة الممرضة والأنسجة المصابة.

3- مرحلة الالتئام التي تتم خلال بضعة أيام وتنتهي بترميم الأنسجة.

1- المرحلة الوعائية

يتم خلالها تنشيط تجلط الدم من خلال إنتاج adrenalin و noradrenalin و serotonin التي تنشط الصفائح الدموية. يعمل الفيبرين الناتج عن تجلط الدم دور جاذب كيميائي قوي للخلايا البيضاء متعددة النوى ومن جانب آخر يؤثر على نفوذية الأوعية الدموية بتأثيره على نظام Kinines (شكل 9).



الشكل 9 : العوامل المنشطة لمسلك Kinines (Weill وآخرون، 2003).

Kinines عبارة عن ببتيدات صغيرة فعالة على الأوعية، تزيد من درجة الحرارة والألم؛ Bradykinin ببتيدي تساعي يزيد بشكل قوي نفوذية الأوعية الدموية. من جهة أخرى Bradykinin مسؤول عن الإحساس بالألم لتأثره مع مستقبلات على مستوى العصبونات الحسية، كما يتفاعل مع plasmin بتنشيط مسلك المتممة مم يزيد التفاعل الالتهابي.

يزيد Bradykinin من تأثير prostaglandins بتنشيطه ل phospholipase A2. يعزز phospholipase A2 تشكيل الحمض arachidonic ابتداء من فوسفوليبيدات أغشية الصفائح الدموية والخلايا الطلائية.

ينتج عن استقلاب الحمض arachidonic بناء prostaglandins (عن طريق مسلك إنزيمات cyclo-oxygenases) وبناء leukotriens (عن طريق مسلك إنزيمات 5-lipo-oxygenases).

تعمل prostaglandins (PGE2 و PGF2α و PGD2 و PGI2 و TxA2) على توسيع الأوعية الدموية، وتتميز بأنها مولدة للألم وتشارك في أعراض الالتهاب (الاحمرار والتورم والألم والحرارة). في حين تتميز leukotriens (LTD4 و LTC4 و LTB4) بقدرة جذب كيميائي قوية للخلايا البيضاء متعددة النوى (Weill وآخرون، 2003).

يخضع تحرير الوسائط سابقة الذكر توسيعاً للأوعية الدموية مع تغيير في نفوذية هذه الأخيرة وزيادة في الثغور بين خلوية التي تسمح بتسرب البروتينات البلازمية والخلايا إلى الأنسجة. يفسر هذا التدفق، جزئياً، ظهور الحرارة والاحمرار. من جانب آخر، يحث التسرب البلازمي ظهور وذمة لانتفاخ النسيج مم يسبب ضغطاً على النهايات العصبية؛ يفسر هذا الإحساس بالألم. من بين البروتينات المنجذبة نحو الأنسجة المتضررة؛ بروتينات المتممة التي

تلعب دورا مهما. فهي تزيد من توسيع الأوعية الدموية ونفوذيتها وترفع من انجذاب الخلايا البيضاء متعددة النوى وأحادية النواة وتحرير الهيستامين من قِبَل الصفائح الدموية (Janeway وآخرون، 2003).

يعمل الهيستامين على زيادة تقلص ألياف العضلات الملساء وزيادة نفوذية الأوعية الدموية نتيجة لتقلص الخلايا الطلائية. يؤثر الهيستامين أيضا على انجذاب الخلايا البيضاء متعددة النوى (Weill وآخرون، 2003).

2- المرحلة الخلوية

تتميز هذه المرحلة بخروج الخلايا البيضاء من الأوعية الدموية وتغلغلها داخل النسيج المتضرر. تتم المرحلة الخلوية في ثلاث مراحل. تتدخل في المرحلة الأولى الخلايا متعددة النوى وأحادية النواة / ملتهومات و تبدأ هذه المرحلة في الدقائق الأولى، يتمثل دورها في القضاء على الكائنات الحية الدقيقة الممرضة والأنسجة المتضررة. يتدخل في هذه المرحلة لمفاويات حاملة لمستقبلات للمستضد تساعد في القضاء على الكائنات الحية الدقيقة. إذا لم تكن المرحلتين السابقتين غير كافيتين للتحكم في الالتهاب، تطوّر العضوية استجابة مناعية تُنشّط فيها لمفاويات بائية وتائية متخصصة (Weill وآخرون، 2003).

3- مرحلة الالتئام

ترتبط مرحلة الالتئام أو الترميم بدرجة الضرر الذي لحق بالنسيج. إذ أنه بعد القضاء على العوامل الممرضة من طرف الخلايا متعددة النوى، تتم بلعمة نواتج التهديم و بقايا الخلايا من قبل الخلايا الملتهمة. حينها تنتج هذه الأخيرة سيتوكينات و وسائط تحرض عملية الالتئام و تجديد الأنسجة (Weill وآخرون، 2003).

2.3. الالتهاب المزمن

تشبه الأعراض في البداية تلك الملاحظة مع الالتهاب الحاد، إلا أن التخريب الذي يلحق بالأنسجة أكثر حدة و له نتائج وظيفية عميقة؛ ينتج عن هذا النوع من الالتهاب آثار تشريحية و وظيفية. الخاصية المميزة للالتهاب المزمن هي استمراره لما بعد ستة أسابيع (Weill وآخرون، 2003).

3.3. الأمراض المرتبطة بالالتهاب

يميل عدد من الأمراض التي تعتبر التهابية الأصل إلى اعتبار الإصابة البكتيرية السبب في ظهورها، إذ أن الاستجابة الالتهابية تجاه عدد من الإصابات الميكروبية يمكن أن تسبب ضررا أكبر من ذلك الذي قد يلحقه الميكروب في حد ذاته (جدول 2) (Nathan، 2002).

جدول 2: أمثلة لأمراض مرتبطة بالالتهاب (Nathan ، 2002) .

أمراض يعود فيها العامل الممرض إلى الالتهاب	
إكزيما	الربو
مرض ألزهايمر	تصلب الشرايين
فُصال	إلتهاب المفاصل الرثياني
داء كرون	النقرس
ذأب حُمامي	إلتهاب الدرقية الهاشيموتي
أمراض ناتجة عن عدوى ميكروبية شارك الالتهاب في ظهورها	
إلتهاب المعدة المحرض بـ <i>Helicobacter pilory</i>	إلتهاب الكبد C
زحار بكتيري	السل
أمراض متعددة الأسباب ساهم التليف بعد الالتهاب بشكل رئيسي في ظهورها	
تليف رئوي	تشمع كبدي كحولي

4.3. مضادات الالتهاب

1.4.3. مضادات الالتهاب غير الستيرويدية

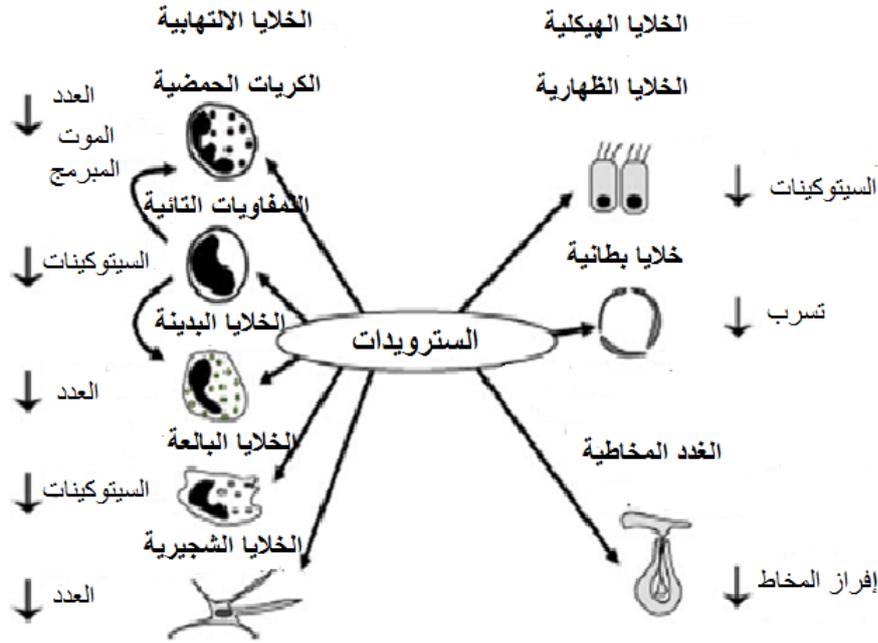
تمثل مضادات الالتهاب غير الستيرويدية مجموعة من المركبات الدوائية تتميز كلها بخصائص مشتركة: تأثيرات مضادة للالتهاب وخافضة للحرارة ومسكنة للألم ومضادة للتجلط (Lévy وآخرون، 2005).

تثبط مضادات الالتهاب غير الستيرويدية إنزيم cyclo-oxygenase (Cox)، ينتج عن ذلك انخفاض في بناء prostaglandines. تنتج الخلايا نظيرين من Cox-1: cyclo-oxygenase النظير المتواجد في أغلب الأنسجة ويتم إنتاجه بشكل غير مرتبط بالالتهاب، يتدخل في حماية المعدة والتوازن على المستوى الوعائي وتجلط الدم؛ وCox-2 النظير الذي يتم إنتاجه بشكل خاص على مستوى الموقع الالتهابي (Brandstätter وآخرون، 2010).

مضادات الالتهاب غير الستيرويدية الكلاسيكية ليست متخصصة في تأثيرها وبالتالي فهي تؤثر على كلا من Cox-1 و Cox-2، إلا أن بعض المضادات الجديدة يقتصر تأثيرها على Cox-2 ولا تؤثر إلا على الفائض من prostaglandins المنتجة على مستوى الالتهاب. تنتج التأثيرات الجانبية لمضادات الالتهاب غير الستيرويدية عن تثبيطها لإنتاج prostaglandins وتمثل في السمية المعدية المعوية وخطر النزيف والسمية الكلوية (Brandstätter وآخرون، 2010).

2.4.3. مضادات الالتهاب الستيرويدية

تتميز الستيرويدات بدور مهم في الحفاظ على توازن العضوية؛ إذ أنها تنظم التعبير عن العديد من الجينات الالتهابية (المشفرة للسيروكينات و chemokines وجزيئات الارتباط adhesion molecules والإنزيمات الالتهابية والمستقبلات والبروتينات) التي تنشط خلال التفاعل الالتهابي (شكل 10) (Barnes، 2006؛ Faure، 2009).



الشكل 10: بعض تأثيرات الستيرويدات على الخلايا (Barnes، 2006).

تعتبر الستيرويدات الغشاء البلازمي وترتبط بمستقبلاتها المتواجدة في السيتوبلازم، يحدق المركب سترويد - مستقبل غشاء النواة ثم يرتبط ب DNA على مواقع تسمح له بتغيير التعبير الجيني بتنشيط الاستنساخ عن طريق إنزيمات histone acetylases (HAT) كما هو الحال مع Lipocortin-1 و β_2 -Adrenoceptor أو بتنشيط الاستنساخ عن طريق إنزيمات histone deacetylases (HDAC) في حالة السيروكينات: IL-1 و IL-2 و IL-3 و IL-4 و IL-5 و IL-6 و IL-11 و IL-13 و TNF α و Chemokines مثل IL-8 والإنزيمات مثل iNOS و COX-2 و cytoplasmic PLA2 و وجزيئات الارتباط مثل E-selectin (Payne و Adcock، 2001). نتيجة لذلك تتميز الستيرويدات بتأثير كابت للمناعة بتثيبتها للعديد من المراحل الأولى للاستجابة المناعية، إذ أنها تثبط توسع الأوعية الدموية وزيادة في نفوذية هذه الأخيرة. كما تحفز من هجرة الخلايا البيضاء إلى موقع الالتهاب (Chapman و Coutinho، 2011).

تستعمل مضادات الالتهاب الستيرويدية أو Corticosteroids أو glucocorticosteroids أو الستيرويدات بشكل شائع وفعال لعلاج عدد كبير من الأمراض الالتهابية والمناعية. وكما هو الحال في مضادات الالتهاب غير الستيرويدية، يرتبط استعمال الستيرويدات بعدد من التأثيرات الجانبية الضارة. يزيد خطر حدوث هذه الآثار غير المرغوب فيها مع إطالة مدة العلاج وزيادة الجرعة. من بين الاضطرابات التي تلاحظ: ارتفاع ضغط الدم الشرياني وعدم انتظام البناء الحيوي للستيرويدات في نهاية العلاج وظهور القرحة على مستوى المعدة والإثني عشر. يمكن أيضاً أن تظهر أعراض مزمنة مثل هشاشة العظام وإعتام عدسة العين وزيادة الوزن (Viatte وآخرون، 2007).

3.4.3. مضادات الالتهاب ذات أصل نباتي (الفلافونويدات)

تستخدم النباتات الطبية على نطاق واسع في الطب التقليدي في جميع أنحاء العالم للتخفيف من الأمراض الالتهابية مثل التهاب المفاصل والربو والأكزما والقرص والتهاب الأنف التحسسي وقرحة المعدة والإثني عشر (Wiat، 2006)؛ يرجع هذا التأثير إلى محتواها من الفلافونويدات التي تمتلك نشاطاً مضاداً للالتهاب (Rathee وآخرون، 2009). من بين تأثيرات الفلافونويدات المضادة للالتهاب:

أ- تخفيض ارتباط الخلايا البيضاء بالجدار البطاني للأوعية الدموية

في الظروف الطبيعية، تنتقل الكريات البيضاء بحرية على طول الجدار البطاني للأوعية الدموية. أما في حالة الإقفار والالتهاب، يمكن أن تسبب العديد من الوسائط الناتجة عن الجدار البطاني وعوامل المتممة التصاق الكريات البيضاء بالجدار وبالتالي تثبيتها وتنشيط الكريات البيضاء. محررة بذلك الجذور الحرة والوسائط الالتهابية ملحقة الضرر بالأنسجة. يخفف تناول فلافونويد micronized عدد الكريات البيضاء خلال الاحتقان مما ينتج عنه انخفاض في متممة المصل الكلية.

يمكن لبعض الفلافونويدات أن تثبط تحرير محتويات الكريات البيضاء دون أن تؤثر على إنتاج جذر فوق الأكسيد. يعود التأثير المثبط لبعض الفلافونويدات لتفريغ حبيبات (degranulation) الخلايا البدينة (mast cell) إلى تغيير في المستقبل المرتبط بقنوات الكالسيوم على مستوى الغشاء البلازمي (Nijvelt وآخرون، 2001).

ب- تنظيم نشاط الإنزيمات المؤيدة للالتهاب

تنظم العديد من الفلافونويدات نشاط الإنزيمات المتدخلة في مسالك استقلاب حمض arachidonic؛ من ضمن هذه الإنزيمات cyclo-oxygenases و lipoxigenases و فوسفوليباز A₂ و iNOS. مما يسمح بتخفيض

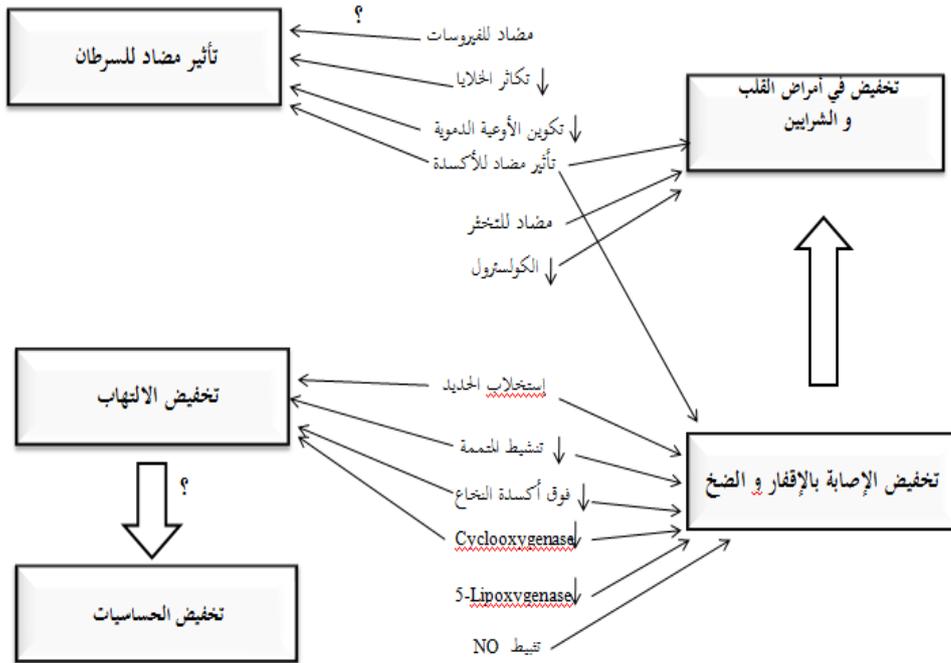
معدل كل من الحمض arachidonic و leucotrienes وأكسيد الآزوت و prostaglandins وهي كلها عبارة عن وسائط التهابية (Durga وآخرون، 2014).

ج - كبح التعبير عن الجينات المتدخلة في الاستجابة المناعية

تنظم الفلافونويدات نشاط Protein kinases C (PKC) و Mitogen Activated Protein (MAPK) و Activating Protein-1 Kinases وبالتالي تحد من ارتباط عوامل الاستنساخ ب DNA. من بين هذه العوامل Nuclear Factor k B (NF-K B) و (AP-1) (Kim وآخرون، 2004).

يعتبر c-Jun-N-terminal Kinase (JNK) و signal regulated kinases 1 و 2 (Erk 1 / 2) و p38 من بين أهم إنزيمات MAPKs (Dong وآخرون، 2002). يثبط quercetin و luteolin مسلك p38 و (Erk 1/2) وبالتالي إنتاج TNF α (Durga وآخرون، 2014).

نتيجة لما سبق فإن الفلافونويدات لها تأثير على القرحة المعدية (Izzo وآخرون، 1994) والسكري وأمراض القلب وتصلب الشرايين والضغط الدموي (Hertag وآخرون، 1993) والأورام (Fotsis وآخرون، 1997) وهشاشة العظام (Hegarty وآخرون، 2000) وتأثيرات مضادة للبكتيريا والفيروسات (Ahamd وآخرون، 2015) (شكل 11).



الشكل 11: العلاقة بين آليات تأثير الفلافونويدات والأمراض التي تؤثر عليها (Nijvelt وآخرون، 2001)

4. نبات *Hypericum perforatum*

يعرف نبات *H. perforatum* باسم الهيوفاريقون وحشيشة القلب وعصبة القلب و المنسيّة وداذي رومي وعشبة القديس يوحنا وأم الألف ثقب وبالإنجليزية Saint John's wort وبالفرنسية millepertuis perforé و herbe de St-jean. ينتمي نبات *H. perforatum* إلى عائلة Hypericaceae. هذا النبات عشبي بري معمر علوه بين 40 و 80 سم، أوراقه بيضية مستطيلة كثيرة الجيوب العطرية بلون ضارب للحمرة أكسبه إسم millepertuis بالفرنسية ويعني ألف فتحة، لأزهاره خمس بتلات صفراء زاهية وأسدية كبيرة (شكل 12). يكثر في الأراضي البور وقرب السياجات يستمر إزهاره من شهر جوان إلى شهر أوت (Rahimi و Kiani، 2016).

1.4. التركيب الكيميائي

يدخل في التركيب الكيميائي لهذا النبات مشتقات anthraquinone : hypericin و pseudohypericin و isohypericin و protohypericin و protopseudohypericin و hypericin و pseudohypericin على الترتيب و hyperforin. كما أنه يتربك من فلافونولات (Kaempferol و quercetin) وفلافون مثل luteolin و biapigenin و غليكوزيدات (hyperoside و isoquercitrin و quercitrin و rutin) و catechins و الدباغ (proanthocyanidins) والأحماض caffeic و chologenic و p-coumaric و vanillic و ferulic. بالإضافة إلى وجود زيوت طيارة (Barnes وآخرون، 2001).

2.4. التأثيرات البيولوجية

نبات *H. perforatum* نبات منبه و فاتح للشهية ومدر للبول وطارد للحمى، كما يتمتع هذا النبات بتأثير مطهر ومضاد للالتهاب ومضاد حيوي ومضاد للفيروسات إلا أن أهم استعمال له هو في حالة الأرق والقلق والانهيار العصبي والاكتئاب الخفيف (Rahimi و Kiani، 2016). يسبب *H. perforatum* حساسية لضوء الشمس ناتجة عن الجزئي hypericin (Barnes وآخرون، 2001).



أ



ج



ب

الشكل 12: نبات *H. perforatum*؛ أ - الشكل العام، ب - الأزهار، ج - الأوراق (Asgarpanah)، (2012).

5. نبات *Xanthium strumarium*

يعرف نبات *Xanthium strumarium* L. باسم الشبيط في شرق الجزائر وبالعربية الفصحى الشاكة وبالفرنسية lampourde. ينتمي نبات *X. strumarium* إلى عائلة *Compositae*، وهو عشب خشن يتواجد على حواف الطرقات والوديان كعشبة ضارة. الكلمة *Xanthium* مشتقة من الكلمة اليونانية "xanthos" وتعني أصفر والكلمة *strumarium* تعني المخدة المنتفخة إشارة إلى شكل بذورها التي يتغير لونها من الأخضر إلى الأصفر عند نضجها ثم إلى البني (Kambo و Saluia، 2010) (شكل 11).



أ



ج



ب

الشكل 13: نبات *X. strumarium*؛ أ - الشكل العام ، ب- الأوراق ، ج - الفاكهة والبذور (Crete، 1995).

X. strumarium عشب سنوي قد يزيد علوه على 1 متر، تتوضع أوراقه بشكل متناوب لونها أخضر ساطع وهي بشكل مثلث بيضوي بفصوص غير منتظمة (عموما ثلاثة فصوص) وأسنان غير واضحة، يتراوح طولها بين 5 و15 سم بعرق بارز وبسويق طويل خشن من الجهتين. فاكهته بيضوية الشكل محاطة بطبقة صلبة يتم جنيها حين تنضج و تحف. يزهر النبات بين شهري جويلية إلى أكتوبر وتنضج البذور بين شهري أوت وأكتوبر (Kamboj و Saluia ، 2010). يتضمن الجنس *Xanthium* 25 نوعا كلها من أصل أميركي. غير أنها تتوزع تقريبا في كل أنحاء العالم (Favier وآخرون، 2005).

1.5. التركيب الكيميائي

يدخل في تركيب نبات *X. strumarium* مركبات sesquiterpene lactones منها xanthumin و xanthanol و isoxanthanol و 8-epi-xanthatin و tomentosin و 2-hydroxytomentosin و 2-hydroxytomentosin-1 β ,5 β -epoxide (Malik وآخرون، 1993) و xanthiazone (Ma وآخرون، 1998) و atractyloside و carboxyatractyloside و hydroquinone و alkaloids والأحماض Caffeolquinic و thiazinedione (Qin وآخرون، 2006).

2.5. التأثيرات البيولوجية

تستعمل البذور والأوراق الجافة في الطب الصيني لعلاج الحمى والتعرق والألم والشلل وتقرح الجلد وألم الأعصاب والجدري والأورام الخبيثة. من جانب آخر تخفض الأوراق معدل السكر في الدم. تستعمل الجذور لتحفيز متانة الجسم وفي حالة قصور الغدة الدرقية والتهاب الشعب الحاد والتهاب مخاطية الأنف وآلام الظهر (Reeta وآخرون، 2010). يستعمل هذا النبات أيضا لعلاج التهاب الجيوب الأنفية والتهاب الطبلية وصداع الرأس والشرى urticaria والتهاب المفاصل (Ma وآخرون، 1998؛ Pharmacopoeia PR China، 2010).

المواد وطرق العمل

1. المواد

1.1. المواد البيولوجية

جلبت النباتان (HP) *Hypericum perforatum* و (XS) *Xanthium strumarium* في شهر جويلية عام 2013 من منطقتي بابور وبني عزيز على التوالي، ولاية سطيف. وتم تحديد نوعهما من طرف الأستاذ بشير أوجحيج، جامعة الحاج الأخضر باتنة شفرة *H. perforatum* 132/ISVSA/DA/UHLB1/13 وشفرة *X. strumarium* 164/ISVSA/DA/UHLB1/13. جففت الأوراق في الظل وفي درجة حرارة الغرفة.

أجريت اختبارات السمية والتأثير المضاد للأوكسدة واختبار سمية الكبد واختبارات التأثير المضاد للالتهاب المحرض بـ xylene و زيت crotton على فئران ذكور وإناث من سلالة NMris التي تراوح وزنها بين 25 و 30 غ أما الجرذان (إناث) التي تراوح وزنها بين 130 و 160 غ فقد استعملت في اختبار التأثير المضاد للالتهاب المحرض بـ carrageenan. أحضعت الفئران والجرذان التي تم جلبها من معهد باستور في الجزائر لفترة تأقلم لمدة أسبوع في درجة حرارة الغرفة حيث تم منعها من الغذاء (ONAB القصر بجاية) لمدة ليلة قبل إجراء الاختبارات.

2.1. المواد الكيميائية

تم شراء المواد الكيميائية والمذيبات العضوية، من Sigma-aldrich و Fluka و Prolabo.

2. الطرق

1.2. الاستخلاص والتجزئة

نقعت الأوراق المجففة و المطحونة في الميثانول النقي 98 % بمعدل 10 / 1 (وزن / حجم) مدة 7 أيام في درجة حرارة الغرفة وكررت العملية مرتين. حيث تم الحصول على المستخلص الخام بعد الترشيح وتبخير الميثانول تحت الضغط بجهاز (Buchi460) (Al-Qudah وآخرون، 2012).

تم فصل المركبات المختلفة الموجودة في المستخلص الخام باستعمال مذيبات ذات قطبية متزايدة، الهكسان (لفصل اللبيدات) والكلوروفورم (لفصل عديدات الفينول غير السكرية) وأسيئات الإثيل (لفصل عديدات الفينول أحادية وثنائية السكر) والمستخلص المائي الغني بالمركبات الأكثر قطبية (Markham، 1982). جففت المستخلصات في درجة حرارة 40°م وتم حفظها إلى حين استعماله.

2.2. معايرة عديدات الفينول

قدر محتوى مختلف المستخلصات من عديدات الفينول بطريقة Folin-Ciocalteu (Li وآخرون، 2007). يتكون محلول Folin-Ciocalteu من الحمض فوسفوموليبيديك والحمض فوسفوتنغستيك؛ ينتج عن إرجاع محلول Folin، في وسط قاعدي، بالمجاميع القابلة للأكسدة في المركبات الفينولية مزيج من أكاسيد التونغستين زرقاء اللون. تتناسب شدة اللون الناتج الذي تمتص في 765 نانومتر، طرديا مع كمية عديدات الفينول الموجودة في المستخلص المختبر. يضاف 1 مل من محلول Folin (10 : 1، حجم/حجم) إلى 200 ميكرو لتر من المستخلص بالتخفيفات الملائمة. بعد 4 دقائق، يضاف 800 ميكرو لتر من محلول كربونات الصوديوم (7.5%). بعد ساعة ونصف من الحضانة، تسجل الامتصاصية في 765 نانومتر. يحدد تركيز عديدات الفينول عن طريق منحني عياري ويعبر عن تركيز عديدات الفينول بمكافئ الملغرام من الحمض غاليك / غرام من وزن المستخلص .

3.2. معايرة الفلافونويدات

قدر محتوى مختلف المستخلصات من الفلافونويدات بطريقة ثلاثي كلورور الألومنيوم (Bahorun وآخرون، 1996). ينتج عن تكون رابطة تكافئية بين ثلاثي كلورور الألومنيوم و مجاميع الهيدروكسيل للفلافونويدات مركب بلون أصفر يمتص في 430 نانومتر. يضاف 1 مل من محلول ثلاثي كلورور الألومنيوم (2% في الميثانول) إلى 1 مل من المستخلص. بعد 10 دقائق من الحضانة في درجة حرارة الغرفة، تسجل الامتصاصية في 430 نانومتر. يحدد تركيز الفلافونويدات عن طريق منحني عياري ويعبر عن تركيز الفلافونويدات بمكافئ الملغرام من الكرسيتين / غرام من وزن المستخلص الجاف.

4.2. تحليل المستخلصات الخام باستعمال HPLC-DAD

أذيت 20 مغ من المستخلص في 2 مل من الميثانول (80%) و رشح عبر غشاء سللوز أسيتات 0.45 ميكرومتر (Millipore). تم تحليل العينات باستعمال نظام Shimadzu HPLC (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) مكون من مضختين من النوع LC-10AD ونظام مراقبة SCTL 10A وكاشف SPD-M 10A photodiode array. تم فصل العينات باستعمال عمود Luna C₁₈ column (4 × 250 mm, 5 mm; Phenomenex). تمت مراقبة خروج العينات خلال 50 دقيقة (بمعدل تدفق 1 مل /د) باستعمال طور متحرك متدرج التركيز من

acetone nitrile (40-5 %) في الماء، الأس الهيدروجيني 2.5 مع TFA. تم ضبط الكاشف على طول الموجتين 320 و 350 نانومتر.

5.2. تقدير النشاطية المضادة للأكسدة في الأنوب

1.5.2. النشاط المضاد لانحلال كريات الدم الحمراء

تم تقدير مقاومة كريات الدم الحمراء المعاملة بالمستخلصات النباتية تجاه الهجوم الجذري من طرف AAPH (HCl) (2-amidinopropane) - azo-bis (2,2') حسب طريقة Takebayashi وآخرون (2012). يجمع دم فئران في أنابيب حاوية على EDTA ويخفف بمحلول منظم فوسفات (300 ملي أسمول وأس هيدروجيني 7.4) للحصول على كريات حمراء بنسبة 2%. تضاف بعدها المستخلصات ثم يحرض الهجوم بإضافة AAPH يحضن المزيج في درجة حرارة 37°م. يتابع الاختفاء التدريجي لكريات الدم الحمراء بقياس التناقص في الامتصاصية عند طول موجة 620 نانومتر، يعبر عن مقاومة الكريات الحمراء للهجوم الجذري بالزمن الضروري لتحلل 50% (HT₅₀) من كريات الدم الحمراء.

2.5.2. إستخلاص الحديد

تقاس قدرة المستخلصات على استخلاص الحديد بمتابعة تثبيط تكوين المركب Fe(II)-Ferrozine بعد حضن المستخلصات مع الحديد ثنائي التكافؤ حسب طريقة Le وآخرون (2007). يضاف إلى 500 ميكرو لتر من تراكيز مختلفة من المستخلص، 100 ميكرو لتر من FeCl₂ (0.6 ملي مولار في الماء المقطر) و 900 ميكرو لتر ميثانول. بعد 5 دقائق، تضاف 100 ميكرو لتر Ferrozine (5 ملي مولار في الميثانول) إلى وسط التفاعل، يرج بعدها المزيج ثم يترك لفترة حضن لمدة 10 دقائق في درجة حرارة الغرفة. يسمح هذا بتكوين المركب Fe(II)-Ferrozine ذي اللون الأحمر والذي يمتص في 562 نانومتر. تمت مقارنة النتائج باستعمال Ethylene diamine tetraacetic (EDTA) كمشاهد موجب يحتوي الشاهد السالب على كل مكونات وسط التفاعل، باستثناء المستخلص الذي يعوض بحجم مساو من الميثانول أو الماء المقطر. يتم حساب نسبة استخلاص حسب العلاقة:

$$\text{Chelation I \%} = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

A_C : امتصاصية الشاهد الذي يحتوي على كل المحاليل ماعدا المستخلص

A_E : الامتصاصية في وجود المستخلص

3.5.2. القدرة الإرجاعية

تحدد القدرة الإرجاعية للمستخلصات حسب طريقة Lalitha و Jayanthi (2011). تتفاعل المستخلصات التي تملك قدرة على الإرجاع مع فريسيانيد البوتاسيوم (Fe^{3+}) لتشكيل فيروسيانيد البوتاسيوم (Fe^{2+})، يتفاعل هذا الأخير مع كلورور الحديد لإعطاء مركب يمتص في طول موجة 700 نانومتر. عمليا، يمزج 2.5 مل من تراكيز مختلفة للمستخلص (مذاب في الميثانول أو الماء المقطر) مع 2.5 مل من المحلول المنظم (فوسفات 0.2 مولار وأس هيدروجيني 6.6) و 2.5 مل من محلول فريسيانيد البوتاسيوم (1%). بعد فترة حضن لمدة 20 دقيقة في حمام مائي بدرجة حرارة 50°م، يضاف للمزيج 2.5 مل من حمض الخل ثلاثي الكلورور (TCA) trichloroacetic acid (10%) يعرض بعدها المزيج للتردد المركزي (3000 دورة/دقيقة خلال 10 دقائق). يضاف إلى 2.5 مل من الجزء الطافي 2.5 مل من الماء المقطر و 0.5 مل من كلورور الحديد (0.1%). تقاس الامتصاصية في طول موجة 700 نانومتر تمت مقارنة النتائج باستعمال فيتامين C كشاهد موجب. يدل التزايد في امتصاصية مزيج التفاعل على التزايد في القدرة الإرجاعية. يعبر على النتائج بتزايد الامتصاصية بدلالة التزايد في تركيز المستخلص، ويحسب EC_{50} الذي يوافق الامتصاصية 0.5.

4.5.2. إختبار إزاحة جذور الهيدروكسيل

يقدر النشاط الإزاحي لجذر OH حسب طريقة Sudha وآخرون (2011). يحتوي مزيج التفاعل على 1 مل من $FeSO_4$ (1.5 ملي مولار) و 0.7 مل من بيروكسيد الهيدروجين (6 ملي مولار) و 0.3 مل من Sodium salicylate (20 ملي مولار) و 0.2 مل من تراكيز مختلفة من المستخلصات. بعد 1 ساعة من الحضانة في درجة حرارة 37°م، تقاس امتصاصية المركب hydroxylated salicylate في طول موجة 562 نانومتر. يستعمل 2, 6 di- (BHT) tert-butyl-4-methyl phénol كشاهد موجب، ويحسب التأثير الإزاحي حسب العلاقة:

$$I \% = [(A_c - A_e) / A_c] \times 100$$

Ac : امتصاصية الشاهد ($FeSO_4$ و Sodium salicylate)

Ae : الامتصاصية في وجود المستخلص

5.5.2 إختبار إزاحة الماء المؤكسج (H₂O₂)

يقدر النشاط الإزاحي للماء المؤكسج حسب طريقة Ruch وآخرون (1989). يضاف إلى 1 مل من المستخلص، 2.4 مل من المحلول المنظم فوسفات (0.1 مولار وأس هيدروجيني 7.4) و 0.6 مل من محلول H₂O₂ (120 ملي مولار)؛ يرج المزيج ثم يحضن في درجة حرارة الغرفة خلال 10 دقائق ثم تسجل الامتصاصية في طول موجة 230 نانومتر. يستعمل BHT كشاهد موجب، ويحسب التأثير الإزاحي حسب العلاقة:

$$I \% = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

A_C: امتصاصية محلول H₂O₂ بتركيز 120 ملي مولار.

A_E: الامتصاصية في وجود المستخلص

6.5.2 إختبار بيتا-كروتين / الحمض لينولييك

تم قياس قدرة المستخلصات المضادة للأكسدة بمتابعة تثبيط تأكسد بيتا-كروتين بنواتج أكسدة الحمض لينولييك (Kartal وآخرون، 2007). يحضر مستحلب بيتا-كروتين / حمض لينولييك بإذابة 0.5 مغ من بيتا-كروتين في 1 مل من الكلوروفورم، يضاف بعدها 25 مكرو لتر من الحمض لينولييك و 200 مغ من Tween 40. ييخر الكلوروفورم كلياً في درجة حرارة 40°م، يضاف بعدها 100 مل من الماء المقطر المشبع بالأكسجين ثم يرج المستحلب بقوة. يضاف 2.5 مل من المستحلب إلى 350 مكرو لتر من المستخلص بتركيز 2 مغ/مل (مذاب في الميثانول أو الماء المقطر) يحضر شاهد موجب (BHT) وشواهد سالبة (الميثانول والماء المقطر). تتابع حركية ابيضاض المستحلب لكل المحاليل وتسجل الامتصاصيات في طول موجة 490 نانومتر في الفترات الزمنية: 0 و 1 و 2 و 3 و 4 و 6 و 24 و 48 سا في درجة حرارة الغرفة وفي الظلام. تحسب النشاطية المضادة لأكسدة بيتا-كروتين حسب العلاقة:

$$AA \% = (A_E / A_{E0}) \times 100$$

A_E: الامتصاصية في وجود المستخلص في زمن القراءة

A_{E0}: الامتصاصية في وجود المستخلص في الزمن 0 سا

ملاحظة: قيم النشاطيات المستعملة للمقارنة هي تلك التي تم حسابها في 24 سا (Barros وآخرون، 2007).

7.5.2. إختبار إزاحة جذور DPPH

استعمل في هذه الطريقة 2,2'-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) كجذر حر ثابت نسبيا (Burities) و Bucar، 2000؛ Markowicz Bastos وآخرون، 2007). في هذا الإختبار ترجع مضادات الأكسدة DPPH ذي اللون البنفسجي إلى مركب ذي لون أصفر. يضاف إلى 50 ميكرو لتر من تراكيز مختلفة للمستخلص 1250 ميكرو لتر من DPPH (0.004 % في الميثانول). بعد فترة حضانة لمدة 30 دقيقة في الظلام، تسجل الامتصاصية في 517 نانومتر. تحسب نسبة تثبيط إزاحة DPPH حسب العلاقة :

$$I \% = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

AC : امتصاصية الشاهد (محلول DPPH)

AE : الامتصاصية في وجود المستخلص

تم حساب التركيز المزيح لـ 50 % من DPPH لكل مستخلص ابتداء من معادلة تغير نسبة التثبيط بدلالة تركيز المثبط. يعبر عنها بـ ميكروغرام/مل وتقارن مع (BHT).

