

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة فرحات عباس - سطيف -

كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم البيوكيمياء

مذكرة

مقدمة لنيل شهادة الماجستير في

البيوكيمياء

تخصص: البيوكيمياء والفيزيولوجيا التجريبية

من طرف: عبد الرحيم بن سلامة

النشاطات المضادة للأكسدة والمثبطة للإنزيم المؤكسد

للكزانثين لمستخلصات أوراق *Hertia cheirifolia* L.

قدمت يوم أمام لجنة المناقشة:

الرئيس:	أ.د. الصديق خنوف	أستاذ	جامعة فرحات عباس سطيف
المشرف:	أ.د. عبد الرحمن بغياني	أستاذ	جامعة فرحات عباس سطيف
الأعضاء:	أ.د. لخميسي عرعار	أستاذ	جامعة فرحات عباس سطيف
د. صليحة دحامة	أستاذة محاضرة		جامعة فرحات عباس سطيف

تشكرات

بداية أحمد الله وأشكره الذي أمدني بالقوة والعزيمة لإتمام هذا العمل

يجدر بي في هذا المقام أن أتقدم بجزيل الشكر وعظيم الإمتنان إلى الأستاذ الدكتور عبد

الرحمان بغياني الذي فتح لي أبواب مخبره ولم ييخل علي بتوجيهاته ونصائحه القيمة طيلة

إشرافه على هذا العمل

كما أتقدم بالشكر إلى أعضاء لجنة المناقشة الأستاذ الدكتور الصديق خنوف و الأستاذ

الدكتور خميسي عرعار و الدكتورة صليحة دحامنة الذين لبوا دعوتي من أجل إثراء

ومناقشة هذا العمل

تشكراتي الخالصة للأستاذ الدكتور خميسي عرعار على تشجيعه و مساعدته وتوجيهاته

القيمة

كما لا يفوتني أن أتقدم بالشكر الجزيل للأستاذة صباح بومرفق على مساعدتها ونصائحها

الدائمة

كما أتقدم بالشكر الجزيل لكل من ساهم في إنجاز هذا العمل.

الملخص:

تم في هذه الدراسة إستخلاص الفلافونويدات من أوراق *Hertia cheirifolia* بواسطة المذيبات العضوية، حيث تم الحصول على أربع مستخلصات: المستخلص الحام (Cr.E) و مستخلص الكلوروفورم (Ch.E) ومستخلص إيثيل الأسيتات (EtA.E) والمستخلص المائي (Aq.E). أظهر التحليل الكمي لهذه المستخلصات أن EtA.E يحتوي أكبر كمية من عديدات الفينول و الفلافونويدات، كما أظهر تحليل EtA.E و Ch.E بواسطة HPLC وجود بعض الفلافونويدات. تمت تنقية الإنزيم المؤكسد المرجع للكزانثين (XOR) من حليب البقر بمردود 17.97 مغ/مل، وقد قدرت نسبة البروتين إلى الفلافين (PFR) بـ 7.1، كما قدرت نشاطية النوعية الإنزيم المنقى بـ 2261 نانومول/دقيقة/مغ بروتين. أبدى EtA.E أكبر تأثير تثبيطي على كل من نشاطية XO و إرجاع cyt-c بـ $IC_{50} = 0.007 \pm 0.157$ مغ/مل و 0.002 ± 0.226 مغ/مل على الترتيب. أعطى EtA.E أفضل تأثير إزاحي لجذر O_2^- بإستعمال النظام PMS-NADH-NBT ($IC_{50} = 0.049 \pm 1.020$ مغ/مل)، متبوع بـ Ch.E و Cr.E و Aq.E على الترتيب. أظهرت نتائج إختبار β -carotene/حمض اللينولييك أن Aq.E و EtA.E يملكان نشاطية مضادة للأكسدة جد معتبرة بنسبة 79.24% و 74.45% على الترتيب. أبدى EtA.E أكبر تأثير إزاحي لجذر DPPH ($IC_{50} = 0.001 \pm 0.149$ مغ/مل)، يليه كل من Cr.E و Ch.E بنفس التأثير الإزاحي ($IC_{50} = 0.012 \pm 0.193$ مغ/مل و 0.007 ± 0.199 مغ/مل على الترتيب). بين إختبار إستحلاب ايونات الحديد الثنائي أن Cr.E، Aq.E و EtA.E هي ملتقطات جيدة، حيث أعطت 15.03، 11.83، 10.32 مغ مكافئ EDTA/غ مستخلص على الترتيب. كما تم تقدير القدرة الإرجاعية لمختلف المستخلصات بتقنية FRAP، حيث كانت القدرة الإرجاعية لكل من EtA.E و Cr.E هي الأفضل. أظهرت مستخلصات أوراق *Hertia cheirifolia* نشاطية مضادة للأكسدة عالية تدعم فكرة إستعمالها كفاءة صحية، إضافة إلى هذا يمكن إستعمال مستخلصات أوراق *Hertia cheirifolia* في علاج بعض الحالات المرضية التي يتدخل فيها إنزيم XO.

الكلمات المفاتيح: الإجهاد التأكسدي، النباتات الطبية، *Hertia cheirifolia*، XOR، مضادات الأكسدة، عديدات الفينول.

Summary:

In the present study, leaves of *Hertia cheirifolia* were extracted with solvent of varying polarity allowed their separation into four subfractions (crude extract; Cr.E, chloroform extract; Ch.E, ethyle acetate extract; EtA.E and aqueous extract; Aq.E). Quantitative analysis showed that EtA.E had the highest amount of polyphenols and flavonoids. HPLC analysis revealed the presence of some flavonoids in Ch.E and EtA.E. Xanthine oxidoreductase (XOR) was purified from bovine milk with yield of 17.97 mg/l, PFR of 7.1, and a specific activity of 2261 nmole/min/mg. EtA.E showed the highest inhibitory effect on both XO activity and cytochrome c reduction with $IC_{50} = 0.157 \pm 0.007$ mg/ml and 0.226 ± 0.002 mg/ml, respectively. Moreover, EtA.E presented the highest superoxide anion scavenging activity ($IC_{50} = 1.020 \pm 0.049$ mg/ml) in NADH/NBT/PMS system, followed by Ch.E, Cr.E and Aq.E. β -carotene/linoleic acid test results showed that Aq.E and EtA.E recorded a considerable inhibition of linoleic acid oxidation by 79.24% and 74.45%, respectively. EtA.E showed the highest DPPH-scavenging effect ($IC_{50} = 0.149 \pm 0.001$ mg/ml) followed by Ch.E and Cr.E, which have approximately similar effect with $IC_{50} = 0.193 \pm 0.012$ and 0.199 ± 0.007 mg/ml, respectively. Ferrous iron chelating assay showed that Cr.E, Aq.E and EtA.E act as a good chelators giving 15.03, 11.83 and 10.32 mg EDTA equivalent /g of extract, respectively. Reducing power was evaluated using FRAP assay, where EtA.E and Cr.E showed the potent power. *Hertia cheirifolia* leaves extracts have strong free radicals scavenging and antioxidant activities, and may prove to be of potential health benefit. In addition, the ability of *Hertia cheirifolia* leaves extracts to inhibit XO can be of great use in some diseases where XO is incriminated.

Key words: oxidative stress, medicinal plants, *Hertia cheirifolia*, XOR, antioxidant, polyphenols.

Résumé:

Dans cette étude, Les flavonoides des feuilles d' *Hertia cheirifolia* ont été extraits en utilisant différent solvents pour obtenir l'extrait brut (Cr.E), extrait chloroformique (Ch.E), extrait d'acétate d'éthyle (EtA.E) et l'extrait aqueux (Aq.E). L'analyse quantitative a montré qu'EtA.E a eu la quantité la plus élevée en polyphénols et en flavonoids. L'analyse par HPLC a révélé la présence de certains flavonoids dans Ch.E et EtA.E. Xanthine oxydoréductase (XOR) a été purifié du lait bovin avec un rendement de 17.97 mg/l, PFR de 7.1, et une activité spécifique de 2261 nmole/min/mg. EtA.E a montré l'effet inhibiteur le plus puissant sur et l'activité de la XO et la réduction du cyt-c avec $IC_{50}=0.157\pm 0.007$ mg/ml et 0.226 ± 0.002 mg/ml, respectivement. EtA.E présenté l'effet scavenger le plus élevé du superoxyde, généré du système NADH/NBT/PMS, ($IC_{50}=1.020\pm 0.049$ mg/ml) suivi par Ch.E, Cr.E et Aq.E, respectivement). Les résultats du test du blanchissement de la β -carotène a révélé que Aq.E et EtA.E a inhibé considérablement l'oxydation de l'acide linoléique (79.24% et 74.45%, respectivement). EtA.E a exercé l'effet scavenger du DPPH le plus élevé ($IC_{50}= 0.149\pm 0.001$ mg/ml) suivi par ceux du Ch.E et Cr.E qui ont un effet similaire ($IC_{50}=0.193 \pm 0.012$ et 0.199 ± 0.007 mg/ml, respectivement). En plus, Cr.E, Aq.E et EtA.E présentent une activité chélatrice puissante avec 15.03, 11.83 et 10.32 mg équivalent d'EDTA/g d'extrait, respectivement. Le pouvoir réducteur a été évalué en utilisant la technique du FRAP, ou' EtA.E et Cr.E ont montré le pouvoir le plus puissant. Les extraits des feuilles d'*Hertia cheirifolia* montrent une activité antioxydante très puissante, et peuvent avoir des bienfaits potentiels pour la santé. En outre, le pouvoir des extraits des feuilles d'*Hertia cheirifolia* d'inhiber la XO peut avoir une utilisation importante dans quelques maladies où XO est incriminé.

Mots-clés: stress oxydant, plantes médicinales, *Hertia cheirifolia*, XOR, antioxydants, polyphénols.

قائمة المختصرات

Aq.E	Aqueous extract
BHT	Butylated hydroxytoluene
CAT	Catalase
Ch.E	Chloroform extract
Cr.E	Crude extract
DPPH	2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EtA.E	Ethyl acetate extract
GPx	Glutathion peroxidase
GR	Glutathion reductase
GSH	Gluthathion
GSSG	Oxidized glutathione
Hex.E	Hexane extract
IL	Interleukin
INF	Interferon
LA	Lipoic acid
LOX	Lipoxygenase
LTB4	Leukotriene B4
NBT	Nitroblue tetrazolium
NO[•]	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
O₂^{•-}	Superoxide anion
OH[•]	Hydroxyl radical
ONOO⁻	Peroxynitrite
PAF	Platelet activating factor
PFR	Protein/Flavin ratio
PGE2	Prostaglandin E2
PLA2	Phospholipase A2
PMS	Phenazine methosulfate
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
SOD	Superoxide dismutase
XDH	Xanthine dehydrogenase
XO	Xanthine oxidase
XOR	Xanthine oxidoreductase

قائمة الأشكال

- الشكل 1: أهم المصادر الداخلية للأنواع الأكسجينية النشطة.
- الشكل 2: آلية أكسدة الليبيدات.
- الشكل 3: البنية الجزيئية لتحت وحدة إنزيم XOR و الإنتقال الإلكتروني بين مراكزها.
- الشكل 4: هدم البيورينات بواسطة إنزيم XOR.
- الشكل 5: آلية تدخل XOR في الإقفار وإعادة الاحتقان.
- الشكل 6: آلية تثبيط XOR بواسطة allopurinol.
- الشكل 7: آلية التخلص من جذر O_2^- بواسطة الإنزيمات المضادة للأكسدة.
- الشكل 8: آلية التخلص من الجذور الليبيدية بواسطة Vit. E و Vit. C و الجلثاثيون.
- الشكل 9: إزاحة الأنواع الأكسجينية والنتروجينية النشطة بواسطة الأنظمة المضادة للأكسدة.
- الشكل 10: الشكل العام للفلافونويدات و أهم المواقع المتدخلة في تأثيراتها الحيوية.
- الشكل 11: تفاعل الفلافونويدات مع ROS.
- الشكل 12: إرتباط الفلافونويدات مع المعادن.
- الشكل 13: الشكل العام و أجزاء من نبتة *Hertia cheirifolia*.
- الشكل 14: مخطط إستخلاص الفلافونويدات من أوراق *H. cheirifolia*.
- الشكل 15: منحى عيارية حمض الغاليك.
- الشكل 16: منحى عيارية quercetin و rutin.
- الشكل 17: منحى العيارية ل $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ عند الدقيقتين 4 و 30 د.
- الشكل 18: التحليلات الكروماتوغرافية لمختلف مستخلصات *H. cheirifolia* بواسطة HPLC.
- الشكل 19: التأثير التثبيطي لمستخلصات أوراق *H. cheirifolia* على نشاطية XO.
- الشكل 20: تركيز مستخلصات *H. cheirifolia* المثبطة ل 50% من نشاطية انزيم XO.
- الشكل 21: التأثير الإزاحي لمستخلصات *H. cheirifolia* على الجذر O_2^- الناتج عن XO بإستعمال cyt-c.
- الشكل 22: تركيز مستخلصات *H. cheirifolia* المثبطة ل 50% من نشاطية انزيم XO و المزيج ل 50% من جذر O_2^- الناتج عنه.
- الشكل 23: التأثير الإزاحي لمستخلصات *H. cheirifolia* على O_2^- بإستعمال النظام PMS-NADH-NBT.
- الشكل 24: مختلف قيم IC_{50} المستخلصات في التأثير الإزاحي على جذر O_2^- في النظام PMS-NADH-NBT.

- الشكل 25: النشاطية المضادة للأوكسدة لمستخلصات و الشواهد (BHT والميثانول والماء) خلال 48 ساعة في إختبار β -carotene/حمض اللينولييك.
- الشكل 26: النشاطية المضادة للأوكسدة للمستخلصات والشواهد (BHT و الميثانول و الماء) بعد مرور 24 ساعة في إختبار β -carotene / حمض اللينولييك.
- الشكل 27: التأثير الإزاحي لمستخلصات *H. cheirifolia* على جذر DPPH.
- الشكل 28: تركيز مستخلصات *H.cheirifolia* المزيجة لـ 50% من جذر DPPH.
- الشكل 29: تأثير المستخلصات و EDTA على تشكّل مركب Fe^{+2} -Ferrozine.
- الشكل 30: قدرة مستخلصات *H. cheirifolia* على إستخلاص المعادن
- الشكل 31: حركيات تفاعل FRAP لمستخلصات *H. cheirifolia* (0.147مغ/مل) و حمض الغاليك (0.043 مغ/مل).
- الشكل 32: مقارنة بين قيم TAP عند الدقيقتين 4 و 30 لمستخلصات *H. cheirifolia* وحمض الغاليك.

قائمة الجداول

1. الجدول بعض الأمراض المتعلقة بالإجهاد التأكسدي و الجذور الحرة.
2. الجدول مردود مستخلصات أوراق *H. cheirifolia* ومحتواها من عديدات الفينول و الفلافونويدات.
3. الجدول زمن إحتجاز مختلف الفلافونويدات و الأحماض الفينولية النقية في التحليل ب HPLC.
4. الجدول تركيز نتائج عملية تنقية إنزيم XOR من حليب البقر.
5. الجدول تركيز مستخلصات *H. cheirifolia* المزيحة ل من جذر O_2^- .
6. الجدول قيم EC1 و TAP لمستخلصات *H. cheirifolia* عند الدقيقة 4 و الدقيقة 30 بإستعمال تقنية FRAP.

الفهرس

I	التشكرات
II	الملخص بالعربية
III	الملخص بالانجليزية
IV	الملخص بالفرنسية
V	قائمة المختصرات
VI	قائمة الأشكال
VIII	قائمة الجداول
IX	الفهرس
1.....	مقدمة
	الدراسة المرجعية
3.....	1. الإجهاد التأكسدي
3.....	1.1. المؤكسدات
3.....	1.1.1. أهم الأنواع الأكسجينية النشطة
5.....	2.1.1. مصادر الأنواع الأكسجينية النشطة
8.....	2.1. تأثير الإجهاد التأكسدي على الجزئيات الداخلية
9.....	1.2.1. فوق أكسدة اللييدات
10.....	2.2.1. أكسدة البروتينات
10.....	3.2.1. أكسدة DNA
11.....	4.1. الإجهاد التأكسدي وعلاقته بالأمراض
12.....	2. الإنزيم المؤكسد المرجع للكانثين (XOR) Xanthine oxidoreductase
12.....	1.2. بنية إنزيم XOR
13.....	2.2. المميزات التحفيزية و آلية عمل XOR
14.....	3.2. دور XOR
14.....	1.3.2. الأدوار الفيزيولوجية
15.....	2.3.2. الأدوار المرضية
16.....	4.2. مثبطات XOR
16.....	1.4.2. مثبطات تشبه مادة التفاعل
17.....	2.4.2. مثبطات أخرى

17.....	3. مضادات الأكسدة.....
18.....	1.3. مضادات الأكسدة الإنزيمية
18.....	1.1.3. إنزيم Superoxide dismutase
18.....	2.1.3. إنزيم Catalase
19.....	3.1.3. إنزيم Glutathion peroxidase و إنزيم Glutathion reductase
19.....	4.1.3. Peroxyredoxines
20.....	2.3. مضادات الأكسدة غير الإنزيمية
20.....	1.2.3. الفيتامين C و الفيتامين E
21.....	2.2.3. الجلوتاثيون Glutathion
21.....	3.2.3. الفلافونويدات
22.....	4. عديدات الفينول
22.....	1.4. الأحماض الفينولية
23.....	2.4. الدباغ
23.....	3.4. الفلافونويدات
24.....	1.3.4. النشاطية الحيوية للفلافونويدات
24.....	2.3.4. التأثيرات المضادة للأكسدة للفلافونويدات
27.....	5. نبتة <i>Hertia cheirifolia</i>
27.....	1.5. وصف نبتة <i>Hertia cheirifolia</i>
28.....	2.5. استعمال النبتة في الطب الشعبي

المواد والطرق

29.....	1. المواد
29.....	1.1. المواد البيولوجية
29.....	2.1. المواد الكيميائية والأجهزة
30.....	2. طرق العمل
30.....	1.2. إستخلاص الفلافونويدات من أوراق <i>H. cheirifolia</i>
32.....	2.2. تحليل مستخلصات <i>H. cheirifolia</i>
32.....	1.2.2. تقدير عديدات الفينول الكلية
32.....	2.2.2. التقدير الكمي للفلافونويدات
33.....	3.2.2. تحليل مستخلصات <i>H. cheirifolia</i> بواسطة HPLC

- 34.....3.2. تنقية إنزيم XOR من حليب البقر
- 34.....4.2. دراسة نشاطية مستخلصات *H. cheirifolia* المضادة للأوكسدة بطرق إنزيمية
- 34.....1.4.2. التأثير الشيطي لمستخلصات *H. cheirifolia* على XO
- 34.....2.4.2. التأثير الإزاحي لمستخلصات *H. cheirifolia* على O_2^- الناتج عن XOR
- 35.....5.2. دراسة نشاطية مستخلصات *H. cheirifolia* المضادة للأوكسدة بطرق غير إنزيمية
- 35.....1.5.2. التأثير الإزاحي على O_2^- بإستعمال النظام PMS-NADH-NBT
- 36.....2.5.2. إختبار β -carotene/حمض اللينولييك
- 36.....3.5.2. التأثير الإزاحي لمستخلصات *H. cheirifolia* على جذر DPPH
- 37.....4.5.2. إختبار إستحلاب المعادن
- 38.....5.5.2. دراسة النشاطية المضادة للأوكسدة بطريقة FRAP
- 39.....6.2. التحليل الإحصائي

النتائج و المناقشة

- 40.....1. استخلاص الفلافونويدات و تقديرها الكمي
- 41.....2. تحليل مستخلصات *H. cheirifolia* بواسطة HPLC
- 44.....3. تنقية إنزيم XOR من حليب البقر
- 45.....4. دراسة نشاطية مستخلصات *H. cheirifolia* المضادة للأوكسدة بطرق إنزيمية
- 45.....1.4. تأثير مستخلصات أوراق *H. cheirifolia* على نشاطية إنزيم XO
- 47.....2.4. التأثير الإزاحي لمستخلصات أوراق *H. cheirifolia* على جذر O_2^- الناتج عن XO
- 49.....5. دراسة نشاطية مستخلصات أوراق *H. cheirifolia* المضادة للأوكسدة بطرق غير إنزيمية
- 49.....1.5. التأثير الإزاحي على O_2^- بإستعمال النظام PMS-NADH-NBT
- 51.....2.5. إختبار β -carotene/حمض اللينولييك
- 53.....3.5. التأثير الإزاحي لمستخلصات *H. cheirifolia* على جذر DPPH
- 56.....4.5. إختبار إستحلاب المعادن
- 58.....5.5. دراسة النشاطية المضادة للأوكسدة بطريقة FRAP
- 61.....المناقشة العامة
- 64.....المراجع

مقدمة

لطالما إعتبرت النباتات الطبية مصدرا أساسيا لصحة الإنسان، و لاتزال العديد من الثقافات التقليدية تثنى الوصفات الطبية النباتية و أهميتها الوقائية و العلاجية و منافعها الأخرى. يتقدم علم التداوي بالأعشاب بمفهوومه الحديث تقدما كبيرا في مختلف أرجاء العالم و يزداد الإهتمام بدراسة النباتات الطبية في مجال البحث البيوصيدلاني نظرا لخصائصها العلاجية و كلفتها المنخفضة و سهولة الحصول عليها و العلاقة التراثية بها والإعتقاد الشعبي السائد بأن الأدوية النباتية أكثر أمانا و نجاعة من العقاقير المصنعة.

تحتوي النباتات على عدد كبير من المركبات الفعالة التي تعكس الإمكانيات العلاجية لهذه النباتات، فمن المعلوم أن لبعض العقاقير النباتية قدرة علاجية أكبر من تلك التي تملكها الأدوية المصنعة في معالجة بعض الأمراض، كما يخلو إستعمال هذه العقاقير من الآثار الجانبية الضارة التي تصاحب إستعمال الأدوية المصنعة أحيانا، و من العوامل الأخرى التي أدت إلى تنامي إستخدام النباتات الطبية و المنتجات الطبيعية الأخرى ظهور أمراض جديدة مصحوبة بتعقيدات شديدة لم يتم إيجاد علاج مناسب لها حتى الآن.

ترتبط وظائف الجسم بتفاعلات الأكسدة والإرجاع التي تؤدي إلى إنتاج الأنواع الأوكسجينية النشطة خلال الميتابوليزم العادي أو عند التعرض لإصابة، فالتوازن بين إنتاج هذه الجزيئات والتخلص منها يضمن الحفاظ على الوظائف الفيزيولوجية الطبيعية للجسم، حيث يمكن حماية الجسم من أضرار هذه الجزيئات عن طريق مضادات الأكسدة والتي تستعمل بكثرة كإضافات في الأغذية أو أشكال صيدلانية مختلفة. تؤثر مضادات الأكسدة من خلال تثبيط الانزيمات المتدخلة في الأكسدة و/أو إزاحة الجذور الحرة الناتجة و إستخلاص (chelating) المعادن وتخفيض الأنظمة الانزيمية المضادة للأكسدة مؤدية بذلك إلى التخفيض من الأضرار الناتجة. تمثل عديدات الفينول المستقبلات الثانوية الأكثر انتشارا وتنوعا في المملكة النباتية وتملك نشاطية بيولوجية وصيدلانية واسعة، إذ تملك هذه المركبات القدرة على الحد و/أو علاج الأمراض المتعلقة بالإجهاد التأكسدي.

يعتبر الإستعمال الشعبي للنباتات الطبية منطلق أي بحث في مجال المركبات الطبيعية و تأثيراتها الحيوية، تهدف هذه الدراسة إلى تقدير المحتوى الفينولي والنشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات أوراق *Hertia cheirifolia*، المستعملة في الطب الشعبي في الجزائر لعلاج بعض الأمراض.

1. الإجهاد التأكسدي

يُعرف الإجهاد التأكسدي (oxidative stress) في النظام البيولوجي على أنه اختلال في التوازن بين مضادات الأكسدة ومولدات الأكسدة، هذا الاختلال راجع إلى الإنتاج المفرط لمولدات الأكسدة و/أو نقص في مضادات الأكسدة (Kirschvink *et al.*, 2008). تُسبب الجزيئات المؤكسدة أضرار خلوية ونسجية غالبا غير عكسية (Tunez *et al.*, 2011).

1.1. المؤكسدات

تعرف الجذور الحرة بأنها أنواع كيميائية (ذرات أو جزيئات) تملك إلكترون أو أكثر حر في المدار الخارجي، وجود إلكترون حر يجعل هذه الأنواع غير مستقرة و أكثر نشاطية مع نصف عمر قصير (Jomova *et al.*, 2010). تُنتج الخلايا المؤكسدات و الأنواع النشطة بتراكيز ضعيفة خلال العمليات الأيضية، ويكون هذا الإنتاج مراقبا بواسطة جهاز دفاعي مضاد للأكسدة (Valko *et al.*, 2007)، عدم استقرار هذه الأنواع يجعل من الصعب مراقبتها في الأوساط البيولوجية (Halliwell and Whiteman, 2004). كثير من التفاعلات البيولوجية تقوم بأكسدة مواد التفاعل يكون فيها الأكسجين الجزيئي هو المستقبل النهائي للإلكترونات، الذي يدخل في تشكيل الأنواع الأكسجينية النشطة Reactive oxygen species (ROS) التي يمكن أن تكون جذرية أو غير جذرية (Medow *et al.*, 2011).

1.1.1. أهم الأنواع الأكسجينية النشطة

◀ جذر فوق الأكسيد ($O_2^{\bullet-}$) Superoxide anion

يعتبر جذر $O_2^{\bullet-}$ طليع العملية التأكسدية داخل الخلية، إذ يمكنه التحول إلى أنواع أكسجينية أخرى، حيث ينتج هذا الجذر عن الإرجاع الأحادي لجزيئة الأكسجين عند استقبالها لإلكترون (Viel *et al.*, 2008). تقوم مجموعة

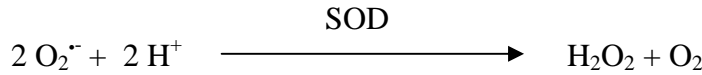
من الأنظمة الخلوية الإنزيمية الإرجاعية بإنتاج O_2^- ، حيث 4% من الأكسجين الموجود داخل الميتوكوندري يتحول إلى O_2^- و 20% من هذا الناتج يطرح خارج الخلية (Dranka *et al.*, 2010).

◀ الأكسجين الأحادي (1O_2) Singlet oxygen

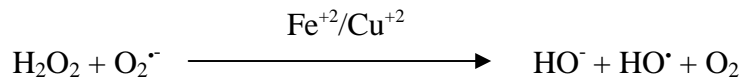
يعتبر الأكسجين الأحادي (1O_2) من الأنواع الأكسجينية غير الجذرية، يتميز بغياب إلكترون حر في المدار الخارجي و بمميزات تأكسدية عالية ينتج عن طريق التحفيز الضوئي (Montanaro *et al.*, 2009). كما يمكن أن ينتج عن إجهاد تأكسدي محفز بواسطة تنشيط الخلايا البالعة الكبيرة (macrophages) أو خلال عملية أكسدة الدهون، يلحق 1O_2 أضراراً خلوية بتفاعله مع الدهون و البروتينات و DNA وذلك حسب مواقع إنتاجه (Arablinskaia *et al.*, 2006).

◀ Hydrogen peroxide (H_2O_2)

ينتج النوع H_2O_2 عن عملية دسمة (dismutation) أيون O_2^- بواسطة إنزيم Super oxidizedismutase (SOD) حسب التفاعل التالي (Vinatier *et al.*, 2010).



يعتبر H_2O_2 من الأنواع الأكسجينية الأكثر سمية، لأن غياب شحنة عليه يجعله قابل للمرور عبر الأغشية البيولوجية، كما يمكن لـ H_2O_2 أن يتحول إلى جذر OH^\bullet في وجود بعض أيونات المعادن وفقاً لتفاعل Fenton بتفاعله مع O_2^- حسب المعادلة (Sato *et al.*, 2011).



◀ الجذر (OH $^\bullet$) Hydroxyl radical

يعتبر جذر OH^\bullet الأكثر نشاطاً والأقل استقراراً من بين مجاميع ROS، حيث يملك نصف عمر صغير جداً يقدر بالنانو ثانية (Aust *et al.*, 2010). يتفاعل OH^\bullet بسهولة مع العديد من الجزيئات التي تكون قريبة منه خاصة

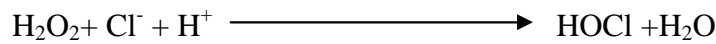
الدهون حيث يعمل على إزالة أو إضافة الهيدروجين لروابط غير مشبعة، مما يؤدي إلى مضاعفة الأضرار و زيادة بشكل كبير في السمية الخلوية التي تحدثها ROS (Cheng *et al.*, 2002).

◀ الجذر (NO[•]) Nitric oxide

ينتج جذر NO[•] عن طريق أكسدة L-arginine بواسطة إنزيم Nitric oxide synthase (NOS) في وجود الأكسجين في العديد من الأنواع الخلوية مثل الخلايا الطلائية و الأعصاب، حيث يلعب دورا في نقل الإشارة الخلوية ، وفي الدفاع ضد العضيات الدقيقة (Jones *et al.*, 2010). يمكن لـ NO[•] أن يتحد مع O₂⁻ لإعطاء جذر peroxynitrite (ONOO⁻) الذي يعتبر مؤكسد قوي جدا وعالي النشاطية، والذي بإمكانه أن يساهم في هدم الأنسجة في حالة الالتهابات المزمنة (Gebicka and Didik, 2010).

◀ Chlorid hydroxyl (HOCl)

تقوم إنزيم Myeloperoxidase (MPO) الخلايا المتعادلة بأكسدة أيونات Cl⁻ في وجود H₂O₂ لإنتاج جذر عالي النشاطية و له قدرة عالية على قتل البكتيريا و الأحياء الدقيقة يدعى جذر HOCl، هذا الأخير يمكن أن يتفاعل مع O₂⁻ لإعطاء جذر OH[•] (Malle *et al.*, 2007).



2.1.1. مصادر الأنواع الأكسجينية النشطة

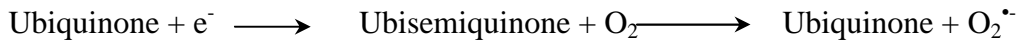
تنتج الجذور الحرة بشكل مستمر من خلال آليات مختلفة.

