

قسم البيوكيمياء

N°...../SNV/2014

أطروحة

مقدمة من طرف

مريم جرموني

للحصول على شهادة

دكتوراه علوم

فرع: بيولوجيا

تخصص: بيوكيمياء

الموضوع

دراسة التأثير المضاد للأكسدة لمستخلصات نبتتي الحرمل *Peganum harmala*
والجعدة *Santolina chamaecyparissus*

نوقشت بتاريخ/...../2014

أمام لجنة المناقشة

الرئيس	صليحة دحامنة	أستاذة	جامعة سطيف 1
المشرف	عبدالرحمان بغياني	أستاذ	جامعة سطيف 1
المتحنون	صالح لروي	أستاذ	جامعة باتنة
	مولود يحي	أستاذ	جامعة باتنة
	بشرة ختال	أستاذة محاضرة (أ)	جامعة بجاية
المدعو	لخميسي عرعار	أستاذ	جامعة سطيف 1

مخبر البيوكيمياء التطبيقية

تشكرات

أحمد الله سبحانه جل شأنه وأشكره جزيل الشكر على إعانته الكبيرة لي في كل ميادين حياتي وفي إنجاز وإتمام بحثي هذا.

أتوجه بخالص تشكراتي للأستاذ الفاضل بغياني عبد الرحمان على إشرافه وتوجيهه ومساعدته ونصائحه خلال مراحل إنجاز هذا البحث.

كما أتقدم بجزيل الشكر إلى أعضاء لجنة المناقشة: الأستاذة دحامنة صليحة أستاذ بجامعة سطيف 1 على قبولها ترأس لجنة المناقشة و الأستاذ لروي صالح أستاذ بجامعة باتنة لقبوله أن يكون عضوا في لجنة المناقشة والأستاذ مولود يحيي بجامعة باتنة على قبوله أن يكون عضوا في لجنة المناقشة، والأستاذة ختال بشرة بجامعة بجاية على قبولها كعضو في لجنة المناقشة، فلهم مني كل التقدير والاحترام.

أتقدم بتشكراتي الخالصة إلى الأستاذ عرعار لخميسي على مساعدته ودعمه خلال مراحل إنجاز هذا البحث.

كما أتقدم بالشكر الجزيل للأستاذة صباح بومرفق على مساعدتها ونصائحتها الدائمة.

كما لا يفوتني أن أتقدم بالشكر الجزيل للأستاذ خنوف الصديق على استقبالي في مخبره بكل رحب وسعة أثناء فترة تربصي بمخبره.

كما أتقدم بشكري إلى كل من الأستاذ لعور حسين على التصنيف العلمي للنبتين و الأستاذة بوريش حمامة على نصائحتها ومعاملتها الطيبة وسماحتها.

الإهداء

إلى والداي العزيزين

إلى أخوتي

إلى زوجي وولدي الغاليين

إلى كل العائلة

إلى جميع الأصدقاء

إلى كل من ساعدني في إنجاز هذا العمل

المنشورات العلمية

M. Djarmounj, S. Boumerfeg, A. Baghiani, N. Boussoualim, F. Zerargui, H. Trabsa, F. Belkhiri, S. Khennouf and L. Arrar (2012). Evaluation of antioxidant and antibacterial properties of *Peaganum harmala* seed extracts. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. Vol.3(4); p: 1109-1119. www.rjpbcs.com

A. Baghiani*, M. Djarmouni, S. Boumerfeg, H. Trabsa, N. Charef, S. Khennouf and L. Arrar. (2012) Xanthine Oxidase Inhibition and Antioxidant Effects of *Peaganum harmala* Seed Extracts. European Journal of Medicinal Plants. 2(1): 42-56.

الملتقيات العلمية

THE 2nd International Symposium on Medicinal Plants, their cultivation and aspects of uses. petra marriot hotel petra– jordan 3-4 november, 2010. Abderrahmane Baghiani, Meriem Djermouni, Djemila Ameni, Hayet Trabsa, Nouredine Charef, Sabah Boumerfeg, Seddik Khennouf, Daoud Harzallah, Lekhmici Arrar. In vitro antioxidant effects and xanthine oxidase inhibitor properties of *paganum harmala* seed extracts.

3eme Séminaire International Biologie Animale. Univesité Mentouri Constantine (09-11/ 2011). Djarmouni M, Baghiani A, Boumerfeg S, Adjadj M, Ameni D, Khennouf S, Arrar L. Studies of antioxidant potential of methanol extract/Fractions of *Peganum harmala*.

2nd African Congress on Biology and Health(2nd ACBH 10-12 November 2012), Faculty of Nature and Life Sciences, University Farhat Abbas Sétif. DJARMOUNI Meriem, Baghiani Abderrahmane, Boumerfeg Sabah, Boussoualim Naouel, Belkhiri Farida and Arrar Lekhmici, Studies of anti bacterial and antioxidant potential of methanol extracts /fractions of *Peganum harmala*.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقدير النشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات نبتتي الحرمل *Peganum harmala* والجمدة *Santolina chamaecyparissus* المستعملان في الطب الشعبي بالجزائر. بينت نتائج التقدير الكمي لعديدات الفينول والفلافونيدات أن مستخلص إيثيل أسيتات لنبات الجمدة (EAE-Sc) يحتوي على أعلى كمية من المركبات الفينولية والفلافونيدات قدرت بـ 373.83 ± 0.23 مغ مكافئ حمض الغاليك / غ من الوزن الجاف و 61.51 ± 7.86 مغ مكافئ كرسيتين / غ من الوزن الجاف للنبته، على التوالي. تم تقدير النشاطية المضادة للأكسدة مخبريا (*in vitro*)، باستعمال إختبار إزاحة الجذور الحرة DPPH و ABTS حيث أظهر مستخلص EAE-Sc أعلى نشاطية إزاحية للجذور الحرة في الإختبارين، بالإضافة إلى إختبار تثبيط فوق أكسدة الليبيدات باستعمال β -carotene و FTC، حيث أظهرت النتائج أن مستخلص إيثيل الأسيتات لنبات الحرمل (EAE- Ph) يملك أعلى قدرة (94.21 ± 0.003 %) بالنسبة لإختبار β -carotene. أما فيما يخص إختبار FTC فقد ظهرت أعلى نسبة تثبيط بالمستخلص الخام لنبات الجمدة (CE-Sc). استعمل تقدير MDA كمؤشرا لفوق الأكسدة الليبيدية، وقد سجل مستخلص EAE-Ph أقل امتصاصية. بين إختبار استخلاص المعادن باستعمال Ferrozine أن المستخلص الخام لنبات الحرمل CE-Ph يملك أعلى قدرة ($IC_{50} = 0.32 \pm 0.009$ مغ/مل). بينت نتائج إختبار قدرة المستخلصات على تثبيط الإنزيم المؤكسد للكزانتين (XO) وإزاحة جذر $O_2^{\cdot-}$ الناتج عنه أن أعلى نشاطية كانت للمستخلص الكلوروفورمي وإيثيل الأسيتات لنبات الجمدة (EAE-Sc و CHE-Sc). في حين سجلت أعلى قدرة إزاحية لجذر $O_2^{\cdot-}$ للمستخلص الكلوروفورمي لنبات الحرمل (CHE-Ph). تمت دراسة النشاطية المضادة للأكسدة في الكائن الحي (*in vivo*) للمستخلص الميثانولي لكل من *P. harmala* (MOHE-Ph) و *S. chamaecyparissus* (MOHE-Sc) عن طريق النشاطية الكلية للبلازما (APC : antioxidant plasma capacity) باستعمال إختبار DPPH والقدرة الإرجاعية. ماعدا القدرة الإرجاعية للمستخلص MOHE-Sc، لم تبد المستخلصات تأثيرا معنويا. من جهة أخرى، أظهرت نتائج تقدير نشاطية إنزيم الكتالاز (CAT) ومستويات MDA و GSH في نسيج الكبد ارتفاعا معنويا في نشاطية CAT عند المعاملة بكل من MOHE-Sc و MOHE-Ph بنسبة 59,16 % و 35 %، على التوالي. كما رفعت من مستوى GSH بنسبة 59,21 % و 50,44 %، على التوالي. كما خفضت من مستوى MDA بنسبة 79.56 % و 63.48 %، على التوالي. وبينت دراسة قدرة المستخلصات على تثبيط الانحلال الدموي *in vivo* في وجود المؤكسد t-BH، أن MOHE-Ph يملك تأثيرا تثبيطيا قريبا من المستخلص MOHE-Sc ($HT50 = 78,51 \pm 11,32$ و $72,05 \pm 4,95$ دقيقة، على التوالي). بينت النتائج المحصل عليها أن كل من نبات *S. chamaecyparissus* و *P. harmala* يملكان القدرة على حماية مطحون نسيج كبد الفئران من الإجهاد التأكسدي وهذا التأثير يعود أساسا إلى ميزتهما المضادة للأكسدة، وهذا ما يفسر الإستعمال الطبي الشعبي الواسع لهما.

الكلمات المفاتيح: *Peganum harmala*، *Santolina chamaecyparissus*، عديدات الفينول، xanthine oxidase، مضادات الأكسدة، استخلاص المعادن، الإنحلال الدموي.

Abstract

The aim of this study is to evaluate the antioxidant activity of the extracts from *Peganum harmala* and *Santolina chamaecyparissus* which are largely used in traditional medicine in Algeria. The estimation of polyphenols and flavonoids showed that Ethyl Acetate extract of *S. chamaecyparissus* (EAE-Sc) contains a high amount of phenolic compounds and flavonoids: 373.83 ± 0.23 mg gallic acid equivalent and 7.86 ± 61.51 mg quercetin equivalent/g of dried weigh, respectively. The DPPH and ABTS tests were used to evaluate the antioxidant activity *in vitro*. The EAE-Sc showed the highest scavenging activity of free radicals in both tests. The inhibition of lipid peroxydation test using FTC and β -carotene showed that the ethyl acetate extract of *P. harmala* (EAE-Ph) had the highest rate ($94,21 \pm 0.003$ %) in β -carotene test, but for the FTC test the highest inhibition rate was noticed with crud extract of *S. chamaecyparissus* (CE-Sc). The MDA evaluation was used as indicator of lipid peroxydation. The low absorption was found in EAE-Ph level. The capacity of the extracts to chelate the mineral ions was tested using Ferrozine. The crud extract of *P. harmala* (CE-Ph) showed a high capacity to chelate ferrous ions (IC_{50} : 0.32 ± 0.009 mg/ml). The extracts were studied for their ability of inhibition effect on XO and $O_2^{\cdot-}$ scavenging activity. The results showed that the chloroform extract of *S. chamaecyparissus* (CHE-Sc) and EAE-Sc have the highest inhibiting activity of XO, but the chloroform extract of *P. harmala* (CHE-Ph) showed the greatest scavenging effect on $O_2^{\cdot-}$ with an IC_{50} : 0.037 ± 0.0053 mg/ml. The antioxidant activity of methanol extract of *P. harmala* (MOHE-Ph) and *S. chamaecyparissus* (MOHE-Sc) *in vivo* was estimated using the antioxidant plasma capacity (APC), DPPH and reducing power tests. Except for the reducing power of MOHE-Sc, all extracts did not show any significant change. The activity of catalase (CAT), the level of MDA and GSH were evaluated in mouse liver homogenate. The results showed a high significant increase in CAT activity with MOHE-Sc and MOHE-Ph, by 59.16 % and 35 %, respectively, and also in the GSH levels by 59.21 % and 50.44 %, respectively. However they decreased the level of MDA by 79.56 % and 63.48 %, respectively. The Evaluation of the plant extracts capacity to inhibit the hemolysis of blood *in vivo* in the presence of the oxidant (tBH), showed that MOHE-Ph has an inhibition effect comparable with MOHE-Sc (78.51 ± 11.32 min and 72.05 ± 4.95 min, respectively). The present study showed that the *P. harmala* and *S. chamaecyparissus* have the capacity to protect liver tissue from oxidative stress and this effect is probably due to their antioxidant capacity, which explain the large use of these plants in traditional medicine.

Key words: *Peganum harmala*, *Santolina chamaecyparissus*, polyphenols, xanthine oxidase, antioxidant, chelating.

Resumé

L'objectif de la présente étude est d'estimer l'activité antioxydante des extraits de deux plantes, *Peganum harmala* et *Santolina chamaecyparissus* largement utilisées en médecine traditionnelle en Algérie. L'extrait acétate d'éthyle de *S. chamaecyparissus* (EAE-Sc) renferme une grande quantité de composés phénoliques et de flavonoïdes avec des teneurs de 373.83 ± 0.23 mg d'équivalent acide gallique et 61.51 ± 7.86 mg d'équivalent quercetin/g de poids sec de la plante, respectivement. L'activité antioxydante a été évaluée *in vitro* par l'utilisation des tests de DPPH et ABTS. L'extrait EAE-Sc a montré l'effet le plus élevé dans les deux tests. L'examen de l'activité anti-péroxydation lipidique évaluée par les tests β -carotène et FTC, a montré que l'extrait acétate d'éthyle de *P. harmala* (EAE-Ph) présente l'effet inhibiteur le plus puissant dans le test β -carotène, par contre dans le test FTC, l'effet de l'extrait brut de *S. chamaecyparissus* (CE-Sc) est le plus élevé. L'évaluation du MDA utilisée comme indicateur de la peroxydation lipidique a montré la faible absorbance a été enregistrée au niveau de EAE-Ph, La capacité des extraits de capter les ions minéraux testée par l'utilisation de ferrozine a indiqué que l'extrait brut de *P. harmala* (CE-Ph) présente l'activité chélatrice la plus puissante (IC_{50} : 0.32 ± 0.009 mg/ml). D'autre part, l'évaluation de la capacité des extraits d'inhiber la xanthine oxydase (XO) et d'éliminer le radical $O_2^{\cdot -}$ qu'elle produit, a montré que l'extrait chloroformique du *S. chamaecyparissus* (CHE-Sc) et EAE-Sc sont plus actifs. Cependant, la plus grande capacité d'éliminer le radical $O_2^{\cdot -}$ est observée avec l'extrait chloroformique de *P. harmala* (CHE-Ph). L'activité antioxydante, *in vitro*, estimée par la capacité antioxydante plasmatique (CAP), le test DPPH et le test du pouvoir réducteur a montré que seul le MOHE-Sc possède un effet réducteur. L'activité de la catalase (CAT) et les taux du MDA et du GSH ont été évalués dans l'homogénat du foie de souris. Les résultats montrent une augmentation significative dans l'activité de la CAT par MOHE-Sc et MOHE-Ph (59.16 % et 35 %, respectivement), en plus d'une augmentation du taux du GSH de 59.21 et 50.44%, respectivement et d'une diminution du taux du MDA de 79.56 % et 63.48 %, respectivement. L'évaluation de la capacité des extraits d'inhiber l'hémolyse des globules rouges *in vivo* en présence d'un oxydant tBH, a montré que le MOHE-Ph possède un effet inhibiteur de l'hémolyse similaire à celui du MOHE-Sc ($78,51 \pm 11,32$ et $72,05 \pm 4,95$ min, respectivement). La présente étude montre que les plantes *Peganum harmala* et *Santolina chamaecyparissus* possèdent une capacité de protéger le foie contre le stress oxydatif et que cet effet est probablement dû à leurs capacités antioxydantes. Ceci explique leur grande utilisation en médecine traditionnelle.

Mots-clés: *Peganum harmala*, *Santolina. chamaecyparissus*, polyphénols, xanthine oxydase, antioxydant, chelation.

قائمة المختصرات

AAPH	2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride
AqE	Aqueous extract
BHT	Butylated hydroxytoluene
BXOR	Bovine xanthine oxidoreductase
CAT	Catalase
CHE	Chloroform extract
COX	Cyclooxygenase
CrE	Crude extract
Cyt-c	Cytochrome c
DPPH	2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTNB	5,5'- dithio-bis- [2- nitrobenzoic acid]
EAE	Ethyl acetate extract
FTC	Ferric thiocyanate
GPx	Glutathion peroxidase
GSH	Gluthathion
GSSG	Oxidized glutathione
HT ₅₀	half-hemolysis Time
HxE	Hexane extract
INF	Interferon
IL	Interleukin
LOX	Lipooxygenase
MDA	Malondialdehyde
Mo	Molybdene
NO [•]	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
O ₂ ^{-•}	Superoxide anion
OH [•]	Hydroxyl radical
ONOO ⁻	Peroxynitrite
PAF	Platelet activating factor
PFR	Protein/Flavin ratio
Ph	<i>Peganum harmala</i>
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
Sc	<i>Santolina chamaecyparissus</i>
SOD	Superoxide dismutase
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamid gel electrophoresis
TBA	Thiobarbituric acid
<i>t</i> -BHP	<i>tert</i> -butyl hydroperoxide
TCA	Trichloroacetic acid
TEMED	N,N,N'N' Tetramethylenediamine
XDH	Xanthine dehydrogenase
XO	Xanthine oxidase

الفهرس

الملخص بالعربية

الملخص بالانجليزية

قائمة الأشكال

قائمة الجداول

قائمة المختصرات

التشكرات

1.....مقدمة.....1

3.....1. الإجهاد التأكسدي.....3

3.....1.1. الجذور الحرة والأنواع النشطة.....3

5.....1.2. البنية الكيميائية للأنواع الأكسجينية النشطة.....5

7.....1.3. المصادر الرئيسية للجذور الحرة.....7

8.....1.5. الدور الفيزيولوجي للجذور الحرة.....8

9.....1.6. الأمراض المرتبطة بالإجهاد التأكسدي.....9

9.....1.7. النتائج الجزيئية للإجهاد التأكسدي.....9

11.....2. إنزيم Xanthine oxydoreductase.....11

11.....1.2. بنية إنزيم XOR.....11

12.....2.2. تواجد و توزع إنزيم XOR.....12

13.....3.2. الدور الفيزيولوجي للإنزيم.....13

13.....4.2. الدور المرضي لإنزيم XOR.....13

15.....5.2. مثبطات إنزيم XOR.....15

17.....6.2. الآلية التحفيزية لإنزيم XOR.....17

18.....3. الأنظمة المضادة للأكسدة.....18

22.....4. المركبات الفينولية.....22

23.....4.1. الأقسام الرئيسية للمركبات الفينولية.....23

27.....4.2. النشاط البيولوجية لعديدات الفينول.....27

31.....5. نبات الحرمل *Peganum harmala*.....31

33.....1.5. الإستعمال التقليدي للنبتة.....33

34.....2.5. التأثير السمي لنبات الحرمل.....34

34.....	6. نبات الجعدة <i>Santolina chamaecyparissus</i>
35.....	1.6. الإستعمال التقليدي للنبتة.....
	الجزء العملي
37.....	1. المواد و الطرق.....
37.....	1.1. المواد المستعملة.....
38.....	2. طرق العمل.....
38.....	2.1. استخلاص المركبات الفينولية.....
40.....	2.2. تقدير عديدات الفينول الكلية.....
40.....	2.3. التقدير الكمي للفلافونيدات.....
41.....	2.4. تنقية إنزيم XOR من حليب البقر.....
44.....	2.5. النشاطية المضادة للأكسدة in vitro.....
44.....	2.5.1. تثبيط نشاطية إنزيم XO.....
44.....	2.5.2. التأثير الإزاحي لجذر O_2^- الناتج عن XO.....
45.....	2.5.3. إختبار ازاحة جذر DPPH.....
45.....	2.5.4. إختبار ازاحة جذر ABTS.....
46.....	2.5.5. إختبار β -carotene/Linoleic acid.....
47.....	2.5.6. إختبار استخلاص المعادن.....
47.....	2.5.7. إختبار Ferric thiocyanate (FTC).....
48.....	2.5.8. إختبار Thiobarbituric acid (TBA).....
48.....	2.5.9. النشاطية المضادة لتحلل كريات الدم الحمراء in vitro.....
49.....	2.6. دراسة النشاطية المضادة للأكسدة in vivo.....
50.....	2.6.1. القدرة المضادة لتحلل كريات الدم الحمراء.....
50.....	2.6.2. النشاطية المضادة للأكسدة الكلية للبلازما (DPPH).....
51.....	2.6.3. إختبار القدرة الإرجاعية للبلازما.....
51.....	2.6.4. تقدير المؤشرات التأكسدية غير الإنزيمية في نسيج الكبد.....
51.....	2.6.4.1. تقدير كمية MDA.....
52.....	2.6.4.2. تقدير كمية GSH الكبدي.....
52.....	2.6.5. تقدير المؤشرات الإنزيمية على مستوى نسيج الكبد.....
52.....	2.6.5.1. تقدير نشاط إنزيم Catalase.....

53.....	2. 5.6.2. تقدير البروتين الكلي.....
54.....	التحليل الإحصائية المستعملة.....
	النتائج و المناقشة
55.....	1. إستخلاص عديدات الفينول والفلافونيدات.....
56.....	2. تقدير عديدات الفينول الكلية والفلافونيدات.....
58.....	3. النشاطية المضادة للأكسدة in vitro.....
58.....	1.3. التأثير المزيح للجذور الحرة.....
58.....	1.1.3. إختبار DPPH.....
60.....	2.1.3. إختبار ABTS.....
62.....	2.3. إختبار إستخلاص المعادن.....
65.....	3.3. إختبار تثبيط فوق أكسدة الليبيدات.....
66.....	1.3.3. إختبار β -caroténe.....
68.....	2.3.3. إختبار (FTC).....
70.....	3.3.3. إختبار (TBA).....
73.....	4.3. تنقية ومراقبة نقاوة إنزيم XOR وتقدير نشاطيته.....
73.....	5.3. التأثير التثبيطي على إنزيم XO.....
76.....	6.3. التأثير الإزاحي لجذر- $O_2^{\cdot-}$ الناتج عن XO.....
78.....	7.3. النشاطية المضادة لتحلل الدم in vitro باستعمال AAPH.....
80.....	4. دراسة النشاطية المضادة للأكسدة في الكائن الحي.....
80.....	1.4. تقدير النشاطية المضادة للأكسدة للبلازما.....
81.....	1.1.4. قدرة البلازما على إزاحة جذر DPPH.....
82.....	2.1.4. إختبار القدرة الإرجاعية للبلازما.....
84.....	2.4. النشاطية المضادة لتحلل كريات الدم الحمراء.....
86.....	3.4. تركيز مستويات MDA على مستوى الكبد.....
88.....	4.4. تقدير نشاط CAT الكبدي.....
89.....	5.4. معايرة GSH السيتوزولي للكبد.....
92.....	المناقشة العامة.....
98.....	المراجع.....

قائمة الأشكال

- شكل 1. إنتاج مختلف الأنواع الأوكسجينية النشطة (ROS)..... 5
- شكل 2. تثبيط إنزيم XOR بواسطة Allopurinol ومستقبلاته Oxypurinol..... 16
- شكل 3. الآلية التحفيزية لإنزيم XOR و الإنتقال الإلكتروني بين مراكزه..... 17
- شكل 4. تنظيم إنتاج الأنواع الأوكسجينية النشطة بواسطة الأنظمة الدفاعية المضادة للأكسدة..... 18
- شكل 5. البنية الكيميائية للأحماض الفينولية..... 23
- شكل 6. البنية العامة للفلافونيدات..... 24
- شكل 7. الأقسام المختلفة للفلافونيدات..... 25
- شكل 8. البنية الكيميائية ل casuarictin (الدباغ المميهة) و proanthocyanidins (الدباغ المكثفة)..... 26
- شكل 9. مواقع ارتباط الأيونات المعدنية بالفلافونيدات 28
- شكل 10. تفاعل الفلافونيدات مع الجذور الحرة 28
- شكل 11. نبات الحرمل والأجزاء المختلفة المكونة له *P. harmala* 32
- شكل 12. الشكل المورفولوجي لنبات الجعدة *Santolina chamaecyparissus* L. 35
- شكل 13. طرق استخلاص الفلافونيدات من حبوب نبات الحرمل والجزء الهوائي لنبته الجعدة..... 39
- شكل 14. منحنى العيارية لحمض الغاليك 40
- شكل 15. منحنى العيارية ل quercetin و rutin..... 41
- شكل 16. التأثير الإزاحي لمستخلصات *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* على جذر DPPH 59
- شكل 17. تركيز مستخلصات *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* المزيج ل 50% من جذر DPPH..... 59
- شكل 18. التأثير الإزاحي لمستخلصات *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* على جذر ABTS..... 61
- شكل 19. تركيز مستخلصات *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* المزيج ل 50% من جذر ABTS..... 61
- شكل 20. نسبة تثبيط مركب Fe⁺²-Ferrozine بمستخلصات *P. harmala* و *S. chamaecyparissus*..... 63
- شكل 21. تركيز مستخلصات *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* على إستخلاص 50% من المعادن..... 64
- شكل 22. النشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* خلال 24 ساعة في إختبار β -carotene/حمض اللينولييك..... 66
- شكل 23. النشاطية المضادة للأكسدة للمستخلصات والشواهد (BHT و الميثانول و الماء) بعد مرور 24 ساعة في إختبار β -carotene/حمض اللينولييك..... 67

- شكل 24. حركية فوق أكسدة حمض اللينولييك في وجود وغياب مستخلصات *P. harmala* و *S. chamaecyparissus*.....69
- شكل 25. إمتصاصية مركب MDA الناتج أثناء أكسدة الليبيدات لمستخلصات *P.harmala* (Ph) و *S. chamaecyparissus* (Sc) بواسطة تقنية TBA.....71
- شكل 26. مقارنة بين النشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات نبتتي *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* باستعمال تقنيتي FTC و TBA.....72
- شكل 27. التأثير التثبيطي لمستخلصات *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* على نشاطية إنزيم XO.....74
- شكل 28. تركيز مستخلصات *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* المثبطة لـ 50% من نشاطية إنزيم XOR.....74
- شكل 29. التأثير الإزاحي لمستخلصات *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* على جذر $O_2^{\cdot-}$ الناتج عن XO بإستعمال Cyt c.....76
- شكل 30. التأثير التثبيطي لـ 50% من نشاطية XO و النشاطية المزيجية لجذر $O_2^{\cdot-}$77
- شكل 31. نسبة تحلل كريات الدم الحمراء لمستخلصات *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* في وجود (AAPH).....79
- شكل 32. النشاطية المضادة للأكسدة للبلازما اتجاه جذر DPPH لمستخلصات Sc و Ph مقارنة بـ contrôle.....81
- شكل 33. القدرة الإرجاعية للبلازما.....83
- شكل 34. زمن HT50 لمختلف المجاميع المدروسة.....85
- شكل 35. تأثير معاملة الفئران بالمستخلص MOHE-Ph و MOHE-Sc على معدل MDA الكبد.....87
- شكل 36. تأثير المعاملة بمستخلص MOHE-Ph و MOHE-Sc على نشاط إنزيم CAT.....88
- شكل 37. تأثير المعالجة بمستخلص MOHE-Ph و MOHE-Sc على معدلات GSH الكبد.....90

قائمة الجداول

جدول 1. تصنيف الجذور الحرة وتأثيراتها المختلفة.....4

جدول 2. مردود مستخلصات حبوب نبات الحرمل *P. harmala* ومحتواها من عديدات الفينول و الفلافونويدات.....57

جدول 3. مردود مستخلصات الجزء الهوائي لنبتة الجعدة *S. chamaecyparissus* ومحتواها من عديدات الفينول و الفلافونويدات.....57

مقدمة

تعمل مضادات الأكسدة على خفض الأضرار التأكسدية على مستوى الخلايا والجزيئات الحيوية التي تسببها الأنواع الأكسجينية (ROS) reactive oxygene species (ROS) والنتروجينية النشطة (RNS) reactive nitrogene species (RNS). فقد وجد أن ROS و RNS تساهم في التخریب التأكسدي مسببة بذلك ظهور أو استمرار العديد من الأمراض عند الإنسان مثل إتهاب المفاصل وداء السكري والإتهاب المزمن والإختلالات العصبية مثل مرض Alzheimer وبعض أنواع السرطان (Valko وآخرون، 2007). ولهذا السبب، حظيت التأثيرات الوقائية لمضادات الأكسدة باهتمام كبير في السنوات الأخيرة. ونظرا لكون العديد من النباتات معروفة بإنتاجها لمركبات ذات نشاطية حيوية، حيث يعمل الكثير منها كمضادات للأكسدة و/أو مضادات للبكتيريا ركزت الكثير من الدراسات على إختبار هذه الفعالية. ومن بين مضادات الأكسدة هذه، نذكر عديدات الفينول وهي مستقلبات نباتية ثانوية تمثل أكثر مضادات الأكسدة الطبيعية انتشارا. تعمل المركبات الفينولية كعوامل مرجعة ومأنحة للهيدروجين ومزيجة للحذور الحرة وملتقطعة للأكسجين المهيج (Fattouch وآخرون، 2007). تستعمل العضوية مضادات أكسدة داخلية وخارجية المنشأ للدفاع ضد الأضرار التي تسببها ROS/RNS، وتقسم إلى أنظمة إنزيمية مثل superoxide dismutase (SOD) و catalase (CAT) و glutathione peroxidase (GPx) وأنظمة غير إنزيمية مثل reduced glutathione (GSH) والفيتامينات والمعادن. تصبح في بعض الأحيان مضادات الأكسدة الداخلية غير قادرة على الحماية من الأضرار التأكسدية مما يتطلب تدخل مركبات خارجية والتي يعمل استهلاكها على الوقاية من الإجهاد التأكسدي (Ibrahim و Habib، 2011).

جرت هذه الدراسة على نبتتين طبيتين هما نبات الحرمل *Peganum harmala* ونبات الجعدة *Santolina chamaecyparissus*، المعروفة بامتلاكهما للعديد من النشاطيات البيولوجية، فعلى سبيل المثال تستعمل بذور

نبات الحرمل *P. harmala* كمضادة للبكتيريا والفطريات (Moghadam وآخرون، 2010) ومضادة للسرطان والطفريات الوراثية (Jahaniani وآخرون، 2005) ومضادة للأكسدة (Moura وآخرون، 2007؛ Baghiani وآخرون، 2012). في حين تملك *S. chamaecyparissus* نشاطية مضادة للإلتهاب (De Logu وآخرون، 2000)، وتعمل على تثبيط نشاطية إنزيم Phospholipase A₂، كما تمتلك نشاطية واقية الكبد (Dhanabal وآخرون، 2012).

تم في هذه الدراسة اختبار قدرة مستخلصات *P. Harmala* و *S. chamaecyparissus* على إزاحة الجذور الحرة وتثبيط فوق أكسدة الليبيدات باستعمال عدة تقنيات وكذا اختبار التأثير الإستخلاصي للمعادن، كما شملت الدراسة اختبار قدرة المستخلصات على تثبيط إنزيم XO وإزاحة جذر O₂⁻ الناتج عنه. في حين تقصت الدراسة في الكائن الحي قدرة المستخلص الميثانولي لكل من *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* على التأثير على فوق الأكسدة الليبيدية والنظام المضاد للتأكسد على مستوى نسيج الكبد، حيث تم تقدير مستويات MDA وGSH ونشاطية إنزيم Catalase. كما اهتمت الدراسة باختبار التأثير المضاد للانحلال الدموي للمستخلصات في وجود المؤكسدات المحفزة للانحلال الدموي.

1. الإجهاد التأكسدي

يوجد توازن على مستوى الخلايا السليمة بين إنتاج و تحلل الجذور الحرة، غير أن هذا التوازن قد يختل لحساب إنتاج مفرط للجذور الحرة أو نقص في كمية مضادات الأكسدة، تدعى هذه الحالة بالإجهاد التأكسدي مسببا أضرارا خلوية خطيرة في حالة ما إذا كان الإجهاد قويا و ذو فاصل زمني طويل (Shinde وآخرون، 2012). عرف العالم Sie، في سنة 1990، مصطلح الإجهاد التأكسدي بأنه عدم قدرة الجسم على الدفاع ضد هجوم الأنواع الأكسجينية النشطة ROS، و هذا راجع للاختلال الناتج عن فرط إنتاج ROS أو قلة قدرة الأنظمة المضادة للأكسدة (Defraignet و Pincemail، 2007).

1.1. الجذور الحرة و الأنواع النشطة

تعتبر الجذور الحرة كل جزيئية أو ذرة تملك واحدا أو عدة إلكترونات غير زوجية على مستوى مدارها الخارجي، وبذلك تصبح هذه الجزيئات غير مستقرة، إذ تحاول أخذ إلكترون من الجزيئات المجاورة لها وبهذا تؤدي إلى أكسدتها. تتميز بمدة حياة قصيرة جدا (من الملي ثانية إلى نانو ثانية) (جدول 1)، حيث تنتج الجذور الحرة عبر انتقال إلكترون هذا ما ينتج عنه طاقة عالية، عند تفاعلها مع جذور أو جزيئات أخرى تتحول هذه الأخيرة بدورها إلى جذور جديدة (Finaud وآخرون، 2006). من بين الجذور الحرة، نجد الأنواع الأكسجينية النشطة (ROS) و التي تشتق من جزيء الأكسجين، بالإضافة إلى الأنواع النتروجينية النشطة (RNS) والكبريتية النشطة (RSS) (جدول 01).

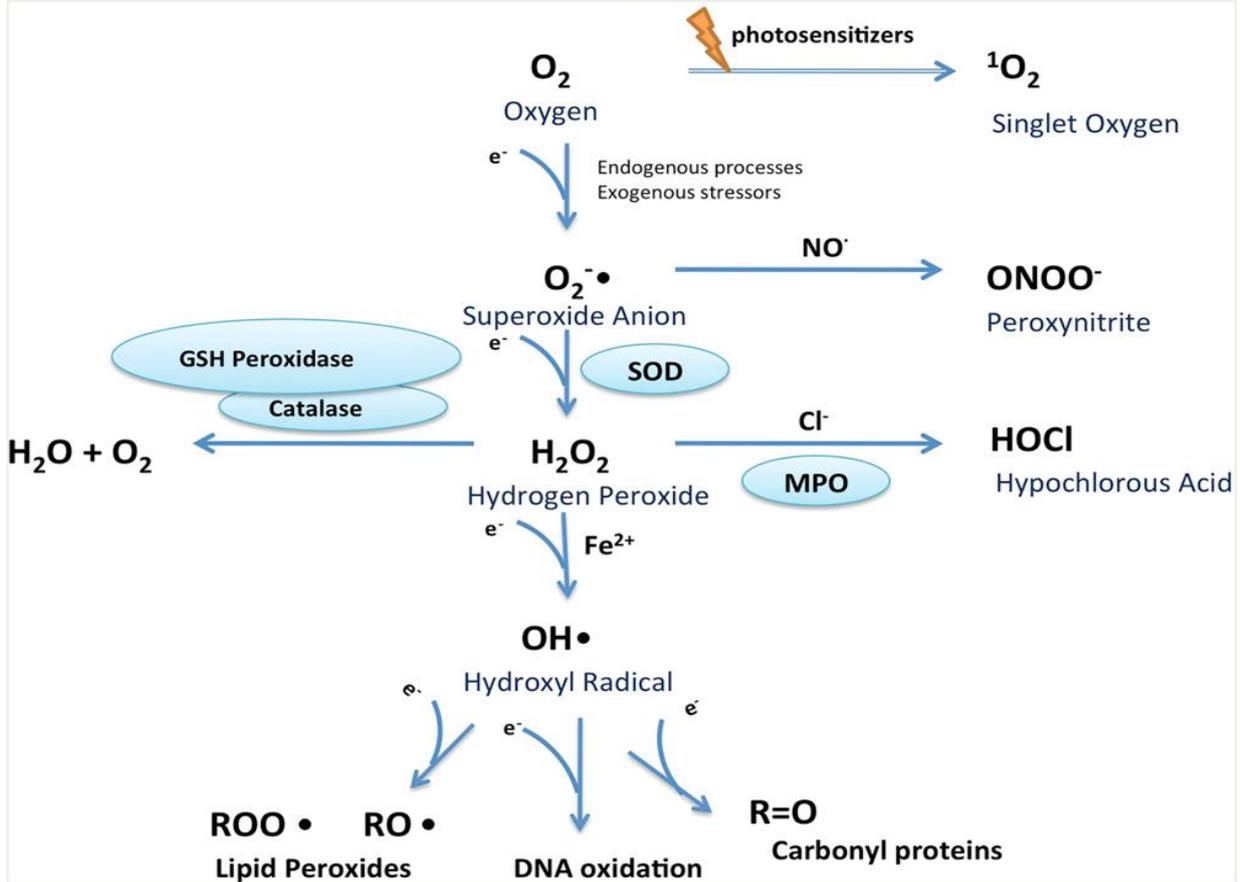
جدول 1. تصنيف الجذور الحرة وتأثيراتها المختلفة (Finaud وآخرون، 2006).

Free radical	Contraction	Half-life	Main effects
Reactive oxygen species	ROS		
Superoxide ion	$O_2^{\cdot-}$	10^{-5} sec	Lipid oxidation and peroxidation protein oxidation DNA damage
Ozone	O_3	Stable	
Singlet oxygen	1O_2	1μsec	
Hydroxyl radical	OH^{\cdot}	10^{-9} sec	
Hydrogen peroxide	H_2O_2	Stable	
Hypochlorous acid	HOCl	Stable	
Alkoxyl radical	RO^{\cdot}	10^{-6} sec	
Peroxyl radical	ROO^{\cdot}	7 sec	
Hydroperoxyl radical	$ROOH^{\cdot}$		
Reactive nitrogen species	RNS		
Nitric oxide	NO^{\cdot}		Lipid peroxidatio DNA damage Proteins oxidation
Nitric dioxide	NO_2^{\cdot}	1-10 SEC	
Peroxynitrite	$ONOO^{\cdot-}$	0.05^{-1} SEC	
Reactive sulphur species	RSS		
Thyl radical	RS^{\cdot}		Proteins oxidation DNA damage ROS production

1. 2. البنية الكيميائية للأنواع الأكسجينية النشطة

تشمل الأنواع الأكسجينية النشطة كل من الجذور الحرة مثل أيون فوق الأكسيد $O_2^{\bullet-}$ ، جذر الهيدروكسيل OH^{\bullet}

والأنواع غير الجذرية والتي تعتبر ذات سمية عالية مثل بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 (شكل 1).



شكل 1. إنتاج مختلف الأنواع الأكسجينية النشطة (ROS) (Lucy Chen، 2012).

يعتبر أيون فوق الأكسيد ($O_2^{\bullet-}$) الجذر الأكثر إنتشارا في الخلية، وينتج عبر الإرجاع الأحادي لجزء الأكسجين.

يتميز هذا الجذر بنشاطية ضعيفة إذ لا يستطيع اختراق الأغشية البيولوجية. يتكون جذر $O_2^{\bullet-}$ تلقائيا على

مستوى الغشاء الداخلي للمتوكوندري خلال السلسلة التنفسية، أو عن طريق عدة إنزيمات مثل

xanthine oxydase، إنزيمي cyclooxygenase و lipoxygenase، بالإضافة إلى إنزيم NADPH oxydases

لغشاء الخلايا البلعمية (Gardès-Albert وآخرون، 2003؛ Genestra، 2007؛ Laitonjam، 2012).



يعتبر H_2O_2 جزيئة مستقرة تملك نصف عمر طويل نسبيا، بإمكانها الانتشار والتفاعل مع الجزيئات على بعد مسافات من تشكلها (Mc Cord، 1993). لا يعتبر H_2O_2 جذرا حرا لكن بإمكانه إنتاج جذور عالية النشاط. ففي وجود الأيونات المعدنية (الحديد والنحاس)، ينتج H_2O_2 عبر تفاعل Fenton جذرا عالي النشاط هو جذر الهيدروكسيل OH^\bullet (Wardman و Candeias، 1996؛ Laitonjam، 2012)، كما يساهم في تشكيل جذر خطير آخر هو hypochlorous acid (HOCl) عبر إنزيم myeloperoxidase (Sorg، 2004؛ Genestra، 2007؛ Laitonjam، 2012).



يملك جذر الهيدروكسيل OH^\bullet نصف عمر يقدر بالنانو ثانية. إذ يمثل الجذر الأكثر نشاطا و يتميز بعدم استقراره عالية من بين كل الأنواع الأكسجينية النشطة. يسمح الانتشار المحدود لهذا الجذر بالتفاعل مع العديد من الجزيئات التي تكون قريبة منه (بروتينات، ليبيدات، ADN، ...). هذا ما يسبب تشكل العديد من الأضرار الخلوية (Guteridge و Halliwell، 1993؛ Laitonjam، 2012).

يعتبر O_2^1 نوعا مهيجا للأكسجين وهو يشبه الجذر الحر نظرا لنشاطه العالي (Delattre وآخرون، 2005). بالإضافة إلى كل هذه المجموع الأكسجينية النشطة، ينتج الجسم مجاميعا أخرى مشتقة من الآزوت وتعرف بالمجموع النتروجينية النشطة RNS وتضم كل من جذر أحادي أكسيد الآزوت NO وفوق أكسيد النترت $ONOO^\bullet$. ينتج NO من تفاعل إستقلاب حمض argenine إلى citrulline بواسطة إنزيم NOS (nitric oxide synthases)، (Xia وآخرون، 1999)، يملك NO القدرة على التفاعل مع الجذور الحرة (جذور peroxy و alkyl) مخفضا من نشاطيتها، ويعمل على تثبيط فوق أكسدة الليبيدات (Laitonjam، 2012). عندما تنتج الخلية كمية عالية من $O_2^{\bullet -}$ بالموازاة مع NO، يتحد هذين الأخيرين ليشكلا فوق أكسيد النترت ($ONOO^\bullet$)، ويعتبر جذرا مؤكسدا يقوم بتجزئة ADN و تحفيز فوق أكسدة الليبيدات (Grigorov، 2012؛ Laitonjam،



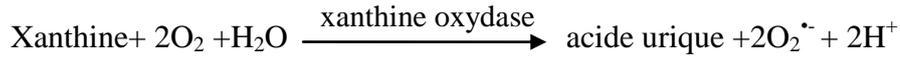
3.1. المصادر الرئيسية للجذور الحرة

1.3.1 . مصادر ROS الداخلية

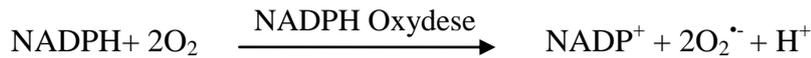
يوجد داخل العضوية العديد من مصادر ROS نذكر منها الأوكسدة الذاتية للجزيئات الصغيرة، NADPH xanthine oxydas ، oxydase ، البيروكسيذومات والميتوكوندري التي تعتبر من أهم المصادر.

