الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

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

قسم البيوكيمياء

N°...../SNV/**20**

أطروحة

مقدمة من طرف

جيدل صليحة

للحصول على شهادة

دكتوراه علوم

فرع: بيولوجيا

تخصص: بيوكيمياء

الموضوع

تقدير المحتوى الفينولي والتأثير المضاد للأكسدة لمستخلصات نباتات

Artemisia campestris L. و *Pistacia lentiscus* L.

و *Argania spinosa* L.

نوقشت بتاريخ 2015/03/08

أمام لجنة المناقشة

الرئيس	بلحطاب رشيد	أستاذ	جامعة سطيف 1
المشرف	خنوف الصديق	أستاذ	جامعة سطيف 1
الممتحنون	خليفي توهامي فطيمة	أستاذ	جامعة قسنطينة 1
	بومرفق صباح	أستاذ محاضر أ	جامعة برج بوعريريج

مخبر العلاج الطبيعي المطبق على الأمراض المزمنة

المنشورات العلمية

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

- Khennouf S, Benchiekh D, **Djidel S**, Dahamna S, Amira S, Charef N, Baghiani A Harzallah D and Arrar L. (2013) Polyphenols and antioxidant properties of extracts from *Mentha pulegium* L and *Matricaria chamomilla* L.. *Pharmacgnosy Communications.* 3(2): 35-40.

- **Djidel S** and Khennouf S. (2014) Radicals scavenging, reducing power, lipid peroxidation inhibition and chelating properties of extraxts from *Artemisia campestris* L. aerial parts. Annual Research/Review in Biology. 4(1): 1691-1701.

- **Djidel S**, Khennouf S. (2014) Evaluation of phenolic compounds, flavonoids and antioxidant properties of Argania spinosa L.) Skeels leaves extracts.

التظاهرات العلمية

- Khennouf S, Benarab A, **Djidel S**, Dahamna S, Baghiani A, Charef N, Harzallah D and Arrar L. Phenolic content and antioxidant properties of *Artemisia campestris* L. extracts. 10th international symposium of pharmaceutical sciences (ISOPS10) University of Ankara, Turkey, 26-29 juine 2012.

- Khennouf S, **Djidel S**, Benchiekh D, Dahamna S, Amira S, Charef N, Baghiani A, Harzallah D and Arrar L. Polyphenols and antioxidant properties of extracts from *Mentha pulegium* L and *Matricaria chamomilla* L. extracts. 10th international symposium of pharmaceutical sciences (ISOPS10) University of Ankara, Turkey, 26-29 juine 2012.

- **Djidel S**, Khennouf S, Baghiani A Dahamna S, Charef N, Harzallah D and Arrar L. in vitro antioxidant properties of *Artemisia campestris* L extracts. 2nd African congress on biology and health, University of Setif 1, Algeria, 10-12 November 2012.

- Bouaziz A, Khennouf S, Bentahar A, **Djidel S** and Amira S. Phytotherpy of hypertension in setif region (eastern Algeria). 2nd African congress on biology and health, University of Setif 1, Algeria, 10-12 November 2012.