أ - المصادر الداخلية

تنتج الأنواع الأكسجينية النشطة داخل العضوية كآلية للحماية ضد الجزيئات الغريبة أو كجزء من نواتج العملية الأيضية عبر العديد من الآليات الموجودة داخل الجسم (Valko *et al.*, 2007).

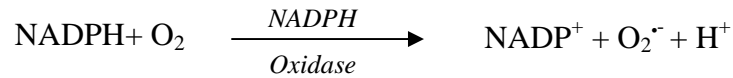
◀ الأغشية الميتكوندرية

تمثل الميتكوندريا المصدر الرئيسي للأنواع الأكسجينية النشطة في الفيزيولوجيا، إذ تنتج حوالي 90% من ROS عبر الميتابوليزم الخلوي و السلسلة التنفسية (Balaban *et al.*, 2005). يعتبر كل من المركبين NADH-ubiquinone و oxidoreductase و ubiquinone-cyt c reductase من إنزيمات الميتكوندري التي تنتج O_2^- و H_2O_2 (الشكل 1)، كما تقوم الميتكوندري بإنتاج H_2O_2 و جذر OH^\bullet من خلال تحول O_2^- و تفاعل Fenton (Neppolian *et al.*, 2004). يتحول حوالي 4% من الأكسجين الموجود داخل الميتكوندري إلى O_2^- ، و تعتبر الأكسدة الذاتية لمادة ubisemiquinone أهم مصدر لـ O_2^- في سلسلة نقل الإلكترونات في الميتكوندري وذلك عن طريق إرجاع ubiquinone حسب التفاعل التالي (Dranka *et al.*, 2010):



◀ إنزيم NADPH oxidase

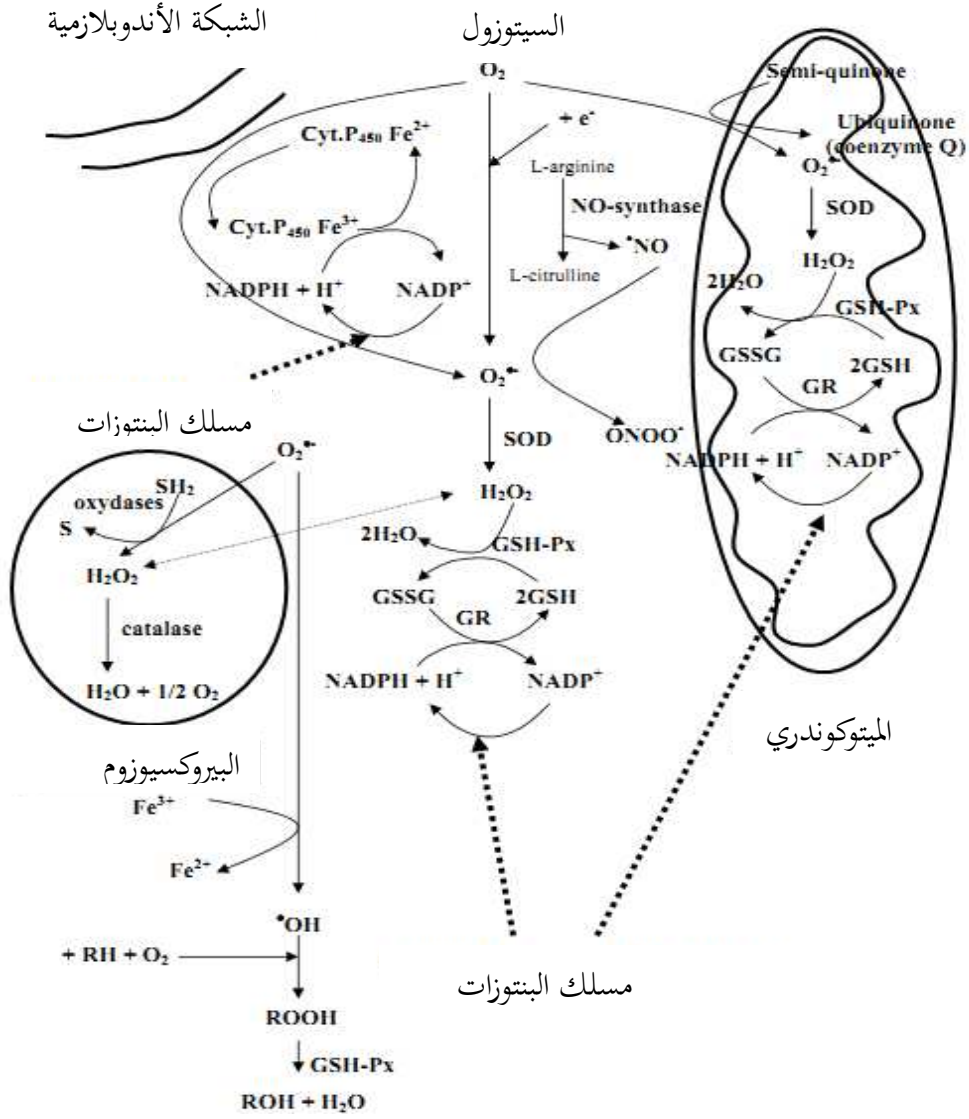
يتواجد إنزيم NADPH oxidase في العديد من الخلايا على مستوى الغشاء البلازمي، حيث يلعب دورا أساسيا في الاستجابة المناعية ضد العضيات الدقيقة و ذلك بإنتاج كميات عالية من جذر O_2^- وفق التفاعل التالي (Medow *et al.*, 2011):



كما يؤدي تنشيط NADPH oxidase و MPO في الحالات الإلتهابية إلى إنتاج HOCl (Medow *et al.*, 2011).

◀ إنزيم Xanthine oxidoreductase (XOR)

يقوم إنزيم XOR بإنتاج O_2^- و H_2O_2 خلال عملية تحويل الهيبوكزانثين إلى كزانثين والكزانثين إلى حمض اليوريا كما يقوم XOR بإنتاج جذر NO^\bullet خلال عملية تحفيز إرجاع nitrates و nitrites إلى nitrites و NO^\bullet على التوالي (Choi *et al.*, 2004).



الشكل 1: أهم المصادر الداخلية للأنواع الأكسجينية النشطة (Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2003).

إنزيم Nitric oxide synthase (NOS) <

يتواجد إنزيم NOS في أنسجة الثدييات على ثلاثة أشكال هي neuronal nitric oxide synthase (nNOS) و Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) و inducible nitric oxide synthase (iNOS)، تنظم نشاطية كل من nNOS و eNOS بواسطة التركيز الداخلي لأيونات الكالسيوم أو عن طريق الوسائط الالتهابية (Capettini *et al.*, 2010)، تقوم الأشكال الثلاثة بتحفيز إنتاج جذر NO• في العديد من الخلايا عن طريق

أكسدة L-arginine أو إرجاع nitrites (Vanin *et al.*, 2007).

◀ إنزيم Lipoxygenase (LOX)

يمثل إنزيم LOX مصدراً آخر للجذور الحرة في جدران الأوعية الدموية (Koshiishi, 2009)، حيث يتدخل الإنزيم 5-LOX في أكسدة الأحماض الدهنية غير المشبعة لإعطاء مشتقات هيدروبيروكسيد الأحماض الدهنية التي تعتبر سامة بالنسبة للخلايا، كما يتدخل في إنتاج أنواع أكسجينية أخرى عند تنشيط اللمفاويات البائية في مزارع خلوية (Werz et al., 2000).

ب- المصادر الخارجية

يتعرض الجسم لمختلف العوامل الخارجية التي يمكن أن تؤدي إلى تكوين الجذور الحرة، حيث تتسبب الأشعة فوق البنفسجية في إنتاج O_2^- و OH^\cdot و 1O_2 (Pavlou et al., 2009)، كما تؤدي أكسدة الأدوية و الكحولات على مستوى الكبد إلى زيادة إنتاج الجذور الحرة (Mari et al., 2010). تدخل عدة سموم منتشرة في الغذاء و المحيط (التبغ، المبيدات، الإضافات الغذائية..) في إنتاج الجذور الحرة عبر تنشيط الإنزيمات (Abdollahi et al., 2004). يقوم إنزيم Cyt p450 بتحويل carbone tetrachloride (CCl_4) في خلايا الكبد إلى CCl_3^\cdot ، هذا الأخير يتحول إلى CCl_3OO^\cdot في وجود الأكسجين ليبدأ الأكسدة الذاتية للأحماض الدهنية غير المشبعة (Lee et al., 2004). تعتبر المعادن السامة مثل الكروم (Cr)، النحاس (Cu) و vanadium (V) محفزات قوية لتفاعلات الأكسدة وإنتاج الجذور الحرة (Koivula et al., 2011)، كما يمكن للمخدرات مثل الكوكايين أن تسبب أضراراً تأكسدية على مستوى الجلد وذلك بتنشيطها لإنزيمي XOR و NOS (Portugal-Cohen et al., 2010).

2.1. تأثير الإجهاد التأكسدي على الجزيئات الداخلية

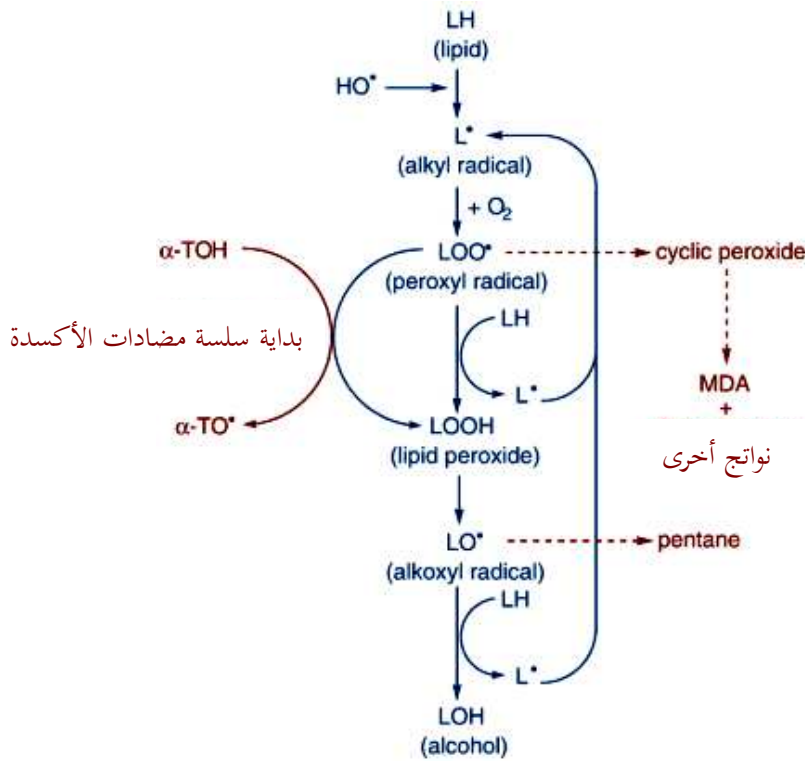
إن الإنتاج المفرط للأنواع الأكسجينية و الجزيئات المؤكسدة يلحق أضراراً بالجزيئات البيولوجية خاصة الليبيدات، بما في ذلك الكوليسترول الغشائي و الأحماض الدهنية الحرة والغشائية (Sachdev and Davies, 2008) و البروتينات (Negre et al., 2008) و DNA (Avouac et al., 2010).

1.2.1. فوق أكسدة الليبيدات

تحتوي الأغشية الخلوية على كميات كبيرة من البروتينات الدهنية و فوسفوليبيدات غنية بالأحماض الدهنية غير المشبعة، و التي تكون عرضة للجذور الحرة مؤدية إلى حدوث فوق أكسدة الليبيدات (Pratt *et al.*, 2011).

تتم عملية فوق أكسدة الليبيدات على ثلاثة مراحل (Sachdev and Davies, 2008):

- مرحلة البداية: أثناء هذه المرحلة يتشكل جذر (L[•]) alkyl radical، حيث يقوم الجذر OH[•] بمهاجمة للأحماض الدهنية غير المشبعة LH، وينزع هيدروجين من إحدى ذرتي كربون الرابطة الثنائية (الشكل 2).
- مرحلة الإنتشار: يتأكسد الجذر L[•] في وجود الأوكسجين إلى جذر (LOO[•]) peroxy radical، هذا التفاعل يدعى بفوق أكسدة الليبيدات والتي تشكل تفاعلات متسلسلة، لأن جذر LOO[•] المتشكل يتحول إلى جذر peroxyd (LOOH) عند تفاعله مع حمض دهني آخر مشكلا جذر L[•] جديد.
- مرحلة النهاية: تتوقف تفاعلات عملية فوق أكسدة الليبيدات إما بتدخل مركب مضاد للأكسدة مثل الفيتامين E لكسر للسلسلة أو تشكل هذه الجذور فيما بينها جزيئات غير جذرية (Maia *et al.*, 2010).



الشكل 2: آلية أكسدة الليبيدات (Sachdev and Davies, 2008).

يمكن للبروتينات الليبيدية الجارية في الدم أو الفوسفوليبيدات الغشائية أن تتعرض للهجوم التأكسدي إذ ينتج عن أكسدة هذه الليبيدات LDL المؤكسد الذي يلتهم من طرف البالعات، مشكلا بذلك ترسبات ليبيدية تكون سببا في الأمراض القلبية الوعائية (Sugamura and Keaney, 2011)، كما تسبب فوق أكسدة الليبيدات تغيرات في ميوعة ونفاذية الأغشية الخلوية و بالتالي تغيير وظائف العديد من المستقبلات و النواقل ونقل الإشارات الخلوية (Cazzola *et al.*, 2004).

2.2.1. أكسدة البروتينات

تعتبر البروتينات من المكونات السائدة في الخلية لذا فهي هدف من أهداف الجذور الحرة، إذ تطرأ على الجزئيات البروتينية تغيرات جوهريّة من خلال تفاعلات الأكسدة التي تستهدف الأحماض الأمينية (Negre *et al.*, 2008). ترتبط حساسية البروتينات تجاه الجذور الحرة بأنواع الأحماض الأمينية المكونة لها، حيث أن الأحماض الحاملة للوظيفة thiol (SH) و الأحماض الأمينية العطرية أكثر عرضة للأكسدة، بحيث تؤدي أكسدة مجاميع SH إلى تشكيل جسور ثنائية الكبريت، كما تؤدي التغيرات التأكسدية في الأحماض الأمينية العطرية إلى قطع السلاسل عديدات الببتيد (Ghezzi *et al.*, 2005). تؤدي أكسدة البروتينات إلى حجب مجموعة الأمين المؤينة أو إظهار المناطق الكارهة للماء المركزية، هذا التغيير يؤدي إلى تشكل كتل بروتينية-ليبيدية تعرف بـ lipofuscins المميزة للأنسجة المسنة (Hutter *et al.*, 2007)، كما أن البروتينات المتغيرة بالأكسدة تفقد نشاطها و خصائصها البيولوجية و تصبح أكثر عرضة للتحلل بواسطة الإنزيمات الحالة للبروتينات (Szweda *et al.*, 2002).

3.2.1. أكسدة DNA

تمثل الميتوكوندري المصدر الرئيسي ل ROS وبالتالي فإن مكوناتها تكون أكثر عرضة للأكسدة بما فيها DNA الميتوكوندري (حوالي 10 مرات أكثر من DNA النووي) (Avouac *et al.*, 2010). يوجد خمس أنواع رئيسية من الأضرار التأكسدية المحفزة بواسطة ROS: القواعد المؤكسدة، المواقع غير القاعدية، إضافة جزئيات بين ذراعي DNA وتكوين جسور-DNA-بروتين (Silva *et al.*, 2008). تتعرض القواعد المكونة ل DNA وخاصة الغوانين إلى

الأكسدة مؤدية إلى تشكيل قواعد متغيرة منها: 8-oxoguanine و Formamido و 8-oxo adenine،uracile و formamido pyimidine و 8-nitro guanine (Lagadu *et al.*, 2010). وقد يؤدي الإجهاد التأكسدي إلى قطع الرابطة الموجودة بين القاعدة و السكر الرببي مشكلا مواقع لا قاعدية (Chiu *et al.*, 2011).

3.1. الإجهاد التأكسدي وعلاقته بالأمراض

إن التأثيرات التي تحدثها الجذور الحرة على العديد من الجزيئات البيولوجية يمكن أن تؤدي إلى تغيرات في شكل ووظيفة ونمو الخلية (Cakir *et al.*, 2010)، حيث أظهرت كثير من الدراسات أن الإجهاد التأكسدي مرتبط بظهور العديد من الأمراض كعامل محفز لها أو بالمضاعفات المطورة لها (Tunez *et al.*, 2011). ترتبط معظم الأمراض المحفزة بالإجهاد بالسن، لأن الشيخوخة تخفض من الدفاع المضاد للأكسدة لجذور وتزيد من إنتاج الميتوكوندري للجذور الحرة (Balaban *et al.*, 2005)، بعض الأمراض التي يعتبر الإجهاد التأكسدي محفزا رئيسيا لها موضحة في الجدول 1.

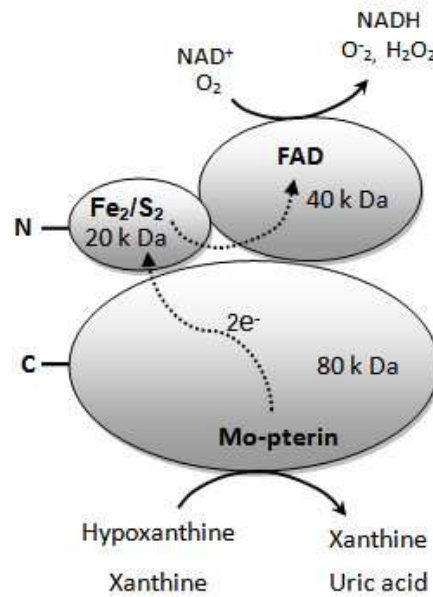
الجدول 1. بعض الأمراض المتعلقة بالإجهاد التأكسدي و الجذور الحرة.

الأمراض	المرجع
السرطان	(Martinez-Outschoorn <i>et al.</i> , 2010)
أمراض القلب والأوعية	(Lakshmi <i>et al.</i> , 2009)
السكري	(Kashihara <i>et al.</i> , 2010)
Alzheimer, Parkinson	(Filosto <i>et al.</i> , 2011)
الالتهاب	(Syrkina <i>et al.</i> , 2008)
التهاب المفاصل	(Wruck <i>et al.</i> , 2011)
الشيخوخة	(Romano <i>et al.</i> , 2010)
الحساسية	(Li <i>et al.</i> , 2010)

2. الإنزيم المؤكسد المرجع للكرانثين (XOR) Xanthine oxidoreductase

1.2. بنية إنزيم XOR

الإنزيم المؤكسد المرجع للكرانثين (XOR) عبارة عن معقد فلافوبروتين معدني (metallo-flavo-protein) تم إكتشافه سنة 1902 في حليب البقر من طرف Franz Schardinger وعرف بإسم إنزيم Schardinger إلى غاية 1935 حيث أعيد تسميته بـ Xanthine oxidoreductase (XOR) (Booth, 1935). يتكون إنزيم XOR من تحت وحدتين متماثلتين (147 كيلودالتن) تحتوي كل واحدة على مركز نشط خاص بها وغير مستقلة تحفيزيا (Brondino *et al.*, 2006). تتكون كل تحت وحدة من ثلاث مجالات مرتبطة مع العوامل المساعدة Mo و FAD و Fe_2/S_2 على التوالي (الشكل 3) (Nishino *et al.*, 2005).



الشكل 3: البنية الجزيئية لتحت وحدة إنزيم XOR و الإنتقال الإلكتروني بين مراكزها (Brondino *et al.*, 2006).

تتواجد مورثة الإنزيم عند الإنسان على مستوى الشريط p 22 للكروموزوم 2 وتتركب من exon 36 و intron 35 ومكونة من أكثر من 60000 نيكليوتيدية (Saksela *et al.*, 1998). المتتالية البروتينية لإنزيم XOR للإنسان تتكون من 1333 حمض أميني وتشابهه بنسبة 91% مع كل من المتتالية البروتينية للفأر (Garattini *et al.*, 2003). يتواجد إنزيم XOR عند الثدييات على شكل نمطين قابلين للتحويل فيما بينهما : نمط مرجع (XDH)

(EC 1.17.3.2) Xanthine oxidase (XO) و نمط مؤكسد (EC 1.17.1.4) Xanthine dehydrogenase

(Nishino *et al.*, 2005).

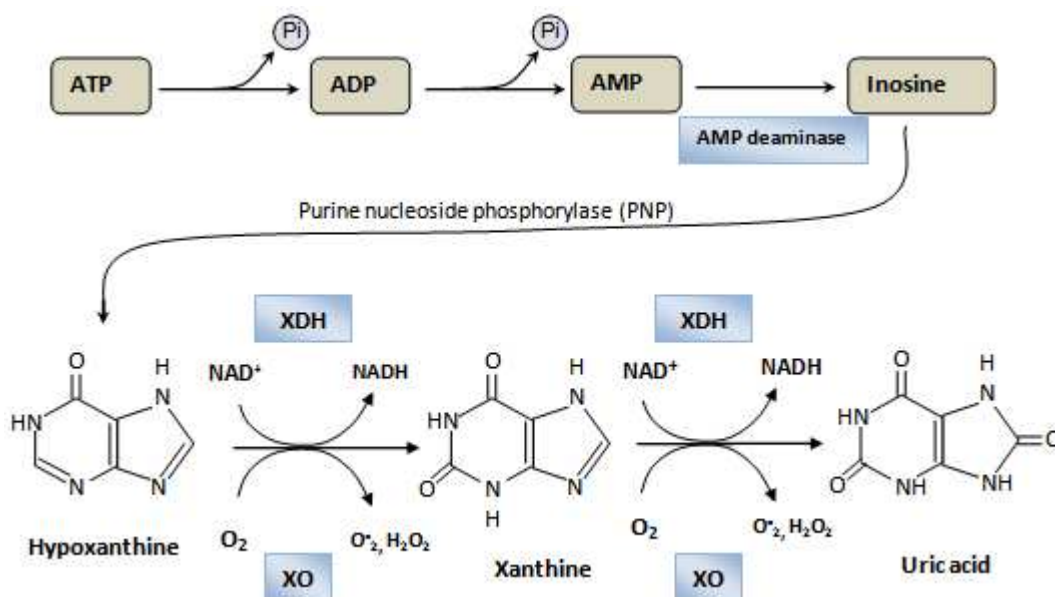
2.2. المميزات التحفيزية و آلية عمل إنزيم XOR

يحفز إنزيم XOR أكسدة العديد من مواد التفاعل المانحة للإلكترونات مثل الحلقات العطرية غير المتجانسة (purines، pyrimidines، pteridines و azapurines)، الألدهيدات الأليفاتية و مشتقاتها الهيدروكسيلية (Choi *et al.*, 2004). إلا أن الدور الرئيسي لإنزيم XOR هو تحفيز المرحلة الأخيرة من هدم البيورينات وذلك بأكسدة الهيبيوكزانتين إلى كزانتين والكزانتين إلى حمض اليوريا مع الإرجاع المتزامن لحزينة NAD^+ أو O_2 بآلية تفاعلية من نوع ping-pong، هذا النوع من التحفيز يشمل نصف تفاعلين: أكسدة وإرجاع مع تحويل للإلكترونات داخل الحزينة (Metz and Thiel, 2009). أظهرت الدراسات أن كل مواد التفاعل المرجعة للإنزيم تتفاعل مع المركز Mo مانحة إياه إلكترونين والذي ينتقل من الحالة المؤكسدة Mo^{VI} إلى الحالة المرجعة Mo^{IV} ، يعاد أكسدة Mo^{IV} من جديد إلى Mo^{VI} وذلك بانتقال إلكترونين إلى المركز Fe/S، الذي يعتبر كخزان للإلكترونات ومنه إلى المركز FAD، و الذي يرجع إلى $FADH_2$ مع تحرير الناتج (Metz and Thiel, 2009). الإنزيم المرجع يعاد أكسدته بانتقال الإلكترونات الأتية من المركز FAD إلى المادة المؤكسدة، في التفاعل المحفز بواسطة XDH، هذا التفاعل النصفى المؤكسد ينتهي بإرجاع NAD^+ إلى $NADH$ ، أما في حالة التحفيز بواسطة XO فالمادة المؤكسدة هي O_2 وإرجاعه الأحادي أو الثنائي ينتج على التوالي O_2^- و H_2O_2 (Choi *et al.*, 2004). في حالة نقص الأكسجين يقوم إنزيم XOR بتحفيز إرجاع (NO_3^-) nitrates إلى (NO_2^-) nitrites و nitrites إلى NO^* وذلك بنقل إلكترونين من المركز Mo إلى nitrates و nitrites (Doel *et al.*, 2001).

3.2. دور إنزيم XOR

1.3.2. الأدوار الفيزيولوجية ل XOR

يعتبر إنزيم XOR جزء من آليات المناعة الطبيعية المضادة للميكروبات، حيث أن النشاطية العالية للإنزيم في الأمعاء تساعد على الحماية من البكتيريا و تقلل من ظهور الالتهابات (Martin *et al.*, 2004)، كما يملك XOR تأثيرات مضادة للجراثيم و نمو البكتيريا بألية معتمدة على NO^{\cdot} (Clare *et al.*, 2008). يشارك إنزيم XOR في الدفاع المضاد للفيروسات وذلك بتحفيز تحول retin-aldehyde إلى حمض retinoic لأن مشتقات هذا الحمض بإمكانها تثبيط التضاعف الفيروسي (Taibi *et al.*, 2001). بالإضافة إلى الدور المناعي للإنزيم، يبقى تحفيز المرحلة الأخيرة من هدم البيورينات و إنتاج حمض اليوريا الدور الرئيسي للإنزيم (الشكل 4)، إذ يؤدي نقص إنزيم XOR إلى زيادة مستوى xanthine في الدم المعروف بـ xanthinuria (Leimkuhler *et al.*, 2003).



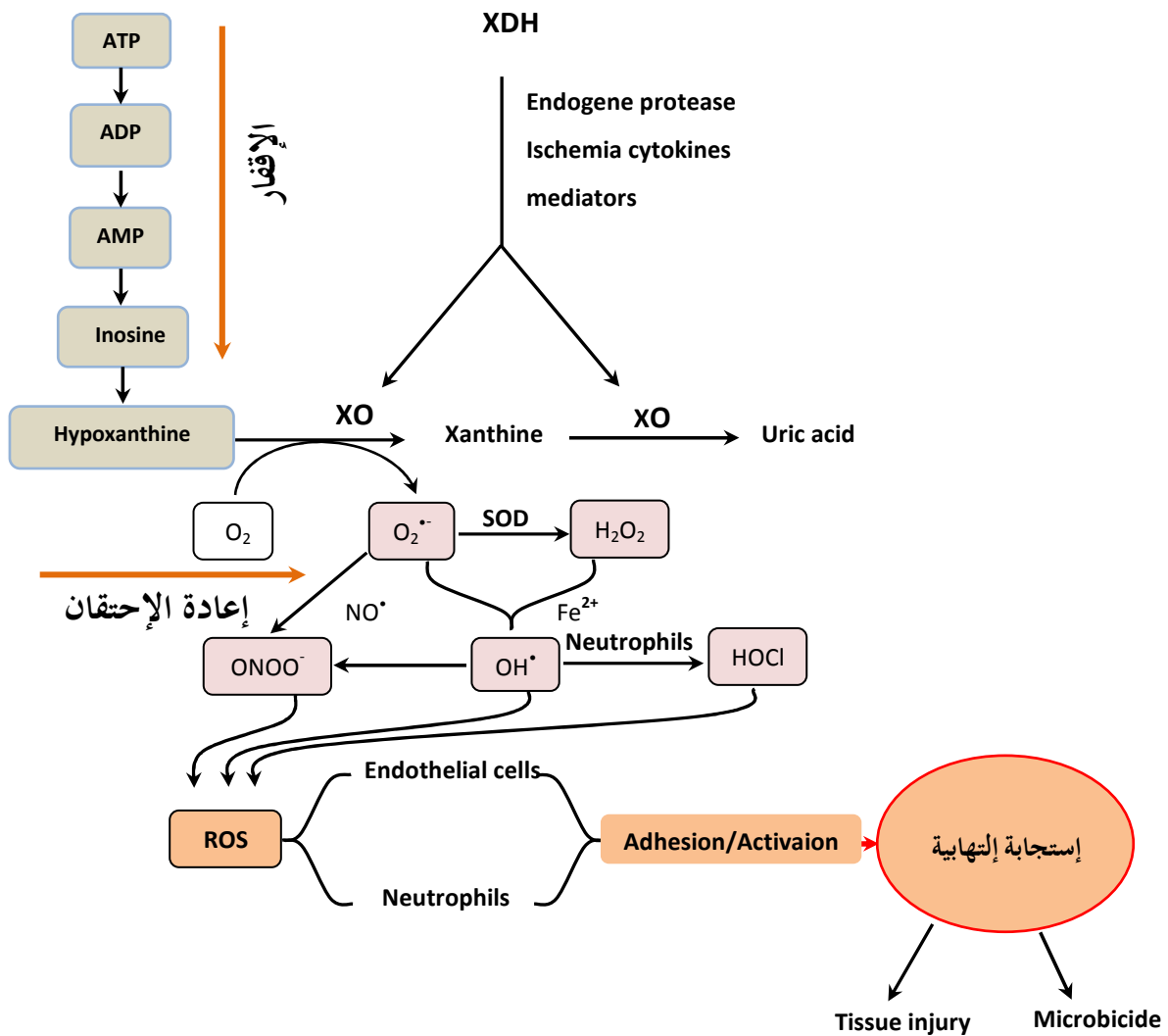
الشكل 4: هدم البيورينات بواسطة إنزيم XOR (Choi *et al.*, 2004).

2.3.2. الأدوار المرضية لإنزيم XOR

يتدخل إنزيم XOR في العديد من الحالات المرضية الالتهابية، إذ يؤدي تثبيط إنزيم XOR بواسطة allopurinol (المثبط المتخصص ل XOR) إلى خفض العملية الالتهابية (Muir *et al.*, 2008). كما تشارك الأنواع الأكسجينية

النشطة التي ينتجها XOR في أكسدة الجزيئات الحيوية و إصابة بنى الأنسجة (Misra *et al.*, 2009). يعتبر إرتفاع مستويات حمض اليوريا في الدم (hyperuricemia) من العوامل التي تؤدي إلى الإلتهابات و ظهور ما يعرف بمرض النقرس (Chilappa *et al.*, 2010).