تمثل الأوكسدة الذاتية للجزيئات dopamine ، adrenaline ، flavine و hydroquinone مصدرا هاما ل ROS (Freeman و Grapo، 1981) وناتج هذه الأوكسدة عموما هو جذر $O_2^{\cdot-}$ ، بالإضافة إلى ذلك فإن الأوكسدة الذاتية لجزيئات dopamine تمثل إحدى أسباب الموت المبرمج الذي يظهر خلال الأمراض العصبية خاصة مرض Parkinson (Fanburg و Thannickal، 2000).

يحفز xanthie oxydase هدم الهيبوكزانثين إلى الكزانثين و الكزانثين إلى حمض اليوريك خلال هذا التفاعل يعمل الأكسجين الجزيئي كمستقبل للإلكترونات منتجا بذلك جذر $O_2^{\cdot-}$ و H_2O_2 (Parks وآخرون، 1986؛ Kelley وآخرون، 2010)، كما يعمل XOR أيضا على إنتاج جذر NO عبر إرجاع النتريت غير العضوي، وفي وجود الأكسجين يتحد $O_2^{\cdot-}$ مع NO^{\cdot} لإنتاج $ONOO^{\cdot}$ (Harrison، 2006).



يلعب NADPH oxydase دورا أساسيا في الاستجابة المناعية وبصفة خاصة في المكافحة ضد العضيات الدقيقة. إلا أنه خلال عملية البلعمة، يتواجد هذا الانزيم على مستوى الغشاء البلازمي للخلايا البالعة مما يحفز إرجاع الأكسجين لإنتاج جذر $O_2^{\cdot-}$ (Babior، 1999؛ Sardina وآخرون، 2012).



تمثل الميتوكوندري المصدر الرئيسي ل ROS وذلك عبر السلسلة التنفسية، والتي تنتج 90% من ROS الخلوي (Balaban وآخرون، 2005).

يعمل الغشاء الداخلي للمتكوندري على انتقال الإلكترونات عبر السلسلة التنفسية إلى غاية المستقبل النهائي (الأكسجين). هذه الحركة الإلكترونية يصاحبها إنتقال نشط للبروتونات من الحشوة إلى الفراغ بين الغشائين، ويتم ذلك على مستوى النواقل I و III و VI فنتج بذلك طاقة على شكل ATP (Mitchell، 1961؛ Labuschagne و Brenkman، 2013). يعمل الأكسجين كمستقبل نهائي للإلكترونات ليرجع إلى جزيئة ماء، خلال سلسلة نقل الإلكترونات يتسرب جزء من الإلكترونات ليتحد مع الأكسجين وينتج جذر O_2^- (Brenkman و Labuschagne، 2013). يتم دسمة O_2^- إلى H_2O_2 بواسطة SOD المتكوندري (Mn-SOD) أو السيتوزولي (Cu-Zn-SOD) (Schacht و Böttger، 2013).

2.3.1. مصادر ROS الخارجية

يتعرض الجسم للعديد من العوامل الخارجية التي تتسبب في تشكيل الجذور الحرة، نذكر على سبيل المثال الأشعة فوق البنفسجية التي تعمل على إنتاج O_2^- و OH^\bullet و O_2^1 (Pavlou وآخرون، 2009). كما تعمل الأشعة x و γ على تجزئة جزيئة H_2O إلى جذرين حرين (Beani، 1995). تنتج الجذور الحرة من تلوث الماء والهواء والتدخين والكحول والمعادن الثقيلة (Cd، Hg، Pb، Fe، As) ومن بعض الأدوية (Cyclosporine، Tacrolimus و Bleomycine) وبعض المذيبات الصناعية ومن جراء الطبخ (اللحم المقدد، استعمال الزيوت، الدهون) (Pham-Huy وآخرون، 2008). تتفكك المركبات الخارجية بعد دخولها إلى الجسم عبر العديد من المسالك وتهدم إلى جذور حرة.

5.1. الدور الفيزيولوجي للجذور الحرة

يرتبط مصطلح الإجهاد التأكسدي في العموم بالأضرار والإصابات الخطيرة، إلا أن الجذور الحرة تساهم كذلك في العديد من الوظائف الفيزيولوجية كالمناعة، حيث تؤثر بالتحديد ضد المستضدات أثناء عملية البلعمة. كما تلعب دورا هاما في نقل الإشارات الخلوية، وفي البناء الحيوي للخلايا (تقوم بدور مراسيل خلوية). وبإمكانها أن

تعدل من حالة الأكسدة الإرجاعية. تعرف ROS أيضا بتدخلها في تنشيط الإنزيمات، وتلعب دورا هاما في التقلص العضلي (Finaud وآخرون، 2006).

فعلى سبيل المثال، يملك جذر NO[•] العديد من الوظائف الفيزيولوجية على مستوى الجهاز العصبي، فهو يؤثر كمنظم عصبي neuromodulateur ويلعب دورا في المرونة الشبكية وفي الذاكرة طويلة المدى. أما على مستوى الجهاز الوعائي، فهو ينظم الضغط الدموي ويثبط تكثر الصفائح الدموية ويهدم بعض الكائنات الحية الدقيقة (Sorg، 2004).

1.6. الأمراض المرتبطة بالإجهاد التأكسدي

تؤدي الأضرار التأكسدية التي تصيب ADN والبروتينات وبعض الجزيئات الكبرى إلى ظهور العديد من الأمراض. خاصة أمراض القلب والسرطان (Halliwell، 1994). يعتبر الإجهاد التأكسدي أيضا السبب الرئيسي في ظهور العديد من الأمراض الإلتهابية مثل إلتهاب الأوعية الدموية وإلتهاب المفاصل وإلتهاب كبيبات الكلى والأمراض الناجمة عن الإقفار (أمراض القلب والسكتة الدماغية و إقفار الأمعاء) ومرض نقص المناعة المكتسب ومرض انتفاخ النسيج الخلوي emphysema والقرحة المعدية وارتفاع الضغط الدموي والأمراض العصبية (Alzheimer، parkinson) والأمراض الناتجة عن بالتدخين وغيرها (Lobo، وآخرون، 2010).

1.7. النتائج الجزيئية للإجهاد التأكسدي

يسبب الإنتاج المفرط ل ROS أضرارا على مستوى الجزيئات البيولوجية وبذلك يؤثر على مختلف الوظائف الخلوية، وتعتبر الأغشية البيولوجية والإنزيمات البروتينية و ADN الأكثر عرضة لهجوم الجذور الحرة (Kohen و Nyska، 2002).

1.7.1. فوق الأكسدة الليبيدية

تمثل الأحماض الدهنية غير المشبعة الأهداف الرئيسية لهجوم ROS (OH^\bullet خصوصا)، والتي تتواجد على مستوى الفوسفوليبيدات والكوليسترول، وتمثل الليبيدات الأساسية للأغشية الخلوية والليبوبروتينات (Moussard، 2006). تتم فوق الأكسدة الليبيدية وفق ثلاثة مراحل: مرحلة البدء حيث يقوم جذر OH^\bullet بمهاجمة مجموعة ميثيلان متواجدة بين رابطتين مزدوجتين لحمض دهني غير مشبع منتجا جذرا كربونيا R^\bullet (ينزع OH^\bullet ذرة هيدروجين ل CH_2 - ثم يحدث إعادة ترتيب الروابط المزدوجة)، كما يتحول R^\bullet إلى RO_2^\bullet في وجود الأوكسجين، تليها مرحلة التضاعف أين ينزع جذر RO_2^\bullet ذرة هيدروجين من حمض دهني جديد قريب منها، لينتج بدوره جذر R^\bullet ثم جذر RO_2^\bullet ، فيبدأ بذلك تفاعل سلسلة حيث يتفاعل جذر alcoyl^\bullet (RO^\bullet) مع حمض دهني جديد من أجل المحافظة على مرحلة الانتشار الليبيدي، أما في المرحلة النهائية يحدث تفاعل بين جذرين حرين لتوقيف تفاعلات السلسلة (Moussard، 2006). تتمثل المركبات الرئيسية الناتجة من فوق أكسدة الليبيدات في: (malondialdehyde)MDA و (4hydroxyalkenal) 4HDA و (4hydroxynonenal) 4HDN. تعتبر هذه المركبات مؤكسدات لها القدرة على التفاعل مع بعض الأحماض الأمينية (Beeber و Borg، 2008).

2.7.1. أكسدة البروتينات

تمثل الأحماض الأمينية المكونة للبروتينات أهدافا ل ROS سواء على مستوى السلسلة الجانبية (R) مشكلا نواتجا مؤكسدة أو على مستوى الرابطة البيبتيدية، مؤديا إلى تجزء السلسلة. إن معظم الأحماض الأمينية تقريبا تكون عرضة للتأكسد بواسطة ROS، إلا أن الأحماض الأمينية الكبريتية (Cys و Met) والعطرية (Tyr و Trp) هي الأكثر حساسية للهجوم. تؤدي أكسدة الأحماض الأمينية إلى إنتاج مجاميع هيدروكسيلية وكربونيلية على مستوى البروتينات وبإمكانها كذلك إحداث تغيرات بنيوية هامة كتشكيل شبكات داخل أو بين خلوية كإحداث جسور ثنائية الكبريت التي تغير في البنية البروتينية مؤثرة بذلك على وظائفها البيولوجية (Beeber و Borg، 2008).

تظهر البروتينات المتأكسدة عموماً مصابة وأحياناً فاقدة لنشاطيتها كلياً لذا يتم التخلص منها، فيما توجه للهدم بواسطة البروتينات الحالة، أو تشكل تكتلات صلبة (Moussard، 2006؛ Borg و Beeber، 2008).

3.7.1. أكسدة ADN

بالرغم من أن جزيئات ADN عبارة عن جزيئات مستقرة ومحمية بصورة عالية إلا أن ROS بإمكانها التفاعل معها لإحداث العديد من الأضرار، منها تغييرات على مستوى قواعد ADN، كسور بسيطة لأحد أو كلا سلسلتي ADN، فقدان لأجزاء بيورينية (مواقع apurinique)، إصابات على مستوى سكر الريبوز منقوص الأكسجين، إتحد ADN مع بروتين (تصالب) وإصابة نظام تصليح ADN (Kunwar و Priyadarsini، 2011).

تؤثر جذور الهيدروكسيل مباشرة على ADN مؤكسدة بعض القواعد الآزوتية فتتشكل بذلك جذور هيدروكسيلية مضافة (OH[•] adducts) تتأكسد بدورها وتتغير طبيعتها. من أهم القواعد الآزوتية المعدلة نذكر: 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) و 8-(or4-,5)-Hydroxyadenine و Thymine peroxide و Thymine glycol و 5-(Hydroxymethyl) uracyl. إن هجوم ROS يسبب كسوراً وتشوهات كروموزومية، والتي تعتبر عوامل محفزة لظهور السرطان والشيخوخة النسيجية (Kunwar و Priyadarsini، 2011).

2. إنزيم Xanthine oxydoreductase

1.2. بنيته

إنزيم Xanthine oxydase (XOR) عبارة عن معقد فلافوبروتين معدني، تم عزله أول مرة من حليب البقر. يملك إنزيم XOR (290 kDa)، ويقسم إلى تحت وحدتين متماثلتين ومستقلتين تحفيزياً عن بعضهما. تحتوي كل تحت وحدة على 4 مراكز إرجاعية، المجال N-term الذي يملك مركزين Fe₂S₂ (20 kDa)، والمجال المركزي يحتوي مركز FAD (40 kDa) والمجال C-term الذي يحتوي عامل مساعد للموليبدين (MO-CO) (85 kDa) (Nishino وآخرون، 2005؛ Hadizadeh وآخرون، 2009).

يظهر الإنزيم على شكلين، الشكل المرجع Xanthine deshydrogenase (XDH, EC1.1.1.204) وهو الشكل السائد *in vivo*، والشكل المؤكسد Xanthine oxydase (XO, EC1.1.3.22) السائد في السوائل. إن تحول الشكل المرجع XDH إلى الشكل المؤكسد XO قد يحدث عكسيا عبر أكسدة المجاميع الكبريتية أو غير عكسي عبر القطع البروتيني للأحماض الأمينية النهائية (Harisson، 2006؛ Nishino وآخرون، 2008).

يعتبر إنزيم XOR مسؤول عن ميتابوليزم البيورينات، الذي يحفز أكسدة الكزانثين و الهيبوكزانثين إلى حمض اليوريك، مرفقا بإنتاج O_2^- و H_2O_2 (Ferrari وآخرون، 2007؛ Hadizadeh وآخرون، 2009). تقع مورثة إنزيم XOR البشرية على مستوى الشريط p22 للكروموزوم 2، تتكون من 36 exons و 35 intron مكونة بذلك المجموع الكلي 3999 زوج من القواعد النيكلوتيدية. يتكون التسلسل البروتيني لإنزيم XOR البشري من 1333 حمض أميني. هذا التتالي يمثل 91% من التشابه البنيوي مع XOR للفئران والجرذان (Berry و Hare، 2004).

2.2. تواجد و توزع إنزيم XOR

يتواجد إنزيم XOR بشكل واسع ابتداء من البيكتيريا إلى غاية الثدييات (Parks و Granger، 1986). فقد أظهرت تقنيات التواجد المناعي، تواجد الإنزيم على شكلين نشط وغير نشط على مستوى بعض الأنسجة مثل الكبد والدماغ وقلب الإنسان (Meneshian و Bulkley، 2002؛ Martin وآخرون، 2004). تتوزع نشاطية الإنزيم بشكل واسع على مستوى أنسجة الثدييات، وتظهر بمستويات مرتفعة في الكبد والأمعاء (Pacher وآخرون، 2006). كما تم تحديد إنزيم XOR في العديد من الأنسجة والخلايا (خلايا العضلات الملساء، وبطانة الأوعية الدموية للقلب، العضلات الهيكلية، الخلايا البدنية والبلاعم) (Hellesten-Westing، 1993) وعلى مستوى البطانة المفصالية السليمة والملتهبة (الروماتيزمية) (Stevens وآخرون، 1991). في حين أظهرت دراسات أخرى تتركز إنزيم XOR السيتوبلازمي على مستوى المناطق المحيطة بالنواة، كما أظهرت تتركزه على مستوى

الحويصلات داخل خلوية للخلايا الطلائية للإنسان. بينما وظيفته هناك غير معروفة، يمكن أن تكون مسؤولة عن تخزين الإنزيم (Harrison، 2002). بالإضافة إلى ذلك، يعتبر إنزيم XOR البروتين الأساسي المكون لغشاء الكريات الدهنية للحليب، التي تغلف القطيرات الدهنية للحليب الطازج (Mather، 2000).

3.2. الدور الفيزيولوجي للإنزيم

منذ عشرات السنين، كان يعتقد أن الدور الوحيد للإنزيم يتمثل في هدم البيورينات، إلا أنه نظرا لتعقيده وتوسع مجال نشاطيته وتوزعه النوعي في الأعضاء فإن وظائفه أصبحت أكثر شمولية على مستوى فيزيولوجية العضوية، فقد تم إظهار دورا هاما للإنزيم في امتصاص الحديد على مستوى الأمعاء الدقيقة وحركتها في الكبد (Martin وآخرون، 2004).

عند نقص الأوكسجين، يحفز إنزيم XOR إرجاع النتريت غير العضوي إلى أكسيد النتريك (NO^*)، والتي تمثل جزيئة الإشارة التي تملك خصائص قاتلة للبيكتيريا. أما في حالة وجود الأوكسجين، فهو يرجع بذلك مكونا O_2^* الذي يتفاعل بسرعة مع NO^* لإنتاج $ONOO^*$ ، والذي يمثل عاملا فعالا قاتلا للبيكتيريا (Martin وآخرون، 2004). يستقبل الرضع حليب الأم الغني بإنزيم XOR (داخل الكائن الحي *in vivo*) ويعمل على تخفيض خطر ظهور التهابات المعدة والأمعاء (Stevens وآخرون، 2000).

4.2. الدور الممرض لإنزيم XOR

1.4.2. دور XOR في الإلتهاب

تمثل الإستجابة الإلتهابية عنصرا هاما جدا في المناعة الطبيعية، فهي تمثل ظاهرة طبيعية تحدث داخل العضوية بسبب الإصابة بجروح أو عدوى. تنتج هذه التفاعلات العديد من جزيئات cytokines و XOR، بتحفيز من جزيئات Interferon ($IFN-\gamma$) و Interferon ($INF-\alpha$)، وعامل النخر الورمي ($TNF-\alpha$) و ($IL1$ و $IL3$) (Vorbach وآخرون، 2003). يشارك إنزيم XOR في انتشار التفاعلات الإلتهابية، كما يشارك في توسعها عن

طريق إنتاجه ل ROS. في حالة إلتهاب المفاصل الرثوي، يضحّم إنزيم XOR الإلتهاب على مستوى السائل المصلي في المفاصل مؤديا إلى تآكل العظم وانتشار المرض، كما يؤدي إلى ظهور مضاعفات مثل الإلتهابات الوعائية (Blake وآخرون، 1997). إن ROS المنتجة بواسطة XOR بإمكانها التفاعل مع مكونات الغشاء الخلوي كحمض الأراشيدونيك، وتؤدي إلى إنتاج لبييدات جاذبة كيميائيا للخلايا المتعادلة مما يساهم في انتشار الإستجابة الإلتهاابية (Perez وآخرون، 1990). كما بإمكان ROS تخفيز إنتاج جزيئات سطحية مسؤولة عن إلتصاق الخلايا البيضاء على خلايا البطانة الوعائية وهجرتها عبر البطانة نحو موقع الإلتهاب (Conner و Grisham، 1996).

2.4.2. دور إنزيم XOR في الإقفار وإعادة الإحتقان

وجد Granger وآخرون (1981)، أن ROS الناتجة عن إنزيم XOR تسبب إصابات إقفارية أثناء هدم ATP في حالة نقص مستويات الأكسجين هذا ما يؤدي إلى زيادة مستويات الهيبوكزانثين. عند انخفاض مستويات ATP، يحدث اختلال في التدرج الأيوني على مستوى الغشاء البلازمي مؤديا إلى دخول Ca^{2+} داخل الخلية. إن ارتفاع التراكيز البلازمية للكالسيوم يؤدي إلى تنشيط إنزيمات *proteases* المعتمدة على Ca^{2+} (Granger وآخرون، 1981؛ McCord، 1985) التي تحفز التحول غير العكسي ل XDH، السائد *in vivo*، إلى XO (Kooij وآخرون، 1992).

أثناء إعادة الإحتقان الذي يتبع الإقفار وبوجود الأكسجين، يقوم إنزيم XO بهدم الهيبوكزانثين المتراكم ويرجع O_2 إلى $O_2^{\cdot-}$ و H_2O_2 . ينتج عن التفاعل مع هذين الجذرين جذر OH^{\cdot} الذي يملك قدرة عالية للهدم مما يؤدي إلى إصابات نسيجية هامة. إن تحول XDH إلى XO غير مسؤول عن إنتاج العوامل الضارة لوحده، وإنما بإمكان XDH، أن يرجع O_2 إلى ROS (Harisson، 2002). إلى جانب بعض الأمراض، بإمكان XO أن يلعب دورا هاما في ظهور حالات مرضية أخرى كأمراض القلب والأوعية (Berry و Hare، 2004)، فقدان وظائف

الأعصاب (Hane وآخرون، 2007) وإلتهاب المفاصل الرثوي وإلتهابات مفصلية أخرى (Al-Mouhtaseb وآخرون، 2011).

5.2. مثبطات إنزيم XOR

رغم اكتشاف إنزيم XOR منذ عشرات السنين، إلا أن الأبحاث حول بنيته ودوره لا تزال مستمرة، فالأبحاث المتجهة نحو مثبطات الإنزيم تملك أهمية بالغة وتهدف إلى فهم بنيته وآلية تأثيره، وقدرته على المساهمة في ظهور الأمراض. تملك مثبطات XOR طبيعة متغيرة، كما تتنوع آليات التثبيط وتعلق بطبيعة المثبط. إن مثبطات XOR قد تكون مشابهة لمادة التفاعل purinique أو لمواد ليس لها أي علاقة بنيوية مع المواد البيولوجية للإنزيم. كلا القسمين من المثبطات تتفاعل على مستوى موقع الموليبدان (Mo) (Hille و Massey، 1981).

1.5.2. المثبطات المشابهة لمواد التفاعل

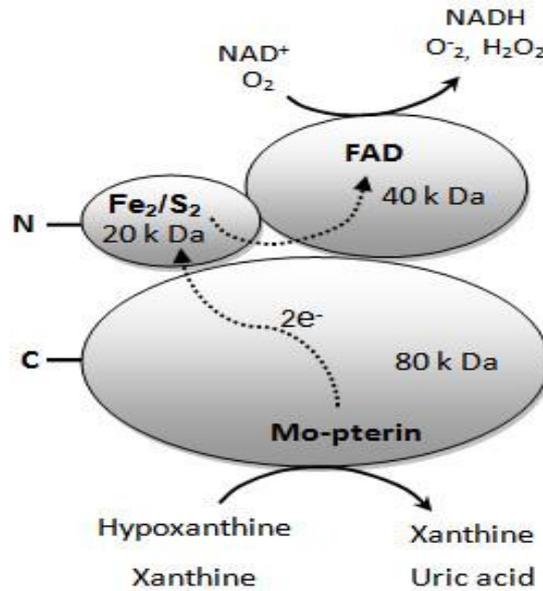
يشمل هذا القسم العديد من المركبات ذات الحلقات العطرية غير المتجانسة، يمثل Allopurinol المثبط الأكثر أهمية فهو يملك نشاطية تثبيطية لإنزيم XO مخفضا بذلك النسب المصلية والبولية لحمض اليوريك، كما يستعمل كدواء لعلاج النقرس (Kojic، 1994؛ Borges وآخرون، 2002).

يتأكسد Allopurinol (isoester de l'hypoxanthine) بواسطة XOR إلى Oxypurinol (isoester de la xanthine) (شكل 2). هذا الأخير يملك شراهية عالية للإنزيم المرجع (Mo^{IV}) و يرتبط معه بشكل قوي (Massey و Edmondson، 1970). عند التراكيز المرتفعة لمركب Allopurinol، فإنه يعمل كمثبط لا تنافسي، ولكن عند التراكيز المنخفضة، فإنه يثبط الإنزيم تنافسيا (Pacher وآخرون، 2006).

بإمكان كلا المثبطين (Allopurinol و Oxypurinol) أن يؤثران كمزيجين للجذور الحرة المنتجة من طرف XOR (Augustin وآخرون، 1994)، من أجل ذلك لا نستطيع التأكيد هل Allopurinol و Oxypurinol يملكان تأثيرا تثبيطيا للإنزيم أو إزاحي للجذور الحرة (Moorhouse وآخرون، 1987).

6.2 الآلية التحفيزية لإنزيم XOR

يتمثل الدور الفيزيولوجي ل XOR في هدم البيورينات وذلك بتحفيظه أكسدة الكزانثين إلى حمض اليوريك ورافقه إرجاع NAD^+ (Olson وآخرون، 1974). أظهرت الدراسات أن أكسدة الهيبوكزانثين و الكزانثين يتم على مستوى المركز Mo للإنزيم، وذلك بانتقال إلكترونين (Xia وآخرون، 1999)، التي تتحول بدورها إلى مركز FAD عبر المراكز المتوسطة Fe_2/S_2 (Anderson و Hille، 1991) والتي تعتبر كمخازن للإلكترونات (Olson وآخرون، 1974). يرجع NAD^+ دائما على شكل ثنائي التكافؤ إلى $NADH$ ، أما O_2 يمكن أن يرجع بشكل ثنائي إلى H_2O_2 أو بشكل أحادي إلى O_2^- (Nishino و Nishino، 1997). يثبت NAD^+ على مركز FAD ل XOR، وبذلك ينتقل إلكترونين إلى NAD^+ ليرجع بصورة ثنائية إلى $NADH$ (Massey و Harris، 1997) (الشكل 3).



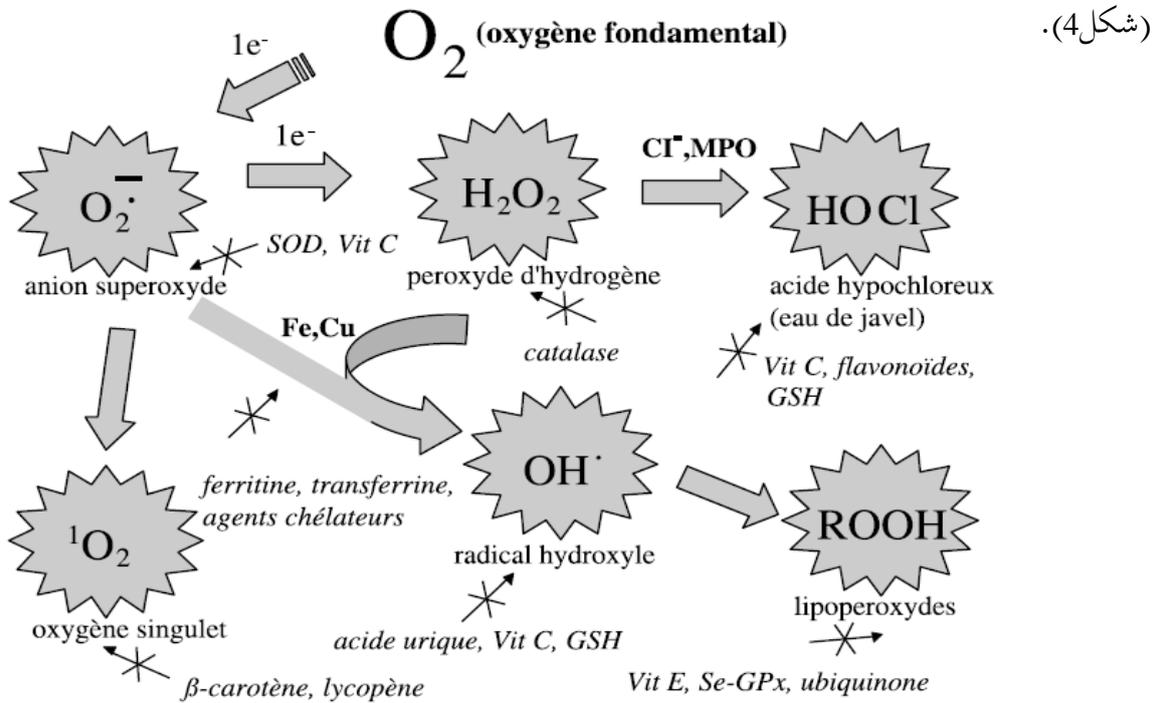
شكل 3. الآلية التحفيزية لإنزيم XOR و الانتقال الإلكتروني بين مراكزه (Brondino وآخرون، 2006).

يتواجد XOR في الطبيعة على شكلين غير نشطين: (1) الشكل غير النشط منزوع الموليبدان أين تكون ذرة الموليبدان للعامل ptérinique غائبة، و(2) الشكل غير النشط منزوع الكبريت أين تكون ذرة الكبريت (S) مستبدلة بذرة الأكسجين (O) (Edmondson و Massey، 1970). يوجد شكلا غير نشط آخر لإنزيم XOR

يتمثل في الشكل deflavo ، والذي يمكن الحصول عليه *in vitro* ولكنه لا يوجد في الحالة الطبيعية. أكثر من 90% من إنزيم XOR المتواجد في حليب الإنسان يكون في شكل غير نشط (Abadeh وآخرون، 1992؛ Godber وآخرون، 1997).

3. الأنظمة المضادة للأكسدة

تعرف مضادات الأكسدة أنها كل مادة تتواجد بتركيز أقل مقارنة بالمادة المؤكسدة، وتعتبر هذه المركبات فعالة لأنها تمنح إلكتروناتها إلى الجذور الحرة وبذلك تعدل آثارها الجانبية (Kohen و Nyska، 2002؛ Lobo وآخرون، 2010)؛ كما تنقسم إلى مضادات أكسدة غير انزيمية مثل glutathion، ubiquinol، uric acid يتم تخليقها أثناء الميتابوليزم الطبيعي في الجسم، وأخرى يتم الحصول عليها من الأغذية ولا يستطيع الجسم تخليقها، كالفيتامينات خصوصا (α-tocopherol) vitamine E، (ascorbic acid) vitamine C و B-carotene، بالإضافة إلى نوع ثالث هي مضادات أكسدة إنزيمية مثل SOD و CAT و GPX (Lobo وآخرون، 2010)



شكل 4. تنظيم إنتاج الأنواع الأكسجينية النشطة بواسطة الأنظمة الدفاعية المضادة للأكسدة (Pincemail وآخرون، 2002).

1.3. الأنظمة المضادة للأكسدة الإنزيمية

1.1.3. إنزيم (SOD) Superoxide dismutase

يعتبر إنزيم SOD النظام الدفاعي الرئيسي ضد جذور فوق الأكسيد ويمثل خط الدفاع الأول ضد الإجهاد التأكسدي، حيث يتواجد في معظم العضيات وفي السوائل خارج خلوية، ويحفز إنزيم SOD تحويل جذر $O_2^{\cdot-}$ إلى H_2O_2 وأكسجين (Das و Lewis-Molock، 1997).



يتواجد إنزيم SOD على ثلاث أشكال في الجسم، Mn-SOD (SOD2) في الميتوكوندري يملك أربع تحت وحدات والعامل المساعد له هو المنغنيز و Cu-Zn-SOD (SOD1) في السيتوزول يملك تحت وحدتين والعوامل المساعدة له هي النحاس والزنك، بالإضافة إلى شكل خارج خلوي Cu-Zn-SOD (SOD3) والذي يملك أربع تحت وحدات (Lobo وآخرون، 2010؛ Grigorov، 2012).

2.1.3. إنزيم (CAT) Catalase

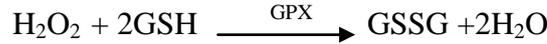
يعتبر CAT من الإنزيمات التي تحتوي على مجموعة الهيم. ويتواجد في خلايا الثدييات خاصة على مستوى البيروكسيزومات، يحول إنزيم CAT بيروكسيد الهيدروجين إلى ماء وأكسجين (Laitonjam، 2012).



يتكون إنزيم CAT من أربع تحت وحدات، تحتوي كل وحدة في مركزها النشط على أيون الحديد Fe^{3+} وجزيئة NADPH. ويتمثل أحد أدوار إنزيم CAT في قدرته على خفض سمية جذر OH^{\cdot} الناتج عن H_2O_2 . كما يرتبط CAT بمجموعة NADPH التي تعمل على حمايته من التثبيط و ترفع من فعاليته (Delattre وآخرون، 2005؛ Laitonjam، 2012).

3.1.3. إنزيم (GPX) Glutathion peroxydase

يتواجد GPX على شكلين، أحدهما غير معتمد على السيلينيوم selenium-independent (glutathione-Stransferase, GST)، بينما يعتمد الآخر على السيلينيوم selenium-dependent (GPx). تتمثل النشاطية المضادة للأكسدة لهذه الإنزيمات في قدرتها على إرجاع H₂O₂ و peroxide (ROOH) إلى ماء أو كحول وبصاحبها أكسدة جزيئات الجلوتاثيون (Grigorov، 2012).



يملك GPX و CAT نفس التأثير على H₂O₂، إلا أن GPX أكثر فعالية مع التراكيز العالية ل ROS بينما CAT له تأثير عالي مع التراكيز المنخفضة ل H₂O₂ (Antunes وآخرون، 2002؛ Grigorov، 2012).

4.1.3. إنزيمات Peroxiredoxins

تعرف Peroxiredoxins بإسم thioredoxin peroxidase ، وهي من الإنزيمات المكتشفة حديثا ولها القدرة على الإرجاع المباشر للبيروكسيدات مثل بيروكسيد الهيدروجين و alkyl hydroxides (Laitonjam، 2012). تلعب Peroxiredoxins دورا هاما في التخلص من الهيدروبيروكسيدات، إذ تمثل 0.1-0.8 % من البروتينات الحرة الخلوية، إلا أن نشاطيتها ضعيفة مقارنة بإنزيمات CAT و GPx (Alvarez وآخرون، 2011).

2.3. الأنظمة المضادة للأكسدة غير الإنزيمية

على عكس الإنزيمات المضادة للأكسدة، فإن معظم المركبات غير الإنزيمية لا يتم تركيبها من طرف العضوية ويتم الحصول عليها عن طريق الأغذية. حيث نجد ضمن قائمة مضادات الأكسدة كلا من الغلوتاثيون المرجع (GSH) و Vit C و Vit E والكاروتنويدات و عديدات الفينول وغيرها.

1.2.3 (Tocopherol) Vitamine E

يتواجد Vit E في الطبيعة بعدة أشكال α و β و γ و δ ، ذات نشاطية مضادة للأكسدة متغيرة (Riicciarelli، 2001). ويعتبر الشكل α أكثر نشاطية، فهو ذو طبيعة ليبيدية ويتثبت على الغشاء الخلوي ويشبط سلسلة تفاعلات فوق الأكسدة الليبيدية وذلك بإتحاده مع جذر peroxy (LOO[•]) فيتحول بدوره إلى جذر لكنه أقل خطورة من جذر (LOO[•])، ليتحد في ما بعد مع جزيئة مضادة للأكسدة (Evans، 2000). يتحدد α - tocopherol بطريقتين، إما عن طريق حمض الأسكوربيك والذي له القدرة على إرجاع جذور tocophéryle، ومن جهة أخرى يتحدد عبر إنزيم خاص يعتمد على glutathion هو إنزيم tocophéryle réductase الذي يعمل على إرجاع جذور tocophéryle إلى α - tocophérol، يصاحبه تحول الغلثياتيون من الحالة المرجعة (GSH) إلى الحالة المؤكسدة (GSSG) (Delattre وآخرون، 2005).

2.2.3 Vitamine C

يعتبر Vit C من المركبات الذائبة في الماء و يمثل مضاد الأكسدة الأكثر أهمية على مستوى السوائل الخلوية. حيث يقوم بتعديل ROS المتواجدة في الطور المائي قبل بدأ عملية فوق أكسدة الليبيدات. و يعمل شكله المرجع AH₂ كمزيج للجذور وذلك بإتحاده مع جذر حر R[•] الذي يرجع إلى RH مستقر ويصاحبه أكسدة Vit C إلى AH[•]، حيث يملك هذا الأخير نشاطية ضعيفة مقارنة بالجذر الحر الأولي (Moussard، 2006).



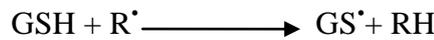
يعمل Vit C على الإزاحة المباشرة لجذور O₂[•] و ONOO[•] و OH[•] (Evans، 2000)، و له القدرة على تحديد α -tocopherol على مستوى الأغشية البلازمية والليبوبروتينات ويحافظ على مستويات GSH داخل الخلية مما يجعله يلعب دورا هاما في حماية مجاميع thiol للبروتينات من عملية الأكسدة (Grigorov، 2012).

3.2.3. الكاروتنويدات

الكاروتنويدات (carotens أو xanthophylls) وهي صبغات صفراء و حمراء وبرتقالية، تتواجد في معظم الخضار والفواكه ويعتبر معظمها طليعا لفتامين VitA (β-carotene، γ-carotene و β-cryptoxanthin). ونظرا لإحتواءها على رابطة مزدوجة فهي تعمل على إزاحة الجذور الحرة و إلتقاط الأوكسجين المهيج. كما أن انخفاض معدلات β-carotene في المصل يعتبر مؤشرا لأمراض القلب والأوعية والسرطان (Podsedek، 2007).

4.2.3. بيتيد Glutathion

هو عبارة عن بيتيد ثلاثي ذو وزن جزيئي ضعيف. يحتوي على مجموعة thiol ويسمى بحمض Glycine-Cystein-glutamique في شكله المرجع (GSH) و GSSG في شكله المؤكسد (Halliwell و Gutteridge، 1999). يتواجد على مستوى السيتوزول و النواة والميتوكوندري، ويعتبر مضاد الأوكسدة الأكثر إنتشارا في هذه الأجزاء الخلوية (Masella وآخرون، 2005؛ Grigorov، 2012). يتراكم الغلثيتيون المؤكسد GSSG في الخلية، وتمثل النسبة بين GSSG /GSH مؤشرا هاما عن الإجهاد التأكسدي (Droge، 2002؛ Grigorov، 2012). يتمثل الدور الرئيسي للغلثيتيون في مشاركته كعامل مساعد للعديد من الإنزيمات المزيلة للسمية ويساهم في نقل الأحماض الأمينية عبر الغشاء البلازمي وإزاحة جذور OH[•] و O₂¹ وتحديد VitC و VitE (Masella وآخرون، 2005؛ Grigorov، 2012).



4. المركبات الفينولية

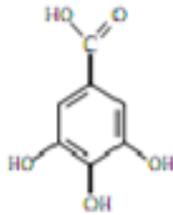
المركبات الفينولية عبارة عن مستقلبات ثانوية نباتية، تتميز بنيتها الأساسية بوجود حلقة عطرية أو أكثر مرتبطة بعدة مجاميع هيدروكسيل (Manach وآخرون، 2004). فقد تتواجد المركبات الفينولية على شكل حر أو مرتبطة مع سكريات أو أسترات أو مبلمرة، و بإمكانها الإرتباط مع مكونات الجدار الخلوي كعديدات السكريات والبروتينات (Edeas، 2007).

1.4 . الأقسام الرئيسية للمركبات الفينولية

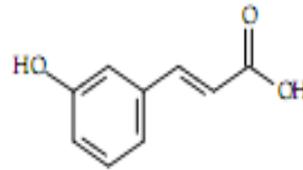
يوجد أكثر من 8000 مركب فينولي مختلف معروف ببنيات متعددة. ويمكن تقسيم المركبات الفينولية حسب بنيتها الأساسية إلى عدة أقسام : الفينولات البسيطة، الأحماض الفينولية و coumarin و isocoumarin و naphtoquinone و xanthone و stilbene و antraquinone و flavonoides و lignane و tannin. ومن بين هذه الأقسام، تمثل الأحماض الفينولية والفلافونيدات الأقسام الأكثر انتشارا (Debeer وآخرون، 2002 ؛ Rooney و Dykes، 2007).

1.4 .1. الأحماض الفينولية

وهي عبارة عن مركبات فينولية (شكل5)، تقسم إلى قسمين رئيسيين: أحماض فينولية مشتقة من حمض cinnamic ذات هيكل كربوني (C1-C6) و أحماض فينولية مشتقة من حمض benzoic ذات هيكل كربوني (C3-C6)، و تتواجد في الخضر والفواكه خاصة في البذور و القشور. كما تظهر الأحماض الفينولية على شكل مرتبط مع سكريات أو أسترات (Chandrasekara و Shahidi، 2010، Gotti، 2011)، ويمكن أن تتحول إلى شكل حر بإماحتها بواسطة الأحماض أو القواعد أو الإنزيمات.



Gallic acid (hydroxybenzoic acid)

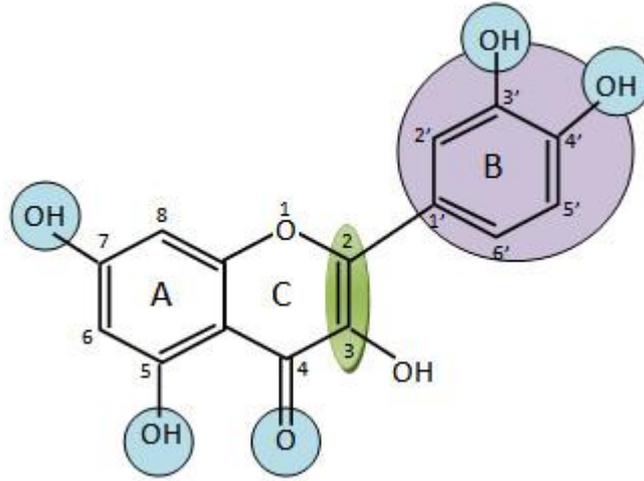


Coumaric acid (hydroxycinnamic acid)

شكل 5. البنية الكيميائية للأحماض الفينولية (Tsao، 2010).