الفهرس

الملخص بالعربية

الملخص بالانجليزية

الملخص بالفرنسية

قائمة الأشكال

قائمة الجداول

قائمة المختصرات

التشكرات

مقدمــة.....1

1. الإجهاد التأكسدي.....4

1. 1 الأنواع الأكسجينية النشطة.....4

1. 2 الأنواع النتروجينية النشطة.....7

1. 3 مصادر الأنواع الأكسجينية النشطة.....8

1. 4 نتائج الاجهاد التأكسدي.....12

1. 4. 1 أكسدة الليبيدات.....12

1. 4. 2 أكسدة DNA 13

1. 4. 3 أكسدة البروتينات 14

1. 5 مضادات الأكسدة 15

1. 5. 1 مضادات الأكسدة الإنزيمية.....16

1. 5. 2 مضادات الأكسدة غير الإنزيمية.....17

2. المركبات الفينولية.....21

2. 1 الأحماض الفنولية.....22

2. 1. 1 الأحماض المشتقة من حمض Hydroxybenzoic.....22

2. 1. 2 الأحماض المشتقة من حمض Hydroxycinnamic.....22

2. 2 الفلافونويدات.....23

2. 3 الستيبينات.....26

2. 4 اللجنينات.....26

2. 5 الدبـاغ.....27
2. 5. 1 الدباغ المميهة 27
2. 5. 2 الدباغ المكثفة.....27
2. 6 الخصائص البيولوجية للفلافونويدات.....28
2. 7 النشاطية المضادة للأكسدة لعديدات الفينول.....30
2. 8 علاقة البنية الكيميائية بالنشاطية المضادة للأكسدة.....31
2. 9 التأثير المؤكسد لعديدات الفينول.....33
3. النباتات المستعملة في الدراسة.....34
3. 1 نبات الضرو (*Pistacia lentiscus* L.).....35
3. 2 نبات اتقفت (*Artemisia campestris* L.).....37
3. 3 نبات الأرغانيا (*Argania spinosa* L.).....39
المواد والطرق.....42
1. المواد.....42
1. 1 العينات النباتية.....42
1. 2 المواد الكيميائية.....42
2. الطرق.....43
2. 1 استخلاص المركبات الفينولية.....43
2. 2 تقدير عديدات الفينول الكلية.....44
2. 3 تقدير عديدات اللافونويدات الكلية.....45
2. 4 تقدير كمية الدباغ الكلية.....46
2. 5 التأثير الإزاحي باستعمال اختبار DPPH 47
2. 6 إختبار ازاحة جذر ABTS.....48
2. 7 إختبار ازاحة جذر الهيدروكسيل.....49
2. 8 القدرة الارجاعية.....49
2. 9 اختبار النشاطية المضادة لأكسدة حمض الينولييك.....50
2. 10 إختبار بيتا-كاروتين/حمض اللينولييك.....51
2. 11 إختبار مسك الحديد.....52

2. 12 القدرة المضادة لانحلال كريات الدم الحمراء.....53
2. 13 دراسة النشاطية المضادة للأكسدة للمستخلصين الخامين لنباتي *P. lentiscus* و *A. campestris* على مستوى الأنسجة الحية.....53
2. 13. 1 معاملة الحيوانات.....53
2. 13 .2 أخذ الدم.....54
2. 13. 3 قتل الحيوانات و أخذ الأعضاء.....55
2. 13. 4 تقدير البروتينات الكلية.....55
2. 13. 5 تقدير أكسدة اللبيدات (TBARS) في كل من الكبد.....55
2. 13. 6 تقدير مستوى GSH.....56
2. 13. 7 تقدير النشاطية الإنزيمية لـ catalase.....57
14.2 التحليل الاحصائي.....58
النتائج والمناقشة **59**
1. استخلاص المركبات الفينولية.....59
2. تقدير المركبات الفينولية والفلافونويدات والدباغ من العينات النباتية.....61
3. التأثير الازاحي باستعمال اختبار DPPH و ABTS.....65
4. اختبار ازاحة جذر الهيدروكسيل.....73
5. اختبار β-carotene / حمض اللينولييك.....78
6. القدرة الارجاعية.....84
7. قدرة المستخلصات النباتية على مسك الحديد.....88
8. أكسدة الليبيدات باختبار Ferric thiocyanate.....93
9. قدرة المستخلصات النباتية على حماية كريات الدم من الإنحلال.....98
10. تأثير المعاملة بالمستخلص الهيدروميثانولي لـ *P. lentiscus* و *A. campestris*.....102
10. 1 تقدير أوزان الجرذان.....102
10. 2 وزن الكبد وتقدير بروتيناته.....104
10. 3 تقدير مستويات MDA في الكبد.....106
10. 4 تقدير نشاطية Catalase في الكبد.....108
10. 5 تقدير مستويات GSH في الكبد.....110
10. 6 النشاطية المضادة للأكسدة للبلازما باستعمال اختبار DPPH.....112
10. 7 القدرة الإرجاعية للبلازما.....114

خاتمة.....**117**
المراجع.....**121**

ملخص

في دراستنا الحالية تم تحضير أربع مستخلصات لكل من النباتات الثلاث *Pistacia lentisus* (Pl)، *Artemisia campestris* (Ac) و*Argania spinosa* (As): المستخلص الميثانولي (CE) ومستخلص الكلوروفوم (CHE) ومستخلص الإيثيل أستات (EAE) والمستخلص المائي (AQE). بتقدير عديدات الفينول أظهر EAE بالنسبة لنباتي Ac و As القيم الأكبر و CE بالنسبة لـ Pl. سجل EAE لنباتي As و Pl القيمة الأكبر لكمية الفلافونويدات في حين كان CHE لنبات Ac الأغنى. تميز CE لنباتي Pl و As بالكمية الأكبر للدباغ بينما كانت القيمة الأكبر عند EAE لنبات Ac. تقدير التأثير الإزاحي in vitro لجذور DPPH و ABTS و OH^- أكد أن لـ EAE الفعالية الأقوى بالنسبة للنباتات الثلاث، بالإضافة إلى إظهاره للقدرة الإرجاعية الأكبر. أظهر اختبار بيتا–كاروتين /حمض اللينولييك أن CE لـ Pl له النشاطية الأكبر على تثبيط الأكسدة الليبيدية وهذا تؤكده ما يؤكده اختبار ferric-thiocyanate. بيّن اختبار القدرة على مسك أيونات الحديد المرجع أن CE للنباتات الثلاث ممسك جيد للحديد. استطاع CHE أن يزيد من من قيمة HT_{50} وهو الوقت اللازم لإنحلال 50 % من كريات الدم الحمراء المحرض بـ AAPH. تم دراسة النشاطية المضادة للأكسدة لـ CE لنباتي Pl و Ac in vivo عند إناث الجرذان، حيث أن تقديم CE يوميا عن طريق الفم لمدة 14 يوما (100 و200 و400 مغ/كغ/اليوم) أظهر عدم وجود فرق معنوي في كمية GSH في الكبد مقارنة بالمجموعة الشاهدة. من جهة أخرى انخفضت نشاطية انزيم catalase عند المجموعة المعالجة بـ 400 مغ /كغ لنبات Pl. أظهر تقدير كمية MDA أن المستخلصين يثبطا فوق أكسدة اليبيدات لأنسجة الكبد. قياس قدرة البلازما على الإرجاع وإزاحة جذور DPPH بيّنت أن CE لـ Pl و Ac بتركيز 200 مغ/كغ امتلك النشاطية الأعلى. تقديم CE لكلا النباتين (200 مغ/كغ) رفع بطريقة فعالة القدرة الإرجاعية والإزاحية لجذر DPPH للبلازما.