6.2. إختبار السمية الحادة

بغرض إجراء الإختبارات المضادة للأكسدة على الحيوان، تم القيام بإختبار السمية الحادة، اعتمد في ذلك على المبادئ التوجيهية لمنظمة التعاون الاقتصادي والتنمية (OECD 425) (2008) التي تقترح البدء بالجرعة 2 غ/كغ ثم الانتقال إلى الجرعة 5 غ/كغ في حالة عدم سمية التركيز السابق (2 غ/كغ).

لاختبار الجرعة 2 غ/كغ، تحضر مجموعة من 3 فئران، تعطى الجرعة للفأر الأول، يتم الانتظار لمدة 24 ساعة يتم خلالها ملاحظة سلوك الفأر. بعد الـ 24 ساعة يأتي دور الفأر الثاني ويعامل بنفس طريقة الفأر السابق. بعد 24 ساعة أخرى يأتي دور الفأر الثالث ويعامل بنفس طريقة الفأر السابق.

في حالة ما إذا كانت الجرعة 2 غ/كغ سامة (قاتلة)، تختبر التراكيز 550 مغ/كغ و 175 مغ/كغ و 55 مغ/كغ و 17.5 مغ/كغ و 5.5 مغ/كغ لحساب LD₅₀. لحساب LD₅₀ استعمل برنامج Stat plus 2009.

1.6.2. إختبار سمية مستخلص *Hypericum perforatum*

أجريت اختبارات السمية على فئران ذكور من سلالة NMris، وأعطيت الجرعات عن طريق الفم. عند اختبار التركيز 2 غ/كغ مات الفئران الثلاثة في مجال زمني يتراوح بين 1 إلى 6 ساعات. تم بعدها تحضير 6 مجموعات (تضم كل مجموعة 6 فئران): مجموعة شاهد تعامل بالماء فقط و المجموعات الخمس الأخرى تعطى لها جرعات بتركيز 550 مغ/كغ و 175 مغ/كغ و 55 مغ/كغ و 17.5 مغ/كغ و 5.5 مغ/كغ.

2.6.2. إختبار سمية مستخلص *Xanthium strumarium*

أجريت اختبارات السمية على فئران ذكور من سلالة NMris وأعطيت الجرعات عن طريق الفم. عند اختبار التركيز 2 غ/كغ لم يؤثر هذا التركيز على الفئران، نتيجة لذلك تم الانتقال إلى التركيز 5 غ/كغ.

7.2. إختبار السمية تحت الحادة

استعملت فئران ذكور من سلالة NMris، حسب Baghiani وآخرون (2013) تم تقسيم الحيوانات إلى 8 مجموعات (تحتوي كل مجموعة 7 فئران)، حيث تم إعطاء مجموعة الشاهد السالب جرعة من الماء و مجموعة الشاهد الموجب فيتامين C كمضاد أكسدة مرجعي بتركيز 100 مغ/كغ.

ثلاث مجموعات خاصة بالمستخلص الخام لنبته الشيبط (لكل مجموعة جرعة : 200 مغ/كغ و 400 مغ/كغ و 600 مغ/كغ مذابة في الماء القطر)

ثلاث مجموعات خاصة بالمستخلص الخام لنبته الهيوفاريقون (لكل مجموعة جرعة : 100 مغ/كغ و 300 مغ/كغ و 500 مغ/كغ مذابة في الماء المقطر).

تلقى كل فأر جرعة يومية عن طريق الفم لمدة 21 يوما، بعدها تم ذبح الفئران للحصول على الدم واسترجاع الكبد والكلية لاختبار نشاطية إنزيم catalase (CAT) وتحديد تركيز Malondiadehyde (MDA) وتقدير تركيز الغلوتاثيون الكلي وتقدير تركيز البروتينات في كل حالة.

استرجع الدم في أنابيب تحتوي على EDTA. حيث تم اختبار حجم منه لتحديد تأثير المحاليل المعطاة لكل مجموعة على مدى تحلل أغشية كريات الدم الحمراء. يعرض الباقي للطرز المركزي بسرعة 3000 دورة/الدقيقة في 4 م°.

1.7.2. إختبار انحلال كريات الدم الحمراء

تم تقدير النشاطية المضادة لانحلال تحلل كريات الدم الحمراء حسب Trabsa وآخرون (2014). يجمع الدم في محلول مضاد للتجلط و يخفف بمحلول Phosphate Bufer saline (PBS). يضاف بعدها AAPH ويحضن المزيج في درجة حرارة 37°م. تتابع حركية الاختفاء التدريجي لكريات الدم الحمراء بقياس التناقص في الامتصاصية عند طول موجة 620 نانومتر. يعبر عن مقاومة الدم للهجوم الجذري بالزمن اللازم لتحلل 50 % من كريات الدم الحمراء.

2.7.2. النشاطية المضادة لفوق أكسدة الليبيدات

قدرت النشاطية المضادة لفوق أكسدة الليبيدات حسب Zerargui وآخرون (2015). يعتبر MDA الناتج النهائي لأكسدة الأحماض الدهنية غير المشبعة من طرف الجذور الحرة الأوكسجينية. تعتمد هذه الطريقة على تفاعل MDA مع (TBA) thiobarbituric acid وبالتالي تكوين مركب TBA-MDA وردي اللون. يضاف إلى 500 ميكرو لتر من النسيج المجانس 500 ميكرو لتر من (TCA) Tri-chloro acetic acid (20 %) و 1 مل TBA (0.67 %). يحضن المزيج في 100 °م خلال 15 دقيقة، يبرد بعدها و يضاف 4 مل بوتانول يريج المزيج ثم يتبع بطرد مركزي بسرعة 3000 دورة/ دقيقة، بعدها تقاس امتصاصية الجزء الطافي عند 530 نانومتر. يعبر عن تركيز MDA بنانومول / غ من النسيج، معامل الانطفاء الجزئي ل MDA 1.56 . 10⁻⁵ مولار⁻¹. سم⁻¹.

3.7.2. إختبار DPPH

يضاف 1250 ميكرو لتر من محلول DPPH (بتركيز 0.004 % في الميثانول) إلى 50 ميكرو لتر من مصال الدم، بعد فترة حضانة لمدة 30 دقيقة يعرض المزيج للطرد المركزي لمدة 15 دقيقة بسرعة 3000 دورة / دقيقة. تقاس الامتصاصية عند طول موجة 517 نانومتر.

4.7.2. إختبار القدرة الإرجاعية

يضاف المحلول المنظم (فوسفات 0.2 مولار و أس هيدروجيني 6.6) و محلول فريسيانيد البوتاسيوم (1 %) إلى مصال الدم. بعد فترة حضانة لمدة 20 دقيقة في حمام مائي بدرجة حرارة 50 °م، يضاف للمزيج حمض الخل ثلاثي الكلورور (TCA) (10 %) و يعرض المزيج للطرد المركزي (3000 دورة/دقيقة خلال 10 دقائق). يضاف إلى الجزء الطافي الماء المقطر و كلورور الحديد (0.1 %) و تقاس الامتصاصية عند طول موجة 700 نانومتر.

5.7.2. متابعة نشاطية إنزيم catalase

توضع الأعضاء بعد نزعها مباشرة في محلول فيزيولوجي ثلجي. لمجانسة النسيج، يوضع جزء من العضو في محلول KCl (1.15%) بنسبة 10/1 و يسحق بجهاز Homogenizer ثم يعرض المعلق الناتج للطرْد المركزي بسرعة 5000 دورة/الدقيقة في 4م خلال 15 دقيقة للتخلص من الأغشية الخلوية. يوزع الجزء الطافي على أنابيب ويجمد لحين الاستعمال.

حددت نشاطية إنزيم CAT في الأنسجة حسب Bouaiz وآخرون (2016) مع بعض التغييرات. يحفز إنزيم CAT إماهة الماء المؤكسج و إنتاج جزيئات ماء و أكسجين. يحتوي مزيج التفاعل على النسيج المجانس الماء المؤكسج بتركيز 19 ملي مولار في محلول منظم فوسفاتي (50 ملي مولار وأس هيدروجيني 7.4). يتم متابعة الانخفاض في امتصاصية بيروكسيد الهيدروجين عند طول موجة 240 نانومتر خلال 30 ثانية. يعبر عن نشاطية إنزيم CAT بوحدة دولية/مغ من البروتين، معامل الإنطفاء الجزيئي لبيروكسيد الهيدروجين 43.4 مولار⁻¹. سم⁻¹.

6.7.2. تقدير تركيز الغلوتاثيون الكلي

قدر تركيز الغلوتاثيون الكلي حسب Bentahar وآخرون (2016). يستعمل في هذا الاختبار 5,5'-Dithio-bis- (DTNB) (2-nitrobenzoic acid) الذي يؤكسد الغلوتاثيون مكونا مركبا ذي لون أصفر 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) بمعامل انطفاء 13600 مولار⁻¹. سم⁻¹. يتكون مزيج التفاعل من النسيج المجانس (المخفف في محلول منظم تركيزه 0.1 مولار وأس هيدروجيني 8.0) و DTNB. تقاس الامتصاصية بعد 5 دقائق في طول موجة 412 نانومتر. يعبر عن تركيز الغلوتاثيون بالمكرومول / غ من النسيج.

7.7.2. تقدير تركيز البروتينات

قدر محتوى البروتينات في محاليل الأنسجة المجانسة حسب طريقة Gornall وآخرون (1949) باستعمال كاشف Biuret وألبومين مصّل البقر كمحلول مرجعي. يحتوي مزيج التفاعل على 1 مل من كاشف Biuret و 25 مكرو لتر من النسيج المجانس أو ألبومين مصّل البقر. تقاس الامتصاصية بعد 10 دقائق عند طول موجة 540 نانومتر. استعملت تراكيز البروتينات لحساب نشاطية إنزيم catalase والتعبير عنها بالوحدة الدولية/مغ من البروتين.

8.2. التأثير المضاد لسمية الكبد بـ CCl_4 Carbon tetrachloride

استعملت فئران ذكور من سلالة NMris و اعتمد في هذا الاختبار على طريقة Kamisan وآخرون (2013) مع بعض التعديلات. قسمت الفئران إلى 7 مجموعات (تحتوي كل مجموعة على 6 فئران):

مجموعة الشاهد: يعطى لها جرعة من الماء ولا تعامل بـ CCl_4 .

مجموعة شاهد ثانية: يعطى لها جرعة من الماء وتعامل بـ CCl_4 .

مجموعة الشاهد الموجب: يعطى لها فيتامين C كمضاد أكسدة مرجعي بجرعة 200 مغ/كغ و تعامل بـ CCl_4 .

مجموعتان للمستخلص الخام لأوراق نبتة الشبيط: جرعة 200 مغ/كغ و جرعة 600 مغ/كغ، تعامل المجموعتان بـ CCl_4 .

مجموعتان للمستخلص الخام لأوراق نبتة الهيوفاريقون: جرعة 50 مغ/كغ و 100 مغ/كغ، تعامل المجموعتان بـ CCl_4 .

دام الاختبار مدة 7 أيام، حيث يعطى كل فأر جرعة يومية عن طريق الفم. في اليوم السابع حقنت الفئران بـ CCl_4 (2 مل /كغ، بنسبة 50 % في زيت الزيتون) عن طريق الصفاق.

بعد 24 ساعة من حقن CCl_4 ، ذبحت الفئران للحصول على الدم لاجراء التحاليل البيوكيميائية وتم استرجاع الكبد و الكلى لاختبار نشاطية إنزيم catalase و تقدير تركيز كل من malonylaldehyde و glutathione والبروتينات. تجانس الأنسجة وتقدر نشاطية إنزيم catalase وكمية MDA والغلوتاثيون الكلي والبروتينات بنفس الطريقة المطبقة في دراسة السمية تحت الحادة.

تم تقدير نشاطية كل من glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) و glutamate pyruvate و transaminase (GPT) و phosphatase alkaline (PAL) وتركيز كل من Bilirubine و creatinine و urea والغلوسيريدات الثلاثية والكولسترول باستعمال جهاز COBAS INTEGRA وباستعمال محاليل Roche.

9.2. التأثير المضاد للالتهاب

1.9.2. تحفيز وذمة الأذن بـ Xylene

أستعملت فئران ذكور من سلالة NMris و اعتمد في هذه الدراسة على طريقة kou وآخرون (2005) مع بعض التعديلات. قسمت الفئران إلى 8 مجموعات (تحتوي كل مجموعة على 6 فئران):

مجموعة الشاهد السالب: يعطى لها جرعة من الماء و تعامل بـ Xylene.

مجموعة الشاهد الموجب: يعطى لها الأسبيرين كمضاد التهاب مرجعي بجرعة 100 مغ/كغ و تعامل بـ Xylene.

ثلاث مجموعات للمستخلص الخام لأوراق نبتة الشبيط: جرعة 200 مغ/كغ و جرعة 400 مغ/كغ و جرعة 600 مغ/كغ، تعامل المجموعات بـ Xylene.

ثلاث مجموعات للمستخلص الخام لأوراق نبتة الهيوفاريقون: جرعة 50 مغ/كغ و 75 مغ/كغ و 100 مغ/كغ، تعامل المجموعات بـ Xylene.

تعطى الجرعات للفئران، و بعد ساعة يتم قياس سمك الأذن اليمنى ثم توضع 30 ميكرو لتر من Xylene على الجهة الداخلية للأذن اليمنى. تقتل الفئران بعد ساعتين بـ dislocation cervical و تقطع أقراص من الأذن بقطر 6 ملم. يقاس سمك كل قرص بالقدم القنوية و يحسب الفرق بين سمك الأذن اليمنى قبل وبعد ساعتين من تحريض الوذمة ثم تحسب نسبة تثبيط الوذمة مقارنة مع مجموعة الشاهد السالب بالعلاقة التالية :

نسبة التثبيط (%) = $\left[\frac{\text{الفرق في السمك بالنسبة للشاهد السالب} - \text{الفرق في السمك بالنسبة للمجموعة المعاملة}}{\text{الفرق في السمك بالنسبة للشاهد السالب}} \right] \times 100$.

2.9.2. تحفيز وذمة الأذن بزيت Croton

أستعملت فئران ذكور من سلالة NMris و اعتمد في هذا الاختبار على طريقة Manga وآخرون (2004) مع بعض التعديلات. قسمت الفئران إلى 8 مجموعات (تحتوي كل مجموعة على 6 فئران):

مجموعة الشاهد السالب: يعطى لها جرعة من الماء و تعامل بزيت Croton.

مجموعة الشاهد الموجب: يعطى لها Indomethacin كمضاد التهاب مرجعي بجرعة 50 مغ/كغ و تعامل بزيت croton.

ثلاث مجموعات للمستخلص الخام لأوراق نبتة الشبيط: جرعة 200 مغ/كغ و جرعة 400 مغ/كغ و جرعة 600 مغ/كغ، تعامل المجموعات بزيت croton.

ثلاث مجموعات للمستخلص الخام لأوراق نبتة الهيوفاريقون: جرعة 50 مغ/كغ و 75 مغ/كغ و 100 مغ/كغ، تعامل المجموعات بزيت croton.

تعطى الجرعات للفئران، و بعد ساعة توضع 15 ميكرو لتر من محلول acetone - ماء (1: 1) حاو على 80 ميكرو غرام من زيت croton على الجهة الداخلية للأذن اليمنى و 15 ميكرو لتر من محلول acetone - ماء (1: 1) على الجهة الداخلية للأذن اليسرى. تقتل الفئران بعد 6 ساعات بـ dislocation cervical و تقطع أقراص من كل أذن بقطر

6 ملم. يقاس سمك كل قرص بالقدم القنوية و يحسب الفرق بين سمك الأذن اليمنى و سمك الأذن اليسرى ثم تحسب نسبة تثبيط الودمة مقارنة مع مجموعة الشاهد السالب بالعلاقة التالية :

نسبة التثبيط (%) = [(الفرق في السمك بالنسبة للشاهد السالب - الفرق في السمك بالنسبة للمجموعة المعاملة)/ الفرق في السمك بالنسبة للشاهد السالب] X 100.

3.9.2. تحفيز وذمة القدم ب carrageenan

أستعملت جرذان إناث من سلالة *Albino wistar*. أعتمد في هذا الاختبار على طريقة Igbe وآخرون (2010) مع بعض التعديلات. قسمت الجرذان إلى 8 مجموعات (تحتوي كل مجموعة على 6 جرذان):

مجموعة الشاهد السالب: يعطى لها جرعة من الماء وتعامل ب carrageenan.

مجموعة الشاهد الموجب: يعطى لها Indomethacin كمضاد التهاب مرجعي بجرعة 50 مغ/كغ وتعامل ب carrageenan.

ثلاث مجموعات للمستخلص الخام لأوراق نبتة الشبيطة: جرعة 200 مغ/كغ وجرعة 400 مغ/كغ وجرعة 600 مغ/كغ، تعامل المجموعات ب carrageenan.

ثلاث مجموعات للمستخلص الخام لأوراق نبتة الهيوفاريقون: جرعة 50 مغ/كغ و75 مغ/كغ و100 مغ/كغ، تعامل المجموعات ب carrageenan.

تعطى الجرعات للفران، و بعد ساعة يتم قياس سمك القدم اليمنى ثم يحقن 0.1 مل من carrageenan (1 % في محلول فيزيولوجي) في أخص القدم اليمنى للجرذ. يقاس سمك القدم بالقدم القنوية ابتداء من الساعة الأولى من الحقن ثم بعد ذلك كل ساعة خلال الخمس ساعات الموالية، و يحسب الفرق بين سمك القدم قبل و بعد كل ساعة خلال فترة الاختبار ثم تحسب نسبة تثبيط الودمة مقارنة مع مجموعة الشاهد السالب بالعلاقة التالية:

نسبة التثبيط (%) = [(الفرق في السمك بالنسبة للشاهد السالب - الفرق في السمك بالنسبة للمجموعة المعاملة)/ الفرق في السمك بالنسبة للشاهد السالب] X 100.

10.2. التحليل الإحصائي

يعبر عن كل القيم المحصل عليها بالمتوسط الحسابي (M) \pm الانحراف المعياري (SD). عموماً ، حللت النتائج إحصائياً عن طريق اختبار ANOVA one-way متبوعاً باختبار Tukey. استعمل برنامج Graphpad Prism v.5.0 في رسم المنحنيات والتحليلات الإحصائية. تعتبر القيم $p \leq 0.05$ و $p \leq 0.01$ و $p \leq 0.001$ ذات دلالة إحصائية معنوية مقارنة بالمجموعات الشاهدة.

النتائج والمناقشة

1. الاستخلاص والتجزئة

تم الاستخلاص حسب Al-Qudah وآخرون (2012) باستعمال الميثانول النقي 98 %، يسمح هذا باستخلاص عديدات الفينول والفلافونويدات وللزيادة في مردود الاستخلاص دامت عملية النقع 7 أيام ثم تُكثَّر عملية الاستخلاص مرتين أخريين. أوضحت النتائج المتحصل عليها أن مردود الاستخلاص عال في حالة المستخلص الخام لكلا النباتين؛ 27.66 % و 21 % مع HP و XS على الترتيب (جدول 3) و (جدول 4). فصلت المركبات المختلفة الموجودة في المستخلص الخام (CrE) باستعمال مذيبات ذات قطبية متزايدة، يسمح هذا بالحصول على مستخلص الهكسان (HeE) حاو على اللييدات في مرحلة أولى، يليه المستخلص الكلوروفورمي (ChE) حاو على عديدات الفينول غير السكرية ثم المستخلص الإيثيلي (EAE) به عديدات الفينول أحادية وثنائية السكر ثم المستخلص المائي (AqE) حاو على عديدات الفينول ثلاثية ورباعية السكاكر وجزيئات أخرى محبة للماء كالبروتينات والسكريات (1982 Markham).

ينتج عن الاختلاف في قطبية المركبات المضادة للأوكسدة (و بالتالي اختلاف في معدل استخلاص هذه المركبات) تغير في مردود الاستخلاص والنشاطية المضادة للأوكسدة للمستخلصات. يتحكم في ذوبانية المركبات الفينولية نوع المذيب المستعمل ودرجة بلورة الفينولات وتأثر الفينولات مع مركبات أخرى في الغذاء وتشكل مركبات غير قابلة للذوبان. لهذا السبب، يوصى باستعمال الميثانول في الاستخلاص (Tiwari وآخرون، 2011).

الجدول 3: مردود استخلاص مختلف مستخلصات أوراق نبتة HP ومحتواها من عديدات الفينول والفلافونويدات.

المستخلص	المردود (%)	عديدات الفينول [°]	الفلافونويدات ^{°°}
CrE	27	8.10 ± 133.47	0.91 ± 19.27
ChE	0.44 ± 3.1	3.8 ± 303.9	2.18 ± 177.4
EAE	1.14 ± 5.276	1.4 ± 692	0.85 ± 245.5
AqE	3.05 ± 8.24	7.3 ± 210.5	4.26 ± 12.1

[°]: مكافئ الملغرام من الحمض gallic / غرام من وزن المستخلص.

^{°°}: مكافئ الملغرام من الكرستين / غرام من وزن المستخلص.

الجدول 4: مردود استخلاص مختلف مستخلصات أوراق نبتة XS ومحتواها من عديدات الفينول والفلافونويدات.

المستخلص	المردود (%)	عديدات الفينول ^o	الفلافونويدات ^{oo}
CrE	21	4.98 ± 85.77	1.39 ± 11.76
ChE	1.96 ± 8.44	3.3 ± 70.58	2.75 ± 17.26
EAE	0.43 ± 1.09	27.98 ± 166.26	3.14 ± 29.037
AqE	1.28 ± 8.14	13.31 ± 75.24	1.615 ± 10.6

^o: مكافئ الملغرام من الحمض gallic / غرام من وزن المستخلص

^{oo}: مكافئ الملغرام من الكريستين / غرام من وزن المستخلص.

عند تحضير مستخلص ابتداء من الجزء الهوائي ل HP حصل Pesin Suntar ورفقاؤه (2010) على مردود استخلاص يتراوح بين 29.33 و 31.3%. هذا المردود قريب جدا من النسبة المتحصل عليها في هذه الدراسة. من بين المستخلصات الثانوية، تميز المستخلص المائي بأعلى معدل يليه المستخلص EAE فمستخلص ChE (الجدول 3). أما في حالة مردود مستخلص XS الخام، فإن القيمة التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة تفوق تلك (14.3%) التي تحصل عليها Scherer و Godoy (2014). في حين تميز كلا من المستخلص AqE و مستخلص ChE بقيم مردود متقاربة، أما مستخلص EAE فتميز بمردود ضعيف (جدول 4).

2. معايرة عديدات الفينول والفلافونويدات

قدر محتوى مختلف المستخلصات من عديدات الفينول بطريقة Folin-Ciocalteu (Georgé وآخرون، 2005؛ Li وآخرون، 2007). كما قدر محتوى مختلف المستخلصات من الفلافونويدات بطريقة الألومنيوم ثلاثي كلور (AlCl₃) (Bahorun وآخرون، 1996).

بالنسبة لأوراق HP، تميز المستخلص EAE بأعلى محتوى من عديدات الفينول الكلية بقيمة 1.4 ± 692 مغ/غ من المستخلص الجاف يليه المستخلص ChE فالمستخلص AqE ثم المستخلص CrE. أما محتوى المستخلصات من الفلافونويدات فكان المستخلص EAE دائما الأغنى بقيمة 0.85 ± 245.5 مغ/غ من المستخلص الجاف يليه المستخلص ChE فالمستخلص CrE ثم المستخلص AqE (جدول 3).

تحصل Fathi و Ebrahimzadeh (2013)، في دراسة حول الجزء الهوائي لنبتة *Hypericum perforatum* من إيران، على محتوى من عديدات الفينول الكلية يقدر بـ 18 ± 505.7 مغ/غ من المستخلص الجاف ومحتوى من

الفلافونويدات يقدر بـ 23.8 ± 1.6 مغ/غ من المستخلص الجاف. وفي دراسة تمت على عينة من اليونان قدر المحتوى من عديدات الفينول يقدر بـ 257 ± 4 مغ/غ من المستخلص الجاف (Gioti وآخرون ، 2009). تميز المستخلص الخام لنبته HP المحضر في هذه الدراسة بمحتوى من عديدات الفينول أضعف ذلك الذي ذكره كل من Fathi و Ebrahimzadeh (2013) و Gioti وآخرون (2009).

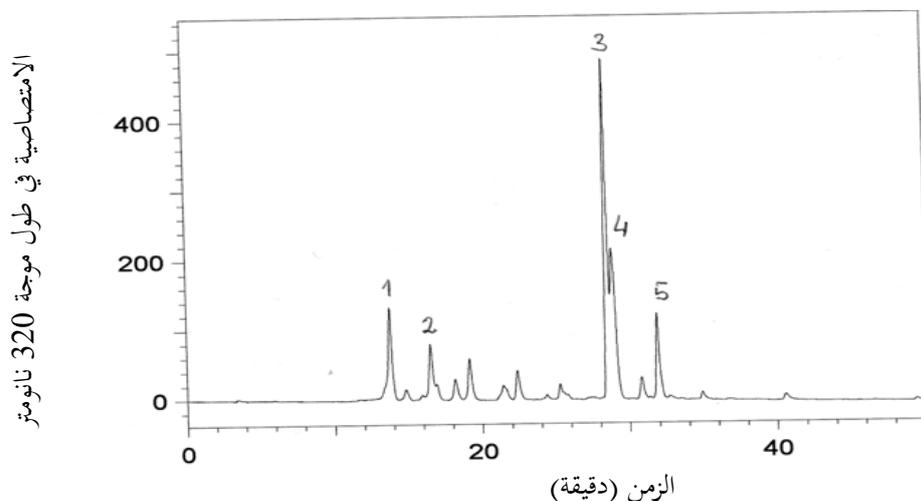
بالنسبة لأوراق XS، رغم تميز المستخلص EAE بمردود استخلاص ضعيف فإن محتواه من عديدات الفينول الكلية كان الأعلى بقيمة 166.26 ± 27.98 مغ/غ من المستخلص الجاف يليه المستخلص CrE فالمستخلص AqE ثم المستخلص ChE. أما محتوى المستخلصات من الفلافونويدات فكان دائما الأعلى في حالة المستخلص EAE بقيمة 29.037 ± 3.14 مغ/غ من المستخلص الخام يليه المستخلص ChE فالمستخلص CrE فالمستخلص AqE (جدول 4).

في حالة XS، تحصل Scherer و Godoy (2014) على محتوى من عديدات الفينول يقدر بـ 98.68 مغ/غ من المستخلص الجاف. أما Sheela و Nair (2016) فقد ذكرا أن محتوى هذه النبتة من عديدات الفينول أقل بكثير يقدر بـ 19.53 مغ / غ من المستخلص الخام. أما محتوى المستخلص من الفلافونويدات فهو 23.26 مغ / غ من المستخلص وهي تعادل ضعف المحتوى المتحصل عليه في هذه الدراسة.

يمكن أن تعود هذه الاختلافات إلى طريقة الاستخلاص والطريقة المتبعة في تقدير عديدات الفينول والفلافونويدات دون تجاهل الموقع الجرافي والمناخ ونوعية التربة. يرتبط محتوى نبتة من المركبات الفينولية بعدة عوامل داخلية (وراثية) وخارجية (عوامل بيئية كالحرارة والرطوبة وطريقة معاملة النبتة بعد القطف وظروف تخزينها) (Sousa وآخرون، 2006).

3. نتائج HPLC

في حالة HP، تم الحصول على المخطط الكروماتوغرافي (شكل 13).



الشكل 14: مخطط يوضح أزمنة احتباس أهم المواد التي تدخل في تركيب المستخلص الخام ل HP. 1: مشتق من الحمض caffeic و 2: مشتق من الحمض *p*-coumaric و 3 و 4 و 5: مشتقات من rutin.

يوضح الجدول 5 أهم الجزيئات المكونة للمستخلص الخام ل HP و تراكيزها.

الجدول 5 : أزمنة احتباس أهم الجزيئات المكونة للمستخلص الخام ل HP و تراكيزها.

التركيز (مغ/غ من المستخلص الخام)	زمن الاحتباس (دقيقة)	الجزيئة
0.24 ± 4.71	13.6	الحمض caffeic (1)
0.09 ± 1.7	16.6	مشتق من الحمض <i>p</i> -coumaric (2)
2.54 ± 50.81	28.8	(3) rutin
1.36 ± 27.12	29.2	مشتق من rutin (4)
0.24 ± 12.73	32.4	مشتق من rutin (5)

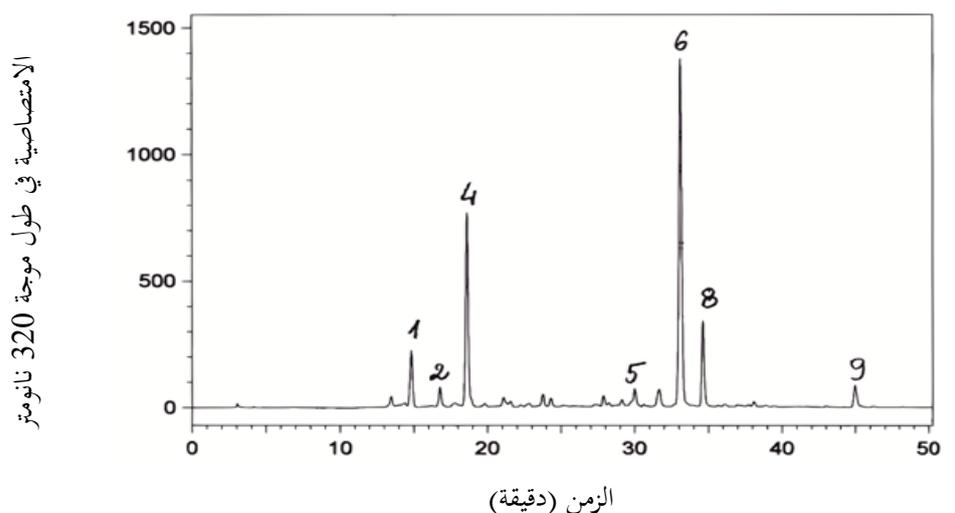
تمثل الأرقام بين قوسين ترقيم الجزيئات في المخطط الكروماتوغرافي.

حسب هذه النتائج، يغلب rutin على تركيب المستخلص الخام ل HP كما يتواجد الحمض caffeic بنسبة أقل ويليه الحمض *p*-coumaric بأقل نسبة. تتوافق هذه النتائج مع القيم المحصل عليها عند معايرة كل من عديدات الفينول والفلافونويدات التي أعطت قيم معتبرة. من جهة أخرى، وحسب Barnes وآخرون (2001) يدخل rutin و الحمضين caffeic و *p*-coumaric في تركيب هذه النبتة، إلا أنها تحتوي أيضا على مركبات مثل

hyperforin و hypericin. قد تكون هذه الجزئيات موجودة في مستخلص HP متمثلة في المعاول التي بقيت دون التعرف على مكوناتها.

يتميز Rutin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone-3-rutinoside) أو (quercetin-3-rutinoside) الطبيعي بتأثير قوي (Baldisserotto وآخرون، 2014) وبقدرة على تخفيض معدل الكولستيرول والغليسيريدات الثلاثية وبخصائص مضادة للالتهاب (Salvamani وآخرون، 2014).

في حالة XS، تم الحصول على المخطط الكروماتوغرافي (شكل 15)



الشكل 15: مخطط يوضح أزمنة احتباس أهم المواد التي تدخل في تركيب المستخلص الخام ل XS. 1 و 6 و 8: مشتقات من الحمض caffeic و 2: مشتق من الحمض p-coumaric و 4: الحمض chlorogenic و 5 و 9: مكافئين ل rutine.

الجدول 6 : أزمنة احتباس أهم الجزئيات المكونة للمستخلص الخام ل XS وتراكيزها.

الجزئية	زمن الاحتباس (دقيقة)	التركيز (مغ/غ من المستخلص الخام)
الحمض caffeic (1)	14.88	0.1 ± 2.07
مشتق من الحمض caffeic (6)	33.11	1.8 ± 36.7
مشتق من الحمض caffeic (8)	34.66	0.17 ± 3.43
مشتق من الحمض p-coumaric (2)	16.88	0.02 ± 0.37
الحمض chlorogenic	18.66	0.7 ± 14
rutin (5)	30	0.25 ± 4.95
مشتق من rutin (9)	45.11	0.29 ± 5.87

تمثل الأرقام بين قوسين ترقيم الجزئيات في المخطط الكروماتوغرافي.

تغلب مشتقات الحمض caffeic على تركيب المستخلص الخام ل XS؛ قد تكون هذه المشتقات بشكل وحدة واحدة أو مكونة من وحدتي حمض caffeic أو ثلاث وحدات أو أربع (Jiang وآخرون، 2005). كما يتواجد الحمضين chlorogenic و p-coumaric بنسبة أقل ويليهما rutin. تتوافق هذه النتائج أيضا مع القيم المحصل عليها عند معايرة كل من عديدات الفينول والفلافونويدات التي أعطت قيما معتبرة.

يدخل في تركيب نبات XS مركبات sesquiterpene lactones منها xanthumin و xanthanol (Malik وآخرون، 1993) و atractyloside و carboxyatractyloside والأحماض Caffeolquinic (Qin وآخرون، 2006). كما هو الحال مع مستخلص HP، قد تكون هذه الجزئيات موجودة في المستخلص لكن لم يتم التعرف عليها.

يتميز الحمض caffeic بخصائص مضادة للأوكسدة، إذ أنه يزيح عددا من الجذور الحرة من بينها جذور DPPH و الهيدروكسيل و فوق الأوكسيد والبيروكسيل والبيروكسي نيتريت و (DA Cunha وآخرون، 2004).

بينت دراسة أخرى حول 25 مشتق من الحمض caffeic (Jiang وآخرون، 2005)، أن هذه الأخيرة تتميز بتأثيرات مختلفة. تشمل التأثيرات المضادة للأوكسدة لمشتقات الحمض caffeic ثلاثة جوانب: 1) تثبيط فوق أكسدة الليبيدات و 2) إزاحة الجذور الحرة ومن بينها جذور الهيدروكسيل ؛ و 3) تثبيط أكسدة البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة وبالتالي منع ظهور مرض تصلب الشرايين.

4. الأنشطة المضادة للأوكسدة في الأنوب

لا يمكن استنتاج النشاطية المضادة للأوكسدة من خلال اختبار واحد، لأن مضادات الأوكسدة تؤثر بآليات متعددة ولا يمكن لآلية واحدة أن تجمع بين كل الآليات (Nur Alam وآخرون، 2013). تم تقدير النشاطية المضادة للأوكسدة لمختلف المستخلصات باستعمال عدة اختبارات؛ انحلال أغشية الكريات الحمراء واستخلاص الحديد والقدرة الإرجاعية وإزاحة جذور الهيدروكسيل والماء المؤكسج وأكسدة البيتا-كروتين وإزاحة جذور DPPH.

1.4 النشاط المضاد لانحلال كريات الدم الحمراء

تستخدم المركبات الحاوية على رابطة مزدوجة بين ذرتي نيتروجين (مجموعة AzO (N=N)) كمولدات للجذور الحرة المخربة لأغشية الكريات الحمراء وبالتالي انحلالها. يتفكك AAPH مباشرة في وسط مائي وفي درجة الحرارة الفيزيولوجية إلى جذور 2-amidinopropyl، التي تتفاعل مع الأوكسجين منتجة جذور بيروكسيل، تحفز هذه

الأخيرة سلسلة أكسدة الليبيدات والبروتينات في أغشية الكريات الحمراء مما يؤدي إلى إنحلالها (Sulaiman و Husein، 2012).

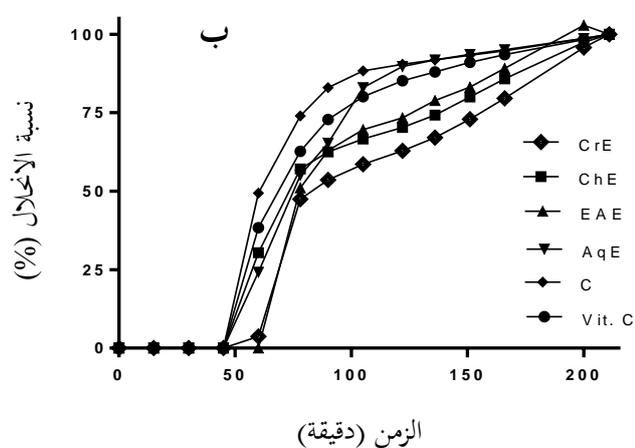
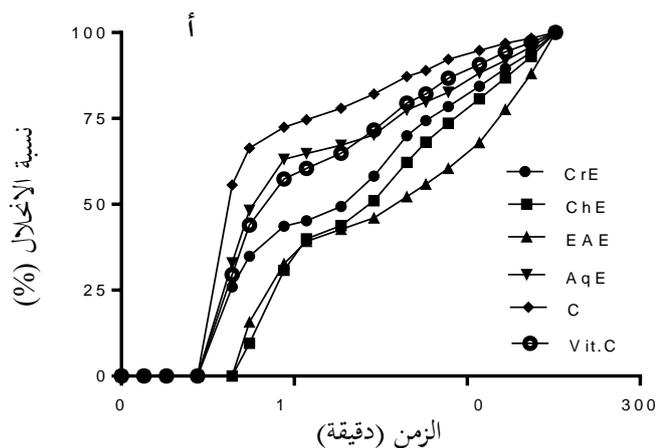
أظهرت النتائج أن الكريات الحمراء المعالجة بمستخلصات النبتتين HP و XS كانت جد مقاومة لهجوم جذور AAPH (شكل 16).

مقارنة مع الفيتامين C كشاهد عياري ($HT_{50} = 81.91$ دقيقة) والشاهد الموجب ($HT_{50} = 57.51$ دقيقة)، أظهرت كل المستخلصات فعالية تجاه تأثير AAPH (شكل 17) وكان الاختلاف جد معتبر ($p > 0.001$). في حالة HP أظهر المستخلص ChE أعلى فعالية بقيمة $HT_{50} = 125.61$ دقيقة، في حين تميز المستخلص AqE بأضعف قيمة ($HT_{50} = 92.25$ دقيقة).