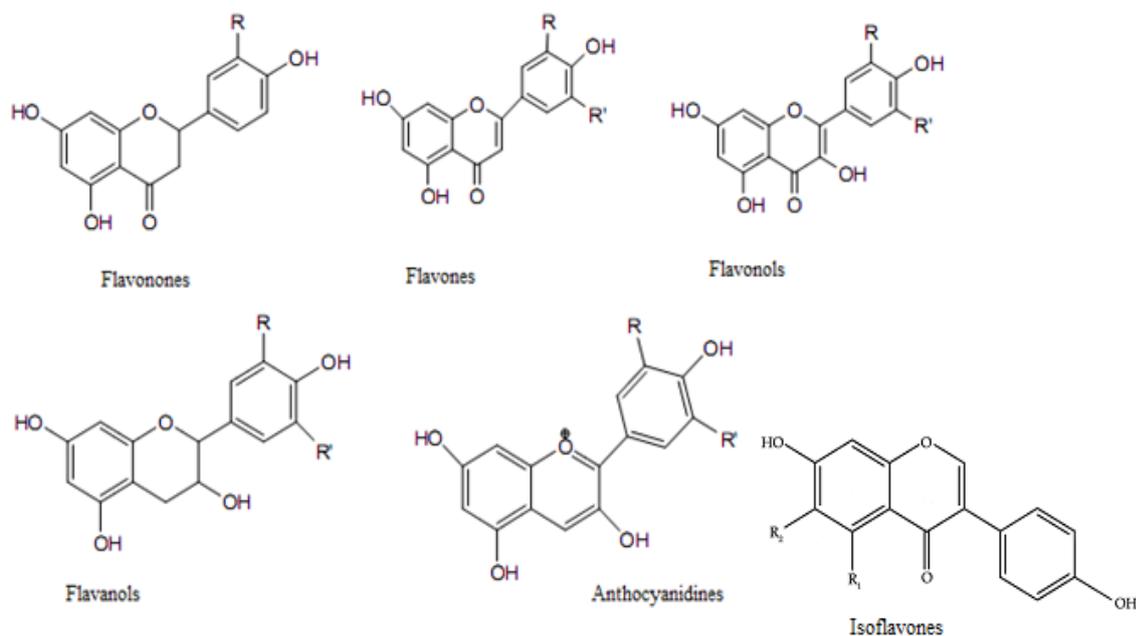
2.1.4. الفلافونيدات

تمثل الفلافونيدات أهم مجموعة في عائلة عديدات الفينول وتتكون من أكثر من 4000 مركب. وهي ذات وزن جزيئي ضعيف، تحتوي على 15 ذرة كربون متوزعة في شكل C6-C3-C6 على حلقتين عطريتين (حلقة A و B) متصلتين بسلسلة من 3 ذرات كربون تسمى الحلقة C (Balasundram وآخرون، 2006) (الشكل 6).



شكل 6. الشكل العام للفلافونويدات و أهم المواقع المتدخلة في تأثيراتها الحيوية (Cazarolli وآخرون، 2008)

تقسم الفلافونويدات إلى 13 عائلة حسب عدد المبادلات الهيدروكسيلية وتواجد الرابطة المزدوجة بين C2 و C3 في الحلقة C؛ وأهمها Flavones و Flavonoles و Flavanols و Flavanones و Isoflavones و Anthocyanins أو anthocyanidins (شكل 7). قد تظهر الفلافونيدات بشكل مشتقات ميثيلية أو كبريتية أو متحدة مع سكريات أحادية أو ثنائية أو متعددة، أو مع الليبيدات و الأمينات و الأحماض الكربوكسيلية والأحماض العضوية (Reis Giada، 2013).



شكل 7. الأقسام المختلفة للفلافونيدات (Bahorun وآخرون، 2006).

3.1.4. الدباغ

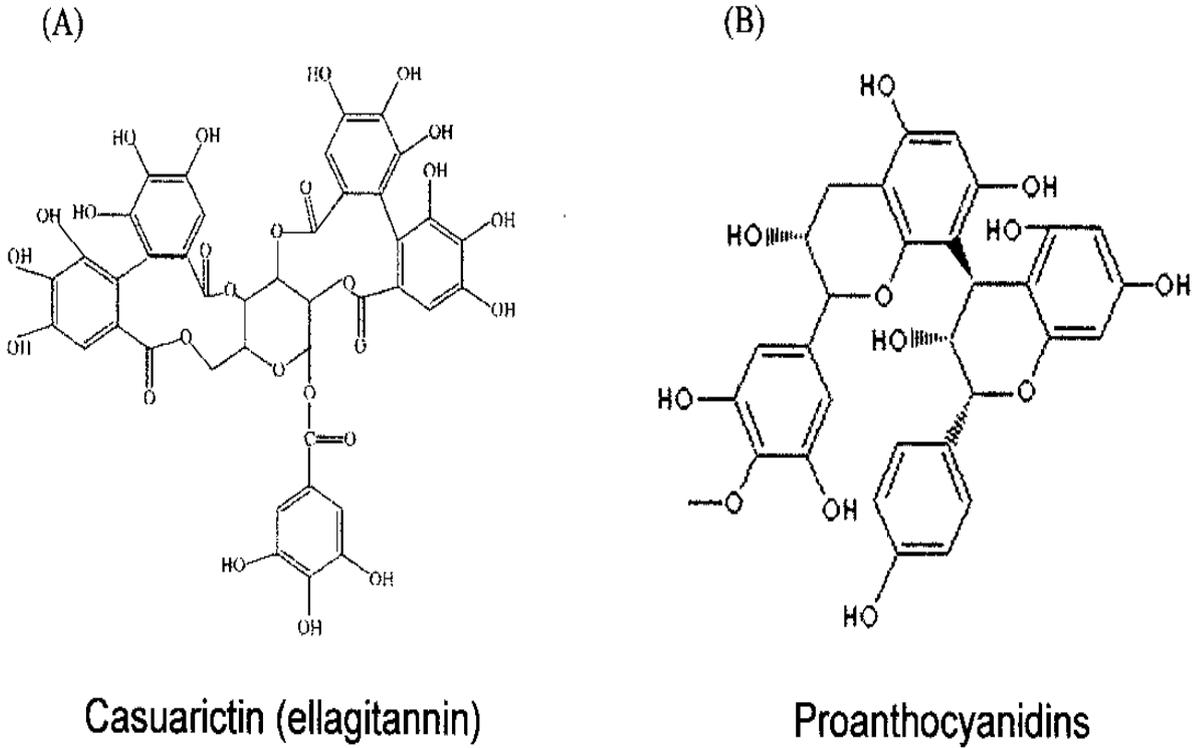
هي مركبات فينولية ذات وزن جزيئي عالي 500 إلى 3000 دالتون، تتميز بقدرتها العالية على الارتباط بالبروتينات وتقوم بترسيبها، وهي مسؤولة عن الذوق في العديد من الفواكه والخضار (Macheix وآخرون، 2005). يمكن تمييز مجموعتين من الدباغ والتي تختلف عن بعضها بنشاطيتها وتركيبها الكيميائي وهي الدباغ المميهة والدباغ المكثفة.

1.3.1.4z. الدباغ المميهة

تتواجد هذه المركبات في النباتات ثنائية الفلقة وفي بعض الأشجار، و تتفكك بفعل الإنزيمات أو عن طريق الإماهة الحامضية أو القاعدية، محررة بذلك أحماضا فينولية من نوع حمض gallic (gallotannin)، أو حمض ellagic (ellagitannin) (Macheix وآخرون، 2005) (شكل 8).

2.3.1.4. الدباغ المكثفة

تشكل الدباغ المكثفة عن طريق بلمرة جزئيات Flavane-3ols المشتقة من catechine (+)-. تتميز بعدم تجانسها ومقاومتها للتحلل، إلا في التفاعلات الكيميائية القوية وتحت درجة حرارة عالية حيث تتحول إلى صبغات حمراء. وتمثل المركبات الفينولية المسؤولة عن الذوق القابض في الخضر وتدعى المركبات الشائبة والمتعددة بـ (proanthocyanidines) (Macheix وآخرون، 2005؛ Reis Giada، 2013) (شكل 8).



شكل 8. البنية الكيميائية لـ casuarictin (الدباغ المميهة) و proanthocyanidins (الدباغ المكثفة)

(Reis Giada، 2013).

2.4. النشاطية البيولوجية لعديدات الفينول

4. 2. 1. النشاطية المضادة للأكسدة للفلافونيدات

تؤثر الفلافونيدات كمضادات للأكسدة بآليات مختلفة مثل الإزاحة المباشرة لـ ROS و تثبيط الإنزيمات واستحلاب الأيونات المعدنية أو حماية الأنظمة الدفاعية المضادة للأكسدة (Halliwell، 1994).

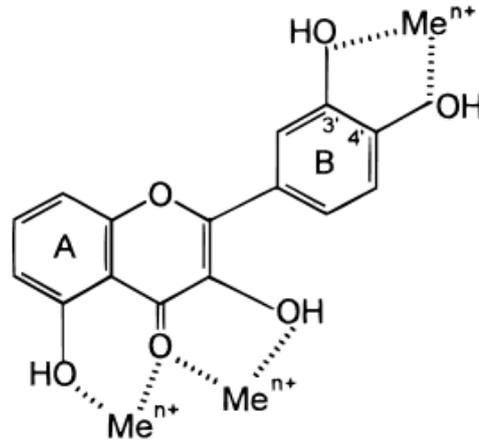
4. 2. 1. 1. تثبيط الإنزيمات

للفلافونيدات القدرة على تثبيط إنزيم xanthine oxydase (Hanasaki، 1994) حيث أظهرت دراسة قام بها Cos (1998)، العلاقة بين البنية الكيميائية للفلافونيدات ونشاطيتها المثبطة لإنزيم XOR، حيث وجد أن كل من Flavones و Flavonoles لهما القدرة على تثبيط الإنزيم لإحتواءهما على الرابطة المزدوجة بين C2-C3 وغياب مجموعة OH على C3. إن الفلافونيدات السكرية تملك نشاطية تثبيطية لـ XOR أقل من الفلافونيدات غير السكرية، فعلى سبيل المثال يملك Rutin نشاطية أقل 10 مرات من Quercetin. وأظهرت دراسات أخرى أن الفلافونيدات لها القدرة على تثبيط إنزيمات أخرى مسؤولة عن إنتاج الجذور الحرة مثل Cyclooxygenase و Lipooxygenase (Landolfi، 1984). كما بينت النتائج المتحصل عليها من طرف Sandhar وآخرون (2011) أن كل من quercetin و kaempherol و galangine و Flavone مثل apigenine هي مشبطات قوية لإنزيم Cytochrome P450.

4. 2. 1. 2. استحلاب الأيونات المعدنية

تعتبر الفلافونيدات مركبات إستحلابية للأيونات المعدنية مثل Fe^{2+} ، مما يخفض من إنتاج جذور الهيدروكسيل (Pietta، 2000؛ Brumaghi و Perron، 2009؛). فقد قام Van Acker وآخرون (1996) بإظهار آلية استحلاب الحديد لبعض الفلافونيدات، وقد كانت المواقع الفعالة المسؤولة عن الاستحلاب هي نواة catechol في

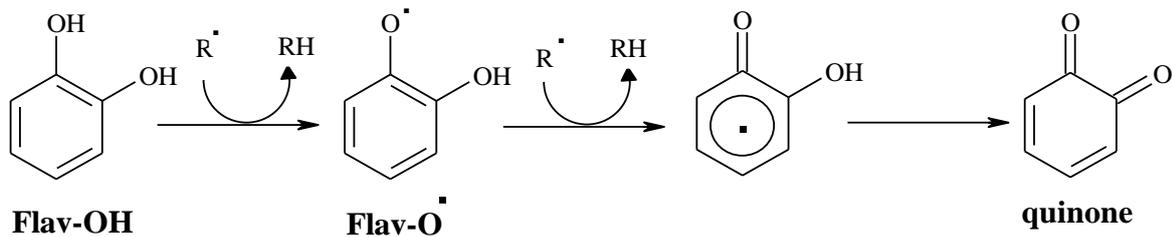
الحلقة B و مجموعة 3-hydroxyl و 4-oxo في الحلقة C و مجاميع 4-oxo و 5-hydroxyl للحلقتين A و C (شكل 9).



شكل 9. مواقع ارتباط الأيونات المعدنية بالفلافونيدات (Pietta، 2000).

4. 2. 3.1. إزاحة الجذور الحرة

تعمل الفلافونيدات على إرجاع الجذور الأوكسجينية مثل: O_2^- ، OH^\bullet ، LO^\bullet و LOO^\bullet وذلك بمنحها هيدروجينا أو إلكترونات، في حين تتفاعل الجذور الفلافونيدية الناتجة مع بعضها لإعطاء بنية quinone مستقرة (Pietta، 2000) (شكل 10).



شكل 10. تفاعل الفلافونيدات مع الجذور الحرة (Pietta، 2000).

إن النشاطية المزيجية للجذور الحرة تتطلب وجود كل من البنية ortho-diphenolique للحلقة C والتي تعتبر ضرورية لنشاطية الفلافونيدات، وجود الرابطة المزدوجة بين C2-C3 مع الوظيفة 4-oxo يساعد على انتقال الإلكترونات

مما يعمل على استقرار جذر aroxy، كما أن اتحاد بمجاميع OH في الوضع 3 و 5 مع وظيفة الكربونيل في C4 يرفع من النشاطية المزحية للجذور الحرة، أما استبدال مجاميع الهيدروكسيل في الحلقة B بمجاميع ميثيلية يغير من النشاطية الإزاحية للجذور الحرة (Pietta، 2000؛ Balasundram وآخرون، 2006؛ Reis Giada، 2013).

2.2.4. النشاطية المضادة للإلتهاب

قامت العديد من الدراسات بإظهار دور الفلافونيدات المضاد للإلتهاب (Da Silva وآخرون، 1994؛ Galati وآخرون، 1994؛ Read، 1995). فالفلافونيدات مثل quercetin، myricetin، apigenin و chrysin لها القدرة على تثبيط إنزيم cyclooxygenase و lipoxygenase (Brunetton، 1993؛ Iwalewa وآخرون، 2007). أسفرت الدراسة التي قام Kostyuk وآخرون (2011) على بعض المركبات الفينولية وآثارها على إلتهاب الأوعية، أن quercetin و resveratrol تخفض مستويات LDL المؤكسد (oxidized LDL) المتسبب في تصلب الأوعية خلال التفاعل الإلتهابي، وإنتاج جذر O_2^- وخفض مستويات NO، كما يعمل resveratrol و verbascoside على تعديل الإستجابة الإلتهابية للخلايا الطلائية مخفضا بذلك من التعبير المفرط ل الكيموكينات ولجزئيات الإلتصاق المحفزة ب (oxLDL).

2.4.3. التأثير المضاد للسرطان

اتجهت الأبحاث حديثا حول عزل المركبات الطبيعية كالمركبات الفينولية واختبار قدرتها كعوامل مضادة للسرطان. فعلى سبيل المثال يعمل كل من quercetin، rutin، luteolin، ومشتقاتها السكرية بالإضافة إلى myricetin، catechin و rosmarinic acid على حماية ADN من أضرار ROS، كما يمثل resveratrol مثبطا قويا للسرطان. تتواجد هذه المركبات في ثمار العنب وبتراكيز عالية في الخمر الأحمر وتقوم بنشاطيتها المضادة للسرطان عن طريق تحفيز الموت الخلوي للخلايا الورمية. كما أنه من المعروف أن مركبات catechine في الشاي

(epigallocatechin، catechin و epicatechin، وغيرها) تملك قدرة عالية مضادة للسرطان (Fasolo و de Mello Andrade، 2014).

4.2.4. التأثير المضاد للأمراض العصبية Neurodegenerative

تم تقدير دور المركبات الفينولية على الجهاز العصبي المركزي. وجد أن الإجهاد التأكسدي يسبب أضراراً عصبية ويسبب الموت عند المرضى المصابين باحتقان دموي في الدماغ (Fasolo و de Mello Andrade، 2014). قام Itoh وآخرون (2012) بدراسة تأثير epigallocatechin gallate (EGCG) (-) والمركبات الفينولية في الشاي الأخضر على تكاثر الخلايا العصبية الجذعية في المكان العصبي المصاب. في هذه الدراسة تم معالجة جردان بمحلول مائي يحتوي على EGCG (w/v) 0.1% مدة 10 أسابيع وأظهرت الدراسة النسيجية عند المعالجة بـ EGCG أنه يقوم بالتخلص و/أو امتصاص الجذور الحرة مثل ($O_2^{\cdot-}$ ، OH^{\cdot}) الناتجة أثناء الإصابة. يتم تثبيط الجذور الحرة المحفزة للموت الخلوي المبرمج للخلايا العصبية الجذعية هذا ما يسمح بحمايتها في المراحل الأولى من حدوث الإصابة.

5.2.4. النشاط المضاد لأمراض القلب والأوعية الدموية

إنطلاقاً من بحث قام به hertog وآخرون عام 1993 وجد أن الأغذية الغنية بالفلافونيدات تخفض 68 % من خطر أمراض القلب و الأوعية مقارنةً بغذاء فقير بها (Zabri وآخرون، 2008). تعمل المركبات الفينولية على حماية القلب والأوعية من خلال تثبيط تشكل أوعية دموية جديدة وهجرة الخلايا والتضاعف في الأوعية. يعتقد أن التأثير الفعال للمركبات الفينولية على اقترار الأوعية يعود إلى الحماية من حدوث تخثر الدم من خلال تثبيط نشاط الصفائح الدموية، أو من خلال خفض تعبير الجزيئات المولدة للتخثر أو المولدة لتصلب الأوعية الدموية (Ong و khoo، 2000، Fasolo و de Mello Andrade، 2014).

5. نبات الحرمل *Peganum harmala*

يعرف نبات الحرمل *Peganum harmala* L. بإسم harmel في شمال افريقيا و Espand في إيران، African rue و Mexican rue و Turkish rue في الولايات المتحدة (Mahmoudian وآخرون، 2002). ينتمي نبات الحرمل إلى عائلة Zygophylacea، فهي عشبة معمرة، قد تصل إلى 30-100 cm في المناطق شبه الصحراوية والسهوب والأترية الرملية (Mahmoudian وآخرون، 2002). يتوزع نبات الحرمل بشكل واسع في وسط آسيا و شمال إفريقيا والشرق الأوسط، كما تم جلبه إلى أمريكا وأستراليا (Mahmoudian وآخرون، 2002). يتكاثر نبات الحرمل أساسا عن طريق البذور، كما له القدرة على التكاثر عبر الجذور المصابة (Unverzagt، 2013). يتميز بسيقان مستقيمة كثيرة التفرع، تحمل أوراقا متناوبة مقسمة إلى أشرطة ضيقة، وأزهار أحادية تبلغ من 25-30 mm ذات لون أبيض مصفر وعروق خضراء. أما البذور فهي صغيرة كثيرة العدد تتميز باحتواءها على زوايا ثلاثية الشكل ذات لون بني قاتم وذوق مر (Iserine، 2001). تكون فترة إزهار نبات الحرمل من شهر مارس إلى أكتوبر (Dube وآخرون، 2011) (شكل 11).



شكل 11. نبات الحرمل والأجزاء المختلفة المكونة له. A: النبتة بأكملها، B: الأزهار، C: الثمار، D: البذور
(Ramezanloo و Asgarpanah، 2010).

1.5. الإستعمال التقليدي للنبته

يستعمل نبات الحرمل منذ زمن قديم في العلاج عند العرب في الطب الشعبي، فبذوره تستعمل كمدررة للحيض و تستعمل كمضادة للعقم في شمال إفريقيا والشرق الأوسط ، كما تستعمل كمخفضة للحمي (Lamchouri وآخرون، 1999؛ Kuhn و Winston، 2000)، كما تستعمل البذور في المغرب كطاردة للديدان و مدر للحليب ومضادة للتشنجات وللتقيؤ (Munir وآخرون، 1995؛ Bellakhdar، 1997) وتملك النبتة تأثيرات أخرى ضد الزكام ونزلات البرد، أما العشبة ككل فهي تستعمل للتبخير والتهابات الأعصاب (Kholmatov وآخرون، 1998؛ Sezik وآخرون، 2004). أما الثمار فهي تستعمل كمساعدة للهضم ومدررة للبول ولكنها مسببة للهديان ومنومة (Kartal وآخرون، 2003؛ Goel وآخرون، 2009). أما الأوراق فتستعمل لمعالجة الربو و المغص (ألم البطن)، و انقطاع الحيض و الهستيريا و الحازوقة و الآلام العصبية الحادة والروماتيزم (Basu و Kirtikar، 1995؛ Ezer و Mumcu، 2006). كما يستعمل Harmine لمعالجة مرض باركنسن (Iserine، 2001).

يتراوح محتواها من القلويدات ما بين 2 إلى 5% والتي تتواجد أساسا في الجذور و البذور (Asparganah و Ramenzanloo، 2012)، وتمثل القلويدات في مركبات B-carbolines مثل Harmine، Harmaline، Harmalol و Harmane (Mahmoudian وآخرون، 2002) و Harmalidine، Ruine و Tetrahydroharmine (Khan، 1990). ومركبات Quizoline مثل (Peganine) Vascine و Vasicinone. إن محتوى القلويدات في البذور غير الناضجة يكون أقل من البذور الناضجة (Mahmoudian وآخرون، 2002). يحتوي الجزء الهوائي لنبات الحرمل على الفلافونيدات وتشمل Vitexine و Orientine و Hyperside و Luteoline (Khan وآخرون، 2012)، في حين يتواجد Kaempherol و Quercetin في البذور (Pulpati وآخرون، 2008)، بالإضافة إلى تواجد فلافونيدات سكرية في الجزء الهوائي وهي -7-O-acacetin و rhamnoside و -O-glycosyl-2''-O-(3''-acetylramnosyl) glucoside و -7-O-(2''-O-rhamnosyl-

glucoflavone-2''''-O- rhamnosyl-2''''-O-glucosyl-cytoside و 2''''-O-glucosylglucoside
(Sharef، 1997).

تملك بذور نبات الحرمل نشاطية مضادة للبكتيريا والفطريات (Jhon و Prashanth، 1999؛ Moghadam وآخرون، 2010 و Nennah، 2010)، ومضادة للسرطان (Lamrouchi وآخرون، 2000؛ Jahaniاني وآخرون، 2005)، ومضادة للأكسدة (Moura وآخرون، 2007؛ Djarmouni وآخرون، 2012؛ Baghiani وآخرون، 2012). ومضادة لتكتل الصفائح الدموية (Im وآخرون، 2009) ونشاطية موسعة للأوعية (Berraouagui وآخرون، 2006؛ Astulla وآخرون، 2008).

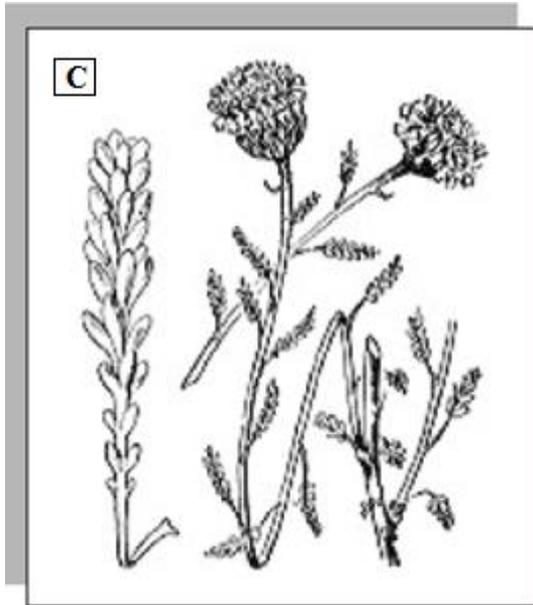
2.5. التأثير السمي لنبات الحرمل

بالرغم من مختلف النشاطيات البيولوجية التي يملكها نبات الحرمل، إلا أن بعض الدراسات أظهرت الجانب السمي لهذا النبات. فهضم النبتة ونظرا لاحتوائها على مركبات (Harmaline، Harmine) Alcaloides B-carboline و Tetrahydroharmine) يسبب تأثيرات سمية مختلفة، كما أن مركبات B-carboline تحفز الجهاز العصبي المركزي بتثبيط أيض النواقل العصبية الأمينية، أو التثبث مباشرة على المستقبلات النوعية (Frison وآخرون، 2008). كما يعمل Harmine على خفض ضغط الدم (Bukhari وآخرون، 2008).

6. نبات الجعدة *Santolina chamaecyparissus*

تدعى نبتة الجعدة بالفرنسية *Santolina petit cyprè* أو *Santolina incana* أو *Aurone femelle* أو *Cyprè de jardin*، أما بالإنجليزية فتسمى *Lavender cotton* و بالإيطالية *Santolina*.

نبتة الجعدة عبارة عن نبتة خشبية ذات رائحة قوية، تملك فروعا متوضعة عموديا تنتهي بمجموع زهري، قد تصل النبتة في البراري إلى 50 سم، بينما المزروعة تبلغ مستويات معتبرة. أوراقها لحمية ضيقة جدا ولا تتعدى 2 إلى 6 مم طولاً ذات لون أبيض مخضر، نجدها في التلال الجافة و الأراضي الحصوية (Fournier، 1948) (شكل 12).



شكل 12. الشكل المورفولوجي لنبات الجعدة *Santolina chamaecyparissus*: A، مظهر عام لنبته الجعدة. B، الأوراق. C، الأزهار.

1.6. الإستعمال التقليدي للنبته

تملك الأوراق العديد من الخصائص فهي محفزة ومنشطة وتستعمل أحيانا ضد اضطرابات المعدة والدورة الشهرية، كما أنها مثيرة للشهوة وطاردة للديدان (Debuigne، 1974)، لها تأثيرات مضادة للهستيريا، و احتقان الكبد والطحال وضد الحمى المتناوبة. تملك النبتة خصائص مضادة للديدان، إلا أن البذور و الزيوت هي الأكثر نشاطا (Fournier، 1984).

تتميز نبتة الجعدة بغناها بالزيوت الأساسية، فهي تحتوي على نسبة عالية من spathulenol (45 - 82 %) و camphor (7,1 %)، L-cadinol (5,8 %)، Methoxy-1,2-dihydrobenzen (2,83 %) و cis-chrysanthenol (2,52 %) (El Rafari، 2008). كما تحتوي مستخلصات النبتة على الفلافونيدات خاصة Flavone مثل apigenine و luteoline وكذلك مشتقاتها السكرية (glucoronides)، rhamnoglucoside ومركبات Flavone methoxylées مثل pectolinariginine، hispiduline، nepetine، jaceosidine ومركبات Flavonol methoxylées في الوضع 7-glycosyl (Giner Pons و Rios، Canavate، 2000)، بالإضافة إلى مركبات sesquiterpene من نوع farnesane، germacrane، eudesmane (Sanz وآخرون، 1991؛ Barrero وآخرون، 1999) و على مجاميع acétylénique (Christensen، 1992) و Coumarin (Ferrari وآخرون، 2005).

تملك نبتة الجعدة العديد من التأثيرات البيولوجية، فقد أظهر Ginger وآخرون تأثيرها المسكن للألم (Giner وآخرون، 1988؛ De Iogu وآخرون، 2000)، كما أن لمستخلصات نبتة الجعدة القدرة على تثبيط التقلصات العضلية المحفزة بالهستامين والسيروتونين، بالإضافة إلى نشاطيتها المضادة للإلتهاب (Giner وآخرون، 1988؛ De Iogu وآخرون، 2000). في دراسة أخرى أجريت من طرف Sala وآخرون، وجد أن نبتة الجعدة تملك تأثيرا مثبتا لنشاطية Phospholipase A₂ (*in vivo* و *in vitro*)، كما أن مستخلصاتها الهيدروكحولية لها تأثير واقى للكبد (Dhanabal وآخرون، 2012). كما تستعمل النبتة كذلك لمعالجة العديد من الإلتهابات الجلدية (Da Silva، 2004)، وتملك زيوتها الأساسية تأثيرا مضادا للفطريات (Suresh وآخرون، 1997).

الجزء العملي

1. المواد و الطرق

1.1. المواد المستعملة

1.1.1. المواد البيولوجية

جلبت نبتة الحرمل في مارس 2010 من منطقة نقاوس ولاية باتنة، وجلبت نبتة الجعدة في جوان 2012 من منطقة عين آرنات بسطيف، وتم تصنيفهما من طرف الأستاذ الدكتور لعور حسين، قسم البيئة وبيولوجيا النبات، كلية علوم الطبيعة والحياة بجامعة سطيف. تم جلب حليب البقر الطازج من مزرعة بضواحي سطيف.

أجريت الدراسة *in vivo* على فئران ذكور *Swiss albinos* ، يتراوح وزنها بين 25 إلى 30 غ، تم الحصول عليها من معهد باستور بالجزائر. أخضعت الفئران لفترة تأقلم مدة أسبوع، مع تقديم الغذاء المصنع الخاص بها.

2.1.1. المواد الكيميائية والأجهزة

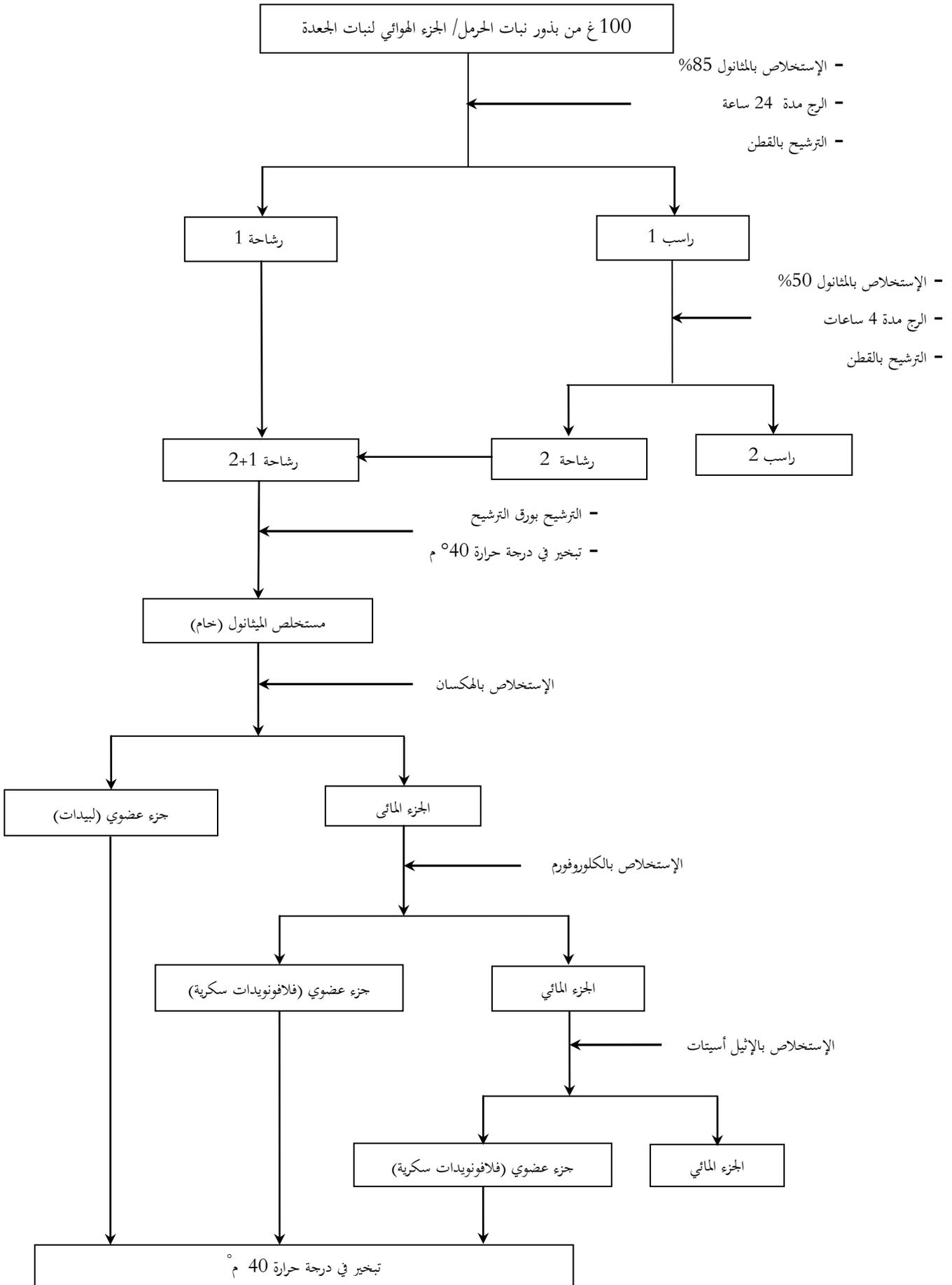
استعملت العديد من المركبات الكيميائية والمحاليل العضوية والتي تم شراؤها من Sigma-Aldrich و Fluka. من بين الأجهزة التي استعملت أثناء البحث، جهاز التبخير (BUchi461) وجهاز التحليل الطيفي UV/VIS-8500TechomP وحمام مائي Memmert وجهاز الطرد المركزي Sigma 1-15K.

2. طرق العمل

1.2. استخلاص المركبات الفينولية

استعمل في طرق الإستخلاص العديد من المذيبات القطبية وغير القطبية حسب طريقة Markham (1982). تعتمد طريقة الإستخلاص على أخذ 100 غ من الوزن الجاف للنبتة، يضاف إليها ميثانول (85 %). يعرض الخليط لعملية رج مدة ليلة كاملة في درجة حرارة 4 م° ، بعدها يرشح المحلول عبر قطن زجاجي، ثم تحفظ الرشاحة الأولى المتحصل عليها في 4 م° ويعاد استخلاص الراسب مرة ثانية بنفس الطريقة ولكن باستعمال ميثانول

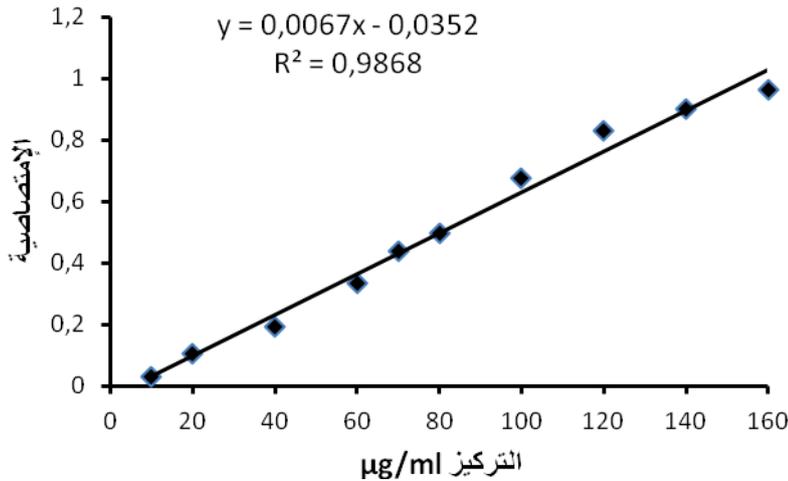
(50%) . تمزج الرشاحتين ثم تعرض لعملية تبخير باستعمال جهاز التبخير لنحصل في النهاية على المستخلص الخام (CrE). يتم نزع الليبيدات من هذا الأخير بالغسل بالهكسان لعدة مرات للحصول على مستخلص الهكسان (HxE). يتم غسل الجزء المائي المتبقي بالكلوروفورم لإستخلاص الفلافونيدات غير السكرية معطيا مستخلص الكلوروفورم (CHE)، أما الجزء المائي الناتج فيضاف له إيثيل الأسيتات لإستخلاص الفلافونيدات أحادية وثنائية السكر للحصول على مستخلص إيثيل الأسيتات (EAE). يحتوي المستخلص المائي النهائي (AqE) على الفلافونيدات الأكثر قطبية ثنائية وثلاثية السكر. تحفظ المستخلصات تحت -20 م° إلى حين استعمالها (شكل 13).



شكل 13. طرق استخلاص الفلافونويدات من بذور نبات الحرمل والجزء الهوائي لنبات الجعدة حسب Markham (1982).

2.2. تقدير عديدات الفينول الكلية

تم تقدير عديدات الفينول الكلية باستعمال طريقة Folin-Ciocalteu (Lie وآخرون، 2007). حيث تعتمد على إرجاع مكونات كاشف Folin-Ciocalteu بواسطة المجاميع الهيدروكسيلية الفينولية، مشكلة ناتجا أزرقا في وسط قاعدي. نأخذ 200 µl من المستخلصات يضاف لها 1ml من محلول Folin-Ciocalteu المخفف 10 مرات. ترج الأنايب وتحفظ في درجة حرارة المخبر لمدة 4 دقائق، بعدها يضاف 800 µl من محلول كربونات الصوديوم (75 g/l)، وتحفظ الأنايب في درجة حرارة المخبر لمدة ساعتين. تقرأ الإمتصاصية عند 765 nm. ويستعمل حمض الغاليك (20-160 µg/ml) لتحديد منحنى العيارية (شكل 14). يتم التعبير عن النتائج بمكافئ حمض الغاليك لكل غرام من وزن المستخلص.

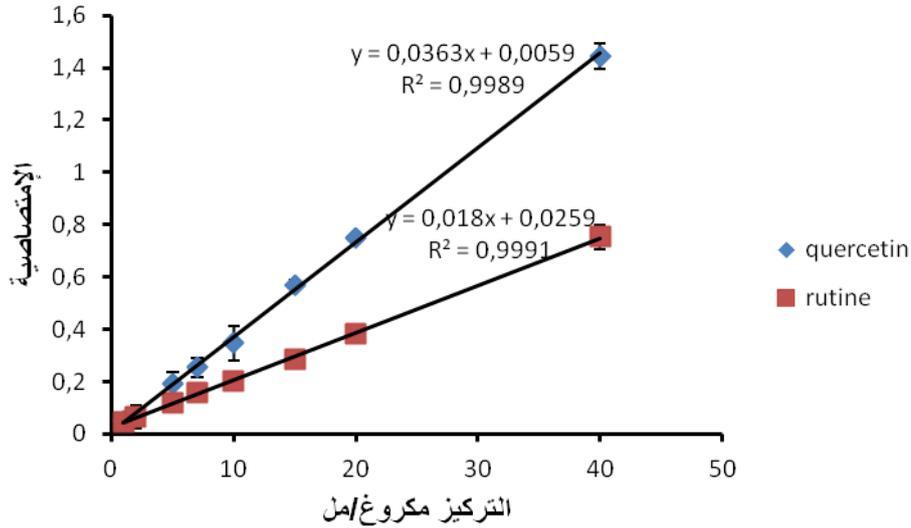


شكل 14 . منحنى العيارية لحمض الغاليك

3.2. التقدير الكمي للفلافونيدات

تم التقدير الكمي للفلافونيدات بطريقة $AlCl_3$ حسب Bahorun وآخرون (1996)، يؤخذ 1ml من المستخلصات المستعملة ويضاف لها 1 ml من محلول $AlCl_3$ بتركيز 2 %، بعد 10 دقائق من الحضانة تقرأ الإمتصاصية عند طول موجة 430 nm. تم حساب تركيز الفلافونيدات انطلاقا من المنحنى العياري لكل من

quercetin و rutin بتركيز يتراوح بين (1-40 µg/ml). يعبر عن النتائج بعدد الملغرامات المكافئة لكل من quercetin و rutin لكل غ من المستخلص (شكل 15).



شكل 15. منحني المعايرة لـ quercetin و rutin.

4.2. تنقية إنزيم XOR من حليب البقر

تم فصل وتنقية إنزيم XOR من حليب البقر بطريقة (Baghiani وآخرون، 2003). تعتمد هذه الطريقة على استخلاص القشدة من حليب البقر بعد عملية طرد مركزي (5000 دورة/دقيقة تحت 4 م°)، بعدها تسترجع القشدة ويضاف لها ضعفي الحجم من محلول فوسفات البوتاسيوم (0,2 M) K_2HPO_4 ، يحتوي على 1 mM من EDTA و 10 mM من DTT و 1,5 mM من Salycylate و 0,1 mM من PMSF، يترك المزيج تحت الرج مدة ساعتين، بعد ذلك تجرى له عملية طرد مركزي 6000 دورة/دقيقة لمدة 30 دقيقة، يرشح الجزء الطافي المتحصل عليه عبر قطن زجاجي ونضيف للمحلول المرشح كبريتات الأمونيوم (15 % حجم/حجم) تدريجياً والبيتانول البارد (15 % حجم/حجم). يرج المحلول لمدة ساعة، ثم يعرض لعملية طرد مركزي 10000 دورة/دقيقة لمدة 20 دقيقة، يضاف كبريتات الأمونيوم (20 % وزن/حجم) تدريجياً مع الرج لمدة ساعة ثم يرسب الإنزيم من

الجزء الطافي للمرشح عبر القطن الزجاجي، يعرض المحلول الإنزيمي المرشح للطررد المركزي (11000 دورة/دقيقة) مدة 30 دقيقة و يتم استرجاع الطبقة البنية الحاوية على الإنزيم ثم يتم إذابتها في المحلول المنظم الهيبارينى (Na_2HPO_4 / (25 mM) (NaH_2PO_4)، يحتوي 1mM من EDTA ذو pH 6,2 ، ويعرض المحلول الإنزيمي الناتج لعملية ميز ضد نفس المحلول المنظم لمدة ليلة كاملة. يتم التخلص من الشوائب غير الذائبة بالطررد المركزي (18000 دورة/دقيقة) لمدة ساعة ، ثم يرشح المحلول عبر غشاء بقطر $0,45 \mu\text{m}$ ، والناتج النهائي المتحصل عليه يدعى بالمستخلص الخام لإنزيم XOR.