الكلمات المفاتيح: النباتات الطبية، عديدات الفينول، التأثير الإزاحي، التقاط المعادن، فوق أكسدة اليبيدات، القدرة الإرجاعية، النشاطية المضادة للإنحلال، GSH، catalase.

Abstract

In the present study, four extracts were prepared for three plants; *Pistacia lenticus* (Pl), *Artemisia campestris* (Ac) et *Argania spinosa* (As): crude extract (CE), chloroform extract (CHE), ethyl acetate extract (EAE) and aqueous extract (AQE). The quantification of polyphenols showed that the EAE of Ac and As contains the highest amount and CE for Pl plant. EAE of two plants As and Pl registered a highest value for the quantification of flavonoids while the CHE of Ac plant is the highest. CE of Pl and Ac characterized by a highest amount of tannins whereas EAE is a highest for Ac plant. Evaluation of scavenger effect of extracts versus DPPH, ABTS and OH^{-} confirms that EAE has a highest ability for three plants, also its maximum reducing ability. Test of beta-carotene/linoleic acid showed that the CE of Pl represent a highest activity for inhibition of lipidic peroxidation. This activity is confirmed by the test of ferric-thiocyanate. Ferrous ion chelating capacity assay showed that CE of three plants is a good chelator. CHE increased the HT_{50} value (Half-Hemolysis Time) in significant manner when compared with vitamin C. antioxidant activity of CE of two plants Pl and Ac is realized *in vivo* in female rats, the daily oral administration of CE (100, 200 and 400 mg/kg/day) during 14 days, showed no significant different in GSH level in liver when compared with control group. Moreover, the activity of catalase enzyme decreased in group treated by 400 mg/kg of Pl extract. Evaluation of MDA revealed that tow extracts reduce the lipidic peroxidation of liver tissues. The oral administration of CE for tow plants (200 mg/kg) augmented significantly the reducing and scavenger capacity of DPPH radical of plasma.

Key words: Medecinal plants, polyphenols, scavenger effect, chelating capacity, lipidic peroxidation, reducing power, anti-hemolysis activity, GSH, catalase.

Résumé

Dans la présente étude quatre extraits ont été préparés pour les trois plantes; *Pistacia lentiscus* (Pl), *Artemisia campestris* (Ac) et *Argania spinosa* (As): Extrait brute (CE), extrait chloroformique (CHE), extrait d'acétate d'éthyle (EAE) et l'extrait aqueux (AQE). Le dosage des polyphénols a montré que EAE de Ac et As ont la quantité la plus élevée et CE pour la plante Pl. EAE des deux plantes As et Pl ont enregistré la valeur la plus grande pour la quantité des flavonoides alors que CHE de la plante Ac est le plus riche. CE de Pl et As sont caractérisés par la quantité la plus élevée en tannins alors que EAE est le plus riche pour la plante Ac. l'évaluation du pouvoir piégeur des extraits vis-à-vis du DPPH, ABTS et $OH^{\cdot-}$ confirme que EAE a la capacité la plus forte pour les trois plantes, en plus sa capacité réductrice la plus élevée. Le test beta-caroténe/acide linoléique a montré que CE de Pl représente l'activité la plus grande pour l'inhibition de peroxydation lipidique. Cette activité est confirmée par le test de ferrique-thiocyanate. Le test de la capacité chélatrice des ions ferreux a démontré que CE de trois plantes est bon chélateur. CHE a augmenté le temps de demie hémolyse (HT50) de façon significative en comparant par la vitamine C. L'activité antioxydante de CE de deux plantes Pl et Ac est etudiée in vivo chez les rats femelles, l'administration quotidienne par voie orale de CE (100, 200 et 400 mg/kg/jour) pendant 14 jours, a montré aucune différence significative au niveau de GSH dans le foie par apport le groupe temoin. Par ailleurs, l'activité de l'enzyme de catalase a diminué chez le groupe traité par 400 mg/kg de l'extrait de Pl. Le dosage de quantité du MDA a montré que les deux extraits inhibent la peroxydation lipidique des tissus de foie. L'administration orale de CE de deux planes (200 mg/kg/jour) a augmenté significativement la capacité reductrice et le piégeage du radical DPPH de plasma.