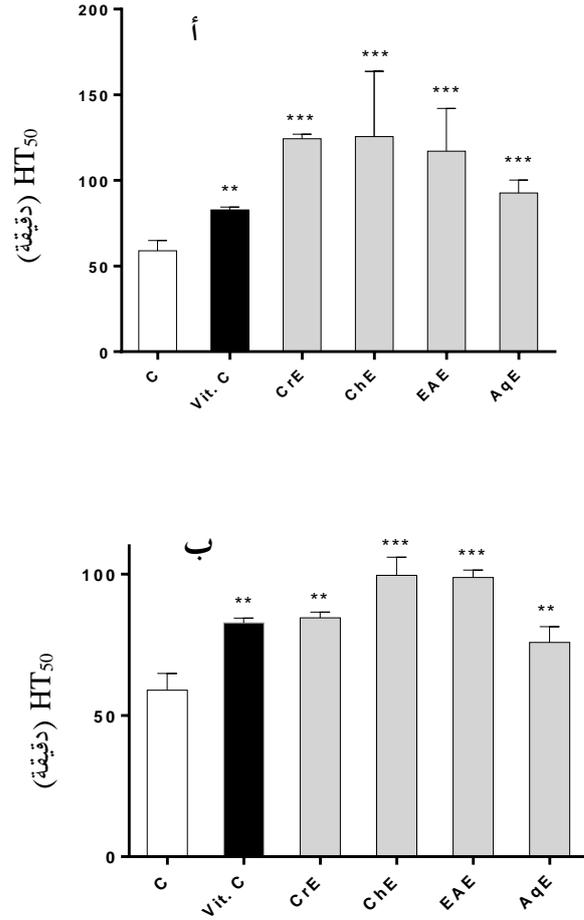
أما في حالة XS، فقد أظهر المستخلص ChE أعلى فعالية بقيمة $HT_{50} = 99.27$ دقيقة في حين تميز المستخلص AqE بقيمة $HT_{50} = 74.38$ دقيقة.

في حقيقة الأمر تعتبر كل هذه القيم عالية جدا، حيث تظهر مدى قدرة مستخلصات هاتين النبتتين على حماية الليبيدات من الأكسدة وهي تتوافق إلى حد كبير مع النتائج المتحصل عليها في اختبار أكسدة البيتا-كاروتين. تتأثر الجذور الحرة مكونات أغشية الكريات الحمراء كالبروتينات والليبيدات وتسبب تغيرات على مستوى بنية ووظيفة الأغشية، ينجم عن ذلك انحلال الكريات الحمراء. هذه الأخيرة حساسة للتخريب التأكسدي نتيجة لوجود كمية كبيرة من الأحماض الدهنية غير المشبعة والتركيز المرتفع للأكسجين و الهيموغلوبين (Sulaiman و Husein، 2012؛ Aman وآخرون، 2013). بالتالي فإن الكريات الحمراء تعتبر نموذجا لاختبار تخريب الأغشية التأكسدي الناتج عن المواد السامة xenobiotics والمؤكسدات (Sulaiman و Husein، 2012) من جانب، ومن جانب آخر لاختبار تأثير مضادات الأكسدة (Tulipani وآخرون، 2014؛ Boussoulim وآخرون، 2016؛ Giampieri وآخرون، 2016؛ Zerargui وآخرون، 2016).

أظهر المستخلص الكلوروفورمي أعلى فعالية؛ قد يعود ذلك لخصائصه غير القطبية التي تسمح له بالتموقع في عمق الطبقات الليبيدية للأغشية الخلوية (Omarova و Antonenko، 2014).



الشكل 16: التأثير المثبط لانحلال كريات الدم الحمراء من طرف مستخلصات HP و XS بدلالة الزمن. أ: H. perforatum؛ ب: X. strumarium؛ CrE: المستخلص الخام؛ ChE: مستخلص الكلوروفورم؛ EAE: مستخلص إيثيل أسيتات؛ AqE: المستخلص المائي؛ C: يحتوي على الكريات الحمراء و AAPH (الشاهد). Vit.C: الفيتامين C. القيم عبارة عن المتوسط الحسابي (n=3).



الشكل 17: قيم HT₅₀ لمستخلصات HP و XS لحماية كريات الدم الحمراء من الانحلال المحرض بـ AAPH. أ : *H. perforatum* ؛ ب : *X. strumarium* ؛ CrE : المستخلص الخام ؛ ChE : مستخلص الكلوروفورم ؛ EAE : مستخلص إيثيل أسيتات ؛ AqE : المستخلص المائي ؛ C : يحتوي على الكريات الحمراء و AAPH (الشاهد). Vit.C : الفيتامين C. القيم عبارة عن المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري (n=3). (p > 0.001).

قد تعود فعالية المستخلصات إلى: (1) طبيعة المحتوى الفينولي (البنى الكيميائية لعديدات الفينول والفلافونويدات) و(2) مدى قدرة جزيئات الفلافونويدات على احتراق الكريات الحمراء وعبورها للطبقات الليدية للأغشية الخلوية (López-Revuelta وآخرون، 2006). تحدد خصائص المضادات الأكسدة المحبة للدهون (مضادات الأكسدة

غير القطبية) تفضيلها التموقع على سطح أوفي عمق الطبقات الليدية للأغشية الخلوية (Omarova وAntonenko، 2014).

4.2 إستخلاص الحديد

يجول استخلاص الجزيئات المضادة للأوكسدة للأيونات المعدنية دون ظهور الجذور الأوكسجينية والتخريب الناتج عنها. تلعب القدرة على استخلاص المعادن دورا هاما في تخفيض تركيز المعادن المحفزة لأوكسدة اللييدات (Vadivukkarasi و Pavithra، 2015).

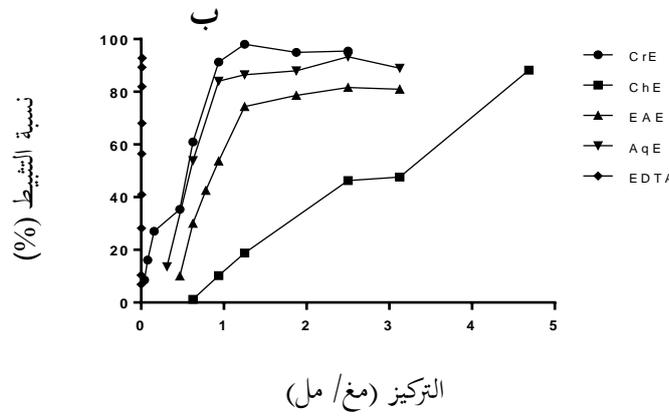
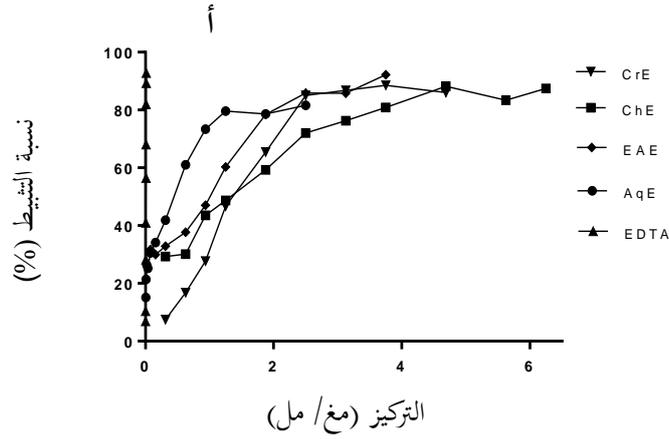
يمكن لـ Ferrozine أن يشكل مركبا (Fe^{2+} -Ferozine) ذي لون أحمر. يحدّد هذا التفاعل في وجود عوامل مستخلبة أخرى وبالتالي يؤدي إلى تناقص في اللون الأحمر. يسمح قياس انخفاض شدة اللون بتحديد نشاط الجزيئات المضاد للأوكسدة المنافسة لـ Ferrozine على الارتباط بأيونات Fe^{2+} (Nur Alam وآخرون، 2013).

من خلال هذه الدراسة أظهرت مستخلصات النبتتين HP و XS قدرة على تثبيط تشكّل المركب Ferrozine- Fe^{2+} بشكل يتناسب طرديا مع التركيز لكن بنسب متفاوتة (شكل 18).

يبين الشكل 19 أن كل المستخلصات تستخلب الحديد. في حالة HP أظهر المستخلص AqE فعالية أكبر بقيمة $\text{IC}_{50} = 0.057 \pm 0.417$ مغ/مل، في حين تميز المستخلص ChE بأضعف قدرة على الاستخلاص بقيمة $\text{IC}_{50} = 0.076 \pm 2.85$ مغ/مل. يبدو أن القدرة الاستخلاصية و لو أنها ضعيفة، تدل على وجود جزيئات في المستخلصات يمكنها إعطاء إلكترونات للدور الحرة وبالتالي تحويل هذه الأخيرة إلى ناتج أكثر استقرارا منهية بذلك سلسلة تفاعلات الجذور الحرة (radical chain reactions).

في هذا الاختبار، أورد Fathi و Ebrahimzadeh (2013) أن المستخلص الخام لنبتة HP أبدى قدرة استخلاصية ضعيفة بقيمة IC_{50} مساوية لـ 2.1 ± 0.3 مغ / مل.

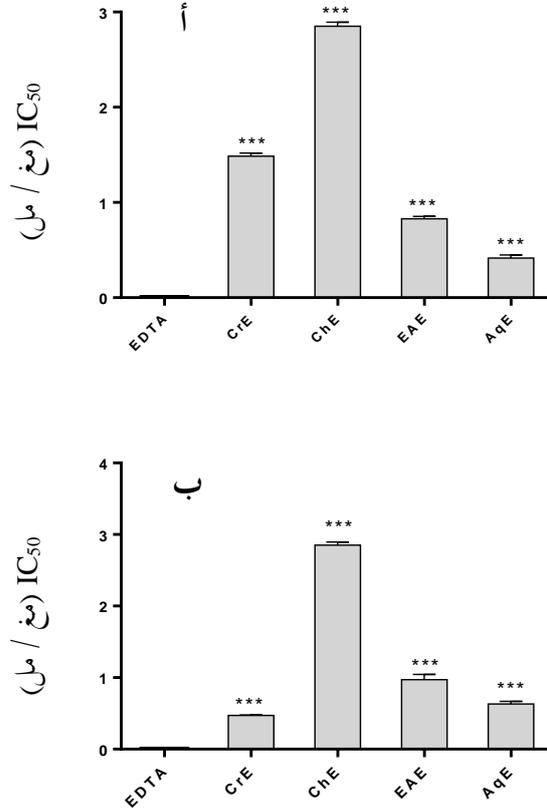
أما في حالة XS، فقد أظهر المستخلص CrE أعلى قدرة على الاستخلاص بقيمة $\text{IC}_{50} = 0.008 \pm 0.47$ مغ/مل. في حين تميز المستخلص ChE بأضعف قدرة على الاستخلاص بقيمة $\text{IC}_{50} = 0.07 \pm 2.9$ مغ/مل.



الشكل 18: نسب استخلاص الحديد من قبل مستخلصات HP و XS بدلالة التركيز. أ: *H. perforatum*؛ ب: *X. strumarium*؛ CrE: المستخلص الخام؛ ChE: مستخلص الكلوروفورم؛ EAE: مستخلص إيثيل أسيتات؛ AqE: المستخلص المائي؛ القيم عبارة عن المتوسط الحسابي (n=3).

تتميز عديدات الفينول بكونها مستخلبة للمعادن (Banjarnahor و Artanti، 2014). حسب هذه الدراسة، يبدو أنه لا يوجد توافق بين محتوى المستخلصات من عديدات الفينول والفلافونويدات والقدرة على الاستخلاص، توافق نتائج تلك المذكورة من طرف Bouaziz وآخرون (2014). من جهة أخرى، يبدو أن لقطبية المستخلصات، في حالة HP، علاقة مع نشاطها الاستخلاصي للحديد؛ إذ تميزت المستخلصات الأكثر قطبية بفعالية أعلى من تلك ضعيفة القطبية. تنطبق هذه الملاحظة مع مستخلصات XS ما عدا المستخلص CrE. توافق هذه النتائج ما أورده Bouaziz وآخرون (2015). حيث أن المستخلصات تحفز تأثيراً استخلاصياً يتناسب طردياً مع قطبية مذيباتها.

تسمح القدرة على استخلاص المعادن بالتخفيض من تركيز المعادن المتدخلة في تحفيز فوق الأكسدة الليبيدية عن طريق تفاعل Fenton وبالتالي يمكن اعتبار العوامل المستخلبة مضادات أكسدة ثانوية لأنها تعمل على استقرار الشكل المؤكسد لأيون المعدن (Bouaziz وآخرون، 2015؛ Pavithra و Vadivukkarasi، 2015).



الشكل 19: قيم IC₅₀ لمستخلصات HP و XS لاستخلاص الحديد. أ: *H. perforatum*؛ ب: X. *strumarium*؛ CrE: المستخلص الخام؛ ChE: مستخلص الكلوروفورم؛ EAE: مستخلص إيثيل أسيتات؛ AqE: المستخلص المائي؛ القيم عبارة عن المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري (n=3). (p > 0.001).

1.5 القدرة الإرجاعية

ترتبط القدرة الإرجاعية لمركب ما بقدرته على نقل الإلكترونات و يمكن أن تعتبر كمؤشر مهم لنشاطه المضاد للأكسدة. في هذا الاختبار يتحول اللون الأصفر لمزيج التفاعل إلى الأخضر أو الأزرق على حسب القدرة الإرجاعية للمستخلص. تعتمد هذه الطريقة على الزيادة في امتصاصية مزيج التفاعل وتدل الامتصاصية العالية في طول موجة 700 نانومتر على قدرة إرجاعية كبيرة (Sudha وآخرون، 2011).

أظهرت النتائج أن جميع المستخلصات لها القدرة على الإرجاع بشكل يتناسب طردياً مع تركيزها (شكل 20).

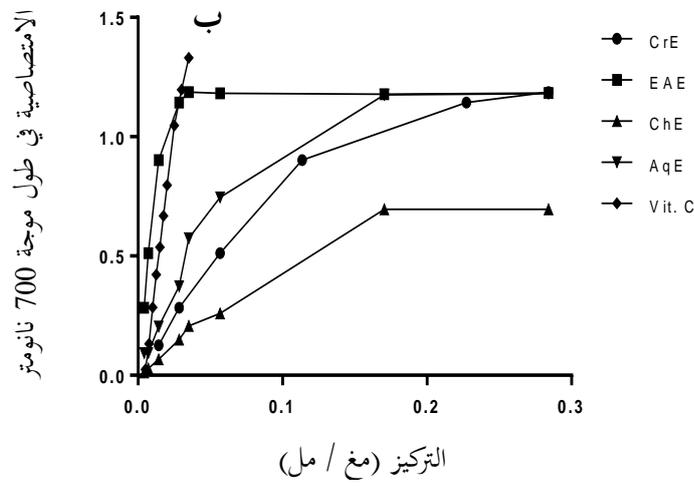
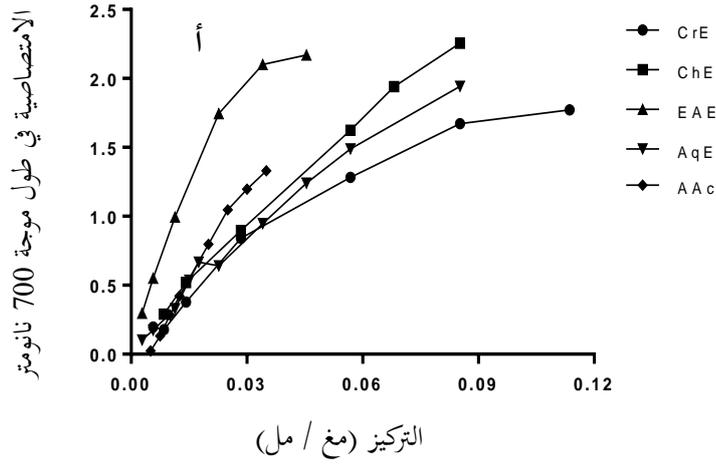
تم حساب التركيز الفعال (EC_{50} : effective concentration) الذي يوافق امتصاصية بقيمة 0.5، وكلما كانت قيمة EC_{50} أقل دلت على قدرة إرجاعية للمستخلص أكبر.

كل المستخلصات تُرجع Fe^{3+} إلى Fe^{2+} (شكل 21) لكن بنسب متفاوتة. في حالة HP، أظهر المستخلص EAE فعالية أكبر بقيمة $EC_{50} = 0.0002 \pm 0.004$ مغ/مل (بزيادة تقدر بثلاث مرات ونصف مقارنة مع الفيتامين Vit. C)، في حين تميزت المستخلصات CrE و ChE و AqE بأدنى قدرة على الإرجاع بقيمة $EC_{50} = 0.018 \pm 0.003$ مغ/مل و $EC_{50} = 0.0002 \pm 0.017$ مغ/مل و $EC_{50} = 10.00 \pm 0.015$ مغ/مل على الترتيب. يمكن أن تعود القدرة الإرجاعية المرتفعة لمستخلص EAE لمحتواه من عديدات الفينول والفلافونويدات مقارنة بالمستخلصات الأخرى.

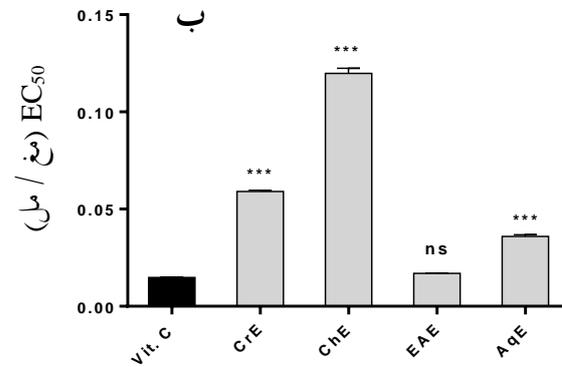
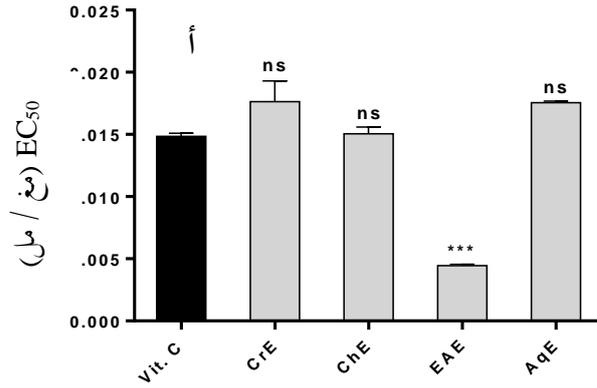
حسب Fathi و Ebrahimzadeh (2013) يبدي المستخلص الخام لنبته HP قدرة إرجاعية تتزايد مع التركيز وبقيمة EC_{50} تزيد عن 50 ميكروغرام / مل. من جهة أخرى، أورد Zou وآخرون (2004) وجود تناسب بين القدرة الإرجاعية وتركيز الفلافونويدات.

أما في حالة XS، فقد أظهر المستخلص EAE أعلى قدرة على الإرجاع بقيمة $EC_{50} = 0.00014 \pm 0.017$ مغ/مل حيث لا يوجد فرق معنوي مع الفيتامين C ($p > 0.001$). في حين تميز المستخلص ChE بأضعف قدرة إرجاعية بقيمة $EC_{50} = 0.0045 \pm 0.12$ مغ/مل. في حالة مستخلصات XS، يبدو أنه لا توجد علاقة بين القدرة على الإرجاع والمحتوى من عديدات الفينول والفلافونويدات. يمكن أن تعود هذه القدرة إلى نوعية المركبات التي تدخل في تركيب كل مستخلص.

عند المقارنة بين النتائج المتحصل عليها بالنسبة لقيم القدرة الإرجاعية للمستخلص الخام لأوراق XS كانت أعلى من تلك المذكورة من قبل Kamboj وآخرون (2014).



الشكل 20 : القدرة الإرجاعية لمستخلصات HP و XS بدلالة التركيز. أ : *H. perforatum* ؛ ب : X. *strumarium* ؛ CrE : المستخلص الخام ؛ ChE : مستخلص الكلوروفورم ؛ EAE : مستخلص إيثيل أسيتات ؛ AqE : المستخلص المائي ؛ Vit.C : الفيتامين C (شاهد). القيم عبارة عن المتوسط الحسابي (n=3).



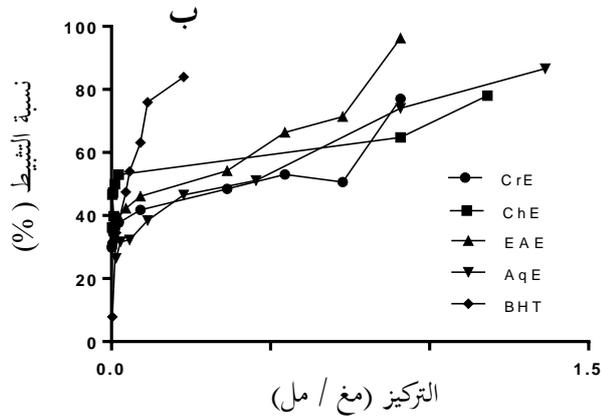
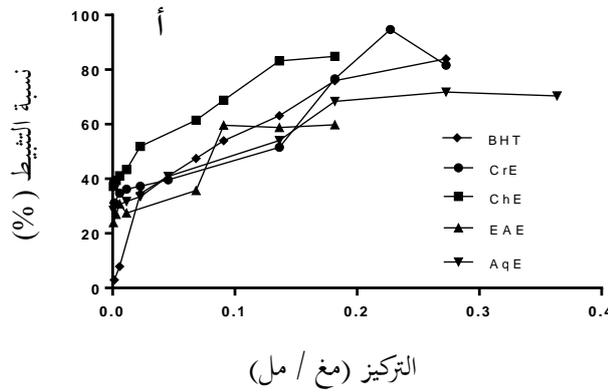
الشكل 21 : القدرة الإرجاعية لمستخلصات HP و XS . أ : *H. perforatum* ؛ ب : *X. strumarium* ؛
 CrE : المستخلص الخام ؛ ChE : مستخلص الكلوروفورم؛ EAE: مستخلص إيثيل أسيتات؛ AqE: المستخلص
 المائي؛ Vit.C : الفيتامين C (شاهد). أقل قيمة لـ EC₅₀ تمثل أكبر قدرة إرجاعية القيم عبارة عن المتوسط الحسابي ±
 الانحراف المعياري (n= 3). (0.001 > p).

2.4. النشاط الإزاحي لجذور الهيدروكسيل

يمكن التخلص من أنيون فوق الأكسيد والماء المؤكسج عن طريق إنزيمات superoxide dimutases و catalases / peroxidases على الترتيب، إلا أنه لا توجد إنزيمات تسمح بالقضاء على جذور الهيدروكسيل (Dwyer وآخرون، 2009). من جانب آخر تتميز جذور الهيدروكسيل بأنها أكثر الجذور الأكسجينية الحرة نشاطا وتفاعلا، وتلحق أضرارا جسيمة بالجزيئات المجاورة مثل DNA والليبيدات والبروتينات (Bouaziz وآخرون، 2014). نتيجة لذلك فإن إزاحة جذور الهيدروكسيل ضرورية لحماية الخلايا من التخريب.

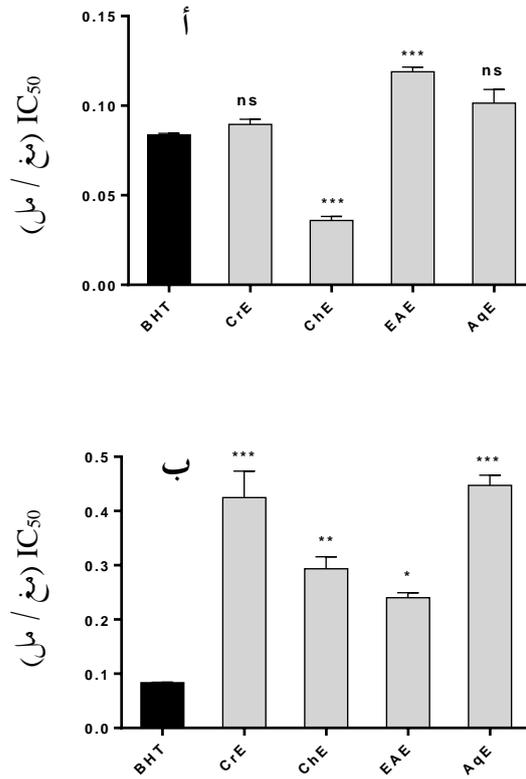
يعتبر تفاعل Fenton من بين أهم طرق إنتاج جذور الهيدروكسيل؛ إذ يتدخل أيون معدني (Fe^{2+}) في تحويل بيروكسيد الهيدروجين إلى جذور الهيدروكسيل. في هذا الاختبار يتم تكوين هذه الأخيرة عن طريق تفاعل $FeSO_4$ مع الماء المؤكسج والكشف عنها بتفاعلها مع الحمض salicylic (Ates وآخرون، 2008).

خلال هذه الدراسة أظهرت مستخلصات النبتتين HP و XS قدرة على إزاحة جذور الهيدروكسيل بشكل يتناسب طرديا مع كمية عديدات الفينول التي تحتويها النبتتين، لكن بنسب متفاوتة (شكل 22).



الشكل 22 : نسبة تثبيط جذور الهيدروكسيل بمستخلصات HP و XS بدلالة التركيز. أ : *H. perforatum* ؛ ب : *X. strumarium* ؛ CrE : المستخلص الخام؛ ChE : مستخلص الكلوروفورم؛ EAE : مستخلص إيثيل أسيتات؛ AqE : المستخلص المائي. القيم عبارة عن المتوسط الحسابي (n=3).

من خلال النتائج تبين أن كل المستخلصات تزيج جذور الهيدروكسيل (شكل 23). في حالة HP، أظهر المستخلص ChE أعلى فعالية بقيمة $IC_{50} = 0.0039 \pm 0.035$ مغ/مل (تزيد عن فعالية BHT بمرتين ونصف، في حين تميز المستخلص EAE بأضعف قدرة على الإزاحة بقيمة $IC_{50} = 0.004 \pm 0.1189$ مغ/مل. لم يلاحظ، في هذا الاختبار، تناسب بين محتوى المستخلصات من عديدات الفينول والقدرة على إزاحة جذور الهيدروكسيل. قد تعود القدرة على إزاحة جذور الهيدروكسيل إلى طبيعة المركبات الموجودة في كل مستخلص. أما في حالة XS، فقد أظهر المستخلص EAE أعلى قدرة على الإزاحة بقيمة $IC_{50} = 0.0158 \pm 0.240$ مغ/مل. في حين تميز المستخلصان CrE و AqE بأضعف قدرة على الإزاحة بقيم متقاربة لـ $IC_{50} = 0.08 \pm 0.42$ مغ/مل و $IC_{50} = 0.032 \pm 0.447$ مغ/مل على الترتيب. عموماً بالنسبة لمستخلصات هذه النبتة، أظهر المستخلص EAE الأغنى بعديدات الفينول وبالفلافونويدات أعلى قدرة على الإزاحة.



الشكل 23: قيم IC_{50} لمستخلصات HP و XS لإزاحة جذور الهيدروكسيل. أ: *H. perforatum*؛ ب: X. *strumarium*؛ CrE: المستخلص الخام؛ ChE: مستخلص الكلوروفورم؛ EAE: مستخلص إيثيل أسيتات؛ AqE: المستخلص المائي؛ أقل قيمة لـ IC_{50} تمثل أكبر تأثير إزاحي. القيم عبارة عن المتوسط الحسابي \pm الانحراف المعياري. (n= 3). (p > 0.001).

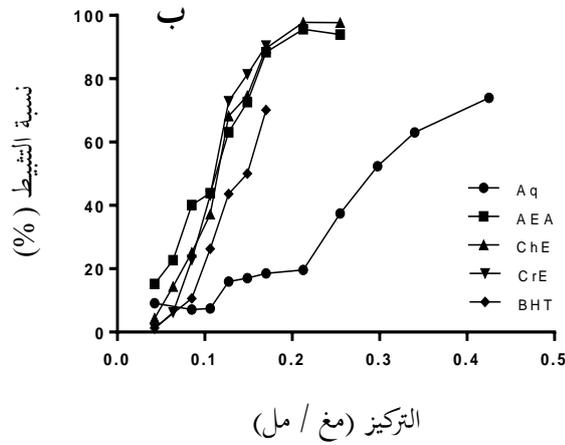
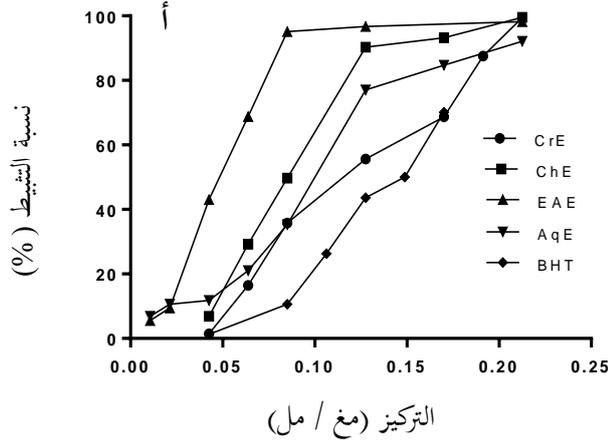
3.4. النشاط الإزاحي للماء المؤكسج

لا يتميز الماء المؤكسج (فوق أكسيد الهيدروجين) في حد ذاته بقدرة عالية على التفاعل، غير أنه قد يكون ساما للخلية. تسمح قدرته العالية على عبور الأغشية الخلوية إلى تشكيل جذور الهيدروكسيل حين يتفاعل الماء المؤكسج مع Fe^{2+} أو جذور أنيون فوق الأكسيد في الخلايا (Pal و Nimse، 2015). وبالتالي فإن إزاحة الماء المؤكسج مهمة جدا كآلية مضادة للأكسدة في الخلايا (Keser وآخرون، 2012). يمكن أن تُرجع قدرة مستخلص ما على إزاحة الماء المؤكسج إلى بنية المركبات النشطة المكونة له والتي تحدد قدرتها على إعطائه إلكترونات وبالتالي إبطال مفعوله بتحويله إلى جزيئات ماء (Gülçin وآخرون، 2004).

من خلال هذه الدراسة أظهرت مستخلصات النبتتين HP و XS قدرة على إزاحة فوق أكسيد الهيدروجين بشكل يتناسب طرديا مع تركيزها لكن بنسب متفاوتة (شكل 24). تزيح كل المستخلصات فوق أكسيد الهيدروجين (شكل 25). في حالة HP أظهر المستخلص EAE أعلى فعالية بقيمة $IC_{50} = 0.0487 \pm$ 0.0009 مغ/مل (تزيد عن فعالية BHT تقريبا بثلاث مرات)، في حين تميز المستخلص CrE بأضعف قدرة على الإزاحة بقيمة $IC_{50} = 0.122 \pm 0.02$ مغ/مل. ذكر Fathi و Ebrahimzadeh (2013) أن المستخلص الخام لنبته HP أظهر نسبة تثبيط 40% عند التركيز 200 ميكروغرام / مل و 90% عند 400 ميكروغرام / مل.

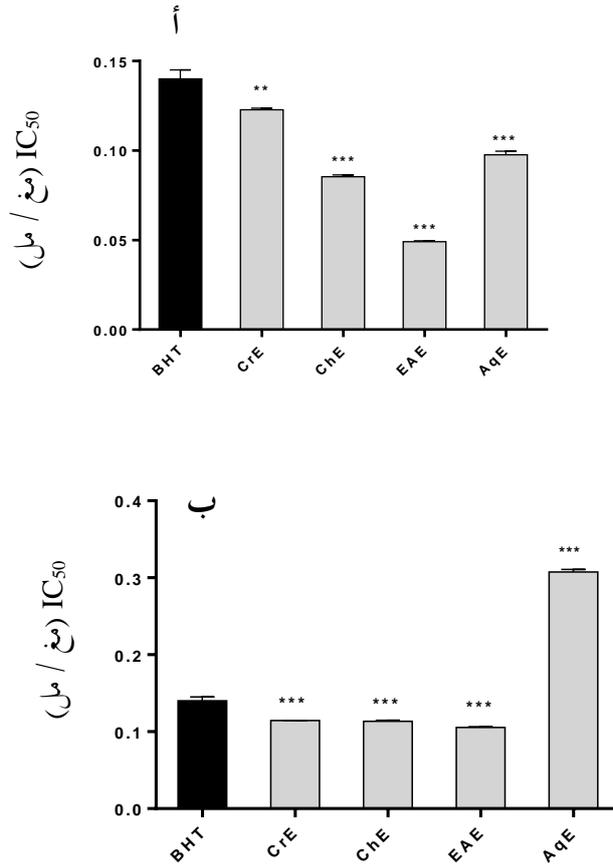
أما في حالة XS، فقد أظهرت المستخلصات CrE و ChE و EAE قدرة متقاربة على الإزاحة بقيمة $IC_{50} = 0.114 \pm 0.001$ مغ/مل و $IC_{50} = 0.113 \pm 0.002$ مغ/مل و $IC_{50} = 0.105 \pm 0.002$ مغ/مل على الترتيب. في حين تميز المستخلص AqE بأضعف قدرة إزاحية بقيمة $IC_{50} = 0.307 \pm 0.01$ مغ/مل. تميز المستخلص الخام لأوراق XS بقدرة أقل على إزاحة فوق أكسيد الهيدروجين من تلك الواردة في دراسة Kamboj و رفقائه (2014).

في حالة مستخلصات HP، يبدو أن هناك ارتباط بين القدرة على إزاحة فوق أكسيد الهيدروجين والمحتوى من عديدات الفينول والفلافونويدات من جانب ومن جانب آخر يبدو أن المستخلصات غير القطبية (المستخلص ChE) تتميز بنشاطية عالية مقارنة مع تلك القطبية. قد يرجع ذلك إلى طبيعة التفاعل مع فوق أكسيد الهيدروجين.



الشكل 24 : نسبة إزاحة فوق أكسيد الهيدروجين بمستخلصات HP و XS بدلالة التركيز. أ : *H. perforatum* ؛
 ب : *X. strumarium* ؛ CrE : المستخلص الخام ؛ ChE : مستخلص الكلوروفورم ؛ EAE : مستخلص إيثيل
 أسيتات ؛ AqE : المستخلص المائي . القيم عبارة عن المتوسط الحسابي (n=3).

في حالة مستخلصات XS، يبدو أنه لا توجد علاقة بين القدرة على إزاحة فوق أكسيد الهيدروجين و المحتوى من
 عديدات الفينول و الفلافونويدات. أما من حيث القطبية فإن المستخلص AqE الأكثر قطبية يتميز بأضعف قدرة
 على الإزاحة.

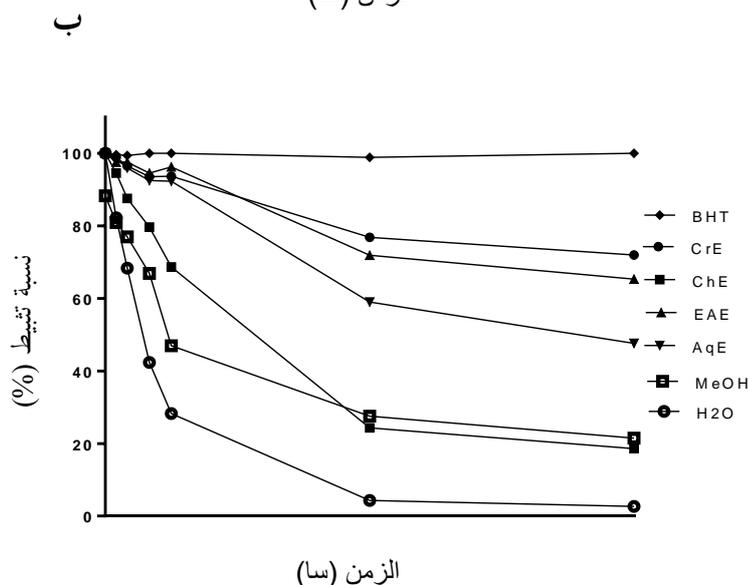
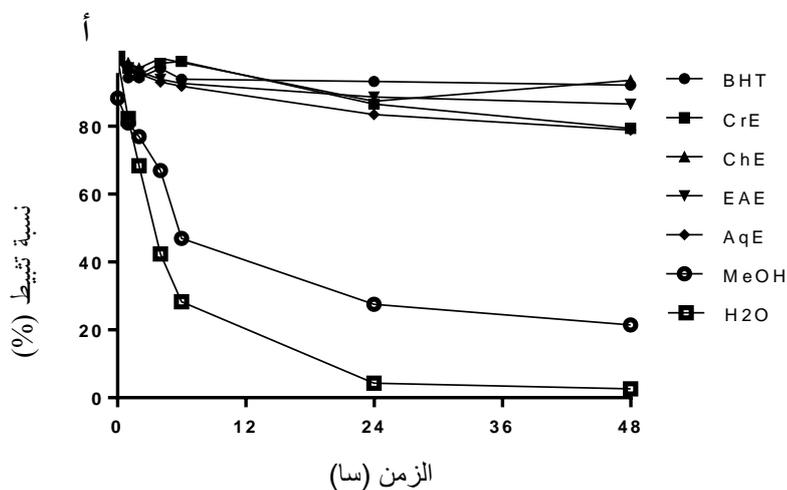


الشكل 25 : قيم IC₅₀ لمستخلصات HP و XS لإزاحة فوق أكسيد الهيدروجين. أ : *H. perforatum* ؛ ب : *X. strumarium* ؛ CrE : المستخلص الخام ؛ ChE : مستخلص الكلوروفورم ؛ EAE : مستخلص إيثيل أسيتات ؛ AqE : المستخلص المائي ؛ أقل قيمة لـ IC₅₀ تمثل أكبر تأثير إزاحي . القيم عبارة عن المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري (n= 3) . (0.001 > p).