يغسل عمود الهيبارين-أغاروز بالمحلول المنظم الهيبارينى يحتوي 1 M من NaCl (30 ml) بمعدل تدفق 10-15 مل/سا، ثم يحقن الإنزيم الخام في العمود بتدفق 10 مل/سا، ويتم التخلص من البروتينات ضعيفة الإرتباط بغسل العمود بالمحلول المنظم الهيبارينى يحتوي 0,02 M من NaCl، ويتم استرجاع الإنزيم بالمحلول المنظم الهيبارينى به 0,1 M من NaCl، بعدها يعرض الإنزيم المنقى لعملية ميز ضد المحلول المنظم Bicine (pH= 8,3 ; 50 mM) لمدة ليلة كاملة، ثم يحضن في -20°C إلى حين استعماله. جميع خطوات التجربة تمت في درجة حرارة 4°C .

1.4.2. دراسة درجة نقاوة BXOR

للتأكد من نقاوة BXOR المتحصل عليه من كروماتوغرافيا الشراهة يتم إجراء مسح طيفي مرئي - فوق بنفسجي للإنزيم من طول موجة 250 nm إلى 700، حيث نسبة البروتين إلى الفلافين Protein Flavin Ratio (PFR) لا (A280 / A450)، المساوية أو القريبة من 5 تمثل درجة عالية من نقاوة الإنزيم (Bray وآخرون، 1975).

2.4.2. الفصل الكهربائي على هلام الأكريلاميد المتعدد في وجود SDS

لمعرفة نقاوة الإنزيم المتحصل عليه، قمنا بعملية فصل كهربائي على هلام الأكريلاميد المتعدد في وجود SDS وفق طريقة Laemmli (1970). تم تحضير هلام الفصل (T = 10% ، C = 2,74%) في محلول Tris-HCl (M) (pH=6,8 ; 0,125) مضاف إليه SDS (0,1% وزن/حجم) و TEMED (0,042% حجم/حجم) وفوق

كبريتات الأمونيوم (0,1 % وزن/حجم). هلام التركيز محضر في محلول HCl Tris- (pH=6,8 ; 0,125 M) مضاف له SDS (0,1 % وزن/حجم) و TEMED (0,1 % حجم/حجم) وفوق كبريتات الأمونيوم (0,1 % وزن/حجم). تحضر العينات (تقريبا 1 مغ/مل) وبروتينات العيارية (تقريبا 1 مغ/مل) بالتسخين في 100 م° لمدة 5 دقائق بعد إذابتها في محلول العينة (حجم/حجم)، المكون من محلول HCl Tris- (pH=6,8 ; 6,25 mM) SDS، (2 % وزن/حجم)، غليسيرول (20 % حجم/حجم) وأزرق البروموفينول (0,005 % حجم/حجم). تعامل الشواهد (MW-SDS-200 Kit, Sigma) بنفس الطريقة. تتم الهجرة الكهربائية في محلول منظم Tris-HCl (25 mM) و غليسين (192 mM) حاوي على SDS (0,1 % وزن/حجم) تحت شدة تيار 10 mA حتى دخول العينات إلى هلام الفصل، ثم ترفع إلى (37-45 mA). تثبت وتلون العينات المفصولة لمدة ساعة على الأقل في محلول التلوين أزرق كوماسي (0,2 % وزن/حجم) مذاب في حمض الخل (10 % حجم/حجم) والمثانول أو الإيثانول (45 % حجم/حجم). أما إزالة الصبغة الزائدة فتكون بوضع الهلام في محلول الخل (10-5 % حجم/حجم) في وجود أو غياب الإيثانول (5 % حجم/حجم).

3.4.2. تقدير نشاطية الإنزيم

قدرت النشاطية الكلية للإنزيم عند طول موجة 295 nm بقياس تركيز تراكم إنتاج حمض اليوريك باستعمال معامل الإمتصاصية ($\epsilon = 9600 \text{ M}^{-1}\text{Cm}^{-1}$)، وفي وجود $100 \mu\text{M}$ من الكزانثين كمادة تفاعل و $500 \mu\text{M}$ من NAD^+ كمادة مستقبلية للإلكترونات مذابة في المحلول المنظم Bicine ذو pH 8,3. أما نشاطية النمط المؤكسد فتم تقديرها بنفس الطريقة لكن في غياب NAD^+ (Avis وآخرون، 1956).

حيث النشاطية الكلية للإنزيم = نشاطية النمط المؤكسد + نشاطية النمط المرجع

تم التعبير عن النشاطية الخاصة للإنزيم بعدد النانومولات من حمض اليوريك الناتجة في كل دقيقة لكل ملغرام من

الإنزيم ($\text{n mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)

5.2. النشاطية المضادة للأكسدة *in vitro* لمستخلصات *P. harmala* و *S. chamaecyparissus*

1.5.2. تثبيط نشاطية XO

تم دراسة التأثير التثبيطي لمستخلصات نبتتي الحرمل والجعدة على نشاطية النمط المؤكسد ل XO وذلك بقياس كمية حمض اليوريك الناتجة عن أكسدة 100 µM من الكزانثين وفي وجود 10µl من انزيم XOR عند طول موجة 295 nm (Bray، 1975) المذابة في المحلول المنظم (Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄) 50 mM ذو pH = 7,4 والذي يحتوي على 0,1 mM EDTA وفي وجود تراكيز متغيرة من مستخلصات نبات الحرمل ونبات الجعدة، تم استعمال Allopurinol كشاهد للمقارنة باعتباره المثبط المتخصص لم XO. تعتبر النشاطية في غياب (مستخلصات أو Allopurinol) هي النشاطية الكلية 100 % وقد تم حساب نسبة التثبيط باتباع القاعدة التالية:

$$\% \text{ Inhibition} = (A1 - A2) / A1 \times 100$$

A1: نشاطية XO في غياب المثبطات.

A2: نشاطية XO في وجود المثبطات.

2.5.2. التأثير الإزاحي لجذر O₂⁻ الناتج عن XO

يعمل جذر O₂⁻ الناتج عن XO على إرجاع Cyt-c⁺³ (الذي يملك امتصاصية عظمى عند طول موجة 550 nm) إلى Cyt- c²⁺، وعليه فوجود مركبات مزيجية لهذا الجذر يمكن أن تمنع إرجاع Cyt- c⁺³. يحتوي وسط التفاعل على 100 µM من الكزانثين و 25 µM من Cyt-c⁺³ و 10µl من انزيم XOR مع تراكيز متغيرة من مستخلصات كلا النبتتين المذابة في المحلول المنظم (Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄) ذو تركيز 50 mM و pH=7,4 ،

$$\% \text{ Inhibition} = Ac - As / Ac \times 100 \quad \text{وتم حساب نسبة تثبيط إرجاع Cyt C (I) كالاتي:}$$

Ac: إمتصاصية الشاهد

As: الإمتصاصية في وجود المستخلصات

تم التعبير عن النتائج بالتركيز المثبط ل 50 % من إرجاع Cyt c (IC₅₀)

3.5.2. إختبار إزاحة جذر DPPH

تم تقدير النشاطية المضادة لإزاحة الجذور الحرة باختبار إزاحة DPPH، حيث يتم إرجاع جذر DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ذو اللون البنفسجي الداكن بمركبات مزيجة للجذور الحرة، إلى 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazine معطيا اللون الأصفر (Cuendet وآخرون، 1997؛ Burits و Bucar، 2000)، ويقراً اللون عند طول موجة 517 نانومتر.

نأخذ 50 µl من مختلف التراكيز المحضرة للمستخلصات النباتية مع 1250 µl من المحلول الميثانولي لمركب DPPH ذو التركيز 0,004 % وبعد 30 دقيقة، تقرأ الإمتصاصية عند 517 nm. حيث يتم مقارنة النتائج المحصل عليها لكل مستخلص مع مركب BHT الذي استعمل كشاهد. تقاس نسبة إزاحة جذر DPPH للمستخلصات (% I) كالتالي:

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

AC: الإمتصاصية في غياب المثبط (الشاهد)

AE: الإمتصاصية في وجود المثبط (العينة)

يتم حساب التركيز المثبط ل 50 % من نشاطية جذر DPPH (IC₅₀) لكل مستخلص من منحنى نسب التثييط (% I) ضد تركيز المستخلصات.

4.5.2. إختبار إزاحة جذر ABTS

يعتمد اختبار ABTS على قياس قدرة المركبات المضادة للأكسدة على إزاحة جذر ABTS⁺⁺ (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (Re وآخرون، 1999). ينتج جذر ABTS⁺⁺ الكاتيوني بعد تفاعل كل من ABTS (7 mM) و potassium persulfate (2,45 mM) (K₂SO₅) في الماء

المقطر، يترك المزيج في الظلام و درجة حرارة الغرفة مدة 12 سا. بعدها يتم إذابة محلول $ABTS^+$ في الميثانول إلى غاية الوصول إلى إمتصاصية 0,70 عند 734 nm.

يبدأ التفاعل بمزج 1 ml من محلول $ABTS^+$ مع 50 µl من المستخلصات النباتية المحضرة وتقرأ الإمتصاصية بعد 30 دقيقة ضد الميثانول. يستعمل Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)

كشاهد للمقارنة، وتقاس نسبة التثبيط (% I) للمستخلصات كالتالي:

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

AC: الإمتصاصية في غياب المثبط (الشاهد)

AE: الإمتصاصية في وجود المثبط (العينة)

5.5.2. إختبار تبييض β -carotene/linoleic acid

يعتمد هذا الإختبار على قياس قدرة المستخلصات على تثبيط البيروكسيدات الناتجة من أكسدة حمض اللينولييك (Aslan، 2006؛ Barriere وآخرون، 2001). بداية يتم إذابة 0,5 mg من β -carotene في 1 ml من الكلوروفورم، ثم يضاف لها 25 µl من حمض اللينولييك و 200 mg من Tween 40. يتم تبخير الكلوروفورم عند 40 م° عبر جهاز التبخير. يضاف بعدها 100 ml من الماء المقطر المشبع بالأكسجين (يحقن بغاز الأكسجين لمدة ساعة قبل الاستعمال) مع تحريك الخليط بشدة. يؤخذ 2,5 ml من الخليط السابق ويوضع في أنابيب الإختبار، ويضاف له 350 µl من كل مستخلص محضر لكلا النباتين بتركيز 2 mg/ml ونستعمل BHT (2 mg/ml) كشاهد موجب والميثانول والماء كشاهدان سالبان. تقرأ الإمتصاصية عند 490 nm، خلال أزمنة متتالية 0 سا، 1 سا، 2 سا، 4 سا، 6 سا، 24 سا. ويتم حساب النشاطية المضادة للأكسدة للمستخلصات النباتية (AA %) بالمعادلة التالية:

$$\% AA = A_E / A_{BHT} \times 100$$

AE: إمتصاصية العينة.

ABHT: إمتصاصية BHT.

6.5.2. إختبار استخلاص المعادن

قدرت نشاطية استخلاص المعادن من طرف المستخلصات النباتية بقياس تثبيط تشكل معقد Fe(II)-Ferrozine حسب طريقة Decker و Welch (1990) المعدلة من طرف Le وآخرون (2007). يمزج 250 µl من المستخلصات النباتية مع 50 µl من محلول FeCl₂ (0,6 mM) و 450 µl ميثانول بعد 5 دقائق يضاف 50 µl من محلول Ferrozine (5 mM)، ترج الأنايب وبعد 10 دقائق من الحضان في الظلام تقرأ الإمتصاصية عند 562 nm ، يستعمل مركب EDTA (0-40 µg/ml) كشاهد للمقارنة وتحسب نسبة استخلاص أيونات الحديد

$$\% \text{ Chelation} = [1 - (A_C - A_E) \times 100] \quad \text{كما يلي:}$$

A_C: إمتصاصية الشاهد

A_E: الإمتصاصية في وجود المستخلصات

7.5.2. إختبار Ferric thiocyanate (FTC)

يعتمد هذا الإختبار على قياس كمية البيروكسيدات الناتجة في المرحلة الأولية لفوق أكسدة الليبيدات حسب طريقة (Chang وآخرون، 2002). يحضر محلول linoleic acid بإضافة كل من (155 µl) linoleic acid + tween 20 (158 µl) + المستخلصات (2 mg/ml) في 50 ml من المحلول المنظم (pH=7, 0,02M , 50 ml). يحضن المزيج عند درجة 40 م° في الظلام يتم تقدير مستويات فوق أكسدة الليبيدات بأخذ 0,1 ml من المحلول السابق ويضاف له الإيثانول 4,7ml (75 %) و 0,1 ml من NH₄CN₆ (30 %) ، مع إضافة 0,1 ml من FeCl₂ (0,02 M), (HCl % 3,5). بعد مزج الخليط، يحضن لمدة 3 دقائق وتقرأ الإمتصاصية عند 500 nm وذلك بعد كل 24 سا إلى غاية وصول قيمة إمتصاصية الشاهد إلى أقصاها. تعطى قيمة نسبة تثبيط فوق أكسدة حمض اللينولييك

$$\text{Inhibition \%} = (1 - \text{Abs}_S / \text{Abs}_C) \times 100 \quad \text{بالعلاقة التالية:}$$

Abs_S: إمتصاصية العينة

Abs_C: إمتصاصية الشاهد

8.5.2. إختبار TBA

تعتمد هذه التقنية على تقدير كمية MDA الناتجة في آخر مرحلة من مراحل فوق أكسدة الليبيدات حسب طريقة (Tunalier، 2007). تضاف 1ml من نفس الخليط السابق لتقنية FTC (محلول حمض اللينولييك مع الإيثانول و NH_4CN_6 و FeCl_2)، الذي تم حضنه 5 أيام مع 2 ml من TCA (Trichloroacetic acid) (20 % وزن/حجم) و 2 ml TBA. يوضع المزيج في حمام مائي (80 م°) مدة 10 دقائق، و بعد التبريد في الجليد نقوم بطرد مركزي عند 3000 دورة / دقيقة لمدة 20 دقيقة، وتقرأ امتصاصية الجزء الطافي عند 532 nm. كلما كانت الإمتصاصية عالية دلت على خفض القدرة التثيضية للمستخلص.

وتقاس نسبة التثييط باستعمال العلاقة التالية:

$$\text{Inhibition \%} = (1 - \text{Abs}_{\text{Ext}} / \text{Abs}_{\text{C+}}) \times 100$$

Abs_{Ext} : إمتصاصية العينة

$\text{Abs}_{\text{C+}}$: إمتصاصية الشاهد

9.5.2. النشاطية المضادة لتحلل كريات الدم الحمراء *in vitro* باستعمال AAPH

تم قياس النشاطية المضادة لتحلل الدم تبعا لطريقة (Girard وآخرون، 2006). قمنا بنزع الدم من وريد عين فئران في أنبوب يحتوي EDTA، يتم تعريضه للطرد المركزي (6000 دورة/دقيقة، 10 دقيقة) للتخلص من البلازما، بعدها تغسل كريات الدم الحمراء ثلاث مرات بواسطة محلول نظامي (10mM Tampon phosphate $\text{NaHPO}_4/\text{pH}7,4/125\text{mM NaCl}$). تم استعمال مركب AAPH (جزئيات AZO)، الذي ينتج عن تجزئته في وسط مائي وفي وجود الأوكسجين جذور البيروكسيل، من أجل تحفيز سلسلة أكسدة الجذور الحرة لكريات الدم الحمراء. يتم حضن 2% من المعلق الخلوي لكريات الدم الحمراء مع محلول Tampon phosphate (80µl) في صفائح Elisa مع إضافة (20 µl) من المستخلص الميثانولي للنبتي *S. chamaecyparissus* و *P. harmala* والمستخلص الخام للنبتين ومستخلص الكلوروفورم وإثيل الأسيتات للنبتين بتركيز 0,1 mg/ml، ثم تحضن

المستخلصات في وجود أو غياب (136 µl) من مركب AAPH (300 mM) في 37 °م لمدة 4 ساعات ونصف تقريبا ويتم ملاحظة الإنخفاض المتتالي لكريات الدم الحمراء بتتبع إنخفاض الإمتصاصية عند 620 nm. تحسب نسبة تحلل كريات الدم الحمراء بالعلاقة:

$$I\% = (Abs\ t_0 - Abs\ t_x) \times 100 / (Abs\ t_0 - Abs\ t_{finale})$$

Abs t₀: الإمتصاصية في الزمن t = 0 mn

Abs t_x: الإمتصاصية في الزمن t = x

Abs t_{finale}: الإمتصاصية في الزمن t = 270 mn

6.2. دراسة النشاطية المضادة للأوكسدة *in vivo* للمستخلص المثنائي لنبتي *P. harmala* و *S.*

chamaecyparissus

تم استعمال ذكور فئران *Swiss albinos*، التي يتراوح وزنها بين 20-30 غ ، حيث قسمت إلى 4 مجموعات تحتوي كل مجموعة من 7-9 فئران، تم حقنها يوميا لمدة 21 يوما بالمستخلص المثنائي في صفاق البطن كمايلي:

- المجموعة Sc قدمت لها 100 mg/kg من المستخلص المثنائي لنبته *S. chamaecyparissus*.

- المجموعة Ph قدمت لها 10 mg/kg من المستخلص المثنائي لنبته *P. harmala*.

- مجموعة Controle قدمت لها المحلول الملحي NaCl (0,9 %).

- مجموعة Vit c قدمت لها 50 mg/kg من Vit c.

تم نزع الدم من وريد عين الفئران ثم قتلت الفئران بعد نهاية مدة المعالجة، يؤخذ 100 µl من الدم للقيام باختبار تحلل الدم ويضاف له 2,4 ml من (NaCl 125mM ، NaPOH₄ 10mM ، pH7,4). أما كمية الدم المتبقية فيجرى لها طرد مركزي (1500 g مدة 5 دقائق في 4 م °)، لاسترجاع البلازما ويتم حفظها في 20- م ° إلى حين استعمالها بهدف قياس القدرة الإزاحية للبلازما لجذر DPPH وقدرتها الإرجاعية لأيون Fe³⁺. بعد تشريح الفئران يؤخذ الكبد ويغسل بواسطة المحلول الفيزيولوجي (NaCl, % 0,9)، بعدها يجفف بواسطة ورق

الترشيح. يضاف 4,5 ml من (KCl 1,15%, 4 C°) لـ 0,5 g من الوزن الكلي للكبد، و يتم طحن المحلول بواسطة Dounce mill ثم يمرر عبر جهاز sonicator، يعرض الناتج لعملية طرد مركزي 4000 دورة /دقيقة مدة 10 mn ليسترجع الجزء الطافي ويحفظ من أجل استعماله لتقدير مؤشرات الإجهاد التأكسدي MDA، GSH و Catalase وكذلك البروتين الكلي.

1.6.2. القدرة المضادة لتحلل كريات الدم الحمراء *in vivo*

تم قياس النشاطية المضادة لتحلل كريات الدم الحمراء حسب طريقة Takebayashi وآخرون (2010) مع بعض التعديلات (Manna وآخرون، 2002). باختصار نضع على صفائح ELISA: 80 µl من محلول الدم السابق المذاب في محلول Tampon phosphate (1/25)، يضاف له 136 µl من محلول tBH (166 µM)، ويتم قياس إمكانية تحلل كريات الدم الحمراء في 37 م° وذلك بتتبع تغير امتصاصية العينات عند 620 nm. ويعبر عن مقاومة كريات الدم الحمراء للهجوم الجذري بالزمن الضروري لتحلل 50 % من كريات الدم الحمراء (half-hemolysis Time; HT₅₀).

2.6.2. تقدير النشاطية المضادة للأكسدة الكلية للبلازما على جذر DPPH

يعتمد هذا الإختبار على قدرة البلازما على إزاحة جذر DPPH حسب طريقة Brand-Williams وآخرون (1995) مع بعض التعديلات. يضاف لـ 25 µl من البلازما 625 µl من محلول DPPH 0,004 %، و يحفظ المزيج في الظلام مدة 30 دقيقة بعدها نقوم بطرد مركزي وتقرأ الإمتصاصية للجزء الطافي عند 517 nm. يتم حساب النشاطية المضادة للأكسدة للبلازما بالعلاقة التالية:

$$\% \text{ scavenging activity} = [(Abs_C - Abs_{ech}) / Abs_C] \times 100$$

Abs_C: امتصاصية الشاهد

Abs_{ech}: امتصاصية العينة (البلازما)

3.6.2. إختبار القدرة الإرجاعية للبلازما

تم تقدير النشاطية المضادة للأكسدة للبلازما بقياس قدرتها على إرجاع Fe^{3+} إلى Fe^{2+} حسب (Chung وآخرون، 2005). نمنج 0,1 ml من البلازما مع 0,1 ml من المحلول المنظم $NaHPO_4$ (0,2M / pH6,6) و 0,1 ml من محلول potassium fericyanide ($K_3Fe(CN)_6$) (1 %) . يحضن المزيج في 50 م[°] مدة 20 دقيقة، يضاف له بعدها 0,25 ml من trichloroacetic acid (TCA: 1 %) . يمرر المزيج على جهاز الطرد المركزي (3000 دورة/دقيقة مدة 10 دقائق)، ثم يسترجع مقدار 0,25 ml من الجزء الطافي ويمزج مع 0,25 ml ماء مقطر و 0,5 ml $FeCl_3$ ثم تقرأ الإمتصاصية عند 700 nm ، زيادة الإمتصاصية تعكس زيادة القدرة الإرجاعية.

4.6.2. تقدير المؤشرات التأكسدية غير الإنزيمية في نسيج الكبد

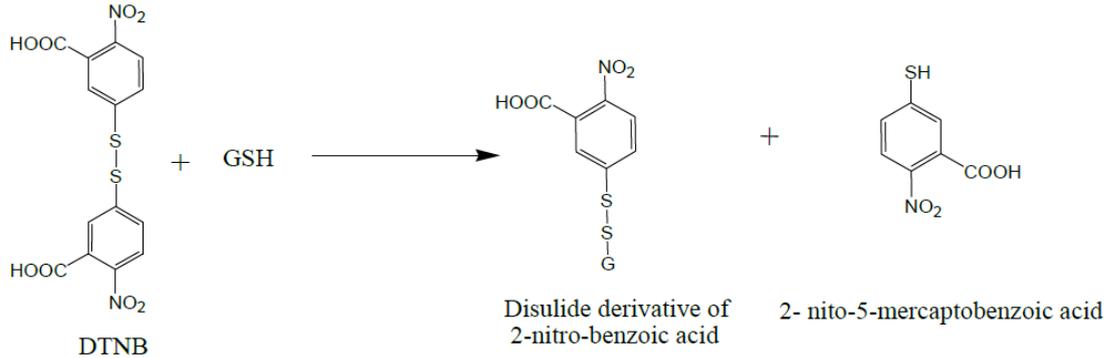
1.4.6.2. تقدير كمية MDA

يمكن قياس فوق أكسدة الليبيدات المتشكلة على مستوى الكبد بتقدير كمية MDA الناتجة، وذلك حسب طريقة (Ohkawa وآخرون، 1979). يعتبر MDA أحد المركبات النهائية المتشكلة من فوق أكسدة الليبيدات في وجود الجذور الحرة. يعتمد هذا الإختبار على الإرتباط بين جزيئة MDA مع جزيئي TBA لتشكيل معقد وردي اللون يمتص عند 530 nm.

باختصار نأخذ 0,25 ml من العينة المراد اختبارها (homogenat) يضاف له 0,25 ml من محلول (20 % TCA) و 0,5 ml من محلول (0,67 % TBA). يخلط المزيج ويسخن في درجة 100 م[°] مدة 15 دقيقة، يتم تبريد المزيج ثم يضاف له 2 ml من *n*-butanol بعد القيام بعملية طرد مركزي (3000 دورة/دقيقة، مدة 15 دقيقة) يتم استرجاع الجزء الطافي وتقرأ كثافته الضوئية عند 532 nm. يعبر عن كمية MDA في العينة بـ nmol/gramme tissus من نسيج الكبد.

2.4.6.2. تقدير كمية GSH الكبدية

لقياس كمية GSH قمنا باستخدام كاشف ألان (DTNB) [2-nitrobenzoic acid]-dithio-bis-5,5' وذلك حسب طريقة Ellman (1959). يعتمد أساس التفاعل على إرجاع DTNB بواسطة مجموعات الثيول (SH) للجليتاينون فيتشكل حمض 2-nitro-5-mercaptobenzoic acid كما هو موضح في التفاعل التالي:



يتميز حمض Nitromercaptobenzoic بلون شديد الصفرة يمتص عند 412 nm. يضاف لـ 0,5 ml من محلول 10 % TCA مقدار 0,5 ml من العينة المراد اختبارها (homogenat) ونقوم برجها رجا خفيفا على فترات متقطعة لمدة 10 - 15 د بعدها يعرض المزيج إلى عملية طرد مركزي (2000 دورة/5 دقائق). نأخذ 0,2 ml من الجزء الطافي ونضيف إليها 1,7 ml من المحلول المنظم phosphate buffer (pH8) مع إضافة 100 µl من كاشف ألان، ثم تقرأ الإمتصاصية بعد 5 دقائق عند طول موجة 412 nm. يعبر عن تراكيز GSH في العينة بـ µmol/g tissus ويتم الحصول عليها إنطلاقا من منحني العيارية لمركب GSH في نفس الشروط السابقة.

5.6.2 . تقدير المؤشرات الإنزيمية على مستوى نسيج الكبد

1. 5.6.2 . تقدير نشاط Catalase

يعتمد تقدير نشاط CAT على انخفاض الإمتصاص الضوئي عند طول موجة 240 nm وهذا يعود إلى تحلل H₂O₂ بفعل CAT (Clairborne, 1985).

باختصار، نأخذ 50 µl من العينة المراد اختبارها (homogenat) وتمزج مع محلول H₂O₂ (19 mM) المحضّر في محلول نظامي NaHPO₄ pH 7.4 (0.1 M). نقيس تغيّر الإمتصاصية لمدة 120 ثانية (دقيقتين) ، يعبر عن نشاط

CAT حسب العلاقة التالية:

$$K = 2.303 / T * \log A1 / A2$$

حيث أن:

K: سرعة التفاعل

T: الفرق الزمني بالدقائق

A1: الإمتصاصية في الزمن t₀

A2: الإمتصاصية في الزمن t₁

تُحسب النشاطية الإنزيمية النوعية لـ CAT بـ K/n و تعطى بالوحدة U/mg protein أو µmol H₂O₂ / mg protein / min حيث n يمثل كمية البروتين بـ mg المتواجدة في الحجم المستعمل.

2. 5.6.2. تقدير البروتين الكلي

تعطي البروتينات معقداً بنفسيها مزرقاً مع أملاح النحاس في وسط قاعدي. تكون شدة اللون المتشكل متناسبة مع تركيز البروتين الكلي في العينة والذي يمكن قياسه بواسطة المطياف الضوئي على 540 nm (Biuret) وآخرون، (1999). قمنا بقياس البروتين الكلي باستعمال Kit total protein Biuret (2×250 ml, Ref:1001290)، وذلك بمزج 1ml من كواشف بيوريت مع 25 µl من العينة، ثم تترك لمدة 5 دقائق في حمام مائي 37 °م. عندها تقاس الكثافة الضوئية عند طول موجة 540 nm ، تقدر كمية البروتين في العينة بـ mg/dl.

التحليل الإحصائية المستعملة

تم التعبير عن القيم بالمتوسط الحسابي \pm الانحراف المعياري (SD) $\text{mean} \pm$ ، أو بالمتوسط الحسابي \pm الانحراف المعياري المتوسط (SEM) $\text{mean} \pm$.

حللت النتائج إحصائيا باستعمال logiciel « Graphpad Prism » عن طريق إختبار ANOVA (one-way ANOVA) متبوع باختبار Tukey بالنسبة للمقارنات بين مختلف المستخلصات والشواهد و بين المستخلصات فيما بينها، حيث اعتبر الفرق إحصائيا ذو معنى عند الدلالة 5% أي أن معامل التحديد $(P < 0.05)$.

النتائج والمناقشة

1. إستخلاص عديدات الفينول والفلافونيدات

تم تحضير مختلف المستخلصات المكونة لنبتي الحرمل والجعدة حسب طريقة Markham (1982)، والتي تعتمد على استعمال سلسلة من المحاليل متزايدة القطبية. تعتمد طريقة الفصل على ذوبانية المركبات الفينولية في هذه المحاليل، حيث يعرض مسحوق النبتتين المجفف إلى الإستخلاص بواسطة خليط من محلول ميثانول/ماء (85 %) للحصول ابتداء على المستخلص الخام. هذا الأخير يتم تعريضه لسلسلة من الإستخلاصات بمحاليل متزايدة القطبية (الهكسان، الكلوروفورم ثم إيثيل الأسيتات). يسمح هذا الإستخلاص بالحصول على خمسة مستخلصات: المستخلص الخام (CrE)، مستخلص الهكسان (HxE)، مستخلص الكلوروفورم (CHE)، مستخلص إيثيل الأسيتات (EAE) و المستخلص المائي (AqE).

تم تقدير مردودية مستخلصات نبتتي الحرمل والجعدة إنطلاقاً من 100 غ من الوزن الجاف لكلا النبتتين، وقد ظهرت أعلى مردودية في نبات الحرمل مع EAE، في حين قدرت أعلى مردودية في CrE بالنسبة لنبات الجعدة (جدول 2، 3).

إن المردود الناتج من عملية الإستخلاص يختلف حسب النوع النباتي و الجزء المستعمل في الإستخلاص و شروط التجفيف و محتوى كل نوع من المستقبلات ونوع و قطبية المذيب المستعمل في الإستخلاص .

تعتبر المركبات الفينولية كالأحماض الفينولية و الفلافونيدات و الدباغ من أهم المركبات المسؤولة على النشاطية المضادة للأوكسدة في النباتات (Li وآخرون، 2007). كما تملك هذه المركبات العديد من النشاطيات البيولوجية، منها مضادة للإلتهاب و مضادة للبكتيريا و مضادة للفيروسات و مضادة للحساسية و مضادة للتخثر الدموي و موسعة للأوعية. كل هذه النشاطيات تعود أساساً إلى النشاطية المضادة للأوكسدة (Gulcin وآخرون، 2010).

لهذا تم تقدير عديدات الفينول الكلية و الفلافونيدات لكل من بذور نبات الحرمل و الجزء الهوائي لنبته الجعدة.

2. تقدير عديدات الفينول الكلية والفلافونيدات

تم تقدير عديدات الفينول الكلية والفلافونيدات للمستخلصات الثلاثة (EAE، CHE، CrE) لبذور نبات الحرمل والجزء الهوائي لنبته الجعدة بطريقة Folin-ciocalteau (Li وآخرون، 2007) وطريقة $AlCl_3$ (Bahorum وآخرون، 1996) على الترتيب.

إنطلاقاً من النتائج المسجلة في الجدول (3،2)، يتضح أن محتوى عديدات الفينول لمستخلصات نبات الحرمل يتراوح بين (137.98 ± 6.9) و (183.95 ± 1.66) (mg حمض الغاليك المكافئ / g من المستخلص). حيث ظهرت أعلى كمية لعديدات الفينول في CrE-Ph، في حين تراوحت كمية عديدات الفينول في مستخلصات نبتة الجعدة بين 143.08 ± 0.47 و 373.83 ± 0.23 mg حمض الغاليك المكافئ / g من المستخلص. وقد ظهرت أعلى كمية لعديدات الفينول في نبات الجعدة على مستوى EAE يليه CrE ثم CHE.

أظهرت النتائج حول تقدير الفلافونيدات باستعمال تقنية $AlCl_3$ حسب Bahorum وآخرون (1996)، أن محتوى الفلافونيدات في مستخلصات كلي النباتين يتراوح بين 7.39 ± 0.68 و 61.51 ± 7.86 مغ quercetin مكافئ/غ من لمستخلصات بذور نبات الحرمل والجزء الهوائي لنبته الجعدة على التوالي. فقد ظهرت أعلى كمية من الفلافونيدات في CHE-Ph، يليه EAE-Ph ثم CrE-Ph وظهرت كمية عالية من الفلافونيدات في EAE-Sc يليه CrE-Sc ثم CHE-Sc.

الجدول 2. مردود مستخلصات بذور نبات الحرمل *P. harmala* 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	1.65 ± 0.27	183.95 ± 1.66	7.39 ± 0.68	21.38 ± 2.01
الكلوروفورم	2.19 ± 0.16	137.98 ± 6.97	13.88 ± 0.13	40.08 ± 0.39
إثيل الأسيتات	2.41 ± 0.31	153.12 ± 1.66	12.1 ± 0.08	35.09 ± 0.24

الجدول 3. مردود مستخلصات الجزء الهوائي لنبته الجعدة *S. chamaecyparissus* 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	9.71 ± 0.20	196.08 ± 0.35	16.94 ± 1.96	31.93 ± 1.23
الكلوروفورم	1.487 ± 0.22	143.08 ± 0.47	8.71 ± 0.98	16.46 ± 0.64
إثيل الأسيتات	1.352 ± 0.34	373.83 ± 0.23	61.51 ± 7.86	115.12 ± 4.5

يتضح من خلال النتائج المتحصل عليها أن مستخلصات نبات الجعدة غنية بالمركبات الفينولية والفلافونويدات مقارنة بمستخلصات نبات الحرمل. فقد أظهرت دراسات سابقة أن كمية عديدات الفينول في عائلة Asteracea

تكون أعلى مقارنة مع باقي العائلات (Kaur و Kapoor، 2002).

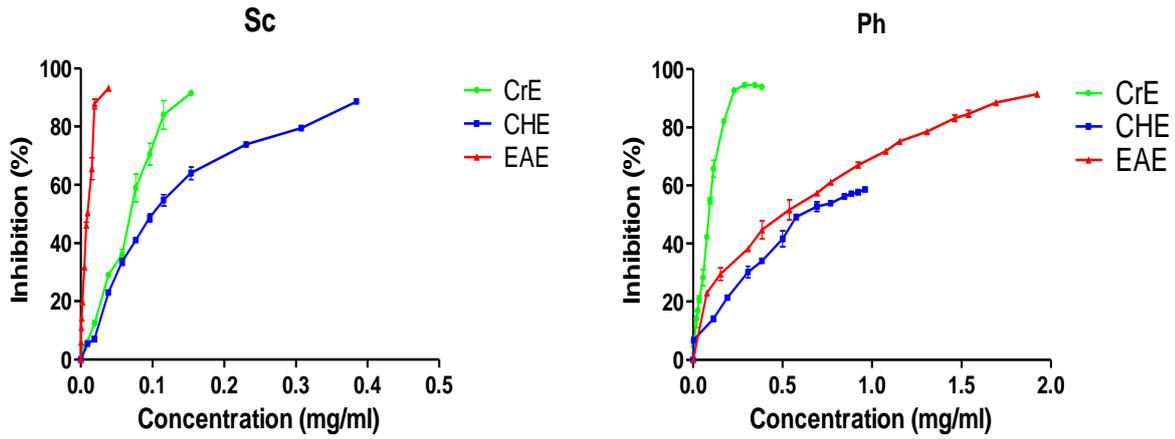
3. النشاطية المضادة للأكسدة *in vitro* لمستخلصات نبات الحرمل والجعدة

1.3. التأثير المزيج للجذور الحرة

تعود النشاطية المضادة للأكسدة للمركبات الفينولية إلى نشاطيتها الأكسدة-الإرجاعية حيث تعمل كعوامل مرجعة أو مانحة للهيدروجين أو مزيحة ل O_2^1 ، كما لها القدرة على استخلاص المعادن (Rice Evans وآخرون، 1995).
تم تقدير النشاطية المضادة للأكسدة *in vitro* لمختلف المستخلصات باستعمال العديد من الإختبارات، وتتمثل في اختبار إزاحة DPPH و ABTS و تبييض β -carotene و FTC و استخلاص المعادن و تثبيط XOR وإزاحة $O_2^{\cdot-}$. حيث تمت دراسة القدرة المضادة للأكسدة التي تعتمد على انتقال الإلكترونات باستعمال اختباري (DPPH و ABTS) وانتقال الهيدروجين عبر اختباري (FTC و B-carotene) (Li وآخرون، 2009) أما اختبار Ferrozine فاستعمل لتقدير خاصية إستخلاص المستخلصات لأيونات الحديد الثائي، بالإضافة إلى اختبار تثبيط إنزيم XOR وإزاحة جذر $O_2^{\cdot-}$ الناتج عنه.

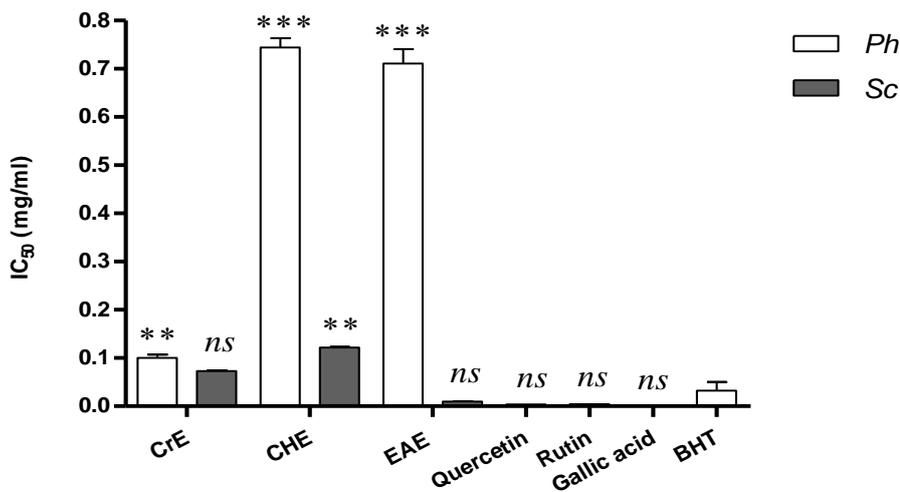
1.1.3. إختبار إزاحة جذر DPPH

قدرة نشاطية المستخلصات على إزاحة جذر DPPH عبر إرجاع هذا الجذر ذو اللون البنفسجي إلى الأصفر، وقيست الإمتصاصية عند 517nm. يتضح من خلال النتائج المحصل عليها أن قدرة المستخلصات المدروسة على إزاحة جذر DPPH تتناسب طرديا مع الزيادة في التركيز (شكل 16).



الشكل 16. التأثير الإزاحي لمستخلصات *S. chamaecyparissus* (Sc) و *P. harmala* (Ph) على جذر DPPH.

يوضح الشكل 17 تراكيز مختلف المستخلصات والشواهد المستعملة التي تزيح 50% من جذر DPPH (IC_{50}) (mg/ml). أظهرت النتائج أن لـ EAE-Sc أعلى تأثير إزاحي على جذر DPPH (0.01 ± 0.0001 mg/ml) يفوق التأثير الإزاحي لـ BHT بـ 2.8 مرة. في حين أبدت المستخلصات CHE-Ph و EAE-Sc تأثيراً أقل (0.744 ± 0.019 و 0.711 ± 0.029 ، على التوالي). أما الشواهد quercetin، rutin و gallic acid، أبدت تأثيراً إزاحياً أعلى من BHT على الترتيب الموالي (rutin < quercetin < gallic acid).



الشكل 17. تركيز مستخلصات كل من *S. chamaecyparissus* و *P. harmala* المزيحة لـ 50% من جذر DPPH. (***) : $p \leq 0.001$, (**): $p \leq 0.01$, ns: $p > 0.05$.

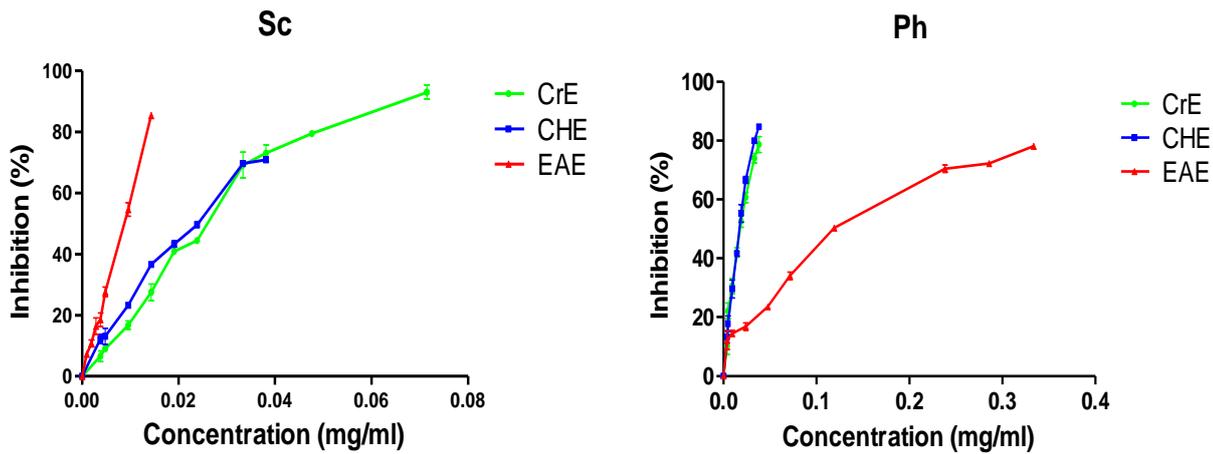
يتضح من خلال النتائج المتحصل عليها وجود علاقة طردية بين محتوى المركبات الفينولية لمستخلصات نبات الحرمل والجعدة والتأثير الإزاحي لها على جذر DPPH، ما يتوافق مع ما توصل إليه العديد من الباحثين (Agbor وآخرون، 2007؛ Ozsoy وآخرون، 2008؛ Hossain و Shah، 2011).