Mots clés : Plantes médicinales, polyphénols, effet scavenger, capacité chelatrice, peroxidation lipidique, pouvoir réducteur, activité anti-hémolytique, GSH, catalase

قائمة الأشكال

شكل 1. مسارات تخليق الأنواع الأكسيجينية النشطة وطرق التخلص منها.....5
شكل 2. مواقع انتاج الأنواع الأكسجينية على مستوى الميتوكندري.....9
شكل 3. مراحل فوق أكسدة اللبيدات.....14
شكل 4. طرق التكامل بين مضادات الأكسدة الانزيمية.....16
شكل 5. أقسام الأحماض الفينولية.....23
شكل 6. البنية الأساسية للفلافونويدات.....24
شكل 7. الأقسام المختلفة للفلافونويدات.....26
شكل 8. أقسام الدباغ.....28
شكل 9. مواقع مسك الحديد من طرف الفلافونويدات.....31
شكل 10. آلية تأثير الفلافونويدات الازاحي للجذور الحرة.....32
شكل 11. أجزاء نبات *Pistacia lentiscus* 36
شكل 12. أجزاء نبات *Artemisia campestris*.....37
شكل 13. أجزاء نبات *Argania spinosa*.....40
شكل 14. خطوات إستخلاص المركبات الفينولية لأوراق *P. lentiscus* والجزء الهوائي *A. campestris* وأوراق *A. spinosa*.....44
شكل 15. منحنى العيارية لحمض الغاليك من أجل تقدير عديدات الفينول الكلية.....45
شكل 16. منحنى العيارية للكرستين لتقدير الفلافونويدات في مستخلصات *P. lentiscus* و *A. campestris* و *A. spinosa*.....46
شكل 17. منحنى العيارية لحمض التانيك لتقدير كمية الدباغ الكلية.....47
شكل 18. منحنى العيارية لـ 1,1,3,3-tetraetoxypropane لحساب كمية MDA.....56
الشكل 19. منحنى العيارية لتقدير كمية الغليتاتيون (GSH).....57
شكل 20. نسبة تثبيط جذور DPPH لمستخلصات كل من *P. lentiscus* و *A. campestris* و *A. spinosa*.....70
شكل 21. نسبة تثبيط جذور ABTS لمستخلصات كل من *P. lentiscus* و *A. campestris* و *A. spinosa*.....71
شكل 22. قيم IC_{50} للمستخلصات نباتات *P. lentiscus* و *A. campestris* و *A. spinosa* لازاحة جذور DPPH.....72

شكل 23 . قيم IC_{50} للمستخلصات نباتات *P. lentiscus* و*A. campestris* و *A. spinosa* لازاحة جذور ABTS.....72

شكل 24. ارتفاع نسبة تثبيط جذر الهيدروكسيل بدلالة التركيز لكل من مستخلصات نباتات *P. lentiscus* و *A. campestris* و *A. spinosa*.....75

شكل 25. قيم IC_{50} لمستخلصات نباتات *P. lentiscus* و*A. campestris* و *A. spinosa* من أجل ازاحة جذور الهيدروكسيل.....76

شكل 26. قدرة مستخلصات *P. lentiscus* و*A. campestris* و *A . spinosa* على تثبيط أكسدة b-carotene بدلالة الزمن.....81

شكل 27. مقارنة نسبة التثبيط لمستخلصات *P. lentiscus* و*A. campestris* و *A. spinosa* عند 24 ساعة باستعمال طريقة b-carotene/حمض اللينولييك.....82

شكل 28. القدرة الارجاعية لمستخلصات نباتات *P. lentiscus* و*A. campestris* و *A. spinosa* بدلالة التركي..86

شكل 29. قيم EC_{50} لمستخلصات نباتات *P. lentiscus* و*A. campestris* و *A. spinosa* لدراسة القدرة الارجاعية.....87

شكل 30. نسبة مسك أيونات الحديد لمستخلصات نباتات *P. lentiscus* و*A. campestris* و *A. spinosa* بدلالة التركيز.....91

شكل 31. قيم IC_{50} لمستخلصات نباتات *P. lentiscus* و*A. campestris* و *A. spinosa* من أجل عملية مسك الحديد باستعمال طريقة ferrozine.....92

شكل 32. قدرة مستخلصات نباتات *P. lentiscus* و*A. campestris* و *A. spinosa* على تثبيط أكسدة حمض اللينولييك باستعمال طريقة ferric thiocyanate بدلالة الزمن.....95

شكل 33. مقارنة نسبة التثبيط لمستخلصات *P. lentiscus* و*A. campestris* و *A. spinosa* عند 48 ساعة باستعمال طريقة ferric-thiocyanate.....96

شكل 34. التأثير المثبط لانحلال كريات الدم الحمراء من طرف مستخلصات *P. lentiscus* و*A. campestris* و *A. spinosa*.....100

شكل 35. قيم HT_{50} لمستخلصات نباتات *P. lentiscus* و*A. campestris* و *A. spinosa* من أجل حماية كريات الدم الحمراء من الإنحلال المحرض بـ AAPH.....101