6.4. اختبار بيتا-كروتين - الحمض لينولييك

تعتمد هذه الطريقة على أكسدة الحمض لينولييك وهو حمض دهني غير مشبع؛ منتجا جذرا حرا يمكنه مهاجمة البيتا-كاروتين ذات اللون البرتقالي الداكن. يؤدي ذلك إلى زوال لون البيتا-كاروتين وبالتالي تتناقص الامتصاصية عند طول الموجة 490 نانومتر. تعمل مضادات الأكسدة على حماية البيتا-كاروتين من الأكسدة بإبطال وتثبيط أكسدة الحمض لينولييك أو إزاحة جذور hydroperoxides الناتجة عن أكسدة الحمض لينولييك (Amamra وآخرون، 2015).

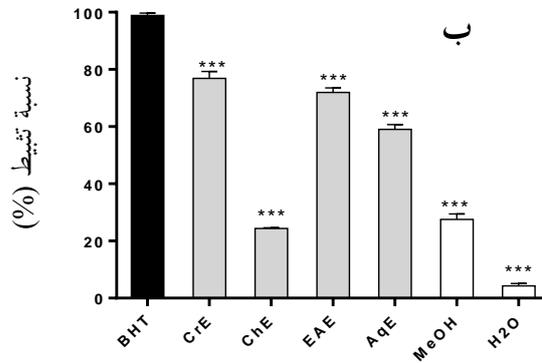
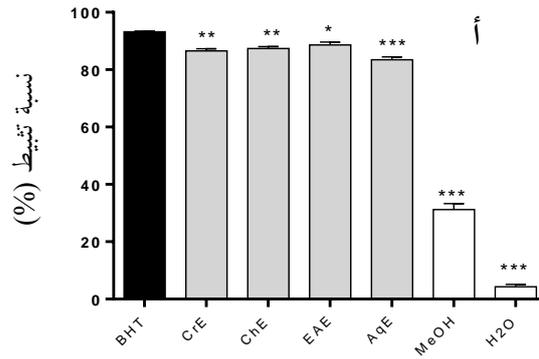
قدرت النشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات النبتتين بتركيز 2 مغ/مل بمتابعة زوال لون البيتا-كروتان مع مرور الزمن. يوضح الشكل 26 حركيات نسب التثبيت بدلالة الزمن. من خلال هذه النتائج يتضح أن كل المستخلصات قادرة على تثبيط أكسدة البيتا-كاروتين لكن بنسب مختلفة.



الشكل 26: قدرة مستخلصات HP و XS على تثبيط أكسدة البيتا-كاروتين بدلالة الزمن. أ: *H. perforatum*؛ ب: *X. strumarium*؛ CrE: المستخلص الخام؛ ChE: مستخلص الكلوروفورم؛ EAE: مستخلص إيثيل أسيتات؛ AqE: المستخلص المائي؛ MeOH: ميثانول؛ H₂O: ماء مقطر. استعمل BHT كشاهد موجب والميثانول والماء المقطر كشاهدين سالبين. القيم عبارة عن المتوسط الحسابي (n=3).

عند مقارنة نسب تثبيط المستخلصات مع تلك الخاصة بـ BHT (شكل 27)، تبين أن مستخلصات HP تتميز بقدرة على التثبيت متقاربة أعلاها مع مستخلص EAE بنسبة $1.69 \pm 88.61\%$ (*، $p > 0.001$) وأدناها مع

مستخلص AqE 1.7 ± 83.44 % (**, $p > 0.001$). إلا أن الفرق بين مستخلصات HP غير معنوي ($p > 0.001$).
 في حالة مستخلصات XS، فإن المستخلص CrE هو الأكثر قدرة على التثبيط بنسبة 4.17 ± 76.84 % (***) ($p > 0.001$) يليه المستخلص EAE بنسبة 2.86 ± 71.92 % (***) ($p > 0.001$) وأدنى قيمة سجلت مع المستخلص ChE بنسبة 0.46 ± 24.34 % (***) ($p > 0.001$). لم تلاحظ علاقة بين القدرة المضادة لأكسدة الليبيدات والمحتوى من عديدات الفينول والفلافونويدات.



الشكل 27: مقارنة نسب التثبيط لمستخلصات HP و XS عند 24 ساعة باستعمال طريقة البيتا-كاروتين / حمض اللينولييك. أ: *H. perforatum*؛ ب: *X. strumarium*؛ CrE: المستخلص الخام؛ ChE: مستخلص الكلوروفورم؛ EAE: مستخلص إيثيل أسيتات؛ AqE: المستخلص المائي؛ MeOH: ميثانول؛ H₂O: ماء مقطر. استعمل BHT كشاهد موجب والميثانول والماء المقطر كشاهدين سالبين القيم عبارة عن المتوسط الحسابي \pm الانحراف المعياري ($n=3$) ($p > 0.001$).

أثناء فترة حضن الحمض لينولييك، ينتج عنه جذور حرة بيروكسيدية. تقلل مضادات الأكسدة الموجودة في المستخلص من معدل أكسدة البيتا-كاروتين من قبل الجذور الحرة. يعود هذا التأثير إلى تثبيط أكسدة الحمض لينولييك و/ أو إزاحة الجذور البيروكسيدية الناتجة عن أكسدة الحمض لينولييك (Amamra وآخرون، 2015) تمثل ظاهرة فوق أكسدة الليبيدات أحد أسباب ظهور أمراض القلب والأوعية والسرطان. وتتم وفق سلسلة من تفاعلات الجذور الحرة، كما أنها تتدخل في عدد من الأضرار البيولوجية (Klotz و Kehrre، 2015).

7.4. النشاط الإزاحي لجذور DPPH

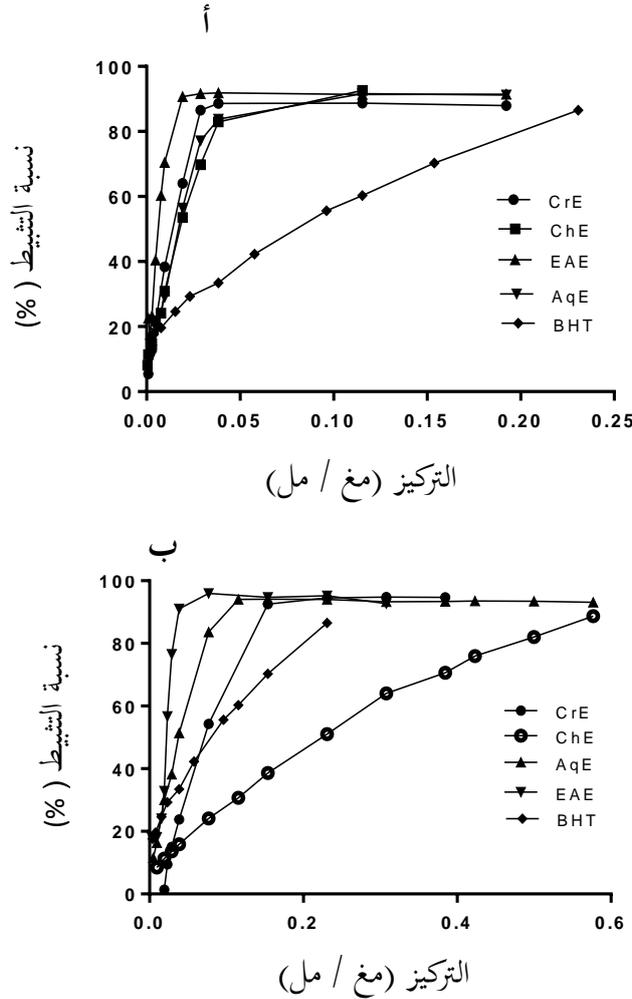
استعمل في هذه الطريقة 2,2'-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) كجذر حر ثابت نسبياً، قد يعود تأثير مضادات الأكسدة على جذر DPPH إلى قدرتها على إعطاء بروتون. يتميز هذا الاختبار ببساطته وسهولته، لذا فهو واسع الاستعمال للكشف عن النشاط الإزاحي لمختلف المستخلصات. بعد التفاعل أي إرجاع DPPH يتغير لون المزيج من البنفسجي إلى الأصفر و تسجل النتائج في طول موجة 517 نانومتر (Lee وآخرون ، 2014). أظهرت النتائج أن جميع المستخلصات لها القدرة على إزاحة جذر DPPH بشكل يتناسب طردياً مع تركيزها (شكل 28).

بحساب التركيز (IC₅₀) المثبط لـ 50% من جذور DPPH وبالمقارنة مع BHT كشاهد، أظهر مستخلص EAE لكلا النباتين أعلى نسبة إزاحة لجذور DPPH (شكل 29)؛ بقيمة IC₅₀ = 0.0065 ± 0.0002 مغ/مل في حالة HP و بقيمة IC₅₀ = 0.017 ± 0.0004 مغ/مل في حالة XS. في حين سجلت أقل نسبة مع مستخلص ChE لنبته XS بمعدل IC₅₀ = 0.234 ± 0.018 مغ/مل.

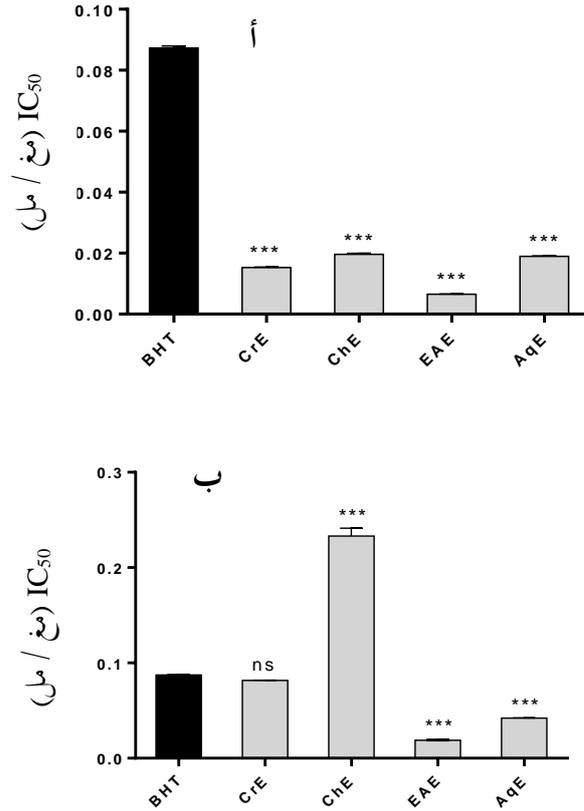
بالنسبة لأوراق HP، كانت القدرة الإزاحية لكل المستخلصات أعلى بكثير من مضاد الأكسدة المرجعي BHT (p > 0.001). فقد تميز المستخلص EAE بأعلى معدل (13 مرة) و المستخلص الخام بمعدل يقارب 6 مرات في حين أن القدرة الإزاحية كانت أعلى في حالة المستخلصين CrE و AqE بـ 4.5 مرة.

تحصل Fathi و Ebrahimzadeh (2013)، في دراسة حول الجزء الهوائي لنبته HP من إيران، على قيمة IC₅₀ مساوية لـ 96.0 ± 3.7 ميكروغرام / مل. وفي دراسة تمت على مستخلص غني بالفلافونويدات كانت قيمة IC₅₀ مساوية لـ 0.63 ميكروغرام / مل. (Zou وآخرون ، 2004). يبدو أنه توجد علاقة بين محتوى المستخلصات من عديدات الفينول والفلافونويدات وقدرتها على إزاحة DPPH.

أما في حالة أوراق XS، فقد تميز المستخلص EAE بقدرة إزاحية أعلى من تلك لـ BHT بمعدل 5 مرة ($p > 0.001$) والمستخلص AqE يقارب مرتين في حين أن القدرة الإزاحية للمستخلص CrE تقارب تلك لـ BHT أما المستخلص ChE فيتميز بقدرة إزاحية أقل بمرتين. قد يعود التأثير الإزاحي المرتفع لمستخلصات HP إلى غناها بالمركبات الفينولية و الفلافونويدات. ورد في دراسة لـ Kamboj وآخرون (2014) قيمة IC_{50} (0.082 مغ / مل) تقارب تلك الملاحظة، في هذه الدراسة، مع المستخلص الخام لأوراق XS.



الشكل 28 : نسبة تثبيط جذور DPPH بمستخلصات HP و XS بدلالة التركيز أ : *H. perforatum* ؛ ب : X. *strumarium* ؛ CrE: المستخلص الخام ؛ ChE: مستخلص الكلوروفورم؛ EAE: مستخلص إيثيل أسيتات؛ AqE: المستخلص المائي. القيم عبارة عن المتوسط الحسابي (n=3).



الشكل 29: قيم IC₅₀ لمستخلصات HP و XS لإزاحة جذور DPPH. أ: *H. perforatum*؛ ب: X. المستخلص المائي. أقل قيمة ل IC₅₀ تمثل أكبر تأثير إزاحي. القيم عبارة عن المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري (n= 3).

2. إختبار السمية الحادة

تظهر السمية الحادة بعد جرعة واحدة من مستخلص خام. الهدف في هذه الحالة هو وصف الأعراض الناجمة عن هذا المستخلص من جهة و من جهة أخرى تحديد LD₅₀. تم إجراء هذا الاختبار وفقا للمبادئ التوجيهية 425 لمنظمة التعاون الاقتصادي (OECD).

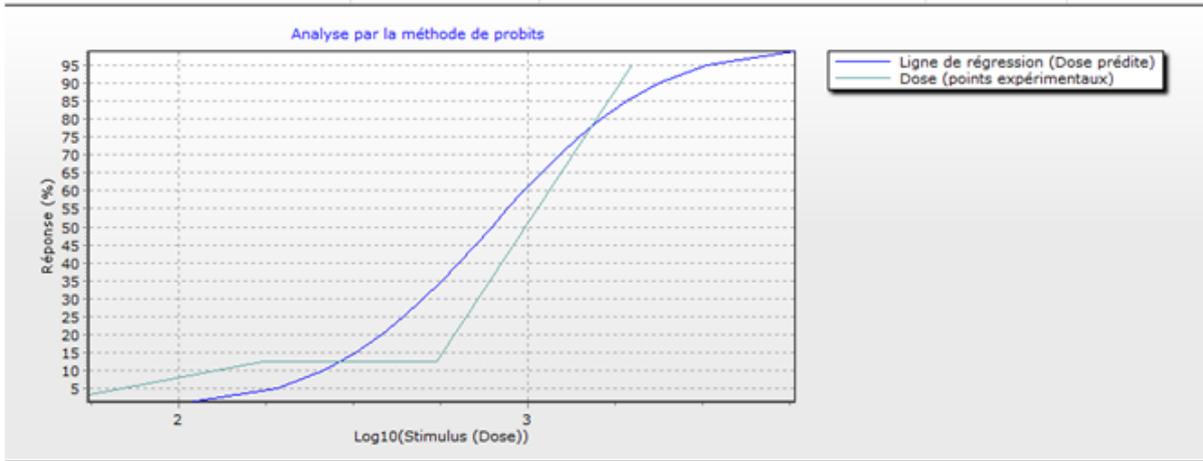
الجرعة القاتلة 50 (LD₅₀) هي الجرعة من مادة كيميائية ما تسبب موت 50 % منها، عند إعطائها للحيوانات (Randhawa، 2009). لمعالجة نتائج هذا الاختبار استعمل برنامج stat PLUS 5.8.0.0، 2009 وتحليل النتائج استعملت طريقة (Abu sitta) (méthode des moindres carrés, Méthode de Finney) de probits وآخرون، (2009). كلما كانت LD₅₀ صغيرة زادت سمية المادة الكيميائية (Oduola وآخرون، 2007).

1.5. إختبار سمية مستخلص *H. perforatum*

أجريت اختبارات السمية على فئران ذكور من سلالة NMris، وأعطيت الجرعات عن طريق فموي. عند اختبار التركيز 2 غ/كغ مات فئران ثلاثة من بين الخمسة (المحددة حسب البروتوكول) في مجال زمني يتراوح بين 1 إلى 6 ساعات. حسب هذه النتيجة تعتبر الجرعة 2 غ/كغ قاتلة. في هذه الحالة، تقترح هذه التوجيهات معاملة الفئران بالجرعات 550 مغ/كغ و 175 مغ/كغ و 55 مغ/كغ و 17.5 مغ/كغ و 5.5 مغ/كغ. النتائج ملخصة في الجدولين 7 و 8 والشكل 30.

الجدول 7: تحديد LD₅₀ لمستخلص *H. perforatum* بطريقة probits-Méthode des moindres carrés (Distribution Normale).

الجرعات (مغ/كغ)	عدد الفئران	النسبة المئوية للفئران الميتة (%)
2000	5	100
550	8	12.5
175	8	12.5
55	8	0
17.5	8	0



الشكل 30 : تقدير LD₅₀ عند الفئران المعاملة بمستخلص *H. perforatum* الخام.

يوضح الجدول 8 قيم الجرعات القاتلة لمستخلص HP التي تم استنتاجها من خلال المنحنى الموضح في الشكل 30.

الجدول 8: تحديد مختلف الجرعات المميتة للمستخلص الخام لـ *H. perforatum* بطريقة probits-Méthode des moindres carrés (Distribution Normale).

290.4521	LD ₁₀
460.8091	LD ₁₆
1065.4932	LD ₅₀
1670.1774	LD ₈₄
1840.5343	LD ₉₀
1972.5196	LD ₁₀₀

أظهرت نتائج هذا الاختبار أن مستخلص HP الخام سام $LD_{50} = 1065.49$ مغ/كغ. تسمح هذه النتيجة بتصنيف هذا المستخلص ضمن الفئة رقم 4 (300 مغ / كغ $> LD_{50} > 2000$ مغ / كغ). حسب تصنيف النظام المنسق عالمياً (Globally harmonized system classification (United Nations، 2015).

2.6. إختبار سمية مستخلص *X. strumarium*

أجريت اختبارات السمية على فئران ذكور من سلالة NMris وأعطيت الجرعات عن طريق فموي. عند اختبار التركيز 2 غ/كغ لم يؤثر هذا التركيز على الفئران، نتيجة لذلك تم الانتقال إلى التركيز 5 غ/كغ. خلال فترة الاختبار، لم تلاحظ أي أعراض أو تغير في سلوك الفئران. يتوافق هذا مع ما ذكر في المراجع بأن هذه النبتة غير سامة بعد مرحلة الإنبات (Kamboj و Saluja، 2010).

حسب تصنيف النظام المنسق عالمياً (Globally harmonized system classification (United Nations، 2015)، يمكن تصنيف هذا المستخلص ضمن الفئة رقم 5 ($LD_{50} < 5000$ مغ / كغ).

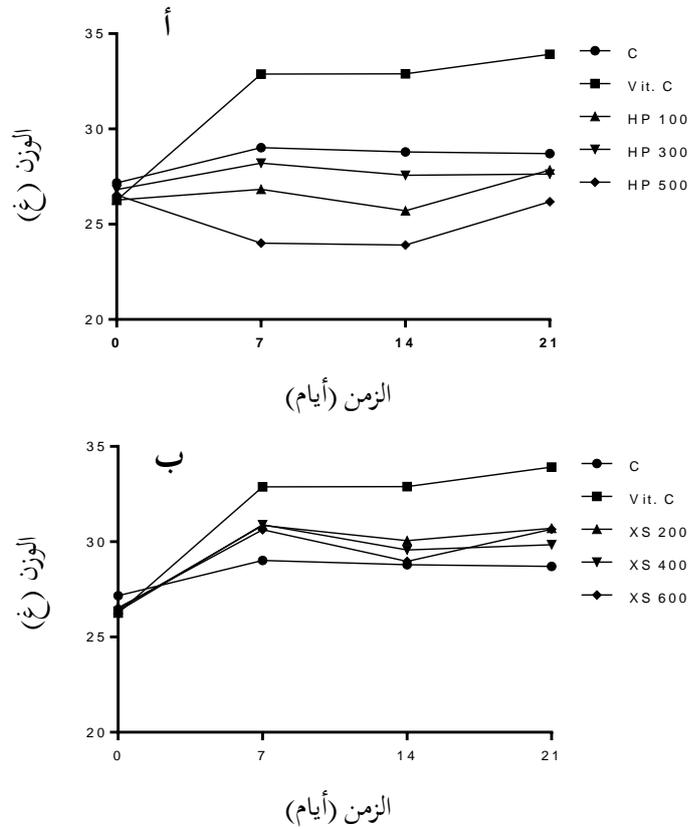
إعتماداً على هذه النتائج، تم اختيار الجرعات الخاصة بالاختبارات في الحي. بالنسبة لمستخلص HP اختيرت الجرعات 100 و 300 و 500 مغ/كغ، أما بالنسبة لمستخلص XS اختيرت الجرعات 200 و 400 و 600 مغ/كغ.

6. إختبار السمية تحت الحادة

بهدف اختبار تأثير المستخلصين الخام للنبتين على الفئران لمدة أطول ومتابعة التغيرات على مستوى الوزن و قدرة البلازما المضادة للأكسدة ونشاطية بعض الإنزيمات المضادة للأكسدة؛ تمت معاملة الفئران بالمستخلصين خلال 21 يوماً.

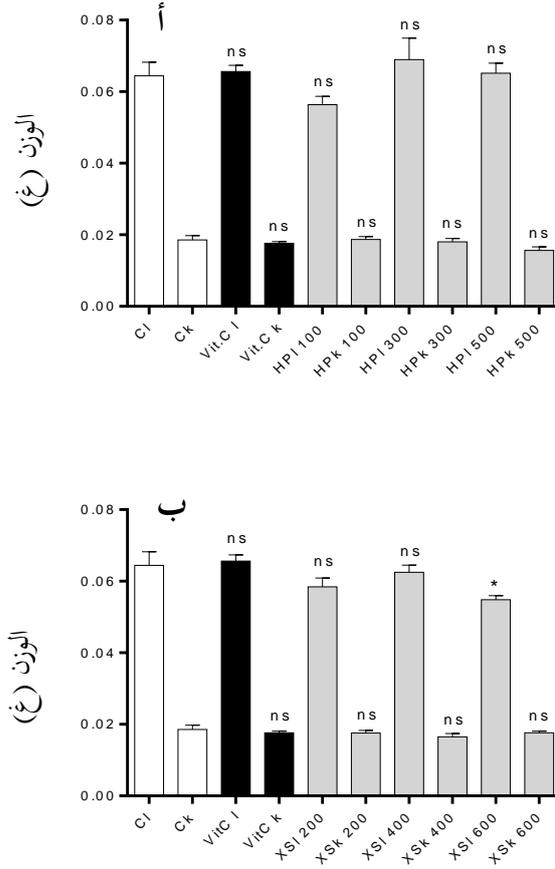
1.6. أوزان الفئران والأعضاء

أثناء الاختبار سُجِّلت أوزان الفئران كل أسبوع (شكل 31). كانت الأوزان بالنسبة للمجموعات المعاملة بمستخلص HP أقل منها بالنسبة لكلا من المجموعة المعاملة بالماء والمجموعة المعاملة بالفيتامين C. تميزت المجموعات المعاملة بالمستخلص HP بثبات في الوزن أما تلك المعاملة بتركيز 500 مغ/كغ فقد تناقص وزنها. رغم أن هذا التركيز أقل بكثير من LD₅₀ (1065.49 مغ/كغ)، قد يعود ذلك إلى تراكم تأثير المستخلص خلال فترة الاختبار، و بالتالي ظهور آثار السمية. أما في حالة مستخلص XS فكانت الأوزان أقل من تلك لمجموعة الفيتامين C و أعلى من تلك للمجموعة المعاملة بالماء.



الشكل 31: تطور أوزان الفئران خلال 21 يوم. HP (أ) و XS (ب). C: المجموعة المعاملة بالماء. Vit. C : المجموعة المعاملة بالفيتامين C (100 مغ/كغ). XS 200 و XS 400 و XS 600 : مجموعات الفئران المعاملة بمستخلص XS بالجرعات 200 و 400 و 600 مغ/كغ. HP 100 و HP 300 و HP 500 : مجموعات الفئران المعاملة بمستخلص HP بالجرعات 100 و 300 و 500 مغ/كغ. القيم عبارة عن المتوسط الحسابي (n=7).

لم يسجل اختلاف معنوي في أوزان الاعضاء (الكبد والكلية) بين المجموعات المختلفة والمجموعة غير المعاملة ما عدا المجموعة المعاملة بمستخلص XS بتركيز 600 مغ/كغ فكان الاختلاف معتبرا بالنسبة لوزن الكبد (* , p > 0.001) (شكل 32).

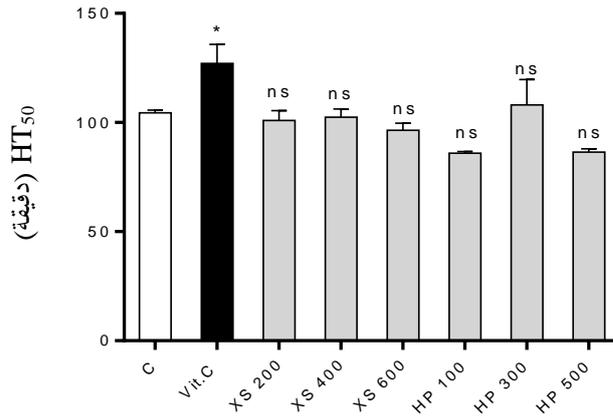


الشكل 32: أوزان كبد و كلى الفئران عند اليوم 21. HP (أ) و XS (ب). l: كبد و k: كلى. C: المجموعة المعاملة بالماء. Vit. C : المجموعة المعاملة بالفيتامين C (100 مغ/كغ). XS 200 و XS 400 و XS 600 : مجموعات الفئران المعاملة بمستخلص XS بالجرعات 200 و 400 و 600 مغ/كغ. HP 100 و HP 300 و HP 500 : مجموعات الفئران المعاملة بمستخلص HP بالجرعات 100 و 300 و 500 مغ/كغ. القيم عبارة عن المتوسط الحسابي \pm SEM (n=7).

2.6. اختبار انحلال الدم في الحي

تُعرف كريات الدم الحمراء على أنها هدف رئيسي للإجهاد التأكسدي نتيجة لغنى الأغشية بالأحماض الدهنية غير المشبعة كالحمض لينولييك والحمض arachidonic (Nabavi وآخرون، 2012). لذا يعتبر تحلل كريات الدم الحمراء نموذجاً جيداً لدراسة التخريب التأكسدي الناتج عن الجذور الحرة على مستوى الأغشية (Zerargui وآخرون، 2016).

أظهر المستخلصان تأثيراً تجاه AAPH (شكل 33) لكن الاختلاف كان غير معنوي ($p > 0.001$). عموماً سمحت، معاملة الفئران بمستخلص XS بالحصول على قيم HT_{50} بمتوسط 99.95 دقيقة، أعلى من تلك لمستخلص HP الذي سمح بالحصول على قيم HT_{50} بمتوسط 93.47 دقيقة. تأثير كلا المستخلصين غير مرتبط بالجرعة. لا يوجد فرق في التأثير بين المجموعة المعاملة بالماء والمجموعات المعاملة بالمستخلصين، قد يرجع ذلك إلى تدخل إنزيمات مضادة للأكسدة على مستوى كريات الدم الحمراء، مثل superoxide dismutase و glutathione و catalase و peroxidase (Delmas-Beauvieux وآخرون، 1995). قد ترجع عدم فعالية المستخلصين إلى: قيمة الجرعات في حد ذاتها و/ أو مدى استقلاب مكونات المستخلصين على مستوى عضوية الفئران (Sanda وآخرون، 2012). توافق هذه النتائج تلك التي تحصلت عليها Zerargui وآخرون (2016) في دراسة حول تأثير مستخلص ميثانولي لـ *Tamus communis* L.، إذ تميز المستخلص بقيمة $HT_{50} = 75.66$ دقيقة في حين أن المجموعة الشاهد (المعاملة بالماء) تميزت بقيمة $HT_{50} = 70.66$ دقيقة وكان الفرق بينهما غير معنوي.



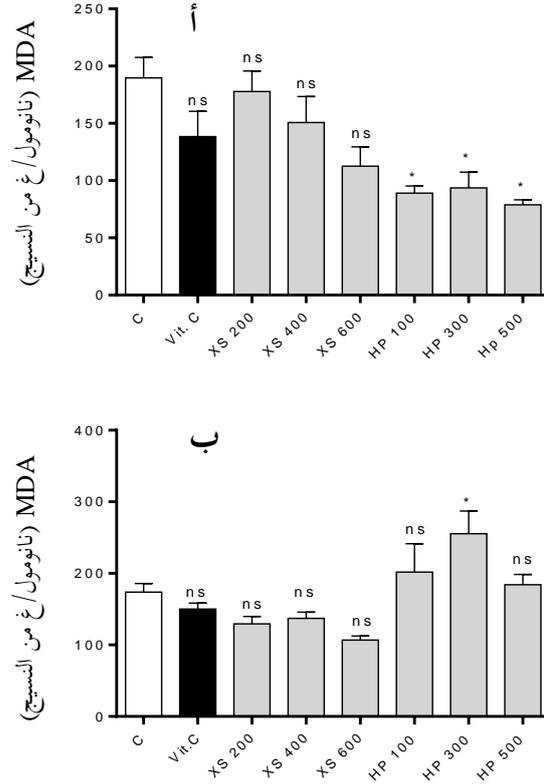
الشكل 33: قيم HT_{50} لمستخلصي HP و XS لحماية كريات الدم الحمراء من الانحلال المحرض بـ AAPH. C: المجموعة المعاملة بالماء. Vit. C: المجموعة المعاملة بالفيتامين C (100 مغ/كغ). XS 200 و XS 400 و XS 600: مجموعات الفئران المعاملة بمستخلص XS بالجرعات 200 و 400 و 600 مغ/كغ. HP 100 و HP 300 و HP 500: مجموعات الفئران المعاملة بمستخلص HP بالجرعات 100 و 300 و 500 مغ/كغ. القيم عبارة عن المتوسط الحسابي \pm SEM (n=7).

3.6. إختبار النشاطية المضادة لفوق أكسدة الليبيدات (تحديد تركيز malodiadehyde)

تنتج فوق الأكسدة الليبيدية عن سلسلة تفاعلات الجذور الحرة مع الأحماض الدهنية غير المشبعة، الموجودة بكثرة في الأعشبية الخلوية (Kowalczyk و Gutowski، 2013). يؤدي تفاعل الليبيدات مع الجذور الحرة إلى فوق الأكسدة الليبيدية، مؤدية إلى تأثيرات مباشرة غير مباشرة. ينتج عن فوق الأكسدة الليبيدية، مركبات سامة تؤثر بعيدا عن مكان توليدها بسلوكها كمراسيل ثانية. من بين نواتج فوق الأكسدة الليبيدية، malondiadehyde (MDA) و 4-hydroxynonenal (4-HNE) (Devasagayam، 2004). بتراكم هذه النواتج، تتأثر القنوات الناقلة للأيونات ويتعطل النقل الغشائي للبروتينات والإنزيمات أو تصبح الليبيدات ثنائية الطبقة أكثر صلابة و/أو نفوذة (Klotz و Kehrler، 2015). يعتبر معدل MDA مؤشر لفوق الأكسدة الليبيدية إذ ينخفض في وجود مضادات أكسدة قوية (Liu وآخرون، 2010).

عند اختبار تأثير المستخلصين الخامين HP و XS على تركيز MDA (شكل 34)، لوحظ أن الجرعات الثلاثة المختبرة للمستخلص الخام HP أدت إلى تخفيض معدل MDA (بمعدل 87.22 نانومول/غ من النسيج) على مستوى الكبد بنسبة معتبرة (*، $p > 0.05$) مقابل 189.62 نانومول/غ من النسيج في المجموعة المعاملة بالماء، وكانت هذه الجرعات أكثر فعالية من الفيتامين C، أما على مستوى الكلى فقد لوحظ ارتفاع في معدل MDA، في حين كان الانخفاض في معدل MDA غير معنوي بالنسبة لمستخلص XS في كلا من الكبد والكلى ($p > 0.05$). خفض الفيتامين C معدل MDA في كلا من الكبد والكلى لكن بشكل غير معنوي ($p > 0.05$).

قد يعود الفرق في قدرة مستخلصات النباتات على تثبيط فوق أكسدة الليبيدات إلى الاختلاف في محتواها من عديدات الفينول ونوعية المركبات التي تدخل في تركيبها (Bonarska-Kujawa وآخرون، 2011). توافق النتائج المحصل عليها مع مستخلص HP تلك المسجلة مع المستخلص الميثانولي لـ *Crataegus azarolus* L. الذي خفض بتركيز 200 مغ / كغ معدل MDA (52.1 نانومول/غ من النسيج) بشكل معنوي مقابل 81.69 نانومول/غ من النسيج في المجموعة المعاملة بالماء (Bouaziz وآخرون، 2016).

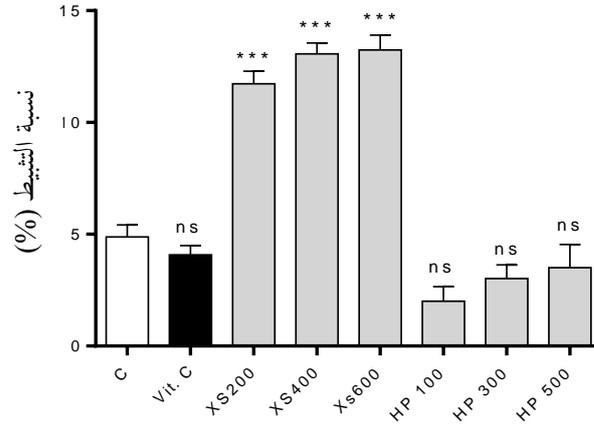


الشكل 34 : تأثير مستخلصي HP و XS على معدل MDA على مستوى الكبد (أ) و الكلى (ب). C.: المجموعة المعاملة بالماء. Vit. C : المجموعة المعاملة بالفيتامين C (100 مغ/كغ). XS 200 و XS 400 و XS 600 : مجموعات الفئران المعاملة بمستخلص XS (الجرعات 200 و 400 و 600 مغ/كغ). HP 100 و HP 300 و HP 500 : مجموعات الفئران المعاملة بمستخلص HP (الجرعات 100 و 300 و 500 مغ/كغ). القيم عبارة عن المتوسط الحسابي \pm SEM (n=7).

4.6. إختبار قدرة البلازما الإزاحية لـ DPPH

يعتبر تقدير نشاطية البلازما المضادة للأكسدة أحد المؤشرات الأكثر استعمالاً لاختبار مدى تأثير مضادات الأكسدة. و نظراً للعدد الكبير لمضادات الأكسدة الموجودة في البلازما، تم تطوير عدة طرق منها: القدرة على إرجاع الحديد ونشاطية إزاحة جذر DPPH.

أظهر إختبار قدرة البلازما الإزاحية لـ DPPH (شكل 35)، أن مستخلص HP لم يرفع من النشاطية المضادة للأكسدة على مستوى البلازما في حالة التراكيز الثلاثة المختبرة ($p > 0.001$). أما مستخلص XS فقد كان فعالاً إذ أن الجرعات 200 مغ/كغ و 400 مغ/كغ و 600 مغ/كغ رفعت النشاطية المضادة للأكسدة بشكل معتبر ($p > 0.001$, ***). من جانب آخر، تميزت جرعات مستخلص XS بفعالية أكبر من تلك لفيتامين C.



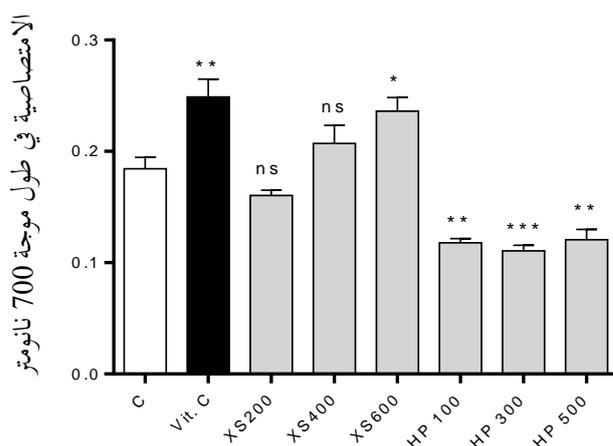
الشكل 35 : تأثير مستخلصي HP و XS على نشاطية البلازما المضادة للأكسدة تجاه جذور DPPH . C : المجموعة المعاملة بالماء . Vit. C : المجموعة المعاملة بالفيتامين C (100 مغ/كغ). XS 200 و XS 400 و XS 600 : مجموعات الفئران المعاملة بمستخلص XS بالجرعات 200 و 400 و 600 مغ/كغ . HP 100 و HP 300 و HP 500 : مجموعات الفئران المعاملة بمستخلص HP بالجرعات 100 و 300 و 500 مغ/كغ . القيم عبارة عن المتوسط الحسابي \pm SEM (n=7).

يحتوي البلازما على عدد من مضادات الأكسدة الداخلية (الألبومين و Bilirubine والغلوتاثيون المرجع وحمض اليوريا) بالإضافة إلى مضادات أكسدة خارجية (الفيتامين E والكاروتينويدات وعديدات الفينول) مصدرها الغذاء. تعمل مضادات الأكسدة بشكل تآزري للوصول إلى حماية أفضل تجاه الجذور الحرة (Zerargui وآخرون، 2016). يمكن أن ترجع النشاطية المضادة للأكسدة لكل المجموعات لوجود مضادات الأكسدة الداخلية، أما الزيادة في النشاطية مقارنة مع الشاهد فقد تعود إلى عديدات الفينول الموجودة في مستخلص XS.