تتعلق آلية التفاعل بين المركبات المضادة للأكسدة وجذر DPPH ببنيتها الكيميائية (Tsimogiannis و Oreopoulou، 2006؛ Kouri وآخرون، 2007). بالإضافة إلى أن قدرة هذه المركبات على إزاحة جذور DPPH ترتبط بعدد المجاميع الهيدروكسيلية التي تحتوي عليها (Boudet وآخرون، 1997). فعلى سبيل المثال، بين Williams وآخرون (2004) أن وجود المجموعة 3,4-dihydroxylated في الحلقة B والرابطة المزدوجة بين 2-3 مع وجود الوظيفة 4-oxo في الحلقة C ووجود مجاميع OH إضافية على كربون C₃ و C₅ يرفع من النشاطية المزيحة للجذور الحرة مثل quercetin و myricetin و fisetin.

2.1.3. إختبار ABTS

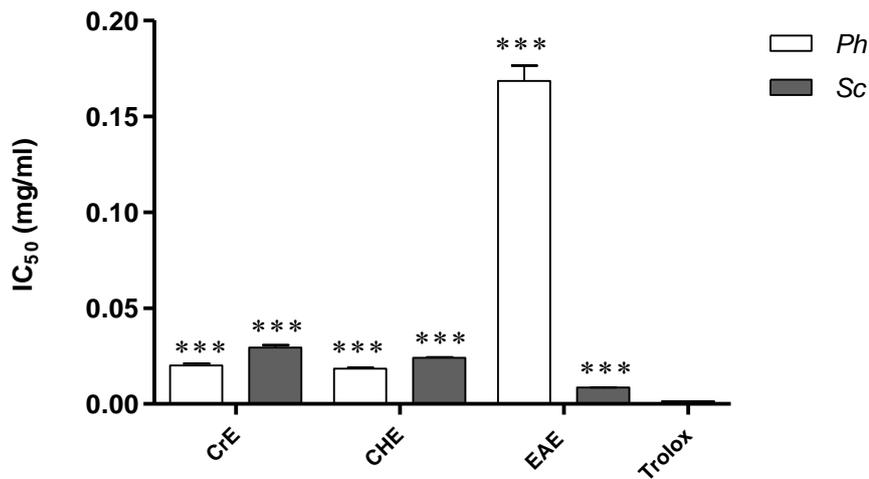
يعتبر جذر ABTS فعالا اتجاه معظم المركبات المضادة للأكسدة، كما أنه يذوب في كل من المذيبات العضوية والمائية، لذلك يمكن استعماله لتقدير نشاطية كل من مضادات الأكسدة التي تذوب في الماء والدهون في أطوار مختلفة (çelik وآخرون، 2010).

بينت النتائج أن لمستخلصات النبتتين قدرة إزاحة معتبرة لجذر ABTS تزداد بزيادة التركيز (شكل 18).



الشكل 18. التأثير الإزاحي لمستخلصات *S. chamaecyparissus* و *P. harmala* على جذر ABTS.

بينت مقارنة قيم IC_{50} (mg/ml) لمستخلصات نبات الجعدة أن EAE-Sc يملك أعلى تأثير إزاحي على جذر ABTS مقارنة بقيم IC_{50} (mg/ml) (شكل 19)، وهو أقل من تأثير Trolox بحوالي 6 مرات. تتوافق هذه النتائج مع نتائج التأثير الإزاحي لجذر DPPH، أين ظهر أعلى تأثير إزاحي على مستوى EAE-Sc، كما أنها تتوافق مع ما توصل إليه العديد من الباحثين حول القدرة العالية لمستخلص إيثيل الأسيتات لنباتات مختلفة الغنية بالفلافونيدات السكرية على إزاحة الجذور الحرة سواء عبر اختبار إزاحة DPPH أو ABTS (Fan وآخرون، 2010؛ Sudha وآخرون، 2011؛ Coqueiro وآخرون، 2013).



الشكل 19. تركيز مستخلصات كل من *S. chamaecyparissus* و *P. harmala* المزيجة لـ 50% من جذر ABTS (***: $p \leq 0.001$, ns: $p > 0.05$).

كما أن التأثير الإزاحي العالي لـ EAE-Sc قد يعود لاحتوائها على أكبر كمية من عديدات الفينول وبالخصوص الفلافونيدات. في حين أبدت مستخلصات نبات الحرمل إختلافا بين قيم التأثير الإزاحي سواء باستعمال اختبار DPPH أو ABTS، حيث أعطى CHE-Ph أعلى تأثير إزاحي لجذر ABTS يليه CrE-Ph وبنسبة أقل EAE-Ph، وهذا لا يتناسب مع كمية عديدات الفينول المتواجدة بها. قد يرجع هذا إلى نوع المركبات الفينولية المتواجدة في مستخلصات نبات الحرمل أو لتدخل مركبات طبيعية نشطة أخرى.

تصنع النباتات المركبات الفلافونيدية من أجل الوقاية من الإصابة بالجذور الحرة. يحمل هذا القسم بنية فينولية تملك العديد من الروابط المزدوجة والمجاميع الهيدروكسيلية التي لها القدرة على منح إلكترونات مما يؤدي إلى استقرار الجذور الحرة (Pietta، 2000).

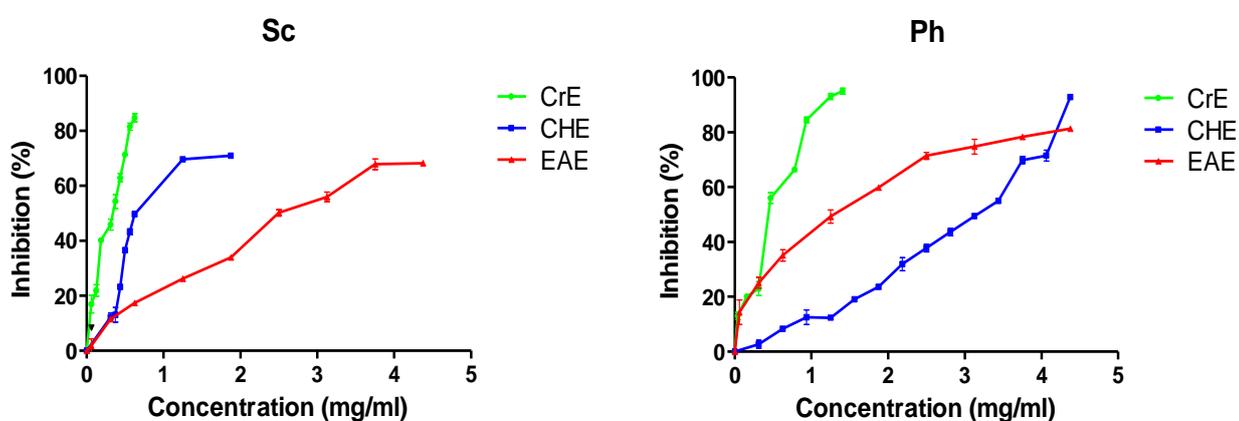
تؤدي القدرة الإزاحية للفلافونيدات إلى الحماية من الإجهاد التأكسدي، والتخفيض من خطر الإصابة بأمراض القلب، وتقي من السرطان، كما تخفض من ظهور الشيخوخة المسؤولة عن ظهور الأمراض الانحلالية (Hollman و Katan، 1997؛ Harvsteen، 2002).

2.3. إختبار إستخلاص المعادن

تعتبر أيونات Fe^{2+} من مولدات الأكسدة الأكثر قوة، وهذا راجع لنشاطيتها العالية (Gulcin وآخرون، 2010). فهي تحفز تفكك الهيدروبيروكسيدات إلى جذور Alkoxy و Peroxy، مما يوسع فوق أكسدة الليبيدات (Pincemail وآخرون، 1999). كما بإمكانها أن تساهم في تفاعلات Fenton المنتجة لجذر OH^{\bullet} . لذلك فالمركبات الفعالة المزيحة لأيونات الحديد بإمكانها أن تؤمن الحماية من الأضرار التأكسدية وذلك عبر استخلاصها لهذه الأيونات (Gulcin وآخرون، 2010).

تم تقدير قدرة مستخلصات نباتي الحرمل والجعدة على استخلاص المعادن باستعمال اختبار إستخلاص أيونات Fe^{2+} ، حيث يشكل Ferrozine معقداً مع أيونات Fe^{2+} الحرة، يرافقه إنخفاضاً في إمتصاصية المعقد (Fe^{2+} -Ferozine) عند 562 nm. يعمل المركب المضاد للأوكسدة على منع تشكل هذا المعقد.

أظهرت النتائج أن جميع مستخلصات نباتي الحرمل والجعدة والشاهد (EDTA) تزداد قدرتها على تثبيط تشكل المركب (Fe^{2+} -Ferozine) مع الزيادة في التركيز (شكل 20).



الشكل 20 . نسبة تثبيط مركب Fe^{+2} -Ferozine بواسطة مستخلصات *S. P. harmala* و *.chamaecyparissus*

قدرت قيمة IC_{50} (µg/ml) لمركب EDTA بـ (5.8 ± 0.0831) هذا ما يعكس قدرته الإستخلاصية العالية، هذه

القيمة قريبة جداً لقيمة IC_{50} التي توصل إليها Le وآخرون (2007) والتي كانت مساوية لـ $5.6 \mu\text{g/ml}$.

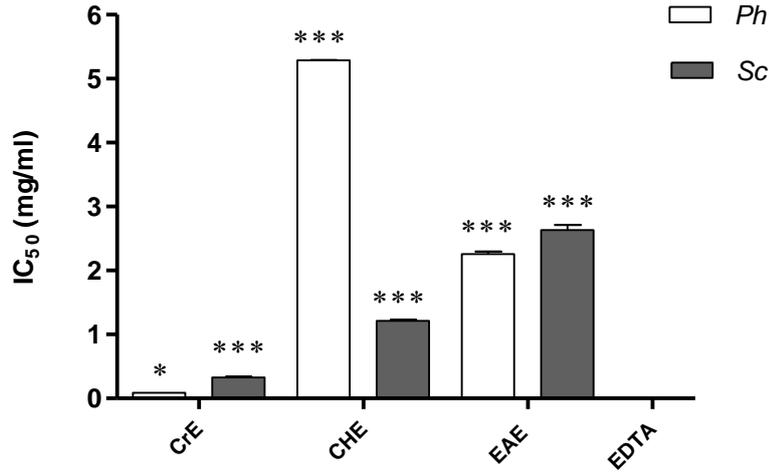
من خلال قيم IC_{50} (mg/ml) لمستخلصات نبات الحرمل والجعدة تبين أن CrE-PH أعطى أعلى تأثيراً

استخلاصياً (0.088 ± 0.0008) مقارنة مع باقي المستخلصات وبقية أقل من مركب EDTA بحوالي 15 مرة،

يليه CrE-Sc و CHE-Sc، والتي أعطت قيم نشاطية أقل من مركب EDTA بـ 56 و 209.31 مرة على التوالي،

في حين أظهرت EAE-Ph و EAE-Sc تأثيراً متقارباً (2.256 ± 0.039) و (2.631 ± 0.081) على الترتيب،

وسجلت أقل نشاطية في CHE-Ph (شكل 21).



الشكل 21. تركيز مستخلصات *P.harmala* و *S. chamaecyparissus* على إستخلاص 50% من المعادن في وجود EDTA كمشاهد ($p \leq 0.001$: ***).

من خلال النتائج المتحصل عليها يظهر أن التأثير الإستخلاصي لمستخلصات نبات الحرمل يتناسب مع المحتوى الفينولي للنبته، لذلك قد يعود هذا التأثير الإستخلاصي إلى المركبات الفينولية المتواجدة بهذه المستخلصات. في حين لم يظهر هذا التناسب في مستخلصات نبات الجعدة، مما يعتقد تدخل نوع المركبات الفينولية في هذه الظاهرة أو تدخل مركبات طبيعية أخرى بخلاف المركبات الفينولية في استخلاص أيونات الحديد الثنائي.

تعتبر المركبات الفينولية المركبات المسؤولة عن استخلاص الأيونات المعدنية (Shyu وآخرون، 2009، Amessis- Ouchemoukh، وآخرون، 2014). في حين أجريت دراسة سابقة من طرف Zhao وآخرون (2008)، لوحظ عدم تناسب بين القدرة الإستخلاصية والمحتوى الفينولي، هذا ما تؤكدته نتائج مستخلصات نبتة الجعدة.

هذه النتائج تشير إلى أن المركبات الفينولية ليست هي بالضرورة المركبات الإستخلاصية المتواجدة في المستخلصات النباتية، وإنما تتدخل العديد من الأحماض العضوية مثل (ascorbic acid، citric acid، phosphoric acid)، و بعض الأحماض الأمينية، البيبتيدات والبروتينات مثل transferrin و ovotransferrin في إستخلاص الأيونات المعدنية (Cornago وآخرون، 2011).

فالقدرية الإزاحية لمركب فينولي تتطلب وجود عدد معين من المجاميع الوظيفية المتوضعة بشكل محدد (VanAcker وآخرون، 1996). إذن فالعينات الغنية بالمركبات الفينولية ليس بإمكانها استخلاص المعادن الناقلة إذا لم تكن تحتوي على المجاميع الوظيفية الضرورية للنشاطية الإستخلاصية. فمثلا مجاميع Catéchol ترتبط بقوة مع الحديد على عكس مجاميع phénol. كذلك اتحاد مركب فينولي مع جزء سكري ينقص من الفعالية الإستخلاصية (Wong وآخرون، 2006). يظهر من خلال النتائج المتحصل عليها أن المستخلص الخام لكلا النباتين يملك قدرة استخلاصية أعلى من باقي المستخلصات، هذا ما يظهر القدرة العالية للمركبات القطبية على استخلاص المعادن مقارنة بالمركبات غير القطبية. وقد بينت دراسة Sahreen وآخرون (2010)، أن المستخلصات النباتية تملك تأثيرات استخلاصية تتناسب طرذا مع قطبيتها في المذيبات العضوية. فعلى سبيل المثال مركبات mucilage عبارة عن عديدات سكرية تذوب في الماء ولا تذوب في الكحول تتميز بخصائص إستخلاصية عالية (Watanabe، 2008).

كما أن المجاميع القطبية التي تملك نواة محبة للماء تزيد من خاصية إستخلاص المعادن (Ozen وآخرون، 2011).

3.3 . إختبار تثبيط فوق أكسدة الليبيدات

تسبب فوق أكسدة الليبيدات العديد من الأمراض كأمراض القلب والأوعية والشيوخوخة والسرطان (Ramarathnam وآخرون، 1995). لذلك فمن الضروري البحث عن مثبطات لفوق أكسدة الليبيدات خاصة منها المتواجدة في المواد الغذائية (Bougatef وآخرون، 2009).

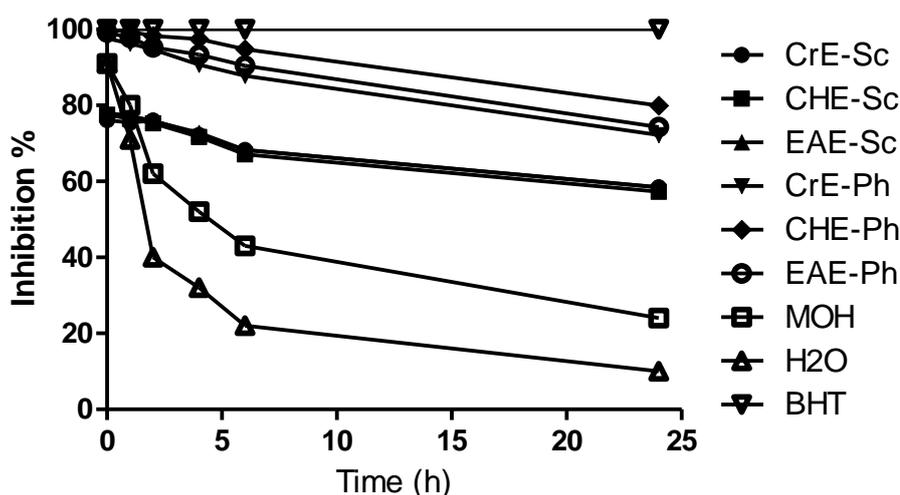
تتميز ظاهرة فوق أكسدة الليبيدات بتحول الأحماض الدهنية إلى ليبيدات بيروكسيدية في وجود الأيونات المعدنية وتتنجزأ إلى مجموعة من المركبات كالألدهيدات و الهيدروكربونات مثل MDA (malonedialdéhyde) و HNE (4-hydroxynonéнал)، والتي تستعمل ككواشف لعملية فوق أكسدة الليبيدات عند المرضى (Pincemail

وآخرون، 1999). لذلك ارتأينا في هذه الدراسة إلى إجراء اختبارين لفوق أكسدة الليبيدات، اختبار تبيض β -caroténe واختبار فوق أكسدة حمض اللينولييك FTC لقياس النشاطية التثيضية لفوق أكسدة الليبيدات.

1.3.3. إختبار تبيض β -caroténe

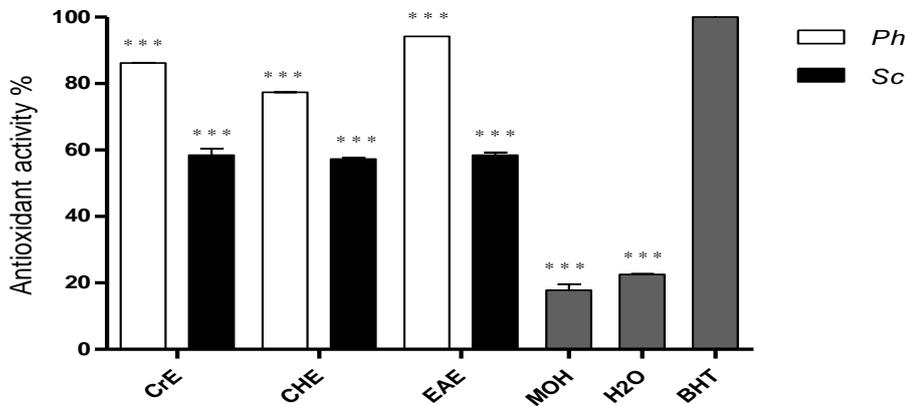
إن ابيضاض جزئيات β -caroténe عبارة عن آلية تعتمد على إزاحة الجذور الحرة من جهة وتثييط فوق أكسدة الليبيدات الناتجة عن أكسدة حمض اللينولييك من جهة أخرى.

يعتمد اختبار تبيض β -caroténe على أكسدة حمض اللينولييك مما ينتج عنه تشكل جذور حرة ذات طبيعة هيدروبيروكسيدية تعمل على مهاجمة جزئيات β -caroténe، يعمل مضاد الأكسدة على تعديل الجذور الحرة المشتقة من حمض اللينولييك وبذلك يحمي من أكسدة وايبيضاض مركب β -carotene، وقد تم تتبع حركية إبيضاض مركبات β -caroténe في وجود وغياب المستخلصات خلال 24 ساعة واستعمال BHT كشاهد (الشكل 22).



الشكل 22 . النشاطية المضادة للأكسدة β -caroténe / linoleic acid لمستخلصات *S. chamaecyparissus* و الشواهد (BHT و الميثانول و الماء) خلال 24 ساعة.

تظهر النتائج أن مستخلصات نبات الحرمل تثبط أكسدة جزيئات β -carotène بصورة جد معتبرة $p < 0.001$. فقد قدرت أعلى نشاطية مضادة للأكسدة عند 24 ساعة ل EAE-Ph ب 94.21 ± 0.003 % والتي كانت مقاربة لنشاطية مركب BHT 99.66 ± 0.55 % متبوعة ب CrE-Ph والذي يملك بدوره نشاطية مضادة للأكسدة عالية والتي قدرت ب 86.24 ± 0.027 %، في حين أظهر CHE-Ph أقل نشاطية بنسبة 77.35 ± 0.032 % (شكل 23).



الشكل 23 . النشاطية المضادة للأكسدة β -carotène للمستخلصات والشواهد (BHT و الميثانول و الماء) بعد مرور 24 ساعة في إختبار β -carotene /حمض اللينولييك. (***: $p \leq 0.001$, **: $p \leq 0.01$, ns: $p > 0.05$).

أظهرت مستخلصات نبتة الجعدة نسبة تثبيطية منخفضة مقارنة بمستخلصات نبات الحرمل. فقد أظهر CrE-Sc و EAE-Sc و CHE-Sc نسب تثبيطية قريبة جدا من بعضها البعض بحوالي 58 %.

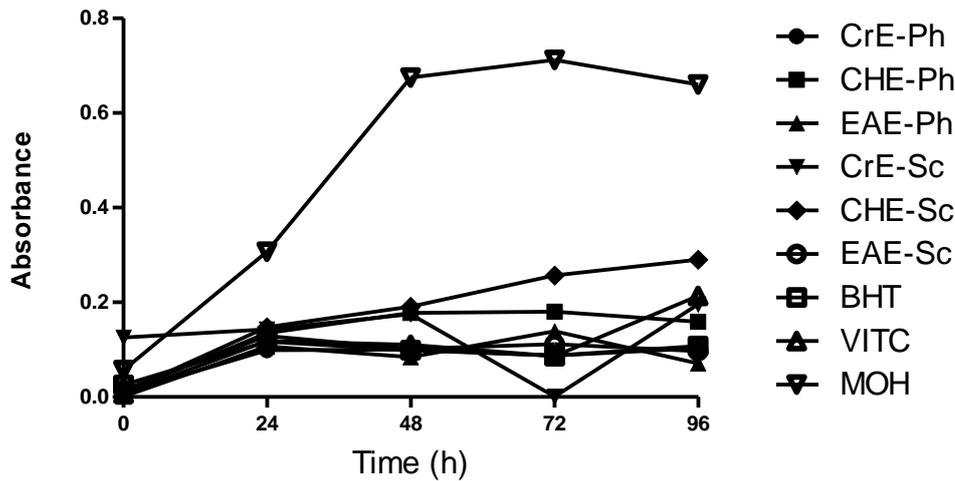
يعتقد أن النشاطية المضادة للأكسدة للمركبات المتواجدة بالمستخلصات تؤخر من معدل إبيضاض جزيئات β -carotène عن طريق إزاحة الجذور الحرة و/أو تثبيط أكسدة الليبيدات (Jayaprakasha وآخرون، 2001). تشير العديد من الدراسات إلى أن النشاطية المضادة لأكسدة الليبيدات للمستخلصات النباتية تعود أساسا لاحتوائها على مركبات عديدة الفينول (Ozsoy وآخرون، 2008؛ Sarikurkcü، 2008). إلا أن نتائج هذه الدراسة لم تظهر التناسب الطردي بين النشاطية المضادة للأكسدة لهذه المستخلصات ومحتواها من عديدة الفينول. لهذا

فقد يعود هذا التأثير إلى نوعية المركبات الفينولية المتواجدة بها. يمكن تفسير النشاطية العالية المضادة للأكسدة لـ CrE و EAE إلى احتوائهما على المركبات الأكثر قطبية على عكس CHE، هذه النتائج تتوافق مع ما توصل إليه Baghiani وآخرون (2010) في دراسة أجريت على جذور نبات *Carthamus caeruleus*، حيث أظهرت المستخلصات القطبية EAE و AqE نشاطية مضادة للأكسدة عالية والتي قدرت بـ 79.75% و 77.13% على الترتيب، رغم احتوائها الضئيل على المركبات الفينولية. كما تتماشى هذه النتائج مع ما توصل إليه Wu وآخرون (2010)، حيث ظهرت أعلى نسبة تثبيطية مع المستخلصات القطبية (CrE، AqE). إلا أن Frankel وآخرون، (1994) إقترحوا فرضية تنص على أن مضادات الأكسدة غير القطبية تملك مميزات تثبيطية عالية جدا في المعلق زيت - ماء مشكلة عازلا يحمي الليبيدات من عملية الأكسدة. بمعنى أن المستخلصات القطبية التي لها خصائص ذوبانية في الطور المائي تملك نشاطية أقل في حماية الليبيدات من الأكسدة مقارنة بالمستخلصات الأقل قطبية التي لها القدرة على الذوبان في الطور الدهني، وهذا ما يسمى بظاهرة القطبية العكسية (Koleva وآخرون، 2002؛ Dastamalchi وآخرون، 2008).

3.3. 2. إختبار Ferric thiocyanate method (FTC)

يعتبر الغشاء البلازمي غني بالأحماض الدهنية التي تعتبر المركبات الأكثر عرضة لظواهر الأكسدة، خصوصا حمض اللينولييك والأراشيدونيك اللذان يعتبران هدفا رئيسيا لفوق أكسدة الليبيدات (Halliwell، 1994). تمثل ظاهرة فوق أكسدة الليبيدات أحد أسباب ظهور أمراض القلب والأوعية والسرطان، وتتدخل في ظهور العديد من الأضرار البيولوجية. تعمل مضادات الأكسدة المانحة للهيدروجين على التفاعل مع جذور peroxy اللبيدية، وتمنع استمرار سلسلة إنتاج جذور حرة جديدة. تستعمل تقنية FTC لقياس كمية البيروكسيدات الناتجة في بداية ظاهرة فوق أكسدة الليبيدات، حيث يتفاعل peroxide مع $FeCl_2$ لتشكيل أيونات Fe^{3+} ، تتحد فيما بعد أيونات الحديد الثلاثية مع Ammonium thiocyanate ذو الصبغة الحمراء.

يعتقد أن المستخلصات التي تملك نسب تثبيطية عالية، تحتوي على مركبات أكسدة أولية التي بإمكانها التفاعل بقوة مع الجذور الحرة خصوصا جذر OH^\bullet ، وتعمل على إيقاف سلسلة تفاعلات الجذور الحرة وبالتالي تأخير تشكل الهيدروبيروكسيدات (Abbasi وآخرون، 2013). تقاس النشاطية المضادة للأكسدة بزيادة إمتصاصية المعقد ferric thiocyanate كل 24 سا، إلى غاية الأكسدة الكلية لحمض اللينولييك (Elmastas وآخرون، 2006). تملك مستخلصات نبتي الحرمل والجعدة نشاطية مضادة للأكسدة عالية في معلق حمض اللينولييك. قدرت نشاطية مستخلصات نبتي الحرمل والجعدة بتركيز 2mg/ml على تثبيط فوق أكسدة اللييدات لمعلق حمض اللينولييك والنتائج موضحة في الشكل 24.



الشكل 24 . حركية فوق أكسدة حمض اللينولييك في وجود وغياب مستخلصات *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* باستعمال BHT و Vit C كشواهد.

أظهرت النتائج في بداية التجربة أن أقل إمتصاصية كانت في EAE-Ph (0.001) وهي أقل من VitC (0.007). تعكس أقل قيمة للإمتصاصية أعلى نشاطية مضادة للأكسدة؛ هذا ما يدل على القدرة التثبيطية العالية لمستخلص EAE-Ph. كما سُجلت أقل إمتصاصية للمستخلص CHE في Sc، ثم تزداد الإمتصاصية بمرور الزمن.

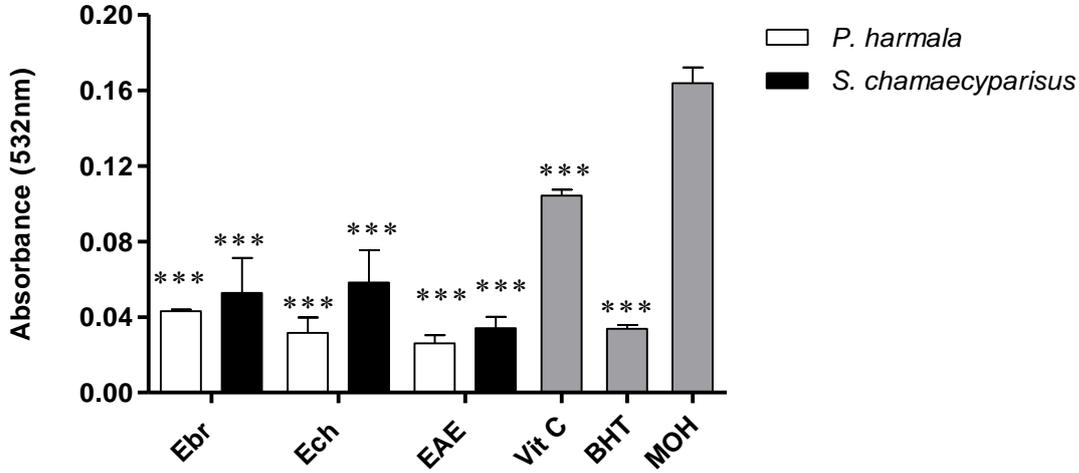
فالنشاطية المضادة للأكسدة تكون عالية في بداية التجربة (t= 0h) مقارنة بآخرها (t= 72h). إذ أن كل العينات المستعملة تقريبا أظهرت إمتصاصية عالية في اليوم الأخير (t= 72h) مقارنة باليوم الأول (t= 0h). فقد أظهر CE-Sc إنخفاض ملحوظا في الإمتصاصية (0.00066)، يليها VitC (0.0863)، ثم BHT (0.0877). وبمقارنة المستخلص CHE لكلا النباتين، فيلاحظ أن أقل إمتصاصية في Ph على عكس مستخلص CrE (أقل إمتصاصية في Sc). أظهرت النتائج أن جميع المستخلصات تملك نشاطية عالية مضادة للأكسدة. فقد سجلت أعلى نشاطية تثبيطية على مستوى CrE-Sc بنسبة 100 % تقريبا، والتي فاقت نشاطية كل من VitC و BHT (87.87%) و (87.68%) على التوالي. تعكس أعلى نسبة تثبيط لفوق أكسدة الليبيدات أعلى نشاطية مضادة للأكسدة (شكل 26). إن التأثير المضاد للأكسدة لمستخلصات نبات الحرمل قد يعود لاحتوائها على المركبات الفينولية أو مركبات مزيجية للجذور الحرة، والتي لها القدرة على تسريع توقيف سلسلة تفاعلات فوق الأكسدة الليبيدية والتخلص من الأنواع الأكسجينية النشطة بتثبيط أكسدة الليبيدات وجزئيات بيولوجية أخرى (Abbasi وآخرون، 2013)، في حين لم يظهر التناسب الطردوي بين المحتوى الفينولي والنشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات نبتة الجعدة، لذلك قد يعود هذا التأثير لتدخل مركبات غير فينولية أخرى مسؤولة عن هذا التأثير (Djanna وآخرون، 2011).

3.3.3. إختبار Thiobarbituric acid (TBA)

يستعمل إختبار FTC لقياس كمية البيروكسيدات الناتجة في المرحلة الأولية من ظاهرة أكسدة الليبيدات، بينما يستعمل TBA لقياس المركبات الثانوية الناتجة عن الأكسدة. أثناء عملية الأكسدة تتفكك البيروكسيدات تدريجيا إلى مركبات ذات وزن جزيئي ضعيف، من بين هذه المركبات نجد مركب malonaldehyde (MDA) والذي يتم قياسه بواسطة إختبار TBA (Eymynur Shafekh وآخرون، 2012).

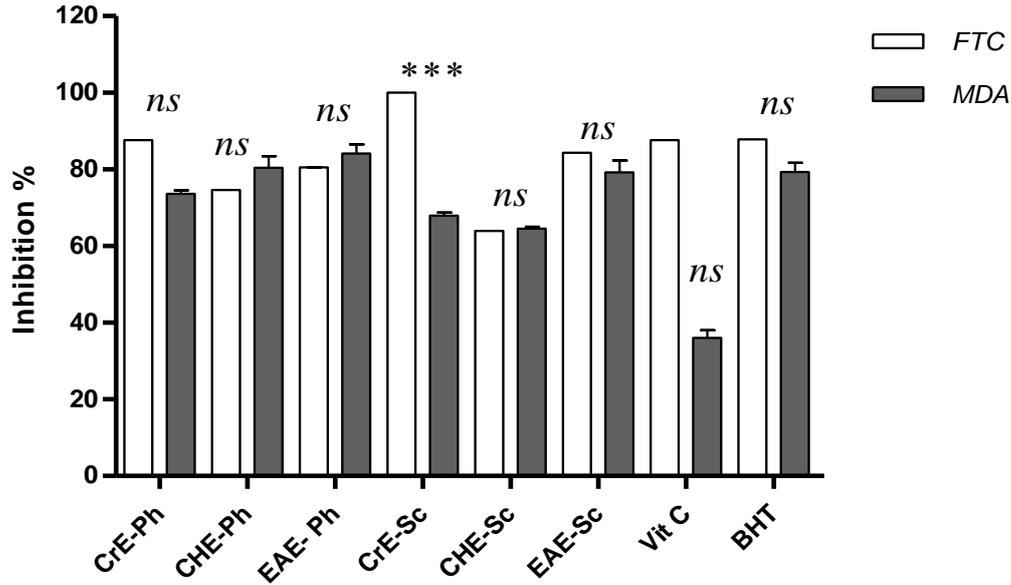
يظهر الشكل 25 النشاطية المضادة للأكسدة لمختلف مستخلصات *P. harmala* و *S. chamaecyparissus*

باستعمال تقنية TBA



شكل 25. النشاطية المضادة للأكسدة في وجود مستخلصات *P.harmala* و *S.chamaecyparissus* بواسطة تقنية TBA وذلك قياس إمتصاصية MDA الناتج أثناء أكسدة الليبيدات.

يتضح من خلال النتائج أن أقل إمتصاصية لمركب MDA ظهرت بالنسبة ل EAE-Ph (0.026) والتي كانت أقل من إمتصاصية BHT (0.033) ($p > 0,05$). هذا ما يعكس إنخفاض كمية MDA المتشكلة أثناء المرحلة الأخيرة من أكسدة الليبيدات، وبالتالي قام EAE-Ph بحماية قوية للليبيدات من عملية الأكسدة مما أدى إلى انخفاض تشكل MDA. في حين ظهرت أعلى إمتصاصية على مستوى CHE-Sc مما يعكس قدرته الضعيفة على حماية الليبيدات من عملية الأكسدة. أما فيما يخص الشواهد، لوحظت أعلى إمتصاصية في الميثانول يليه Vit C ثم BHT. بمقارنة نسب تثبيط أكسدة الليبيدات باستعمال FTC و TBA (الشكل 26) فنلاحظ أنها كانت متساوية فقط مع CHE-Sc (64 %) في حين يوجد اختلافا بين باقي المستخلصات والشواهد في قدرتها على تثبيط أكسدة الليبيدات في مرحلتها الأولية (FTC) والنهائية (TBA).



شكل 26 . مقارنة بين النشاطية المضادة للأوكسدة لمستخلصات نبتتي *S. chamaecyparissus* و *P. harmala* باستعمال تقنيتي FTC و TBA في وجود VitC و BHT كشواهد.

قد يعزى الاختلاف بين الإختبارين إلى عدة عوامل من بينها إختلاف آلية التفاعل التي يعتمد عليها كلا الإختبارين، بنية المركبات الفينولية المختلفة في كل مستخلص والنشاطية المضادة للأوكسدة التي تقوم بها هذه المركبات واحتمال وجود تعاون بينها في القيام بهذه النشاطية (Zainol وآخرون، 2003). فقد تعود النشاطية المضادة للأوكسدة التي تملكها هذه المركبات إلى عدة آليات كقدرتها على إزاحة الأنواع الأوكسجينية النشطة (catechine و quercetin)، وتثبيط إنتاج الجذور الحرة و هدم سلسلة فوق أكسدة الليبيدات (p-coumaric acids)، واستحلاب الأيونات المعدنية (Zainol وآخرون، 2003). هذه ما يدل على أن الآلية المعتمدة من طرف المركبات الفينولية للحماية من عملية الأوكسدة تتميز بنوعية عالية لكل مركب فينولي.

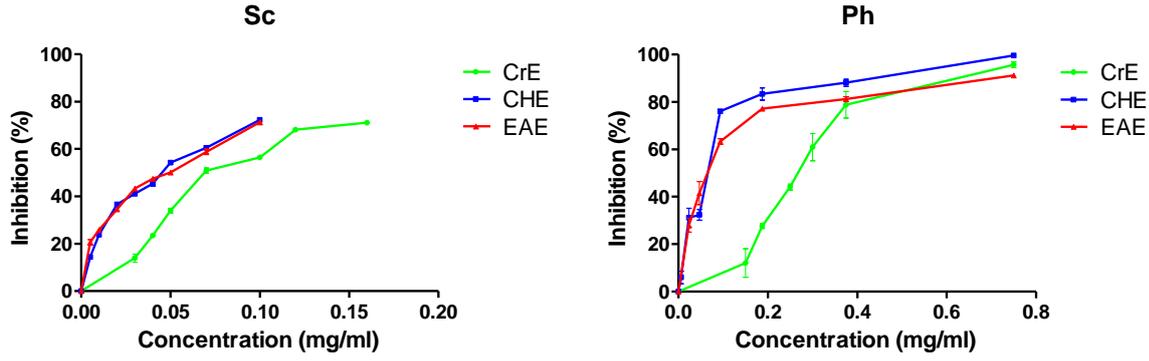
4.3 . تنقية ومراقبة نقاوة وتقدير نشاطية XOR

تم تنقية XOR من حليب البقر حسب طريقة Baghiani وآخرون (2003) عبر سلسلة من عمليات الطرد المركزي و الترسيب بواسطة كبريتات الأمونيوم لإستخلاص الإنزيم الخام، متبوع بالفصل على عمود كروماتوغرافيا (أغاروز-هيبارين). قدرت مرودية الإنزيم ب 23.21 mg/ml، هذه القيمة قريبة من القيمة (20.32 mg/ml) التي توصل إليها Baghiani و آخرون (2003). أعطى المسح الطيفي المرئي - فوق البنفسجي لإنزيم XOR المنقى ثلاث معاول أساسية 280، 325، 450 nm و قدرت نسبة البروتين إلى الفلافين (PFR) ب 5.15، وهي تدل على درجة عالية من النقاوة (Bray وآخرون، 1996). وللتأكد من درجة نقاوة XOR، قمنا بإجراء فصل كهربائي على هلام الأكريلاميد المتعدد (SDS-PAGE)، أظهر الفصل الكهربائي شريطا رئيسيا في حدود 150 كيلودالتون. هذا ما يتوافق مع نتائج Baghiani و آخرون (2003) و Atmani وآخرون (2004).

قدرت النشاطية الكلية ل XOR المنقى من حليب البقر في وجود الكزانثين كمادة مانحة للإلكترونات و NAD^+ كمادة مستقبلية للإلكترونات ب 2055.05 نانومول / دقيقة / مغ بروتين و النشاطية المؤكسدة في وجود O_2 كمادة مستقبلية للإلكترونات ب 1988.55 نانومول / دقيقة / مغ بروتين، وقد كانت نسبة النمط المؤكسد تفوق 90 % هذه النتائج تتماشى مع ما توصل إليه (Baghiani وآخرون، 2003).

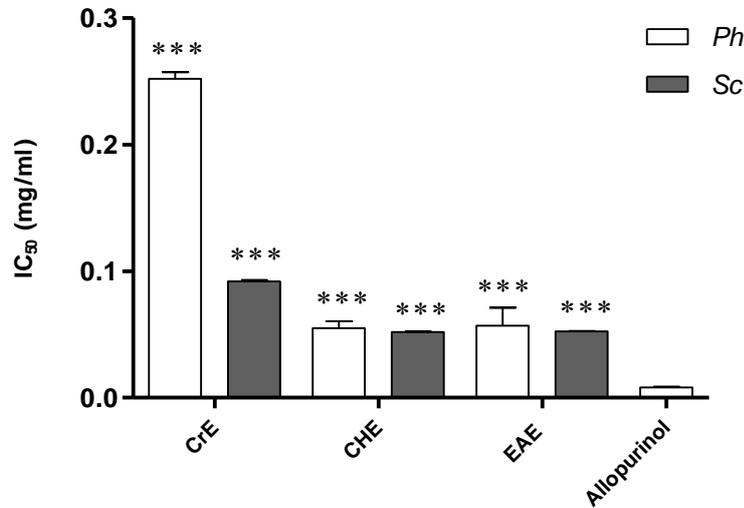
5.3 . دراسة التأثير الشبطي على إنزيم XO

قمنا بدراسة تأثير مستخلصات *P. harmala* و *S.chamaecyparissus* على نشاطية إنزيم XO، باستعمال تركيز ثابت من مادة التفاعل الكزانثين $100 \mu M$ و تتبع إنتاج حمض اليوريك عند 295 نانومتر مع الزمن. أظهرت النتائج أن كل المستخلصات تثبط إنزيم XO بصورة معتبرة، بشكل يتناسب طرديا مع الزيادة في تركيز المستخلصات (الشكل 27).



شكل 27 . التأثير التثبيطي لمستخلصات *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* على نشاطية إنزيم XO.

سجلت أعلى نشاطية تثبيطية لإنزيم XO مع CHE-Sc و EAE-Sc بقيمة IC_{50} (mg/ml) مساوية (0.051 ± 0.002) و (0.052 ± 0.0003) ، يليها CHE-Ph و EAE-Ph بقيمة (0.055 ± 0.005) و (0.057 ± 0.014) على التوالي (شكل 28).



الشكل 28 . تركيز مستخلصات *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* المثبطة لـ 50% من نشاطية إنزيم

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

بمقارنة نسبة تثبيط إنزيم XO بواسطة مستخلصات CHE-Sc و EAE-Sc ($P > 0.05$) و مستخلصات

CHE-Ph و EAE-Ph ($P > 0.05$) مع التأثير التثبيطي لمركب Allopurinol الذي يعتبر مثبطا صناعيا نوعيا

لإنزيم XO فقد كانت أقل بـ 6.3 و 6.7 مرة على التوالي.