شكل 36. تأثير المستخلصات الخامة لنباتي *P. lentiscus* و*A. campestris* على مستويات MDA الناتجة عن أكسدة الليبيدات في نسيج الكبد.....107

شكل 37. تأثير مستخلصات *P. lentiscus* و*A. campestris* على نشاطية catalase في نسيج الكبد.....109

شكل 38. تأثير المستخلصات الخامة لنباتي *P. lentiscus* و*A. campestris* على مستويات الغليتاتيون (GSH) في الكبد.....111

شكل 39. نسبة تثبيط جذور *DPPH* للمستخلصات الهيدروميثانولية لنباتي *P. lentiscus* و *A. campestris* على مستوى البلازما...*113*
شكل 40. تأثير المستخلصات الهيدروميثانولية لنباتي *P. lentiscus* و *A. campestris* على القدرة الإرجاعية للبلازما...*114*

قائمة الجداول

جدول 1. مردود استخلاص عديدات الفينول في نباتات *P. lentiscus* و *A. campestris* و *A. spinosa*.....59

جدول 2. محتوى عديدات الفنول الكلية [A] والفلافونويدات [B] والدباغ [C] لمستخلصات نباتات *P. lentiscus* و *A. campestris* و *A. Spinosa*.....*62*

جدول 3. محتوى الفلاوفونويدات لـ*مستخلصات نباتات* *P. lentiscus* و *A. campestris* و *A. Spinosa*.....*63*

جدول 4. محتوى الفلاوفونويدات لمستخلصات نباتات *P. lentiscus* و *A. campestris* و *A. Spinosa*.....*64*

جدول 5. تأثير مستخلصات *P. lentiscus* و *A. campestris* على أوزان الجرذان.....103

جدول 6. تأثير مستخلصات *P. lentiscus* و *A.campestris* على تركيز بروتينات الكبد ووزنه.....105

المختصرات

ABTS	2,2-azinobis 3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonate
AQE	Aqueous extract
BHT	Butylatedhydroxy toluene
CAT	Catalase
CE	Crude extract
CHE	Chloroform extract
DHLA	*α-dihydrolipoic acid*
DPPH	2,2'- diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTNB	5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)
EAE	Ethyl acetate extract
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
GPX	Glutathion peroxidase
GPx	Glutathion peroxidase
GSH	Glutathion reduced
GSSG	Glutathion oxidized
GSSG	Oxidized glutathione
H_2O_2	hydrogen peroxide
HOCL	hypochlorous acid
K_3FeCN_6	Potassium ferricyanide
L°	alkyl
LA	Lipoic acid
LDL	Low density lipoprotein
LO	Lipooxigenase
LOO°	peroxyl radical
MDA	Malondialdehyde
MeOH	Methanol
$NO^{\cdot}$	Nitric oxide radical
$O^{\cdot -}_2$	superoxide Radical
$OH^{\cdot}$	Hydroxyl radical
$ONOO^{\cdot -}$	Peroxynitrite

Q10	Ubiquinol 10
RNS	Reactive nitrogene species
ROS	Reactive oxygene species
SD	Standard Deviation.
SOD	Superoxide dismutase
TBA	Thiobarbiritic acid
TCA	Trichloroacetic acid
TNF	Tumor necrosis factor
XO	Xanthine oxidase
XOR	Xanthine oxydoreductase

تشكرات

أحمد الله سبحانه وتعالى و أشكره جزيل الشكر الذي بعونه و توفيقه أتممت بحثي هذا.

أتقدم بالشكر الخالص لأستاذي الفاضل البروفيسور **خنوف الصديق** الذي لم يبخل علينا بتوجيهاته ونصائحه القيمة وكان حريصا دائما على توفير الإمكانيات اللازمة لجميع فريق العمل.

كل الشكر للأستاذ المحترم البروفيسور **بغياني عبد الرحمان** الذي أفادنا كثيرا بنصائحه وإمكانياته العلمية والمادية.

كما أتقدم بخالص شكري و تقديري للأستاذة **حمامنة صليحة، عميرة اسماعيل** والأستاذ **خميسي عمار** على كل المساعدات، التوجيهات والنصائح الثرية القيمة وعلى توفير كل الإمكانيات والوسائل لإتمام هذا البحث.

أتقدم بكل معاني الشكر إلى الأساتذة الكرام:

الأستاذ **بلحطاب رشيد** جامعة سطيف 1 الذي تفضل بترؤس لجنة المناقشة وإثراء الأطروحة بنصائحه القيمة.

الأستاذتين **خليفي توهامي فطيمة** جامعة منتوري قسنطينة 1، **بومرفق صباح** جامعة برج بوعريريج اللتين قبلتا مناقشة الأطروحة وإثرائها بخبراتهما االعلمية ونصائحهما القيمة.