قد يعزى عدم ارتفاع التأثير المضاد للأكسدة في حالة HP، إلى قلة امتصاص المستخلص على مستوى الأمعاء إذ لوحظ عند تشريح الفئران أن المستخلص تراكم على مستوى المعدة خصوصا التركيز 500 مغ/كغ.

5.6. إختبار القدرة الإرجاعية

تم اختبار جانب آخر من قدرة البلازما المضادة للأوكسدة وهو القدرة الإرجاعية. يوضح الشكل 36 أن مستخلص XS رفع القدرة الإرجاعية للبلازما أما مستخلص HP فقد خفضها. كان تأثير المستخلص XS مرتبطا بالجرعة إذ أظهرت الجرعة 600 مغ/كغ تأثيرا معنويا (*، $p > 0.05$) موافقا تقريبا لتأثير الفيتامين C. خفضت المعاملة بالجرعات الثلاث للمستخلص HP القدرة الإرجاعية للبلازما بشكل معنوي (**، $p > 0.05$).



الشكل 36: تأثير مستخلصي HP و XS على قدرة البلازما الإرجاعية. C: المجموعة المعاملة بالماء. Vit. C : المجموعة المعاملة بالفيتامين C (100 مغ/كغ). XS 200 و XS 400 و XS 600 : مجموعات الفئران المعاملة بمستخلص XS (الجرعات 200 و 400 و 600 مغ/كغ). HP 100 و HP 300 و HP 500 : مجموعات الفئران المعاملة بمستخلص HP (الجرعات 100 و 300 و 500 مغ/كغ). القيم عبارة عن المتوسط الحسابي \pm SEM (n = 7).

في حالة مستخلص XS، قد يرجع التزايد الملاحظ في قدرة البلازما على الإرجاع إلى غنى المستخلص الخام بعديدات الفينول والفلافونويدات. بينت العديد من الدراسات وجود ارتباط وثيق بين قدرة البلازما المضادة للأوكسدة والمحتوى الفينولي للمستخلصات والمشروبات المحضرة ابتداء من النباتات (Avila-Nava وآخرون، 2014؛ Vicente وآخرون، 2014). أما مستخلص HP فقد خفض من قدرة البلازما المضادة للأوكسدة، قد يعود ذلك إلى التركيز العالي لعديدات الفينول والفلافونويدات المحتواة في الجرعات المعطاة للفئران ونوعية المركبات التي تدخل في تركيب المستخلص. إذ أن عدديتات الفينول في حالة التراكيز العالية قد تكون مولدة للأوكسدة (Prooxidants) (Procházková وآخرون، 2011)، أو أنها تثبط إنتاج الجذور الحرة التي تلعب دورا فيزيولوجيا (Bjelakovic وآخرون، 2008)

تبين من خلال اختباري قدرة البلازما الإزاحية لـ DPPH وقدرة البلازما الإرجاعية، أن هناك توافق بين نتائج المستخلصين إذ أن مستخلص XS كان أكثر فعالية من مستخلص HP.

6.6. إختبارات النشاطية المضادة للأكسدة

من المعروف أن الجذور الحرة يمكن تتسبب في تلف الخلايا، نتيجة للارتباط التكافئي وفوق أكسدة الليبيدات التي تلحق ضررا بالأنسجة. الكبد والكلى هما العضوين الأكثر عرضة للضرر الناجم عن الجذور الحرة مما يؤدي إلى مشاكل صحية خطيرة (Sreenivasamurthy وآخرون، 2012). يسمح ارتفاع نشاطيات الإنزيمات المضادة للأكسدة، في هذين العضوين، بتحسين القدرة على مواجهة الأضرار الناجمة عن الجذور الحرة (Zhong وآخرون، 1999). يلعب إنزيم CAT وجزيئات الغلوتاثيون دورا في تثبيط تشكل الجذور الحرة لذا تستعمل عادة مع MDA (Malondiadehyde) كمؤشرات لمتابعة إنتاج الجذور الحرة (Durand و Beadeux، 2011).

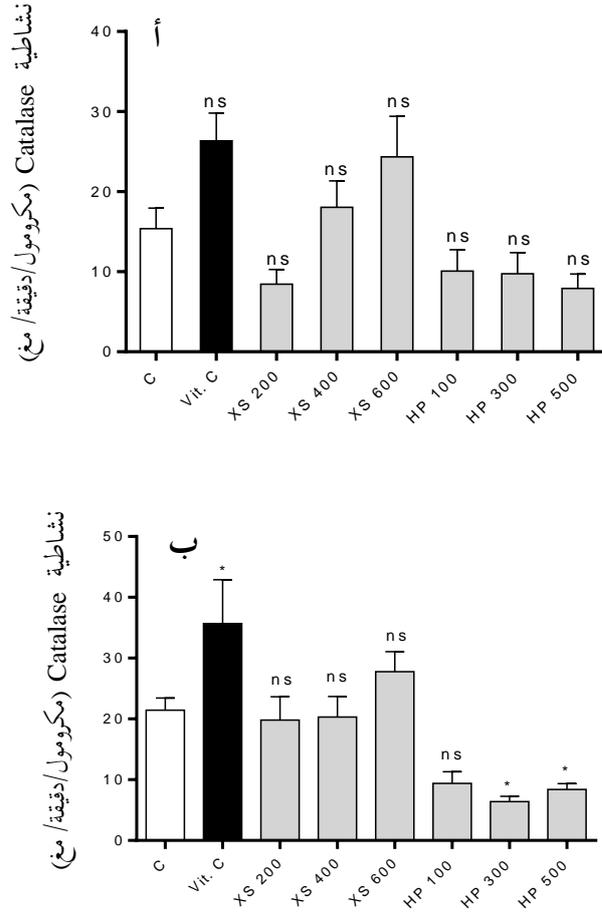
1.6.6. إختبار نشاطية إنزيم catalase

يقوم إنزيم CAT بدور مهم في استقلاب بيروكسيد الهيدروجين إذ يحفز تحويل هذا الأخير إلى ماء وأكسجين (Sisein، 2014)، لذا يعتبر CAT إنزوما مضادا للأكسدة جد مهم.

في هذه الدراسة، تم تحديد نشاطية هذا الإنزيم في الكبد والكلى (شكل 37). عموما، لم تحفز التراكيز الثلاثة المختبرة للمستخلصين الحامين لكل من HP و XS زيادة معنوية في نشاطية CAT. أدى مستخلص HP إلى تخفيض معدل نشاطية CAT في حالة أنسجة الكبد بشكل غير معنوي ($p > 0.05$)، من جهة، ومن جهة أخرى لم يسجل ارتباط بين الجرعات والنشاطية. أما في الكلى فقد سجل انخفاض معنوي في النشاطية (*، $p > 0.05$). أما في حالة XS، فإن نشاطية CAT تزايدت بشكل متناسب مع الجرعات، إلا أن هذه الزيادة غير معنوية ($p > 0.05$).

في هذه الدراسة، قد تعزى الزيادة في نشاطية CAT بعد المعاملة بمستخلص XS إلى ارتفاع مستويات مضادات الأكسدة الخارجية مثل عديدات الفينول والفلافونويدات (Bouaziz وآخرون، 2016).

وقد بينت دراسات مماثلة وجود تأثير إيجابي لأقسام مختلفة من عديدات الفينول على نشاطيات إنزيمات مضادة للأكسدة مثل SOD و CAT والغلوتاثيون بيروكسيداز عند الحيوانات وعند الإنسان (Kardum وآخرون، 2014؛ Khan وآخرون، 2014).



الشكل 37: تأثير مستخلصي HP و XS على نشاطية catalase على مستوى الكبد (أ) و الكلى (ب). C: المجموعة المعاملة بالماء. Vit. C : المجموعة المعاملة بالفيتامين C (100 مغ/ كغ). XS 200 و XS 400 و XS 600 : مجموعات الفئران المعاملة بمستخلص XS (الجرعات 200 و 400 و 600 مغ/ كغ). HP 100 و HP 300 و HP 500 : مجموعات الفئران المعاملة بمستخلص HP (الجرعات 100 و 300 و 500 مغ/ كغ). القيم عبارة عن المتوسط الحسابي \pm SEM (n=7).

تشير عدد من الدراسات إلى وجود ارتباط بين عديدات الفينول والتعبير عن الإنزيمات المضادة للأكسدة عن طريق تنشيط العامل Nrf 2 في الحي والمزارع الخلوية (Nakayama وآخرون، 2015). في الظروف الطبيعية ، يبقى العامل Nrf 2 مرتبطاً بمثبطه السيتوبلازمي بشكل مركب Keap 1- Nrf2. غير أنه في حالة الإجهاد التأكسدي أو التعرض إلى محرضات، ينفصل العامل Nrf 2 عن هذا المركب مما يسمح بانتقاله إلى النواة أين يرتبط بجزء من DNA يسمى antioxidant response element (ARE) أو electrophile response element (EpRE) موجود في منطقة المحضّض للإنزيمات سابقة الذكر، مم يزيد من معدل استنساخها (Vicente وآخرون، 2014).

قد يعزى انخفاض نشاطية إنزيم CAT ولو أنه غير معنوي في حالة الكبد، في حالة المستخلص HP، إما إلى كبح البناء الحيوي لهذا الإنزيم أو تثبيط الإنزيم.

قد يكون للجرعات الكبيرة من المستخلص HP تأثير مؤيد للأوكسدة، ينتج عن ذلك ظهور ارتفاع في معدل الجذور الحرة، من بينها جذور فوق أكسيد الهيدروجين. يؤدي تراكم فوق أكسيد الهيدروجين في الخلية إلى تثبيط إنزيم CAT (Sun وآخرون، 2007).

2.6.6. تحديد تركيز الغلوتاثيون الكلي

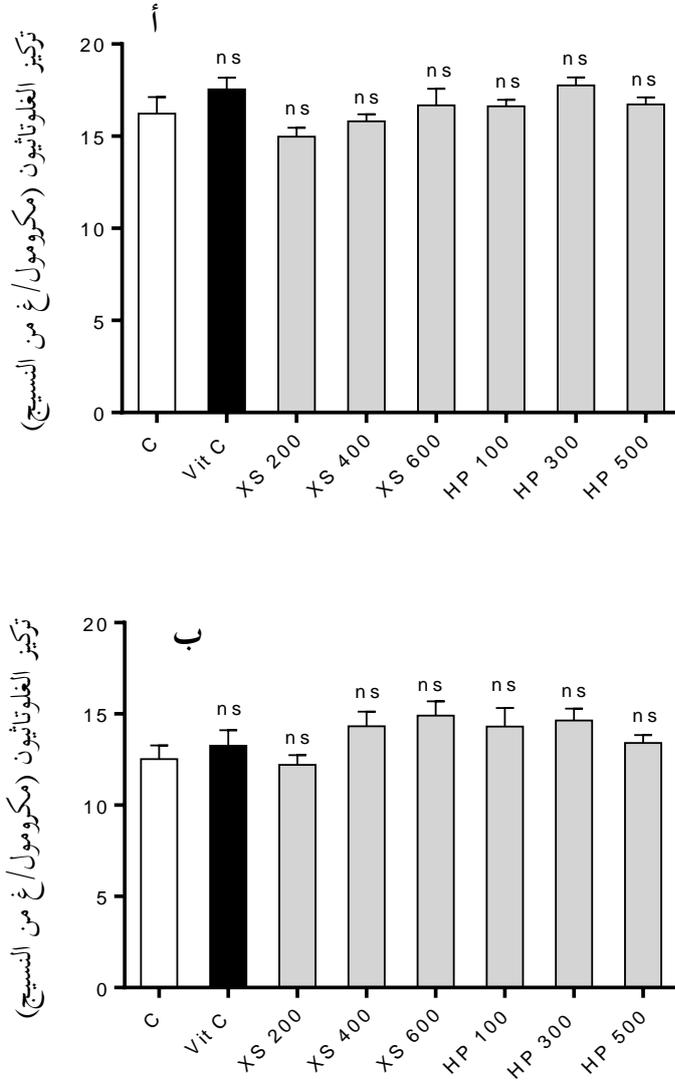
يلعب الغلوتاثيون دورا مهما في الدفاع المضاد للأوكسدة بإزاحته الفعالة للعديد من الجذور الحرة (مثل جذور الهيدروكسيل و جذور البيروكسينيتريت وفوق أكسيد الهيدروجين) واستقلاب العناصر المغذية وتنظيم النشاطات الخلوية ومن ضمنها التعبير الجيني وبناء الـ DNA و البروتينات وتكاثر الخلايا والموت المبرمج ونقل الإشارات وإنتاج السيبتوكينات والاستجابة المناعية (Wu وآخرون، 2004).

لم ترفع التراكيز الثلاثة المختبرة لمستخلصي HP و XS معدل الغلوتاثيون (شكل 38)، و كان التأثير غير معنوي ($p > 0.05$). من جانب آخر كان تأثير الفيتامين C مشابها لتأثير المستخلصين.

في هذا الاختبار، ونظرا لعدم وجود فرق في معدل الغلوتاثيون بين المستخلصين والمجموعة المعاملة بالماء، يمكن توقع أن محتوى المستخلصين من الفينولات الكلية لم يؤثر على قيمة الغلوتاثيون من جانب ومن جانب آخر، يمكن أن فترة 21 يوم التي تمت فيها معاملة الفئران بالمستخلصين لم تكن كافية لتحفيز تغييرات على مستوى تفاعلات استقلاب الغلوتاثيون. توافق هذه النتائج تلك التي تحصل عليها Celep وآخرون (2013)، مع *Cornus mas L.* بتركيز 500 مغ / كغ بعد معاملة الحيوانات لمدة 21 يوما، إذ سجلوا عدم وجود فرق معنوي في معدل نشاطية كل من catalase و SOD والغلوتاثيون بيروكسيداز ومعدل MDA بين المجموعة الشاهد المعاملة بمذيب المستخلص والمجموعة المعاملة بمستخلص النبتة والمجموعة المعاملة بـ Silymarin (50 مغ / كغ) كمضاد أكسدة عياري.

من خلال النتائج المحصل عليها في المخبر، كان من المتوقع أن إعطاء جرعات من المستخلص الخام لـ HP سيسمح بزيادة عالية في القدرة المضادة للأوكسدة للفئران، إلا أنه لوحظ العكس إذ تناقصت هذه القدرة على العموم. قد يعود ذلك إلى الجرعات (100 مغ/كغ و 300 مغ/كغ و 500 مغ/كغ) التي قد تكون عالية بحيث أنها أثرت بشكل سلبي.

نتيجة لذلك تم اختيار جرعات أقل لمستخلص HP في اختبار التأثير المضاد لسمية الكبد برياعي كلوريد الكربون. أما في حالة المستخلص الخام ل XS فقد أعطيت الفئران نفس الجرعات.



الشكل 38 تأثير مستخلصي HP و XS على معدل الغلوتاثيون على مستوى الكبد (أ) و الكلى (ب). C: المجموعة المعاملة بالماء. Vit. C : المجموعة المعاملة بالفيتامين C (100 مغ/كغ). XS 200 و XS 400 و XS 600 : مجموعات الفئران المعاملة بمستخلص XS (الجرعات 200 و 400 و 600 مغ/كغ). HP 100 و HP 300 و HP 500 : مجموعات الفئران المعاملة بمستخلص HP (الجرعات 100 و 300 و 500 مغ/كغ). القيم عبارة عن المتوسط الحسابي \pm SEM (n=7).

7. التأثير المضاد لسمية الكبد الناتج عن رباعي كلوريد الكربون

يعتبر رباعي كلوريد الكربون (CCl_4) من المركبات الكيميائية المستعملة في الصناعات كمذيبات و يسبب تسمم على مستوى الكبد و الكلى عند العمال المعرضين له أو لدى حيوانات المخبر (Khan وآخرون، 2010 ؛ Lin وآخرون، 2008).

يرفع استنشاق CCl_4 أو ابتلاعه أو امتصاصه من طرف الجلد أو حقنه داخل الصفاق من معدل أكسدة الليبيدات ويخفض من البروتينات الكلية والإنزيمات المضادة للأكسدة (superoxide dismutase و catalase و peroxidase والإنزيمات المتدخلة في استقلاب المرحلة II).

ينتج ضرر وسمية CCl_4 عن تحويله إلى جذور حرة؛ تُنتج هذه الأخيرة بتنشيط إنزيمات سيتوكروم P450 وبشكل أساسي إنزيم (CYP2E1) وبالتالي إنتاج، في مرحلة أولى، الجذر ثلاثي كلورو ميثيل ($CCl_3\cdot$) الذي يعطي في وجود تراكيز عالية من الأكسجين جذر بيروكسي ثلاثي كلورو ميثيل ($OOCCl_3\cdot$) الأكثر سمية وبالتالي الشروع في أكسدة الليبيدات (Halliwell و Gutteridge، 2007) وألكلة Alkylation البروتينات الخلوية وجزيئات عملاقة أخرى (Yadav وآخرون، 2008).

يمكن أن يساعد استعمال بعض مضادات الأكسدة كالفيتامين C والفيتامين E في تخفيض تأثير السموم الكيميائية. كما تستعمل مستخلصات النباتات الغنية بعديدات الفينول كمضادات أكسدة (Arem وآخرون، 2017؛ Khan و Zehra، 2013).

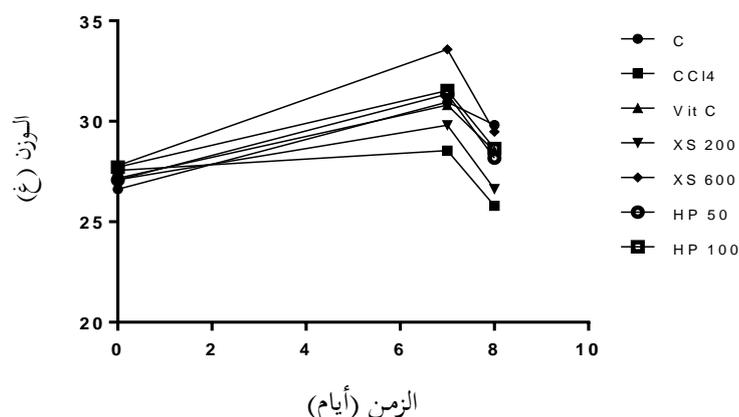
بهدف تقييم تأثير المستخلصين الخامين لكلا من HP و XS المضاد لسمية الكبد برباعي كلوريد الكربون، تم إعطاء جرعات من كلا المستخلصين لمجموعات من الفئران خلال 7 أيام. حُرِضت بعدها سمية الكبد بحقن رباعي كلوريد الكربون في الصفاق.

1.7. أوزان الفئران والأعضاء

لمتابعة تأثير المستخلصين من جهة وتأثير CCl_4 من جهة أخرى، سُجِّلت أوزان الفئران عند بداية الاختبار وفي اليوم السابع عند حقن رباعي كلوريد الكربون وفي اليوم الثامن (شكل 39). زاد وزن الفئران في كل المجموعات خلال الأيام السبعة الأولى ثم تناقص بعد حقن رباعي كلوريد الكربون.

فيما يخص الأوزان النسبية للأعضاء، (شكل 40) في حالة المستخلص HP، كانت الزيادة في الوزن بالنسبة للكبد معتبرة في حالة المجموعة المعاملة برياعي كلوريد الكربون والمجموعة الخاصة بالجرعة 50 مغ / كغ (** ، $p \geq 0.05$). بالنسبة للكلى، سجلت زيادة معتبرة في الوزن في كل المجموعات.

في حالة المستخلص XS، كانت الزيادة في الوزن بالنسبة للكبد معتبرة في حالة المجموعة المعاملة برياعي كلوريد الكربون والمجموعة الخاصة بالجرعة 200 مغ / كغ (** ، $p \geq 0.05$). بالنسبة للكلى، سجلت زيادة معتبرة في الوزن في كل المجموعات.

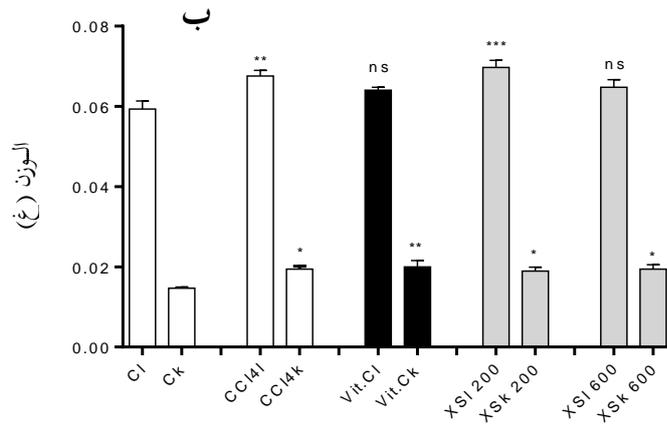
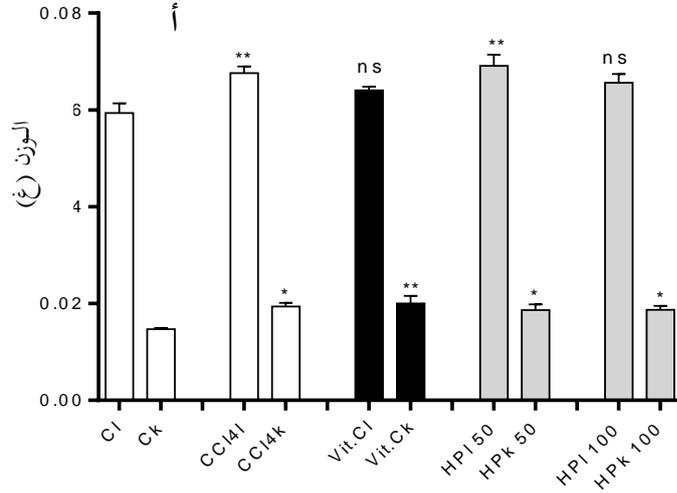


الشكل 39: تطور أوزان الفئران خلال الأيام السبعة. C: المجموعة المعاملة بالماء فقط (المجموعة الشاهد)؛ CCl₄: المجموعة المعاملة بالماء و CCl₄. Vit. C: المجموعة المعاملة بفيتامين C و CCl₄، XS 200 و XS 600 : مجموعتين معاملتين بالمستخلص XS و CCl₄، HP 50 و HP 100 : مجموعتين معاملتين بالمستخلص HP و CCl₄. القيم عبارة عن المتوسط الحسابي (n = 7).

عند دراسة سمية أي مركب كيميائي، يعتبر رصد الوزن النسبي للأعضاء الحيوية معيارا مهما لتقييم مدى سمية هذا المركب (Yavasoglua وآخرون، 2008). في هذه الدراسة، عموما سجلت زيادة معتبرة في الوزن النسبي للكبد والكلى مقارنة بالمجموعة المعاملة بالماء نتيجة لمعاملة الفئران برياعي كلوريد الكربون والمستخلصين والفيتامين C.

يرتبط نشاط الكبد والكلى باستقلاب المركبات الكيميائية والتخلص منها؛ قد تكون زيادة وزن هذه الأعضاء استجابة لزيادة الطلب الوظيفي لاستقلاب التراكيز العالية من رباعي كلوريد الكربون والمستخلصين والفيتامين C (Sharma وآخرون، 2014). يفسر Tiwari وآخرون (2014) زيادة وزن الكبد في حالة المجموعة المعاملة برياعي كلوريد الكربون باحتجاز الماء داخل سيتوبلازم خلايا الكبد. قد يوافق هذا التفسير نتائج هذه الدراسة، إذ تم

تسجيل الزيادة في الوزن مع مجموعة الفئران المعاملة برياعي كلوريد الكربون والمجموعتين المعاملتين بالجرعات الأصغر للمستخلصين HP و XS، حيث أنه في هذه المجموعات من الفئران كان تأثير CCl_4 الأقوى.



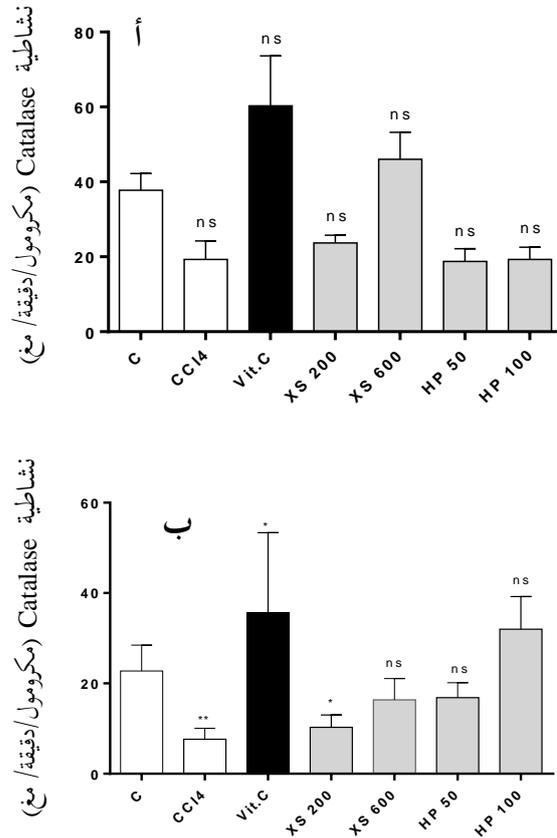
الشكل 40 : أوزان أكباد وكلى الفئران عند اليوم السابع. (أ) HP و (ب) XS . l: كبد و k: كلَى . C : المجموعة المعاملة بالماء فقط (المجموعة الشاهد)؛ CCl_4 : المجموعة المعاملة بالماء و CCl_4 و Vit. C : المجموعة المعاملة بفيتامين C و CCl_4 ، XS 200 و XS 600 : مجموعتين معاملتين بالمستخلص XS و CCl_4 ، HP 50 و HP 100 : مجموعتين معاملتين بالمستخلص HP و CCl_4 . حرضت السمية برياعي كلوريد الكربون 50 % (2 مل/كغ)، أجريت المقارنة مع المجموعة C (المعاملة بالماء فقط). القيم عبارة عن المتوسط الحسابي \pm SEM (n = 7).

2.7. إختبارات النشاطية المضادة للأكسدة

1.2.7. إختبار نشاطية إنزيم catalase

في حالة الكبد، أدت معاملة الفئران بـ HP إلى تخفيض نشاطية إنزيم CAT بمعدل النصف مقارنة مع المجموعة الشاهد (المعاملة بالماء فقط) ولم تلاحظ علاقة بين الجرعة والنشاطية. أما في حالة الكلى، فقد لوحظت زيادة في النشاطية، تتناسب هذه الأخيرة مع الزيادة في الجرعات (شكل 41).

في حين أنه في حالة XS سجلت، في حالة الكبد، زيادة في النشاطية تتناسب مع الزيادة في الجرعات. لوحظ العكس مع الكلى إذ لم يظهر مستخلص XS نفس الفعالية التي كانت في الكبد.



الشكل 41 : تأثير مستخلصي HP و XS على نشاطية CAT على مستوى الكبد (أ) و الكلى (ب). C: المجموعة المعاملة بالماء فقط (المجموعة الشاهد)؛ CCl₄: المجموعة المعاملة بالماء و CCl₄. Vit. C: المجموعة المعاملة بفيتامين C و HP 50 و HP 100، XS 200 و XS 600 : مجموعتين معاملتين بالمستخلص XS و CCl₄، و HP 50 و HP 100

: مجموعتين معاملتين بالمستخلص HP و CCl_4 . حرضت السمية برباعي كلوريد الكربون 50 % (2 مل/كغ)، أجريت المقارنة مع المجموعة C (المعاملة بالماء فقط). القيم عبارة عن المتوسط الحسابي \pm SEM (n = 7). عموماً، قد تعزى الزيادة في نشاطية إنزيم CAT إلى المحتوى المرتفع من الفينولات الكلية التي تؤثر على مستقبلاتها وبالتالي تحفز الزيادة في البناء الحيوي لإنزيم CAT (Vicente وآخرون، 2014). أما الانخفاض في النشاطية فقد يعود إلى ارتفاع تركيز الجذور الحرة، خصوصاً فوق أكسيد الهيدروجين الذي يثبط إنزيم CAT (Sun وآخرون، 2007). قد يرجع الانخفاض في نشاطية إنزيم CAT ونشاطية بقية الإنزيمات المتدخلة في النشاط المضاد للأكسدة إلى التغييرات التي تحدثها الجذور الحرة على بنية البروتينات، التي ينتج عنها انخفاض في النشاطية (Celep وآخرون، 2013).

في دراسة مماثلة، أوضح Shanmugam وآخرون (2016) أن معاملة الجردان بمستخلص أسيتوني لأوراق نبتة *Passiflora subpeltata* سمحت بإعادة مستويات نشاطيات الإنزيمات المضادة للأكسدة (SOD و CAT و GPx). تؤدي استعادة هذه النشاطيات إلى التقليل من أكسدة الليبيدات وبالتالي الحد من الضرر الذي يصيب خلايا الكبد (Halliwell، 2001).

من جانب آخر، ذكر Celep وآخرون (2013) أن معاملة الجردان بمستخلص ميثانولي لأوراق نبتة *Cornus mas* أدت إلى استعادة نشاطيات الإنزيمات المضادة للأكسدة وتخفيض معدل أكسدة الليبيدات وزيادة قدرة الدم المضادة للأكسدة.

2.2.7. إختبار النشاطية المضادة لفوق أكسدة الليبيدات (تحديد تركيز MDA)

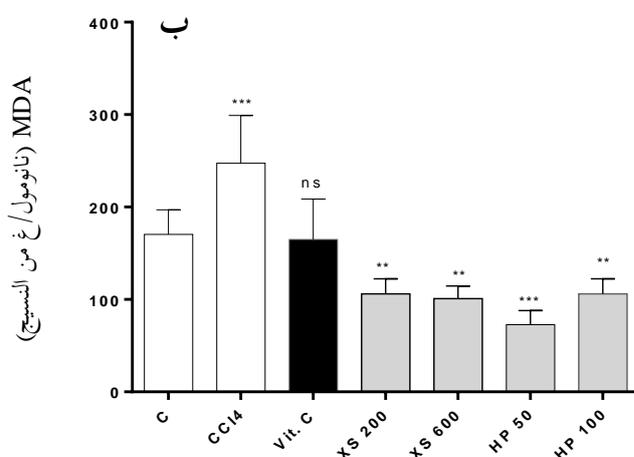
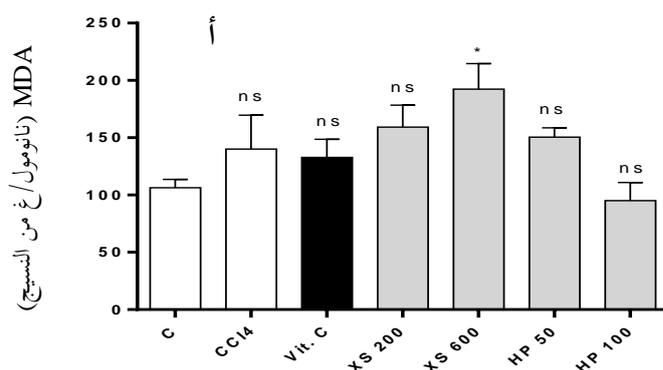
في حالة الكبد، لم تؤثر معاملة الفئران بـ *H. perforatum* على معدل MDA ($p \geq 0.05$, ns) ولم تلاحظ علاقة بين الجرعة والنشاطية. أما في حالة الكلى، فقد لوحظ تناقص معتبر في معدل MDA ($p \geq 0.05$, **) وتناسب بين تأثير المستخلص والجرعات (شكل 42).

نفس الملاحظة كانت مع *X. strumarium*، حيث أنه سجلت، مع الجرعتين، زيادة في معدل MDA. أما في حالة الكلى، فقد لوحظ تناقص معتبر في معدل MDA ($p \geq 0.05$, **).

ينتج ضرر وسمية رباعي كلوريد الكربون عن تحويله في مرحلة أولى، إلى الجذر ثلاثي كلورو ميثيل (CCl_3) الذي يعطي في وجود تراكيز عالية من الأكسجين جذر بيروكسي ثلاثي كلورو ميثيل ($OOCCl_3$) الأكثر سمية وبالتالي الشروع في أكسدة الليبيدات (Halliwell و Gutteridge، 2007).

تخريب أكسدة الليبيدات للأغشية الحيوية هو أحد الأسباب الرئيسية لسمية رباعي كلوريد الكربون. في هذه الدراسة تم تسجيل ارتفاع في النواتج النهائية لفوق أكسدة الليبيدات، أهمها MDA، عند الفئران المعاملة برباعي كلوريد الكربون. تشير زيادة مستويات MDA في الكبد إلى فشل آلية الدفاع المضادة للأكسدة لمنع إنتاج الجذور الحرة و / أو إزاحتها (Sreenivasamurthy وآخرون، 2012).

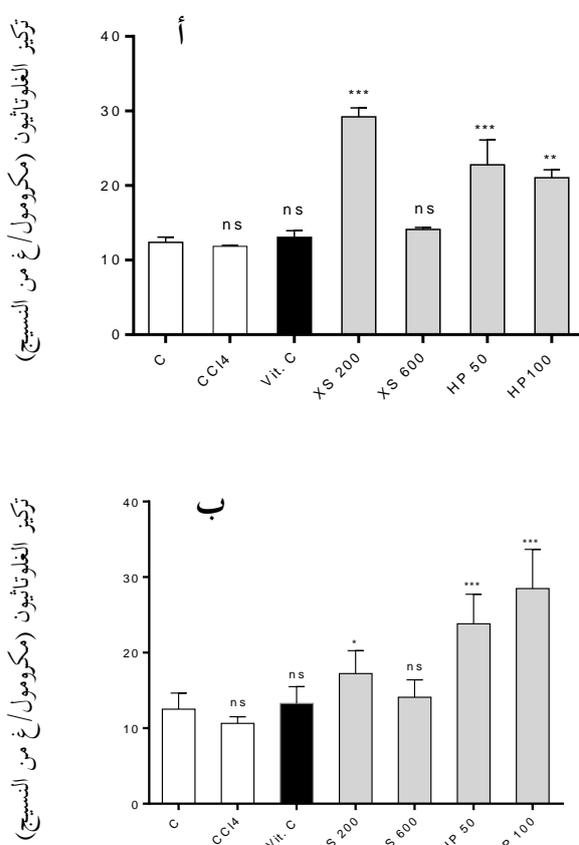
أما انخفاض معدل MDA فيدل على قدرة المستخلصين على إزاحة الجذور الحرة الناتجة عن استقلاب رباعي كلوريد الكربون.



الشكل 42 : تأثير مستخلصي HP و XS على معدل MDA على مستوى الكبد (أ) و الكلى (ب). C: المجموعة المعاملة بالماء فقط (المجموعة الشاهد)؛ CCl₄: المجموعة المعاملة بالماء و CCl₄ و Vit. C: المجموعة المعاملة بفيتامين C و XS 200 و XS 600: مجموعتين معاملتين بالمستخلص XS و CCl₄، HP 50 و HP 100: مجموعتين معاملتين بالمستخلص HP و CCl₄. حرضت السمية برباعي كلوريد الكربون 50% (2 مل/كغ)، أجريت المقارنة مع المجموعة C (المعاملة بالماء فقط). القيم عبارة عن المتوسط الحسابي \pm SEM (n = 7).

3.2.7. تحديد تركيز الغلوتاثيون الكلي

في حالة الكبد، أدت معاملة الفئران بـ HP إلى زيادة معدل الغلوتاثيون (**، $p \geq 0.05$) مقارنة مع المجموعة الشاهد (المعاملة بالماء فقط) ولم تلاحظ علاقة بين الجرعة و النشاطية (شكل 43). أما في حالة الكلى، فقد لوحظ تناسب بين النشاطية والزيادة في الجرعات وزيادة معتبرة في معدل الغلوتاثيون (***) ($p \geq 0.05$). في حين أنه في حالة XS فقد سجلت الزيادة في معدل الغلوتاثيون في حالة الجرعة 200 مغ/كغ (***)، $p \geq 0.05$ ثم تناقص المعدل مع الجرعة 600 مغ/كغ ($p \geq 0.05$, ns). نفس الملاحظة سجلت مع الكلى.



الشكل 43 : تأثير مستخلصي HP و XS على معدل الغلوتاثيون على مستوى الكبد (أ) و الكلى (ب). C: المجموعة المعاملة بالماء فقط (المجموعة الشاهد)؛ CCl₄: المجموعة المعاملة بالماء و CCl₄ و Vit. C: المجموعة المعاملة بفيتامين C و CCl₄، XS 200 و XS 600 : مجموعتين معاملتين بالمستخلص XS و CCl₄، HP 50 و HP 100 : مجموعتين معاملتين بالمستخلص HP و CCl₄. حرّضت السمية برباعي كلوريد الكربون 50 % (2 مل/كغ)، أجريت المقارنة مع المجموعة C (المعاملة بالماء فقط). القيم عبارة عن المتوسط الحسابي \pm SEM (n = 7).

يلعب الغلوتاثيون و GPx و GR دورا أساسيا في حماية الخلايا تجاه جذور بيروكسي ثلاثي كلورو ميثيل المخربة لأغشية خلايا الكبد. بعد حقن رباعي كلوريد الكربون، وللتخلص من البيروكسيدات الليبدية الناتجة استقلاب هذا الأخير، يستهلك الغلوتاثيون بشكل كبير من طرف الإنزيمات المرتبطة في نشاطها بالغلوتاثيون، ينتج عن ذلك تناقص في معدل الغلوتاثيون (Singh وآخرون، 2014).

سمحت المعاملة بالمستخلصين برفع معدل الغلوتاثيون في كلا من الكبد والكلبي خصوصا في حالة المستخلص HP، مما يسمح بإزاحة جذور بيروكسي ثلاثي كلورو ميثيل الناتجة عن استقلاب رباعي كلوريد الكربون (Singh وآخرون، 2014).

3.7. التحاليل البيوكيميائية

بينت النتائج أن حقن رباعي كلوريد الكربون يؤدي إلى ارتفاع كبير في معدل الإنزيمات ناقلة الأمين المصلية (GOT و GPT) والفوسفاتاز القاعدي و bilirubine الكلبي والغليسيريدات الثلاثية والكولستيرول واليوربا والكرياتينين (جدول 9) مقارنة مع المجموعة غير المعاملة برباعي كلوريد الكربون.