يرتبط إنزيم XOR بالإقفار و إعادة الإحتقان (ischemia/reperfusion) الذي يحدث أثناء الصدمات والجلطات الدماغية أو أثناء زرع الأعضاء أو العمليات الجراحية على الأوعية (Lehmann, 2009)، ولقد أفترض أن الأضرار التي تلحق بالأنسجة بعد إعادة الإحتقان (reperfusion) الذي يلي الإقفار (ischemia) هي ناتجة عن ROS التي ينتجها XOR (الشكل 5) (Misra *et al.*, 2009; McCord *et al.*, 1985).



الشكل 5: آلية تدخل XOR في عملية الإقفار وإعادة الإحتقان (Meneshian and Bulkley, 2002).

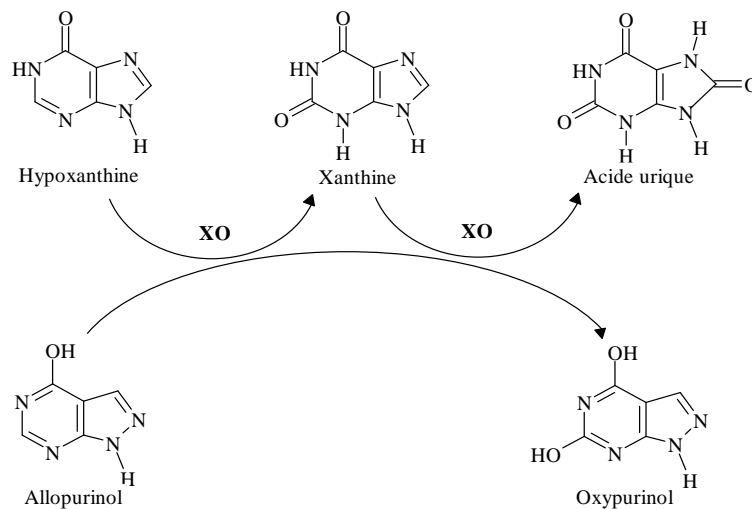
أثبتت الدراسات تدخل الإنزيم في تطور أمراض القلب و الأوعية، حيث أن إرتفاع مستويات حمض اليوريا في الدم يؤدي إلى ظهور الأمراض الوعائية و القلبية خاصة عند الأشخاص المصابين بالسكري (Riegersperger *et al.*, 2011)، كما يتدخل NO الناتج عن XOR في إرتفاع الضغط الشرياني (Suziki, 1998).

4.2. مثبطات XOR

نظرا للدور الذي تلعبه نواتج إنزيم XOR في الإصابة أو تطور بعض الأمراض، فإن دراسة مثبطاته تحظى بأهمية بالغة وهذا لتأثيرها العلاجي، تتنوع مثبطات XOR حسب طبيعة المثبط و آلية التثبيط، قد تكون مشابهة لمادة التفاعل أو غير مشابهة لها (Kumar *et al.*, 2011).

1.4.2. مثبطات تشبه مادة التفاعل

تضم المثبطات المشابهة لمادة التفاعل كل من allopurinol و oxypurinol و مجموعة من البتيرينات وبعض الحلقات العطرية غير المتجانسة (Peglow *et al.*, 2011). يستعمل المثبط allopurinol كدواء لعلاج مرض النقرس و الأضرار التي تنجم عن الإقفار و إعادة الاحتقان (Chilappa *et al.*, 2010). يقوم XOR بأكسدة allopurinol الذي يشبه في بنيته hypoxanthine إلى oxypurinol الذي يشبه في بنيته xanthine، يملك oxypurinol شراهة كبيرة للإنزيم و يشكل معه مركب جد مستقر (الشكل 6) (Borges *et al.*, 2002).



الشكل 6: آلية تثبيط XOR بواسطة allopurinol (Borges *et al.*, 2002).

يمكن ل alloxanthine الذي ينتمي إلى pyrazolo[3,4-d]pyrimidines والذي يشبه مادة التفاعل و allopurinol أن يثبط إنزيم XOR (Tai and Hwang, 2001).

2.4.2. مثبطات أخرى

يضم الصنف الثاني من المثبطات غير المشابهة في بنيتها لمادة التفاعل، حيث يمكن لحمض folic أن يتفاعل مع إنزيم XO و يثبطه بشكل تنافسي (Nishino and Tsushima, 1986)، وقد يثبط الإنزيم بتركيز عالي من مادة التفاعل الهيبوكزانتين، أو بنواتج تفاعله مثل حمض اليوريا بشكل لا تنافسي (Maloyan et al., 2009)، كما يستطيع arsenite تثبيط XOR بواسطة التفاعل مع المركز Mo وتمنع إنتقال الإلكترونات بين المركزين Fe/S و FAD (Amado et al., 2005). تستطيع بعض قواعد Schiff تثبيط إنزيم XO بشكل كبير (You et al., 2008). من بين المركبات التي درست بصورة واسعة كمثبطات لإنزيم XOR هي المركبات الطبيعية المعزولة من النباتات، هذه المركبات تتغير بكثرة و تملك أهمية بالغة في العلاج، حيث بإمكان الفلافونويدات أن تثبط XO بشكل تنافسي وقوي مثل مشتقات apigenin (Jiao et al., 2006)، يمكن ل aloneic acid dilactone المستخلص من نبات *Lagerstroemia speciosa* أن يثبط إنزيم XOR بفعالية أكبر من allopurinol (Unno et al., 2004).

3. مضادات الأكسدة

يطلق مصطلح مضادات الأكسدة على كل مادة أو مركب له فعالية ضد الأضرار التأكسدية و يعمل على تأخير أو الوقاية من فعل الجذور الحرة، تعمل مضادات الأكسدة على الحماية بعدة طرق إما بالتثبيط المباشر لإنتاج ROS أو منع انتشارها أو هدمها (Miquel, 2002). تستعمل الخلية العديد من الآليات المضادة للأكسدة، وتختلف طبيعة هذه الأنظمة المضادة للأكسدة حسب الأنسجة والنوع الخلوي وحسب تواجدها في الوسط داخل وخارج الخلوي. تقسم الأنظمة المضادة للأكسدة إلى أنظمة إنزيمية وأخرى غير إنزيمية.

1.3. مضادات الأكسدة الإنزيمية

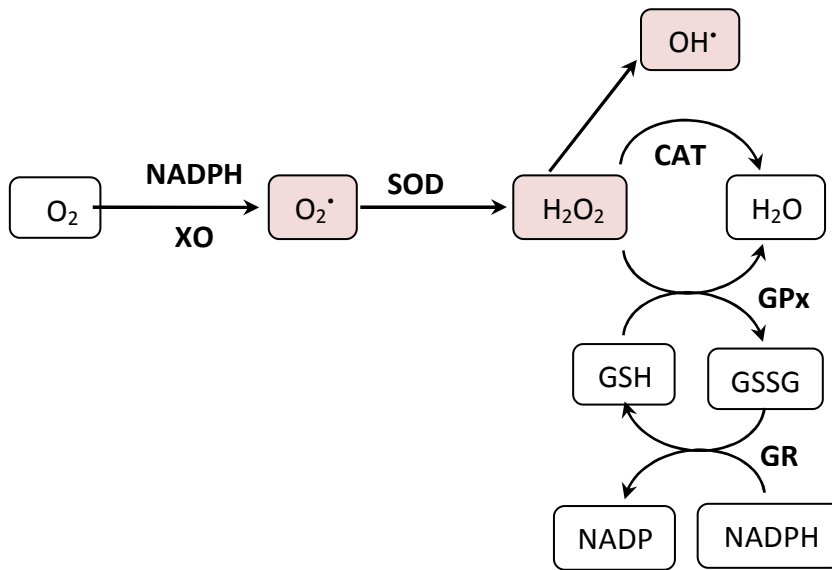
يملك الجسم العديد من الإنزيمات المضادة للأكسدة لأهمها SOD و CAT و GPX (Desai *et al.*, 2010).

1.1.3. إنزيم Superoxide dismutase

يعتبر إنزيم Superoxide dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) من الإنزيمات التي تدخل في تحليل النواتج السامة

للميتابوليزم الخلوي، فهو يقوم بإزالة الجذر $O_2^{\cdot-}$ وذلك بتسريع معدل تحوله إلى H_2O_2 بمساعدة بعض المعادن مثل

السيلينيوم والنحاس والزنك (الشكل 7) (Fukai and Ushio-Fukai, 2011).



الشكل 7: آلية التخلص من جذر $O_2^{\cdot-}$ بواسطة الإنزيمات المضادة للأكسدة (Shilina, 2009).

يوجد ثلاث نظائر إنزيمية لـ SOD عند الثدييات والتي تختلف حسب توزيعها الخلوي و المعادن المرتبطة بها، إذ تميز

الشكل Cu/Zn-SOD الذي يتواجد أساسا في السيتوزول و النواة، و الشكل Mn-SOD الذي يتواجد في

المتكوندري، أما الشكل Ec-SOD فيتواجد خارج الخلية (Yen *et al.*, 2009).

2.1.3. إنزيم Catalase

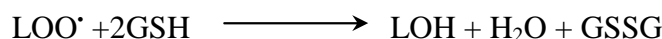
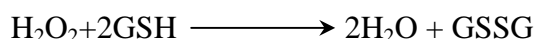
يتكون إنزيم Catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) من أربع تحت وحدات، تحتوي كل وحدة على مجموعة

هيم مرتبطة بالموقع النشط (Odajima *et al.*, 2010). يوجد إنزيم CAT في أغلب الكائنات الحية وفي كل أعضاء

الجسم ويتركز خاصة في الكبد و كريات الدم الحمراء و الكلى وبكميات قليلة في المخ والقلب و العضلات الهيكلية، كما يتواجد في الميتوكوندري و السيتوزول و البيروكسيزومات (Day, 2009). يعمل CAT على التخلص من H_2O_2 وذلك بتحويله إلى H_2O و O_2 (الشكل 7) (Odajima *et al.*, 2010).

3.1.3 إنزيم Glutathion peroxidase و إنزيم Glutathion reductase

ينتشر كل من Glutathion peroxidase (GPx) و Glutathion reductase (GR) في العديد من الأنواع الخلوية، حيث يتمركزان في الميتوكوندري و السيتوزول، و يعتبران من أهم الأنظمة الإنزيمية المضادة للأكسدة، وذلك لقدرتهما على إزاحة عدد من الجذور والهيدروبيروكسيديات الناتجة عن أكسدة الكوليسترول والأحماض الدهنية وفق التفاعلات الآتية (Herbette *et al.*, 2007):



يقوم إنزيم GR بإعادة تجديد GSH (γ -glutamyl-cysteinyl-glycine) انطلاقاً من GSSG، و يتطلب هذا التفاعل عامل مساعد هو NADH (الشكل 7).

4.1.3 Peroxiredoxins

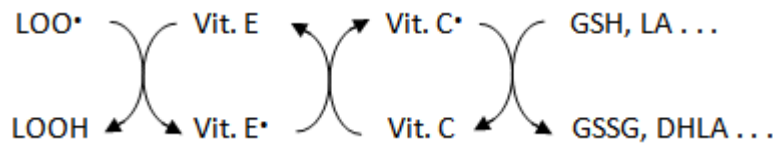
تعرف Peroxiredoxins أيضاً بإسم thioredoxin peroxidase، وقد تم تحديد فعلها المضاد للأكسدة حديثاً (Piacenza *et al.*, 2008)، توجد ستة أنواع منها عند الثدييات تتوضع أساساً في السيتوزول و الميتوكوندري، كما تتصل هذه البروتينات بالنواة و الأغشية الخلوية (Wu *et al.*, 2011). تقوم Peroxiredoxins بتحويل كل من H_2O_2 و NO^\bullet و $ONOO^-$ وذلك بفضل النشاطية peroxidase (Flohe and Ursini, 2008). رغم فعاليتها الضعيفة مقارنة بـ CAT و GPx إلا أن هذه البروتينات تلعب دوراً مهماً في التخلص من الهيدروبيروكسيديات وذلك لكميتها المعتبرة، إذ تمثل 0.1-0.8 % من البروتينات الحرة الخلوية (Alvarez *et al.*, 2011).

2.3. مضادات الأكسدة غير الإنزيمية

على عكس مضادات الأكسدة الإنزيمية، معظم هذه المركبات لا تنتج من طرف العضوية وقد تأتي من الأغذية تشمل هذه المركبات كل من الجزئيات الصغيرة مثل الفيتامينات Vit. E و Vit. C و glutathion و ubiquinone (Karthikeyan and Rani, 2003). كما يمكنها أن تكون داخلية المنشأ مثل coenzyme Q والميلاتونين وحمض اليوريا (Bodzek and Wielkoszynski, 2003). تتميز مضادات الأكسدة غير الإنزيمية بأوزان جزيئية منخفضة والقدرة على الوقاية و/أو الحد من أضرار الإجهاد التأكسدي (Yin and Chan, 2007).

1.2.3. الفيتامين C و الفيتامين E

يقوم كل من Vit. E و Vit. C بمساعدة النظام الدفاعي للجسم على إزالة سمية بعض المواد الكيميائية وذلك عن طريق عملية الأكسدة والاختزال في الجسم (Calabrese *et al.*, 2010). يمكن لـ Vit. C أن يقوم بإزاحة كل من OH^{\bullet} ، $O_2^{\bullet-}$ و NO^{\bullet} الناتجة عن الأيض الخلوي $O_2^{\bullet-}$ و OH^{\bullet} و NO^{\bullet} ، كما يمكنه إستخلاص المعادن و منع أكسدة LDL (Traber, 2007). يعتبر α -tocopherol و المعروف باسم Vit. E من المركبات المضادة للأكسدة الذاتية في الدهون، يتواجد على مستوى الأغشية ويثبط سلسلة تفاعلات فوق أكسدة الدهون (Traber, 2007). يتفاعل فيتامين E مع الجذور الليبيدية و يمنع انتشارها، حيث يعمل على إستخلاص هذه الجذور ويتحول بدوره إلى جذر حر لكنه أقل نشاطا مقارنة بجذر البيروكسيل (LOO^{\bullet}) (Naziroglu *et al.*, 2010)، كما يعمل Vit. C على الرفع من فعالية Vit. E (الشكل 8) وذلك بإرجاع الجذر α -tocopheryl (α -TO $^{\bullet}$) (Ryan *et al.*, 2010).



الشكل 8: آلية التخلص من الجذور الليبيدية بواسطة Vit. E و Vit. C و الجلثاثيون (Ryan *et al.*, 2010).

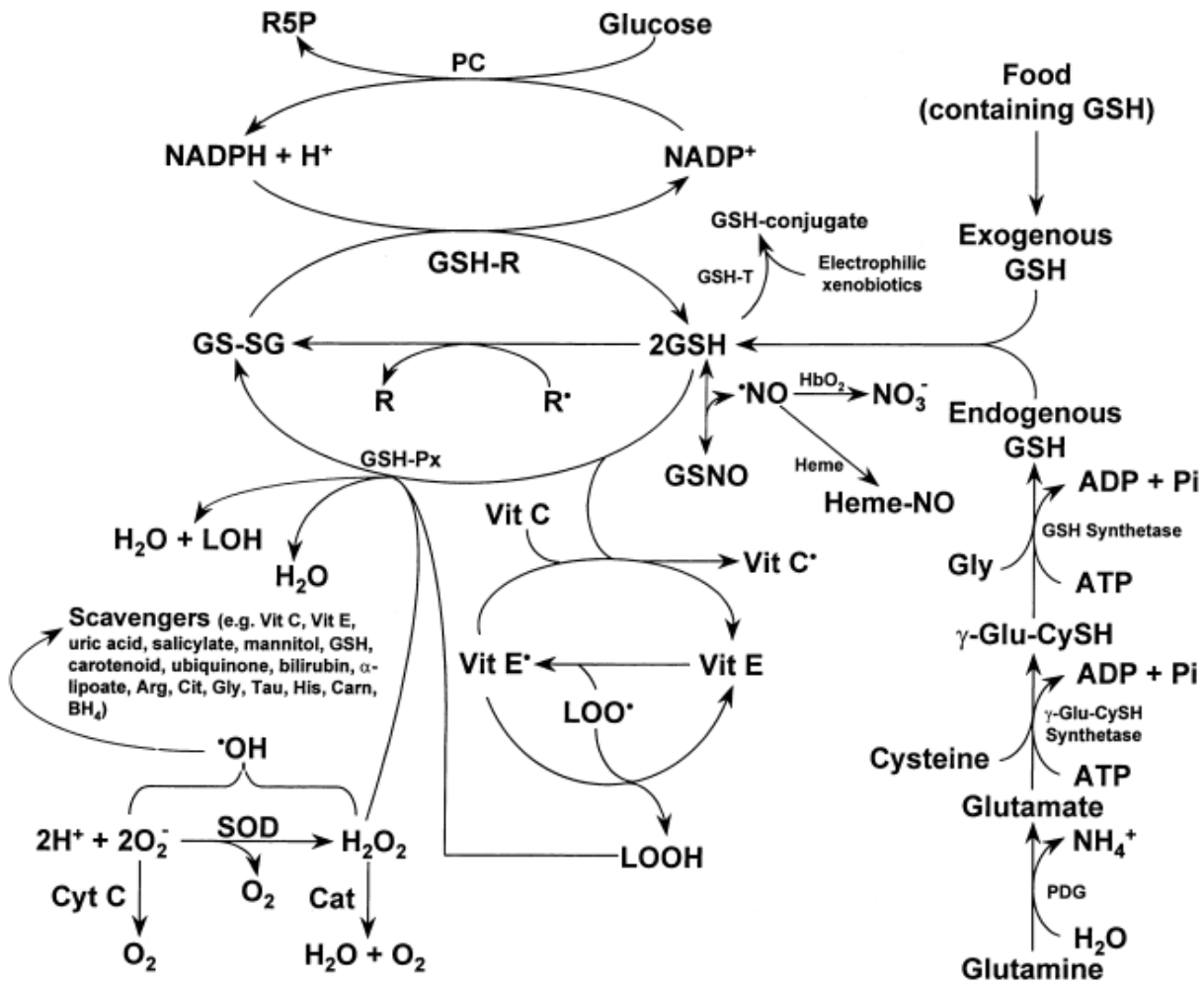
2.2.3. الجلثاثيون Glutathion

الجلثاثيون (GSH) عبارة عن ببتيد قصير مكون من ثلاثة أحماض أمينية هي glutamic و cysteine و glycine، يوجد الجلثاثيون في الأنسجة الحيوانية ويلعب دوراً مهماً كمضاد للأكسدة داخل الجسم، حيث يحمي الخلية من التلف التأكسدي عبر اختزال البيروكسيداز و جذر $\alpha\text{-TO}^\bullet$ (Jan *et al.*, 2011)، كما يعمل GSH كمساعد لإنزيم GPx و Glutathion S transfrase (Rybka *et al.*, 2011). يستطيع GSH التفاعل مباشرة مع الجذور الحرة مثل $\text{O}_2^{\bullet-}$ و OH^\bullet و LO^\bullet و LOO^\bullet ، حيث تفقد مجموعة الكبريت ذرة هيدروجين مما يؤدي إلى إنتاج جذر (GS^-) thiyl، بإمكانه الانضمام إلى جذر آخر لتكوين جزيئة (GSSG) (Biljak *et al.*, 2010).

3.2.3. الفلافونويدات

الفلافونويدات عبارة عن مركبات نباتية من عائلة عديدات الفينول تملك بنيات كيميائية مختلفة وقد حظيت حديثاً باهتمام كبير لنشاطيتها الحيوية الكبيرة، إذ تساهم في الدفاع الخلوي المضاد للأكسدة و الوقاية من العديد من الأمراض المزمنة المتعلقة بالإجهاد التأكسدي (Martinez *et al.*, 2002). تقوم الفلافونويدات بالتأثير المضاد للأكسدة عن طريق تثبيط الإنزيمات المنتجة للجذور الحرة، أو إزاحة هذه الجذور و إستقلاب المعادن و/أو تحريض تعبير الإنزيمات المضادة للأكسدة، وتحديد الأنظمة المضادة للأكسدة (He *et al.*, 2010).

يعتبر أخصائيو التغذية أن تعزيز النظام الغذائي الطبيعي الشامل بمعظم أنواع مضادات الأكسدة يؤدي إلى إطالة فترة حياة الكائن وتحسين صحته وتخفيف علامات الشيخوخة (Schroeksnadel *et al.*, 2010). تعمل مضادات الأكسدة بصفة عامة كمجموعة واحدة متكاملة ضد أنواع مختلفة من الجذور الحرة في أجزاء مختلفة من الخلايا وفي مواضع مختلفة من الجسم وبطرق مختلفة أيضاً (الشكل 9)، أي أن تأثيرات مضادات الأكسدة مجتمعة تكون أفضل من تأثير كل مضاد أكسدة بمفرده، كما تستعيد بعض مضادات الأكسدة فاعليتها بواسطة مضادات الأكسدة الأخرى، وهذه إحدى الأسباب الهامة لتأثيرها التآزري (Wang *et al.*, 2011).



الشكل 9: إزاحة الأنواع الأكسجينية والنتروجينية النشطة بواسطة الأنظمة المضادة للأكسدة (Fang *et al.*, 2002).

4. عديدات الفينول

عديدات الفينول هي مستقبلات ثانوية نباتية، تتميز بنيتها الأساسية بوجود حلقة عطرية أو أكثر مرتبطة بعدة مجاميع هيدروكسيل (Manach *et al.*, 2004). تنقسم عديدات الفينول حسب درجة عدم تشبعها وأكسدتها (وجود الأكسجين) في الحلقة الوسطى إلى ثلاث أقسام: الأحماض الفينولية، الفلافونويدات و الدباغ، تمثل الفلافونويدات القسم الأكبر منها (Quideau *et al.*, 2011).

1.4. الأحماض الفينولية Phenolic acids

الأحماض فينولية هي مركبات قابلة للذوبان في المذيبات العضوية القطبية. تنقسم إلى ثلاث أقسام، أحماض فينولية

بسيطة و أحماض مشتقة من حمض البنزويك وأحماض مشتقة من حمض السيناميك (Iakovleva *et al.*, 2007). يعتبر القسم الأول نادرا ما عدا مركبات hydroquinone التي توجد في العديد من العائلات النباتية، أما الأحماض المشتقة من حمض البنزويك تتواجد عموما في الحالة الحرة، كما يمكن أن ترتبط بسكريات أو أسترات (حمض الغاليك). بينما تنتشر الأحماض المشتقة من حمض السيناميك بكثرة ويعتبر حمض caffeic وحمض ferulic من الأنواع الرئيسية لها (Mandal *et al.*, 2010). يوجد حمض caffeic بكثرة في القهوة (Wang and Ho, 2009) أما حمض ferulic فيتواجد في الأغذية الغنية بالحبوب (Manach *et al.*, 2004).

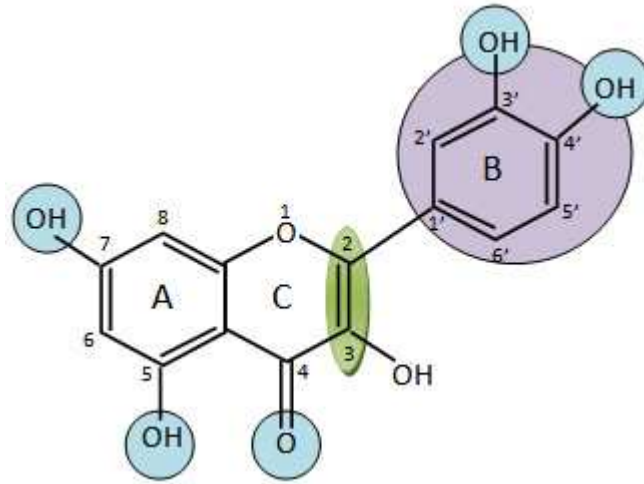
2.4. الدباغ Tannins

تتواجد الدباغ تقريبا في كل جزء من النبات (الأوراق ، القشرة ، الثمار، الجذور)، وزنها الجزئي يتراوح ما بين 500 إلى 30000 دالتون، تقسم الدباغ إلى مجموعتين دباغ قابلة للإماهة (Hydrolyzable tannins) ودباغ مكثفة (Condensed tannins) (Hellstrom *et al.*, 2009). تتكون الدباغ القابلة للإماهة من مركز سكري غالبا ما يكون الغلوكوز، أما الدباغ المكثفة فهي عبارة عن تكاثف وحدات من Flavan3-ols (Romani *et al.*, 2006) كما تتميز الدباغ بخاصية الارتباط بالبروتينات مشكلة معها معقدات (Charlton *et al.*, 2002).

3.4. الفلافونويدات Flavonoids

الفلافونويدات عبارة عن عائلة واسعة من المركبات الفينولية التي ينتجها النبات، تحتوي على أكثر من 6000 نوع (Buer *et al.*, 2010). تملك الفلافونويدات بنية كيميائية مشتركة يتكون فيها الهيكل الكربوني من 15 ذرة كربون (C6-C3-C6) موزعة على حلقتين عطريتين سداسيتين (حلقة A و B) مرتبطين بحلقة غير متجانسة pyrane أو pyrone، تدعى الحلقة C (الشكل 10) (Cazarolli *et al.*, 2008). تتوزع الفلافونويدات بكثرة في الأوراق والقشرة وفي الأزهار، كما تنتشر بكثرة في الخضر الورقية (Cazarolli *et al.*, 2008). تساهم الفلافونويدات في إعطاء النكهة ولون الأزهار و الثمار و الأوراق، حيث أن غالبية الألوان عبارة عن Chalcone و Aurones

وAnthocyanins، كما لها دور في نمو وتكاثر النبات و المقاومة ضد العوامل الممرضة للنبات و الأشعة UV (Tanaka *et al.*, 2008). تؤدي التغيرات الحاصلة على مستوى الحلقات إلى وجود عدة أقسام من الفلافونويدات و مشتقاتها التي تختلف فيما بينها في عدد و مواقع مجاميع OH، وكذلك في طبيعة ومدى الارتباط بالسكريات هذه الأقسام هي: Flavanonols و Flavanones و Flavonols و Isoflavones Flavanols و Anthocyanins، Aurones و Chalcone، Flavan3-ols و Flavan3,4diols (Schijlen *et al.*, 2004).



الشكل 10: الشكل العام للفلافونويدات و أهم المواقع المتدخلة في تأثيراتها الحيوية (Cazarolli *et al.*, 2008).

1.3.4. النشاطية الحيوية للفلافونويدات

أثبتت كثير من الدراسات أن تناول الأغذية الغنية بالمركبات الفينولية خاصة الفلافونويدات لها تأثيرات إيجابية على الصحة، إذ تتميز الفلافونويدات بتأثيرات حيوية مختلفة: كمضادات أكسدة (Martinez *et al.*, 2002) وكمضادات إلتهاب (Tunon *et al.*, 2009)، و كمضادات للحساسية (Ganapaty *et al.*, 2010) و كمضادات للبكتيريا (Alvarez *et al.*, 2008) كما تحمي من أمراض القلب و الأوعية (Hooper *et al.*, 2008) و مرض السرطان (Saif *et al.*, 2009) و لها دور في حماية الجهاز العصبي (Gutierrez-Merino *et al.*, 2011).

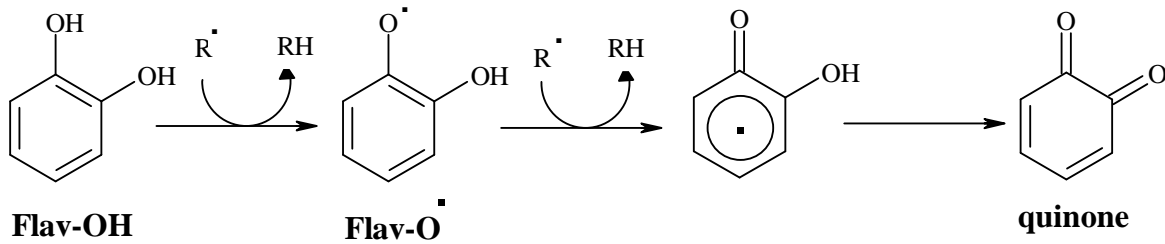
2.3.4. التأثيرات المضادة للأكسدة للفلافونويدات

يعود التأثير الوقائي للفلافونويدات من الأمراض أساسا إلى تأثيراتها المضادة للأكسدة، إذ بإمكانها أن تمنع

الإصابات الناتجة عن الجذور الحرة بعدة طرق منها: إزاحة الجذور الحرة، إستحلاب الأيونات المعدنية المسؤولة عن إنتاج ROS، تثبيط الإنزيمات المسؤولة عن تشكيل هذه الجذور، تنشيط و تجديد الأنظمة المضادة للأكسدة (Cazarolli *et al.*, 2008).

◀ تفاعل الفلافونويدات مع الجذور الحرة و المعادن

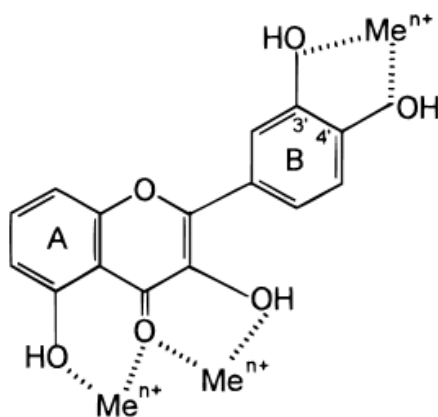
تملك الفلافونويدات بنية خاصة تمكنها من التفاعل مع الأنواع الجذرية و إعطائها إستقرارية أكبر، حيث تقوم الفلافونويدات (Flavon-OH) بإرجاع الجذور الأكسجينية (R[•]) مثل O₂^{-•} و OH[•] و LO[•] و LOO[•] و ذلك بنقل الهيدروجين أو إلكترون (الشكل 11)، تتفاعل النواتج (الجذور الفلافونويدية) المؤكسدة مع بعضها لإنتاج بنية quinine مستقرة (Pietta, 2000)، كما تتعرض الفلافونويدات إلى عدة تغيرات بعد إمتصاصها منتجة بذلك أشكال مختلفة التي بإمكانها أن تعمل كعوامل مرجعة و مزيجة ل ROS (He *et al.*, 2010).



الشكل 11: تفاعل الفلافونويدات مع ROS (Pietta, 2000).