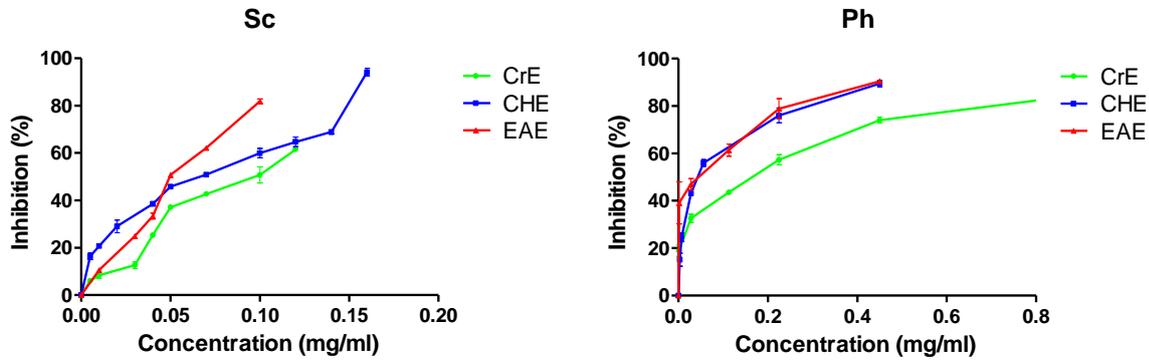
أجريت العديد من الدراسات حول قدرة المستخلصات النباتية على تثبيط إنزيم XOR (Gawlik-Dziki وآخرون، 2012؛ Ummamaheswari وآخرون، 2009). إذ يعتقد أن المركبات التي تعمل على تثبيط إنزيم XOR تقوم بمنع تثبت مادة التفاعل بالمركز النشط وترتبط هذه المركبات بدورها على مستوى المراكز MO و FAD للإنزيم (Sanders وآخرون، 1997). يتضح من خلال النتائج عدم وجود ارتباط بين المحتوى الفينولي لكلا النباتين *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* وقدرتها التثبيطية لإنزيم XOR، في حين أشار العديد من الباحثين إلى أن تثبيط إنزيم XOR يعود إلى تدخل المركبات الفينولية خصوصا الفلافونيدات (Lespade و Bercion، 2010؛ Sowndhararajan وآخرون، 2012؛ Bakasso وآخرون، 2013).

إضافة إلى العامل الكمي، فإن نوعية الفلافونويدات الموجودة في كل مستخلص يمكن أن تحدد قوة التثبيط، إذ يعتقد أن الفلافونيدات السكرية المتواجدة في EAE والفلافونيدات غير السكرية المتواجدة في CHE تملك تأثيرا أقوى من CrE. هذه النتائج تتوافق مع ما توصل إليه (Baghiani وآخرون، 2010؛ 2012) في دراسة أجريت على نبات *Capparis spinosa* و *Carthamus caeruleus* على التوالي، أظهر فيها CHE و EAE أعلى تأثيرا تثبيطيا لإنزيم XOR مقارنة مع CrE.

أظهرت دراسات سابقة أجريت من طرف (Lin وآخرون، 2002؛ Van Hoorn وآخرون، 2002)، أن مركب Flavone (Myrecetin) يملك تأثيرا تثبيطيا عاليا لإنزيم XOR بشكل تنافسي، بينما لم يظهر Catechine و Epicatechine أي تأثير تثبيطي (Cos وآخرون، 1998؛ Hsieh و Chang، 2010). كما أن الفعل التثبيطي للفلافونويدات على XOR قد يعود إلى بنيتها الكيميائية، حيث أن وجود الرابطة المزدوجة بين C2-C3 و غياب مجموعة OH في C3 يرفع من القدرة التثبيطية للفلافونويد (Borges وآخرون، 2002).

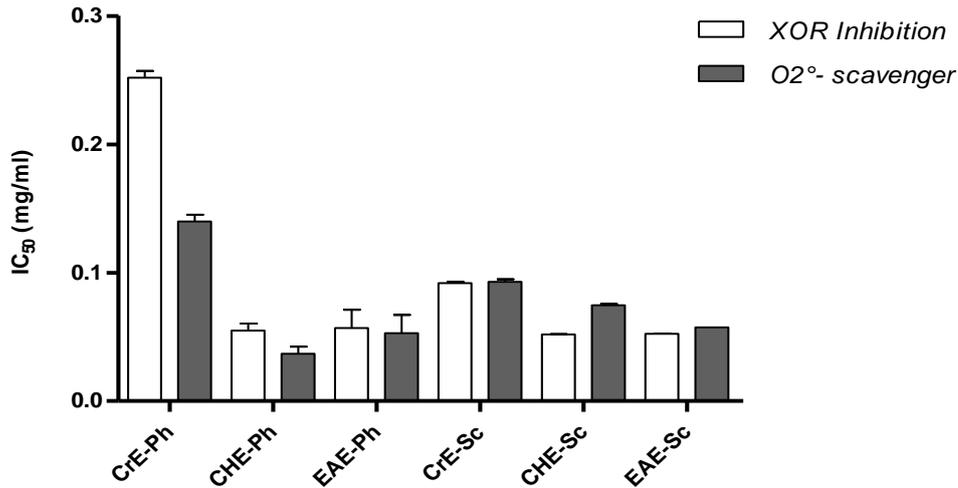
6.3. التأثير الإزاحي لجذر $O_2^{\cdot-}$ الناتج عن XO

يقوم إنزيم XOR بإنتاج جذر $O_2^{\cdot-}$ في وجود الكزانتين وذلك عبر إرجاع الأوكسجين الجزيئي، يقوم جذر $O_2^{\cdot-}$ بإرجاع $Cyt-c^{+3}$ إلى $Cyt-c^{+2}$. لدراسة التأثير الإزاحي لمستخلصات نباتي *P.hamala* و *S. chamaecyparissus* على جذر $O_2^{\cdot-}$ الناتج عن XO قمنا بتتبع إرجاع Cyt c بواسطة $O_2^{\cdot-}$ عند طول موجة 550 نانومتر. أظهرت النتائج أن كل مستخلصات نباتي *P. hamala* و *S. chamaecyparissus* تثبط إرجاع Cyt c بشكل يتناسب طرديا مع الزيادة في التركيز (شكل 29).



الشكل 29 . التأثير الإزاحي لمستخلصات *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* على جذر $O_2^{\cdot-}$ الناتج عن XO بإستعمال Cyt c.

كما أظهرت النتائج أن CHE-Ph يملك أعلى تأثير تثبيطي، أما بالنسبة لمستخلص CrE فلوحظ أعلى تأثير في Sc على عكس مستخلص EAE ظهر أعلى تأثير في Ph. بملاحظة هذه النتائج يتضح عدم تناسب بين التأثير المثبط لإرجاع Cyt c لهذه المستخلصات مع محتواها من المركبات الفينولية. تم مقارنة قيم IC_{50} لكل من التأثير المثبط لإنزيم XO و التأثير الإزاحي لجذر $O_2^{\cdot-}$ ، والنتائج موضحة في الشكل 30.



الشكل 30 . التأثير التثبيطي لـ 50 % من نشاطية XO و النشاطية المزيجية لجذر O₂^{•-}.

يتضح من خلال النتائج الموضحة في الشكل 30 أن CrE-Sc يملك تأثيرا مثبتا لإنزيم XOR مساويا للتأثير الإزاحي لجذر O₂^{•-}، هذا ما يصنف CrE-Sc حسب Cos وآخرون (1998) ضمن (القسم B) بمعنى أن CrE-Sc يملك تأثيرا تثبيطيا لإنزيم XO دون تأثير إضافي مزيجا لـ O₂^{•-}، هذا ما يتوافق مع ما توصل إليه Costantino وآخرون (1992). في حين CHE-Sc و EAE-Sc يملكان IC₅₀ للتأثير الإزاحي لجذر O₂^{•-} أعلى من IC₅₀ المثبطة لإنتاج حمض اليوريك على التوالي، هذا ما يصنفهما ضمن (القسم D)، بمعنى مستوى تشكل O₂^{•-} تكون أعلى من مستوى تشكل حمض اليوريك. بينما تملك مستخلصات نبات *P. harmala* IC₅₀ التأثير الإزاحي لجذر O₂^{•-} أقل من IC₅₀ المثبطة لإنزيم XO بمعنى أنها تملك تأثيرا تثبيطيا لإنزيم XO وتأثيرا إضافيا مزيجا لجذر O₂^{•-} هذا ما يجعلها ضمن (القسم C).

من خلال ملاحظة النتائج، يتضح عدم تناسب طردي بين كل من المحتوى الفينولي لنبته *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* والنشاطية المزيجية لجذر O₂^{•-}. لذلك يعتقد أن البنية الكيميائية للمركبات المتواجدة بهذه المستخلصات هي التي تتحكم في هذه النشاطية، فعلى سبيل المثال، يملك مركب epigallocatechine تأثيرا إزاحيا قويا لجذر O₂^{•-} بينما مركب naringenine لا يملك أي تأثير إزاحي لجذر O₂^{•-} (Cos وآخرون، 1998).

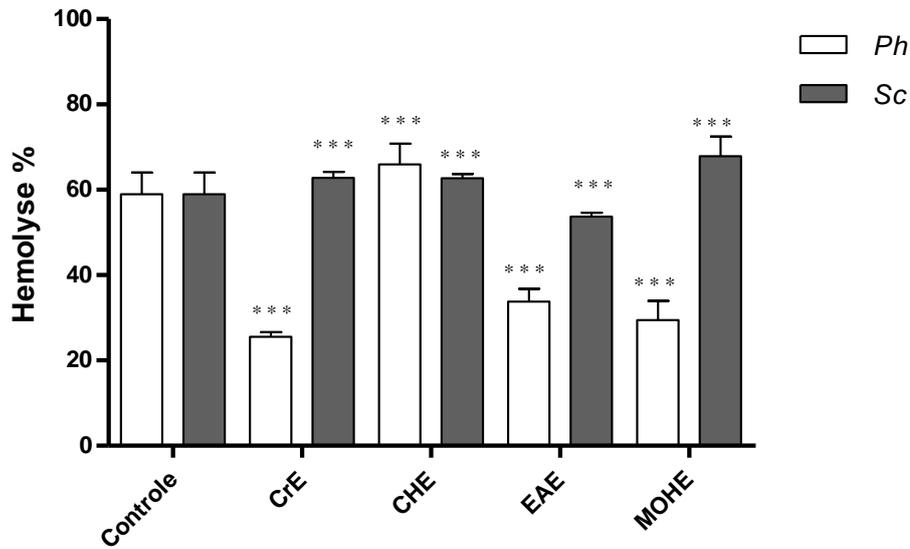
7.3. النشاطية المضادة لتحلل كريات الدم الحمراء *in vitro* باستعمال AAPH

أجريت العديد من الدراسات مؤخرًا حول تأثير المركبات الفينولية على حماية كريات الدم الحمراء من عملية الأكسدة (Mendes وآخرون، 2011؛ Tulipani وآخرون، 2011؛ Valente وآخرون، 2011). تحفز جزيئات AAPH (مركبات AZO) إنتاج الجذور الحرة وذلك بعد تجزئتها في وسط مائي، تتفاعل المركبات الناتجة بسرعة مع الأكسجين لإنتاج جذور البيروكسيل والتي تعمل بدورها على مهاجمة غشاء كريات الدم الحمراء.

تعتبر كريات الدم الحمراء من أكثر الخلايا المتواجدة في الجسم، كما أنها الأكثر عرضة للأكسدة وذلك نظراً لإحتوائها على كمية عالية من الليبيدات وغناها بالأكسجين بالإضافة إلى احتوائها على الأيونات المعدنية كالحديد والنحاس (Alvarez-Suarez وآخرون، 2012). يؤدي الإجهاد التأكسدي في العموم إلى حدوث فوق الأكسدة الليبيدية لأغشية كريات الدم الحمراء مما يسبب إختلال وظائفها من خلال التأثير على ميوعتها وعلى وظائف المستقبلات والإنزيمات المدججة في الأغشية، إذ يعتقد أن هذه الإختلالات هي المسببة في ظهور تحلل كريات الدم الحمراء مما يؤدي إلى إصابة الخلايا أو موتها.

قمنا بدراسة تأثير مستخلصي الميثانول 85% و 100% (CrE و MOHE) بالإضافة إلى مستخلص الكلوروفورمي وإثيل الأسيتات لكلا النبتتين *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* على حماية كريات الدم الحمراء من التحلل المحفز بواسطة المؤكسد AAPH. يظهر الشكل 31 تحلل كريات الدم الحمراء بواسطة AAPH وتأثير المستخلصات المدروسة على تحلل الدم. عند إضافة AAPH إلى معلق كريات الدم الحمراء، نلاحظ زيادة في نسبة تحلل كريات الدم الحمراء بمرور الزمن. بعد تعريض كريات الدم الحمراء لـ 300mM AAPH، نلاحظ أن عملية الإنحلال الدموي تبدأ بعد 60 دقيقة لتستقر بعد حوالي 4 ساعة ونصف. يلاحظ من خلال النتائج أن كل من المستخلص الميثانولي MOHE-Ph و CrE-Ph ومستخلص إثيل الأسيتات EAE-Ph و EAE-Sc قامت بحماية كريات الدم الحمراء من التحلل بتأثير معنوي جدا $P < 0,001$ ، إذ ظهرت أعلى نسبة حماية على مستوى CrE-

Ph و MOHE-Ph ب 56.65% و 50.0% على التوالي. في حين كل من المستخلص المثانولي MOHE-Sc و CrE-Sc والمستخلص الكلوروفورمي CHE-Ph و CHE-Sc تملك تأثيرا محفزا لتحلل كريات الدم الحمراء بتأثير معنوي جدا $P < 0.001$ ، إذ ظهرت أعلى نسبة تحلل في كل من MOHE-Sc و CHE-Ph ب 67.88% و 65.92% على التوالي (شكل 31).



شكل 31. نسبة تحلل كريات الدم الحمراء في وجود مستخلصات نباتي *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* بواسطة 300 μ M من محلول AAPH المحفز للإنحلال الدموي (n=3).

تؤكد النتائج المتحصل عليها نتائج de Freitas وآخرون (2008)، فقد وجد فيها إختلافا في النشاطية المضادة لتحلل كريات الدم الحمراء إذ أن كل من *Bryophyllum sp* و *Solidago microglossa* تملك نشاطية محللة للدم في حين تملك باقي النباتات تأثيرا مضادا للإنحلال الدموي. قد يعود التأثير المحفز للإنحلال الدموي للمستخلصات لإحتواءها على مركبات Saponines، إذ تعمل هذه المركبات على تكوين معقدات مع الستيرويدات و البروتينات والفوسفوليبيدات مغيرة بذلك من نفاذية الغشاء البلازمي، في حين يعتقد أن تأخير الإنحلال الدموي لباقي المستخلصات قد يعود إلى وجود الفلافونويدات التي لها القدرة على الإندماج ضمن أغشية

كريات الدم الحمراء وتعمل على حمايتها من عملية الأكسدة (Chaudhuri وآخرون، 2007).

أجريت العديد من الدراسات *in vitro* حول السمية الخلوية التي تصيب غشاء كريات الدم الحمراء في وجود مستخلصات العديد من النباتات ويعزى ذلك إلى المركبات التي تحتويها. فعلى سبيل المثال، عديدات الفينول المستخرجة من الشاي الأخضر والأسود (Grinberg وآخرون، 1997)، epicactechin isomers المستخرجة من Jasmine green tea (Zhang وآخرون، 1997) و steryl glycosides المستخرجة من جذور نبات *Momordica cochinchinensis* (Ng وآخرون، 1986) و triterpenoid saponins المستخرجة من كل من *Helianthus annuus* ، *H. biennis* ، *Heteropappus altaicus* ، *Solidago virens* و *Solidago virens* وجد لهذه المركبات علاقة وطيدة بتحليل كريات الدم الحمراء (Bader وآخرون، 1996).

إن الاختلاف في النشاط المضاد للإنحلال الدموي بين المستخلصات المدروسة قد يعود أيضا لإختلاف طبيعة المركبات المتواجدة بها، لذا من الضروري تجزئة هذه المستخلصات لمعرفة نوعية وآلية المركبات المسؤولة عن هذا التأثير.

4. دراسة النشاط المضاد للأكسدة في الكائن الحي

1.4. تقدير النشاط المضاد للأكسدة للبلازما (APC)

تحتوي البلازما على مجموعة من المركبات المضادة للأكسدة داخلية المنشأ (albumine ، bilirubine ، uric acid ، reduced glutathion) وأخرى خارجية المنشأ تأتي من الأغذية. يمكن لهذه المركبات أن تعمل بشكل تعاوني على سلسلة الجذور الحرة من أجل القيام بحماية العضوية.

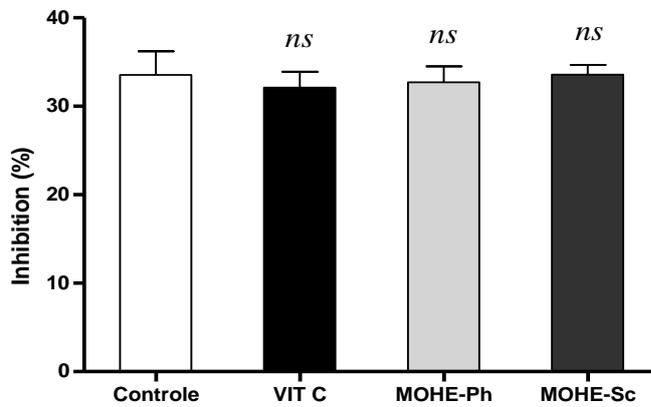
إن النشاط المضاد للجذور الحرة بالغة الأهمية وهذا يعود لدورها المزيح للجذور الحرة وذلك على مستوى النظام

الغذائي و الأنظمة البيولوجية (Gulçin، 2010). سمح استعمال اختبارين متكاملين هما: قدرة البلازما على إزاحة جذر DPPH وإرجاع الحديد الثنائي Fe^{2+} لدراسة الدور المضاد للأوكسدة للمستخلصات النباتية في البلازما.

1.1.4. قدرة البلازما على إزاحة جذر DPPH

يعتبر اختبار DPPH من الإختبارات المستعملة بكثرة لتقدير الفعل الازاحي للجذور الحرة حيث تقاس نشاطية البلازما المضادة للأوكسدة بدرجة اختفاء لون محلول DPPH البنفسجي في وجود البلازما مقارنة بالمحلول الميثانولي الذي يحتوي على DPPH لوحده.

أظهرت النتائج الموضحة في الشكل 33 أن إعطاء جرعة 100 mg / kg و 10 mg / kg للمستخلص الميثانولي لنبتي *S. chamaecyparissus* و *P. harmala* على التوالي لم يؤثر على النشاطية المضادة للأوكسدة للبلازما ب 33.59 ± 2.40 % و 32.70 ± 4.45 % على التوالي مقارنة بالشاهد (32.11 ± 4.03 %) (شكل 32).



الشكل 32. النشاطية المضادة للأوكسدة للبلازما اتجاه جذر DPPH لمستخلصات Sc و Ph مقارنة بالشاهد

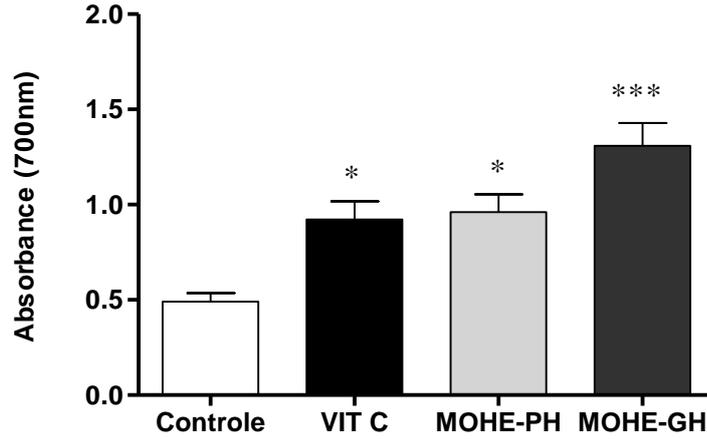
بمقارنة النشاطية الكلية للبلازما (APC) والنشاطية الكلية للدم (HT_{50})، يلاحظ أن الجرعة 100 mg/kg ل (Sc) أظهرت تأثيرا غير معنوي ($p > 0.05$) في النشاطية الكلية للبلازما و النشاطية الكلية للدم في حين الجرعة 10mg/kg ل (Ph) أظهرت تأثيرا جد معنويا ($p < 0.001$) في النشاطية الكلية للدم فقط، يحتمل أن يعود

الإختلاف بين النشاطية الكلية للبلازما والكلية للدم لتنوع وإختلاف الأنظمة المضادة للأكسدة (ascorbate، urate، tocopherole الموجودة في البلازما ومضادات الأكسدة الموجودة في الدم). إن الدراسات التي أجريت لتقدير النشاطية المضادة للأكسدة الكلية للبلازما أو المصل قليلة وهذا يعود لصعوبة قياس كل مركب مضاد للأكسدة على حدى والتفاعل الحاصل بين المركبات (Re وآخرون، 1999). يعتمد قياس النشاطية المضادة للأكسدة للعينة على الطريقة المستعملة ونوع المركب المنتج للجذور الحرة (المادة المؤكسدة) المستعمل في القياس، كما أن المقارنة بين التقنيات يساعد أكثر على تسهيل الفهم وتفسير النتائج، لهذا تم اختيار إختبارين مختلفين (DPPH و reducing power). يعتمد الإختبار الأول على قدرة البلازما على إزاحة الجذور الحرة في حين يدل الثاني على القدرة الإرجاعية للبلازما. تتعلق هذين التقنيتين بمستويات محددة للمركبات المضادة للأكسدة في البلازما فعلى سبيل المثال يتعلق إختبار DPPH بمستويات الغليتاتيون الداخلية في حين يتعلق إختبار القدرة الإرجاعية بمستويات حمض الأسكوربيك وحمض اليوريك و α -tocopherol البلازمية.

2.1.4. إختبار القدرة الإرجاعية للبلازما

إن قدرة العينة على منح إلكترونات في تفاعلات الأكسدة الإرجاعية يمكن استغلاله لقياس النشاطية المضادة للأكسدة. تم قياس القدرة الإرجاعية للبلازما بتحول مركب $\text{Fe}^{3+}(\text{CN})_6$ لشكل $\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6$ (Le وآخرون، 2007). يتغير اللون الأصفر للوسط التفاعلي إلى اللون الأخضر وتعبّر شدة هذا اللون على قدرة البلازما الإرجاعية (Zou وآخرون، 2004).

يتضح من خلال الشكل 33 أن MOHE-Sc رفع من القدرة الإرجاعية للبلازما بشكل معنوي مقارنة بالشاهد ($p < 0.001$) بإمتصاصية قدرت بـ 1.237 ± 0.298 ، يليه ارتفاع طفيف وغير معنوي في كل من MOHE-Ph و Vit C بـ 0.915 ± 0.217 و 0.867 ± 0.279 على التوالي ($p > 0.05$).



شكل 33. القدرة الإرجاعية للبلازما للمستخلص الميثانولي لكل من *P. harmala* و *S. chamaecyparissus*. القيم تمثل $\text{mean} \pm \text{SEM}$ (n=8-9) (***) $p < 0.001$ ؛ ns = غير معنوي).

يوجد اختلاف في نتائج الباحثين حول استجابة مضادات الأكسدة بعد استهلاك عديدات الفينول لمدة قصيرة، فمنها من أبدت عدم تغير في النشاطية المضادة للأكسدة بعد استهلاك كل من مستخلص *Pinnus maritima* (Silliman وآخرون، 2003) واستهلاك anthocyanins من نبات *Myrciaria jaboticaba* (Leite وآخرون، 2011)، في حين أجريت دراسة أخرى وجد فيها أن مستخلص التوت يرفع النشاطية المضادة للأكسدة للبلازما (Hassimotto وآخرون، 2011). في دراسة سابقة أجريت من طرف (da Silva وآخرون، 2013) أظهرت أن مستخلص الهيدروكولي لنبات *Passiflora edulis* لم يظهر تغيراً في النشاطية المضادة للأكسدة للبلازما باستعمال إختبار ORAC و FRAP وقد أرجع السبب لقصر مدة التجربة (15 يوماً) التي لم يظهر فيها هذا التأثير، فعلى سبيل المثال استهلاك الشاي الأسود لم يظهر تغيراً في النشاطية المضادة للأكسدة للبلازما باستعمال إختبار ORAC و FRAP إلا بعد إطالة زمن التجربة (Widlansky، 2005)، تدل النتائج المحصل عليها على قدرة هذه العينات على منح إلكترونات، وبالتالي قدرتها على تعديل الجذور الحرة. إذ تمثل الفلافونيدات المركبات الأساسية المانحة للإلكترونات (Le وآخرون، 2007)، كما أظهرت دراسات أخرى أن المركبات الفينولية هي المسؤولة عن القدرة الإرجاعية للمستخلصات النباتية (Krishnamoorthy وآخرون، 2011). إلا أن التناسب بين

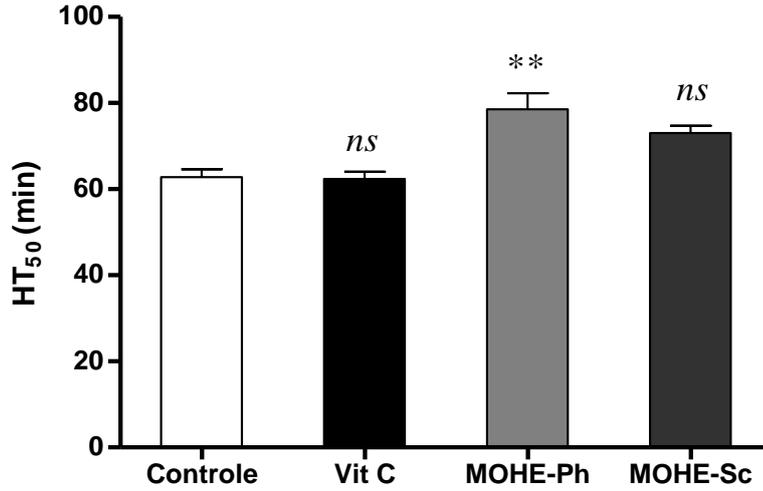
المحتوى الفينولي والقدرة الإرجاعية لا يحدث في معظم الحالات، ففي دراسة أجريت من طرف Ozen وآخرون (2011) وجد أن المستخلص الميثانولي لنبته *Thymus praecox* يملك أعلى قدرة إرجاعية مقارنة بباقي المستخلصات المدروسة بالرغم من احتوائه على أقل كمية من المركبات الفينولية وقد يعزى هذا لنوعية المركبات المحتواة في المستخلص.

لوحظ أن النشاطية الإزاحية للجذور الحرة لا ترتبط بالقدرة الإرجاعية، فيما يخص النتائج المحصل عليها لاحظنا وجود توافق بين قيم كل من إختبار DPPH و reducing power، تختلف هذه النتائج عن نتائج Cao و Prior (1998) في دراسة النشاطية المضادة للأكسدة لمصل الإنسان باستعمال طرق متعددة حيث لم يلاحظ وجود هذا التناسب. تختلف النشاطية المضادة للأكسدة حسب نوعية العينة المستعملة وطريقة تحضيرها (مطحون أنسجة حيوان أو مصلى إنسان) واختلاف مضادات الأكسدة في هذه العينات (تواجد ascorbate و urate في المصل، ومضادات الأكسدة الخلوية في الأنسجة).

2.4. النشاطية المضادة لتحلل كريات الدم الحمراء

يعمل مركب tBHP على تحفيز تحلل كريات الدم الحمراء. نتائج قيم HT_{50} التي تدل على إرتفاع في زمن تحلل نصف كريات الدم الحمراء لكل من MOHE-Ph و MOHE-Sc مبينة في الشكل 34.

حفز مستخلص Ph تأخرًا جد معنوي $p < 0.001$ في الإنحلال الدموي بقيمة HT_{50} مساوية ل 78.51 ± 11.32 min، يليه مستخلص Sc بقيمة $(72.05 \pm 4.95 \text{ min} = HT_{50})$ $p < 0.05$ مقارنة مع مجموعة الشاهد $(59.88 \pm 9.32 \text{ min})$.



شكل 34. الزمن HT₅₀ بعد إضافة المستخلص الميثانولي لكل من *S. chamaecyparissus* و *P. harmala* و Vit C القيم تمثل mean ± SEM (n=8-9)، (p ≤ 0.001 : *** ؛ ns = غير معنوي).

يعتقد أن آلية تأثير مركب tBHP على كريات الدم الحمراء يكون من خلال الارتباط مع البروتينات الغشائية مما يؤدي إلى تغيير في هيئة الطبقة الغشائية الليبيدية وتكوين ثغور بالغشاء الخلوي (Deuticke وآخرون، 1992)، إذ تعتبر الجوامع SH- للبروتينات أكثر عرضة للإجهاد التأكسدي (Haraguchi وآخرون، 1996)، كما أن انخفاض مستويات الجلوتاثيون يؤدي إلى انخفاض في مجاميع SH- (Grinberg وآخرون، 1994). مؤديا إلى اختلال في استقرار الأغشية (Kitagawa وآخرون، 1996).

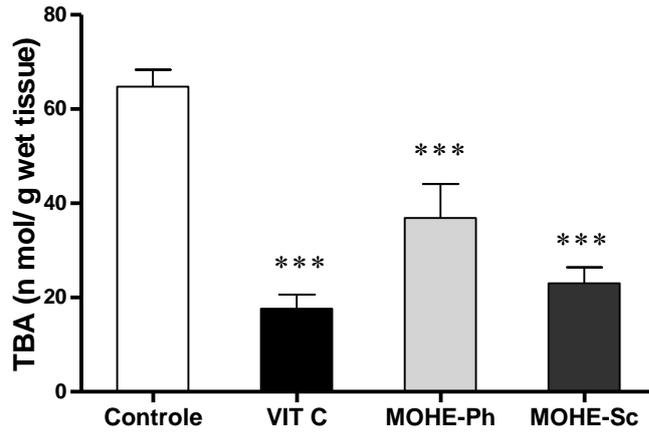
يؤثر tBHP على فوق أكسدة الليبيدات من خلال تحفيزه إنتاج مركب MDA على مستوى كريات الدم الحمراء مما يؤدي إلى اختلال النفاذية الغشائية (Deuticke وآخرون، 1987). ومن أجل حماية الأغشية من هجوم الجذور الحرة، أصبح استعمال مضادات الأكسدة من مصادر طبيعية محل اهتمام كبير (Machlin و Bendich، 1987). من أهم مضادات الأكسدة المتواجدة على مستوى كريات الدم الحمراء نجد

أنظمة إنزيمية مثل SOD، CAT و GPX وأنظمة غير انزيمية مثل الجلوتاثيون و Vit E، إذ يعتبر Vit E من أهم مضادات الأكسدة الدفاعية للأغشية الخلوية (Halliwell و Gutteridge، 1992؛ Dalle-Donne وآخرون، 2006). أظهرت بعض الدراسات دور quercetin المضاد للإجهاد التأكسدي *in vitro*، فهو يعمل على استقرار غشاء كريات الدم الحمراء ويرجع هذا لسهولة نفاذه إلى داخل الخلية (Hapner وآخرون، 2010). يعود تأثير حماية المستخلصات النباتية من أكسدة كريات الدم الحمراء عبر: (1) نوع المركبات الفينولية، (2) درجة نفاذية الفلافونويدات بداخل كريات الدم الحمراء (Chaudhuri وآخرون، 2007)، إلا أن سلوك هذه المركبات اتجاه الجذور الحرة يبقى عموماً صعب التفسير نظراً لكون كريات الدم الحمراء تمثل حشوة خلوية معقدة، إذ تؤثر المركبات الصيدلانية على الغشاء البلازمي بتفاعلات متنوعة (Djeridane وآخرون، 2007).

3.4 . تركيز مستويات MDA الكبدية

تعد فوق أكسدة الليبيدات عملية تحليلية ذاتية وحالة مشتركة من الموت الخلوي، يستخدم تثبيط فوق أكسدة الليبيدات كمؤشر مهم للنشاط المضاد للأكسدة والذي يظهر من خلال تقدير MDA (Mazunder وآخرون، 2005).

يظهر الشكل 35 تغير تركيز نسب MDA الكبدية لدى الفئران المعالجة بمستخلص MOHE-Ph و MOHE-Sc مقارنة بالشاهد. يلاحظ انخفاض جد معنوي في تركيز MDA عند الفئران المعالجة بالمستخلص MOHE-Ph و MOHE-Sc و Vit C مقارنة مع الشاهد. قدر هذا الانخفاض ب 63.48 % بالنسبة Ph (41.77 ± 14.47 nmol /g tissus) وب 79.56 % بالنسبة Sc (23.37 ± 6.73 nmol/g tissus) و 84.58 % بالنسبة ل Vit C (17.63 ± 6.06 nmol / g tissus) مقارنة بالشاهد (64.78 ± 7.14 nmol / g tissus).



شكل 35. تأثير معاملة الفئران بالمستخلص MOHE-Ph و MOHE-Sc و VitC على معدل MDA السيتوزولي للكبد (n=6-9). $p \leq 0.001$: ***

بقدره مستخلصي *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* على خفض مستوى مؤشر فوق الأوكسدة الليبيدية، فإنها تعمل على وقاية الكبد من خلال خفض مؤشر TBARS وذلك لغنى المستخلصين بعديدات الفينول التي تزيح الجذور الحرة.

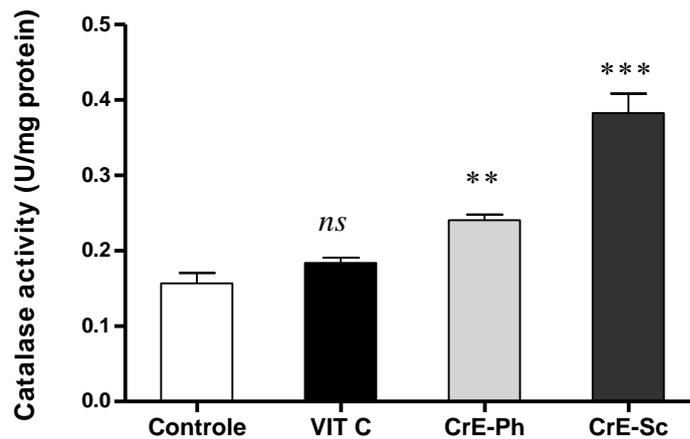
من خلال ما سبق نلاحظ نبتتي *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* تتمتع بالخصائص و المميزات التي تسمح لها بأداء وظائفها المضادة للأوكسدة و يبدو ذلك جلياً من خلال انخفاض معدلات MDA بشكل معنوي $p \leq 0.001$ بالنسبة للمجموعتين المعاملتين مسبقاً بالمستخلص الميثانولي. أجريت العديد من الدراسات على الحيوانات و تم تقدير TBARS والذي يظهر فيها انخفاض مستويات MDA سواء في الدم أو الأعضاء (الكبد، الكلى، المخ) (Decorde وآخرون، 2008؛ Chen وآخرون، 2011، da Silva وآخرون، 2013). هذا ما تؤكدُه النتائج المحصل عليها، إذ أثبتت إنخفاضاً في مستويات MDA في الكبد بنسبة 79.56 % و 63.48 % عند مجاموعات الفئران المعالجة بمستخلصي MOHE-Sc و MOHE-Ph على التوالي. في دراسة أجريت من طرف Khennouf وآخرون (2010) حول تأثير المركبات الفينولية و الدباغ النقية على تثبيط فوق أكسدة الليبيدات في الأرانب، أظهرت النتائج أن الأحماض الفينولية و الدباغ النقية تثبط فوق أكسدة الليبيدات في المخ عند جميع

التراكيز المدروسة (10, 25, 50 µg/mL)، هذه النتائج تؤكد أيضا دراسة (Rop وآخرون، 2010) حيث لوحظ انخفاض في تشييط أكسدة الليبيدات بنسبة بين 12.57 % و 19.81 % في كبد الجرذان المعالجة ب black chokeberries.

4.4 . تقدير نشاط CAT الكبدى

إنزيم CAT هو هيموبروتين يعمل على إرجاع H_2O_2 إلى ماء و أكسجين كما يعمل بشكل غير مباشر على حماية الأنسجة من جذور الهيدروكسيل عالية النشاط (Subramanian و Sathishsekar، 2005).

يبين الشكل 36 نتائج تأثير المعالجة بمستخلصي *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* على نشاط إنزيم CAT على مستوى الكبد. لوحظ ارتفاعا معنويا $P < 0.01$ في نشاطية CAT سواءا عند الفئران المعالجة بمستخلص *P. harmala* أو مستخلص *S. chamaecyparissus* مقارنة مع مجموعة فئران الشاهد. قدرت هذه الزيادة ب 59.16 % ($P < 0.001$) بالنسبة لمجموعة الفئران Sc (0.382 ± 0.068 U/mg protein) و 35 % P بالنسبة لمجموعة الفئران Ph (0.24 ± 0.021 U / mg protein) مقارنة بالشاهد (0.156 ± 0.033 U / mg protein).



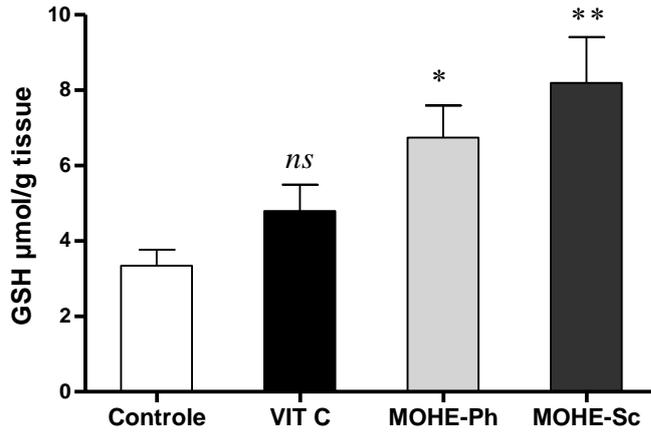
شكل 36. تأثير المعاملة بمستخلص MOHE-Sc و MOHE-Ph على نشاط إنزيم CAT

(n=6-9) *** : $p \leq 0.001$, ** : $p \leq 0.01$

تعمل المركبات الفعالة المتواجدة بهذه النباتات على الرفع من نشاطية CAT الذي يحمي من الأضرار التي تسببها الجذور الحرة في الكبد، ويمكن أن يكون هذا الإرتفاع ناتجا عن زيادة التعبير عن جزيئات mRNA المنتجة للإنزيم (Zhong وآخرون، 1999). أجريت دراسات أخرى حول تقدير النشاطية المضادة للأكسدة للإنزيمات CAT، SOD، GSH-PX عند جردان معالجة بمستخلصات نبتة Douchi على مستوى الكبد والكلية، ففي الكبد ارتفعت نشاطية إنزيمي CAT و SOD مقارنة بالشاهد ($p < 0.05$)، وارتفع طفيف وغير معنوي في نشاطية إنزيم GSH-PX ($p > 0.05$). أما على مستوى الكلية فظهرت زيادة معنوية في نشاط GSH-SOD ($p < 0.05$) و PX و زيادة غير معنوية في نشاطية CAT ($p > 0.05$) مقارنة بالشاهد (Wang وآخرون، 2008). في حين أجريت دراسات سابقة من طرف Ozturk وآخرون (2009) بمعالجة جردان مدة 5 أشهر بنبات المشمش فلم يلاحظ أي تغيير في نشاطية الإنزيمات المضادة للأكسدة (CAT، SOD، GSH-PX). إن النتائج المتحصل عليها أظهرت إرتفاع في نشاطية إنزيم CAT وزيادة في تراكيز GSH وانخفاض في معدلات MDA مما يبين جليا أن مستخلصات *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* تملك قدرة فعالة على إلتقاط الجذور الحرة ورفع النظام المضاد للأكسدة.

5.4. معايرة GSH الكبدي

النتائج التي تظهر تركيز GSH في نسيج الكبد بعد معالجة الفئران بمستخلصي *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* لمدة 21 يوما موضحة في الشكل 37. لوحظ ارتفاع معنوي في تركيز GSH عند الفئران المعالجة بمستخلص MOHE-Ph ($6.74 \pm 1.89 \mu\text{mol} / \text{g}$) ($P < 0.05$) وتلك المعالجة بمستخلص MOHE-Sc ($8.19 \pm 2.98 \mu\text{mol/g}$) ($P < 0.01$) على التوالي مقارنة بالشاهد 3.34 ± 1.12 .



شكل 37. تأثير المعالجة بمستخلص MOHE-Sc و MOHE-Ph على معدلات GSH السيتوزولي للكبد

(n=6-9) (ns: non significatif ؛ ** : $p \leq 0.01$, * : $p \leq 0.05$)

تصنع الخلية من أجل ضمان حمايتها جزيئات GSH التي تحمل وظائف -SH- وتمثل نظاما دفاعيا مضادا للأكسدة وذلك بارتباط مجاميع -SH- مع المستقبلات السمية (Morin وآخرون، 2001). فهي تلعب دورها المضاد للأكسدة بالتعاون مع الإنزيمات المضادة للأكسدة مثل glutathion peroxydase، catalase و superoxyde dismutase (Morin وآخرون، 2001). عند معالجة الفئران بمستخلص *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* ارتفعت نسبة GSH مقارنة بمجموعة الشاهد، مما يعتقد أن المركبات الفينولية المتواجدة بهذه المستخلصات تعمل إما على زيادة بناء glutathion أو على خفض الإجهاد التأكسدي مما يقلل من هدم glutathion، أو أنها تقوم بالآليتين معا (Sathishsekar و Subramanian، 2005). من جهة أخرى من المعروف أن المركبات الفينولية لها القدرة على تجديد Vitamine E وإزاحة الجذور الحرة مما يسمح لها بالمشاركة بشكل مباشر في إرجاع glutathion (Babu وآخرون، 2006). كما أن إرتفاع تراكيز GSH في الكبد عند الفئران المعالجة بالنبتتين يعتبر عاملا مسؤولا عن انخفاض معدلات MDA في نفس النسيج (Latha و Pari، 2005). أظهرت دراسة أجريت حول الجرذان المعالجة بنبات *Passiflora edulis* لقياس مستويات GSH و نشاطية كل من GPX و GR في الكبد والكلبي، قيما متساوية لمستويات GSH بين المجموعة

المعالجة و مجموعة الشاهد في الكبد، وارتفاع في مستويات GSH (40 %) في الكلى، بالإضافة إلى ارتفاع في نشاطية GR و GPX في الكبد والكلى (da Silva وآخرون، 2013).