الجدول 9 : تأثير رباعي كلوريد الكربون على المؤشرات البيوكيميائية على مستوى الكبد. حرضت السمية برباعي كلوريد الكربون 50 % (2 مل/كغ). تمثل القيم المتوسط الحسابي \pm SEM.

المجموعة الشاهد (معاملة بالماء)	المجموعة المعاملة برباعي كلوريد الكربون	
5.09 ± 136.76	781.49 ± 15508	GOT (وحدة دولية / ل)
1.67 ± 24.96	202.81 ± 16770.25	GPT (وحدة دولية / ل)
8.1 ± 68.57	24.28 ± 200	الفوسفاتاز القاعدي (وحدة دولية / ل)
0	0.89 ± 4.57	Bilirubine (مغ / ل)
0.15 ± 1.125	0.45 ± 1.737	الغليسيريدات الثلاثية (غ / ل)
0.057 ± 0.688	0.09 ± 0.675	الكولستيرول (غ / ل)
0.038 ± 0.542	0.175 ± 0.536	اليوربا (غ / ل)
4	4	الكرياتينين (مغ / ل)

تعكس هذه النتائج الضرر الذي لحق بالكبد، إذ ترتفع معدلات هذه الوسائط في مصبل الدم نتيجة لأكسدة لبيدات الأغشية الخلوية بنواتج استقلاب رباعي كلوريد الكربون. يؤدي تغيير البنى الكيميائية لهذه اللبيدات إلى حدوث ثغرات على مستوى أغشية الخلايا ثم خروج مكونات الخلايا إلى الدم.

1.3.7. الإنزيمات ناقلة الأمين المصلية (GOT و GPT) والفوسفاتاز القاعدي

يمكن اعتبار بعض الإنزيمات مثل الإنزيمات ناقلة الأمين المصلية (GOT و GPT) والفوسفاتاز القاعدي كمؤشرات على الأضرار اللاحقة بالكبد (Brandt وآخرون، 2009). تسبب المعاملة برباعي كلوريد الكربون زيادة معتبرة في معدل هذه الإنزيمات مما يشير إلى حدوث أكسدة على مستوى الكبد (Coballase-Urrutia وآخرون، 2017). ينتج عن حقن رباعي كلوريد الكربون استقلاب هذا الأخير إلى جذور حرة جد سامة تسبب فوق أكسدة الليبدات، و بالتالي تحريب أغشية العضيات داخل خلايا الكبد و كذا الغشاء البلازمي، مسببة تورم وتنخر هذه الأخيرة من جهة ومن جهة أخرى خروج إنزيمات مثل GOT و GPT إلى الدورة الدموية وبالتالي زيادة معدلها في المصل (جدول 8) (Sahreen وآخرون، 2011).

يتدخل الفوسفاتاز القاعدي في نزع مجموعة فوسفات لبروتينات مختلفة تتواجد بالقرب من الغشاء البلازمي لخلايا الكبد وعلى اتصال مباشر بالنواقل التي تلعب دورا أساسيا في عملية تكوين الصفراء. يعتبر ارتفاع معدل الفوسفاتاز القاعدي في المصل مؤشرا للركود الصفراوي. ترجع هذه الزيادة إلى تراكم الصفراء في الكبد وارتفاع البناء الحيوي للفوسفاتاز القاعدي وتحرير هذا الأخير في المصل (Alvaro وآخرون، 2000؛ Brai وآخرون، 2014).

من وظائف الكبد العديدة، التخلص من نواتج تفكيك الهيموغلوبين، bilirubine، في الصفراء (Jothy وآخرون، 2012). قد يرتفع معدل bilirubine في الدم نتيجة لزيادة بنائه أو زيادة في تحلل كريات الدم الحمراء أو تناقص في عملية الربط (Sasidharan وآخرون، 2010). لذا فهو يستعمل كمؤشر لتقييم الضرر اللاحق بالكبد (Sangare وآخرون، 2012).

سمحت معاملة الفئران بمستخلصي HP و XS بتخفيض معدل الإنزيمات ناقلة الأمين المصلية (GOT و GPT) والفوسفاتاز القاعدي و bilirubine بنسب متفاوتة (جدول 10) و (شكل 44).

الجدول 10: النسب المئوية لتأثير مستخلصي HP و XS على المعدل المصلي لـ GPT و GOT و PAL و bilirubine. حرضت السمية رباعي كلوريد الكربون 50 % (2 مل/كغ)، تمت المقارنة مع المجموعة المعاملة رباعي كلوريد الكربون. تمثل القيم المتوسط الحسابي للنسب المئوية \pm SEM.

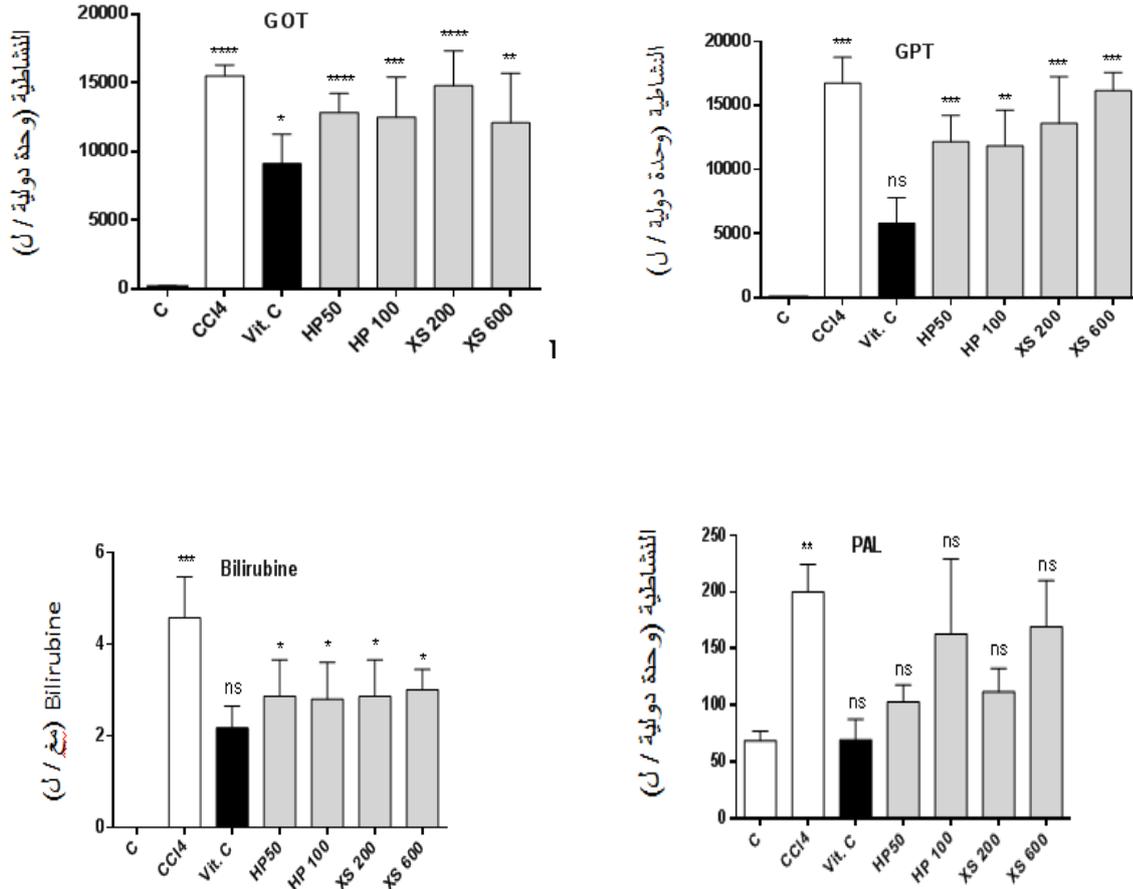
(%) Bilirubine	الفوسفاتاز القاعدي (%)	(%) GPT	(%) GOT	
10.44 \pm 52.60	9.1 \pm 65.33	7.38 \pm 75.71	16.84 \pm 45.54	الفيتامين C (200 مغ/كغ)
19.15 \pm 37.5 ^{ns}	7.76 \pm 48.64 ^{ns}	13.34 \pm 39.62 ^{ns}	8.88 \pm 17.18 ^{ns}	HP 50 مغ / كغ
16.40 \pm 50.78 ^{ns}	21.00 \pm 47.5 ^{ns}	18.07 \pm 48.67 ^{ns}	19.88 \pm 30.40 ^{ns}	HP 100 مغ / كغ
6.22 \pm 48.96 ^{ns}	11.48 \pm 44 ^{ns}	17.37 \pm 30.03 ^{ns}	9.52 \pm 17.12 ^{ns}	XS 200 مغ / كغ
9.78 \pm 28.9 ^{ns}	10.37 \pm 34.33 ^{ns}	1.42 \pm 11.99*	26.35 \pm 36.08 ^{ns}	XS 600 مغ / كغ

مقارنة مع مجموعة رباعي كلوريد الكربون، سمحت معاملة الفئران بمستخلص HP مع الجرعة 100 مغ / كغ بتخفيض معدل الإنزيمات GOT و GPT والفوسفاتاز القاعدي بالنسب 30.40 % و 48.67 % و 47.5 % على الترتيب وبشكل غير معنوي ($p > 0.05$). في حين خفضت نفس الجرعة معدل Bilirubine بنسبة 50.78 %، وهي قيمة تقارب تلك المسجلة مع الفيتامين C (52.60 %).

دائماً ومقارنة مع مجموعة رباعي كلوريد الكربون، سمحت معاملة الفئران بمستخلص XS مع الجرعة 200 مغ / كغ بتخفيض معدل الإنزيمات GOT و GPT والفوسفاتاز القاعدي بالنسب 17.12 % و 30.03 % و 44 % على الترتيب وبشكل غير معنوي ($p > 0.05$). في حين خفضت نفس الجرعة معدل Bilirubine بنسبة 48.96 % . إلا أنه مع الجرعة 600 مغ / كغ ، سجل تناقص في التأثير.

في نفس السياق، سجل Kale وآخرون (2012) تناقصاً مع إنزيمات GOT و GPT والفوسفاتاز القاعدي بعد معاملة الجرذان بمستخلص *Sesbania grandiflora*.

التناقص في معدل هذه الإنزيمات و Bilirubine، في المصل، نتيجة للمعاملة بمستخلصي HP و XS، مؤشر لاستقرار الغشاء البلازمي في خلايا الكبد وبالتالي حماية الكبد من الضرر الناتج عن رباعي كلوريد الكربون (Brai وآخرون، 2014 ؛ Coballase-Urrutia وآخرون، 2017).



الشكل 44 : تأثير مستخلصي HP و XS على المعدل المصلي لـ GPT و GOT و PAL (فوسفاتاز قاعدي) و bilirubine . حرّضت السمّية برناعي كلوريد الكربون 50 % (2 مل/كغ)، C: المجموعة المعاملة بالماء فقط (المجموعة الشاهد)؛ CCl₄: المجموعة المعاملة بالماء و CCl₄ . Vit. C: المجموعة المعاملة بفيتامين C و CCl₄ ، XS 200 و XS 600 : مجموعتين معاملتين بالمستخلص XS و CCl₄ ، HP 50 و HP 100 : مجموعتين معاملتين بالمستخلص HP و CCl₄ . أُجريت المقارنة مع المجموعة C (المعاملة بالماء فقط) . تمثل القيم المتوسط الحسابي ± .SEM

2.3.7 الكولسترول والجليسيريدات الثلاثية

ينتج عن المعاملة برناعي كلوريد الكربون تنخر وتشحم على مستوى الكبد؛ ينتج هذا التشحم عن تراكم الكولسترول والجليسيريدات الثلاثية نتيجة لتعطيل نقل الشحوم من الكبد. ينجم ذلك عن اضطراب عملية ربط الجليسيريدات الثلاثية بالبروتين الضروري لتكوين الجزيئات الحاملة للبيدات (Tiwari وآخرون، 2014).

سمحت معاملة الفئران بمستخلصي HP وXS بتخفيض معدل الغليسيريدات الثلاثية و بزيادة معدل الكولسترول (جدول 11) و(شكل 45).

الجدول 11: النسب المئوية لتأثير مستخلصي HP وXS على المعدل المصلي للغليسيريدات الثلاثية والكولسترول. حضرت السمية رباعي كلوريد الكربون 50 % (2 مل/كغ)، تمت المقارنة مع المجموعة المعاملة رباعي كلوريد الكربون. تمثل القيم المتوسط الحسابي للنسب المئوية \pm SEM.

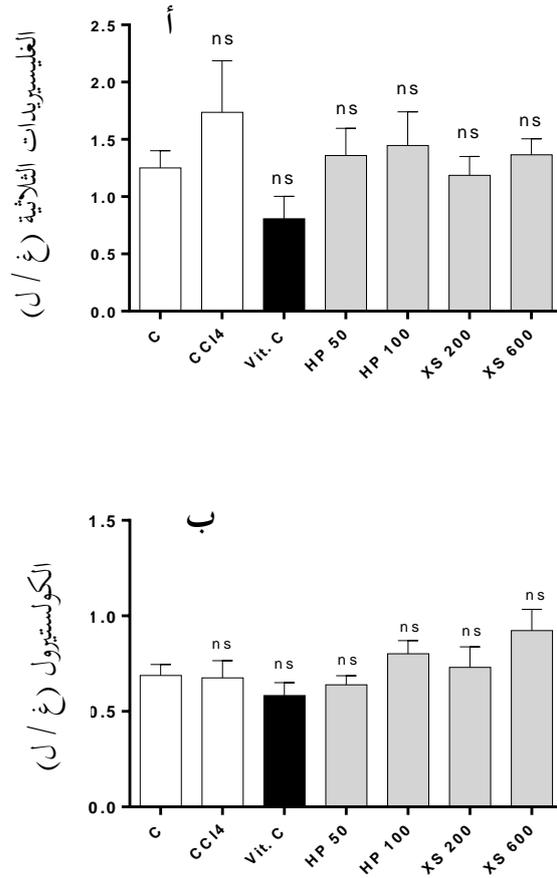
الكولسترول (%)	الغليسيريدات الثلاثية (%)	
10.03 \pm 13.67	11.27 \pm 53.56	الفيتامين C (200 مغ/كغ)
5.28 \pm 6.99 ^{ns}	6.71 \pm 21.72 ^{ns}	HP 50 مغ / كغ
10.15 \pm 18.69 ^{ns}	11.17 \pm 31.35 ^{ns}	HP 100 مغ / كغ
16.06 \pm 8.03 ^{ns}	10.43 \pm 31.69 ^{ns}	XS 200 مغ / كغ
3.56 \pm 82.23 ^{ns}	9.79 \pm 21.42 ^{ns}	XS 600 مغ / كغ

مقارنة مع مجموعة رباعي كلوريد الكربون، سمحت معاملة الفئران بمستخلص HP مع الجرعة 50 مغ / كغ بتخفيض معدل الكولسترول تقارب تلك ل فيتامين C، أما الجرعة 100 مغ / كغ فقد رفعته بنسبة 18.69 % . فيما يخص الغليسيريدات الثلاثية فقد انخفض معدلها بشكل متناسب طرديا مع الجرعات .

دائما ومقارنة مع مجموعة رباعي كلوريد الكربون، رفعت معاملة الفئران بمستخلص XS معدل الكولسترول مع كلتا الجرعتين. فيما يخص الغليسيريدات الثلاثية فقد انخفض معدلها مع كلتا الجرعتين.

سجل Gnanadesigan وآخرون (2016) تناقصا في الكولسترول و الغليسيريدات الثلاثية بعد معاملة الجرذان بمستخلص إيثانولي لأوراق نبتة *Ceriops decandra*.

تهاجم الجذور الحرة الناتجة عن استقلاب CCl_4 لبيدات أغشية الشبكة الأندوبلازمية. هذه الهجومات مسؤولة عن نقص في الوظائف الاستقلابية مثل البناء الحيوي للبروتينات وتثبيط تخزين الكولستيرول (Verma وآخرون، 2015).



الشكل 45 : تأثير مستخلصي HP و XS على المعدل المصلي الغليسيريدات الثلاثية (أ) و الكوليسترول (ب) .
 حضرت السمية برباعي كلوريد الكربون 50 % (2 مل/كغ)، C: المجموعة المعاملة بالماء فقط (المجموعة الشاهد)؛
 CCl₄: المجموعة المعاملة بالماء و CCl₄ و Vit. C: المجموعة المعاملة بفيتامين C و CCl₄ و XS 200 و XS 600 :
 مجموعتين معاملتين بالمستخلص XS و CCl₄ ، HP 50 و HP 100 : مجموعتين معاملتين بالمستخلص HP
 و CCl₄. أجريت المقارنة مع المجموعة C (المعاملة بالماء فقط) . تمثل القيم المتوسط الحسابي \pm SEM.

3.3.7. اليوريا والكرياتينين

ينتج عن حقن رباعي كلوريد الكربون فوق أكسدة البنى الليبيدية في أنسجة الكلى، و بالتالي تخريب الخلايا
 (Khan وآخرون، 2010).

تعد اليوريا والكرياتينين مؤشرات على القصور الكلوي لذا تقيم وظيفة الكلى بمتابعة معدلات اليوريا
 والكرياتينين. يتغير معدل هذين المؤشرين في حالة إلحاق ضرر بنفرونات الكلى (Radulović وآخرون، 2015).

وهزال العضلات في حالة الكرياتينين (Ouachria وآخرون، 2017) الذي قد يكون ناتجا عن هدم البروتينات (Hena وآخرون، 2016).

سمحت معاملة الفئران بمستخلصي HP و XS بتخفيض معدل كل من اليوريا و الكرياتينين (جدول 12) و(شكل 46).

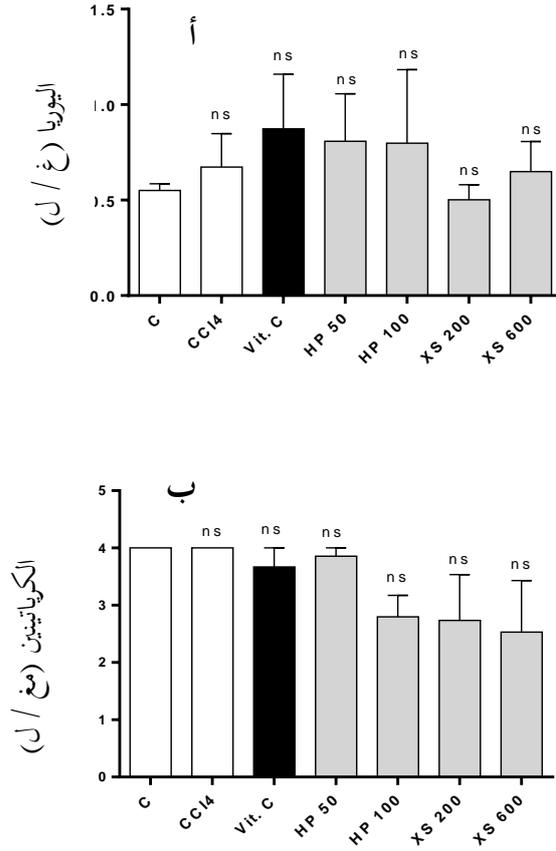
الجدول 12: النسب المئوية لتأثير مستخلصي HP و XS على المعدل المصلي لليوريا و الكرياتينين. حرضت السمية رباعي كلوريد الكربون 50 % (2 مل/كغ)، تمت المقارنة مع المجموعة المعاملة رباعي كلوريد الكربون. تمثل القيم المتوسط الحسابي للنسب المئوية \pm SEM.

اليوريا (%)	الكرياتينين (%)	
9.64 \pm 17.71	8.33 \pm 9.13	الفيتامين C (200 مغ/كغ)
13.77 \pm 14.79 ^{ns}	3.57 \pm 3.57 ^{ns}	HP 50 مغ / كغ
16.85 \pm 37.08 ^{ns}	10.46 \pm 30 ^{ns}	HP 100 مغ / كغ
12.35 \pm 31.34 ^{ns}	20.01 \pm 31.62 ^{ns}	XS 200 مغ / كغ
9.35 \pm 39.06 ^{ns}	26.48 \pm 45.87 ^{ns}	XS 600 مغ / كغ

مقارنة مع مجموعة رباعي كلوريد الكربون، سمحت معاملة الفئران بمستخلص HP مع الجرعة 100 مغ / كغ بتخفيض معدل الكرياتينين و اليوريا إلى 30 % و 37.08 % على الترتيب.

دائما و مقارنة مع مجموعة رباعي كلوريد الكربون، سمحت معاملة الفئران بمستخلص XS مع الجرعة 600 مغ / كغ بتخفيض معدل الكرياتينين و اليوريا إلى 45.87 % و 39.06 % على الترتيب.

خفض كل من مستخلصي HP و XS معدل اليوريا بنسب أعلى من تلك المسجلة مع الفيتامين C. توافق هذه النتائج تلك المسجلة من طرف Saba و آخرون (2010)، إذ أن المستخلص المائي لأوراق نبتة *nidoscolus aconitifolius* يخفض معدل كلا المؤشرين (الكرياتينين و اليوريا).



الشكل 46: تأثير مستخلصي HP و XS على المعدل المصلي لليوريا (أ) و الكرياتينين (ب). حرضت السمية برباعي كلوريد الكربون 50% (2 مل/كغ)، C: المجموعة المعاملة بالماء فقط (المجموعة الشاهد)؛ CCl₄: المجموعة المعاملة بالماء و CCl₄. Vit. C: المجموعة المعاملة بفيتامين C و XS 200 و XS 600 : مجموعتين معاملتين بالمستخلص XS و CCl₄ ، HP 50 و HP 100 : مجموعتين معاملتين بالمستخلص HP و CCl₄. حرضت السمية برباعي كلوريد الكربون 50% (2 مل/كغ)، أجريت المقارنة مع المجموعة C (المعاملة بالماء فقط). تمثل القيم المتوسط الحسابي \pm SEM.

يمكن رفع فعالية المستخلصين بالأخذ بعين الاعتبار عدة عوامل: (1) مراجعة الجرعات المعطاة للفئران، و (2) تخفيض جرعة رباعي كلوريد الكربون (2 مل/كغ و 3) تمديد فترة معاملة الفئران بالمستخلصين إذ أن 6 أيام قد لا تسمح الجرعات المطبقة برفع مستوى الدفاع المضاد للأكسدة. ذكر Singh و رفاقه (2014) أن التراكيز 5 مغ/كغ و 10 مغ/كغ و 20 مغ/كغ من جزيئة plumieride المستخلصة من *lumeria bicolor* سمحت بتحسين معدل التأثير المضاد للأكسدة وكذا المؤشرات البيوكيميائية في فترة 30 يوم.

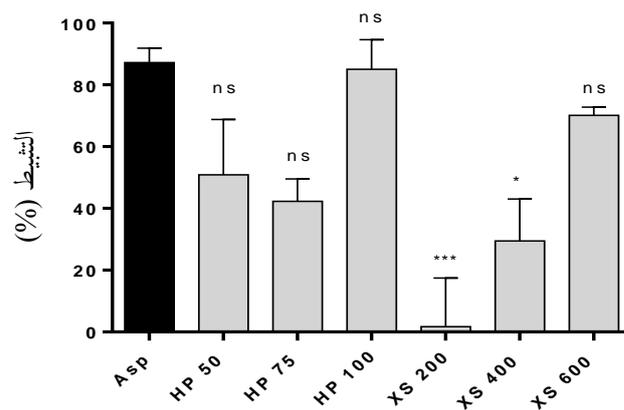
8. الاختبارات المضادة للالتهاب

تكاثفت الدراسات بهدف البحث عن مضادات للالتهاب ضمن النباتات الطبية. قد توفر هذه الأخيرة جزيئات لها القدرة على تثبيط أو تخفيض الالتهاب. لأجل هذا تم اختبار النشاطية المضادة للالتهاب المحفز بـ xylene و زيت croton و carrageenan.

1.8. تحفيز وذمة الأذن بـ Xylene

الوذمة المحرّضة بـ xylene عند الفئران، نموذج للالتهاب الحاد، إذ يسبب xylene توسعا في الأوعية الأوعية و تغيرات على مستوى الجلد (Kim و آخرون، 2007). يستعمل xylene لتقييم تأثير مضادات الالتهاب الستيرويدية و كذا غير الستيرويدية خصوصا تلك المثبطة لـ phospholipase A2 (Agbaje و Fageyinbo، 2012؛ Ishola و آخرون، 2014).

يؤثر xylene على الأعصاب الحسية التي تفرز المادة P والببتيد المرتبط بجين Calcitonin (CGRP) calcitonin Gene Related Peptide؛ يسمح هذا بتراكم السوائل وظهور الوذمة (Nasri و آخرون، 2017). المادة P بببتيد مكون من إثني عشرة باقي حمض أميني، واسع الانتشار في الجهاز العصبي المركزي والمحيطي ويعمل كناقل عصبي ومنظم أو معدل عصبي في العديد من الحالات الفيزيولوجية (O'Connor و آخرون، 2004). في هذه الدراسة، تم قياس سمك الأذن قبل وبعد ساعتين من التطبيق الموضعي لـ xylene، سمح هذا بتقييم تأثير المستخلصين المضاد للوذمة (شكل 47).



الشكل 47 : تأثير مستخلصي HP و XS على الوذمة المحرّضة بـ xylene عند الفئران. حرّضت الوذمة بتطبيق 30 مكروول من xylene على الجهة الداخلية للأذن اليمنى. تلقت مجموعات الفئران جرعات من Aspirine

(Asp) مضاد التهاب مرجعي وجرعات بتركيز مختلفة من كلا المستخلصين. تمثل القيم المتوسط الحسابي $SEM \pm$ (n = 6).

في حالة مستخلص HP، سمح هذا الأخير بتخفيض معدل الوذمة بنسبة معتبرة توافق 87.27 ± 0.008 % في حالة التركيز 100 مغ/كغ، تقارب هذه النسبة تلك الملاحظة مع الأسبيرين (89.09 ± 0.004 %) المستعمل كمضاد التهاب مرجعي.

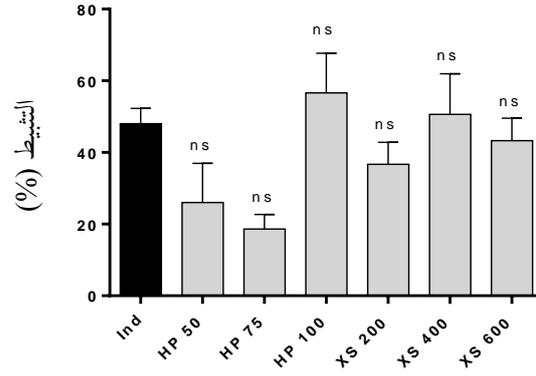
أما في حالة مستخلص XS، فقد سمح هذا الأخير بتخفيض معدل الوذمة بنسبة أيضا معتبرة توافق 74.54 ± 0.002 % في حالة التركيز 600 مغ/كغ. مع كلا المستخلصين، كان التثبيط مرتبطا بالجرعة. قد يرجع تأثير المستخلصين إلى تثبيط إفراز المادة P أو تثبيط تأثيرها.

2.8. تحفيز وذمة الأذن بزيت Croton

الوذمة المحرّضة بزيت croton عند الفئران، نموذج آخر للالتهاب الحاد، إذ يستعمل زيت croton لتقييم تأثير مضادات الالتهاب. زيت croton عامل محرض للالتهاب مستخلص من ثمار *Croton tiglium* L. ، يحتوي هذا الزيت المهيج للجلد على إسترات phorbol، أهمها (TPA) 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. يحرض هذا الأخير تفاعلا التهابيا حادا يتميز بتوسع الأوعية الدموية و ارتشاح أو اختراق الخلايا البيضاء متعددة النوى للأنسجة و زيادة الأنترلوكين 1B و بالتالي تشكل الوذمة. من جانب آخر ينتج عن هذا الزيت ارتفاع في كلا من نشاطية إنزيم xanthine oxydase و فوق الأكسدة الليبيدية (Otuki وآخرون، 2005؛ Rahman وآخرون، 2011).

تنجم هذه التغيرات عن البروتين كيناز C (PKC) التي تحفز ارتفاع نشاطية phospholipase A2 (PLA2) (Wang وآخرون، 2002). تحفز PLA2 إماهة الفوسفوليبيدات الغشائية إلى الحمض arachidonic، يتدخل هذا الأخير في بناء eicosanoids ؛ prostaglandines و leucotriènes، تمثل هذه المرحلة الخطوة الأولى في التفاعل الالتهابي (Sato وآخرون، 2009). من جانب آخر، تحفز PKC إفراز وتنشيط عدة وسائط مناعية مثل السيتوكينات والكيموكينات التي ترفع الاستجابة الالتهابية على مستوى الجلد (Denning، 2004).

في هذه الدراسة، تم قياس سمك الأذن اليمنى و سمك الأذن اليسرى بعد 6 ساعات من التطبيق الموضعي لزيت croton، سمح هذا بتقييم تأثير المستخلصين المضاد للوذمة (شكل 48).



الشكل 48 : تأثير مستخلصي HP و XS على الوذمة المحرّضة بزيت croton عند الفئران. حرّضت الوذمة بتطبيق 80 ميكروغرام من زيت croton على الجهة الداخلية للأذن اليمنى. تلقت مجموعات الفئران جرعات من indometacine (Ind) مضاد التهاب مرجعي وجرعات بتركيز مختلفة من كلا المستخلصين. تمثل القيم المتوسط الحسابي \pm SEM (n = 6).

في حالة مستخلص HP ، سمح هذا الأخير بتخفيض معدل الوذمة بنسبة توافق 10.05 ± 56.66 % في حالة التركيز 100 مغ/كغ، تقارب هذه النسبة تلك الملاحظة مع indométacine (4.29 ± 48.00 %) المستعمل كمضاد التهاب مرجعي.

أما في حالة مستخلص XS ، فقد سمح هذا الأخير بتخفيض معدل الوذمة بنسبة توافق 11.32 ± 50.66 % في حالة التركيز 400 مغ/كغ.

يمكن أن يرجع تأثير المستخلصين إلى (1) نشاطهما المضاد للأوكسدة القوي، إذ أن معاملة الجلد بمواد محرّضة ل PKC تحفز تشكل الجذور الحرة. (2) قد تعمل مباشرة على تثبيط أو تخفيض نشاط PKC وبالتالي إيقاف سلسلة التفاعلات الالتهابية وتشكل الجذور الحرة (Garrido وآخرون، 2004).

من جانب آخر، قد يفسر محتوى المستخلصين المرتفع من الفلافونويدات (خاصة في حالة HP) التأثير المضاد للالتهاب الملاحظ معهما. بينت دراسة ل Bouriche وآخرون (2016) أن المستخلص الميثانولي لنبته *Hertia cheirifolia* يخفض بشكل معتبر سمك الوذمة المحرّضة بزيت croton.

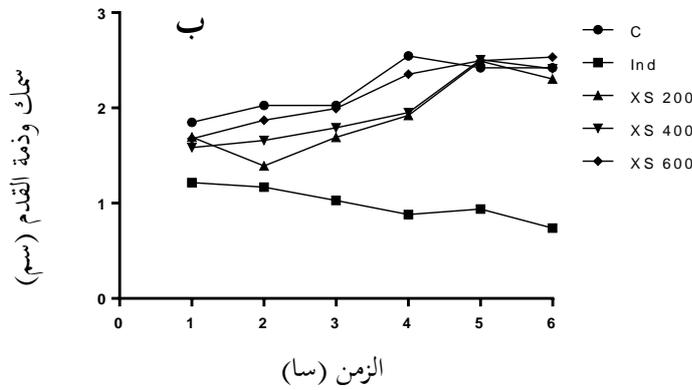
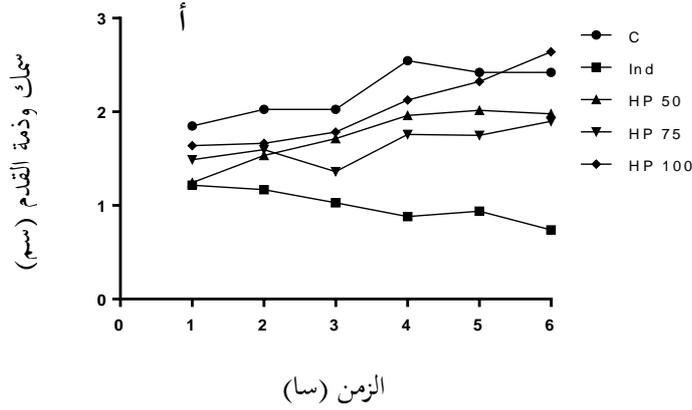
3.8. تحفيز وذمة القدم ب carrageenan

تعرض الوذمة ب carrageenan كنموذج تجريبي للالتهاب الحاد عند الجرذان. يتم قياس الوذمة خلال 6 ساعات، يعتقد أن التفاعل الالتهابي الناجم عن carrageenan يمر بمراحلتين ؛ يتم في المرحلة الأولى (1-2 سا) إفراز histamine و serotonin أما خلال المرحلة الثانية (2-6 سا) فيتم إفراز prostaglandins و bradykinin و leukotrienes، يتم إنتاج هذين الأخيرين من طرف الخلايا البالعة (Agnel Ruba و Mohan، 2016). في هذه الدراسة، تم قياس سمك الرجل اليمنى للجرذ خلال 6 ساعات بعد التطبيق الموضعي ل carrageenan، سمح هذا بتقييم تأثير المستخلص المضاد للوذمة (شكل 49) و (شكل 50).

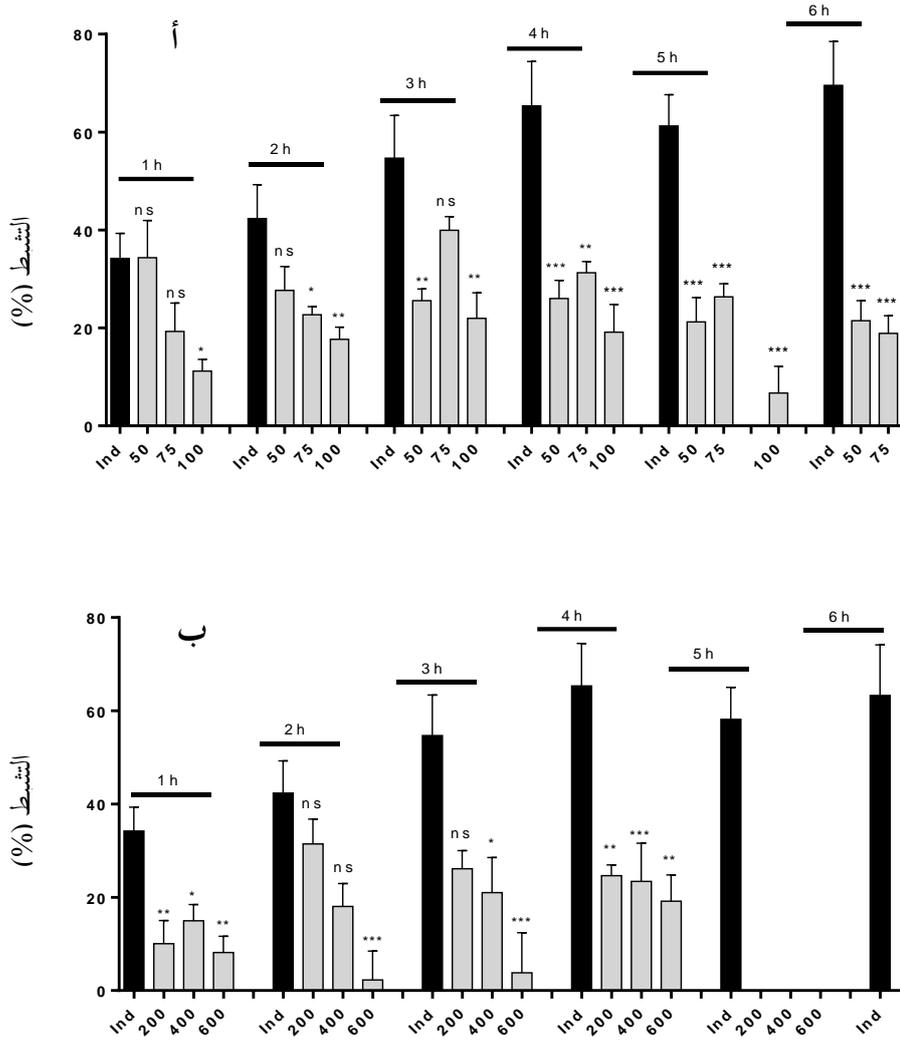
سمح إعطاء جرعات من مستخلص HP بتخفيض سمك الوذمة مقارنة مع الشاهد السالب خلال فترة الاختبار (شكل 49 أ). نفس الملاحظة كانت مع XS (شكل 49 ب) إلا أن تخفيض سمك الوذمة استمر حتى الساعة الخامسة ثم زاد السمك إلى نفس مستوى المجموعة الشاهد.

من جانب آخر، سمح مستخلص HP (شكل 50 أ) بتثبيط الوذمة (34.34 - 27.69 %) خلال المرحلة الأولى (1-2 سا)، قد يوحي هذا بأن هذا المستخلص يمكنه تثبيط تأثير histamine و serotonin. أما خلال المرحلة الثانية (2-6 سا)، فقد وصلت نسبة التثبيط إلى أوجها 39.96 ± 2.31 % عند الساعة الثالثة؛ قد يدل هذا على قدرة المستخلص على تثبيط prostaglandins و bradykinin و leukotrienes. أما مستخلص XS، فقد سمح بتثبيط الوذمة لكن بفعالية أقل من مستخلص HP (شكل 50 ب).