في دراسة قام بها De Souza و De Giovanni (2004) على التأثير المضاد للأكسدة لكل من quercetin و rutin و catechin و galangin وجد أن التأثير الإزاحي لهذه الفلافونويدات مجتمعة على O₂^{-•} يكون أكثر فعالية من تأثير كل واحد على حدى، و إفترض أن هذه الفعالية العالية ترجع لإمتلاك مركز إضافي لإزاحة O₂^{-•}. تمنع الفلافونويدات أكسدة الليبيدات على عدة مستويات، حيث يمكنها إزاحة جذور proxyl الناتجة عبر مختلف مراحل أكسدة الليبيدات أو تقوم بإرجاع α-tocopheryl على مستوى الأغشية (Patel *et al.*, 2001)، كما إن قدرة الفلافونويدات على تثبيط فوق أكسدة الليبيدات مرتبطة ببنيتها الكيميائية، حيث أن وجود مجموعة

catechol يرفع من هذه النشاطية (Mukai *et al.*, 2005). تتفاعل الفلافونويدات مع المعادن و تشكل معها مركبات مستقرة (الشكل 12) مانعة بذلك تشكل ROS عبر تفاعل Fenton (Pietta, 2000)، فمثلا تفاعل quercetin مع أيونات الحديد (المصدر الهام لهذه للجذور الحرة) يؤدي إلى حماية أغشية الكريات الحمراء من أضرار الإجهاد التأكسدي (Ferrali *et al.*, 1997).



الشكل 12: إرتباط الفلافونويدات مع المعادن (Pietta, 2000).

← تثبيط الإنزيمات المنتجة ل ROS

بإمكان الفلافونويدات تثبيط إنتاج حمض اليوريا من جهة وإزاحة ROS التي ينتجها XO من جهة أخرى في أنسجة الإنسان (Phuwapraisirisan *et al.*, 2006)، بين كل من Pauff و Hille (2009) في دراسة التأثير التثبيطي لكل من luteolin، silibinin، quercetin و curcumin على XO أن quercetin و luteolin يثبطان الإنزيم بشكل تنافسي بينما يمكن ل silibinin أن يثبط XO بشكل تنافسي أو غير تنافسي، في حين أن curcumin لا يملك أي تأثير تثبيطي على نشاطية XO، و في دراسة أخرى قام بها Cos وآخرون (1998) أجريت على 30 مركب فلافونويدي حول إمكانية تثبيط إنتاج حمض اليوريا وإزاحة جذر O_2^- ، توصل إلى أن مركبات Flavonols و Flavones تملك نشاطية تثبيطية لإنزيم XO، بينما لا تملك مركبات Flavanones و Dihydroflavonols و Flavan-3-ols و Flavan-3-4-diols هذه النشاطية، يعود هذا التثبيط لوجود رابطة مزدوجة بين C2-C3 عند Flavonols و Flavones. بمقارنة نشاطية مركبات Flavones و Flavovols تبين أن

غياب مجموعة OH في C3 يزيد قليلا من النشاطية التثبيطية لإنزيم XO. يملك luteolin أكبر نشاطية تثبيطية على XO و ذلك لوجود مجموعة هيدروكسيل على C5 et C7 و وجود رابطة ثنائية بين C2-C3 و غياب مجموعة OH في C3، كما تعتبر مشتقات isoflavonoids مثبطات قوية للإنزيمات التي تتدخل في السلسلة التنفسية مثل NADPH oxidase (Jang et al., 2011)، كما يستطيع Catechin حماية الخلايا الطلائية للأوعية الدموية من الإجهاد التأكسدي غير تثبيط نشاطية و تعبير إنزيم NADPH oxidase (Ihm et al., 2009). يستطيع quercetin و مشتقاته خفض أكسدة البروتينات و البروتينات الدهنية وذلك بتثبيط إنزيم MPO الخلايا البالعة مما يخفض الإصابة بأمراض قلبية (Shiba et al., 2008).

5. نبتة *Hertia cheirifolia* L.

تعتبر *Hertia cheirifolia* من النباتات دائمة الخضرة، اسمها العلمي *Hertia (Othonna) cheirifolia* L. من نوع *cheirifolia* من جنس *Hertia* من عائلة (Compositae) Asteraceae، لها عدة أسماء شائعة حيث تسمى بالعربية الكرتشون و بالبربرية تسمى تيمرزو أما بالفرنسية تدعى Hémérocalle و بالإنجليزية فتدعى Barbary ragwort (Quezel and Santa, 1963). تنتشر *Hertia cheirifolia* في حوض البحر الأبيض المتوسط (تونس و الجزائر و مصر و إسبانيا و إيطاليا)، كما تنتشر في أمريكا الشمالية وجنوب إفريقيا، و يتركز وجود *H. cheirifolia* في الجزائر بالمناطق شبه الصحراوية و الهضاب العليا (Quezel and Santa, 1963).

1.5. وصف نبتة *Hertia cheirifolia*

تتميز نبتة *Hertia cheirifolia* L. بأوراق سميكة ودائمة الخضرة متوضعة بشكل متبادل، أزهارها صفراء ليمونية تزهر في نهاية فصل الشتاء، يتراوح إرتفاعها ما بين 20-40 سم، تمتد على سطح الأرض مشكلة غطاء بقطر 50سم (الشكل 13) لهذا تعتبر من النباتات الجيدة لتثبيت التربة وحمايتها من الانجراف، كما أنها مقاومة للجفاف و بطيئة النمو (Quezel and Santa, 1963).

2.5. استعمال النبتة في الطب الشعبي

تستعمل نبتة *Hertia cheirifolia* في الطب الشعبي في كل من الجزائر و تونس كمضاد للتشنج و مضاد للالتهاب، أما في إيطاليا فيستخدم مشروب مغلى الأوراق لعلاج كل من تشنجات وآلام المعدة والأمعاء. تستعمل *H. cheirifolia* في الطب الشعبي في جنوب إفريقيا لعلاج العديد من الإلتهابات، بالإضافة إلى بعض أمراض الجهاز الهضمي مثل سوء الهضم والإسهال والإنتفاخ (Iserin, 2001).



الشكل 13: الشكل العام و أجزاء من نبتة *Hertia cheirifolia*

(<http://www.gardenguides.com/taxonomy/hertia-cheirifolia>)

المواد و الطرق

1. المواد

1.1. المواد البيولوجية

نبته *Hertia cheirifolia* جلبت من منطقة عين التوتة ولاية باتنة في خريف 2010. تم التعرف عليها من طرف الأستاذ أوجحيج بشير، قسم علوم زراعية كلية العلوم جامعة الحاج لخضر (باتنة). حليب البقر الطازج تم جلبه من مزرعة بضواحي سطيف (قجال).

2.1. المواد الكيميائية و الأجهزة

استعملت العديد من المركبات الكيميائية منها: xanthine ،allopurinol ،tripyridyl-triazine (TPTZ) ،naringin ،gallic acid ،morin ،rutin ،quercetin ،etylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ،fisetin ،propyle gallat ،myricetin ،flavon ،kaempferol ،naringenin ،epicatechin ،catechin ،ethyle acetat ،chloroforme ،hexane ،methanol ،gossypin ،ellagic acid ،caffeic acid ،iron II chloride (FeCl₂) ،aluminium chloride (AlCl₃) ،nitroblue tetrazolium (NBT) ،ferrozine ،cytochrome c ،phenazine methosulfate (PMS) ،sodium phosphate (Na₂HPO₄ and NaH₂PO₄) ،2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ،Folin-Ciocalteu ،Butylated hydroxy toluene (BHT) ،iron III chloride (FeCl₃) ،tween40 ،β-carotene ،nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) .

هذه المركبات مأخوذة من Sigma و Sigma-Aldrich و Fluka .

من بين الأجهزة التي استعملت خلال البحث: جهاز التبخير (bÜchi461) و جهاز التحليل الطيفي TechomP

و جهاز UV/VIS-8500 و جهاز HPLC (Shimadzu 10 VP class).

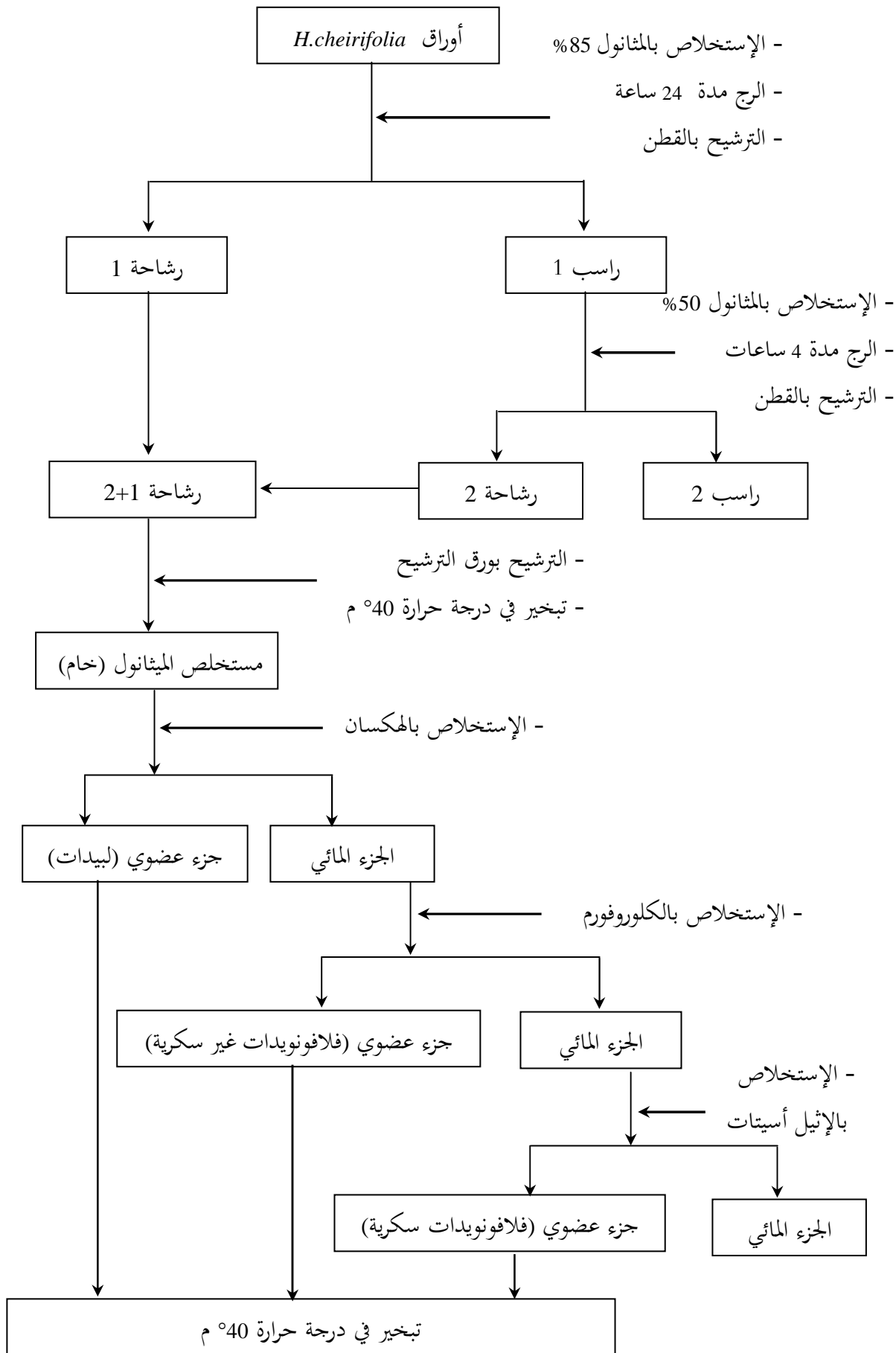
2. طرق العمل

1.2. إستخلاص الفلافونويدات من أوراق *H. cheirifolia*

تم إستخلاص الفلافونويدات حسب طريقة Markham (1982)، والتي تتركز على درجة ذوبانية هذه المركبات في المذيبات العضوية (الشكل 14). تغسل أوراق النبتة جيدا ثم تقطع إلى أجزاء صغيرة وتترك لتجفف قليلا عدة أيام في درجة حرارة الغرفة تحت الظل، بعدها تطحن جيدا للحصول على مسحوق.

يعتمد إستخلاص الفلافونويدات على إضافة 1ل (85% ميثانول) إلى 100 غ من الوزن الجاف لأوراق نبتة *Hertia cheirifolia*، يُعرض الخليط إلى عملية رج مدة ليلة كاملة في درجة حرارة 4°م بعدها يرشح المحلول عبر قطن زجاجي، ثم تحفظ الرشاحة الأولى المتحصل عليها في 4°م و يعاد إستخلاص الراسب مرة ثانية بنفس الطريقة ولكن باستعمال (50% ميثانول/ماء) فتتحصل على رشاحة ثانية. تمزج الرشاحتين وترشح عبر ورق الترشيح ثم تعرض لعملية تبخير باستعمال جهاز التبخير (Rotavapor) تحت درجة حرارة 40°م، نحصل في النهاية على ناتج عبارة عن مستخلص خام يؤخذ منه حجم معين يجفف و يحفظ في 4°م.

يتم نزع الليبيدات بإضافة لحجم من المستخلص الخام حجم من الهكسان فينتج جزء عضوي (مستخلص الهكسان) و جزء مائي، الذي يُضاف له الكلوروفورم لإستخلاص الفلافونويدات غير السكرية، أما الجزء المائي الناتج فيضاف له حجم مساوي من إيثيل الأسيتات لإستخلاص الفلافونويدات أحادية وثنائية السكر، المستخلص المائي النهائي يحتوي على الفلافونويدات الأكثر قطبية ثنائية، ثلاثية و رباعية السكر. تُعرض كل المستخلصات العضوية لعملية تبخير لإزالة المذيبات ثم تجفف و تُحفظ في 4°م إلى حين استعمالها مع العلم أن عملية الغسل بالمذيبات العضوية تم تكرارها عدة مرات إلى حين زوال اللون.

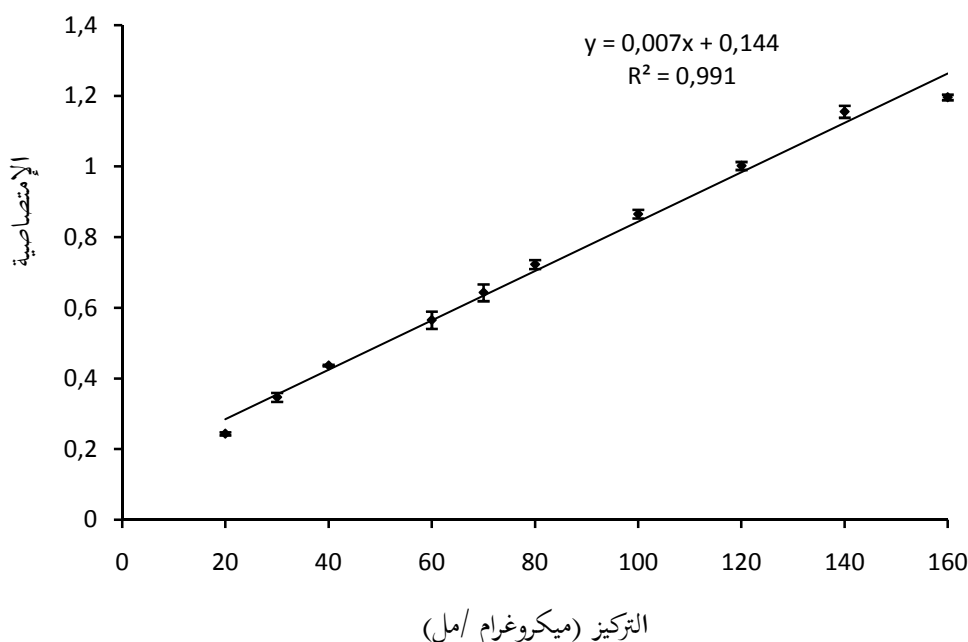


الشكل 14: مخطط إستخلاص الفلافونويدات من أوراق *H. cheirifolia* حسب طريقة Markham (1982).

2.2. تحليل مستخلصات *H. cheirifolia*

1.2.2. تقدير عديدات الفينول الكلية

تم تقدير عديدات الفينول الكلية بطريقة Folin-Ciocalteu حسب (Li *et al.*, 2007)، حيث تعتمد على إرجاع مكونات كاشف Folin-Ciocalteu بواسطة المركبات الفينولية لإعطاء كينون أو كيتون المتميزة باللون الأزرق. تمزج 0.2 مل من المستخلصات المذابة في الميثانول أو الماء مع 1 مل من محلول Folin-Ciocalteu مخفف 10 مرات، ترج الأنايب وتحضن في درجة حرارة المخبر لمدة 4 دقائق، بعدها نضيف 0.8 مل كربونات الصوديوم 7.5% ترج الأنايب وتحضن في درجة حرارة المخبر لمدة ساعة ونصف. تقاس امتصاصية المحلول الناتج عند طول موجة 765 نانومتر و يستعمل حمض الغاليك (20-160 ميكروغرام/مل) لتحديد منحنى العيارية (الشكل 15). يتم التعبير عن النتائج بمكافئ مغ حمض الغاليك لكل غرام من وزن المستخلص.

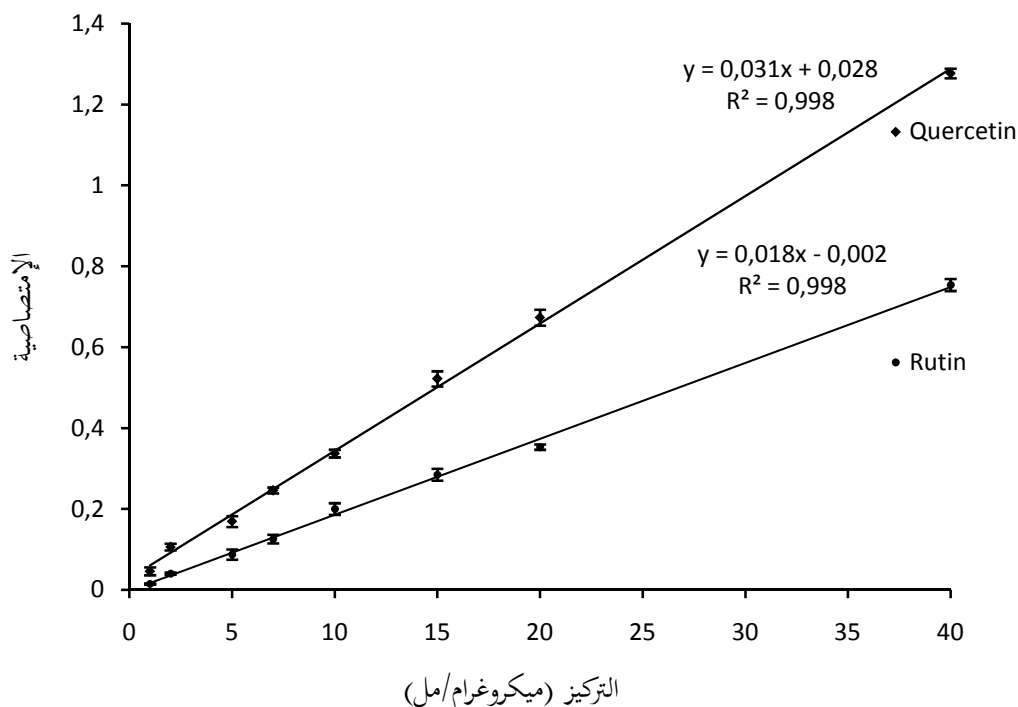


الشكل 15: منحنى عيارية حمض الغاليك

2.2.2. التقدير الكمي للفلافونويدات

تم التقدير الكمي للفلافونويدات بطريقة $AlCl_3$ حسب Bahorun و آخرون (2003)، يؤخذ 1 مل من المستخلصات

المداية في الميثانول أو الماء و يضاف لها 1 مل من $AlCl_3$ بتركيز 2%، بعد 10 دقائق من الحضان في الظلام تقرأ الامتصاصية عند طول موجة 430 نانومتر. تم حساب تركيز الفلافونويدات انطلاقا من المنحنيين العياريين quercetin و rutin (1-40 ميكروغرام/مل)، يعبر عن النتائج بعدد الملغرامات المكافئة لكل من rutin و لكل غ من المستخلص (الشكل 16).



الشكل 16: منحى عيارية quercetin و rutin

3.2.2. تحليل مستخلصات *H. cheirifolia* بإستعمال HPLC

تم تحليل مستخلصات أوراق *Hertia cheirifolia* بإستعمال الكروماتوغرافيا السائلة عالية الضغط (HPLC) High performance liquid chromatography (Shimadzu 10 VP class)، الموصولة بكاشف UV-VIS حيث تم فصل و تحليل المكونات بإستعمال طور متحرك وحيد (Isocratic) و طور ثابت عبارة عن عمود غير قطبي (c18 apolaire، 125×4.6 مم)، تم ضخ الطور المتحرك (acetonitrile/ماء، 80%) عبر الطور الثابت بتدفق 1 مل/د و تم قراءة إمتصاصية الجزئيات عند طول موجة 280 نانومتر (Kalia et al., 2008).

3.2. تنقية إنزيم XOR من حليب البقر

تم تنقية إنزيم XOR من حليب البقر حسب طريقة Nakamura و Yamazaki (1982) المعدلة من طرف Baghiani و آخرون (2003)، حيث تم الحصول على الإنزيم الخام من حليب البقر عبر سلسلة من عمليات الطرد المركزي و الترسيب بواسطة كبريتات الأمونيوم، يمرر الإنزيم الخام على عمود كروماتوغرافيا (أقاروز - هيبارين) بمحلول هيباريني (25 ملي مولر، pH=6.2) بتدفق ثابت طيلة التجربة (10 مل/سا). تم استرجاع إنزيم XOR بمحلول الهيبارين المنظم الحاوي على 2 ملي مولر من NaCl. للتأكد من نقاوة الإنزيم المحصل عليه من الشراهة تم إجراء مسح طيفي مرئي - فوق بنفسجي له، وذلك لتحديد نسبة البروتين إلى الفلافين Protein Flavin Ratio (PFR). لمعرفة الأوزان الجزئية للعينات المدروسة ودرجة نقاوتها تم إجراء الفصل الكهربائي على هلام الأكريلاميد المتعدد في وجود SDS.

4.2. دراسة نشاطية مستخلصات *H. cheirifolia* المضادة للأوكسدة بطرق إنزيمية

1.4.2. التأثير التثبيطي لمستخلصات *H. cheirifolia* على XO

تم دراسة التأثير التثبيطي لمستخلصات *H. c* على نشاطية إنزيم XO حسب Boumerfeg و آخرون (2009) وذلك بقياس كمية حمض uric الناتجة عند طول موجة 295 نانومتر. يحتوي وسط التفاعل على 100 ميكرومولر من الكزانثين المذابة في المحلول المنظم $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (50 ملي مولر، pH=7.4) الذي يحتوي على 0.1 ملي مولر من EDTA، في وجود تراكيز متغيرة من المستخلصات. تم تتبع التفاعل خلال دقيقة مع اعتبار النشاطية في غياب المستخلصات 100% وقد تم حساب نسبة التثبيط (I%) كما يلي:

$$\text{Inhibition \%} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

A_c : نشاطية XOR في غياب المستخلصات، A_s : نشاطية XOR في وجود المستخلصات.

استعمل allopurinol كشاهد مقارنة باعتباره المثبط المتخصص لإنزيم XOR، و قد تم التعبير عن النتائج بالتركيز المثبط ل 50% من نشاطية الإنزيم (IC₅₀). Inhibition concentration (IC₅₀).

2.4.2. التأثير الإزاحي لمستخلصات *H. cheirifolia* على O₂⁻ الناتج عن XO

تم دراسة التأثير الإزاحي لمستخلصات *H. cheirifolia* على جذر O₂⁻ الناتج عن XO حسب طريقة Robak و Gryglewski (1988) المعدلة من طرف Boumerfeg وآخرون (2009). يعمل جذر O₂⁻ الناتج عن XO على إرجاع cyt-c⁺³ (الذي له إمتصاصية عظمى عند طول موجة 550 نانومتر) إلى cyt-c⁺²، وبالتالي وجود مركبات مزيجية لهذا الجذر يمكن أن تمنع إرجاع cyt-c⁺³. يحتوي وسط التفاعل على 100 ميكرومولر من الكزانثين و 25 ميكرومولر من cyt-c وتراكيز متغيرة من مستخلصات النبتة المذابة في المحلول المنظم Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄ (50ملي مولر، pH=7.4) المشبع بالأكسجين الجوي O₂. تم تتبع التفاعل خلال دقيقة بعد إضافة الإنزيم، و تم

حساب نسبة تثبيط إرجاع cyt-c (I%) كما يلي:

$$Inhibition \% = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

A_c: امتصاصية الشاهد، A_s: الامتصاصية في وجود المستخلصات.

تم التعبير عن النتائج بالتركيز المثبط ل 50% من cyt-c (IC₅₀).

5.2. دراسة نشاطية مستخلصات *H. cheirifolia* المضادة للأوكسدة بطرق غير إنزيمية

1.5.2. التأثير الإزاحي على O₂⁻ بإستعمال النظام PMS-NADH-NBT

تم تقدير الفعل الإزاحي لمستخلصات *H. cheirifolia* على O₂⁻ بإستعمال النظام PMS-NADH-NBT حسب طريقة Ani و آخرون (2006)، حيث يعتمد هذا الإختبار على قياس إمتصاصية مركب formazan الناتج عن إرجاع nitroblue tetrazolium (NBT) بواسطة O₂⁻ الناتج عن النظام PMS-NADH عند طول موجة 560 نانومتر. يتم التفاعل في وجود 300 ميكرومولر من المحلول منظم NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (0.1 مولر، pH=7.8)

و50 ميكرو لتر من β -NADH (3 ملي مولر) و 50 ميكرو لتر من NBT (1 ملي مولر) و50 ميكرو لتر من المستخلص النباتي، بعد حضانة المزيج لمدة دقيقتين يتم إضافة 50 ميكرو لتر (PMS) phenazine methosulfate (0.3 ملي مولر) لإنتاج O_2^- ، تقرأ الامتصاصية عند 560 نانومتر بعد 3 دقائق من إضافة PMS. يعبر عن التأثير الإزاحي لمستخلصات *H. cheirifolia* على O_2^- بنسبة تثبيط تحول NBT إلى formazan وفق العلاقة:

$$Inhibition \% = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

A_c : امتصاصية الشاهد، A_s : الامتصاصية في وجود المستخلصات.

تم التعبير عن النتائج بالتركيز المزيح لـ 50% من O_2^- (IC₅₀).

2.5.2. إختبار β -carotene/حمض اللينولييك

تم تقدير النشاط المضادة للأكسدة لمستخلصات *H. cheirifolia* بواسطة إختبار β -carotene/حمض اللينولييك حسب (Dapkevicius et al., 1998)، حيث يعتمد هذا الإختبار على قياس التغيرات التي تحدث في الامتصاصية عند طول موجة 490 نانومتر، بسبب أكسدة جذور البيروكسيل لجزيئات β -carotene. يذاب 0.5 مغ من β -carotene في 1 مل من الكلوروفورم ثم يضاف له 25 ميكرو لتر من حمض اللينولييك و200 غ من Tween 40، يمزج هذا الخليط جيدا ثم يتم تبخير الكلوروفورم في جهاز التبخير في 40°م، يتم إضافة 100 مل من الماء المقطر المشبع بالأكسجين. يوضع 2.5 مل من الخليط السابق في أنبوبة إختبار ونضيف له 350 ميكرو لتر من المستخلصات النباتية المحضرة بتركيز ثابت 2مغ/مل تكرر العملية مع الشواهد والمتمثلة في BHT كشاهد موجب والماء والميثانول كشواهد سالبة. يحضن المزيج في الظلام و تقرأ الامتصاصية عند طول موجة 490 نانومتر، و ذلك خلال الأزمنة 0 سا، 1 سا، 2 سا، 3سا، 4 سا، 6 سا، 12 سا، 24 سا، 48 سا. تحسب النشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات *H. cheirifolia* (antioxidant activity) حسب العلاقة التالية:

$$AA\% = \frac{A_s}{A_c} \times 100$$

A_c : امتصاصية الشاهد، A_s : الامتصاصية في وجود المستخلصات.

3.5.2. التأثير الإزاحي لمستخلصات *H. cheirifolia* على جذر DPPH

تم إختبار التأثير الإزاحي لمستخلصات *H. cheirifolia* على جذر 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) حسب Goupy وآخرون (2003) مع بعض التعديلات، حيث يعتمد هذا الإختبار على استعمال جذر DPPH ذو اللون البنفسجي الداكن والذي يتحول إلى اللون الأصفر عند إزاحة (إرجاعه) بواسطة المركبات المضادة للأكسدة، مما يؤدي إلى انخفاض الامتصاصية عند طول موجة 517 نانومتر. تحضن 50 ميكرو لتر من عدة تراكيز من المستخلصات المختلفة مع 1250 ميكرو لتر من محلول DPPH الميثانولي ذو تركيز 0.004%. بعد 30 دقيقة من الحضن في الظلام تقاس الامتصاصية عند طول موجة 517 نانومتر، و قد إستعمل كل من rutin و quercetin وحمض الغاليك و butylated hydroxytoluen (BHT) كشواهد وقد تم حساب نسبة إزاحة جذر DPPH كما يلي:

$$\text{Scavenging \%} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

A_c : امتصاصية الشاهد، A_s : الإمتصاصية في وجود المستخلصات.

تم التعبير عن النتائج بالتركيز المزيح ل 50% من جذر DPPH (IC_{50}).

4.5.2. إختبار إستخلاص المعادن

تم قياس قدرة المستخلصات على إستخلاص (قبط) المعادن حسب طريقة Welch و Decker (1990) المعدلة من طرف Le وآخرون (2007)، حيث تسمح هذه التقنية بتقدير قدرة المركبات على إستخلاص أيونات الحديد الثنائي و منع تكوين المركب Fe^{2+} -Ferrozine الذي له إمتصاصية عظمى عند 562 نانومتر. يمزج 250 ميكرو لتر من مستخلصات *H. cheirifolia* بتراكيز مختلفة مع 50 ميكرو لتر من محلول $FeCl_2$ (0.6 ملي مولر) و 450 ميكرو لتر ميثانول بعد 5 دقائق يضاف 50 ميكرو لتر من محلول ferrozine (5 ملي مولر)، ترج الأنايب و بعد 10 دقائق من الحضن في الظلام تقرأ الإمتصاصية عند 562 نانومتر، أستعمل مركب EDTA (0-40 ميكرو غرام/مل) كشاهد مقارنة و تم حساب نسبة إستخلاص أيونات الحديد أو تثبيط تشكيل المركب كما يلي:

$$Chelating \% = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

A_c : امتصاصية الشاهد، A_s : الإمتصاصية في وجود المستخلصات.