أشكر جميع من أعانني من قريب أو من بعيد : **جميلة عمني، الأستاذة عميرة فطيمة، بوعزيز أمال، بن طاهر آسيا وجنيدي حبيبة.**

مقدمــة

تحتاج خلايا الجسم إلى الأكسجين الذي يتفاعل مع جزيئات الطعام المهضوم بحيث ينتج ثاني أكسيد الكربون والماء والطاقة، وأثناء هذا التفاعل تنشأ بعض المجموعات الوسطية النشطة نتيجة لعمليات التحول الغذائي وهي تلك التي يطلق عليها الجذور الحرة (Free radicals). تعمل هذه الجذور على مهاجمة وتدمير مكونات الخلايا لتحدث بها أضراراً بالغة مؤدية إلى تعطيل وظائفها الخلوية المختلفة. ومع زيادة تراكم الجذور الحرة، تظهر العديد من الأمراض مثل الأمراض الانحلالية وأمراض القلب والأوعية الدموية والسرطان والشيخوخة وغيرها. يستطيع جسم الإنسان السيطرة على هذه السلسلة من التفاعلات في الوقت المناسب، عن طريق نظام يدعى بنظام المواد المضادة للأكسدة داخل الخلايا وتنقسم هذه المضادات إلى انزيمية (catalase و superoxide-dismutase و glutathion-peroxidase) وأخرى غير انزيمية (حمض اليوريك، الغليتاتيون...)، إلا أنه في شروط معينة قد لا تعمل هذه الأنظمة بشكل صحيح مما يزيد من ضرر الأنسجة (Aruoma، 1999). في السنوات الأخيرة زاد الاهتمام بمضادات الأكسدة ذات المصادر الطبيعية بسبب قدرتها على تحصين الجسم ضد غزو الجراثيم والقضاء عليها، كما تقي الجسم من أمراض العصر الشائعة. وتتعدد وظائف مضادات الأكسدة لتغطي معظم حاجات جسم الإنسان من الوقاية والشفاء وترميم أنسجتة وخلايا جسمه. أكدت البحوث العلمية والدراسات الإحصائية أكدت فاعلية هذه المركبات في الوقاية من الأمراض ومقاومتها. تعتبر عديدات الفينول من المستقلبات الثانوية الأكثر انتشارا وتنوعا في المملكة النباتية وقد يعود التأثير الايجابي لهذه النباتات ولو جزئيا إلى وجود هذه

المركبات (Bravo، 1998). تمثل الفلافونويدات القسم الأكبر من هذه المجموعة وتؤدي تأثيرات فعالة مضادة للأكسدة، كما أنها تتميز بتأثيرات ايجابية على صحة الإنسان (Hung وآخرون، 2004). ومن أحد أهم تأثيراتها هي قدرتها على استقرار الأغشية الخلوية وبذلك التخفيض من فوق أكسدة الليبيدات (Chaudhuri وآخرون، 2007).

يعتبر *Pistacia lentiscus* L. (الضرو) و *Artemisia campestris* L. (اتقفت) من النباتات المستعملة في الطب الشعبي في الجزائر لمعالجة اضطرابات الجهاز الهضمي بالاضافة إلى أوراق نبات *Argania spinosa* L. (الأرغانيا) التي تستعمل زيوت ثمارها في المجالات التجميلية والغذائية، وارتأينا دراسة مستخلصات أوراقها لإظهار ما إذا كانت تملك خصائص علاجية. وبعد إستخلاص المركبات النباتية باستعمال المحاليل العضوية متزايدة القطبية والتي تؤدي إلى إعطاء أربع مستخلصات وهي المستخلص الهيدروميثانولي (85%) ومستخلص الكلوروفورم والايثيل أستات والمستخلص المائي، تم تحديد تقدير عديدات الفينول الكلية والفلافونويدات والدباغ للمستخلصات، ومن ثم دراسة االنشاطية المضادة للأكسدة لهذه المستخلصات باستعمال عدة طرق *in vitro* والتي تبين مختلف آليات تأثير عديدات الفينول كمسك أيونات الحديد وتثبيط أكسدة اليبيدات والقدرة الإرجاعية وإزاحة جذور الهيدروكسيل وحماية كريات الدم الحمراء من الإنحلال الناتج عن الإجهاد التأكسدي المحرض باستعمال جذر AAPH. تم أيضا دراسة النشاطية المضادة للأكسدة على مستوى الكائن الحي باستعمال الجرذان الإناث للمستخلصات الخامة لنباتي *P. lentiscus* و *A. campestris* من خلال تقدير النشاطية المضادة الأكسدة الإنزيمية (catalase) وغير الإنزيمية (GSH) على مستوى أنسجة الكبد الذي يعتبر مقر