وردت نشاطية الفلافونويدات المضادة للالتهاب في العديد من البحوث. و دُكر أن غليكوزيدات الفلافون و الفلافونول و كذا الفلافونويدات غير السكرية تملك قدرة مضادة للالتهاب معتبرة في حالة الالتهاب الحاد أو المزمن عند إعطائها عن طريق الفم أو بتطبيقها موضعياً. من بين هذه الفلافونويدات، apigenin و luteolin و quercetin و kaempferol و myricetin و fisetin. تؤثر هذه الأخيرة على الالتهاب بتثبيطها لاستقلاب الحمض arachidonic أو بتثبيطها لنشاط إنزيمات cyclo-oxygenase و lipoxygenase (Tapas وآخرون، 2008).



الشكل 49 : حركية تأثير مستخلصي HP (أ) و XS (ب) على الوذمة المحرّضة ب Carrageenan عند الجرذان خلال 6 ساعات. حرّضت الوذمة بحقن 0.1 مل من Carrageenan في أخصص القدم اليمنى للجرذ. تلقت مجموعات الجرذان جرعات من indometacin (Ind) مضاد التهاب مرجعي وجرعات بتراكيز مختلفة من كلا المستخلصين. تمثل القيم المتوسط الحسابي \pm SEM (n = 6).



الشكل 50: تأثير مستخلصي HP (أ) و XS (ب) على الوذمة المحرّضة ب Carrageenan عند الجرذان. حرّضت الوذمة بحقن 0.1 مل من Carrageenan في أخمص القدم اليمنى للجرذ. تلقت مجموعات الجرذان جرعات من indometacin (Ind) مضاد التهاب مرجعي وجرعات بتركيز مختلفة من كلا المستخلصين. تمثل القيم المتوسط الحسابي \pm SEM (n = 6).

من جانب آخر، عند اختبار عديدات الفينول في الحي *in vivo* يتدخل عامل آخر في مدى تأثيرها، معدل امتصاصها على مستوى الجهاز الهضمي ثم التغيرات التي تتعرض لها بعد الامتصاص. تتواجد عديدات الفينول في النباتات بشكل غير مرتبط بالسكريات وعديدات الفينول سكرية وإسترات ومكاثير polymers. يمكن امتصاص عديدات الفينول غير سكرية على مستوى المعى الدقيق، في حين يتم إماهة عديدات الفينول سكرية وإسترات

والمكاثير من طرف إنزيمات معوية أو microflora معوية قبل امتصاصها (Sanda وآخرون، 2012). قد يفسر هذا عدم أو ضعف التأثير الناجم عن إعطاء المستخلصات عن الطريق الفموي.

يتضح من خلال النتائج المحصل عليها أن كل من نبتة *Xanthium strumarium* و *Hypericum perforatum* تملك نشاطية مضادة للالتهاب. كما تملك نشاطية مضادة للأكسدة مخبريا وفي الكائن الحي، كما تملك نشاطية مضادة للالتهاب.

المناقشة العامة

أثبتت العديد من الدراسات أن الجذور الحرة الأكسجينية والنيتروجينية تتدخل في ظهور أمراض مختلفة مثل أمراض القلب و تصلب الشرايين و السرطان و التقدم في السن. توفر النباتات المستخدمة في الطب التقليدي مجموعة كبيرة من مضادات الأكسدة الطبيعية التي يمكن أن تقلل من الآثار الضارة للجذور الحرة. يمكن للمركبات الفينولية و الفلافونويدات التي هي عبارة عن مواد طبيعية تنتجها النباتات أن تتفاعل مع الجذور الحرة الأكسجينية و النيتروجينية مانعة بذلك حدوث سلسلة التفاعلات التي قد تلحق الضرر بالخلايا (Hussain وآخرون، 2016). في هذه الدراسة تم اختبار النشاط المضاد للالتهاب والمضادة للأكسدة في الأنبوب وفي الحي، لنبتين طبيتين (HP) *Hypericum perforatum* و (XS) *Xanthium strumarium*.

يستعمل نبات HP بشكل أساسي في حالة الأرق والقلق والانهيار العصبي والاكنتاب الخفيف (Rahimi و Kiani، 2016). أما XS فيستعمل في الصين لعلاج التهاب الجيوب الأنفية والتهاب الطبلية والصداع والشرى urticaria والتهاب المفاصل (Rad وآخرون، 2013).

تم تحضير مستخلصات من النبتتين باستعمال محاليل عضوية متزايدة القطبية (الهكسان والكلوروفورم و الإيثيل أستات) انطلاقاً من مسخلص خام ميثانولي؛ تميز المستخلص الميثانولي الخام لكلا النبتتين بمردود استخلاص أعلى مقارنة بالمستخلصات الأخرى.

بين التقدير الكمي لعديدات الفينول الكلية والفلافونيدات في مستخلص CrE ومستخلص ChE ومستخلص EAE ومستخلص AqE لنبات HP بغناها بكل من عديدات الفينول والفلافونويدات مقارنة بمستخلصات XS. حيث سجل أعلى محتوى من المركبات الفينولية (692 ± 1.4 مغ/غ من المستخلص الجاف) و الفلافونويدات (245.5 ± 0.85 مغ/غ من المستخلص الجاف) في مستخلص EAE. كذلك بالنسبة XS، تميز EAE بأعلى محتوى من المركبات الفينولية (166.26 ± 27.98 مغ/غ من المستخلص الجاف) والفلافونويدات (29.037 ± 3.14 مغ/غ من المستخلص الجاف).

أظهر تحليل المستخلصات الخام باستعمال HPLC، في حالة HP، أن المستخلص الخام يتميز بوجود مشتق للحمض caffeic بتركيز (4.71 ± 0.24 مغ/غ من المستخلص) و مشتق للحمض p-coumaric بتركيز (1.7 ± 0.09 مغ/غ من المستخلص) و مشتقات من rutine بتركيز (50.81 ± 2.54 مغ/غ من المستخلص الجاف) و (27.12 ± 1.36 مغ/غ من المستخلص الجاف) و (12.73 ± 0.24 مغ/غ من المستخلص الجاف).

أما في حالة XS، فقد تميز المستخلص CrE بوجود مشتقات من الحمض caffeic بتراكيز (0.1 ± 2.07 مغ/غ من المستخلص) و (1.8 ± 36.7 مغ/غ من المستخلص) و (0.17 ± 3.43 مغ/غ من المستخلص) و مشتق من الحمض *p*-coumaric بتراكيز (0.02 ± 0.37 مغ/غ من المستخلص) و الحمض chlorogenic بتراكيز (± 14.0 مغ/غ من المستخلص) و مشتق من rutine بتراكيز (0.25 ± 4.95 مغ/غ من المستخلص) و (0.29 ± 5.87 مغ/غ من المستخلص).

حسب هذه النتائج، يغلب rutin في مشتقاته في التركيب الكيميائي لنبته HP ويغلب الحمض caffeic ومشتقاته في التركيب الكيميائي لنبته XS. حسب ما ورد في المراجع، تتميز كلا من النبتتين بوجود مركبات أخرى لم تكشف HPLC عنها.

تميزت مستخلصات HP بغناها بكل من عديدات الفينول والفلافونويدات مقارنة بمستخلصات XS. عند مقارنة نتائج اختبارات تقدير محتوى المستخلصات من عديدات الفينول الكلية والفلافونيدات، مع مستخلصات من مناطق أخرى من العالم يتضح وجود اختلافات قد تعود إلى عوامل مختلفة أهمها الموقع الجغرافي وطريقة تحضير المستخلص من مذهب ودرجة الحرارة أثناء الاستخلاص ومدة استخلاص (Sousa وآخرون، 2006؛ Tiwari وآخرون، 2011).

تم بعدها تقدير النشاط المضاد للأكسدة في الأنبوب لمختلف المستخلصات باستعمال عدة اختبارات؛ انحلال أغشية الكريات الحمراء واستخلاص الحديد والقدرة الإرجاعية وإزاحة جذور الهيدروكسيل والماء المؤكسج وايضا β -carotene وإزاحة كل من DPPH. تم اختيار هذه الاختبارات انطلاقا من كون مضادات الأكسدة تؤثر بآليات متعددة و أنه لا يمكن لآلية واحدة أن تجمع بين كل الآليات (Nur Alam وآخرون، 2013).

يمكن تقسيم مضادات الأكسدة حسب نوعية تأثيرها إلى (1) مضادات أكسدة أولية تتفاعل مع الجذور الليبيدية محولة إياها إلى نواتج أكثر استقرارا و(2) مضادات أكسدة ثانوية تعمل على إزاحة الجذور الحرة موقفة بذلك التفاعلات اللاحقة التي يمكن أن يتدخل فيها الجذر الحر (Moharram و Youssef، 2014).

تمثل ظاهرة فوق أكسدة الليبيدات أحد أسباب ظهور أمراض القلب والأوعية والسرطان. وتتم وفق سلسلة من تفاعلات الجذور الحرة، كما أنها تتدخل في عدد من الأضرار البيولوجية (Klotz و Kehr، 2015).

لاختبار فعالية المستخلصات تجاه فوق أكسدة الليبيدات؛ تم تطبيق اختبارين (1) انحلال كريات الدم الحمراء المحرض بـ AAPH و (2) اختبار بيتا-كروتين/الحمض لينولييك.

يعتمد الاختبار الأول على تحريض تخريب أغشية الكريات الحمراء بمركب AAPH الذي يتحول إلى جذور 2-amidinopropyl التي تتفاعل مع الأكسجين منتجة جذور بيروكسيل، تحفز هذه الأخيرة سلسلة أكسدة الليبيدات والبروتينات في أغشية الكريات الحمراء مخربة إياها (Sulaiman و Husein، 2012). أما الطريقة الثانية فتعتمد على أكسدة الحمض لينولييك وهو حمض دهني غير مشبع؛ منتجا جذورا حرة يمكنها مهاجمة البيتا-كروتين. تعمل مضادات الأكسدة على حماية البيتا-كروتين من الأكسدة بإبطال وتثبيط أكسدة الحمض لينولييك أو إزاحة جذور hydroperoxides الناتجة عن أكسدة الحمض لينولييك (Amamra وآخرون، 2015). عند متابعة حركية نشاط AAPH المحلل لكريات الدم الحمراء، أظهرت الكريات الحمراء المعاملة بمستخلصات النبتتين HP و XS مقاومة لهجوم لـ AAPH الجذري. تميز المستخلص ChE، مع كلا من HP و XS، بأعلى فعالية في حين تميز المستخلص AqE لكلا النبتتين بأضعف قيمة.

قد تعود فعالية المستخلصات إلى: (1) طبيعة المحتوى الفينولي (البنى الكيميائية لعديدات الفينول والفلافونويدات) و (2) مدى قدرة جزيئات الفلافونويدات على اختراق الكريات الحمراء وعبورها للطبقات الليبيدية للأغشية الخلوية (L'opez-Revuelta وآخرون، 2006). تحدد خصائص المضادات الأكسدة المحبة للدهون (مضادات الأكسدة غير القطبية) تفضيلها التموقع على سطح أوفي عمق الطبقات الليبيدية للأغشية الخلوية (Omarova و Antonenko، 2014). أظهر المستخلص ChE في كلا المستخلصين أعلى فعالية. من جانب آخر لم تلاحظ علاقة بين فعالية المستخلصات ومحتواها من عديدةات الفينول والفلافونويدات.

أما اختبار بيتا-كروتين/الحمض لينولييك، فقد أظهر أن مستخلصات HP تميزت بقدرة عالية على حماية الحمض لينولييك أعلاها مع EAE وأدناها مع AqE. في حالة مستخلصات XS، كان المستخلص CrE الأكثر قدرة على الحماية وسجلت أدنى فعالية مع المستخلص ChE. في هذا الاختبار، لم تلاحظ علاقة بين القدرة المضادة لأكسدة الليبيدات والمحتوى من الفلافونويدات وعديدةات الفينول.

عند المقارنة بين الاختبارين، أظهرت مستخلصات HP توافقا بين فعاليتها حسب اختبار انحلال كريات الدم الحمراء وتلك الخاصة باختبار بيتا-كروتين-الحمض لينولييك. في حالة مستخلصات XS، لم يلاحظ هذا التوافق.

يحول استخلاص الجزيئات المضادة للأوكسدة للأيونات المعدنية دون ظهور الجذور الأوكسجينية والتخريب الناتج عنها. تلعب القدرة على استخلاص المعادن دورا مهما في تخفيض تركيز المعادن المحفزة لأوكسدة الليبيدات (Sudha و آخرون، 2011).

بالنسبة لاختبار استخلاص الحديد، سجلت أقل قدرة مع مستخلص ChE لكلا النبتتين، أما أعلى فعالية فسجلت مع المستخلص AqE، في حالة النبتة HP، في حين أظهر مستخلص CrE في حالة النبتة XS أعلى قدرة على الاستخلاص. يبدو أن لقطبية المستخلصات، في حالة HP، علاقة مع نشاطها الاستخلاصي للحديد؛ إذ تميزت المستخلصات الأكثر قطبية بفعالية أعلى من تلك ضعيفة القطبية. تنطبق هذه الملاحظة في حالة مستخلصات XS ما عدا المستخلص CrE. توافق هذه النتائج ما أورده Sahreen و رفقاؤه (2010)، حيث أن المستخلصات النباتية تحفز تأثيرا استخلاصيا يتناسب طرديا مع قطبية مذيبتها.

لاختبار قدرة المستخلصات الإزاحية للجذور الحرة تم تطبيق الاختبارات التالية: القدرة الإرجاعية واختبارات إزاحة DPPH (جذر تركيبي) ومجاميع الهيدروكسيل وفوق أكسيد الهيدروجين (جذرين طبيعيين).

ترتبط القدرة الإرجاعية لمركب ما بقدرته على نقل الإلكترونات ويمكن أن تعتبر كمؤشر مهم لنشاطه المضاد للأوكسدة. تم حساب التركيز الفعال (EC_{50} : effective concentration) الذي يوافق امتصاصية بقيمة 0.5، وكلما كانت قيمة EC_{50} أقل دلت على قدرة إرجاعية للمستخلص أكبر. أرجعت كل المستخلصات Fe^{3+} إلى Fe^{2+} ، لكن بنسب متفاوتة. أظهر المستخلص EAE لكلا النبتتين أعلى فعالية، في حين تميز ChE أيضا لكلا النبتتين بأضعف قدرة على الإرجاع. في هذا الاختبار، لم يلاحظ توافق بين محتوى المستخلصات من عديدات الفينول والفلافونويدات وقدرتها الإرجاعية.

أظهرت نتائج اختبار إزاحة DPPH، أن مستخلصات HP تميزت بقدرة على الإزاحة أعلى مقارنة بمستخلصات XS. في حالة هذا الاختبار، لوحظ توافق بين قدرة المستخلصات على الإزاحة وغناها بعديدات الفينول والفلافونويدات.

تتميز جذور الهيدروكسيل بأنها أكثر الجذور الأوكسجينية الحرة نشاطا وفعالية، إذ بإمكانها أن تلحق أضرارا جسيمة بمجزيئات DNA والليبيدات والبروتينات (Sudha وآخرون، 2011). من جانب آخر لا توجد إنزيمات تسمح باستقلاب جذور الهيدروكسيل على غرار أنيون فوق الأوكسيد وبيروكسيد الهيدروجين (Dwyer وآخرون، 2009). نتيجة لذلك فإن إزاحة جذور الهيدروكسيل ضرورية لحماية الخلايا من التخريب.

أظهر اختبار إزاحة جذور الهيدروكسيل، أن كل المستخلصات تزيح هذا الأخير بفعالية. اختلفت النبتتان من حيث قدرة المستخلصات على الإزاحة. إذ أنه مع النبتة HP، أظهر المستخلص ChE أعلى فعالية في حين تميز المستخلص EAE بأضعف قدرة على الإزاحة. بينت النتائج أن قدرة المستخلصات على إزاحة جذور الهيدروكسيل ليست مرتبطة بغناها بالمركبات الفينولية والفلافونويدات لذا فقد تكون مرتبطة بنوع وبنية المركبات التي تدخل في تركيبها.

لا يتميز فوق أكسيد الهيدروجين في حد ذاته بفاعلية عالية، غير أنه قد يكون ساما للخلية. تسمح قدرته العالية على عبور الأغشية الخلوية إلى تشكيل جذور الهيدروكسيل عند تفاعله مع Fe^{2+} أو جذور أنيون فوق الأوكسيد في الخلايا (Pal و Nimse، 2015). وبالتالي فإن إزاحة هذا الجذر مهمة جدا كآلية مضادة للأكسدة في الخلايا (Keser وآخرون، 2012).

تميز EAE، في حالة HP، بأعلى فعالية، في حين تميز CrE بأضعف قدرة على الإزاحة. أما مستخلصات XS، فقد أظهرت قدرة أضعف على إزاحة فوق أكسيد الهيدروجين. في حالة مستخلصات HP، يبدو أن هناك ارتباط بين القدرة على إزاحة فوق أكسيد الهيدروجين والمحتوى من عديدات الفينول والفلافونويدات من جانب ومن جانب آخر يبدو أن المستخلصات غير القطبية (المستخلص ChE) تتميز بنشاطية عالية مقارنة مع تلك القطبية. قد يرجع ذلك إلى طبيعة التفاعل مع فوق أكسيد الهيدروجين.

عند المقارنة بين نتائج إزاحة الجذور DPPH والهيدروكسيل وفوق أكسيد الهيدروجين، لم يلاحظ تناسب بينها. اختلفت المستخلصات فيما بينها من حيث نشاطياتها المضادة للأكسدة. يرتبط نوع كل نشاط مضاد للأكسدة بقطبية المركبات ونوع ومواقع المجاميع المرتبطة بالمركبات التي تدخل في تركيب كل مستخلص (Russo، 2018).

قبل البدء في اختبار المستخلصين على الحيوانات، تم اختبار السمية الحادة لتحديد الجرعة القاتلة (LD_{50}). الهدف هو وصف الأعراض الناجمة عن هذا المستخلص من جهة ومن جهة أخرى تحديد LD_{50} . وقد تم إجراء هذا الاختبار وفقا للمبادئ التوجيهية 425 لمنظمة التعاون الاقتصادي (OECD). أظهرت نتائج هذا الاختبار أن

مستخلص HP الخام سام $LD_{50} = 1065.49$ مغ/كغ أما مستخلص XS فإن الجرعة القاتلة أعلى من 5 غ / كغ. بناءً على هذه النتائج، تم اختيار الجرعات 100 و 300 و 500 مغ/كغ بالنسبة لـ HP و الجرعات 200 و 400 و 600 مغ / كغ بالنسبة لـ XS.

بهدف اختبار تأثير المستخلصين الخام للنبتين على الفئران لمدة أطول ومتابعة التغيرات على مستوى الوزن و قدرة البلازما المضادة للأكسدة و نشاطية بعض الإنزيمات المضادة للأكسدة؛ تمت معاملة الفئران بالمستخلصين خلال 21 يوماً.

أثر مستخلص HP على أوزان الفئران إذ أدى إلى تناقص في هذه الخيرة خصوصاً مع الجرعة 500 مغ/كغ. أما مستخلص XS فقد نتج عن إعطائه للفئران زيادة في الوزن مقارنة مع المجموعة المعاملة فقط بالماء.

تعرف كريات الدم الحمراء على أنها هدف رئيسي للإجهاد التأكسدي نتيجة لغنى الأغشية بالأحماض الدهنية غير المشبعة كحمض لينولييك وحمض arachidonic (Nabavi وآخرون، 2012). لذا يعتبر تحلل كريات الدم الحمراء نموذجاً جيداً لدراسة التخریب التأكسدي الناتج عن الجذور الحرة على مستوى الأغشية (Zerargui و آخرون، 2016).

تحتوي البلازما على عدد من مضادات الأكسدة الداخلية (الألبومين و Bilirubine و الغلوتاثيون المرجع و حمض اليوريا) بالإضافة إلى مضادات أكسدة خارجية (الفيتامين E و الكاروتينويدات و عديدات الفينول) مصدرها الغذاء. تعمل مضادات الأكسدة بشكل تآزري للوصول إلى حماية أفضل من الجذور الحرة (Zerargui و آخرون، 2016).

أظهر اختبار قدرة البلازما الإزاحية لـ DPPH أن مستخلص HP لم يرفع من النشاطية المضادة للأكسدة على مستوى البلازما. أما مستخلص XS فقد كان فعالاً إذ أن التراكيز 200 مغ / كغ و 400 مغ / كغ و 600 مغ / كغ زادت النشاطية المضادة للأكسدة بشكل معتبر. بالنسبة لاختبار القدرة الإرجاعية للبلازما، رفع مستخلص XS من هذه القدرة أما مستخلص HP فقد خفضها. تبين من خلال اختباري قدرة البلازما الإزاحية لـ DPPH و قدرة البلازما الإرجاعية، أن هناك توافق بين نتائج المستخلصين إذ أن مستخلص XS كان أكثر فعالية من مستخلص HP.

يسمح ارتفاع نشاطيات الإنزيمات المضادة للأكسدة برفع مستوى مواجهة الأضرار الناجمة عن الجذور الحرة (Zhong و آخرون، 1999). يلعب إنزيم CAT وجزيئات الغلوتاثيون دوراً في تثبيط تشكل الجذور الحرة لذا

تستعمل عادة مع MDA (Malondiadehyde) كمؤشرات لمتابعة إنتاج الجذور الحرة (Durand و Beadeux، 2011).

بينت هذه الدراسة أن مستخلص HP القدرة على تخفيض نشاطية CAT في حالة أنسجة الكبد والكلبي من جهة، من جانب آخر لم يلاحظ اختلافا في التأثير بتغيير الجرعات. أما في حالة XS، فإن نشاطية catalase تزايدت بشكل متناسب مع الجرعات.

عموما، قد تعزى الزيادة في نشاطية إنزيم CAT إلى المحتوى المرتفع من الفينولات الكلية التي تؤثر على مستقبلاتها وبالتالي تحفز الزيادة في البناء الحيوي لإنزيم CAT (Vicente وآخرون، 2014). أما الانخفاض في النشاطية فقد يعود إلى ارتفاع تركيز الجذور الحرة، خصوصا فوق أكسيد الهيدروجين الذي يثبط إنزيم CAT (Sun وآخرون، 2007). قد يرجع الانخفاض في نشاطية إنزيم CAT ونشاطية بقية الإنزيمات المتدخلة في النشاط المضاد للأكسدة إلى التغييرات التي تحدثها الجذور الحرة على بنية البروتينات، التي ينتج عنها انخفاض في النشاطية (Celep وآخرون، 2013).

سجلت هذه الدراسة، مع مستخلص HP، انخفاضا في معدل MDA على مستوى الكبد أما على مستوى الكلبي فكان العكس إذ ارتفع معدل MDA، في حين لم يلاحظ تخفيض في معدل MDA في حالة مستخلص XS. تدل النتائج المحصل عليها في الكبد مع مستخلص HP، أن هذا الأخير قام بحماية خلايا الكبد من فوق الأكسدة الليدية. لم تؤثر التراكيز الثلاثة المختبرة لمستخلصي HP و XS على معدل الغلوتاثيون.

كان من المنتظر، حسب النتائج المحصل عليها في المخبر مع مستخلصات HP، أن إعطاء جرعات من المستخلص الخام لهذا الأخير سيعزز بشكل فعال القدرة المضادة للأكسدة للفئران، إلا أنه لوحظ العكس إذ تناقصت هذه القدرة على العموم. قد يعود ذلك إلى الجرعات المعطاة للفئران التي قد تكون مرتفعة بحيث أنها أثرت بشكل سلبي مؤيد للأكسدة.

يعتبر رباعي كلوريد الكربون من المركبات الكيميائية المستعملة في الصناعات كيميائية ويسبب تسمما على مستوى الكبد والكلبي. عند العمال المعرضين له أو لدى حيوانات المخبر (Khan وآخرون، 2010؛ Lin وآخرون، 2008). ينجم ضرر وسمية رباعي كلوريد الكربون عن تحوله إلى جذور حرة؛ تنتج هذه الأخيرة بتنشيط إنزيمات سيتوكروم P450 وبشكل أساسي إنزيم (CYP2E1) وبالتالي إنتاج، في مرحلة أولى، الجذر ثلاثي كلورو

ميثيل (CCl_3) الذي يعطي في وجود تراكيز عالية من الأوكسجين جذر بيروكسي ثلاثي كلورو ميثيل ($OOCCl_3$) الأكثر سمية وبالتالي البدء في أكسدة الليبيدات (Halliwell و Gutteridge، 2007) وألكلة Alkylation البروتينات الخلوية وجزئيات عملاقة أخرى (Yadav وآخرون، 2008). بالنسبة لأوزان الفئران، سجلت هذه الدراسة زيادة في الوزن في كل المجموعات خلال الأيام السبعة الأولى ثم تناقص بعد حقن رباعي كلوريد الكربون.

أدت معاملة الفئران بـ HP، في حالة الكبد، إلى تخفيض نشاطية إنزيم CAT بمعدل النصف مقارنة مع المجموعة الشاهد (المعاملة بالماء فقط). في حين لوحظت زيادة في النشاطية في حالة الكلى. سجلت، في حالة XS، وفي حالة الكبد، زيادة في النشاطية تتناسب مع الزيادة في الجرعات. من جانب آخر، لم يظهر مستخلص XS في الكلى نفس الفعالية التي كانت في الكبد.

لم تؤثر معاملة الفئران بـ HP، في حالة الكبد، على معدل MDA. أما في حالة الكلى، فقد لوحظ تناقص معتبر في معدل MDA. في حالة مستخلص XS، سجلت زيادة في معدل MDA في الكبد. أما في حالة الكلى، فقد لوحظ تناقص معتبر في معدل MDA.

أدت معاملة الفئران بـ HP، في حالة الكبد، إلى زيادة معدل الغلوتاثيون مقارنة مع المجموعة الشاهد (المعاملة بالماء فقط). أما في حالة الكلى، فقد لوحظ تناسب بين النشاطية والزيادة في الجرعات وزيادة معتبرة في معدل الغلوتاثيون. في حين أنه في حالة XS فقد سجلت الزيادة في معدل الغلوتاثيون في حالة الجرعة 200 مغ/كغ ثم تناقص المعدل مع الجرعة 600 مغ/كغ، نفس الملاحظة سجلت مع الكلى.

يمكن اعتبار بعض الإنزيمات (GOT و GPT) والفوسفاتاز القاعدي كمؤشرات على الأضرار اللاحقة بالكبد (Brandt و آخرون، 2009). تسبب المعاملة برباعي كلوريد الكربون زيادة معتبرة في معدل هذه الإنزيمات مما يشير إلى حدوث أكسدة على مستوى الكبد (Coballase-Urrutia وآخرون، 2017). ينتج عن حقن رباعي كلوريد الكربون استقلاب هذا الأخير إلى جذور حرة جد سامة تسبب فوق أكسدة الليبيدات، وبالتالي تخريب أغشية العضيات داخل خلايا الكبد وكذا الغشاء البلازمي، مسببة تورم وتنخر هذه الأخيرة من جهة و من جهة أخرى خروج إنزيمات مثل GOT و GPT إلى الدورة الدموية وبالتالي زيادة معدلها في المصل (Sahreen وآخرون، 2011).

سمحت معاملة الفئران بمستخلصي HP و XS بتخفيض معدل الإنزيمات ناقلة الأمين المصلية (GPT و GOT) والفوسفاتاز القاعدي و bilirubine بنسب متفاوتة.

التناقص في معدل هذه الإنزيمات و bilirubine، في المصل، نتيجة للمعاملة بمستخلصي HP و XS، مؤشر لاستقرار الغشاء البلازمي في خلايا الكبد وبالتالي حماية الكبد من الضرر الناتج عن رباعي كلوريد الكربون (Brair) وآخرون، 2014؛ Coballase-Urrutia وآخرون، 2017).

ينتج عن المعاملة برباعي كلوريد الكربون تنخر وتشحم على مستوى الكبد؛ ينتج هذا التشحم عن تراكم الكولسترول والجليسيريدات الثلاثية نتيجة لتعطيل نقل الشحوم من الكبد. ينجم ذلك عن اضطراب في عملية ربط الجليسيريدات الثلاثية بالبروتين الضروري لتكوين الجزيئات الحاملة للبيدات (Tiwari وآخرون، 2014).

سمحت معاملة الفئران بمستخلصي HP و XS بتخفيض معدل الجليسيريدات الثلاثية وزيادة معدل الكولسترول. تعد اليوريا والكرياتينين مؤشرات على القصور الكلوي لذا تقيم وظيفة الكلى بمتابعة معدلات اليوريا والكرياتينين. يتغير معدل هذين المؤشرين في حالة إلحاق ضرر بنفرونات الكلى (Radulović وآخرون، 2015). وهزال العضلات في حالة الكرياتينين (Ouachria وآخرون، 2017).

سمحت معاملة الفئران بمستخلصي HP و XS بتخفيض معدل كل من اليوريا والكرياتينين. قد يدل ذلك على حماية المستخلصين لخلايا الكلى من الضرر الناتج عن رباعي كلوريد الكربون.

يمكن رفع فعالية المستخلصين بالأخذ بعين الاعتبار عدة عوامل: (1) مراجعة الجرعات المعطاة للفئران؛ (2) تخفيض جرعة رباعي كلوريد الكربون (2 مل/كغ) و (3) تمديد فترة معاملة الفئران بالمستخلصين إذ أن 6 أيام قد لا تسمح الجرعات المطبقة برفع مستوى الدفاع المضاد للأكسدة. ذكر Singh وآخرون (2014) أن التراكيز 5 مغ/كغ و 10 مغ/كغ و 20 مغ/كغ من جزيئة plumieride المستخلصة من *Plumeria bicolor* سمحت بتحسين معدل التأثير المضاد للأكسدة و كذا المؤشرات البيوكيميائية بعد 30 يوماً.

تكاثفت الدراسات بهدف البحث عن مضادات للالتهاب ضمن النباتات الطبية. قد توفر هذه الأخيرة جزيئات لها القدرة على تثبيط أو تخفيض الالتهاب. لأجل هذا تم اختبار النشاطية المضادة للالتهاب المحفز ب xylene وزيت croton و carrageenan.

الوذمة المحرصة بـ xylene عند الفئران، نموذج للالتهاب الحاد، إذ يسبب xylene توسعا في الأوعية الأوعية و تغيرات على مستوى الجلد (Kim و آخرون، 2007). يستعمل xylene لتقييم تأثير مضادات الالتهاب الستيرويدية و كذا غير الستيرويدية خصوصا تلك المثبطة لـ phospholipase A2 (Agbaje و Fageyinbo، 2012؛ Ishola و آخرون، 2014). يؤثر xylene على الأعصاب الحسية التي تفرز المادة P والببتيد المرتبط بجين calcitonin؛ يسمح هذا بتراكم السوائل وظهور الوذمة (Nasri وآخرون، 2017). المادة P بببتيد واسع الانتشار في الجهاز العصبي المركزي والمحيطي ويعمل كناقل عصبي ومنظم أو معدل عصبي في العديد من الحالات الفيزيولوجية (O'Connor وآخرون، 2004).

في حالة مستخلص HP، سمح هذا الأخير بتخفيض معدل الوذمة بنسبة معتبرة توافق 87.27 ± 0.008 % في حالة التركيز 100 مغ/كغ، قاربت هذه النسبة تلك الملاحظة مع الأسبيرين (89.09 ± 0.004 %) المستعمل كمضاد إتهاب مرجعي. أما في حالة مستخلص XS، فقد سمح هذا الأخير بتخفيض معدل الوذمة بنسبة أيضا معتبرة توافق 74.54 ± 0.002 % في حالة التركيز 600 مغ/كغ. مع كلا المستخلصين، كان التثبيط مرتبطا بالجرعة. قد يرجع تأثير المستخلصين إلى تثبيط إفراز المادة P أو تثبيط تأثيرها.

الوذمة المحرصة بزيت croton عند الفئران، نموذج آخر للالتهاب الحاد، إذ يستعمل زيت croton لتقييم تأثير مضادات الالتهاب. يحتوي زيت croton على إسترات phorbol، أهمها 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA). يحرض هذا الأخير تفاعلا التهابيا حادا يتميز بتوسع الأوعية الدموية وارتشاح أو اختراق الخلايا البيضاء متعددة النوى للأنسجة وزيادة الأنترلوكين 1 β وبالتالي تشكل الوذمة. من جانب آخر ينتج عن هذا الزيت ارتفاع في كلا من نشاطية إنزيم xanthine oxydase و فوق الأكسدة الليبيدية (Otuki وآخرون، 2005؛ Rahman و آخرون، 2011). تنجم هذه التغيرات عن البروتين كيناز C (PKC) التي تحفز ارتفاع نشاطية phospholipase A2 (PLA2) (Wang وآخرون، 2002). تحفز PLA2 إماهة الفوسفوليبيدات الغشائية إلى الحمض arachidonic، يتدخل هذا الأخير في بناء eicosanoids ؛ prostaglandins و leucotrienes، تمثل هذه المرحلة الخطوة الأولى في التفاعل الالتهابي (Sato و آخرون، 2009). من جانب آخر، تحفز PKC إفراز وتنشيط عدة وسائط مناعية مثل السيتوكينات والكيموكينات التي ترفع الاستجابة الالتهابية على مستوى الجلد (Denning، 2004).

في حالة مستخلص HP، سمح هذا الأخير بتخفيض معدل الوذمة بنسبة توافق 56.66 ± 10.05 % في حالة التركيز 100 مغ/كغ، تقارب هذه النسبة تلك الملاحظة مع indometacine (48.00 ± 4.29 %) المستعمل كمضاد التهاب مرجعي. أما في حالة مستخلص XS، فقد سمح هذا الأخير بتخفيض معدل الوذمة بنسبة توافق 50.66 ± 11.32 % في حالة التركيز 400 مغ/كغ.

يمكن أن يرجع تأثير المستخلصين إلى (1) نشاطهما المضاد للأكسدة القوي، إذ أن معاملة الجلد بمواد محرضة لـ PKC تحفز تشكل الجذور الحرة. (2) قد تعمل مباشرة على تثبيط أو تخفيض نشاط PKC وبالتالي إيقاف سلسلة التفاعلات الالتهابية و تشكل الجذور الحرة (Garrido و آخرون، 2004). من جانب آخر، قد يفسر محتوى المستخلصين من الفلافونويدات (خاصة في حالة HP) التأثير المضاد للالتهاب الملاحظ معهما.

تخضع الوذمة بـ carrageenan كنموذج تجريبي للالتهاب الحاد عند الجرذان. يتم قياس الوذمة خلال 6 ساعات، يعتقد أن التفاعل الالتهابي الناجم عن carrageenan يمر بمراحلتين؛ يتم في المرحلة الأولى (1-2 سا) إفراز histamine و serotonin أما خلال المرحلة الثانية (2-6 سا) فيتم إفراز prostaglandins و bradykinin و leukotrienes، يتم إنتاج هذين الأخيرين من طرف الخلايا البالعة (Mohan و Agnel Ruba، 2016). سمح إعطاء جرعات من مستخلص HP بتخفيض سمك الوذمة مقارنة مع الشاهد السالب خلال فترة الاختبار. نفس الملاحظة كانت مع XS إلا أن تخفيض سمك الوذمة استمر حتى الساعة الخامسة ثم زاد السمك إلى نفس مستوى المجموعة الشاهد.

من جانب آخر، سمح مستخلص HP بتثبيط الوذمة ($34.34 - 27.69$ %) خلال المرحلة الأولى (1-2 سا)، قد يوحي هذا بأن هذا المستخلص يمكنه تثبيط تأثير histamine و serotonin. أما خلال المرحلة الثانية (2-6 سا)، فقد وصلت نسبة التثبيط إلى أوجها 39.96 ± 2.31 % عند الساعة الثالثة؛ قد يدل هذا على قدرة المستخلص على تثبيط prostaglandins و bradykinin و leukotrienes. أما في حالة مستخلص XS، فقد سمح هذا الأخير بتثبيط الوذمة لكن بفعالية أقل من HP.

وردت نشاطية الفلافونويدات المضادة للالتهاب في العديد من البحوث. وذكّر أن غليكوزيدات الفلافون والفلافونول وكذا الفلافونويدات غير السكرية تملك قدرة مضادة للالتهاب معتبرة في حالة الالتهاب الحاد أو المزمن عند إعطائها عن طريق الفم أو بتطبيقها موضعياً. من بين هذه الفلافونويدات، apigenin و luteolin

وquercetin و kaempferol و myricetin و fisetin. تؤثر هذه الأخيرة على الالتهاب بتثيبتها لاستقلاب الحمض arachidonic أو بتثيبتها لنشاط إنزيمات cyclo-oxygenase و lipoxygenase (Tapas وآخرون، 2008).

من جانب آخر، عند اختبار عديدات الفينول في الحي *in vivo* يتدخل عامل آخر في مدى تأثيرها، معدل امتصاصها على مستوى الجهاز الهضمي ثم التغيرات التي تتعرض لها بعد الامتصاص. تتواجد عديدات الفينول في النباتات بشكل غير مرتبط بالسكريات و عديدات الفينول سكرية و إسترات و مكاثير polymers. يمكن امتصاص عديدات الفينول غير سكرية على مستوى المعى الدقيق، في حين يتم إماهة عديدات الفينول سكرية و إسترات و المكاثير من طرف إنزيمات معوية أو microflora معوية قبل امتصاصها (Sanda وآخرون، 2012).

يتضح من خلال النتائج المحصل عليها أن كل من نبتة *Xanthium strumarium* و *Hypericum perforatum* تملك نشاطية مضادة للأكسدة في الأنوب الحي، كما أنها تملك نشاطية مضادة للالتهاب.