المناقشة العامة

في العقدين الأخيرين، أصبحت مضادات الأكسدة تمثل موضوع العديد من دراسات علم الأوبئة التي أظهرت العلاقة بين استهلاك مضادات الأكسدة وانخفاض معدل الإجهاد التأكسدي المسبب للأمراض، حيث تركزت الاهتمامات حول استعمال مضادات الأكسدة خاصة الطبيعية منها لتحسين صحة الإنسان (Ng و Liu، 2000؛ Wang و Zheng، 2001). قمنا في هذه الدراسة باستعمال نبتتين طبيبتين *Peganum harmala* و *Santolina chamaecyparissus* كمصدر لمضادات الأكسدة الطبيعية وذلك باختبار نشاطيهما المضادة للأكسدة مخبريا (*in vitro*) وتجريبها على الفئران (*in vivo*).

قبل التطرق إلى هذه الإختبارات تم تقدير عديدات الفينول الكلية والفلافونيدات المتواجدة في مستخلص الميثانول والكلوروفورم و أسيتات الإثيل لكل من *P. harmala* و *S. chamaecyparissus*. أظهرت الدراسة أن كمية عديدات الفينول الكلية المتواجدة في مستخلصات كلا النبتتين تتراوح بين 137.98 ± 6.97 و 373.83 ± 0.23 مغ مكافئ حمض غاليك/ غ من المستخلص وظهرت أعلى كمية لعديدات الفينول لنبات *P. harmala* على مستوى CrE-Ph في حين كانت أعلى نسبة في مستخلص EAE-Sc بالنسبة ل *S. chamaecyparissus*. أما بالنسبة للفلافونيدات فقد تراوحت كميتها بين 7.39 ± 0.68 إلى 61.51 ± 7.86 مغ مكافئ كرسيتين/ غ من المستخلص. أبدت نبتة *S. chamaecyparissus* احتواءها على كمية عالية من المركبات الفينولية والفلافونيدية في جميع المستخلصات مقارنة مع نبات *P. harmala*، هذا ما يؤكد دراسات سابقة بينت أن كمية عديدات الفينول في عائلة Asteracea تكون أعلى مقارنة مع باقي العائلات (Kaur و Kapoor، 2002). يتغير تركيز المركبات الحيوية في النباتات وكذا تأثيراتها البيولوجية تبعا لعدة عوامل منها الموقع الجغرافي، المرحلة الضوئية والحرارة. تؤثر هذه العوامل على البناء الحيوي للمستقلبات الثانوية كالفلافونيدات هذا ما يغير نشاطيهما المضادة للأكسدة (Kumazawa وآخرون، 2004؛ Jaakola و Hohtola، 2010).

أظهرت نتائج إختباري DPPH و ABTS أن EAE-Sc يملك أعلى تأثير إزاحي لجذر DPPH و ABTS مقارنة بباقي المستخلصات ويمكن إعزاء هذا لاحتواءه على كمية عالية من المركبات الفينولية والفلافونيدات، إلا أنه بوجود اختلاف بين نتائج الإختبارين بالنسبة لباقي المستخلصات، هذا ما يتوافق مع ما توصل إليه Zhou وآخرون (2013). هذا ويعتقد أن الفلافونيدات السكرية تملك قدرة إزاحية عالية للجذور الحرة مقارنة مع باقي المستخلصات.

تمثل ظاهرة فوق أكسدة الليبيدات أحد أسباب ظهور أمراض القلب والأوعية والسرطان. وتتم وفق سلسلة من تفاعلات الجذور الحرة، كما أنها تتدخل في عدد من الأضرار البيولوجية (Abbasi وآخرون، 2013). أظهرت النتائج الخاصة باختبار B-carotene / linoleic acid أن أعلى تأثير تثبيطي كان بواسطة EAE-Ph، بينما أظهرت مستخلصات نبات *S. chamaecyparissus* تأثيرا متوسطا بنسب حوالي 60%. تقودنا هذه النتائج إلى استنتاج أن النشاطية المضادة لأكسدة جزيئات B-carotene لنبات الحرمل ترجع إلى قدرتها الإزاحية للجذور الحرة. أما فيما يخص اختبار FTC فأظهرت النتائج أن جميع المستخلصات تملك نشاطية مضادة للأكسدة عالية، فقد سجلت أعلى نشاطية تثبيطية على مستوى CrE-Sc بنسبة 100% تقريبا، والتي فاقت نشاطية كل من VitC و BHT. تشير العديد من الدراسات أن النشاطية المضادة لأكسدة الليبيدات للمستخلصات النباتية تعود أساسا لاحتوائها على مركبات عديدة الفينول (Ozsoy وآخرون، 2008؛ Sarikurkcu، 2008)، إلا أنه فيما يخص النتائج المحصل عليها في اختبار B-carotene و FTC و TBA، لم يظهر هذا التناسب الطردي إلا مع مستخلصات نبات الحرمل في تقنية FTC، قد يعود هذا التأثير إلى نوعية المركبات الفينولية وهذا ما وجدته Tuberoso وآخرون (2009). وجد أن كل من بنية و ذوبانية عديدات الفينول في الدهون تمثل العوامل الأساسية التي تتحكم في النشاطية المضادة للأكسدة وهي المسؤولة عن الإندماج العميق لهذه المركبات ضمن الطبقة الليبيدية (Djeridane وآخرون، 2010). أجريت دراسة سابقة من طرف Hayet وآخرون، (2010) ووجد أن

مستخلصات أوراق *P. harmala* تملك نشاطية مضادة للأكسدة باستعمال FTC وقد ظهرت أعلى نشاطية في المستخلص المثنائي.

تعتبر النشاطية الإستخلاصية للأيونات المعدنية ذات أهمية بالغة وهذا يرجع لقدرتها على خفض تراكيز الأيونات المعدنية المسؤولة عن إنتاج الجذور الحرة الأولية و تحفيز انطلاق تفاعلات سلسلة الأكسدة على مستوى النظام البيولوجي، كما تعمل المركبات الإستخلاصية على تثبيط تفاعلات Fenton وتفكيك الهيدروبيروكسيدات (Liu وآخرون، 2010). من خلال النتائج المحصل عليها كانت أعلى قيمة IC_{50} على مستوى CrE-Ph، قد يعود التأثير الإستخلاصى لمستخلصات نبات الحرمل إلى المركبات الفينولية المتواجدة بها، في حين لم يظهر هذا التناسب في مستخلصات نبات الجعدة، مما يعتقد تدخل مركبات غير فلافونيدية في استخلاص أيونات الحديد الثنائي، مثل الأحماض الأمينية والأحماض العضوية (Cornago وآخرون، 2011). أظهرت النتائج الإمكانية العالية للمركبات القطبية على استخلاص المعادن مقارنة بالمركبات غير القطبية، هذا ما يتوافق مع Sahreen وآخرون (2010).

أظهرت نتائج نسبة تثبيط إنزيم XO بواسطة مستخلصات *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* والتأثير الإزاحي لها على جذر $O_2^{\cdot-}$ ، أن أعلى تأثير تثبيطي كان على مستوى CHE-Sc و EAE-Sc يليها CHE-Ph و EAE-Ph. يتضح من خلال النتائج غياب العلاقة بين المحتوى الفينولي لكلا النباتين وقدرتها التثبيطية لإنزيم XO، في حين أشار بعض الباحثين أن تثبيط إنزيم XOR قد يعود إلى تدخل العديد من المركبات النشطة خصوصا الفلافونيدات (Sowndhararajan وآخرون، 2012؛ Bakasso وآخرون، 2013).

تعتبر كريات الدم الحمراء من أكثر الخلايا المتواجدة في الجسم، كما أنها الأكثر عرضة للأكسدة وذلك نظرا لإحتوائها على كمية عالية من الليبيدات وغناها بالأكسجين بالإضافة إلى احتوائها على الأيونات المعدنية كالحديد والنحاس (Alvarez-Suarez وآخرون، 2012). تم إختبار قدرة مستخلصات *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* على حماية كريات الدم الحمراء المحفزة بكل من AAPH و t-BHP من الإنحلال

in vitro و *in vivo* على التوالي. أظهرت نتائج *in vitro* أن مستخلصات MOHE-Ph و CrE-Ph و EAE-Ph و EAE-Sc تملك تأثيرا مثبتا للإنحلال الدموي، بينما تملك MOHE-Sc و CrE-Sc و CHE-Ph و CHE-Sc تأثيرا محفزا للإنحلال الدموي، يمكن أن يعود هذا الاختلاف في التأثير إلى بنية المركبات المتواجدة بهذه المستخلصات، فعلى سبيل المثال قد يعود تثبيط الإنحلال الدموي للمستخلصات إلى الفلافونيدات التي لها القدرة على الإندماج ضمن أغشية كريات الدم الحمراء وتعمل على حمايتها من عملية الأكسدة (Chaudhuri وآخرون، 2007)، بينما قد يرجع الإنحلال الدموي لباقي المستخلصات إلى مركبات Saponine، التي تعمل على تكوين معقدات مع الستيرويدات والبروتينات والفوسفوليبيدات مسببة تغيير في نفاذية الغشاء البلازمي (de Freitas وآخرون، 2008)، كما يمكن أن تثبط الفلافونيدات السكرية المتواجدة بمستخلص EAE تحلل كريات الدم الحمراء، في حين تعمل الفلافونيدات غير السكرية المتواجدة بمستخلص CHE على تحفيز تحلل كريات الدم الحمراء. أما فيما يخص نتائج الإنحلال الدموي *in vivo* فقد أبدى MOHE-Ph تأثيرا قويا مثبتا للإنحلال الدموي يليه MOHE-Sc مماثلا للنتائج المحصل عليها *in vitro*. تقوم المستخلصات بحماية كريات الدم الحمراء من الأكسدة حسب نوع المركبات الفينولية المتواجدة بها ودرجة نفاذيتها داخل الكريات الحمراء (Chaudhuri وآخرون، 2007).

وعليه وبعد التأكد من التأثير المثبط لهذين النباتين على الجذور الحرة *in vitro* قمنا بمواصلة الدراسة *in vivo* وذلك من خلال دراسة تأثير المستخلصات الميثانولية على النشاطية المضادة للأكسدة على مستوى مصلى وكبد الفئران.

قدرت النشاطية المضادة للأكسدة الكلية للبلازما (CPA) للمستخلص الميثانولي لكل من *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* باستعمال اختبار DPPH و reducing power. لم يلاحظ وجود أي تأثير في CPA فيما يخص اختبار DPPH بالنسبة لكلى المستخلصين، في حين أبدى مستخلص CrE-Sc تغيرا معنويا

و CrE-Ph تغيرا غير معنوي في CPA في اختبار reducing power. تختلف قدرة المستخلصات النباتية على تغيير CPA، فعلى سبيل المثال أجريت دراسة سابقة من طرف da Silva وآخرون (2013) لم يظهر تغيرا في CPA باستعمال اختبار ORAC و FRAP، إذ يعتقد اسناد هذا لقصر مدة التجربة (15 يوما)، في حين لم يظهر تغير في CPA باستعمال اختبار ORAC و FRAP إلا بعد إطالة زمن التجربة (Widlansky، 2005). بينت النتائج أن قيمة MDA عند المجاميع المعاملة بالمستخلص المثنوي لكل من *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* كانت منخفضة مما يدل على أن المستخلصين قاما بحماية نسيج الكبد من فوق أكسدة الليبيدات. سجلت هذه الدراسة ارتفاعا معنويا في مستوى GSH في كبد الفئران المعالجة بالمستخلص المثنوي لكل من *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* قد يعود هذا الارتفاع إلى قدرة المستخلصات على زيادة البناء الحيوي لـ GSH أو خفض الإجهاد التأكسدي المؤدي إلى التقليل من هدم GSH أو الإثيين معا (Rajasekaran وآخرون، 2005). سجلنا خلال هذه الدراسة ارتفاعا معنويا في نشاطية CAT عند الفئران المعالجة بالمستخلص المثنوي لكل من *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* بنسبة قدرت بـ 35 % و 59,16 % على التوالي، هذا يعود إلى قدرة هذه المستخلصات على تحسين نشاط الإنزيمات المضادة للتأكسد (Finley وآخرون، 2011؛ Silva وآخرون، 2012)، أو إلى عمل المستخلصات على زيادة التعبير عن المورثات المشفرة للإنزيمات المضادة للأكسدة مثل SOD، CAT، GPX.

تستعمل الإختبارات المضادة للأكسدة *in vitro* بكثرة لقياس القدرة المضادة للأكسدة للنباتات، إلا أنه في بعض الأحيان يحد تداخل بين النشاطية المضادة للأكسدة *in vitro* و *in vivo* و السبب الرئيسي لذلك يعود إلى قلة إمتصاصية بعض المركبات خصوصا anthocyanins، بالإضافة إلى قلة نصف عمر المركبات الفينولية في البلازما والذي يعد بالساعات، كل هذه العوامل تحد من استعمال المركبات الفينولية لتقدير النشاطية المضادة للأكسدة *in vivo*، لذلك يجب تكثيف الدراسات *in vivo* لتحديد الدور الحقيقي للمركبات المضادة للأكسدة

(Lotito و Fre، 2006).

يتضح من خلال النتائج المحصل عليها أن كل من نبتة *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* تملك نشاطية عالية مضادة للأكسدة مخبريا وفي الكائن الحي ونشاطية مضادة للإنحلال الدموي، لذلك يجدر توسيع الأبحاث من خلال عزل وتجزئة وتنقية المركبات النشطة ودراسة تأثيراتها المضادة للأكسدة، دراسة آلية عمل كل مركب على حدة وتنوع الدراسة *in vivo* باستعمال حيوانات مصابة بأمراض مشابهة لما عند الإنسان (أمراض التهابية، مرض التهاب المفاصل الرثوي، فرط الحساسية وغيرها...) ودراسة الجانب السمي للنبتين للتأكد من استعمالهما بأمان في الجانب الصيدلاني.

قائمة المراجع

- Abadeh, S., Killacky, J., Benboubetra, M., Harrison, R. (1992). Purification and partial characterization of xanthine oxidase from human milk. *Biochimica et Biophysica Acta* 1117, 25-32.
- Abbasi M A, Saleem H, Rehman A, Riaz T and Ajaib M. (2013). Determination of Antioxidant Activity and Phytoconstituent Screening of *Euphorbia heterophylla* Linn. *British Journal of Pharmaceutical Research*. 3(2): 202-216.
- Agbor, G.A., Kuate, D., Oben, J.E. (2007). Medicinal plants can be good source of antioxidants: case study in Cameroon. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10, 537-544.
- Al-Muhtaseb, N., Al-Kaissi, E., Thawaimi, A.J., Muhi Eldeen, Z., Al-Muhtaseb, S., Al-Saleh, B. (2012). The role of human xanthine oxidoreductase (HXOR), anti-HXOR antibodies, and microorganisms in synovial fluid of patients with joint inflammation. *Rheumatology International* 32(08), 2355-2362.
- Alvarez, M. A., Debattista, N. B., Pappano, N. B. (2008). Antimicrobial activity and synergism of some substituted flavonoids. *Folia Microbiologica (Praha)* 53, 23-28.
- Amessis-Ouchemoukh, N., Madani, K., Falé, P.L.V. Serralheiro, M. L., Araújo, M.E.M. (2014). Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. *Industrial Crops and Products* 53, 6-15.
- Amzad Hossain, M., Shah, M.D. (2011). A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis*. *Arabian Journal of Chemistry* 08, 66-71.
- Antonella, S., Mario, S., Maria, L., Daniela, M., Francesco, B., Francesco, C. (1995). Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembrane. *Free Radical Biology and Medicine* 19, 481-486.
- Antunes, F., Derick, H., Cadenas, E. (2002) Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radical Biology and Medicine* 33 (9), 1260-1267.
- Aqil, F., Ahmad, I., Mehmood, Z. (2006). Antioxidant and free radical scavenging properties of twelve traditionally used Indian medicinal plants. *Turkish Journal of Biology* 30, 177-183.

- Asgarpanah, J., Ramezanloo, F. (2012). Chemistry, pharmacology and medicinal properties of *Peganum harmala* L.. *African Journal Pharmacology Pharmacologica* 22, 1573-1580.
- Aslan, A., Güllüce, M., Sökmen, M., Adigüzel, A., Sahin, F., Özkan, H. (2006). Antioxidant and antimicrobial properties of lichens *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Everinia divaricata*, *Everinia prunastri* and *Neofuscella pulla*. *Pharmacology Biology* 44, 247-252.
- Astulla, A., Zaima, K., Matsuno, Y., Hirasawa, Y., Ekasari, W., Widyawaruyanti, A., et al. (2008). Alkaloids from the seeds of *Peganum harmala* showing antiplasmodial and vasorelaxant activities. *Journal of Natural Medicines* 62, 470-472.
- Atmani, D., Benboubetra, M., Harrison, R. (2004) Goat's milk xanthine oxidoreductase is grossly deficient in molybdenum. [*Journal of Dairy Research* 71, 7-13.](#)
- Augustin, A.J., Boker, T., Blumenroder, S.H., Lutz, J., Spitznas, M. (1994). Free radical scavenging and antioxidant activity of allopurinol and oxypurinol in experimental lens-induced uveitis. *Investigation Ophthalmology Visual Science* 35, 3897-3904.
- Avis, P.G., Bergel, F., Bray, R.C. (1956). Cellular constituents. The chemistry of xanthine oxidase. Part III. Estimations of the cofactors and the catalytic activities of enzyme fractions from cow's milk. *Journal of the Chemistry Society* 1219-1226.
- Babior, B.M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood* 93, 1464-1476.
- Babu, P.V.A., Sabitha, K.S., Shyamaladevi, C.S. (2006). Therapeutic effect of green tea extract on oxidative stress in aorta and heart of streptozotocin diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions* 162, 114-120.
- Bader, G., Plohm, B., Hiller, K., Franz, G. (1996). Cytotoxicity of triterpenoid saponins. Part 1: activities against tumor cells in vitro and hemolytical index. *Pharmazie* 51 (6), 414-417.
- Baghiani, A., Boumerfeg, S., Belkhiri, F., Khennouf, S., Charef, N., Harzallah, D., Arrar L., 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., Djarmouni, M., Boumerfeg, S., Trabsa, H., Charef, N., Khennouf, S., Arrar, L. (2012). Xanthine Oxidase Inhibition and Antioxidant Effects of *Peganum harmala* Seed Extracts. *European Journal of Medicinal Plants* 2(1), 42-56.
- Baghiani, A., Harrison, R., Benboubetra, M. (2003). Purification and partial characterisation of camel milk xanthine oxidoreductase. *Archives of Physiology and Biochemistry* 111, 407-414.

- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J.C., Pinkas, M., Luycky, M., Gazin, M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneimittel Forsh / Drug Research* 1-6.
- Bahorun, T., Soobrattee, M.A., Luximon-Ramma, V., Aruoma, O.I. (2006). Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. *Internet Journal Medicine Update* 1, 25-41.
- Bakasso, S., Lamien-meda, A., Lamien, C.E., Kiendrebeogo, M., Coulibaly, A.Y., Compaoré, M., Meda, N.R., Nacoulma, O.G. (2013). *In vitro* Inhibition of Acetyl Cholinesterase, Lipoxygenase, Xanthine Oxidase and Antibacterial Activities of Five *Indigofera* (Fabaceae) Aqueous Acetone Extracts from Burkina Faso. *Research Journal of Biological Sciences* 5(3), 115-122.
- Balaban, R.S., Nemoto, S., Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483-495.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99, 191-203.
- Barrero, A.F., Mar Herrador, M., Quilez, J.F., Alvarez- Manzaneda, R., Portal, D., Gavin, J.A, Gravalos, D.G., Simmonds, M.S.J., Blaney, W.M. (1999). Bioactive sesquiterpenes from *Santolina rosmarinifolia* subsp. *Canescens*. A conformational analysis of the germacrane ring. *Phytochemistry* 51, 529-541.
- Barriere, C., Centeno, D., Lebert, A., Leroy-Setrin, S., Berdague, J.L., Talon, R. (2001). Roles of superoxide dismutase and catalase of *Staphylococcus xylosus* in the inhibition of linoleic acid oxidation. *FEMS Microbiology Letters* 201, 181-185.
- Beani, J. C. (1995). Actions biologiques du rayonnement solaire sur la peau. *Review Internationnal Pédiatric* 259, 2-7.
- Bellakhdar, J.L. (1997). A pharmacopee marocaine traditionnelle. *Medecine arabe ancienne et savoirs populaires*. Paris: Ibis Press.
- Ben Abid, Z., Feki, M., Hédhili, A., Hédi Hamdaoui, M. (2007). *Artemisia herba-alba* Asso (*Asteraceae*) Has Equivalent Effects to Green and Black Tea Decoctions on Antioxidant Processes and Some Metabolic Parameters in Rats. *Annals of Nutrition and Metabolism* 51, 216-222.
- Benzie, I.F., Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of bantioxidant powerQ the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239, 70-76.

- Berrougui, H., Martin-Cordero, C., Khalil, A., Hmamouchi, M., Ettaib, A., Marhuenda, E., et al. (2006). Vasorelaxant effects of harmine and harmaline extracted from *Peganum harmala* L. seeds in isolated rat aorta. *Pharmacological Research* 54, 150-157.
- Berry, C.E., Hare, J.M. (2004). Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *The Journal of Physiology* 555, 589-606.
- Bieber, J. D., Terkeltaub, R. A. (2004). Gout: on the brink of novel therapeutic options for an ancient disease. *Arthritis and Rheumatology* 50, 2400-2414.
- Blake, D. R., Stevens, C. R., Sahinoglu, T. M., Ellis, G., Gaffney, K., Edmonds, S., Benboubetra, M., Harrison, R., Jawed, S., Kanezler, J., Millar, T. M., Winyord, P. G., Zhang, Z. (1997). Xanthine oxidase; four roles for the enzyme in rheumatoid pathology. [*Biochemical Society Transactions*](#) 25, 812-816.
- Bondet, V., Williams, W.B., Berset, C. (1997). Kinetic and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmittel -Wissenschaft und Technologie* 30, 609-615.
- Borg, J., Beeber, A. (2008). Le stress oxydant. In: *Biochimie métabolique*, édité par: Ellipses: France, 2^{ème} édition, pp. 257-273.
- Borges, F., Fernandes, E., Rolivera, F. (2002). Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Current Medicinal Chemistry* 9, 195-217.
- Böttger, E. C., Schacht J. (2013). The mitochondrion: A perpetrator of acquired hearing loss. *Hearing Research* 303, 12-19.
- Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., Nasri, M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry* 114, 1198-1205.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). "Use of free radical method to evaluate antioxidant activity". *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* 28, 25-30.
- Bray, R.C. (1975). Molybdenum iron-sulfur flavin hydroxylases and related enzymes. In Boyer P.D. *The enzyme*. New York: Academic Press 299-419.
- Brondino, C. D., Romao, M. J., Moura, I., and Moura, J. J. (2006). Molybdenum and tungsten enzymes: the xanthine oxidase family. *Current Opinion in Chemical Biology*. 10, 109-114.
- Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Technique et documentation, Lavoisier, 2^{ème} ed., Paris 915.

- Bukhari, N., Choi, J. H., Jeon, C. W., Park, H. W., Kim, W. H., Khan, M. A., et al. (2008). Phytochemical studies of the alkaloids from *Peganum harmala*. *Applied Chemistry* 12, 101-104.
- Burits, M., Bucar, F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research* 14, 323-328.
- Cao, G., Prior, R.L. (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry* 44, 1309-1315.
- Casetta, I., Govoni, V., Granieri, E. (2005). Oxidative stress, antioxidants and neurodegenerative diseases. *Current Pharmaceutical Design* 11(16), 2033-2052.
- Çelik, S.E., Ozyürek, M., Güçlü, K., Apak, R. (2010). Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRA C, ABTS/ persulfate and FRAP methods. *Talanta* 81, 1300–1309.
- Chandrasekara, A., Shahidi, F. (2010). Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 6706–6714.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal Food Drug Analysis* 10, 178-182.
- Chapple, I.L., Mason, G.I., Garner, I., Matthews, J.B., Thorpe, G.H., Maxwell, S.R., Whitehead, T.P. (1997). Enhanced chemiluminescent assay for measuring the total antioxidant capacity of serum, saliva and crevicular fluid. *Annals of Clinical Biochemistry* 34(4), 412- 421.
- Chaudhuri, S., Banerjee, A., Basu, K., Sengupta, B., Sengupta, P.K. (2007). Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and antihemolytic effects. *International Journal of Biological Macromolecules* 41, 42-48.
- Chen Y, Huang B, He J, Han L, Zhan Y, Wang Y. (2011). In vitro and in vivo antioxidant effects of the ethanolic extract of *Swertia chirayita*. *Journal of Ethnopharmacology* 136, 309–315.
- Christensen, L.P.(1992). Acetylenes and related compounds in Anthemideae. *Phytochemistry* 31, 7-49.
- 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
- Chung, Y.C., Chen, S.J., Hsu, C.K., Chang, C.T., Chou, S.T. (2005). Studies on the antioxidative activity of *Graptopetalum paraguayense* E. Walther. *Food Chemistry* 91, 419-424.
- Clairborne, A. (1985). Catalase activity. In: CRC Handbook of methods for oxygen radical research. Ed. Greenwald. R.A. CRC Press. Boca. Raton 283-284.

- Conner, E. M., Grisham, M. B. (1996). Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* 12, 274-277.
- Coqueiro, A., Regasini, L.O., Gutkoski, S.C.S., Marçal, M., Queiroz, F., Dulce, H., Iqueira, S., Vanderlan da, S.B. (2013). Free Radical Scavenging Activity of *Kielmeyera variabilis* (Clusiaceae). *Molecules* 18, 2376-2385.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Vanden Berghe, D. (1998). Structure activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products* 61, 71-76.
- Costantino, L., Albasini, A., Rastelli, G., and Benvenuti, S. (1992). Activity of polyphenolic crude extracts as scavengers of superoxide radicals and inhibitors of xanthine oxidase. *Planta Medica* 58, 342-345.
- Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O. (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta* 80, 1144-1152.
- da Silva, J. K., Cazarin, C. B. B., Colomeu, T. C., Batista, Â. G., Meletti, L.M.M., Paschoal, J. A. R., Júnior, S. B., Furlan, M. F., Reyes, F. G. R., Augusto, F., Júnior, M. R. M., Zollner, R. de Lima. (2013). Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: In vitro and in vivo study. *Food Research International* 53, 882-890.
- da Silva, E.J.A., Oliveira, A. B., Lapa, A.J. (1994). Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 46(2), 118-122.
- da Silva, J.A.T. (2004). Mining the essential oils of the Anthemidea. *African Journal of Biotechnology* 3(12), 706-720.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry* 52, 4601-4623.
- Das, K.C., Lewis-Molock, Y., White, C.W. (1997). Elevation of manganese superoxide dismutase gene expression by thioredoxin. [*American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 17, 713-726.](#)
- Dastmalchian, K., Dormana, H.J.D., Oinonen, P.P., Darwis, Y., Laakso, I., Hiltunen, R. (2008). Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *Food Science and Technology* 41, 391-400.

- De beer, D., Joubert, E., Gelderblom, W. C. A., Manley, M. (2002). Phenolic compounds: a review of their possible role as *in vivo* antioxidants of wine. *South African Journal of Enology and Viticulture* 20, 48-61.
- de Freitas, M. V., Netto, M. de Cássia. R., da Costa Huss, J.C., de Souza, T.M.T., Costa, J. O., Firmino, C. B., Penha-Silva, N. (2008). Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. *Toxicology in Vitro* 22, 219–224.
- de Logu, A., Loy, G., Pellerano, M.L., Bonsignore, L., Schivo, M.L. (2000). Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by *Santolina insularis* essential oil. *Antiviral Research* 48, 177-185.
- de Lourdes Reis Giada, M. (2013). Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. Chapter 4. licensee In Tech. 88-112.
- de Mello Andrade, J. M., Fasolo, D. (2014). Polyphenol Antioxidants from Natural Sources and Contribution to Health Promotion Chapter 20. Polyphenols in Human Health and Disease.
- Debuigne, G. (1974). Larousse des plantes qui guérissent. Larousse paris, pp. 254.
- Decker, E. A., Welch, B. (1990). Role of Ferritin as lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38, 674-677.
- Decorde, K., Teissedre, P.L., Auquer, C., Cristol, J.P., Rouanet, J.M. (2008). Phenolics from purple grape, apple, purple grape juice and apple juice prevent early atherosclerosis induced by an atherogenic diet in hamsters. [*Molecular Nutrition & Food Research* 2](#), 400-407.
- Defraigne, J.O., Pincemail, J. (2007). Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. *Revue Médicale de Liège* 62, 4.
- Delattre, J., Beaudeau, J.L., Bonnefont-Rousselot. (2005). Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier edition TEC & DOC éditions médicales internationales Paris 1-405.
- Delmas-Beauvieux, M.C., Combe, C., Peuchant, E., Carbonneau, M.A., Dubourg, L., de Precigout, V., Aparicio, M., Clerc, M. (1995). Evaluation of red blood cell lipoperoxidation in hemodialysed patients during erythropoietin therapy supplemented or not with iron. *Nephron* 69, 404-410.
- Deuticke, B., Heller, K.B., Haest, W.M. (1987). Progressive oxidative membrane damage in erythrocytes after pulse treatment with t-butylhydroperoxide. *Biochimica et Biophysica Acta* 899, 113-124.

- Deuticke, B., Klonk, S., Haest, C.W.M. (1992). Erythrocyte membrane barrier formation: role of bilayer polarity and skeletal proteins. *Biochemical Society Transactions* 20, 769-773.
- Dhanabal, S.P., Rahul, J., Priyanka Dwarampudi, L., Muruganatham, N., Raghu, P.S. (2012). Hepatoprotective activity of *Santolina chamaecyparissus* Linn against D-Galactosamine Induced Hepatotoxicity in Rats. *Pharmacognosy Communications*. 2.
- Djanna, F., Cornago, Rowena Grace, O., Rumbaoa, Inacrist, M., Geronimo. (2011). Philippine Yam (*Dioscorea* spp.) Tubers Phenolic Content and Antioxidant Capacity. *Philippine Journal of Science* 140(2), 145-152.
- Djarmouni M., Boumerfeg S., Baghiani A., Boussoualim N., Zerargui F., Trabsa H., Belkhiri F., Khennouf S., Arrar L. (2012). Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Properties of *Peaganum Harmala*. Seed Extracts. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 3(4), 1109-1119.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Brunel, J. M., Stocker, P. (2010). Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the *in vitro* antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and Chemical Toxicology* 48, 2599-2606.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Vidal, N., Lesgards, JF., Stocker, P. (2007). Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology* 224, 801-809.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82, 47-95.
- Dube, A., Misra, P., Khaliq, T., Tiwari, S., Kumar, N., Narender, T. (2011). Therapeutic potential of *Harmala (Peganum harmala* L.) seeds with an array of pharmacological activities. In: *Nuts & Seeds in Health and Disease Prevention*, edited by: Victor R. Preedy, Ronald Ross Watson and Vinood B. Patel, ELSEVIER: UK, USA 601-609.
- Dykes, L., Rooney, L. W. (2007). Phenolic compounds in cereal grains and health benefits. *Cereal Foods World* 50, 105-117.
- Edeas, M. (2007). Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytothérapie* 5, 264-270.
- EL Rhaffari, L. (2008). Catalogue des plantes potentielles pour la conception de tisanes. Errachidia.14p.
- Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82, 70-77.

- Elmastas, M., Gulcin, I., Isildak, O., Kufrevioglu, O.I., Ibaoglu, K., Aboul-Enein, H.Y. (2006). Radical scavenging activity and antioxidant capacity of bay leaf extracts. *Journal of Iranian chemical society* 03(03), 258-266.
- Erben-Russ, M., Bors, W., Saran, M. (1987). Reactions of linoleic acid peroxy Radicals with phenolic antioxidants: a pulse Radiolysis study. [*International Journal of Radiation Biology*](#) 52(3), 393-412.
- Evans, W.J. (2000). Vitamin E, vitamin C, and exercise. [*The American Journal of Clinical Nutrition*](#) 72, 647-652.
- Ezer, N., Mumcu, A.O. (2006). Folk medicines in Merzifon (Amasya, Turkey). *Turkish Journal of Botany* 30, 223-230.
- Fan, H., Yang, G.Z, Zheng, T., Mei, Z. N. X.M., Liu Chen, Y., Chen, S. (2010). Chemical Constituents with Free-Radical-Scavenging Activities from the Stem of *Microcos paniculata*. *Molecules* 15, 5547.
- Fang, Y.Z. (2002). Free radicals and nutrition. In: Fang YZ, Zheng RL, eds. *Theory and application of free radical biology*. Beijing: Scientific Press 647.
- Fattouch, S., Caboni, P., Coroneo, V., Tuberoso, C.I.G., Angioni, A., Dessi, S., Marzouki, N., Cabras, P. (2007). Antimicrobial activity of tunisian quince (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenolic extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 963-969.
- Ferrari, A.M., Sgobba, M., Gamberina, M.C., Rastelli, G. (2007). Relationship between quantum-chemical descriptors of proton dissociation and experimental acidity constants of various hydroxylated coumarins. Identification of the biologically active species for xanthine oxidase inhibition. *European Journal of Medicinal Chemistry* 42, 1028-1031..
- Finaud, J., Lac G., Filaire, E. (2006). Oxidative Stress Relationship with Exercise and Training. *Sports Medicine* 36(4), 327-358.
- Finley, J. W., Kong, A. N., Hintze, K. J., Jeffrey, E. H., Ji, L. L., Lei, X. G. (2011). flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342(8878), 1007-1011.
- Fournier, P. (1948). Livre des plantes medicinales et venéneuses de France. Tome III. Lechevalier-Paris, pp. 415 .
- Frankel, E.N., Huang, S.W. Kanner, J., German, J.B. (1994). Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: Bulk oils vs. emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42, 1054-1059.

- Freeman, B.A., Crapo, J.D. (1981). Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 256, 10986-10992.
- Frison, G., Favretto, D., Zancanaro F., Fazzin, G., Ferrara, S. D. (2008). A case of beta-carboline alkaloid intoxication following ingestion of *Peganum harmala* seed extract. *Forensic Science International* 179, 37-43.
- Galati, E. M., Monforte, M. T., Kirjavainen, S., Forestieri, A. M., Trovato, A., Tripodo, M.M. (1994). Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I): antiinflammatory and analgesic activity. *Farmaco* 40(11), 709-712.
- Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z. (2003). Comment l'oxygène peut-il devenir toxique?. *L'actualité chimique* 14, 91-96.
- Gawlik-Dziki, U. (2012). Dietary spices as a natural effectors of lipoxygenase, xanthine oxidase, peroxidase and antioxidant agents. *Food Science and Technology* 47, 138-146.
- Genestra, M (2007). Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signalling* 19, 1807-1819.
- Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E., Ferro-Luzzi, A. (1995). A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biology and Medicine* 18, 29- 36.
- Giner Pons, R. M., Rios Canavate, J. L. (2000). *Santolina chamaecyparissus*: Especie mediterranea con potenciales aplicaciones terapeuticas en procesos inflamatorios y transtornos digestivos. *Revista de Fitoterapia* 1, 27-34.
- Giner, R.M., Rios, J.L., Villar, A. (1988). C N S depressant effects, anti-inflammatory activity and anti-cholinergic actions of *Santolina chamaecyparissus* extracts. *Phytotherapy Research* 12, 37-41.
- Girard, A., Madani, S., Boukourt, F., Cherkaoui-Malki, M., Belleville, J., Prost, J. (2006). Fructose enriched diet modifies antioxidant status and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Nutrition* 22, 758-766.
- Godber, B., Sanders, S., Harrison, R., Eisenthal, R., Bray, R.C. (1997) of xanthine oxidase in human milk is present as the demolybdo form, lacking molybdopterin. [*Biochemical Society Transactions*](#) 25, 519 .
- Goel, N., Singh, N., Saini, R. (2009). Efficient *in vitro* multiplication of Syrian Rue (*Peganum harmala*) using 6-benzylaminopurine preconditioned seedling explants. *Nature Sciences* 7, 129-134.

- Gotti, R. (2011). Capillary electrophoresis of phytochemical substances in herbal drugs and medicinal plants. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 55, 775-801.
- Gramza, A., Korczak, J., Amarowicz, R. (2005). Tea polyphenols – their antioxidant properties and biological activity - a review. *Polish Journal of Food And Nutrition Sciences* 3, 219-235.
- Granger, D.N., Rutili, G., and McCord, J.M. (1981). Role of superoxide radical in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 81, 22-29.
- Grigorov, B. (2012). Reactive oxygen species and their relation to carcinogenesis. *Trakia Journal of Sciences* 10 (3), 83-92.
- Grinberg, L.N., Newmark, H., Kitrossk, N., Rahamim, E., Chevion, M., Rachmilewitz, E.A. (1997). Protective effects of tea polyphenols against oxidative damage to red blood cells. *Biochemical Pharmacology* 54 (9), 973-978.
- Grinberg, L.N., Rachmilewitz, E.A., Newmark, H. (1994). Protective effects of rutin against hemoglobin oxidation. *Biochemical Pharmacology* 48, 643-649.
- Gulcin, I., Huyut, Z., Elmastas, M., Aboul-Enein, H. Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry* 3, 43-53.
- Habib, H.M., Ibrahim, W. H. (2011). Effect of date seeds on oxidative damage and antioxidant status in vivo. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91(9), 1674-1679.
- Hadizadeh, M., Keyhani, E., Keyhani, J., Khodadadi, C. (2009). Functional and structural alterations induced by copper in xanthine oxidase. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 41 (7), 603–617.
- Halliwell B (1995). Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology* 49(10), 1341-1348.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants : a personal view. *Nutrition Reviews* 52, 253-265.
- Halliwell, B. (1994). Free Radicals, Antioxidants, and Human Disease: Curiosity, Cause, or Consequence?. *Lancet* 344, 721-724.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 246(2), 501-514.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (Eds.) (1999). In: *Free Radical in Biology and Medicine*, Oxford University Press, UK 617.

- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Cross, C. E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 119(6), 598-620.
- Han, S.T., Bhopale, V.M., Om, S.R. (2007). Xanthine oxidoreductase and neurological sequelae of carbon monoxide poisoning. *Toxicology Letters* 170, 111-115.
- Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S. (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* 16, 845-850.
- Hapner, C.D., Deuster, P., Chen, Y. (2010). Inhibition of oxidative hemolysis by quercetin, but not other antioxidants. [*Journal Of Chemical And Biological Interfaces*](#)186(3), 275-279.
- Haraguchi, H., Saito, T., Ishikawa, H., et al. (1996). Antiperoxidative components in *Thymus vulgaris*. *Planta Medica* 62, 217-221.
- Harborne, J.B., and Williams, C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504.
- Harris, C.M., Massey, V. (1997). The oxidative half-reaction of xanthine dehydrogenase with NAD; reaction kinetics and steady-state mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 272, 28335-28341.
- Harrison, R. (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase: Where are we now?. *Free Radical Biology and Medicine* 33, 774-797.
- Harrison, R. (2006). Milk xanthine oxidase: properties and physiological roles. *International Dairy Journal* 16, 546-554.
- Harvsteen, B.M. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics* 96, 67-202.
- Hassimotto, N. M. A., Pinto, M. D., & Lajolo, F. M. (2008). Antioxidant status in humans after consumption of blackberry (*Rubus fruticosus* L.) juices with and without defatted milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(24), 11727-11733.
- Hayet, E., Maha, M., Mata, M., Mighri, Z., Laurant, G., Mahjoub, A. (2010). Biological activities of *Peganum harmala* leaves. *African Journal of Biotechnology* 9(48), 8199-8205.
- Hellsten-Westing, Y. (1993). Immunohistochemical localization of xanthine oxidase in human cardiac and skeletal muscle. *Histochemistry* 100, 215-222.
- Hille, R., and Massey, V. (1981). Studies on the oxidative half-reaction of xanthine oxidase. [*Journal of Biological Chemistry*](#) 256, 9090-9095.