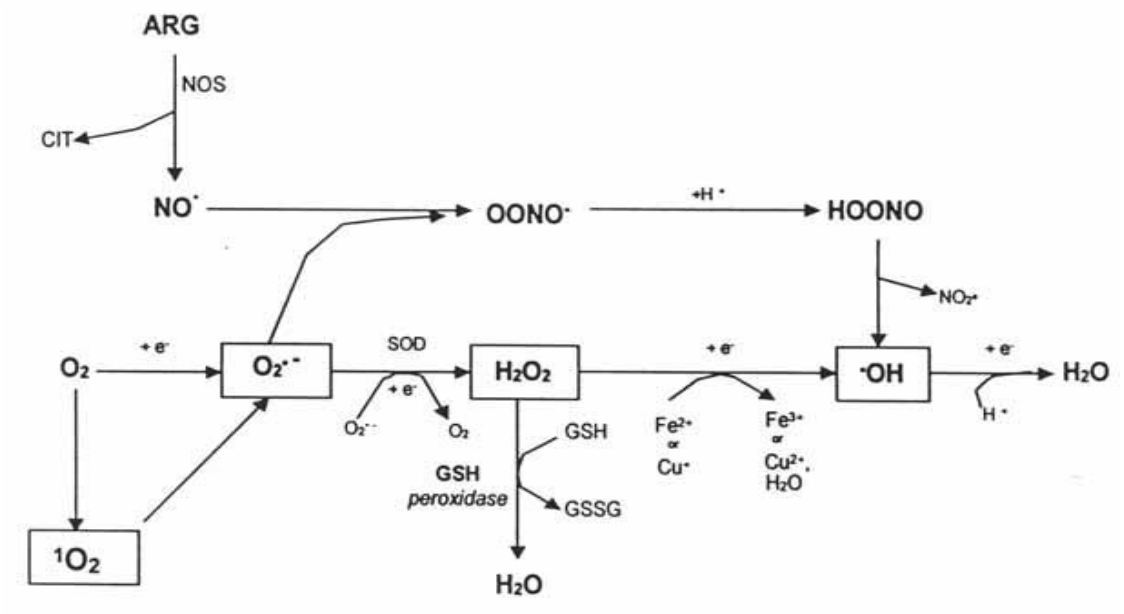
الكثير من التفاعلات الأيضية، بالإضافة إلى قدرة هذه المستخلصات على حماية الأنسجة من فوق أكسدة الليبيدات عن طريق تقدير كمية malonaldialdehyde (MDA) المتشكلة. ولقد قمنا بهذه الدراسة لأن علاج العديد من الأمراض يرتكز على تأثير مضادات الأكسدة خاصة منها الفينولية تجنبا للتأثيرات السلبية لمضادات الأكسدة المصنعة.

1. الإجهاد التأكسدي

أصبح الإجهاد التأكسدي ظاهرة العصر فهو يتسبب في العديد من الاضطرابات الخلوية مؤديا إلى الكثير من المشاكل الصحية. يعرف على أنه اختلال التوازن بين المؤكسدات ومضادات الأكسدة وهذا نتيجة لانخفاض مضادات الأكسدة أو الانتاج المفرط للجذور الحرة (Favier، 2003).

1.1 الأنواع الأكسجينية النشطة

الجذر الحر هو عبارة عن جزيء أو ذرة تحتوي على إلكترون غير مزدوج في مداره الخارجي، وقد تكون تلك الشوارد عضوية أو غير عضوية، ويطلق بعض العلماء مصطلح العامل المؤكسد على الجذر الحر. تبقى الإلكترونات في الأحوال العادية في الجزيئات مزدوجة، وحين يفقد الجزيء أحدها فإنه يصبح غير مستقر ومؤذ للجزيئات الأخرى المجاورة، إذ أن بقاء الإلكترون وحيداً في مداره الخارجي يجعله في حالة بحث دائم ونشط عن الإلكترون المفقود ليكون زوجاً من الإلكترونات المستقرة، وهذا ما يجعله ينتزع إلكتروناً من الجزيئات المجاورة مما يسبب إتلاف جزيئات الخلية الطبيعية في الجسم. وبالرغم من قصر فترة حياة الجذر الحر التي لا تتجاوز أجزاء من الثانية، إلا أن جذراً حراً واحداً قد ينشر حالة من الفوضى أو عدم التوازن وبالتالي نشوء الأمراض. يمكن أن تشتق هذه الجذور من الأكسجين وتسمى الأنواع الأكسجينية النشطة أو من النتروجين وتسمى الأنواع النتروجينية النشطة (Droge، 2002) (شكل1).



شكل1. مسارات تخليق الأنواع الأكسيجينية والنتروجينية النشطة وطرق التخلص منها (Bandyopadhyay وآخرون، 2004).