تم التعبير عن النتائج بـ مكافئ مغ EDTA/غ من المستخلص حسب Kandhasamy وآخرون (2010).

5.5.2. دراسة النشاطية المضادة للأوكسدة بطريقة FRAP

تم تقدير القدرة المضادة للأوكسدة (القوة الإرجاعية) لمستخلصات أوراق *Hertia cheirifolia* بطريقة (FRAP)

وآخرون (2000)، حيث تسمح هذه التقنية بتقدير القدرة الإرجاعية لمضادات الأوكسدة، حيث تركز على قياس

التغيرات التي تحدث في الإمتصاصية عند طول موجة 593 نانومتر بسبب ظهور اللون الأزرق الناتج عن إرجاع

المركب (tripirydyltetraiazine) Fe^{+3} -TPTZ إلى Fe^{+2} -TPTZ. يتم مزج 90 ميكرو لتر من الماء المقطر مع 30

ميكرو لتر من العينة المختبرة و900 ميكرو لتر من محلول FRAP الذي يتكون من 10 ملي مولر من TPTZ و20

ملي مولر من $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ و300 ملي مولر من المحلول المنظم الأسيتات ذو pH=3.6، و تتم القراءة كل 15 ثا

بالنسبة لكل من العينة والشاهد لمدة نصف ساعة عند 37°م. لتحديد قيم Equivalent concentration (EC1)

تم إستعمال $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (2000-0 ميكرومولر) لتحديد منحنى العيارية عند الدقيقتين 4 و30د.

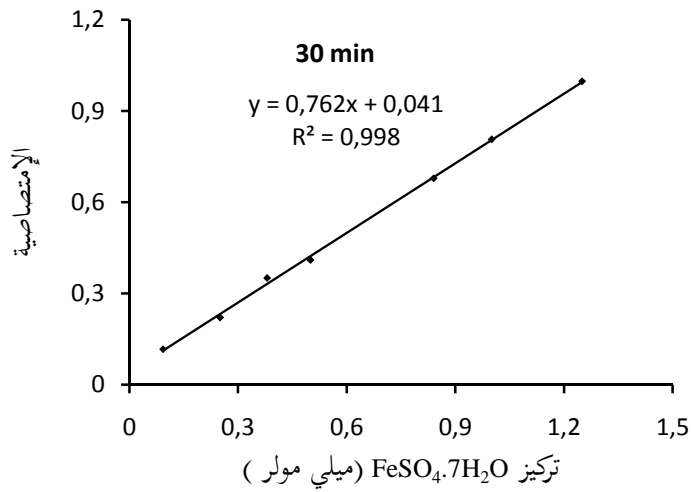
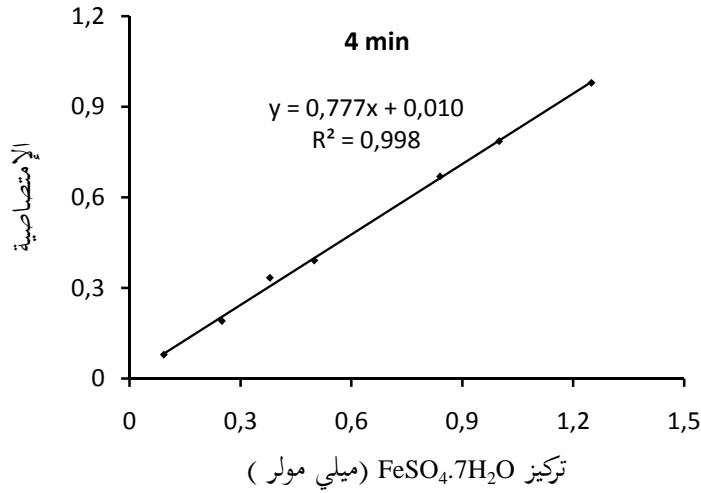
تم التعبير عن النتائج بالتركيز المكافئ (EC1) الذي يعني تركيز مضاد الأوكسدة أو العينة المدروسة الذي له قدرة

إرجاعية مكافئة لتلك الخاصة بتركيز 1 ملي مولر من Fe^{+2} عند تحول $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ عند الدقيقتين 4 و30

(الشكل 17). كما عبر عن النتائج بالقوة الإرجاعية/ المضادة للأوكسدة (TAP) total antioxidant power

الذي يمثل مكافئ ملي مولر من Fe^{+2} الناتجة بواسطة 1 غ من المستخلص (Erdogan-Orhan et al., 2010)،

كما تم إستعمال حمض الغاليك كشاهد مقارنة.



الشكل 17: منحنى المعايرة لـ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ عند الدقيقتين 4 و 30 د

6.2. التحليل الإحصائي

كل القيم المحصل عليها عبر عنها بالمتوسط الحسابي (M) \pm الانحراف المعياري (SD) حيث أن $n=3$ أو 2. خللت النتائج إحصائياً عن طريق اختبار (one-way ANOVA) متبوع باختبار Dunnett بالنسبة للمقارنات بين مختلف المستخلصات والشواهد و بين المستخلصات فيما بينها. حيث اعتبر الفرق إحصائياً ذو معنى عند الدلالة 5% أي أن معامل التحديد ($P \geq 0.05$)، كما إستعمل برنامج Graphpad Prism v.5.0 في رسم المنحنيات و التحيلات الإحصائية.

النتائج و المناقشة

1. إستخلاص الفلافونويدات و تقديرها الكمي

تم الإستخلاص الفلافونويدات من أوراق *H. cheirifolia* حسب طريقة Markham (1982)، والتي تعتمد على استعمال مذيبات متزايدة القطبية انطلاقا من المستخلص الخام، حيث يستعمل الهكسان لإستخلاص الليبيدات والكلوروفيل و الشموع و الكلوروفورم لإستخلاص الفلافونويدات غير السكرية و إثيل أسيتات لإستخلاص الفلافونويدات أحادية وثنائية السكر، أما الجزء المائي المتبقي فيحتوي على الفلافونويدات الأكثر قطبية، ثلاثية ورباعية السكر.

تم حساب مردود كل مستخلص انطلاقا من 100 غ من الوزن الجاف للنبته، وقد ظهر أعلى مردود مع المستخلص الخام (Cr.E) ب $2.14 \pm 16.58\%$ ، يليه الجزء المائي (Aq.E) ب $1.00 \pm 12.67\%$ ، أما مستخلصا الكلوروفورم (Ch.E) والإثيل أسيتات (EtA.E) فكان مردودهما $0.05 \pm 1.09\%$ ، $0.05 \pm 0.93\%$ على التوالي. أقل مردود ظهر في مستخلص الهكسان (Hex.E) ب $0.06 \pm 0.67\%$ (الجدول 2). تتوافق هذه النتائج مع ما توصل إليه Ammar وآخرون (2009) و هذا بتطبيق نفس الطريقة على نفس النبته.

تم تطبيق طريقة Folin-Ciocalteu لتقدير عديدات الفينول الكلية بإستعمال حمض الغاليك كشاهد، تتميز هذه الطريقة بسهولة وفعاليتها (Li et al., 2007). تم التعبير عن المحتوى الفينولي في كل مستخلص بعدد الملغرامات المكافئة من حمض الغاليك لكل غرام من للمستخلص. أظهرت النتائج أن مستخلص إثيل أسيتات يحتوي على كمية معتبرة من المركبات الفينولية، كانت ضعف كمية عديدات الفينول المتواجدة في المستخلص الخام و مستخلص الكلوروفورم، أما المستخلص المائي فقد أظهر أقل نسبة من عديدات الفينول مقارنة بالمستخلصات الأخرى (الجدول 2).

الجدول 2. مردود مستخلصات أوراق *H. cheirifolia* ومحتواها من عديدات الفينول و الفلافونويدات.

نوع المستخلص	المردود %	عديدات الفينول الكلية مكافئ مغ حمض الغاليك لكل غ من المستخلص	الفلافونويدات مكافئ مغ quercetin لكل غ من المستخلص	الفلافونويدات مكافئ مغ rutin لكل غ المستخلص
الخام	2.14±16.58	8.79±72.00	0.43±6.23	1.34±10.42
الهكسان	0.06±0.67	-----	-----	-----
الكلوروفورم	0.05±1.09	6.26±70.72	0.31±3.64	0.88±6.07
إثيل الأسيتات	0.05±0.93	14.04±181.24	6.32±63.46	10.40±105.69
المائي	1.00±12.67	6.36±62.54	0.37±3.07	0.72±5.87

تم تطبيق طريقة $AlCl_3$ لتقدير الفلافونويدات باستعمال quercetin و rutin كشواهد حسب Bahorun و آخرون (2003). بينت النتائج أن كمية الفلافونويدات في كل مستخلص باستعمال المكافئ rutin أكبر مرتين تقريبا من كمية الفلافونويدات في نفس المستخلص باستعمال المكافئ quercetin. أظهر التقدير الكمي للفلافونويدات أن مستخلص إثيل الأسيتات يحتوي على أكبر كمية وصلت إلى 10 أضعاف الكمية التي يحتويها المستخلص الخام وكانت كمية الفلافونويدات في مستخلص الكلوروفورم و المستخلص المائي متساوية سواءً باستعمال المكافئ بدلالة quercetin أو rutin (الجدول 2).

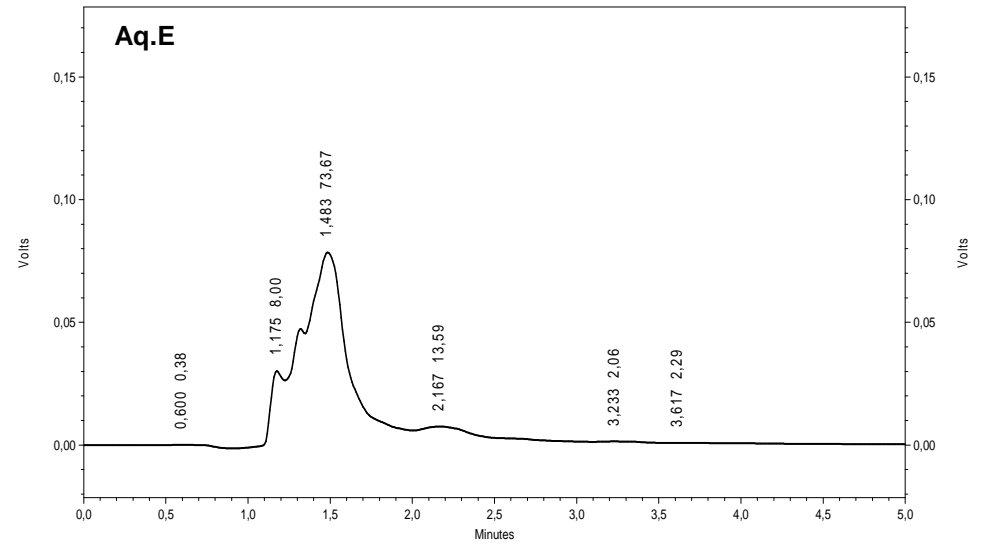
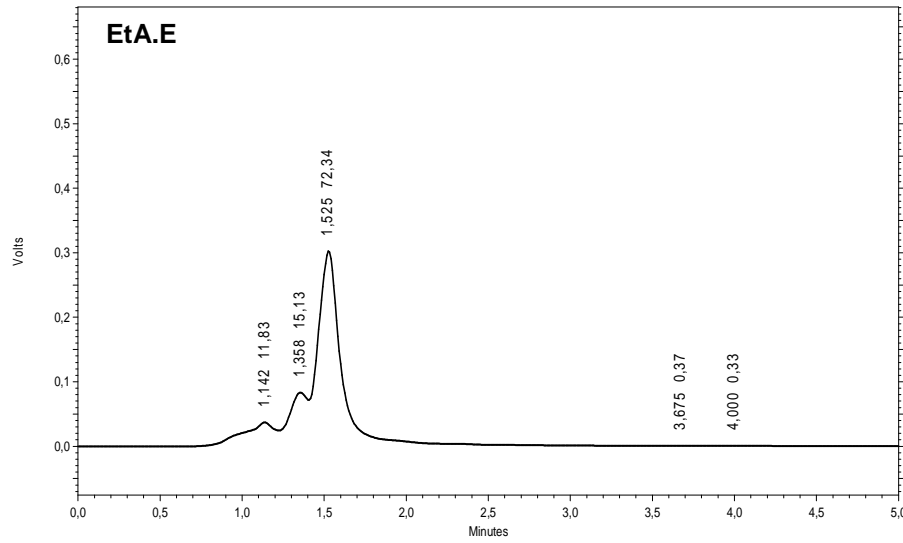
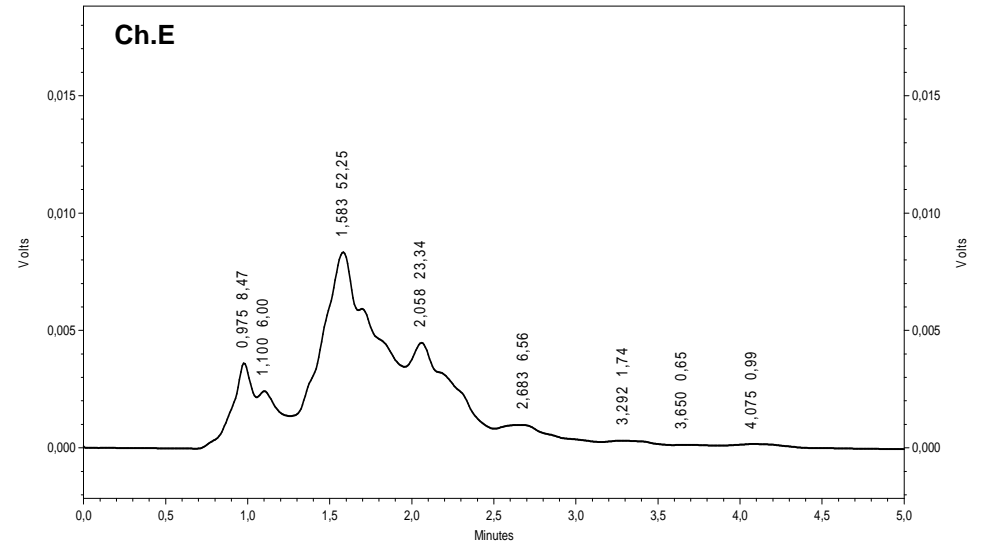
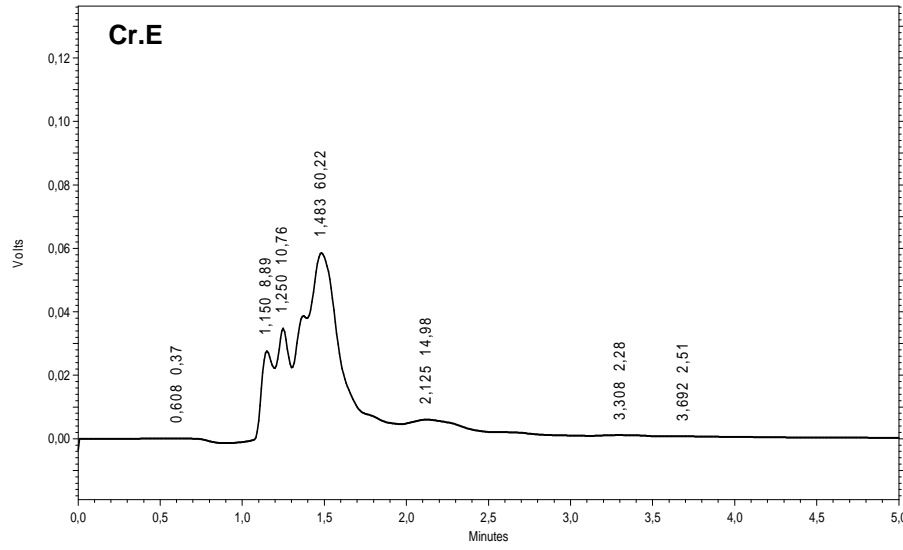
2. تحليل مستخلصات *H. cheirifolia* باستعمال HPLC

تعتبر HPLC من بين أهم التقنيات المستعملة في تحليل وفصل مختلف المركبات الفينولية المستخلصة من النباتات. أظهر تحليل مستخلصات *H. cheirifolia* بواسطة HPLC أنها تحتوي على بعض المركبات الفينولية (الشكل 18) و ذلك بعد مقارنة زمن إحتجازها (Retention times (RT) مع تلك الخاصة بالشواهد (الجدول 3).

الجدول 3. زمن إحتجاز مختلف الفلافونويدات و الأحماض الفينولية النقية.

الشواهد	زمن الإحتجاز (د)
Gossypin	0,908
Naringin	1,533
Gallic acid	1,567
Rutin	1,567
Epicatechin	1,583
Catechin	1,583
Morin	1,592
Ellagic acid	1,600
Caffeic acid	1,633
Propyle gallat	1,755
Naringenin	1,800
Quercetin	1,917
Myricetin	1,958
Kaempferol	1,992
Fisetin	2,467
Flavon	3,250

أظهر التحليل الكروماتوغرافي لمستخلص الكلوروفورم عدة معاول، من خلال مقارنة أزمنة إحتجازها مع أزمنة إحتجاز الشواهد تبين أن مستخلص الكلوروفورم يحتوي على epicatechin و/أو catechin ، كما يحتمل إحتواء المستخلص على kaempferol و flavon والتي توافقت أزمنة الإحتجاز 2,058، 3.292 د في التحليل الكروماتوغرافي (الشكل 18)، كما أظهر التحليل الكروماتوغرافي لمستخلص إيثيل الأسيتات معولا في الزمن 1.525 د، يمكن لهذا المركب أن يكون narangin الذي له زمن إحتجاز قريب جدا من هذا الزمن.



الشكل 18: التحليلات الكروماتوغرافية لمختلف مستخلصات *H.cheirifolia* بواسطة HPLC.

3. تنقية إنزيم XOR من حليب البقر

تم تنقية إنزيم XOR من حليب البقر حسب طريقة Nakamura و Yamazaki (1982) المعدلة من طرف Baghiani و آخرون (2003) عبر سلسلة من عمليات الطرد المركزي و الترسيب بواسطة كبريتات الأمونيوم لإستخلاص الإنزيم الخام، متبوع بالفصل على عمود كروماتوغرافيا (أغاروز-هيبارين)، حيث تم استرجاع إنزيم XOR المنقى بمحلول الهيبارين المنظم (25ملي مولر، pH=6.2) الحاوي على 2 ملي مولر من NaCl. قدرت مرودية الإنزيم بـ 17.97 مغ/مل، هذه القيمة قريبة من القيمة (20.32 مغ/مل) التي توصل إليها Baghiani و آخرون (2003). أعطى الفصل الكهربائي على هلام الأكريلاميد المتعدد (SDS-PAGE) شريطا رئيسيا في حدود 150 كيلودالتون. قدرت النشاطية الكلية للإنزيم في وجود الكزانثين كمادة مانحة للإلكترونات و NAD^+ كمادة مستقبلية للإلكترونات بـ 2261 نانومول/دقيقة/مغ بروتين و النشاطية المؤكسدة في وجود O_2 كمادة مستقبلية للإلكترونات بـ 2011 نانومول/دقيقة/مغ بروتين، وقد كانت نسبة النمط المؤكسد مساوية 89% (الجدول 4). كما أعطى المسح الطيفي المرئي-فوق البنفسجي لإنزيم XOR المنقى ثلاث معاول و قدرت نسبة البروتين إلى الفلافين (PFR) بـ 7.1 (Bray et al., 1996). هذه النتائج تتوافق مع ما توصل إليه كل من Baghiani و آخرون (2003)، Benboubetra و آخرون (2004) Boumerfeg و آخرون (2009).

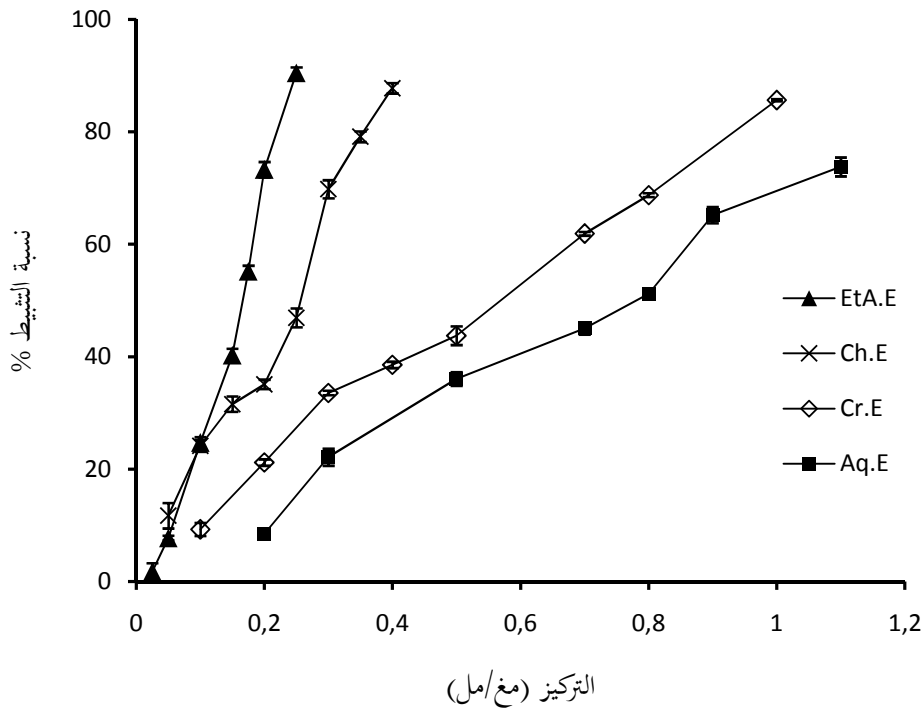
الجدول 4. نتائج عملية تنقية إنزيم XOR من حليب البقر الطازج.

PFR	نسبة النمط المؤكسد %	نشاطية النمط المؤكسد (نانومول /دقيقة/مغ بروتين)	النشاطية الكلية (نانومول /دقيقة/مغ بروتين)
7.1	% 89	2011	2261

4. دراسة نشاطية مستخلصات *H. cheirifolia* المضادة للأوكسدة بطرق إنزيمية

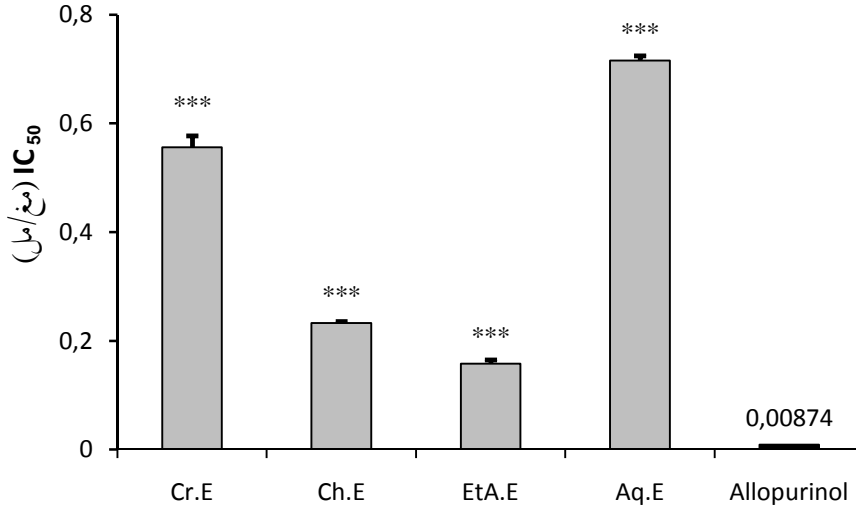
1.4. تأثير مستخلصات أوراق *H. cheirifolia* على نشاطية إنزيم XO

تمت دراسة تأثير مستخلصات *H. cheirifolia* على نشاطية إنزيم XO باستعمال تركيز ثابت من مادة التفاعل كزانشين (100 ميكرومولر)، مع تتبع إنتاج حمض اليوريك مع الزمن عند 295 نانومتر، وقد أظهرت النتائج أن المستخلصات تثبط إنزيم XO بشكل يتناسب طرديا مع الزيادة في تركيز هذه المستخلصات (الشكل 19).



الشكل 19: التأثير التثبيطي لمستخلصات أوراق *H. cheirifolia* على نشاطية XO.

أظهرت النتائج أن كل المستخلصات تثبط بشكل معتبر جدا إنزيم XO، حيث كان التأثير التثبيطي لكل من مستخلص إيثيل الأسيتات و مستخلص الكلوروفورم هو الأعلى بـ $IC_{50} = 0.157 \pm 0.0075$ مغ/مل و 0.232 ± 0.003 مغ/مل على الترتيب، فيما أظهر المستخلص الخام والمستخلص المائي تأثير تثبيطي أقل بجوالي 3 مرات و 4 مرات على الترتيب مقارنة بمستخلص إيثيل الأسيتات (الشكل 20).



الشكل 20: تركيز مستخلصات *H. cheirifolia* المثبطة لـ 50% من نشاطية إنزيم XO.

(***: $p \leq 0.001$)

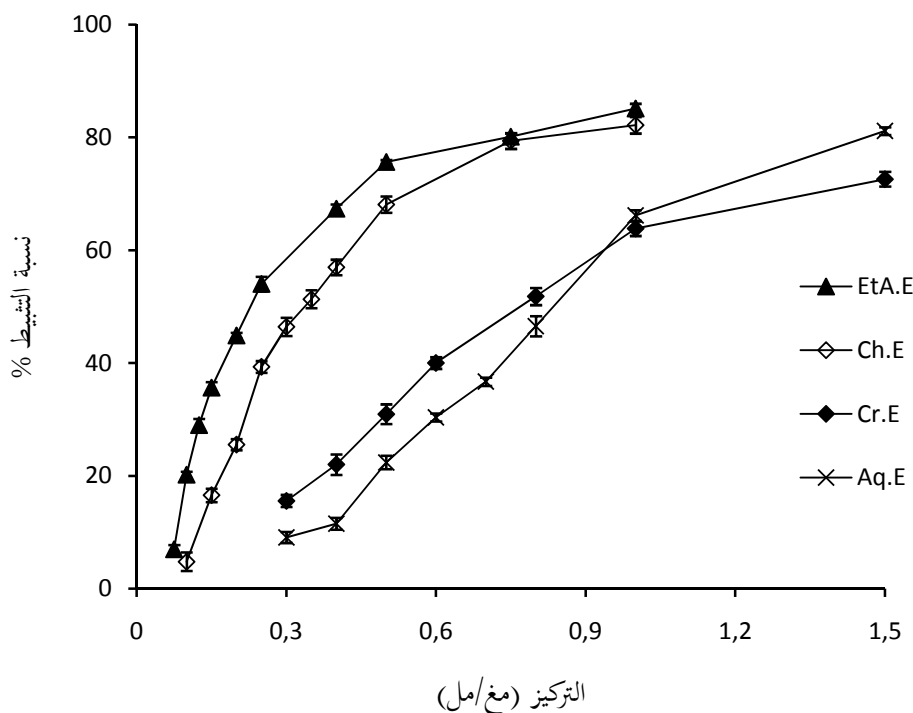
يتضح من خلال النتائج المتحصل عليها أن هناك علاقة طردية بين محتوى المستخلصات من المركبات الفينولية والفلافونويدات و التأثير التثبيطي لهذه المستخلصات ($R^2=0.815$ ، $R^2=0.718$ على الترتيب)، و بالتالي يمكن إرجاع التأثير التثبيطي العالي لمستخلص إيثيل الأسيتات إلى كمية المركبات الفينولية و الفلافونويدات الموجودة فيه. هذه النتائج تتوافق مع ماتوصل إليه كل من Boumerfeg وآخرون (2009)، Wu وآخرون (2010)، حيث أعطى مستخلص إيثيل الأسيتات الأغنى بالمركبات الفينولية و الفلافونويدات أعلى تأثير تثبيطي على إنزيم XO.

إضافة إلى العامل الكمي فإن نوعية الفلافونويدات الموجودة في كل مستخلص يمكن أن تحدد قوة التثبيط، فقد أظهر مستخلص الكلورفورم تأثيرا تثبيطيا عاليا رغم محتواه الضئيل من الفلافونويدات مقارنة بالمستخلصين الخام والمائي. فقد بيّن العديد من الباحثين دور المركبات الفينولية خصوصا الفلافونويدات في تثبيط إنزيم XO، فقد أظهر Pauff و Hille (2009) في دراسة التأثير التثبيطي لكل من quercetin، silibinin، luteolin و curcumin على XO أن quercetin و luteolin يشبطان الإنزيم بشكل تنافسي بينما يشبط silibinin إنزيم XO بشكل غير تنافسي، في حين أن curcumin لا يملك أي تأثير تثبيطي على XO. إن الفعل التثبيطي للفلافونويدات على XO يعود إلى البنية الكيميائية الخاصة بها، حيث أن وجود رابطة مزدوجة بين C2-C3 و غياب مجموعة OH في C3

يرفع من القدرة التثبيطية للفلافونويد (Borges et al.,2002). إعتقادا على نتائج التحليل بـ HPLC والدراسة التي قام بها Cos و آخرون (1998) التي بينت أن catechin و epicatechin لهما تأثير تثبيطي على نشاطية XO، مما قد يفسر التأثير التثبيطي العالي لمستخلص الكلوروفورم.

2.4. التأثير الإزاحي لمستخلصات *H. cheirifolia* على جذر O_2^- الناتج عن XO

في وجود الكزانثين يقوم XOR بإرجاع الأوكسجين الجزئي إلى جذر O_2^- ، هذا الأخير يقوم بإرجاع $cyt-c^{+3}$ إلى $cyt-c^{+2}$. لدراسة التأثير الإزاحي لمستخلصات *H. cheirifolia* على جذر O_2^- الناتج عن XO قمنا بتتبع إرجاع $cyt-c$ بواسطة O_2^- عند طول موجة 550 نانومتر، إذ تعبر قدرة المستخلصات على تثبيط إرجاع $cyt-c$ عن قدرتها على إزاحة جذر O_2^- . أظهرت النتائج أن المستخلصات تثبط إرجاع $cyt-c$ بشكل يتناسب طرديا مع الزيادة في تركيز هذه المستخلصات (الشكل 21).