قائمة المراجع

- Abu Sitta K, Shomah MS, and Salhab AS. 2009. Hepatotoxicity of *Teucrium polium* L. tea: supporting evidence in mice models. *Australian Journal of Medical Herbalism* 21(4): 106-107.
- Agbaje E O., and Fageyinbo M S. (2012). Evaluating anti-inflammatory activity of aqueous root extract of *Strophanthus hispidus* DC. (Apocynaceae). *Intern J Appl Res in Nat Products*, 4(4):7-14.
- Ahamd A., Kaleem M., Ahmed Z., and Shafiq H. (2015). Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infection – A review. *Food res Intern.*, 77; 221-235.
- Al-Qudah MA, Muhaidat R, Alomary AA, Malkawi EH, Al-Jaber HI, Trawenh IN, Abu Zarga M. H, and Abu Orabi ST. Antimicrobial activity o the essential oil and crude extracts of *Sedum Microcarpum* (Sm.) schönl growing wild in Jordan. *Phcog J.* 2012; 4(33): 1-6.
- Alvaro A., Benedetti A., Luca Marucci L., Delle Monache M., Monterubbiansi R., Di Cosimo E., Perego L., Macarri G., Glaser S., Le Sage G., and Alpini G.(2000). The Function of Alkaline Phosphatase in the Liver: Regulation of Intrahepatic Biliary Epithelium Secretary Activities in the Rat. *Hepathology* , 32(2) : 174-184.
- Amamra S., Charef N., Samia Mezaache S., Oum Elkheir Belhaddadi O E., Zerroug M M., , Hayet Trabsa H., Baghiani A., Khenouf S., and Arrar L. (2015). Fractionation, antioxidant and antibacterial activities of methanol and petroleum ether extracts of *Fraxinus excelsior* Wulfenia J., 22(7): 303-316.
- Aman S., Moin S., Owais M., and Siddiqui M. U. (2013). Antioxidant activity of thymol : protective role in AAPH-induced hemolysis in diabetic erythrocytes. *Intern J Pharmaceu Sci Invention*, 2(31) : 55-60.
- Amić D., Davidović- Amić D., Bešlo D., Trinajstić N. (2003). Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids. *Croit Chem Acta.*, 76 (1) : 55-61.
- Asgarpanah J. (2012). Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Hypericum perforatum* L. *Afr J Pharm Pharmacol.*, 6 (19) :1387-1394.
- Ates B., Linu A., and Ercal N. (2008). Antioxidant and free radical scavenging properties of N-acetylcysteine amide (NACA) and comparison with N-acetylcysteine (NAC). *Free Radical Res.*, 42(4) : 372-377.
- Avila-Nava A, Calderón-Oliver M, Medina-Campos O N, Zou T, Gu L, Torres N, Tovar A R, and Pedraza-Chaverri J. Extract of cactus (*Opuntia ficus indica*) cladodes scavenges reactive oxygen species *in vitro* and enhances plasma antioxidant capacity in humans. *J funct foods* 2014; 10: 13–24.
- Baghiani A., Boussoualim N., Trabsa H., Aouachria S., and Arrar L. (2013). *In vivo* free radical scavenging, Antihemolytic activity and antibacterial effects of *Anchusa Azurea* extracts. *Int. J. Med. Med. Sci.* 46, 1113–1118.

Bala A and Haldar PK. Free radical biology in cellular inflammation related to rheumatoid arthritis. *Cellular and Molecular Mechanisms*; 1-6, 2013.

Baldisserotto A., Vertuani S., Bino A., Lucia D.D., Lampronti I., Milani R., Gambari R., and Manfredini S., (2014). Design, Synthesis and Biological Activity of a Novel Rutin Analogue with Improved Lipid Soluble Properties. *Bioorg Medic Chem.*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2014.10.023>

Banjarnahor S. D. S., and Artanti N. (2014). Antioxidant properties of flavonoids. *Med J Indones*, 23(4) : 239-244.

Bansal A. K., and Bilaspuri G.S. (2011). Impact of oxidative stress and antioxidants on semen Functions. *Veter Med Intern.*, 2011 :1-7.

Barnes J., Anderson L.A., and Phillipson J.D. (2001). St john's wort (*Hypericum pefroratum* L.) : a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *J Pharm Pharmacol.*, 53 :583-600.

Barnes P. J. (2006). Corticosteroids : The drugs to beat. *Europ J Pharmacol.*, 533 :2-14.

Bentahar A, Khennouf S, Bouaziz A, Baghiani A, Dahamna S, Amira S, and Arrar L. Polyphenols content and antioxidant activities of selected Algerian plants used for gastro-duodenal ulcers. *Der Pharma Chemica*. 2016;8(12):88-99.

Bjelakovic G., Nikolova D., Simonetti R. G. and Gluud C. (2008) Systematic review: primary and secondary prevention of gastrointestinal cancers with antioxidant supplements. *Aliment Pharmacol Therap.*, 28(6), 689-703.

Blain H., Jouzeau JY., Netter P., Jeandel C. (2000). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase 2. Intérêt et perspectives *Rev Méd Interne* ; 21 : 978-88

Bonarska-Kujawa D, Pruchnik H, Oszmian´ski J, Sarapuk J, and Kleszczyn´ska H. (2011). Changes caused by fruit extracts in the lipid phase of biological and model membranes. *Food Biophys*, 6: 58–67.

Bouaziz A., Khennouf S., Abdalla S., Djidel S., Abu Zarga M., Bentahar A., Dahamna S., Baghiani A., and Amira S. (2014). Phytochemical Analysis, Antioxidant Activity And Hypotensive Effect Of Algerian Azarole (*Crataegus azarolus* L.) Leaves Extracts. *Res J Pharmaceu, Biolog Chemical Sci.*, 5(2) : 286-305.

Bouaziz A., khennouf S., Abu zarga M., Abdalla S., Baghiani A., and Charef N. (2015) Phytochemical analysis, hypotensive effect and antioxidant properties of *Myrtus communis* L. growing in Algeria. *Asian Pac J Trop Biomed*; 5(1): 19-28

Bouaziz A, Khennouf S, Djidel S, Baghiani A, Dahamna S, Amira S, and Arrar L. (2016). Effects of methanolique extract of *Crataegus azarolus* L. on plasma antioxidant capacity and biomarkers of oxidative stress in Liver and kidney of rats. *Internat J Pharmacogn Res.*, ;8(6): 968-976.

- Bouriche H, Kada S, Assaf AM, Senator A, Gul F, and Dimertas I, (2016). Phytochemical screening and anti-inflammatory properties of Algerian *Hertia cheirifolia* methanol extract. *Pharm Biol*, 54, 2584 - 2590.
- Boussoualim N., Krache I., Baghiani A., Trabsa H., Aouachria S., and Arrar L. (2016). Human Xanthine Oxidase Inhibitory Effect, Antioxidant *In Vivo* of Algerian Extracts (*Globularia alypum* L.) *Intern J of Pharmacog Phytochem Res.* , 8(4) : 645-650.
- Brai B I C., Adisa R A., and Odetola A A. (2014). Hepatoprotective properties of aqueous leaf extract of *Persea americana*, Mill (Lauraceae) 'Avocado' against CCl₄ induced damage in rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* (2014) 11(2):237-244.
- Brandstätter H., Samer C. F., Ribi C., and Piguet V. (2010). Reactions d'hypersensibilité Immédites aux anti-inflammatoires non stéroïdiens : allergie ou pseudo-allergie. *Rev Med Suisse*, 6 :1345-1350.
- Brandt, A.P., Oliveira, L.F.S., Fernandes, F.B., and Alba, J., 2009. Evaluation of prospective hypocholesterolemic effect and preliminary toxicology of crude extract and decoction from *Vitex megapotamica* (Spreng) Moldenke (V. montevidensis Cham.) in vivo. *Rev. Bras. De. Farmacogn.* 19, 388–393.
- Bubols G.B., Vianna Dda V., Medina-Reimon A., von Poser G., Lamuela-Raventos R. M., Eifler-Lima V. L., *et al.*, (2013). The antioxidant activity of coumarins and flavonoids. *Mini Rev Med Chem.*, 13(3) :318-334.
- Burits, M., Bucar, F. 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother Res.*, 14: 323-328.
- Butler J., and Hoey B. M. (1993). The one-electron potential of several substrates can be related to their reduction rates by cytochrome-P-450 reductase. *Biochim Biophys Acta* , 1161 :73-78.
- Casas-Grajales S., and Muriel, P. (2015). Antioxidants in liver health. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* , 6(3) :59-72.
- Celep E., Aydın A., Kırmızıbekmez H., Yesilada E. (2013). Appraisal of *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity potential of cornelian cherry leaves. *Food Chem Toxicol.*, 62 : 448–455.
- Chang W. S., Lee Y. J., Lu F. J., and Chiang H. C. (1993). Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer res.*, 13 :2165-2170.
- Coballase-Urrutia E., Cárdenas-Rodríguez N., González-García M C., Núñez-Ramírez E., Floriano-Sánchez E., González-Trujano M E., Fernández-Rojas B., Pedraza-Chaverri J., Montesinos-Correa H., Rivera-Espinosa L., Sampieri A., and Carmona-Aparicio L. (2017). Biochemical and molecular modulation of CCl₄-induced peripheral and central damage by *Tilia americana* var. *mexicana* extracts. *Saudi Pharmac J.* , 25 : 319–331.

Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J.P., Cimanga K., Van Poel B., *et al.*, (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod.*, 61 :71-76.

Crete P. (1955), Recherches embryologiques sur le *Xanthium strumarium* L. Les affinités du groupe des Ambrosia, pages 293- 296 - Départ./Région : , Bulletin de la Société Botanique de France, 4, Tome 102 - Fascicule 7-8.

Coutinho A. E., and Chapman K. E. (2011). The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and Cellular endocrinology*, 335 : 2-13.

DA Cunha F. M., Duma D., Assreuy J., Buzzi F C., Niero R., Campos M M., and Calixto J B. (2004). Caffeic Acid Derivatives: *In Vitro* and *In Vivo* Anti-inflammatory Properties. *Free Rad Res.*, 38 (11) : 1241–1253.

Das Sarma A., Mallick A., and Ghosh A. K. (2010). Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions: An Overview. *Intern J Pharma Sci Res.*, 1(3) : 185-192.

Delmas-Beauvieux M-C., Combeb C., Peuchanta E., M-A., Liliane Dubourga C., De Précigoutb V., Apariciob M., and Clerca M. (1995). Evaluation of Red Blood Cell Lipoperoxidation in Hemodialysed Patients during Erythropoietin Therapy Supplemented or Not with Iron Nephron. 69 : 404-410

Dehmlow C., Erhard J., and De Groot H. (1996). Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. *Hepatology*, 23 :749-754.

Devasagayam T. P. A., Tilak J.C., Boloor K.K., Sane K. S., Ghaskadbi S. S., and Lele R. D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health : current status and future prospects. *JAPI.*, 52 : 794-804.

Djidel S., Khennouf S., Ameni D., Baghiani A., Arrar L., and Charef N. (2013). Antioxidant properties of *Pistacia lentiscus* L. leaves extracts. *Pharmacognosy Communications*, 3(2) : 28-34.

Dong C., Davis R. J., and Flavell R.A. (2002). MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol.*, 20 : 55-72.

Durga M., Nathiya S., and Devasena .T. (2014). Immunomodulatory and antioxidant actions of dietary flavonoids. *Int J Pharm Pharm Sci*, 6, Issue 2, 50-56.

Dwyer D.J., Kolanski M. A., and Collins J. J. (2009). Role of reactive oxygen species in antibiotic-mediated cell death. *Cell*, 135 : m679-690.

Dröge W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* 82 : 47–95.

Gioti EM., Yiannis C. Fiamegos YC., Skalkos DC., and Stalikas C D. (2009). Antioxidant activity and bioactive components of the aerial parts of *Hypericum perforatum* L. from Epirus, Greece. *Food Chemistry*, 117 : 398–404.

- Faure S. (2009). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens. Actualités pharmaceutiques n° 489.
- Fathi H., and Ebrahimzadeh M A. (2013). Antioxidant and free radical scavenging activities of *Hypericum perforatum* L. (st. John's wort). *Int. J. Forest, Soil and Erosion*, 3(2) : 68-72
- Favier A. (2003). Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *l'actualité chimique*, 108-115.
- Favier L.S., María A. O. M., Wendel G. H., Borkowski E. J., Giordano O.S., Pelzer L., and Tonn C.E. (2005). Anti-ulcerogenic activity of xanthanolide sesquiterpenes from *Xanthium cavanillesii* in rats. *J. Ethnopharmacol.*, 100 : 260-267.
- Fostis T., Pepper, M. S., Aktas E., *et al.*, (1997). Flavonoids , Dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res.*, 57 :2916-2921.
- Galano A. (2015). Free Radicals Induced Oxidative Stress at a Molecular Level: The Current Status, Challenges and Perspectives of Computational Chemistry Based Protocols , *J. Mex. Chem. Soc.*, 59(4) : 231-262
- Garrido G., González D., Lemus Y., García D., Lodeiro L., Quintero G., Delporte C., Núñez-Sellés A. J., Delgado R. (2004). *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extra . [Pharmacol Res.](#), 50(2) : 143-149.
- Giampieri F., Forbes-Hernandez T. Y., Gasparri M., Alvarez-Suarez J. M., Afrin S., Bompadre S., Quiles J. L., Mezzetti B., Battino M. (2015) . Strawberry as a health promoter : an evidence based review. *Food Funct.*, 6(5):1386-98
- Gnanadesigan M, Ravikumar S, Anand M, (2016). Hepatoprotective activity of *Ceriops decandra* (Griff.) Ding Hou mangrove plant against CCl₄ induced liver damage. *J Taibah Univ Sci*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtusci.2016.07.004>
- Gornall A, Charles G, Bardawill J, Maxima MD. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of Biological Chemical*. 177 : 751-766.
- Gülçin I, Huyut Z, Elmastaş M, Aboul-Enein HY. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*.;3:43-53.
- Gülçin I, Küfrevioğlu ÖI, Oktay M, Büyükkuroğlu ME. (2004). Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *J. Ethnopharmacol.*, 90 : 205-215.
- Gutowski M., and Kowalczyk S. (2013). A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance *Biochimica Polonica*, 60 (1) : 1–16.
- Haleng J., Pincemail J., Defraigne J. O., Charlier C., J.P. Chapelle J.P. (2007). Le stress oxydant. *Rev Med Liege* , 62 : 10 : 628-638.
- Halliwell B, (2001). Role of free radicals in neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drug Aging*, 18, 685-716.

- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. (2007). Cellular responses to oxidative stress : adaptation, damage, repair, senescence and death. In : Free Rad Biol Med. Oxford : Oxford University Press Inc., p. 187-267.
- Hegarty V. M., May H. M., and Khaw K. T. (2000). Tea drinking and bone mineral density in older women. *Am J Clin Nutr.*, 71 :1003-1007.
- Heijnen C.G., Haenen G. R., van Acker F A., van der Vijgh W. J., and Bast A. (2001). Flavonoids as peroxynitrite scavengers : the role of the hydroxyl groups. *Toxicol in vitro*, 15(1) :3-6.
- Hena, Tiwari P, Srivastava M, Ghoshal S, (2016). Hepatoprotective and histopathological Activity of Ethanol and Aqueous extracts of stem of *Aloe vera* Linn (Ghee gangwar) against paracetamol-induced liver damage in rats. *Int J Pharm Biol Sci*, 1, 1 - 7.
- Hertag M. G., Feskens E. J., Hallman P.C., Katan M.B., and Kromhout D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease : the Zutphen elderly study, *Lancet* 342 :1007-1011.
- Hif C. S., and Howell S. L. (1985). Effects of flavonoids on insulin secretion and $^{45}\text{Ca}^{+2}$ handling in rat islets of Langerhans. *J Endocrinol.*, 107 :107-108.
- Hussain T., Tan B., Yin Y., Blachier F., Tossou M. C. B., and Rahu N. (2016). Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016 : 1-9.
- Igbe I., Ching F. P., and Eromon A. (2010). Anti-inflammatory activity of aqueous fruit pulp extract of *Hunteria umbellata* K. Schum in acute and chronic inflammation. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 67(1) : 81-85.
- Ishola I. O., Awodele O., Olusayero A. M., Ochieng C. O. (2014). Mechanisms of analgesic and anti-inflammatory properties of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) fruit extract in rodents. *J Med Food*. 17(12):1-8.
- Izzo A. A., Carb G. D., Mascolo N., Capasso F., and Autore G. (1994). Effect of quercetin on gastrointestinal tract. *Phyto Ther res.*, 8 :179-185.
- Janeway C. A., Travers P., Walport M., and Shlomchik M. J. (2003). Immunobiologie. Le système immunitaire fondamental et pathologique. 2^{ème} Edition, De Boeck Bruxelles p. 42
- Jayanthi, P., And Lalitha, P. (2011). Reducing power of the solvents extracts of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3, Suppl 3,
- Kabel AM. Free radicals and antioxidants: role of enzymes and nutrition. *World Journal of Nutrition and Health*. 2014;2(3): 35-38.
- Kamboj A., and Saluja A. K. (2010). Phytopharmacological review of *Xanthium strumarium* L. (Cocklebur). *International Journal of Green Pharmacy*, 2010:129-139.
- Kamisan F. H., Yahya F., Ismail N. A., Shamsah Din S., Mamat S. S., Zabidi Z., Wan Zainulddin W. N., Mohtarrudin N., Husain H., Ahmad Z., and Zakaria Z. A. (2013)

Hepatoprotective Activity of Methanol Extract of *Melastoma malabathricum* Leaf in Rats J Acupunct Meridian Stud, 6(1):52-55.

Kardum N, Takic' M, Šavikin K, Zec M, Zdunic' G, Spasic' S, and Konic'-Ristic' A. Effects of polyphenol-rich chokeberry juice on cellular antioxidant enzymes and membrane lipid status in healthy women. J funct foods 2014; 9: 89–97.

Markowicz Bastos DH., Saldanha LA., Catharino RR., Sawaya ACHF., Cunha IBS., Carvalho PO., and Eberlin MN. (2007) Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. Molecules, vol 12, pages 423-432.

Kale I., Khan MA., Irfan Y., and Goud V. (2012). Hepatoprotective potential of ethanolic and aqueous extract of flowers of *Sesbania grandiflora* (Linn) induced by CCl₄. Asian Pac J Trop Biomed, 2, S670 – S679.

Kartal N., Sokmen M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., and Sokmen A. (2007) Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. Food Chem., 100: 584–589.

Kehrer J. P., and Klotz L-O. (2015). Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease : implications for health. Crit Rev Tox., 45(9):765-798.

Keser, S., Celik, S., Turkoglu, S., Yilmaz, Ö. And Turkoglu, I. (2012). Hydrogen peroxide radical scavenging and total antioxidant activity of Hathworn. Chem J., 2(1) : 9-12.

Khan I, Yousif A M, Johnson S K, and Gamlath S. (2014). Acute effect of sorghum flour-containing pasta on plasma total polyphenols, antioxidant capacity and oxidative stress markers in healthy subjects: A randomised controlled trial. Clin Nutr. (In press) doi: 10.1016/j.clnu..08.005.

Khan M R., and Zehra H. (2013). Amelioration of CCl₄-induced nephrotoxicity by *Oxalis corniculata* in rat. Experimental and Toxicologic Pathology, 65: 327-334.

Khan R A., Khan M R., and Sahreen S. (2010). Evaluation of *Launaea procumbens* use in renal disorders : a rat model. J Ethnopharm., 128 :452-461.

Khan R A., Khan M R., Sahreen S., and Bokhari J. (2010) Prevention of CCl₄-induced nephrotoxicity with *Sonchus asper* in rat Food and Chemical Toxicology 48 2469–2476.

Kim HD., Cho HR., Moon SB., Shin HD., Yang KJ., Park BR., Jang HJ., Kim LS., Lee HS., and Ku SK. (2007). Effects of beta-glucan from *Aureobasidium pullulans* on acute inflammation in mice. Archives of Pharmacal Research 30: 323–328.

Kim H P., Kun H. S., Chang H.W., and Kang S. S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. J Pharmacol Sci., 96 :229-245.

Kou J., Ni Y., Li N., Wang J., Liu L., and Jiang Z-H. (2005). Analgesic and Anti-inflammatory Activities of Total Extract and Individual Fractions of Chinese Medicinal Ants *Polyrhachis lamellidens*. *Biol. Pharm. Bull.* 28(1) 176-180.

Landis GN., and Tower J (2005). Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech Ageing Dev.* 126 : 365–79.

Lattanzio V. (2013). Phenolic compounds : Introduction. *Natural Products*. DOI 10.1007/978-3-642-22144-6_57.

Le K., Chiu F., Ng K. (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, 105: 353–363.

Lévy P., Fanello S., Pivette J., Parot-Schinkel E., Le Grand G., Schoux JB., Le Bodo P. (2005). Anti-inflammatoires non stéroïdiens et risques iatrogènes potentiels :analyse des données de l'Assurance maladie. *Revue Médicale de l'Assurance Maladie* 36 n° 2 : 153-161.

Li H., Tsao R., and Deng Z. (2012). Factors affecting the antioxidant potential and health benefits of plant foods. *Can J Plant Sci.*, 92 :1101-1111.

Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F. and Jiang Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry* 102: 771-776.

Li W. D., Wu Y., Zhang L., Yan L.G., Yin F. Z., Ruan J. S., Chen Z. P., Yang G. M., Yan C.P., Zhao D., Lu Y., and Cai B. C.(2013) . Characterization of xanthatin : anticancer properties and mechanisms of inhibition murine melanoma *in vitro* and *in vivo*. *Phytomedicine* , 20 :865-873.

Lin H. M., Tseng H. C., Wang C. J. Lin J. J., Lo C. W., Chou F. P. (2008). Hepatoprotective effects of *Solanum nigrum* Linn extract against CCl₄-induced oxidative damage in rats. *Chemico-Biological Interactions* 171 : 283-293.

L'opez-Revuelta A., José I. Sánchez-Gallego J I., Hernández-Hernández A., Jesús Sánchez-Yagüe J., Marcial Llanillo M. (2006). Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress *Chemico-Biolog Interac.*, 161 : 79–91.

Ma Y-T., Huang M-C., Hsu F-L., and Chang H-F. (1998). Thiazinedione from *Xanthium strumarium*. *Phytochem.*, 48(6) :1083-1085.

Malik M. S., Sangwan N. K., and Dhindsa K.S. (1993). Xanthanolides from *Xanthium strumarium*. *Phytochem.*, 32(1) : 206-207.

Mavar Mangaa H., Brkic D., Marie D. E. P., and Quetin-Leclercq J. (2004). *In vivo* anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae). *J Ethnopharm.* 92 : 209–214.

Markham KR. Techniques of flavonoid identification. Academic Press. London. 1982; 133.

- Marinova E. M., Toneva A., and Yanishlieva N. (2009). Comparison of the antioxidative properties of caffeic and chlorogenic acids. *Food Chemistry* 114 :1498–1502.
- Moharram H A., and Youssef M M. (2014). Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. *Alex J Fd Sci Technol.*, 11(1) : 31-42.
- Nabavi S. M., Nabavi S. F., Eslami S., and Moghaddam A. H. (2012). In vivo protective effects of quecetin against sodium fluoride-induced oxidative stress in the hepatic tissue. *Food Chem.*, 132 :931-935.
- Nakayama S, Kishimoto Y, Saita Y, Sugihara N, Toyozaki M, Taguchi C, Tani M, Kamiya T, and Kondo K. (2015). Pine bark extract prevents low-density lipoprotein oxidation and regulates monocytic expression of antioxidant enzymes. *Nutr Res*; 35(1):56-64.
- Nasri M., Bedjou F., Porras D., Martinez-Florez S. (2017). Antioxidant, anti-inflammatory, and analgesic activities of *Citrus reticulata* blanco leaves extracts : an *in vitro* and *in vivo* study.
- Nathan C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, 420 :846-852.
- Nimse SB, and Pal D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Royal Society of Chemistry.*, 5:27986-28006.
- Nijveldt RJ., Van Nood E. , Van Hoorn DEC., Boelens PG., Van Norren K., and Van Leeuwen PAM. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* , 74:418–25.
- Nur Alam Md., Jahan Bristi N., and Rafiquzzaman Md. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21 :143-152.
- O'Connor T. M., O'Connell J., O'Brien D. I., Goode T., Bredin C. P., Shanahan F. (2004). The role of substance P in inflammatory disease. *J Cellular Physiology*, 201 :167-180.
- Oduola T, Adeniyi F, Ogunyemi E, Bello I.S, Idowu T, Subair H. 2007. Toxicity studies on an unripe *Carica papaya* aqueous extract: biochemical and haematological effects in wistar albino rats. *Journal of Medicinal Plants Research* 1(1): 001-004.
- OECD. Guidelines for the testing of chemicals. Acute oral toxic. – *Proced.* 2008;425:27.
- Omarova E. O., and Antonenko Y. N. (2014). Inhibition of oxidative hemolysis in erythrocytes by mitochondria-targeted antioxidants of SkQ series. *Biochem (Moscow)*, 79(2) :187-195.
- Otuki M. F., Vieira-Lima F., Malheiros A., Yunes R. A., and Calixto J. B. (2005). Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protum kleinii* and α -amyrin pentacyclic triterpene. *Eur J Pharmacol.*, 507 :253-259.
- Pham-Huy LA., Hua He H., and Pham-Huy C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci*, 4 (2) :89-96.

- Payne DNR., and Adcock IM. (2001). Molecular mechanism of corticosteroid actions. *Pediatric Respiratory Reviews*, 2 :145-150.
- Pereira D. M., Valentã P., Pereira J. A., and Andrade P. B. (2009). Phenolics : From chemistry to biology. *Molecules*, 14 :2202-2211.
- Procházková D., Boušová I., and Wilhelmová N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids, *Fitoterapia* 82 :513–523.
- Qui L., Han T., Li H., Zhang Q., and Zheng H. (2006). A new thiazinedione from *Xanthium strumarium*. *Fitoterapia* 77 :245–246.
- Rahman K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2(2) 219–236.
- Rahman S., Ansari R A., Rehman H., Parvez S., and Raisuddin S. (2011). Nordihydroguaiaretic acid from creosote bush (*Larrea tridentata*) mitigates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammatory and oxidative stress response of tumor promotion cascade in mouse skin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011: 1-10.
- Rahimi R., and Kiani S. (2016). Chemical compound and therapeutic effects of *Hypericum perforatum*. *Der Pharmacia Letter*, 8(9) :237-241.
- Randhawa M. A. (2009). Calculation of LD50 values from the method of Miller and Tainter, *J Ayub Med Coll Abbottabad.*, 21(3) : 184-185.
- Rad JS, Alfatemi SMH, Rad MS, Iriti M. (2013). *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of *Xanthium strumarium* L. extracts on methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ancient Science of Life*. 33(2):109-113.
- Rathee P., Chaudhary H., Rathee S., Rathee D., Kumar V., Kohli K. (2009). Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents : a review. *Inflammation and Allergy-Drug Targets*, 8 :229-235.
- Reeta S., Kavita G., Arjun P., and Rimpal J. (2010). Pharmacognostical standardization of leaves of *Xanthium strumarium* Linn. *Phcog. J.*, 2 : 492-497.
- Jianga R-W., Laua K-M., Hona P-M., Makb TCW., Wo oc K-S. and Kwok-Pui Fung K-P. (2005). Chemistry and Biological Activities of Caffeic Acid Derivatives from *Salvia miltiorrhiza*. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 237-246 .
- Renugadevi J., Prabu S M. (2009) Naringenin protects against cadmium-induced oxidative renal dysfunction in rats . *Toxicology*, 256 : 128–134.
- Ruba A. A., Mohan V.R. (2016). Anti-inflammatory Activity of Whole Plant Extract of *Andrographis echinoides* Against Carrageenan Induced Paw Edema. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 37(2) : 110-113.
- Russo D. (2018). Flavonoids and the Structure-Antioxidant Activity Relationship. *J Pharmacogn Nat Prod.*, 4:1 DOI: [10.4172/2472-0992.1000e109](https://doi.org/10.4172/2472-0992.1000e109)

Saad A. F., Virella G., Chassereau C., Boackle R. J., and LopesVirella, M. F., (2006). OxLDL immune complexes activate complement and induce cytokine production by MonoMac 6 cells and human macrophages. *J. Lipid Res.* 47, 1975– 1983.

Saba AB, Oyagbemi AA, Azeez OI, (2010). Amelioration of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and haemotoxicity by aqueous leaf extract of *Cnidioscolus aconitifolius* in rats. *Niger J Physiol Sci*, **25**, 139 R 147.

Sahreen S, Khan M R and Khan R A (2010). Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chemistry*, **122**, 1205-1211.

Sahreen, S., Khan, M.R., Khan, R.A. (2011). Hepatoprotective effects of methanol extract of *Carissa opaca* leaves on CCl₄-induced damage in rat. *BMC Complement. Altern. Med.* 11, 48.

Sangare M. M., Balaya B., Ategbo J-M., LOKO F., and Dramane K., L. (2012). Effets de l'extrait aqueux de gomphrena celosioides (amaranthaceae) sur les enzymes hépatiques. *Afrique SCIENCE*, 08(3) : 107 – 115.

Saikat S., Chakraborty R., Sridhar C., Reddy Y S R., and De B. (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines : currents status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 3(1) :

Sampieri A III., and Carmona-Aparicio L. (2017). Biochemical and molecular modulation of CCl₄-induced peripheral and central damage by *Tilia americana* var. *mexicana* extracts. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25 : 319–331.

Sasidharan S, Aravindran S, Latha LY, Vijenthil R, Saravanan D, Amutha S, (2010). *in vitro* antioxidant activity and hepatoprotective effects of *lentinula edodes* against paracetamol induced hepatotoxicity. *Molecules*, **15**, 4478-4489.

Senguttuvan J, Paulsamy S, Karthika K. Phytochemical analysis and evaluation of leaf and root parts of medicinal herb, *Hypochoeris radicata* L. for *in vitro* antioxidant activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2014;4(Suppl 1): S359-S367.

Salvamani S., Gunasekaran B., Shaharuddin NA., Ahmad SA., and Mohd Yunus Shukor MY. (2014). Antiatherosclerotic Effects of Plant Flavonoids. *BioMed Research International* , 11 pages

Shanmugam S, Thangaraj P, Lima BdS, Chandran R, de Souza Araújo AA, Narain N, Serafini MR, Quintans Júnior LJ, (2016). Effects of luteolin and quercetin 3-b-D-glucoside identified from *Passiflora subpeltata* leaves against acetaminophen induced hepatotoxicity in rats. *Biomed Pharmacother*, 83, 1278R1285.

Sharma, P., Singh, R., and Jan, M. (2014). Dose-dependent effect of deltamethrin in testis, liver, and Kidney of wistar rats. *Toxicol. Int.* 21, 131–139.

Singh D., Arya P. V., Ashutosh Sharma A., Ved Prakash Aggarwal V. P., Mahabeer Prasad Dobhal M. P., and Radhey Shyam Gupta R. S. (2014). Antioxidant Potential of Plumieride against CCl₄-Induced Peroxidative Damage in Rats. *Antioxidants*, 3 :798-813

- Sisein EA. (2014). Biochemistry of free radicals and antioxidants. Scholar Academic Journal of Biosciences, 2(2):110-118.
- Sousa R, Dias S , & Antunes C. (2006). Spatial subtidalmacro-benthic distribution in relation to abiotic conditions in the Lima estuary. NW of Portugal *Hydrobiologia*, 559 : 135-148.
- Soto C., Recoba R., Barrón H.,Avarez C., and Favari L. (2003). Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.*, 136(3) :205-212.
- Sreenivasamurthy B, Banji D, Banji O J F. Investigation on antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic leaf extract of *Polygonum glabrum* Willd. on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Spatula* 2012; 2(4):199-205.
- Suba V., Murugesan T., Kumaravelrajan R., Mandal S. C., and Saha B. P. (2005). Anti-inflammatory, Analgesic and Antiperoxidative Efficacy of *Barleria lupulina* Lindl. Extract. *Phytother. Res.* 19 : 695–699.
- Sudha G., Sangeetha Priya M., Indhu shree R., and Vadivukkarasi S. (2011). In vitro free radical scavenging activity of raw pepino fruit (*Solanum muricatum* aiton). *International Journal of Current Pharmaceutical Research.* 3(2) : 137-140.
- Subramanion L. Jothy,¹ Azlan Aziz,¹ Yeng Chen,² and Sreenivasan Sasidharan. (2012). Antioxidant Activity and Hepatoprotective Potential of *Polyalthia longifolia* and *Cassia spectabilis* Leaves against Paracetamol-Induced Liver Injury. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2012 : 1-10.
- Sudha G., Sangeetha Priya , M., Shree R. I., and Vadivukkarasi S. (2011). *In vitro* free radical scavenging activity of raw pepino fruit (*Solanum muricatum* aiton). *Int J Curr Pharm Res*, 3 (2): 137-140.
- Sun M, Xu PP, Ren Y, Li YF, Zhong YF, Yan H. Protective effect of melatonin on oxidative damage by Deltamethrin in rat brain. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi.* 2007;25:155–8.
- Tapas A. R., Sakarkar D. M., and Kakde R.B. (2008). Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, September 7 (3): 1089-1099
- Takebayashi,J., Iwayashi, N., Ishimi, Y. and Tai, A. (2012). Development of a simple 96-well plate method for evaluation of antioxidant activity based on the oxidative haemolysis inhibition assay(OxHLIA). *Food chemistry*, 134, 606-610.
- Terkeltaub R., Bushinsky D.A., Becker M.A. (2006). Recent developments in our understanding of the renal basis of hyperuricemia and the development of novel anti hyperuricemic therapeutics. *Arthritis Research and therapy*, 8(Suppl1) :S4
- Tiwari P., Ahirwae D., Chandy A., Ahirwar B. (2014). Evaluation of hepatoprotective activity of alcoholic and aqueous extracts of *Selaginella lepidophylla* . *Asian Pac J Trop Dis*; 4(Suppl): S81-S86.

- Tiwari P, Kumar B, Kaur M , Kaur G , and Kaur H. (2011). Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1: 98-106.
- Trabsa H, Boumerfeg S, Baghiani A, Boussoualim N, Krache I, Khennouf S, Arrar L. (2014). Anti-Haemolytic, antioxidant and xanthine oxidase inhibitory effect of *Sedum sediforme* shoot extracts. *International Journal of Indigenous Medicinal Plants*. 47:1502-1510.
- Tsao R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2 :1231-1246.
- Tulipani S., Armeni T., Giampieri F., Alvarez-Suarez J. M., Gonzalez-Paramas A. M., Santos-Buelga C., Busco F., Principato G., Bompadre S., Quiles J L., Mezzeti B., and Battino M. (2014). Strawberry intake increase blood fluid, erythrocyte and mononuclear cell defenses against oxidative challenge. *Food Chem.*, 156 : 87-93.
- Unated Nations (2015). Globally harmonized system of classification and labeling of chemicals (GHS).Sixth edition, Unated Nation,New York and Genava. 521 p.
- Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C.J., Telser J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.*, 266 :37-56.
- Verma K, Shrivastava D, and Kumar G, (2015). Antioxidant activity and DNA damage inhibition in vitro by a methanolic extract of *Carissa carandas* (Apocynaceae) leaves. *J Taibah Univ Sci*, 9 : 34-40.
- Viatte S., Waeber G., and Vollenweider G. (2007). Effets secondaires méconnus des glucocorticoïdes : prévention et traitement spécifiques requis ? *Rev Med Suisse* , 3 : 326-46.
- Vicente S J, Ishimoto E Y, Torres E A F S. (2014). Coffee modulates the transcription factor Nrf2 and highly increases the activity of antioxidant enzymes in rats. *J Agr Food Chem* , 12: 116–122.
- Vladimir-Knežević S., Blažeković B., Bival Štefan M., and Marija Babac M. (2012). Plant polyphenos as antioxidants influencing the human health. *Phytochemicals as Nutrients*.
- Yadav N. P., Pal A., Shanker K., Bawankule D. U., Gupta A. K., Darokar M.P., Kanuja S. P. S. (2008). Synergistic effect of silymarin and standardized extract of *Phyllanthus amarus* against CCl₄- induced hepatotoxicity in *Rattus norvegicus*. *Phytomedicine* 15 : 1053-1061.
- Yavasoglua A., Karaaslanb MA., Uyanikgila Y., Sayimb F., Atesa U., Yavasoglub NUK. (2008). Toxic effects of anatoxin-a on testes and sperm counts of male mice *Experimental and Toxicologic Pathology* , 60 : 391–396.
- Walle T., Ta N., Kawamori T., Wen P. A., Tsuji P. A., and Walle U. K. (2007). Cancer chemopreventive properties of orally bioavailable flavonoids-methylated versus unmethylated flavones. *Biochem Pharmacol.*, 73(9) :1288-1296.
- Wang X., Lan M., Wu H-P., Shi Y-Q., Lu J., Ding J., Wu K-C., Jin J-P., Fan D-M. (2002). Direct effect of croton oil on intestinal epithelial cells and colonic smooth muscle cells. *China World J Gastroenterol*, 8(1):103-107

Weill B., Batteux F., and Dhainault J. (2003) Réaction inflammatoire, Conduite à tenir : aspects biologiques et cliniques. In Immunopathologie et réactions inflammatoires. Eds De Boeck (Université Paris) pp : 12-23.

Wiat C (2006). Ethnopharmacology of Medicinal Plants: Asia and the Pacific. Eds, Humana Press (Totowa), pp: 1-20.

Wolfe K.L., and Liu R. H. (2008). Structure-activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay. J Agric Food Chem., 56(18) :8404-8411.

Wu G., Fang Y-Z., Yang S., Lupton JR., and Turner ND. (2004). Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. American Society for Nutritional Sciences.489-492.

Zerargui F, Boumerfeg S, Charef N, Baghiani A, Djarmouni M, Khennouf S, Arrar L, Abu Zaga, M, Mubarak M. (2015). Antioxidant potential and xanthine oxidase inhibitory effect of two furanocoumarins isolated from *Tamus communis* L. Medicinal Chemistry.;11:506-513.

Zou Y, Lu Y, Wei D (2004). Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. *in vitro*. J. Agr. Food Chem. 52 (16): 5032-5039.