- Hille, R., Anderson, R.F. (1991). Electron transfer in milk xanthine oxidase as studied by pulse radiolysis. *Journal of Biological Chemistry* 266, 5608-5615.
- Holley, A.E. and Cheeseman, K.H. (1993). Measuring free radical reactions *in vivo*. *British Medical Bulletin* 49, 494-505.
- Hollman, P.C.H., Katan, M.B. (1997). Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 51, 305-310.
- Hsieh, C.Y., Chang, S.T. (2010). Antioxidant activities and xanthine oxidase inhibitory effects of phenolic phytochemicals from *Acacia confusa* twigs and branches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 1578-1583.
- Huang, T.C., Hsu, H.K., Fu, H.Y., Ho, C.T. (2005). Effect of lactic acid fermentation on quercetin composition and antioxidant properties of *Toona sinensis* leaves. In F. Shahidi & C.T. Ho (Eds.), *Phenolic compounds in foods and natural health products* (pp.46–56). Washington, DC: ACS Division of Agricultural and Food Chemistry, Inc..
- Ichimori, K., Fukahori, M., Nakazawa, H., Okamoto, K., and Nishino, T. (1999). Inhibition of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase by nitric oxide. Nitric oxide converts reduced xanthine-oxidizing enzymes into the desulfo-type inactive form. *Journal of Biological Chemistry* 274, 7763-7768.
- Im, J. H., Jin, Y. R., Lee, J. J., Yu, J. Y., Han, X. H., Im, S. H., et al. (2009). Antiplatelet activity of beta-carboline alkaloids from *Peganum harmala*: a possible mechanism through inhibiting PLC gamma2 phosphorylation. *Vascular Pharmacology* 50, 147-152.
- Iserin, P. (2001). *Encyclopédie Encyclopedia of Medicinal Plants*. La Rousse. 2nd Edition, pp. 244-245.
- Ismail, H.I., Chan, K.W., Mariod, A.A., Ismail, M. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (*cucumis melo*) methanolic extracts. *Food Chemistry* 119, 643-647.
- Itoh, T., Imano, M., Nishida, S. (2012). (2)-Epigallocatechin-3-gallate increases the number of neural stem cells around the damaged area after rat traumatic brain injury. *Journal of Neural Transmission - Springer* 119(8), 877-890.
- Iwalewa, E.O., McGaw, L.J., Naidoo, V., Eloff, J.N. (2007). Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *African Journal of Biotechnology* 6, 2868-2885.

- Jaakola, L., Hohtola, A. (2010). Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. *Plant, Cell & Environment* 33(8), 1239-1247.
- Jahaniani, F., Ebrahimi, S. A., Rahbar-Roshandel, N., Mahmoudian, M. (2005). Xanthomicrol is the main cytotoxic component of *Dracocephalum kotschyii* and a potential anti-cancer agent. *Phytochemistry* 66, 1581-1592.
- Jayaprakasha, G. K., Singh, R. P., Sakariah, K. K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chemistry* 73, 285-290.
- Kang, H.M., Saltveit, M.E. (2002). Antioxidant capacity of lettuce leaf tissue increases after wounding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 7536-7541.
- Kartal, M., Altun, M.L., Kurucu, S. (2003). HPLC method for the analysis of harmol, harmalol, harmine and harmaline in the seeds of *Peganum harmala*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 31, 263-269.
- Kaur, C., Kapoor, H.C. (2002). Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science & Technology* 37, 53-161.
- Kelley, E. E., Kelley, N. K. H., Hundley, N. J., Malik, U. Z., Freeman, B. A., Tarpey, M. M. (2010). Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free Radical Biology and Medicine* 48, 493-498.
- Khan, A. M., Qureshi, R. A., Ullah, F., Shinwari, Z.K., Khan, J. (2012). Flavonoids distribution in selected medicinal plants of margalla hills and surroundings. [*Pakistan Journal of Botany* 44\(4\), 1241-1245.](#)
- Khan, O. Y. (1990). Studies in the chemical constituents of *Peganum harmala* L. PhD Thesis, H.E.J. Research Institute of Chemistry University of Karachi, Paki
- Khenouf, S., Amira, S., Arrar, L., Baghiani, A. (2010). Effect of Some Phenolic Compounds and *Quercus* Tannins on Lipid Peroxidation. *World Applied Sciences Journal* 8 (9), 1144-1149.
- Kholmatov, Kh., Kharlamov, I.A., Mavlankulova, Z.I. (1998). Medicinal plants of Central Asia (In Russian). Med Lit Publ Ibn Sino. Tashkent 296.
- Kirtikar, K.R., & Basu, B.D. (1995). *Indian Medicinal Plants*. Dehradune, India: International Book Distributors.

- Kitagawa, S., Sugiyama, Y., Sakuma, T. (1996). Inhibitory effects of catechol derivatives on hydrophilic free radical initiator-induced hemolysis and their interaction with hemoglobin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)* 44, 881-4.
- Klinenberg, J.R., Goldfinger, S.E., Seegmiller, J.E. (1965). The effectiveness of xanthine oxidase inhibitor allopurinol in the treatment of gout. *Annals of internal medicine* 62, 639-647.
- Kohen, R., Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology* 30, 620-630.
- Koleva, I.I., van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., de Groot, A., Evstatieva, L.N. (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis* 13(1), 8-17.
- Kooij, A. (1994). A re-evaluation of the tissue distribution and physiology of xanthine oxidoreductase. *Histochemical Journal* 26, 889-915.
- Kooij, A., Bosch, K.S., Frederiks, W.M., and Van Noorden, C.J.F. (1992). High levels of xanthine oxidoreductase in endothelial, epithelial and connective tissue cells in rat tissues. A relation between localization and function. *Virchows Archiv [B] Cell Pathology* 62, 143-150.
- Kostyuk, V.A., Potapovich, A.I., Suhan, T.O., De Luca, C., Korkina, L.G. (2011). Antioxidant and signal modulation properties of plant polyphenols in controlling vascular inflammation. [*European Journal of Pharmacology*](#) 658(2_3), 248-256.
- Kouri, G., Tsimogiannis, D., Bardouki, H., Oreopoulou, V. (2007). Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8, 155-162.
- Krishnamoorthy, M., Sasikumar, J.M., Shamna, R., Pandiarajan, C., Sofia, P., Nagarajan, B. (2011). Antioxidant activities of bark extract from mangroves, *Bruguiera cylindrica* (L.) Blume and *Ceriops decandra* Perr. *Indian Journal of Pharmacology* 43(5), 557-562.
- Kuhn, M.A., Winston, D. (2000). Herbal therapy and supplement, a scientific and traditional approach. lippincot, New York, pp. 347-350.
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* 84(3), 329-339.
- Kunwar, A., Priyadarsini, K.I. (2011). Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *Journal of Medical and Allied Sciences* 2, 53-60.

- Labuschagne, C. F., Brenkman, A. B. (2013). Current methods in quantifying ROS and oxidative damage in *Caenorhabditis elegans* and other model organism of aging. *Ageing Research Reviews* 12, 918-930.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laitonjam W. S. (2012). Natural Antioxidants (NAO) of Plants Acting as Scavengers of Free Radicals, Chapter 9. In *Studies in Natural Products Chemistry Vol. 37*. (review)
- Lamchouri, F., Settaf, A., Cherrah, Y., Zemzami, M., Lyoussi, B., Zaid, A., et al. (1999). Antitumour principles from *Peganum harmala* seeds. *Therapie* 54, 753-758.
- Landolfi, R., Mower, R.L., Steiner, M. (1984). Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. *Biochemical Pharmacology* 33, 1525-1530.
- Le, K., Chiu, F., Ng, K. (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry* 105, 353-363.
- Leite, A. V., Malta, L. G., Riccio, M. F., Eberlin, M. N., Pastore, G. M., Marostica, M. R. (2011). Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried Jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(6), 2277-2283.
- Lespade, L., Bercion, S. (2010). Theoretical study of the mechanism of inhibition of xanthine oxydase by flavonoids and gallic acid derivatives. *Journal of Physical Chemistry* 114, 921-928.
- Li, W., Hydamaka, A.W., Lowry, L., Beta, T. (2009). Comparison of antioxidant capacity and phenolic compounds of berries, chokecherry and sea buckthorn. [*Central European Journal of Biology*](#)
- 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 Chemistry* 102, 771-776.
- Lin, C.M., Chen, C.S., Chen, C.T., Liang, Y.C., and Lin, J.K. (2002). Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 294, 167-172.
- Liu, F., Ng, T.B. (2000). Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. *Life Science* 66(8), 725-735.

- Liu, W., Wang, H., Yao, W., Gao, X., Yu, L. (2010). Effects of sulfation on the physicochemical and function properties of a water-insoluble polysaccharide preparation from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 3336-3341.
- [Lobo](#), V., [Patil](#), A., [Phatak](#), A., [Chandra](#), N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews* 4(8), 118-126.
- Lotito, S.B., Frei, B. (2006). Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon?. *Free Radical Biology and Medicine* 41, 1727-1746.
- Lucy Chen, B.A., Judy, Y., Hu, M.D., Steven, Q., Wang, M.D. (2012). The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. *Journal of the American Academy of Dermatology* 67, 1013-1024.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C. (2005). Nature et diversité des composés phénoliques des végétaux. In : *Les composés phénoliques des végétaux*, Presses polytechniques et universitaires Fomandes: Italie, 1^{er} édition 1-33.
- Machlin, L.J., Bendich, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The Journal of American Societies for Experimental Biology* 1, 441-445.
- Mahmoudian, M., Jalilpour, H., Salehian, P. (2002). Toxicity of *Peganum harmala*. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics* 1, 1-4.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability *The American Journal of Clinical Nutrition* 79, 727-747.
- Manna, C., D'angelo, S., Migliardi, V., Loffredi, E., Mazzoni, O., Morrica, P., Galletti, P., Zappia, V. (2002). Protective effect of the phenolic fraction from virgin olive oils against oxidative stress in human cells. *Journal of agricultural and food chemistry* 50, 6521-6526.
- Markham, K.R. (1982). Techniques of flavonoid identification. *Academic press, London*, Chap. 1 and 2, 1-113.
- Martin, H.M., Moore, K.P., Bosmans, E., Davies, S., Burroughs, A.K., Dhillon, A.P., Tosh, D., Harrison, R. (2004). Xanthine oxidoreductase is present in bile ducts of normal and cirrhotic liver. *Free Radical Biology and Medicine* 37, 1214-1223.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., et al. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 16, 577-586.

- Massey, V., Edmondson, D. (1970). On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by cyanide. *Journal of Biological Chemistry* 245, 6595-6598.
- Mather, I.H. (2000). A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane. *Journal of Dairy Science* 83, 203-247.
- Matsumura, F., Yamaguchi, Y., Goto, M., Ichiguchi, O., Akizuki, E., Matsuda, T., Okabe, K., Liang, J., Ohshiro, H., Iwamoto, T., Yamada, S., Mori, K., and Ogawa, M. (1998). Xanthine oxidase inhibition attenuates kupffer cell production of neutrophil chemoattractant following ischemia-reperfusion in rat liver. *Hepatology* 28, 1578.
- Mazunder, U.K., Gupta, M., Rajeshwar, Y. (2005). Antihyperglycemic effect and antioxidant potential of *phyllanthus niruri* (euphorbiaceae) in streptozotocin induced diabetic rats. *European Bulletin of Drug Research* 13(1), 13-23.
- Mc Cord, J. (1993). Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance. *Clinical Biochemistry* 26-32.
- Mc Cord, J.M. (1985). Oxygen-derived free radicals in post ischemic tissue injury. *New England Journal of Medicine* 312, 159-163.
- McCord, J. M., and Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte (hemocaprein). *Journal of Biological Chemistry* 244, 6049-6055.
- Mendes, L., de Freitas, V., Baptista, P., Carvalho, M. (2011). Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. *Food and Chemical Toxicology* doi:10.1016/j.fct.2011.06.028.
- Meneshian, A.V.E.D., Bulkley, G.B. (2002). The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. *Microcirculation* 9, 161-175.
- Milde, J., Elstner, E.F., Grabmann, J. (2004). Synergistic inhibition of Low-density lipoprotein oxidation by rutin, terpinene, and ascorbic acid. *Phytomedicine* 11, 105-113.
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148.
- Moghadam, M. S., Maleki, S., Darabpour, E., Motamedi, H., Nejad, S. M. S. (2010). Antibacterial activity of eight Iranian plant extracts against methicillin and cefixime resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 3, 262-265.

- Moorhouse, P.C., Grootvelt, M., Halliwell, B., Quinlan, J.G., and Gutteridge, M.C.J. (1987). Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *European Journal of Biochemistry Letters* 213, 23-28.
- Morin D., Thiery H., Spedding M., Tillement J., P. (2001). Mitochondria as target for antiischemic drugs. *Journal of Physiology and Pharmacology* 13, 22-67.
- Moura, D. J., Richter, M. F., Boeira, J. M., Pegas Henriques, J. A., & Saffi, J. (2007). Antioxidant properties of betacarboline alkaloids are related to their antimutagenic and antigenotoxic activities. *Mutagenesis* 22, 293-302.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, J. M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M. J., Parajo, J. C.(2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry* 72, 145-171.
- Moussard, C. (2006). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. In: *Biochimie structural et métabolique*, De boeck: Bruxelles, 3^{eme} édition, pp. 321-335.
- Munir, C., Zaidi, M.I., Ahmad, N., Attaur, R. (1995). An Easy Rapid Metal Mediated Method of Isolation of Harmine and Harmaline from *Peganum harmala*. *Fitoterapia* 1,73.
- Nakamura, M., Yamazaki, I. (1982). Preparation of bovine milk xanthine oxidase as dehydrogenase form. [*The Journal of Biochemistry*](#) 92, 1279-1286.
- Nenaah, G. (2010). Antibacterial and antifungal activities of (beta)-carboline alkaloids of *Peganum harmala* (L) seeds and their combination effects. *Fitoterapia* 81(7), 779-782.
- Ng, T.B., Li, W.W., Yeung, H.W. (1986). A steryl glycoside fraction with hemolytic activity from tubers of *Momordica cochinchinensis*. *Journal of Ethnopharmacology* 18 (1), 55-61.
- Nishino, T., Nishino, T. (1997). The conversion from the dehydrogenase type to the oxidase type of rat liver xanthine dehydrogenase by modification of cysteine residues with fluorodinitrobenzene. [*The Journal of Biological Chemistry*](#) 272, 29859-29864.
- Nishino, T., Okamoto, K., Eger, B.T., Pai, E.F., Nishino, T. (2008). Mammalian xanthine oxidoreductase mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology Journal* 275, 3278-3289.
- Nishino, T., Okamoto, K., Kawaguchi, Y., Hori, H., Matsumura, T., Eger, B.T., Pai, E.F., 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. [*The Journal of Biological Chemistry*](#) 280, 24888-24894.

- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Analytical Biochemistry* 95(2), 351-358.
- Okamoto, K., Eger, B. T., Nishino, T., Kondo, S., Pai, E. F., Nishino, T. (2003). An extremely potent inhibitor of xanthine oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry* 278, 1848-1855.
- Olson, J. S., Ballou, D. P., Palmer, G., Massey, V. (1974). The mechanism of action of xanthine oxidase. *Journal of Biological Chemistry* 249, 4363-4382.
- Ong, K.C., Khoo, H.E. (2000). Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Science* 67, 1695-1705.
- Ozen, T., Demirtas, I., Aksit, H. (2011). Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii*. *Food Chemistry* 124, 58-64.
- Ozsoy, N., Can, A., Yanardag, R., Akev, N. (2008). Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. *Food Chemistry* 110, 571-583.
- Ozturk, F., Gul, M., Ates, B., Ozturk, I.C., Cetin, A., Vardi, N., Otlu, A., 2009. Protective effect of apricot (*Prunus armeniaca* L.) on hepatic steatosis and damage induced by carbon tetrachloride in Wistar rats. [British Journal of Nutrition](#) 102, 1767-1775.
- Pacher, P., Nivorozhkin, A., Szabó, C. (2006). Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of Allopurinol. *Pharmacological Reviews* 58, 87-114.
- Pari, L., Latha, M. (2005). Antidiabetic effect of *Scoparia dulcis*: effect on lipid peroxidation in streptozotocin diabetes. [General Physiology and Biophysics](#) 24, 13-26.
- Parks, D. A., Granger, D. N. (1986). Xanthine oxidase: Biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiologica Scandinavica* 548, 87-99.
- Parks, D.A., Williams, T.K., Beckman, J.S. (1988). Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. [American Journal of Physiology](#) 254, 768-774.
- Pavlou, P., Rallis, M., Deliconstantinos, G., Papaioannou, G., Grando, S. A. (2009). *In-vivo* data on the influence of tobacco smoke and UV light on murine skin. [Toxicology and Industrial Health](#) 25, 231-239.
- Perez, H. D., Weksler, B. B., Goldstein, I. M. (1990). Generation of chemotactic lipid from arachidonic acid by exposure to a superoxide generation system. *Inflammation* 4, 313-328.

- Perron, N. R., Brumaghim, J. L. (2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. [*Cell Biochemistry and Biophysics*](#) 53, 75-100.
- Pham-Huy, Lien, Ai., He, Hua., Pham-Huy, Chuong. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. [*International Journal of Biomedical Science*](#) 4(2), 89-96.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. [*Journal of Natural Products*](#) 63, 1035-42.
- Pincemail, J, Meurisse, M, Limet, R., Defraigne, J. O. (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons* 4 (5). (review)
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O. (2002). Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 3 (16), 233-239.
- Podsędek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables. A review. *Food Science and Technology* 40, 1-11.
- Prashanth, D., John, S. (1999). Antibacterial activity of *Peganum harmala*. *Fitoterapia* 70, 438-439.
- Pulpati, H., Biradar, Y. S., Rajani, M. (2008). High-performance thin-layer chromatography densitometric method for the quantification of harmine, harmaline, vasicine, and vasicinone in *Peganum harmala*. *Journal of AOAC International* 91(5), 1179-1185.
- Rajasekaran, S., Sivagnanam, K., Subramanian, S. (2005). Antioxidant effect of Aloe vera gel extract instreptozotocin-induced diabetes in rats *Pharmacological Reports* 57, 90-96.
- Ramarathnam, N., Osawa, T., Ochi, H., Kawakishi, S. (1995). The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends in Food Sciences and Technology* 6, 75.
- Rastelli, G., Costantino, L., and Albasini, A. (1997). A model of the interaction of substrates and inhibitors with xanthine oxidase. [*Journal of the American Chemical Society*](#) 119, 3007-3016.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Annala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolourisation assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 1231-1237.
- Read G., Randat R. (1988). Structure and properties of thiobarbituric acid malonaldehyde chromogen. *Journal of The Chemical Society* 1103-1105.
- Read, M. A. (1995). Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents Vascular. [*American Journal of Pathology*](#) 147(2), 235-237.

- Record, I. R., Dreosti, I. E., McInerney, J. K. (2001). Changes in plasma antioxidant status following consumption of diets high or low in fruit and vegetables or following dietary supplementation with an antioxidant mixture. *British Journal of Nutrition* 85(4), 459-464.
- Ricciarelli, R., Zingg, J.M., Azizi, A. (2001). Vitamin E: protective role of a Janus molecule. *FASEB Journal* 15, 2314-2325.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B. (1995). The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*. 22, 375-383.
- Rop, O., Mlcek, J., Jurikova, T., Valsikova, M., Sochor, J., Reznicek, V., Kramarova, D. (2010). Phenolic content, antioxidant capacity, radical oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibiting activities of extracts of five black chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot) cultivars. [*Journal of Medicinal Plants Research*](#) 4(22), 2431–7.
- Rott, K. T., Agudelo, C. A. (2003). Gout. *Journal of the American Medical Association* 289, 2857-2860.
- Rundles, R.W., Metz, E.N., Sliberman, H.R. (1966). Allopurinol in the treatment of gout. *Annals of Internal Medicine* 64, 229-258.
- Sahreem, S., Khan, M. R., Khan, R. A. (2010). Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chemistry* 122, 1205-1211.
- Sala, A., Recio, M.C., Giner, R.M., Mane, S., Rios, J.L. (2000). Anti-phospholipase A2 and anti-inflammatory activity of *Santolina chamaecyparissus*. *Life Science* 66, 35-40.
- Sanchez-Moreno, C. (2002). Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International* 8, 121-137.
- Sanders, S., Eisenthal, R.S., and Harrison, R. (1997). NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase – reneration of superoxyde anion. *European Journal of Biochemistry* 245, 541-548.
- Sandhar, H. K., Kumar, B., Prasher S., Tiwari, P., Salhan, M., Sharma, P. (2011). A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia* 1(1), 25-41.
- Sanz, J. F., Garcia-Sarrion, A., Marco, J. A. (1991). Germacrane derivatives from *Santolina chamaecyparissus*. *Phytochemistry* 30, 3339-3342.

- Sardina, J. L., López-Ruano, G., Sánchez-Sánchez, B., Lianillo, L., [Hernández-Hernández](#), A. (2012). Reactive oxygen species: Are they important for haematopoiesis?. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 81, 257–274.
- Sarikurkcu, C. Tepe, B. Daferera, D. Polissiou, M. Harmandar, M. (2008). Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Marrubium globosum* subsp. *Globosum* (Lamiaceae) by three different chemical assays. *Bioresource Technology* 99, 4239-4246.
- Sathishsekar, D., Subramanian, S. (2005). Antioxidant properties of *Momordica Charantia* (bitter gourd) seeds on Streptozotocin induced diabetic rats. [Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition](#) 14(2), 153-158.
- Sezik, E., Yesilada, E., Shadidoyatov, H., Kuliev, Z., Nigmatullaev, A.M., Aripov, H.N. (2004). Folk Medicine in Uzbekistan. I. Toshkent, Djizzah and Samarqand provinces. *Journal of Ethnopharmacol* 92, 197-207.
- Sharaf, M., el-Ansari, M.A., Matlin, S.A., Saleh, N.A. (1997). Four flavonoid glycosides from *Peganum harmala*. *Phytochemistry* 44, 533-536.
- Shinde, A., Ganu, J., Naik, P. (2012). Effect of free radicals & antioxidants on oxidative stress: A review. *Journal of Dentistry and Allied Science* 2, 63-66.
- Shyu, Y.S., Lin, J.T., Chang, Y.T., Chiang, C.J., Yang, D.J. (2009). Evaluation of antioxidant ability of ethanolic extract from dill (*Anethum graveolens* L.) flower. *Food Chemistry* 115, 515–521.
- Sies, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. (1991). [American Journal of Medicine](#) 91, 31-38.
- Silliman, K., Parry, J., Kirk, L. L., & Prior, R. L. (2003). Pycnogenol does not impact the antioxidant or vitamin C status of healthy young adults. *Journal of the American Dietetic Association* 103(1), 67-72.
- Silva, A. M. O., Vidal-Novoa, A., Batista-Gonzalez, A. E., Pinto, J. R., Mancini, D. A. P., Reina-Urquijo, W., et al. (2012). In vivo and in vitro antioxidant activity and hepatoprotective properties of polyphenols from *Halimeda opuntia* (Linnaeus) Lamouroux. *Redox Report* 17, 47-53.
- Simoes, C. M.O., Amoros, M., and Girre, L. 1999. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. *Phytotherapy Research* 13, 323-328.
- Sorg, O. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies* 327, 649-662.

- Sowndhararajan, K., Joseph, J.M., Rajendrakumaran D. (2012). In vitro xanthine oxidase inhibitory activity of methanol extracts of *Erythrina indica* Lam. leaves and stem bark. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* S1415-S1417.
- Stevens, C.R., Miller, T.M., Clinch, J.G., Kanczler, J.M., Bodamyali, T., Blake, D.R. (2000). Antibacterial properties of xanthine oxidase in human milk. *Lancet* 356, 829-830.
- Stewart, R. C., Hille, R., Massey, V. (1984) Characterization of arsenite-complexed xanthine oxidase at room temperature. Spectral properties and pH-dependant redox behaviour of the molybdenum-arsenite center. *Journal of Biological Chemistry* 259, 14426-14436.
- Sudha, G., sangeetha priya, M., indhu shree, R., vadivukkarasi, S. (2011). *in vitro* free radical scavenging activity of raw pepino fruit (*solanum muricatum* aiton). *International Journal of Current Pharmaceutical Research* 3(2), 0975-7066.
- Suresh, B., Srirama, S., Dhanaraja, S.A., Elango, K., Chinnaswamy, K. (1997). "Anticandidal activity of *Santolina chamaecyparissus* volatile oil." *Journal of Ethnopharmacology* 55(2), 151-159.
- Takebayashi, J., Chen, J., Tai, A. (2010). A Method for Evaluation of Antioxidant Activity Based on Inhibition of Free Radical-Induced Erythrocyte Hemolysis. D. Armstrong (ed.), *Advanced Protocols in Oxidative Stress II, Methods in Molecular Biology*, vol 594, 287-296. (review)
- Thannickal, V.J., Fanburg, B.L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *The American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 279, 1005-1028.
- Tsao, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols (2010). *Nutrients* 2, 1231-1246.
- Tsimogiannis, D.I., Oreopoulou, V. (2006). The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3',4'-hydroxy substituted members. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 7, 140-146.
- Tuberoso C I G, Montoro P, PiacenteS, Corona G, Deiana M, Dessi M A, Pizza C and Cabras P (2009). Flavonoid characterization and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts from *Achillea ligustica* All. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 50, 440-448.
- Tulipani, S., Armeni, T., Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J.M., Gonzalez-Paramas, A.M., Santos-Buelga, C., Busco, F., Principato, G., Bompadre, S., Quiles, J.L., Mezzetti, B., Battino, M. (2014). Strawberry intake increases blood fluid, erythrocyte and mononuclear cell defenses against oxidative challenge. *Food Chemistry* 156, 87-93.

- Tunalier, Z., Koşar, M., Küpeli, E., Caliş, I., Başer, K.H. (2006). Antioxidant, anti-inflammatory, anti-nociceptive activities and composition of *Lythrum salicaria* L. extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 4;110(3), 539-547.
- Tung, Y.-T., Wu, J.-H., Huang, C.-Y., Kuo, Y.-H., and Chang, S.-T. (2009). Antioxidant activities and phytochemical characteristics of extracts from *Acacia confusa* bark. *Bioresource Technology* 100, 509-514.
- Umamaheswari, M., Asokkumar, K., Sivashanmungam, A. T., Remyarayu, A., Subhadredevi, V., Ravi, T. K. (2009). In vitro xanthine oxidase inhibitory activity of the fraction of *Erythrina stricta* Roxb. *Journal of Ethnopharmacology* 124, 646-648.
- Unverzagt, J. (2013). African rue. In: *Field guide wyoming weed watchlist*, edited by: Steven L. miller, university of wyoming extension: USA 47-49.
- Urban, M.K., Zainol, A., Abd-Hamid, S., Yusof, R. Muse. (2003). Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.). *Food Chemistry* 81, 575-581.
- Valente, M.J., Baltazar, A.F., Henrique, R., Estevinho, L., Carvalho, M., (2011). Biological activities of Portuguese propolis: protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. *Food and Chemical Toxicology* 49, 86–92.
- Valko, M., Dieter, L., Jan, M., Mark, T.D., Cronin, Milan, Mazur, Joshua Telser. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 44-84.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160(1), 1-40.
- Van Acker, S. A. B. E., van Balen, G. P., van den Berg, D. J., Bast, A., van der Vijgh, S. A. B. E. (1998). Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochemical Pharmacology* 56(8), 935-943.
- Van Acker, S.A.B.E., van den Berg, D.J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., van Bennekom, W.P., van der Vijgh, W.J.F., Bast, A. (1996). Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* 20, 331-342.
- Van Hoorn, D.E.C., Nijveldt, R.J., Van Leeuwen, P.A.M., Hofman, Z., M'Rabet, L., De Bont, D.B.A., and Van Norren, K. (2002). *European Journal of Pharmaceutical* 451, 111-118.

- Vorbach, C., Harrison, R., Capecchi, M. (2003). Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *Trends in Immunology* 24, 512-517.
- Wang, D., Wang, L., Zhu, F., Zhu, J., Chen, X. D. L. Z., Saito, M., Li, L. (2008). In vitro and in vivo studies on the antioxidant activities of the aqueous extracts of Douchi (a traditional Chinese salt-fermented soybean food). *Food Chemistry* 107, 1421-1428
- Wardman, P., Candeias Fenton, L.P. (1996). Chemistry: an introduction. *Radiation Res* 145, 523-531.
- Watanabe, T., Misawa, S., Hiradate, S., Osaki, M. (2008). Characterization of root mucilage from *Melastoma malabathricum*, with emphasis on its roles in aluminum accumulation. *New Phytologist* 178, 581-589.
- Widlansky, M. E., Duffy, S. J., Hamburg, N. M., Gokce, N., Warden, B. A., Wiseman, S., et al. (2005). Effects of black tea consumption on plasma catechins and markers of oxidative stress and inflammation in patients with coronary artery disease. *Free Radical Biology & Medicine* 38(4), 499-506.
- Williams, R.J., Spencer, J.P.E., Rice Evans, C. (2004). Flavonoids: antioxidants or signaling molecules?. *Free Radical Biology and Medicine* 7, 838-849.
- Wong, S.P., Leong, L.P., William Koh, J.H. (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry* 99, 775-783.
- Wu, N., Zu, Y., Fu, Y., Kong, Y., Zhao, J., Li, X., Li, J., Wink, M., Efferth, T.(2010). Antioxidant activities and xanthine oxidase inhibitory effects of extracts and main polyphenolic compounds obtained from *Geranium sibiricum* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 4737-4743.
- Xia, M., Dempski, R., and Hille, R. (1999). The reductive half-reaction of xanthine oxidasereactionwith aldehyde substrats and identification of the catalytically labile oxygen. *Journal of Biological Chemistry* 274, 3323-3330.
- Yalçın, D., Bayraktar, O. (2009). Screening of Some Plant-Derived Alkaloids and Phenolics for Catechol-OMethyltransferase Inhibition. *International Journal of Natural and Engineering Sciences* 3 (2), 23-27.
- Young, J.L., Boswell, R.B., Nies, A.S. (1974). Severe allopurinol hypersensitivity. association with Thiazides and Prior Renal Compromise. *Archives of internal medicine* 134, 553-559.
- Zabri, H., Kodjo, C., Beni, A., Marnyrbekova, B., Ko, J., Bekro, Y.A. (2008). Phytochemical screening and determination of flavonoids in *Secamone afzeli* (Asclepiadaceae) extracts. *African journal of Pure and Applied Chemistry* 2(8), 80-82.

- Zhang, A., Zhu, Q.Y., Luk, Y.S., Ho, K.Y., Fung, K.P., Chen, Z.Y. (1997). Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers free radical induced lysis of red blood cells. *Life Science* 61(4), 383-394.
- Zhao, H., Fan W., Dong J., Lu J., Chen J., Shan L., Lin Y., Kong W. (2008). Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties. *Food Chemistry* 107, 296-304.
- Zheng, W., Wang, S.Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected. *herbs*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(11), 5165-5170.
- Zhong, W., Yan, T., Lim, R., Oberley, L.W., 1999. Expression of superoxide dismutases, catalase, and glutathione peroxidase in glioma cells. [*Free Radical Biology & Medicine*](#) 27, 1334-1345.
- Zhou, F. G., Chen, Y., Liu, S., Yao, X., Wang, Y. (2013). In vitro and in vivo hepatoprotective and antioxidant activity of ethanolic extract from *Meconopsis integrifolia* (Maxim.) Franch. *Journal of Ethnopharmacology* 148, 664-670.
- Zhu, J.X., Wang, Y., Kong, L.D., Yang, C., and Zhang, X. (2004). Effects of *Biota orientalis* extract and its flavonoid constituents, quercetin and rutin on serum uric acid levels in oxonate-induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver. *Journal of Ethnopharmacology* 93, 133-140.
- Zou, Y.P., Lu, Y.H., Wei, D.Z. (2004). Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 5032-5039.

ملخص: تحدف هذه الدراسة إلى تقدير النشاط المضاد للأكسدة لمستخلصات نباتي الحمرا *Peganum harmala* والجعدة *Santolina chamaecyparissus* المستعملان في الطب الشعبي بالجزائر. بينت نتائج التقدير الكمي لعديدات الفينول والفلافونيدات أن مستخلص إيثيل أسيتات لنبات الجعدة (EAE-Sc) يحتوي على أعلى كمية من المركبات الفينولية والفلافونيدات قدرت بـ 373.83 ± 0.23 مغ مكافئ حمض الغاليك /غ من الوزن الجاف و 61.51 ± 7.86 مغ مكافئ كيرستين/غ من الوزن الجاف للنباتة، على التوالي. تم تقدير النشاط المضاد للأكسدة مخبريا (*in vitro*)، باستعمال إختبار إزاحة الجذور الحرة DPPH و ABTS حيث أظهر مستخلص EAE-Sc أعلى نشاطية إزاحية للجذور الحرة في الإختبارين، بالإضافة إلى إختبار تثبيط فوق أكسدة الليبيدات باستعمال β -carotene و FTC، حيث أظهرت النتائج أن مستخلص إيثيل الأسيتات لنبات الحمرا (EAE- Ph) يملك أعلى قدرة (94.21 ± 0.003 %) بالنسبة لإختبار β -carotene. أما فيما يخص إختبار FTC فقد ظهرت أعلى نسبة تثبيط بالمستخلص الخام لنبات الجعدة (CE-Sc). استعمل تقدير MDA كمؤشرا لفوق الأكسدة الليبيدية، وقد سجل مستخلص EAE-Ph أقل امتصاصية. بين إختبار استخلاص المعادن باستعمال Ferrozine أن المستخلص الخام لنبات الحمرا CE-Ph يملك أعلى قدرة ($IC_{50} = 0.32 \pm 0.009$ مغ/مل). بينت نتائج إختبار قدرة المستخلصات على تثبيط الإنزيم المؤكسد للكروماتين (XO) وإزاحة جذر O_2^{\bullet} الناتج عنه أن أعلى نشاطية كانت للمستخلص الكلووروفورمي وإيثيل الأسيتات لنبات الجعدة (EAE-Sc و CHE-Sc). في حين سجلت أعلى قدرة إزاحية لجذر O_2^{\bullet} للمستخلص الكلووروفورمي لنبات الحمرا (CHE-Ph). تمت دراسة النشاط المضاد للأكسدة في الكائن الحي (*in vivo*) للمستخلص الميثانولي لكل من *P. harmala* (MOHE-Ph) و *S. chamaecyparissus* (MOHE-Sc) عن طريق النشاط الكلية للبالزما (APC : antioxidant plasma capacity) باستعمال إختبار DPPH والقدرة الإرجاعية. ماعدا القدرة الإرجاعية للمستخلص MOHE-Sc، لم تبد المستخلصات تأثيرا معنويا. من جهة أخرى، أظهرت نتائج تقدير نشاطية إنزيم الكاتالاز (CAT) ومستويات MDA و GSH في نسيج الكبد ارتفاعا معنويا في نشاطية CAT عند المعاملة بكل من MOHE-Sc و MOHE-Ph بنسبة 59,16 % و 35 %، على التوالي. كما رفعت من مستوى GSH بنسبة 59,21 % و 50,44 %، على التوالي. كما خفضت من مستوى MDA بنسبة 79,56 % و 63,48 %، على التوالي. وبينت دراسة قدرة المستخلصات على تثبيط الانحلال الدموي *in vivo* في وجود المؤكسد t-BH، أن MOHE-Ph يملك تأثيرا تثبيطيا قريبا من المستخلص MOHE-Sc ($HT50 = 78,51 \pm 11,32$ و $72,05 \pm 4,95$ دقيقة، على التوالي). بينت النتائج المحصل عليها أن كل من نبات *P. harmala* و *S. chamaecyparissus* يملكان القدرة على حماية نسيج الكبد من الإجهاد التأكسدي وهذا التأثير يعود أساسا إلى ميزاتهم المضادة للأكسدة، وهذا ما يفسر الإستعمال الطبي الشعبي الواسع لهما.

Abstract : The aim of this study is to evaluate the antioxidant activity of the extracts from *Peganum harmala* and *Santolina chamaecyparissus* which are largely used in traditional medicine in Algeria. The estimation of polyphenols and flavonoids showed that the Ethyl Acetate extract of *S. chamaecyparissus* (EAE-Sc) contains a high amount of phenolic compounds and flavonoids: 373.83 ± 0.23 mg gallic acid equivalent and 7.86 ± 61.51 mg quercetin equivalent/g of dried weigh, respectively. The DPPH and ABTS tests were used to evaluate the antioxidant activity *in vitro*. The EAE-Sc showed the highest scavenging activity of free radicals in both tests. The inhibition of lipid peroxydation test using FTC and β -carotene showed that the ethyl acetate extract of *P. harmala* (EAE-Ph) had the highest rate (94.21 ± 0.003 %) in β -carotene test, but for the FTC test the highest inhibition rate was noticed with crud extract of *S. chamaecyparissus* (CE-Sc). The MDA evaluation was used as indicator of lipid peroxydation. The low absorption was found in EAE-Ph level. The capacity of the extracts to chelate the mineral ions was tested using Ferrozine. The crud extract of *P. harmala* (CE-Ph) showed a high capacity to chelate ferrous ions (IC_{50} : 0.32 ± 0.009 mg/ml). The extracts were studied for their ability of inhibition effect on XO and O_2^{\bullet} scavenging activity. The results showed that the chloroform extract of *S. chamaecyparissus* (CHE-Sc) and EAE-Sc have the highest inhibiting activity of XO, but the chloroform extract of *P. harmala* (CHE-Ph) showed the greatest scavenging effect on O_2^{\bullet} with an IC_{50} : 0.037 ± 0.0053 mg/ml. The antioxidant activity of methanol extract of *P. harmala* (MOHE-Ph) and *S. chamaecyparissus* (MOHE-Sc) *in vivo* was estimated using the antioxidant plasma capacity (APC), DPPH and reducing power tests. Except for the reducing power of MOHE-Sc, all extracts did not show any significant change. The activity of catalase (CAT), the level of MDA and GSH were evaluated in mouse liver homogenate. The results showed a high significant increase in CAT activity with MOHE-Sc and MOHE-Ph, by 59.16 % and 35 %, respectively, and also in the GSH levels by 59.21 % and 50.44 %, respectively. However they decreased the level of MDA by 79.56 % and 63.48 %, respectively. The Evaluation of the plant extracts capacity to inhibit the hemolysis of blood *in vivo* in the presence of the oxidant (tBH), showed that MOHE-Ph has an inhibition effect comparable with MOHE-Sc (78.51 ± 11.32 min and 72.05 ± 4.95 min, respectively). The present study showed that the *P. harmala* and *S. chamaecyparissus* have the capacity to protect liver tissue from oxidative stress and this effect is probably due to their antioxidant capacity, which explain the large use of these plants in traditional medicine.

Resumé : L'objectif de la présente étude est d'estimer l'activité antioxydante des extraits de deux plantes, *Peganum harmala* et *Santolina chamaecyparissus* largement utilisées en médecine traditionnelle en Algérie. L'extrait acétate d'éthyle de *S. chamaecyparissus* (EAE-Sc) renferme une grande quantité de composés phénoliques et de flavonoïdes avec des teneurs de 373.83 ± 0.23 mg d'équivalent acide gallique et 61.51 ± 7.86 mg d'équivalent quercetin/g de poids sec de la plante, respectivement. L'activité antioxydante a été évaluée *in vitro* par l'utilisation des tests de DPPH et ABTS. L'extrait EAE-Sc a montré l'effet le plus élevé dans les deux tests. L'examen de l'activité anti-péroxydation lipidique évaluée par les tests β -carotène et FTC, a montré que l'extrait acétate d'éthyle de *P. harmala* (EAE-Ph) présente l'effet inhibiteur le plus puissant dans le test β -carotène, par contre dans le test FTC, l'effet de l'extrait brut de *S. chamaecyparissus* (CE-Sc) est le plus élevé. L'évaluation du MDA utilisée comme indicateur de la peroxydation lipidique a montré la faible absorbance a été enregistrée au niveau de EAE-Ph. La capacité des extraits de capter les ions minéraux testée par l'utilisation de ferrozine a indiqué que l'extrait brut de *P. harmala* (CE-Ph) présente l'activité chélatrice la plus puissante (IC_{50} : 0.32 ± 0.009 mg/ml). D'autre part, l'évaluation de la capacité des extraits d'inhiber la xanthine oxydase (XO) et d'éliminer le radical O_2^{\bullet} qu'elle produit, a montré que l'extrait chloroformique de *S. chamaecyparissus* (CHE-Sc) et EAE-Sc sont plus actifs. Cependant, la plus grande capacité d'éliminer le radical O_2^{\bullet} est observée avec l'extrait chloroformique de *P. harmala* (CHE-Ph). L'activité antioxydante, *in vitro*, estimée par la capacité antioxydante plasmatique (CAP), le test DPPH et le test du pouvoir réducteur a montré que seul le MOHE-Sc possède un effet réducteur. L'activité de la catalase (CAT) et les taux du MDA et du GSH ont été évalués dans l'homogénat du foie de souris. Les résultats montrent une augmentation significative dans l'activité de la CAT par MOHE-Sc et MOHE-Ph (59.16 % et 35 %, respectivement), en plus d'une augmentation du taux du GSH de 59.21 et 50.44%, respectivement et d'une diminution du taux du MDA de 79.56 % et 63.48 %, respectivement. L'évaluation de la capacité des extraits d'inhiber l'hémolyse des globules rouges *in vivo* en présence d'un oxydant tBH, a montré que le MOHE-Ph possède un effet inhibiteur de l'hémolyse similaire à celui du MOHE-Sc (78.51 ± 11.32 et 72.05 ± 4.95 min, respectivement). La présente étude montre que les plantes *Peganum harmala* et *Santolina chamaecyparissus* possèdent une capacité de protéger le foie contre le stress oxydatif et que cet effet est probablement dû à leurs capacités antioxydantes. Ceci explique leur grande utilisation en médecine traditionnelle.