الشكل 21: التأثير الإزاحي لمستخلصات *H. cheirifolia* على جذر O_2^- الناتج عن XO بإستعمال $cyt-c$.

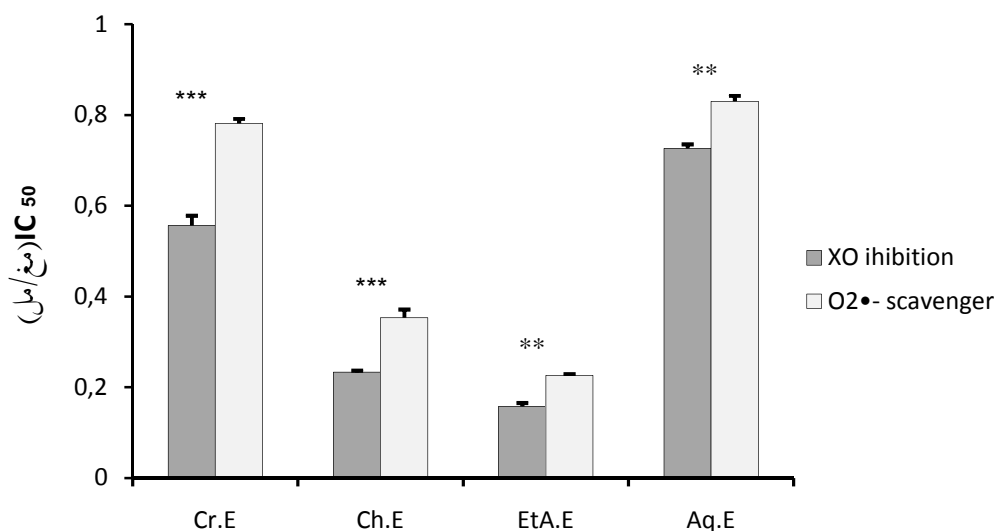
كان ترتيب المستخلصات في التأثير الإزاحي مماثلا لترتيبها في التأثير التثبيطي، حيث أظهر مستخلصي إيثيل

الأسيئات و الكلوروفورم أكبر تأثير إزاحي على جذر O_2^- ($IC_{50} = 0.002 \pm 0.226$ مغ/مل و 0.017 ± 0.353 مغ/مل على الترتيب)، في حين كان التأثير الإزاحي للمستخلص الخام و للمستخلص المائي على جذر O_2^- متقاربا ($IC_{50} = 0.009 \pm 0.781$ مغ/مل و 0.011 ± 0.830 مغ/مل على الترتيب) (الجدول 5).

الجدول 5. تركيز مستخلصات *H. cheirifolia* المثبطة لإرجاع 50% من cyto-c

المستخلص	IC_{50} (مغ/مل)
الخام	0.009 ± 0.781
الكلوروفورم	0.017 ± 0.353
إثيل الأسيئات	0.002 ± 0.226
المائي	0.011 ± 0.830

إن قدرة مستخلصات *H. cheirifolia* على تثبيط إرجاع cyto-c يرجع للتأثير المزدوج، تثبيط نشاطية إنزيم XO وإزاحة جذر O_2^- الناتج عنه. بمقارنة قيم IC_{50} للمستخلصات من حيث تثبيط إنتاج حمض اليوريك وإزاحة جذر O_2^- ، فقد كانت قيم IC_{50} المثبطة لإنزيم XO أقل من قيم IC_{50} المثبطة لإرجاع cyto-c (الشكل 22).



الشكل 22: التأثير التثبيطي لـ 50% من نشاطية XO و النشاطية المزيحة لجذر O_2^- .

(***: $p \leq 0.001$, **: $p \leq 0.01$).

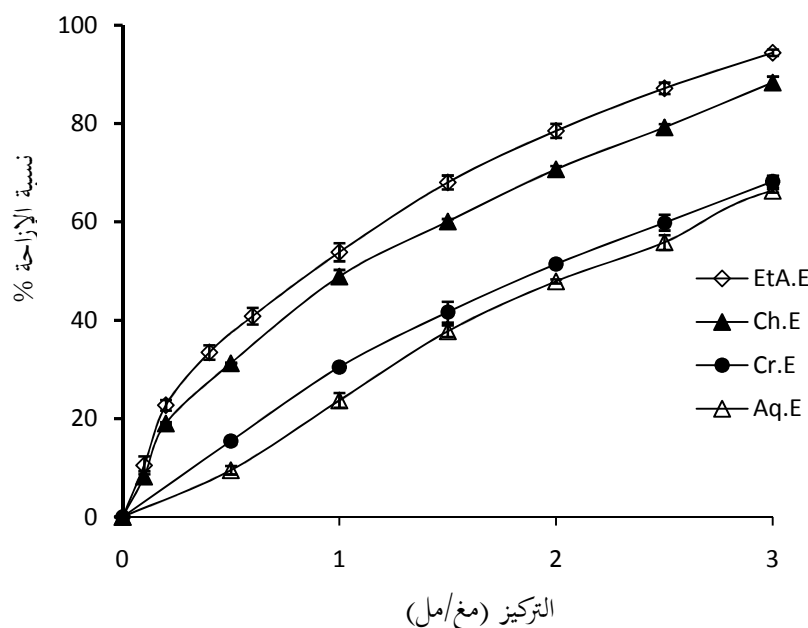
من الصعب التنبؤ ما إذا كان هذا التأثير التثبيطي لإرجاع cyto-c راجع إلى إزاحة جذر O_2^- أو إلى تثبيط XO

فبعض الفلافونويدات تملك قدرة تثبيطية لإنتاج حمض اليوريك أقوى من التأثير الإزاحي لجذر O_2^- ، كما هو الحال بالنسبة ل rutin و catechin (Selloum et al., 2001)، كما صنف Cos وآخرون (1998) الفلافونويدات إلى ستة أقسام (A و B و C و D و E و F) حسب نوعية تأثيراتها، حيث يمكن إعتبار فلافونويدات هذه المستخلصات من القسم B و التي تملك تأثير تثبيطي أعلى من التأثير الإزاحي. أظهرت كثير من الدراسات العلاقة بين البنية الكيميائية للفلافونويدات و التأثير الإزاحي على جذر O_2^- ، حيث أن وجود رابطة مزدوجة و البنية catechol في الحلقة A يرفع من نشاطية الفلافونويدات المزيجة للجذور الحرة (Seyoum et al., 2006).

5. دراسة نشاطية مستخلصات *H. cheirifolia* المضادة للأوكسدة بطرق غير إنزيمية

1.5. التأثير الإزاحي على O_2^- بإستعمال النظام PMS-NADH-NBT

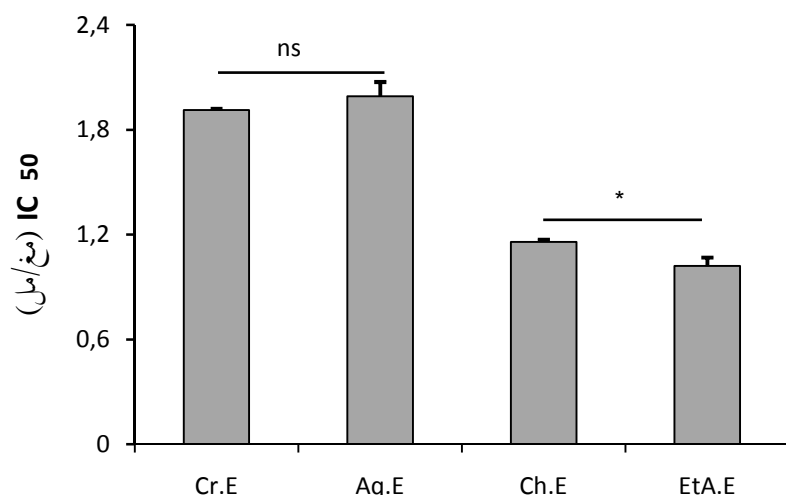
تم تقدير الفعل الإزاحي لمستخلصات *H. cheirifolia* على O_2^- وذلك بقياس الإمتصاصية الناتجة عن تحول NBT إلى formazan بفعل O_2^- الناتج عن النظام الكيميائي PMS-NADH، و قد أظهرت النتائج أن كل المستخلصات تزيح جذر O_2^- بشكل يتناسب طرديا مع الزيادة في التركيز (الشكل 23).



الشكل 23: التأثير الإزاحي لمستخلصات *H. cheirifolia* على O_2^- بإستعمال النظام PMS-NADH-NBT.

أبدى مستخلص إيثيل الأسيتات و مستخلص الكلوروفورم قدرة عالية على ازاحية جذر O_2^- حيث كانت قيم

IC₅₀ جد متقاربة، في حين أظهر كل من المستخلص الخام و المستخلص المائي قدرة إزاحية متساوية (=IC₅₀)
 0.007 ± 1.191 مغ/مل و 0.083 ± 1.199 مغ/مل على الترتيب)، كما أن تأثيرهما هذا كان أقل بحوالي مرتين
 مقارنة بتأثير كل من مستخلص إيثيل الأسيتات و مستخلص الكلوروفورم (الشكل 24).



الشكل 24: قيم IC₅₀ مختلف المستخلصات المزيحة لجذر O₂⁻ في النظام PMS-NADH-NBT.

(* p: ≤ 0.05, ns: p > 0.05).

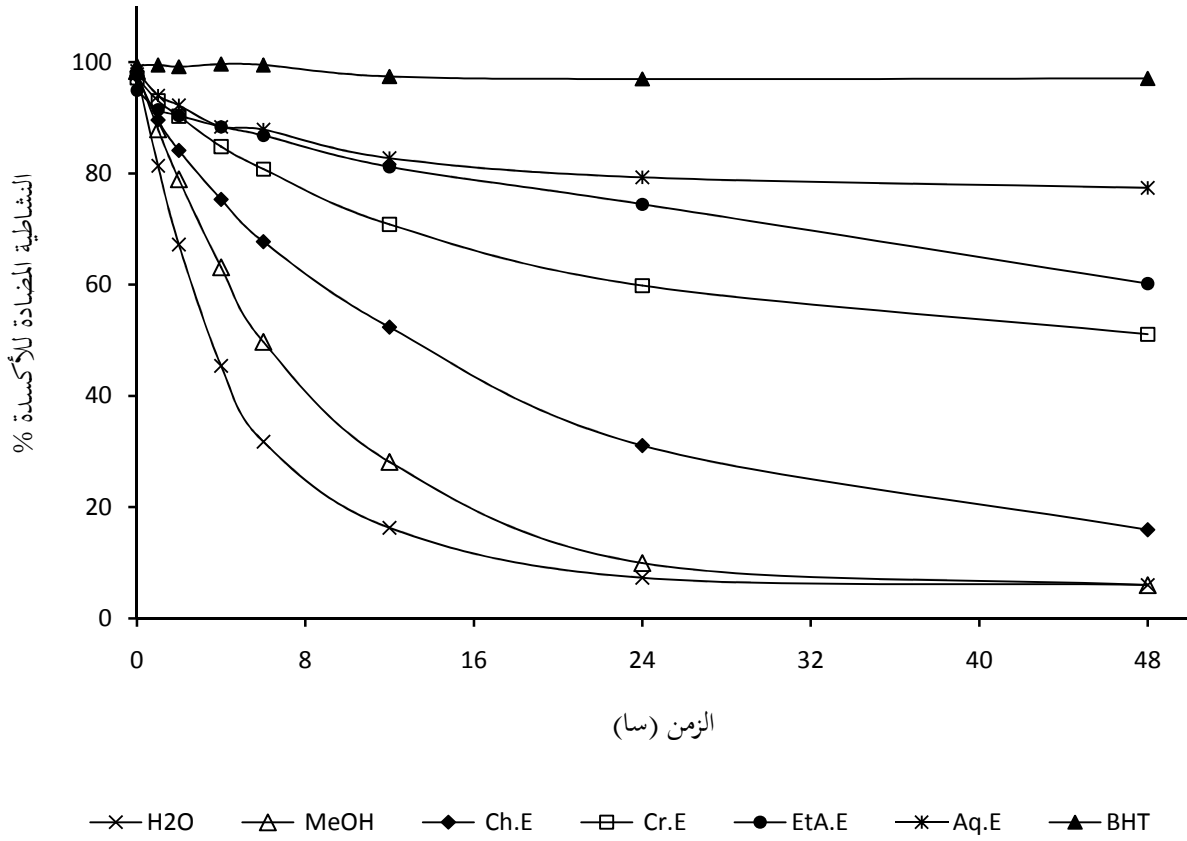
من خلال النتائج المتحصل عليها يتضح أن هناك تناسب كبير بين محتوى المستخلصات النباتية من الفلافونويدات
 النشاطية المزيحة لجذر O₂⁻ (R²=0.738). هذه النتائج تتوافق مع ما توصل إليه Wu وآخرون (2010) في دراسة
 التأثير المضاد للأوكسدة لمختلف مستخلصات *Geranium sibiricum* L.، كما تتوافق هذه النتائج مع ما توصل
 إليه McCune و Johns (2002) في دراسة للتأثير المضاد للأوكسدة لمستخلصات 35 نبتة، حيث وجد علاقة
 كبيرة بين محتوى هذه المستخلصات من عديدات الفينول والفلافونويدات والتأثير الإزاحي لهذه المستخلصات على
 كل من O₂⁻ و جذر DPPH. أظهر مستخلص الكلوروفورم تأثيراً إزاحياً عالياً مقارنة بالمستخلصين الخام و المائي
 رغم فقره نسبياً من الفلافونويدات، هذا التأثير يمكن إرجاعه إلى نوعية الفلافونويدات الموجودة في هذا
 المستخلص، حيث أظهرت كثير من الدراسات العلاقة بين البنية الكيميائية للفلافونويدات و التأثير الإزاحي، حيث
 أن وجود رابطة مزدوجة و البنية catechol في الحلقة A يرفع من نشاطية الفلافونويدات المزيحة للجذور الحرة

(Seyoum *et al.*, 2006). إعتقاداً على نتائج التحليل بـ HPLC فإن مستخلص الكلوروفورم يحتوي على الفلافونويدات التي تملك الخصائص السابقة و المتمثلة في catechin و epicatechin مما قد يفسر تأثيره العالي. بمقارنة نتائج التأثير الإزاحي للمستخلصات على O_2^- بإستعمال النظام Cyt-c/XO مع النتائج المتحصل بإستعمال النظام الكيميائي PMS-NADH-NBT، يمكن إرجاع التأثير الإزاحي الظاهر في النظام الأول إلى التأثير التثبيطي للمستخلصات على نشاطية إنزيم XO.

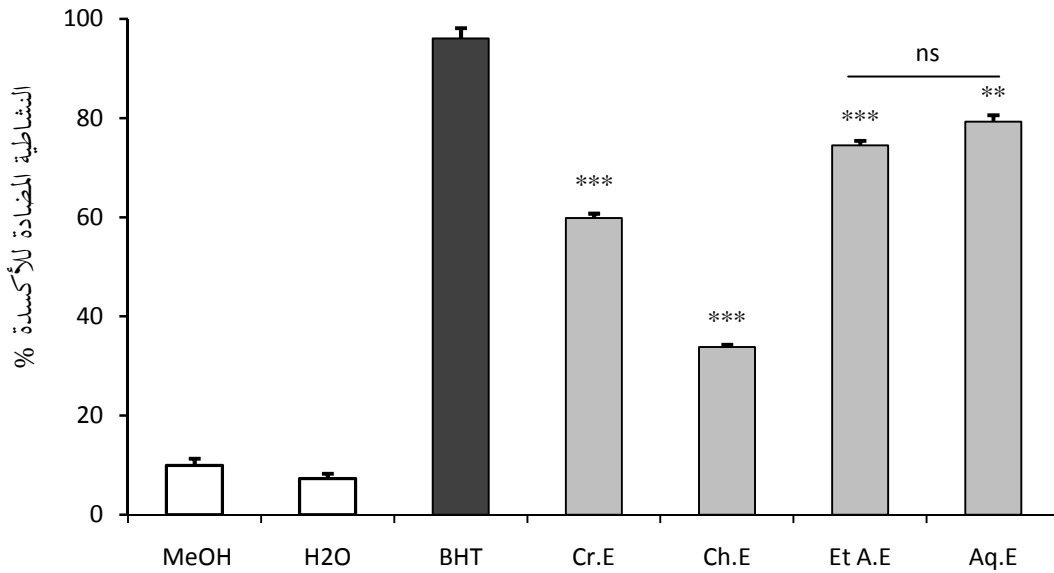
2.5. إختبار β -carotene/حمض اللينولييك

يعتبر إختبار β -carotene/حمض اللينولييك من بين أكثر الإختبارات المستعملة لتقدير نشاطية المستخلصات النباتية المضادة للأكسدة، حيث تقوم نواتج الأكسدة والمتمثلة في الهيدروبيروكسيدات الليبيدية ونواتج الضم المزدوجة (conjugated dienes) الناتجة عن أكسدة حمض اللينولييك بمهاجمة جزيئات β -carotene غير المشبعة مرفوق بزوال لونها البرتقالي، مما يسبب انخفاض في الامتصاصية عند طول موجة 490 نانومتر. إن وجود مركبات مضادة للأكسدة يمكن أن يقلل من أو يمنع امتداد عملية زوال اللون عن طريق تثبيط أكسدة الليبيدات و/أو إزاحة جذور البيروكسيد والجذور الأخرى المتشكلة من هذا النظام، من هذا المنطلق أصبح بالإمكان تقدير النشاطية المضادة للأكسدة للمستخلصات النباتية (Naidu *et al.*, 2011)، كما أن التأثير المضاد للأكسدة في إختبار β -carotene/حمض اللينولييك يشبه ذلك الحاصل على مستوى الأغشية الليبيدية (Tepe *et al.*, 2005).

أظهرت المستخلصات تأثيراً مضاداً للأكسدة بنسب متفاوتة خلال 48 ساعة (الشكل 25) و من خلال النتائج يتضح وجود علاقة ضعيفة بين المحتوى الكمي من عديدات الفينول و الفلافونويدات و نشاطية المستخلصات المضادة للأكسدة ($R^2=0.311$ ، $R^2=0.265$ على الترتيب)، حيث أظهر كل من المستخلص المائي ومستخلص إيثيل الأسيتات نشاطية مضادة للأكسدة عالية قدرت بـ 79.24% و 74.45% على الترتيب، في حين أظهر المستخلص الخام و مستخلص الكلوروفورم أقل نشاطية مضادة للأكسدة بـ 59.83% و 33.78% على الترتيب وقد قدرت نشاطية BHT المضادة للأكسدة بـ 96.02% (الشكل 26).



الشكل 25: النشاطية المضادة للأوكسدة لمستخلصات و الشواهد (BHT و الميثانول و الماء) خلال 48 ساعة في إختبار β -carotene/حمض اللينولييك.



الشكل 26: النشاطية المضادة للأوكسدة للمستخلصات والشواهد (BHT و الميثانول و الماء) بعد مرور 24 ساعة في إختبار β -carotene/حمض اللينولييك

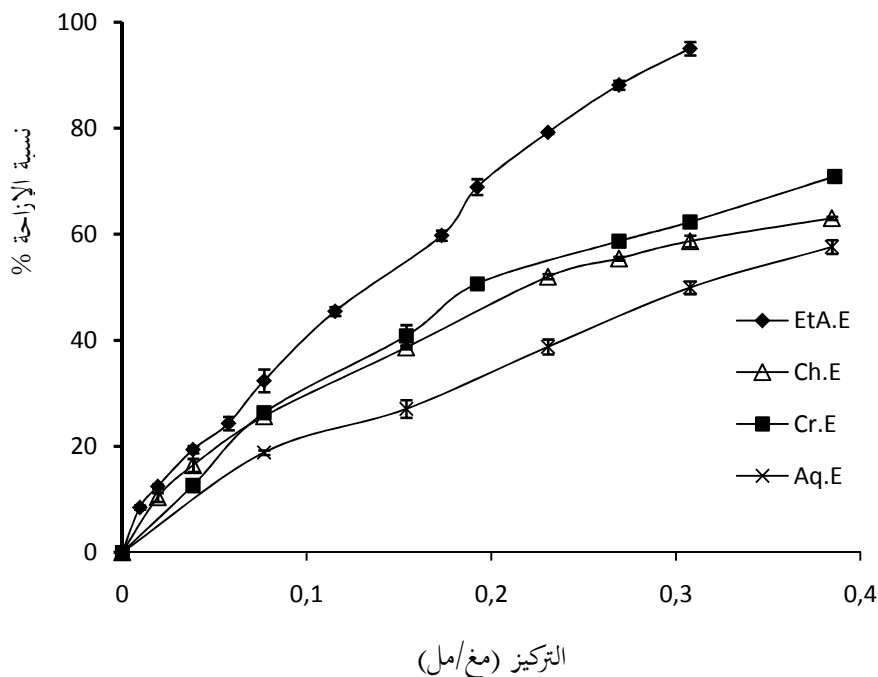
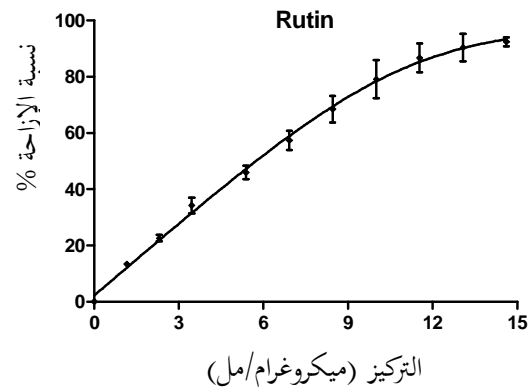
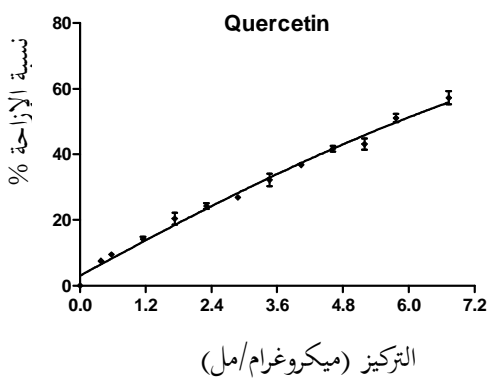
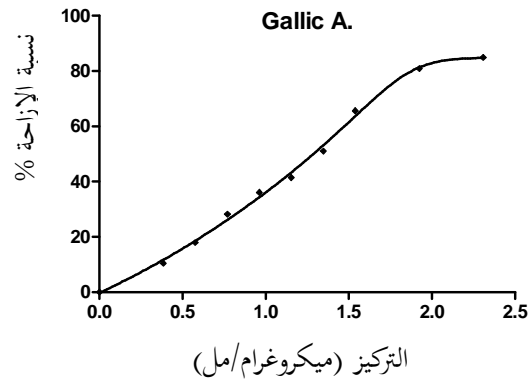
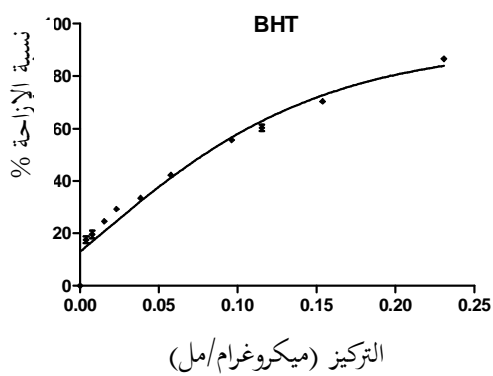
إختبار β -carotene/حمض اللينولييك

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

يمكن تفسير النشاط المضاد للأوكسدة الكبيرة لـ Aq.E و EtA.E و إلى إحتوائهما على المركبات الأكثر قطبية على عكس مستخلص الكلوروفورم، تتوافق هذه النتائج مع ما توصل إليه Baghiani وآخرون (2010) حيث وجد أن مستخلص إيثيل الأسيتات و المستخلص المائي لجذور *Carthamus caeruleus* L. يملكان نشاطية المضادة للأوكسدة بنسبة 79.75% و 77.13% على الترتيب رغم محتواها الضئيل من الفينولات، كما تتوافق هذه النتائج مع ما توصل إليه Wu وآخرون (2010)، حيث أعطى المستخلص المائي ومستخلص إيثيل الأسيتات لـ *Geranium sibiricum* L. أعلى تأثير مضاد للأوكسدة في إختبار β -carotene/حمض اللينولييك، كما أظهرت عدة دراسات أن التأثيرات المضادة للأوكسدة للمستخلصات النباتية يمكن أن يرجع إلى محتواها من المركبات الفينولية والفلافونويدات التي تملك فعل إزاحي إتجاه الجذور الليدية و تمنع أكسدة اللييدات. إن النشاطية المضادة التي تظهرها عديدات الفينول في الأنظمة الليدية قد يرجع إلى إزاحة الجذور الحرة الليدية و/أو إستخلاص الأيونات التي تتدخل في إنتاج جذر OH[•] الذي يعتبر محفزاً قويا لفوق أكسدة اللييدات (Sachdev and Davies, 2008).

3.5. التأثير الإزاحي لمستخلصات *H. cheirifolia* على جذر DPPH

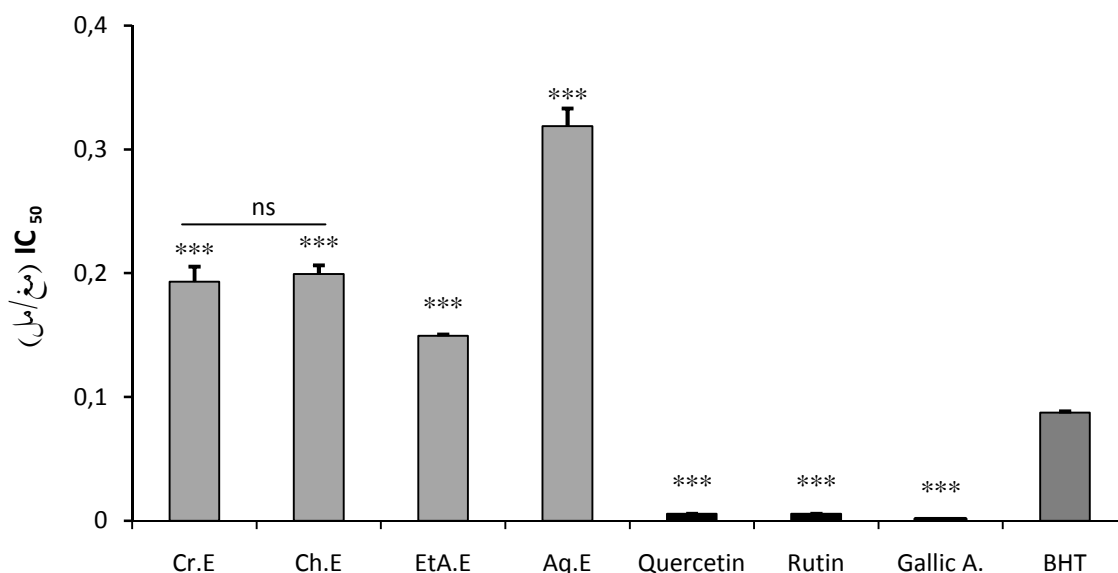
يعتبر إختبار التأثير الإزاحي لـ DPPH من أكثر الإختبارات إستعمالاً في تقدير التأثير الإزاحي للمركبات الفينولية والمستخلصات النباتية، حيث يستعمل في هذا الإختبار مركب DPPH الذي هو عبارة عن جذر حر مستقر ذو لون بنفسجي داكن، يتغير لونه إلى اللون الأصفر عند إرجاعه بواسطة المركبات المضادة للأوكسدة بمنحه إلكترونات أوبروتونا (Goupy et al., 2003). أظهرت النتائج أن كل المستخلصات تزيح جذر DPPH بشكل يتناسب طردياً مع الزيادة في التركيز (الشكل 27).



الشكل 27: التأثير الإزاحي لمختلف مستخلصات *H. cheirifolia* و الشواهد على جذر DPPH.

أظهرت النتائج أن كل المستخلصات تزيح بشكل معتبر جذر DPPH، حيث أظهر مستخلص إيثيل الأسيتات قدرة إزاحية عالية ($0.001 \pm 0.149 = IC_{50}$ مغ/مل)، فيما أظهر كل من المستخلص الخام و مستخلص الكلوروفورم

تأثيراً إزاحياً متساوياً، في حين كان التأثير الإزاحي للمستخلص المائي على جذر DPPH أقل بجوالي مرتين مقارنة بتأثير مستخلص إيثيل الأسيتات، أبدت الشواهد (BHT و quercetin و rutin و حمض الغاليك) تأثير إزاحياً كبيراً على جذر DPPH (الشكل 28).



الشكل 28: تركيز مستخلصات *H.cheirifolia* المريحة لـ 50% من جذر DPPH.

(***: $p \leq 0.001$, ns: $p > 0.05$) .

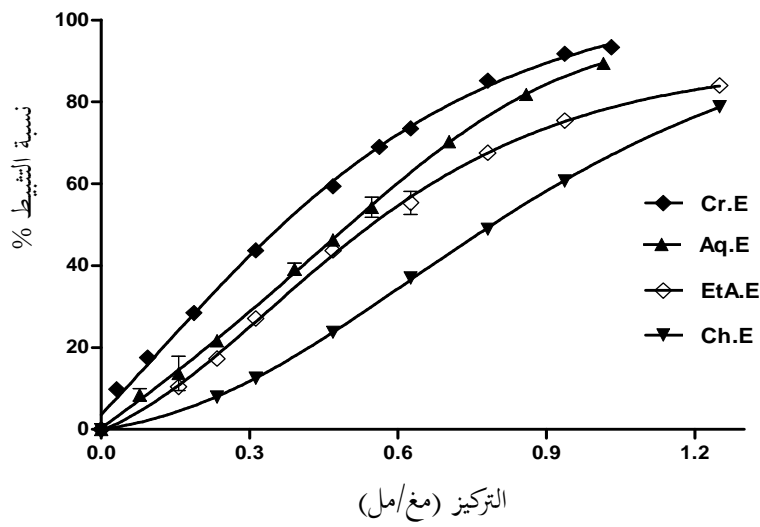
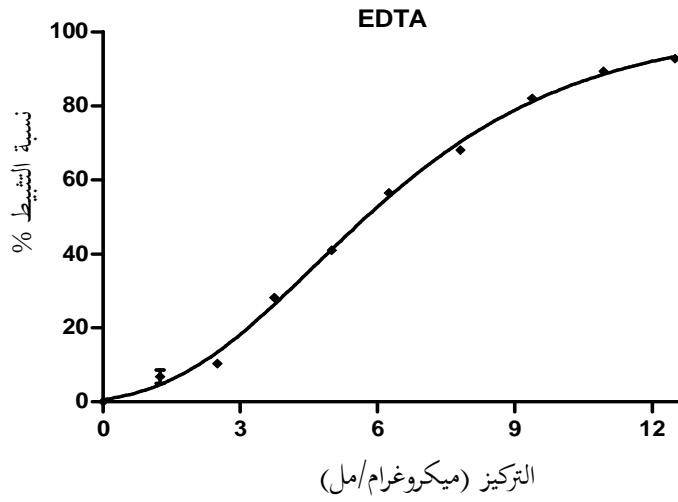
من خلال النتائج المتحصل عليها يتضح أن هناك تناسب طردي بين محتوى المستخلصات من المركبات الفينولية والفلافونويدات والتأثير الإزاحي على جذر DPPH ($R^2=0.718$, $R^2=0.853$ على الترتيب)، فقد أظهر مستخلص إيثيل الأسيتات الذي يحتوي على أكبر كمية من عديدات الفينول و الفلافونويدات أعلى تأثير إزاحي لجذر DPPH. هذه النتائج تتوافق مع ما توصل إليه Dudonne وآخرون (2009)، حيث وجد أن 97% من هذ المستخلصات تملك فعل إزاحي إتجاه جذر DPPH يتناسب مع محتواها الفينولي. كما تتوافق هذه النتائج مع ما توصل إليه Wu وآخرون (2010) في دراسة التأثير المضاد للأوكسدة لمختلف مستخلصات *Geranium sibiricum* L. حيث وجد أن مستخلص إيثيل الأسيتات الأغنى بالفلافونويدات يملك أكبر تأثير إزاحي على جذر DPPH. إضافة إلى العامل الكمي للفلافونويدات، فقد بيّن العديد من الباحثين أن القدرة الإزاحية لهذه المركبات النباتية على جذر DPPH لها علاقة كبيرة بالبنية الكيميائية. حيث أظهر Zheng و آخرون (2010) في دراسة للتأثير

الإزاحي ل 31 فلافونويد على جذر DPPH، أن عدد مجموعات الهيدروكسيل و تموضعها له دور كبير في التأثير الإزاحي، إذ أن وجود مجموعة هيدروكسيل في C3 و البنية ortho-dihydroxyl يعطي أفضل فعل إزاحي على جذر DPPH، كما أن وجود سكر أو مثيل يرفع من الفعل الإزاحي للفلافونويدات.

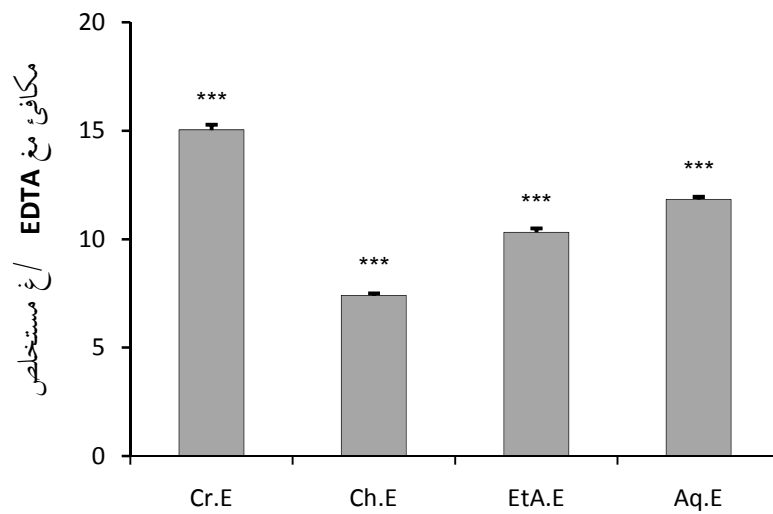
4.5. إختبار إستخلاص المعادن

تلعب المركبات المستخلبة للمعادن دورا مهما في الحد من انتاج الأنواع الأوكسجينية النشطة التي تكون أساسا في أكسدة الليبيدات، و بالتالي تعبر قدرة المركبات على إستخلاص المعادن عن تأثير مضاد للأكسدة قابل للقياس (Bartels et al., 2007). تم تقدير قدرة المستخلصات على إستخلاص أيونات الحديد الثنائي حسب Le وآخرون (2007)، حيث يعتمد مبدأ هذه التقنية على قدرة المركبات الملتقطة للمعادن على منع تشكيل مركب Fe²⁺-Ferrozine، إذ تُعبر نسبة تثبيط تشكل المركب Fe²⁺-Ferrozine بواسطة المستخلصات عن قدرة هذه الأخيرة على إستخلاص أيونات الحديد الثنائي. بينت النتائج المتحصل عليها أن مستخلصات *H. cheirifolia* تمنع تشكيل المركب Fe²⁺-Ferrozine بشكل يتناسب طرديا مع الزيادة في التركيز (الشكل 29). تم التعبير عن النتائج بمكافئ مغ EDTA لكل غ من المستخلص حسب Kandhasamy وآخرون (2010).

أظهر المستخلص الخام قدرة عالية على إستخلاص المعادن (15.03 مكافئ مغ EDTA/غ)، فيما أظهر كل من المستخلص المائي و مستخلص إيثيل الأسيتات قدرة إستخلاص متقاربة (11.83 و 10.32 مكافئ مغ EDTA/غ) في حين كانت قدرة مستخلص الكلوروفورم على إستخلاص المعادن ضعيفة مقارنة بالمستخلصات الأخرى (7.40 مكافئ مغ EDTA/غ) (الشكل 30). من خلال النتائج نلاحظ وجود علاقة ضعيفة بين المحتوى الفينولي والفلافونويدي لهذه المستخلصات و القدرة على إستخلاص المعادن ($R^2=0.116$ ، $R^2=0.173$ على الترتيب)، هذه النتائج تتوافق مع ماتوصل إليه Zhao و آخرون (2008)، حيث أظهر أن هناك علاقة ضعيفة بين المحتوى الفينولي لمستخلصات الشعير وقدرتها على إستخلاص المعادن.



الشكل 29: تأثير مستخلصات *H. cheirifolia* و EDTA على تشكيل مركب Fe^{+2} -Ferrozine.



الشكل 30: قدرة مستخلصات *H. cheirifolia* على إستخلاص المعادن (مكافئ مغ EDTA / غ من المستخلص).

. (***: $p \leq 0.001$)

يمكن للفلافونويدات أن تقوم بإستحلاب المعادن عبر تشكيل روابط معها، هذه القدرة ترتبط بالخصائص البنيوية للفلافونويدات بالتالي نوعية المركبات الفينولية في كل مستخلص هي التحدد قدرة هذا المستخلص على إستحلاب المعادن، حيث أن الفلافونويدات التي تملك مجموعة هيدروكسيل في الموقعين C5 و C3 بالإضافة إلى وجود وظيفة C = O في الموقع C4 تملك قدرة إستحلاب عالية (Perron and Brumaghim, 2009).

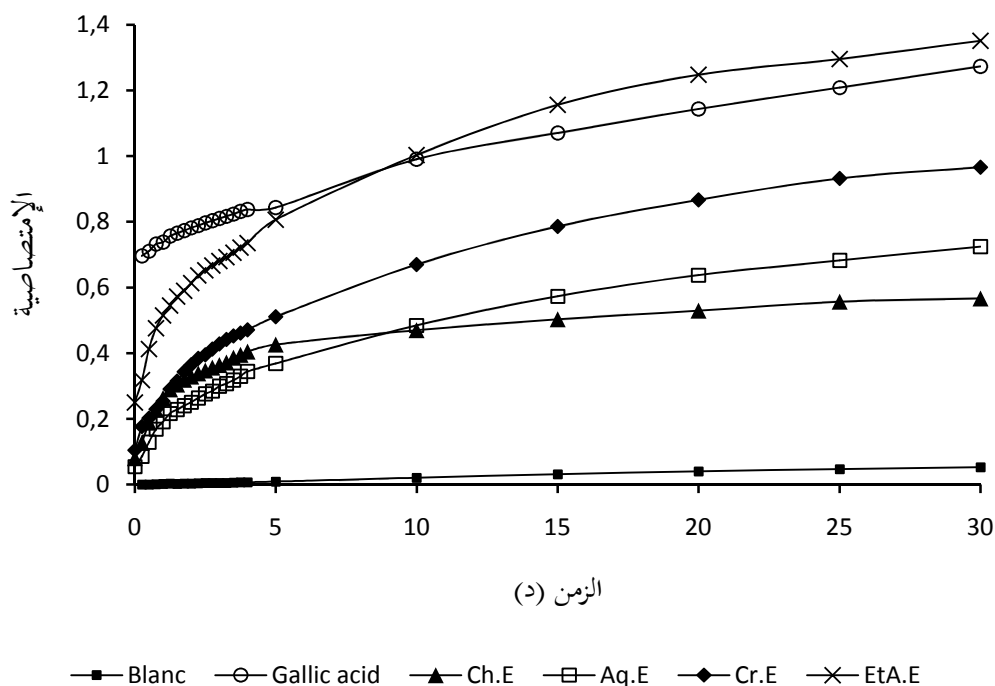
كما أن قدرة المستخلصات على إستحلاب أيونات الحديد الثنائي يمكن أن ترجع لمركبات أخرى غير الفلافونويدات في هذه المستخلصات أو فعل تعاوي (synergism) بين مختلف المكونات الموجودة فيها، و هذا ربما ما يفسر القدرة الكبيرة التي أظهرها المستخلص الخام على إستحلاب المعادن (Zhao et al., 2008).

5.5. دراسة النشاطية المضادة للأكسدة بطريقة FRAP

كثير من المركبات تعتمد في آليتها المضادة للأكسدة على القدرة الإرجاعية لمختلف الجذور الحرة، و لتقدير هذه القدرة عند مستخلصات أوراق *H. cheirifolia*، قمنا بدراسة النشاطية المضادة للأكسدة بطريقة FRAP، حيث تركز هذه التقنية على قياس التغيرات التي تحدث في الإمتصاصية بسبب ظهور اللون الأزرق الناتج عن إرجاع مضادات الأكسدة لمركب Fe^{+3} -TPTZ إلى Fe^{+2} -TPTZ في وسط تفاعل حمضي (Benzie et al., 1996)، حيث تم تطبيق هذه التقنية على عديدات الفينول و تم تمديد فترة التفاعل إلى 30 دقيقة (Pulido et al., 2000). تم دراسة القدرة الإرجاعية/المضادة للأكسدة لمستخلصات أوراق *H. cheirifolia* بإستعمال عدة تراكيز نهائية، كما أستعملت عدة تراكيز من $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0-2000 ميكرومولر) لتحديد قيم EC1 و القوة الإرجاعية لكل مستخلص عند الدقيقتين 4 و 30 د.

أبدت بعض المستخلصات قوة إرجاعية تصل تقريبا إلى الضعف عند الدقيقة 30 مقارنة بالدقيقة الرابعة كما هو الحال بالنسبة لمستخلص إيثيل الأسيتات و المستخلص الخام. أظهرت النتائج أن هناك تناسب كبير بين القوة الإرجاعية/المضادة للأكسدة (TAP) total antioxidant power و محتوى المستخلصات من عديدات

الفينول والفلافونويدات ($R^2=0.879$ و $R^2=0.768$ على الترتيب) (الشكل 31،32)، حيث أن مستخلص إيثيل الأسيتات هو أقوى المستخلصات من حيث القوة الإرجاعية وأغناها بالفلافونويدات (13.08 ملي مول Fe^{2+} /غ) عند الدقيقة 30 هذه القيمة كانت نصف القيمة الإرجاعية لحمض الغاليك (28.31 ملي مول Fe^{2+} /غ) (الجدول 6)، يليه المستخلص الخام ثم المستخلص المائي ومستخلص الكلوروفوم على التوالي، هذه النتائج تتناسب مع ما توصل إليه Li و آخرون (2008) في دراسة النشاطية المضادة للأوكسدة لمستخلصات 45 نبتة بواسطة تقنية FRAP، حيث أثبت أن القدرة الإرجاعية لهذه المستخلصات تتناسب مع محتواها من عديدات الفينول والفلافونويدات.



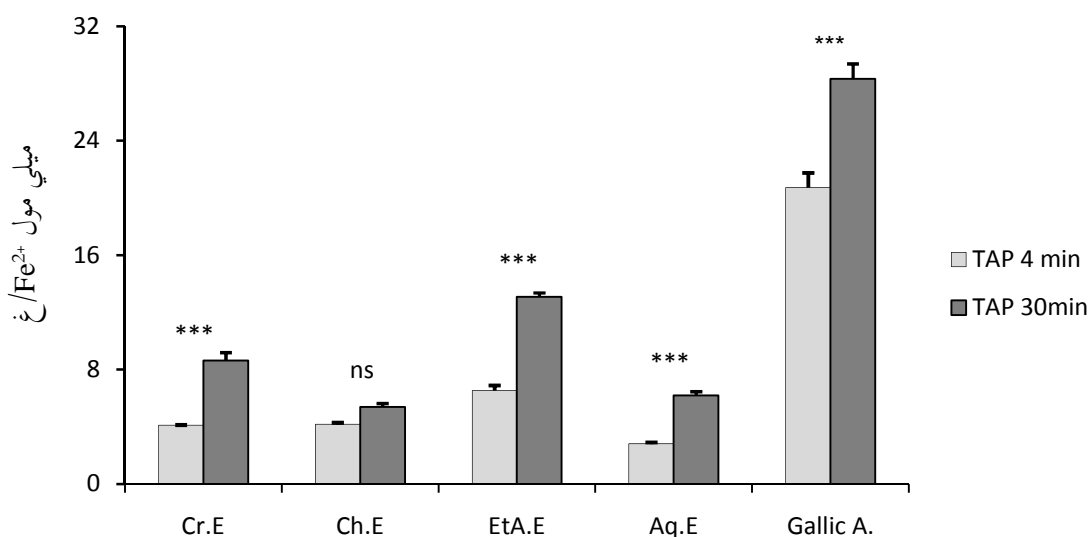
الشكل 31: حركيات تفاعل FRAP لمستخلصات *H. cheirifolia* بتركيز 0.147 مغ/مل و حمض الغاليك بتركيز 0.043 مغ/مل

أظهر Dudonne وآخرون (2009) في دراسة التأثير المضاد للأوكسدة بعدة طرق لمستخلصات 30 نبتة، أن القدرة الإرجاعية لهذه المستخلصات تتناسب مع محتواها من عديدات الفينول، كما بين Wu وآخرون (2010) في دراسة التأثير المضاد للأوكسدة لمختلف مستخلصات *Geranium sibiricum* L. بإستعمال طريقة FRAP، أن القدرة الإرجاعية لهذه المستخلصات يتناسب مع محتواها من الفلافونويدات. إضافة إلى العامل الكمي فإن نوعية

الفلافونويدات في كل مستخلص يمكن أن تحدد القدرة الإرجاعية لهذا الأخير، كما يمكن إرجاع التأثير الإرجاعي للمستخلصات إلى وجود مركبات أخرى مثل الفيتامينات أو الكاروتينات أو إلى فعل تآزري بين هذه المركبات و المركبات الفينولية (Wang *et al.*, 2011).

الجدول 6. قيم EC1 و TAP لمستخلصات *H. cheirifolia* عند الدقيقة 4 و الدقيقة 30 بإستعمال طريقة FRAP.

(>30) TAP	(>4) TAP	(>30) EC1	(>4) EC1	
ملي مول Fe^{2+} /غ	ملي مول Fe^{2+} /غ	(مغ/مل)	(مغ/مل)	
مستخلص	مستخلص			
0.0544±8.654	0.0163±4.113	0.0007±0.115	0.0009±0.243	Cr.E
0.0243±5.385	0.0910±4.193	0.0008±0.185	0.0051±0.238	Ch.E
0.0268±13.084	0.3728±6.524	0.0001±0.076	0.0087±0.153	EtA.E
0.0265±6.187	0.1038±2.809	0.0006±0.161	0.0131±0.356	Aq.E
1.0458±28.312	1.0312±20.710	0.0003±0.0354	0.0030±0.0488	Gallic A.



الشكل 32: مقارنة بين قيم TAP عند الدقيقتين 4 و 30 لمستخلصات *H. cheirifolia* وحمض الغاليك.

(***: $p \leq 0.001$, ns: $p > 0.05$)

المناقشة العامة

إن الاهتمام بمضادات الأكسدة في تزايد مستمر، كما زاد الإهتمام أكثر بمضادات الأكسدة الطبيعية المتواجدة في النباتات الطبية والغذائية وذلك لفعاليتها، توفرها و قلة تأثيراتها الجانبية. يعود التأثير المضاد للأكسدة للمواد الطبيعية النباتية أساسا إلى محتواها من عديدات الفينول خاصة الفلافونويدات. يعتبر إنزيم XOR من أهم المصادر الداخلية المنتجة للأنواع الأكسجينية النشطة، إذ تحضى دراسة مثبطات هذا الإنزيم بأهمية كبيرة، حيث أن معالجة هذا الإنزيم بمواد ذات تأثير تثبيطي و إزاحي للجذور الحرة في نفس الوقت له دور علاجي مهم.

في بحثنا هذا قمنا بدراسة التأثير المضاد للأكسدة لمختلف مستخلصات أوراق *Hertia cheirifolia* بطرق إنزيمية و غير إنزيمية، بينت نتائج الدراسة أن مستخلصات أوراق *H. cheirifolia* تملك تأثير تثبيطي على إنزيم XO بشكل يتناسب مع الزيادة في التركيز، حيث كان مستخلص إيثيل الأسيتات و مستخلص الكلوروفورم أكثر فعالية ($0.0075 \pm 0.157 = IC_{50}$ مغ/مل، $0.003 \pm 0.232 = IC_{50}$ مغ/مل على الترتيب)، فيما أظهر المستخلص الخام والمستخلص المائي تأثيرا أقل بحوالي 3 مرات و 4 مرات على الترتيب مقارنة بمستخلص إيثيل الأسيتات. يعزى التأثير التثبيطي العالي لمستخلص إيثيل الأسيتات إلى المحتوى الفلافونويدي الكبير لهذا المستخلص و هذا ما يتوافق مع ما توصل إليه كل من (Tung and Chang, 2010, Wu et al., 2010)، أما التأثير التثبيطي لمستخلص الكلوروفورم فقد يعزى لنوعية الفلافونويدات الموجودة في هذا المستخلص (Pauff and Hille, 2099)

هذا التأثير يتناسب مع محتواها من الفلافونويدات وعديدات الفينول. يرجع التأثير التثبيطي للفلافونويدات على XO للتشابه البنيوي بين حلقة البنزن التي تضم مجاميع الهيدروكسيل الموجودة في الفلافونويدات و مواد تفاعل الإنزيم (Lespade and Bercion, 2010). في التأثير الإزاحي على جذر O_2^- الناتج عن XO بإستعمال Cyt-c كان مستخلص إيثيل الأسيتات أكثر فعالية من المستخلصات الأخرى ($0.002 \pm 0.226 = IC_{50}$ مغ/مل) يليه مستخلص الكلوروفورم ($0.017 \pm 0.353 = IC_{50}$ مغ/مل)، بينما أظهر المستخلص الخام و المستخلص المائي أقل

تأثير الإزاحي، من الصعب التنبؤ ما اذا كان التأثير الإرجاعي لـ Cyt c يعزى لإزاحة جذر فوق الأكسيد أو تثبيط إنزيم XO للتأكد من نوع التأثير تم إختبار التأثير الإزاحي لمستخلصات *H. cheirifolia* على جذر O_2^- بإستعمال النظام PMS-NADH-NBT حيث أظهرت المستخلصات تأثيرا إزاحيا بنفس الترتيب الذي ظهر في الطريقة الإنزيمية لكن بقيم IC_{50} أكبر ، أما المستخلص الخام و المستخلص المائي فقد أظهرتا قدرة إزاحية متقاربة. فحسب تصنيف Cos وآخرون، (1998) و بأخذ بعين الإعتبار قيم المثبطة للإنزيم وقيم IC_{50} المزيجة لجذر O_2^- فإن مستخلصات أوراق *H. cheirifolia* تنتمي إلى المجموعة B والتي تضم الفلافونويدات التي تملك تأثير تثبيطي فقط على إنزيم XO.

تم تطوير العديد من التقنيات لقياس التأثيرات المضادة للأكسدة للمستخلصات النباتية، والتي تركز على الآليات المختلفة للدفاع المضاد للأكسدة، تم تطبيق بعض هذه التقنيات في هذه الدراسة، حيث أظهرت نتائج إختبار β -carotene/حمض اللينولييك أن مستخلصات *H. cheirifolia* تملك نشاطية مضادة للأكسدة بنسب متفاوتة، فقد أظهر كل من المستخلص المائي و مستخلص إيثيل الأسيتات أعلى نشاطية مضادة للأكسدة (79.24% و74.45% على الترتيب)، بينما أظهر المستخلص المائي و مستخلص الكلوروفورم تأثيرا أقل (59.83% و33.78% على الترتيب). قد يعود هذا التأثير المضاد للأكسدة العالي للمستخلصين إلى نوعية المركبات الفينولية والفلافونويدات التي يحتويها هذين المستخلصين، فهما يحتويان على الفلافونويدات السكرية و المركبات الأكثر قطبية، إن التأثير المضاد للأكسدة في إختبار β -carotene/حمض اللينولييك يشبه ذلك الحاصل على مستوى الأغشية الليبدية (Tepe et al., 2005)، تقوم مختلف الأنظمة المضادة للأكسدة بحماية الأغشية الليبدية من الإجهاد التأكسدي عن طريق إزاحة الجذور الحرة و/أو إستخلاص المعادن المتدخلة في إنتاجها، كما أن تدخل بعض الأنظمة يكون عن طريق عملية الإرجاع مثل Vit.C و Vit.E، لحد قمتنا بإختبارات أخرى وقد أظهرت النتائج في إختبار DPPH أن جميع المستخلصات تزيح جذر DPPH بشكل يتناسب مع الزيادة في التركيز، و قد أظهر المستخلص الخام و مستخلص الكلوروفورم تأثيرا إزاحيا متساويا، هذا التأثير كان أقل بحوالي مرة ونصف

مقارنة بمستخلص إيثيل الأسيتات الذي أظهر أعلى تأثير إزاحي ($0.001 \pm 0.149 = IC_{50}$ مغ/مل)، في حين أظهر المستخلص المائي أقل تأثير إزاحي على جذر DPPH ($0.014 \pm 0.318 = IC_{50}$ مغ/مل). هذا ما يتناسب مع محتوى الفلافونويدات المتواجدة بهذه المستخلصات. هذا ما أظهره العديد من الباحثين حول التناسب الطردوي بين النشاطية الإزاحية للجذور الحرة والمحتوى الفينولي للمستخلصات (Dudonne et al., 2009)، إضافة إلى العامل الكمي فقد أظهر Zheng و آخرون (2010) العلاقة بين بنية الفلافونويدات و قدرتها الإزاحية، و هذا ما قد يفسر التأثير العالي لمستخلص الكلوروفورم رغم محتواه القليل من الفلافونويدات.

أظهر إختبار إستخلاص المعادن أن المستخلص الخام يملك قدرة إستخلاص كبيرة مقارنة بالمستخلصات الأخرى. هذا التأثير قد يرجع إلى فعل تعاوي (synergism) بين مختلف المركبات المتواجدة في هذا المستخلص. ي تم دراسة القدرة الإرجاعية/المضادة للأكسدة لمستخلصات أوراق *H. cheirifolia* بطريقة FRAP، وقد أظهرت هذه المستخلصات قدرة إرجاعية أقل مقارنة بحمض الغاليك الذي أظهر قوة إرجاعية كبيرة. أعطى مستخلص الإيثيل أسيتات أكبر قوة إرجاعية مقارنة بالمستخلصات الأخرى بأكبر قيمة TAP و ذلك عند الدقيقتين 4 و 30 على الترتيب، يليه مستخلص الخام ثم المستخلصين المائي و الكلورفومي على التوالي. يتضح من خلال هذه النتائج أن هناك تناسب كبير بين القوة الإرجاعية و محتوى المستخلصات النباتية من عديدات الفينول و الفلافونويدات.

من خلال النتائج المتحصل عليها من هذه الدراسة، يمكننا القول أن مستخلصات *H. cheirifolia* تمتلك كمية معتبرة من عديدات الفينول و الفلافونويدات والتي تعكس النشاطية المضادة للأكسدة لهذه المستخلصات في كل من التأثير التثبيطي على إنزيم XO، الفعل الإزاحي على كل من جذر O_2^- و DPPH، الفعل الإرجاعي بطريقة FRAP، بينما غاب هذا الإنعكاس في إختبار β -carotene/حمض اللينوليك و إختبار إستخلاص المعادن، النتائج المتحصل عليها تعطي نظرة عامة حول التأثير المضاد للأكسدة لمستخلصات *H. cheirifolia*، إلا أن دراسات أخرى مكتملة يمكن أن تحدد بشكل أفضل هذا التأثير.

المراجع

- Abdollahi M., Ranjbar A., Shadnia S., Nikfar S. and Rezaie A.(2004). Pesticides and oxidative stress. *Med Sci Monit.* **10**: RA141-RA147.
- Alvarez M. A., Debattista N. B. and Pappano N. B.(2008). Antimicrobial activity and synergism of some substituted flavonoids. *Folia Microbiol (Praha).* **53**: 23-28.
- Alvarez M. N., Peluffo G., Piacenza L. and Radi R.(2011). Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. *J Biol Chem.* **286**: 6627-6640.
- Amado L. C., Saliaris A. P., Raju S. V., Lehrke S., St J. M., Xie J., Stewart G., Fitton T., Minhas K. M., Brawn J. and Hare J. M.(2005). Xanthine oxidase inhibition ameliorates cardiovascular dysfunction in dogs with pacing-induced heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* **39**: 53.536-1
- Ammar S., Edziri H., Mahjoub M. A., Chatter R., Bouraoui A. and Mighri Z.(2009). Spasmolytic and anti-inflammatory effects of constituents from *Hertia cheirifolia*. *Phytomedicine.* **16**: 1156-1161.
- Ani V., Varadaraj M. C. and Akhilender N. K.(2006). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenolic compounds from bitter cumin (*Cuminum nigrum* L.). *Eur Food Res Technol.* **224**: 109-115.
- Arablinskaia N. E., Borisov S. E., Gracheva M. P. and Kupavtseva E. A.(2006). Free radical processes in the phagocytes of the lung in the diagnosis of granulomatous diseases. *Probl Tuberk Bolezn Legk.* **52**: 49-54.
- Aust S. D., Hebdon T., Humbert J. and Dimalanta R.(2010). Hydroxyl free radical production during torsional phacoemulsification. *J Cataract Refract Surg.* **36**:2149-2146 :
- Avouac J., Borderie D., Ekindjian O. G., Kahan A. and Allanore Y.(2010). High DNA oxidative damage in systemic sclerosis. *J Rheumatol.* **37**: 2540-2547.
- Baghiani A., Boumerfeg S., Belkhiri F., Khennouf S., Charef N., Harzallah D., Arrar L. and Abdel-Wahhab M.(2010). Antioxidant and radical scavenging properties of *Carthamus caeruleus* L. extracts grow wild in Algeria flora. *Comunicata Scientiae.* **1**: 128-136.
- Baghiani A., Harrison R. and Benboubetra M.(2003). Purification and partial characterisation of camel milk xanthine oxidoreductase. *Arch Physiol Biochem.* **111**: 407-414.

- Bahorun T., Aumjaud E., Ramphul H., Rycha M., Luximon-Ramma A., Trotin F. and Aruoma O. I.(2003). Phenolic constituents and antioxidant capacities of *Crataegus monogyna* (Hawthorn) callus extracts. *Nahrung*. **47**: 191-198.
- Balaban R. S., Nemoto S. and Finkel T.(2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. **120**: 483-495.
- Bartels-Stringer M., Verpalen J. T., Wetzels J. F., Russel F. G. and Kramers C.(2007). Iron chelation or anti-oxidants prevent renal cell damage in the rewarming phase after normoxic, but not hypoxic cold incubation. *Cryobiology*. **54**: 258-264.
- Benboubetra M., Baghiani A., Atmani D. and Harrison R.(2004). Physicochemical and kinetic properties of purified sheep's milk xanthine oxidoreductase. *J Dairy Sci*. **87**: 1580-1584.
- Benzie I. F. and Strain J. J.(1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. **239**: 70-76.
- Biljak V. R., Rumora L., Cepelak I., Pancirov D., Popovic-Grle S., Soric J. and Grubisic T. Z.(2010). Glutathione cycle in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Cell Biochem Funct*. **28**: 448-453.
- Bodzek P. and Wielkoszynski T.(2003). Evaluation of vitamin C and E concentration--some nonenzymatic indicators of antioxidant protective barrier in pregnant women. *Wiad Lek*. **56**: 508-514.
- Bonnefont-Rousselot D., Thérond P. and Delattre J.(2003). Radicauxlibresetanti-oxydants. *In: Delattre J., Durand G. and Jardillier J.C. Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires*, Flammarion : Paris ; 59-81.
- Borges F., Fernandes E. and Roleira F.(2002). Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Curr Med Chem*. **9**: 195-217.
- Boumerfeg S., Baghiani A., Messaoudi D., Khennouf S. and Arrar L.(2009). Antioxidant properties and xanthine oxidase inhibitory effects of *Tamus communis* L. root extracts. *Phytother Res*. **23**: 283-288.
- Bray R. C., Bennett B., Burke J. F., Chovnick A., Doyle W. A., Howes B. D., Lowe D. J., Richards R. L., Turner N. A., Ventom A. and Whittle J. R.(1996). Recent studies on xanthine oxidase and related enzymes. *Biochem Soc Trans*. **24**: 99-105.
- Brondino C. D., Romao M. J., Moura I. and Moura J. J.(2006). Molybdenum and tungsten enzymes: the xanthine oxidase family. *Curr Opin Chem Biol*. **10**: 109-114.

- Buer C. S., Imin N. and Djordjevic M. A.(2010). Flavonoids: new roles for old molecules. *J Integr Plant Biol.* **52**: 98-111.
- Cai Y. Z., Mei S., Jie X., Luo Q. and Corke H.(2006). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci.* **78**: 2872-2888.
- Cakir B., Kasimay O., Kolgazi M., Ersoy Y., Ercan F. and Yegen B. C.(2010). Stress-induced multiple organ damage in rats is ameliorated by the antioxidant and anxiolytic effects of regular exercise. *Cell Biochem Funct.* **28**: 469-479.
- Calabrese V., Cornelius C., Maiolino L., Luca M., Chiaramonte R., Toscano M. A. and Serra A.(2010). Oxidative stress, redox homeostasis and cellular stress response in Meniere's disease: role of vitagenes. *Neurochem Res.* **35**: 2208-2217.
- Capettini L. S., Cortes S. F. and Lemos V. S.(2010). Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta. *Eur J Pharmacol.* **643**: 260-266.
- Cazarolli L. H., Zanatta L., Alberton E .H., Figueiredo M. S., Folador P., Damazio R. G., Pizzolatti M. G. and Silva F. R.(2008). Flavonoids: prospective drug candidates. *Mini Rev Med Chem.* **8**: 1429-1440.
- Cazzola R., Rondanelli M., Russo-Volpe S., Ferrari E. and Cestaro B.(2004). Decreased membrane fluidity and altered susceptibility to peroxidation and lipid composition in overweight and obese female erythrocytes. *J Lipid Res.* **45**: 1846-1851.
- Charlton A. J., Baxter N. J., Khan M. L., Moir A. J., Haslam E., Davies A. P. and Williamson M. P.(2002). Polyphenol/peptide binding and precipitation. *J Agric Food Chem.* **50**: 1593-1601.
- Cheng F. C., Jen J. F. and Tsai T. H.(2002). Hydroxyl radical in living systems and its separation methods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **781**: 481-496.
- Chilappa C. S., Aronow W. S., Shapiro D., Sperber K., Patel U. and Ash J. Y.(2010). Gout and hyperuricemia. *Compr Ther.* **36**: 3-13.
- Chiu L. Y., Ho F. M., Shiah S. G., Chang Y. and Lin W. W.(2011). Oxidative stress initiates DNA damager MNNG-induced poly (ADP-ribose) polymerase-1-dependent parthanatos cell death. *Biochem Pharmacol.* **81**: 459-470.
- Choi E. Y., Stockert A. L., Leimkuhler S. and Hille R.(2004). Studies on the mechanism of action of xanthine oxidase. *J Inorg Biochem.* **98**: 841-848.

- Clare D. A., Zheng Z., Hassan H. M., Swaisgood H. E. and Catignani G. L.(2008). Antimicrobial properties of milkfat globule membrane fractions. *J Food Prot.* **71**: 126-133.
- Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J. P., Cimanga K., Van P. B., Pieters L., Vlietinck A. J. and Vanden Berghe D .(1998).Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod.* **61**: 71-76.
- Dapkevicius A., Venskoutonis R., Van Beek T. A. and Linssen P. H.(1998). Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *J Sci Food Agric.* **77**: 140-146.
- Day B. J.(2009). Catalase and glutathione peroxidase mimics. *Biochem Pharmacol.* **77**: 285-296.
- De Souza R. F. and De Giovanni W. F.(2004). Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Rep.* **9**: 97-104.
- Desai P. B., Manjunath S., Kadi S., Chetana K. and Vanishree J.(2010). Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in rheumatoid arthritis: a case control study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* **14**: 959-967.
- Doel J. J., Godber B. L., Eisenthal R. and Harrison R.(2001). Reduction of organic nitrates catalysed by xanthine oxidoreductase under anaerobic conditions. *Biochim Biophys Acta.* **1527**: 81-87.
- Dranka B .P., Hill B. G. and Darley-Usmar V. M.(2010). Mitochondrial reserve capacity in endothelial cells: the impact of nitric oxide and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* **48**: 905-914.
- Dudonne S., Vitrac X., Coutiere P., Woillez M. and Merillon J. M .(2009).Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J Agric Food Chem.* **57**: 1768-1774.
- Enroth C., Eger B. T., Okamoto K., Nishino T., Nishino T. and Pai E. F.(2000). Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**: 10723-10728.
- Erdogan-Orhan I., Sever-Yilmaz B., Altun M. L. and Saltan G.(2010). Radical quenching activity, ferric-reducing antioxidant power, and ferrous ion-chelating capacity of 16 Ballota species and their total phenol and flavonoid contents. *J Med Food.* **13**: 1537-1543.
- Fang Y. Z., Yang S. and Wu G.(2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* **18**: 872-879.

- Ferrali M., Signorini C. and Caciotti B.(1997). Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS-Lett.* **416**: 123-129.
- Filosto M., Scarpelli M., Cotelli M. S., Vielmi V., Todeschini A., Gregorelli V., Tonin P., Tomelleri G. and Padovani A.(2011). The role of mitochondria in neurodegenerative diseases. *J Neurol.* **258**:1763-74.
- Flohe L. and Ursini F.(2008). Peroxidase: a term of many meanings. *Antioxid Redox Signal.* **10**: 1485-1490.
- Fukai T. and Ushio-Fukai M.(2011). Superoxide Dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal.* **15**: 1583-1606.
- Ganapaty S., Chandrashekhar V. M. and Narsu M. L.(2010). Evaluation of anti-allergic activity of gossypin and suramin in mast cell-mediated allergy model. *Indian J Biochem Biophys.* **47**: 90-95.
- Garattini E., Mendel R., Romao M. J., Wright R. and Terao M.(2003). Mammalian molybdo-flavoenzymes, an expanding family of proteins: structure, genetics, regulation, function and pathophysiology. *Biochem J.* **372**: 15-32.
- Gebicka L. and Didik J.(2010). Oxidative stress induced by peroxynitrite. *Postepy Biochem.* **56**: 103-106.
- Ghezzi P., Bonetto V. and Fratelli M.(2005). Thiol-disulfide balance: from the concept of oxidative stress to that of redox regulation. *Antioxid Redox Signal.* **7**: 964-972.
- Goupy P., Dufour C., Loonis M. and Dangles O.(2003). Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *J Agric Food Chem.* **51**: 615-622.
- Gutierrez J., Ballinger S. W., Darley-USmar V. M. and Landar A.(2006). Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: the emerging role in signal transduction in vascular cells. *Circ Res.* **99**: 924-932.
- Gutierrez-Merino C., Lopez-Sanchez C., Lagoa R., Samhan-Arias A. K., Bueno C. and Garcia-Martinez V.(2011). Neuroprotective actions of flavonoids. *Curr Med Chem.* **18**: 1195-1212.
- Halliwell B. and Whiteman M.(2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* **142**: 231-255.
- He J., Yu Y., Chen X., Sun W., Fang F., Li N. and Zheng J.(2010). Research progress on drug metabolism of flavanoids. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* **35**:2794-2789 :

Hellstrom J. K., Torronen A. R. and Mattila P. H.(2009). Proanthocyanidins in common food products of plant origin. *J Agric Food Chem.* **57**: 7899-7906.

Herbette S., Roeckel-Drevet P. and Drevet J. R.(2007). Seleno-independent glutathione peroxidases. more than simple antioxidant scavengers. *FEBS J.* **274**: 2163-2180.

Hooper L., Kroon P. A., Rimm E. B., Cohn J. S., Harvey I., Le Cornu K. A., Ryder J. J., Hall W. L. and Cassidy A.(2008). Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr.* **88**: 38-50.

<http://www.gardenguides.com/taxonomy/hertia-cheirifolia>

Hutter E., Skovbro M., Lener B., Prats C., Rabol R., Dela F. and Jansen-Durr P.(2007). Oxidative stress and mitochondrial impairment can be separated from lipofuscin accumulation in aged human skeletal muscle. *Aging Cell.* **6**: 245-256.

Iakovleva K. E., Kurzeev S. A., Stepanova E. V., Fedorova T. V., Kuznetsov B. A. and Koroleva O. V.(2007). Characterization of plant phenolic compounds by cyclic voltammetry. *Prikl Biokhim Mikrobiol.* **43**:739-730 :

Ihm S. H., Lee J. O., Kim S. J., Seung K. B., Schini-Kerth V. B., Chang K. and Oak M. H.(2009). Catechin prevents endothelial dysfunction in the prediabetic stage of OLETF rats by reducing vascular NADPH oxidase activity and expression. *Atherosclerosis.* **206**: 47-53.

Iserin P.(2001). *Encyclopédie des plantes médicinales*. Ed Larousse-Bordas, 14 Paris-France. 326.

Jan A. T., Ali A. and Haq Q.(2011). Glutathione as an antioxidant in inorganic mercury induced nephrotoxicity. *J Postgrad Med.* **57**: 72-77.

Jang Y. J., Kim J., Shim J., Kim J., Byun S., Oak M. H., Lee K. W. and Lee H. J.(2011). Kaempferol attenuates 4-hydroxynonenal-induced apoptosis in PC12 cells by directly inhibiting NADPH oxidase. *J Pharmacol Exp Ther.* **337**: 747-754.

Jiao R. H., Ge H. M., Shi d. H. and Tan R. X.(2006). An apigenin-derived xanthine oxidase inhibitor from *Palhinhaea cernua*. *J Nat Prod.* **69**: 1089-1091.

Jomova K., Vondrakova D., Lawson M. and Valko M.(2010). Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem.* **345**: 91-104.

Jones M. L., Ganopolsky J. G., Labbe A., Wahl C. and Prakash S.(2010). Antimicrobial properties of nitric oxide and its application in antimicrobial formulations and medical devices. *Appl Microbiol Biotechnol.* **88**: 401-407.

- Kalia K., Sharma K., Singh H. P. and Singh B.(2008). Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosanguinea* Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. *J Agric Food Chem.* **56**: 1012-10134-9
- Kandhasamy S., Jince M. J., aruppusamy A. and ellamuthu M.(2010). Evaluation of *Merremia tridentata* L. Hallier f. for *in vitro* antioxidant activity. *Food Sci Biotechnol.* **19**: 663-669.
- Karthikeyan J. and Rani P.(2003). Enzymatic and non-enzymatic antioxidants in selected Piper species. *Indian J Exp Biol.* **41**: 135-140.
- Kashihara N., Haruna Y., Kondeti V. K. and Kanwar Y. S.(2010). Oxidative stress in diabetic nephropathy. *Curr Med Chem.* **17**: 4256-4269.
- Kirschvink N., de Moffarts B. and Lekeux P.(2000) .The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *Vet J.* **177**: 178-191.
- Koivula M. J., Kanerva M., Salminen J. P., Nikinmaa M. and Eeva T.(2011). Metal pollution indirectly increases oxidative stress in great tit (*Parus major*) nestlings. *Environ Res.* **111**.370-362 :
- Koshiishi I.(2009). Lipid-derived radicals in lipoxygenase reactions. *Seikagaku.* **81**: 793-797.
- Kumar R., Darpan, Sharma S. and Singh R.(2011). Xanthine oxidase inhibitors: a patent survey. *Expert Opin Ther Pat.* **21**:1071-1078.
- Lagadu S., Lechevrel M., Sichel F ,Breton J., Pottier D., Couderc R., Moussa F. and Prevost V.(2010). 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a biomarker of oxidative damage in oesophageal cancer patients: lack of association with antioxidant vitamins and polymorphism of hOGG1 and GST. *J Exp Clin Cancer Res.* **29**: 157-169
- Lakshmi S. V., Padmaja G., Kuppusamy P. and Kutala V. K.(2009). Oxidative stress in cardiovascular disease. *Indian J Biochem Biophys.* **46**: 421-440.
- Le K., Chiu F. and Ng K.(2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chem.* **105**: 353-363.
- Lee J. Y., Lee S. H., Kim H. J., Ha J. M., Lee S. H., Lee J. H. and Ha B. J.(2004). The preventive inhibition of chondroitin sulfate against the CCl4-induced oxidative stress of subcellular level. *Arch Pharm Res.* **27**: 340-345.
- Lehmann C.(2009). Biochemistry and pathophysiology of ischemia and reperfusion. *Dtsch Med Wochenschr.* **134 S 11**: S409-S410.

- Leimkuhler S., Hodson R., George G. N. and Rajagopalan K. V.(2003). Recombinant *Rhodobacter capsulatus* xanthine dehydrogenase, a useful model system for the characterization of protein variants leading to xanthinuria I in humans. *J Biol Chem.* **278**: 20802-20811.
- Lespade L. and Bercion S.(2010). Theoretical study of the mechanism of inhibition of xanthine oxidase by flavonoids and gallic acid derivatives. *J Phys Chem B.* **114**: 921-928.
- Li H. B., Cheng K. W., Wong C. C., Fan K. W., Chen F. D. and Jiang Y. S.(2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem.* **102**: 771-776.
- Li Y. J., Takizawa H. and Kawada T.(2010). Role of oxidative stresses induced by diesel exhaust particles in airway inflammation, allergy and asthma: their potential as a target of chemoprevention. *Inflamm Allergy Drug Targets.* **9**: 300-305.
- Maia M. S., Bicudo S. D., Sicherle C. C., Rodello L. and Gallego I. C.(2010). Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. *Anim Reprod Sci.* **122**: 118-123.
- Malle E., Furtmuller P. G., Sattler W. and Obinger C.(2007). Myeloperoxidase: a target for new drug development? *Br J Pharmacol.* **152**: 838-854.
- Maloyan A., Osinska H., Lammerding J., Lee R. T., Cingolani O. H., Kass D. A., Lorenz J. N. and Robbins J.(2009). Biochemical and mechanical dysfunction in a mouse model of desmin-related myopathy. *Circ Res.* **104**: 1021-1028.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C. and Jimenez L.(2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* **79**: 727-747.
- Mandal S. M., Chakraborty D. and Dey S.(2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signal Behav.* **5**: 359-368.
- Mari M., Colell A., Morales A., von M. C., Garcia-Ruiz C. and Fernandez-Checa J. C.(2010). Redox control of liver function in health and disease. *Antioxid Redox Signal.* **12**: 1295-1331.
- Markham K. R.(1982). *Techniques of flavonoid identification*. Academic press, London. 133.
- Martin H. M., Hancock J. T., Salisbury V. and Harrison R.(2004). Role of xanthine oxidoreductase as an antimicrobial agent. *Infect Immun.* **72**: 4933-4939.
- Martinez-Florez S., Gonzalez-Gallego J., Culebras J. M. and Tunon M. J.(2002). Flavonoids: properties and anti-oxidizing action. *Nutr Hosp.* **17**: 271-278.

- Martinez-Outschoorn U. E., Balliet R. M., Rivadeneira D. B., Chiavarina B., Pavlides S., Wang C., Whitaker-Menezes D., Daumer K. M., Lin Z., Witkiewicz A. K., Flomenberg N., Howell A., Pestell R. G., Knudsen E. S., Sotgia F. and Lisanti M. P.(2010). Oxidative stress in cancer associated fibroblasts drives tumor-stroma co-evolution: a new paradigm for understanding tumor metabolism, the field effect and genomic instability in cancer cells. *Cell Cycle*. **9**: 3256-3276.
- McCord J. M., Roy R. S. and Schaffer S. W.(1985). Free radicals and myocardial ischemia. the role of xanthine oxidase. *Adv Myocardiol*. **5**: 183-189.
- McCune L. M. and Johns T.(2002). Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the indigenous peoples of the North American boreal forest. *J Ethnopharmacol*. **82**: 197-205.
- Medow M. S., Bamji N., Clarke D., Ocon A. J. and Stewart J. M.(2011). Reactive oxygen species (ROS) from NADPH and xanthine oxidase modulate the cutaneous local heating response in healthy humans. *J Appl Physiol*. **301**: R763-R768.
- Meneshian A. and Bulkley G. B.(2002). The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. *Microcirculation*. **9**: 161-175.
- Metz S. and Thiel W.(2009). A combined QM/MM study on the reductive half-reaction of xanthine oxidase: substrate orientation and mechanism. *J Am Chem Soc*. **131**: 14885-14902.
- Miquel J.(2002). Can antioxidant diet supplementation protect against age-related mitochondrial damage? *Ann N Y Acad Sci*. **959**: 508-516.
- Misra M .K., Sarwat M., Bhakuni P., Tuteja R. and Tuteja N.(2009). Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Med Sci Monit*. **15**: RA209-RA219.
- Montanaro S., Lhiaubet-Vallet V., Iesce M. I., Previtera L. and Miranda M. A.(2009). A mechanistic study on the phototoxicity of atorvastatin: singlet oxygen generation by a phenanthrene-like photoproduct. *Chem Res Toxicol*. **22**: 173-178.
- Muir S. W., Harrow C., Dawson J., Lees K. R., Weir C. J., Sattar N. and Walters M. R.(2008). Allopurinol use yields potentially beneficial effects on inflammatory indices in those with recent ischemic stroke: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Stroke*. **39**: 3303-3307.
- Mukai K., Mitani S., Ohara K. and Nagaoka S.(2005). Structure-activity relationship of the tocopherol-regeneration reaction by catechins. *Free Radic Biol Med*. **38**: 1243-1256.

- Naidu M. M., Shyamala B. N., Naik J. P., Sulochanamma G. and Srinivas P.(2011). Chemical composition and antioxidant activity of the husk and endosperm of fenugreek seeds. *LWT /Food Science and Technology*. **44**: 451-456.
- Nakamura M. and Yamazaki I.(1982). Preparation of bovine milk xanthine oxidase as a dehydrogenase form. *J Biochem*. **92**: 1279-1286.
- Naziroglu M., Akkus S., Soyupek F., Yalman K., Celik O., Eris S. and Uslusoy G. A.(2010). Vitamins C and E treatment combined with exercise modulates oxidative stress markers in blood of patients with fibromyalgia: a controlled clinical pilot study. *Stress*. **13**: 498-505.
- Negre-Salvayre A., Coatrieux C., Ingueneau C. and Salvayre R.(2008). Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br J Pharmacol*. **153**: 6-20.
- Neppolian B., Park J. S. and Choi H.(2004). Effect of Fenton-like oxidation on enhanced oxidative degradation of para-chlorobenzoic acid by ultrasonic irradiation. *Ultrason Sonochem*. **11**: 273-279.
- Nishino T., Okamoto K., Kawaguchi Y., Hori H., Matsumura T., Eger B. T., Pai E. F. and Nishino T.(2005). Mechanism of the conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase: identification of the two cysteine disulfide bonds and crystal structure of a non-convertible rat liver xanthine dehydrogenase mutant. *J Biol Chem*. **280**: 24888-24894.
- Nishino T. and Tsushima K.(1986). Interaction of milk xanthine oxidase with folic acid. inhibition of milk xanthine oxidase by folic acid and separation of the enzyme into two fractions on sepharose 4B/folate gel. *J Biol Chem*. **261**: 11242-11246.
- Odajima N., Betsuyaku T., Nagai K., Moriyama C., Wang D. H., Takigawa T., Ogino K. and Nishimura M.(2010). The role of catalase in pulmonary fibrosis. *Respir Res*. **11**: 183.
- Patel R. P., Boersma B. J., Crawford J. H., Hogg N., Kirk M., Kalyanaraman B., Parks D. A., Barnes S. and Darley-Usmar V.(2001). Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxy radical scavenging. *Free Radic Biol Med*. **31**: 1570-1581.
- Pauff J. M. and Hille R.(2009). Inhibition studies of bovine xanthine oxidase by luteolin, silibinin, quercetin, and curcumin. *J Nat Prod*. **72**: 725-731.
- Pavlou P., Rallis M., Deliconstantinos G., Papaioannou G. and Grando S. A.(2009). *In-vivo* data on the influence of tobacco smoke and UV light on murine skin. *Toxicol Ind Health*. **25**: 231-239.

- Peglow S., Toledo A. H., Anaya-Prado R., Lopez-Neblina F. and Toledo-Pereyra L. H.(2011). Allopurinol and xanthine oxidase inhibition in liver ischemia reperfusion. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* **18**: 137-146.
- Perron N. R. and Brumaghim J. L.(2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys.* **53**: 75-100.
- Phuwapraisirisan P., Sowanthip P., Miles D. H. and Tip-pyang S.(2006). Reactive radical scavenging and xanthine oxidase inhibition of proanthocyanidins from *Carallia brachiata*. *Phytother Res.* **20**: 458-461.
- Piacenza L., Peluffo G., Alvarez M. N., Kelly J. M., Wilkinson S. R. and Radi R.(2008). Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *Biochem J.* **410**: 359-368.
- Pietta P. G.(2000). Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* **63**: 1035-1042.
- Portugal-Cohen M., Numa R., Yaka R. and Kohen R.(2010). Cocaine induces oxidative damage to skin via xanthine oxidase and nitric oxide synthase. *J Dermatol Sci.* **58**: 105-112.
- Pratt D. A., Tallman K. A. and Porter N. A.(2011). Free radical oxidation of polyunsaturated lipids: new mechanistic insights and the development of peroxy radical clocks. *Acc Chem Res.* **44**: 458-467.
- Pulido R., Bravo L. and Saura-Calixto F.(2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem.* **48**: 3396-3402.
- Quezel P. and Santa S.(1963). *Nouvelle flore de l'Algerie et des régions descitique méridionales*. Editions du centre national de la recherche scientifique, 15 Paris-France. 153.
- Quideau S., Deffieux D., Douat-Casassus C. and Pouysegu L.(2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl.* **50**: 586-621.
- Riegersperger M., Covic A. and Goldsmith D.(2011). Allopurinol, uric acid, and oxidative stress in cardiorenal disease. *Int Urol Nephrol.* **43**: 441-449.
- Robak J. and Gryglewski R. J.(1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem pharmacol.* **37**: 837-841.

- Romani A., Ieri F., Turchetti B., Mulinacci N., Vincieri F. F. and Buzzini P.(2006). Analysis of condensed and hydrolysable tannins from commercial plant extracts. *J Pharm Biomed Anal.* **41**: 415-420.
- Romano A. D .,Serviddio G., de M. A., Bellanti F. and Vendemiale G.(2010). Oxidative stress and aging. *J Nephrol.* **23 S 15**: S29-S36.
- Rutkowski M., Matuszewski T., Kedziora J., Paradowski M., Klos K. and Zakrzewski A.(2010). Vitamins E, A and C as antioxidatives .*Pol Merkur Lekarski.* **29**: 377-381.
- Ryan M. J., Dudash H. J., Docherty M., Geronilla K. B., Baker B. A., Haff G. G., Cutlip R. G. and Alway S. E.(2010). Vitamin E and C supplementation reduces oxidative stress, improves antioxidant enzymes and positive muscle work in chronically loaded muscles of aged rats. *Exp Gerontol.* **45**: 882-895.
- Rybka J., Kupczyk D., Kedziora-Kornatowska K., Motyl J., Czuczejko J., Szewczyk-Golec K., Kozakiewicz M., Pawluk H., Carvalho L. A. and Kedziora J.(2011). Glutathione-related antioxidant defense system in elderly patients treated for hypertension. *Cardiovasc Toxicol.* **11**: 1-9.
- Sachdev S. and Davies K. J.(2008). Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radic Biol Med.* **44**: 215-223.
- Saif M .W., Tytler E., Lansigan F., Brown D. M. and Husband A. J.(2009). Flavonoids, phenoxodiol, and a novel agent, triphendiol, for the treatment of pancreaticobiliary cancers. *Expert Opin Investig Drugs.* **18**: 469-479.
- Saksela M., Lapatto R. and Raivio K. O.(199 .8Xanthine oxidoreductase gene expression and enzyme activity in developing human tissues. *Biol Neonate.* **74**: 274-280.
- Sato E., Mokudai T., Niwano Y. and Kohno M.(2011). Kinetic analysis of reactive oxygen species generated by the in vitro reconstituted NADPH oxidase and xanthine oxidase systems. *J Biochem.* **150**:173-81
- Schardinger F.(1902). Über das verhalten der kuhmilch genen methylenblau und seine verwendung zur unterscheidung von ungekochter und gekochter milch. *Untersuch Nahrungs Genussmittel.* **5**: 1113-1121.
- Schijlen E. G., Ric de Vos C. H., van Tunen A. J. and Bovy A. G.(2004). Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry.* **65**: 2631-2648.

- Schroeksnadel S., Kurz K. and Fuchs D.(2010). Antioxidant supplements for long-term health and to prevent disease. *Maturitas*. **67**: 375-376.
- Selloum L., Reichl S., Muller M., Sebihi L. and Arnhold J.(2001). Effects of flavonols on the generation of superoxide anion radicals by xanthine oxidase and stimulated neutrophils. *Arch Biochem Biophys*. **395**: 49-56.
- Seyoum A., Asres K. and El-Fiky F. K.(2006). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*. **67**: 2058-2070.
- Shiba Y., Kinoshita T., Chuman H., Taketani Y., Takeda E., Kato Y., Naito M., Kawabata K., Ishisaka A., Terao J. and Kawai Y.(2008). Flavonoids as substrates and inhibitors of myeloperoxidase: molecular actions of aglycone and metabolites. *Chem Res Toxicol*. **21**: 1600-1609.
- Shilina N. M.(2009). [Mechanisms of the antioxidant defense in children]. *Vopr Pitan*. **78**: 11-17.
- Silva J. P., Gomes A. C. and Coutinho O. P.(2008). Oxidative DNA damage protection and repair by polyphenolic compounds in PC12 cells. *Eur J Pharmacol*. **601**: 50-60.
- Sugamura K. and Keaney J. F., Jr.(2011). Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med*. **51**:978-92.
- Suzuki H., DeLano F. A., Parks D. A., Jamshidi N., Granger D. N., Ishii H., Suematsu M., Zweifach B. W. and Schmid-Schonbein G. W.(1998). Xanthine oxidase activity associated with arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**: 4754-4759.
- Syrkina O., Jafari B., Hales C. A. and Quinn D. A.(2008). Oxidant stress mediates inflammation and apoptosis in ventilator-induced lung injury. *Respirology*. **13**: 333-340.
- Szweda P. A., Friguet B. and Szweda L. I.(2002). Proteolysis, free radicals, and aging. *Free Radic Biol Med*. **33**: 29-36.
- Tai L. A. and Hwang K. C.(2001). Photoreactivation of alloxanthine-inhibited xanthine oxidase. *Photochem Photobiol*. **73**: 439-446.
- Taibi G., Paganini A., Gueli M. C., Ampola F. and Nicotra C. M.(2001). Xanthine oxidase catalyzes the synthesis of retinoic acid. *J Enzyme Inhib*. **16**: 275-285.
- Tanaka Y., Sasaki N. and Ohmiya A.(2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J*. **54**: 733-749.

- Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M. and Polissiou M.(2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chem.* **90**: 333-340.
- Traber M. G.(2007). Heart disease and single-vitamin supplementation. *Am J Clin Nutr.* **85 S 11**: S293- S299.
- Tunez I., Sanchez-Lopez F., Aguera E., Fernandez R., Sanchez F. and Tasset I.(2011). Important role of oxidative stress biomarkers in Huntington's disease. *J Med Chem.* **54**:5602-6.
- Tunon M. J., Garcia-Mediavilla M. V., Sanchez-Campos S. and Gonzalez-Gallego J.(2009). Potential of flavonoids as anti-inflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways. *Curr Drug Metab.* **10**: 256-271.
- Unno T., Sugimoto A. and Kakuda T.(2004). Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Lagerstroemia speciosa* L. Pers. *J Ethnopharmacol.* **93**: 391-395.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M. and Telser J.(2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* **39**: 44-84.
- Vanin A. F., Bevers L .M., Slama-Schwok A. and van Faassen E. E.(2007). Nitric oxide synthase reduces nitrite to NO under anoxia. *Cell Mol Life Sci.* **64**: 96-103.
- Viel E. C., Benkirane K., Javeshghani D., Touyz R. M. and Schiffrin E. L.(2008). Xanthine oxidase and mitochondria contribute to vascular superoxide anion generation in DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **295**: H281-H288.
- Vinatier V., Guieu V., Madaule Y., Maturano M., Payrastra C. and Hoffmann P.(2010). Superoxide-induced bleaching of streptocyanine dyes: application to assay the enzymatic activity of superoxide dismutases. *Anal Biochem.* **405**: 255-259.
- Wang S., Meckling K. A., Marcone M. F., Kakuda Y. and Tsao R.(2011). Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities. *J Agric Food Chem.* **59**: 960-968.
- Wang Y. and Ho C. T.(2009). Polyphenolic chemistry of tea and coffee: a century of progress. *J Agric Food Chem.* **57**: 8109-8114.
- Werz O., Szellas D. and Steinhilber D.(2000). Reactive oxygen species released from granulocytes stimulate 5-lipoxygenase activity in a B-lymphocytic cell line. *Eur J Biochem.* **267**: 1263-1269.

- Wruck C. J., Fragoulis A., Gurzynski A., Brandenburg L. O., Kan Y. W., Chan K., Hassenpflug J., Freitag-Wolf S., Varoga D., Lippross S. and Pufe T.(2011). Role of oxidative stress in rheumatoid arthritis: insights from the Nrf2-knockout mice. *Ann Rheum Dis.* **70**: 844-850.
- Wu N., Zu Y., Fu Y., Kong Y., Zhao J., Li X., Li J., Wink M. and Efferth T.(2010). Antioxidant activities and xanthine oxidase inhibitory effects of extracts and main polyphenolic compounds obtained from *Geranium sibiricum* L. *J Agric Food Chem.* **58**: 4737-4743.
- Wu X. Y., Fu Z. X. and Wang X. H.(2011). Peroxiredoxins in colorectal neoplasms. *Histol Histopathol.* **25**: 1297-13.03
- Yen K., Patel H. B., Lublin A. L. and Mobbs C. V.(2009). SOD isoforms play no role in lifespan in adlib or dietary restricted conditions, but mutational inactivation of SOD-1 reduces life extension by cold. *Mech Ageing Dev.* **130**: 173-178.
- Yin M. C. and Chan K. C.(2007). Nonenzymatic antioxidative and antiglycative effects of oleanolic acid and ursolic acid. *J Agric Food Chem.* **55**: 7177-7181.
- You Z. L., Shi D. H., Xu C., Zhang Q. and Zhu H. L.(2008). Schiff base transition metal complexes as novel inhibitors of xanthine oxidase. *Eur J Med Chem.* **43**: 862-871.
- Zheng C. D., Li G., Li H. Q., Xu X. J., Gao J. M. and Zhang A. L.(2010). DPPH-scavenging activities and structure-activity relationships of phenolic compounds. *Nat Prod Commun.* **5**: 1759-1765.