جذر فوق الأكسيد ($O_2^{\cdot-}$)

تستخدم الثديات حوالي 85–90% من الأكسجين الذي تأخذه الخلايا الحيوانية من البلازما بواسطة الميتوكندريا وذلك لأكسدة المواد الغذائية لانتاج الطاقة الأيضية أي فقد الالكترونيات التي تستقبلها حوامل الالكترونات مثل NAD وFMN وFAD وبدورها تعاد أكسدة هذه المركبات المختزلة بالأكسجين الموجود في الميتوكندريا وينتج من ذلك ATP حسب التفاعل 1 (Li وآخرون، 2013).

$$O_2 + 4é + 4H^+ \longrightarrow 2H_2O \qquad (1)$$

إن الانزيم النهائي في سلسلة نقل الالكترونات cytochrome c oxidase يضيف 4 إلكترونات للأكسجين إلا أنه خلال عملية مرحلية تتولد أنواع الأكسجين المختزلة جزئيا (منقوصة الالكترون) وهو مايعرف بجذر فوق الأكسيد ($O_2^{\cdot-}$) (تفاعل 2).

$$O_2 + 1é \longrightarrow O_2^{\cdot-} \qquad (2)$$

ينتج جذر فوق الأكسيد أيضا عن طريق انزيم NADPH oxidase المتواجد على مستوى الخلايا الطلائية الوعائية كما يمكن أن ينتج هذا الجذر عن طريق الأكسدة الذاتية للموصلات العصبية (الأدرينالين، الدوبامين ...الخ) والمركبات الكبريتية ومرافقات الانزيمات المرجعة ($FADH_2$، $NADH_2$) (Halliwell و Guettridge، 1999). يتم التخلص من جذر فوق الأكسيد بواسطة انزيم superoxyde dismutase (SOD) (تفاعل 3) ويوجد نوعين من SOD يملك أحدهما النحاس والزنك في موقعه النشط ويسمى Cu-Zn-SOD ويتمركز أساسا في السيتوبلازم، أما الآخر فيحتوي على المنغنيز (Mn) ويسمى Mn-SOD ويتواجد في المتوكندري (Jay وآخرون، 2006).

$$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} \longrightarrow H_2O_2 + O_2 \quad (3)$$

بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2)

لا يعتبر بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) جذرا حرا وإنما جزيئا فعالا ينتج خلال الارجاع غير التام للالكترونات بوجود انزيمات الأكسدة (aminoacide oxidase و glycolate oxidase و urate oxidase) المتواجدة أساسا في الليزوزوم. من جهة أخرى يعتبر الغشاء الخارجي للميتوكندري موقعا لانزيم monoacide oxidase القادر على تشكيل H_2O_2 (تفاعل 4).

$$O_2 + 2\acute{e} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 \quad (4)$$

تنظم التراكيز المرتفعة لـ H_2O_2 بواسطة انزيم catalase المتواجد في البيروكسيزوم، حيث يقوم بتحفيز تحول H_2O_2 إلى O_2 و H_2O (تفاعل 5) بينما يقوم انزيم glutathion peroxydase المتواجد في السيتوبلازم بتحفيز تفاعل أكسدة glutathion (GSH) بوجود H_2O_2 (تفاعل 6) (Handy وآخرون، 2012).

$$H_2O_2 + H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2 \quad (5)$$

$$H_2O_2 + 2GSH \longrightarrow 2H_2O + GSSG \quad (6)$$

جذر الهيدروكسيل ($OH^{\cdot}$)

يمكن أن يتشكل $OH^{\cdot}$ ابتداءا من H_2O_2 في تفاعل غير إنزيمي يتم تحفيزه بأيونات الحديدوز (Fe^{+2})، ويسمى هذا التفاعل بتفاعل Fenton (تفاعل 7). يعتبر جذر الهيدروكسيل جزيء نشطا جداً ويمكن أن يتفاعل مع البروتينات والأحماض النووية والليبيدات وغيرها من الجزيئات ليغير من تركيبها ويسبب تلفاً للأنسجة رغم تميزه بفترة حياة قصيرة جدا قدرت بحوالي 10^{-9} ثانية، يساهم $O_2^{\cdot -}$ أيضا في انتاج هذا الجذر عن طريق تفاعله مع H_2O_2 ويسمى بتفاعل Haber–Weiss (تفاعل 8) (Valko وآخرون، 2007).

$$H_2O_2 + Fe^{+2} \longrightarrow OH^{\cdot -} + OH^{-} \quad (7)$$

$$H2O2 + O_2^{\cdot -} \longrightarrow O_2 + OH^{\cdot -} + OH^{-} \quad (8)$$

تعتبر الأنواع الأكسجينية النشطة (ROS) الأكثر نشاطا وانتشارا في الأوساط البيولوجية، ويمكنها أن تتفاعل مع مركبات كيميائية أخرى معطية أنواعا أكثر فعالية مثل تفاعل H_2O_2 مع أيون الكلور لتشكيل حمض الإيبوكلوريس (HOCL) بوجود انزيم myeloperoxydase (تفاعل 9) (Jing و Zhang، 2013).

$$H_2O_2 + CL^{-} \longrightarrow HOCL + H_2O \quad (9)$$

2.1 الأنواع النتروجينية النشطة

ينتج جذر أكسيد الأزوت ($NO^{\cdot}$) في الأنسجة البيولوجية بواسطة انزيم nitric oxide synthase (NO_S) عن طريق أكسدة L- arginine. يلعب أدوارا فيزيولوجية مهمة، فهو يعتبر كناقل عصبي ومنظّم لضغط الدم وله دور في آليات الدفاع المناعي واسترخاء العضلات الملساء، يملك

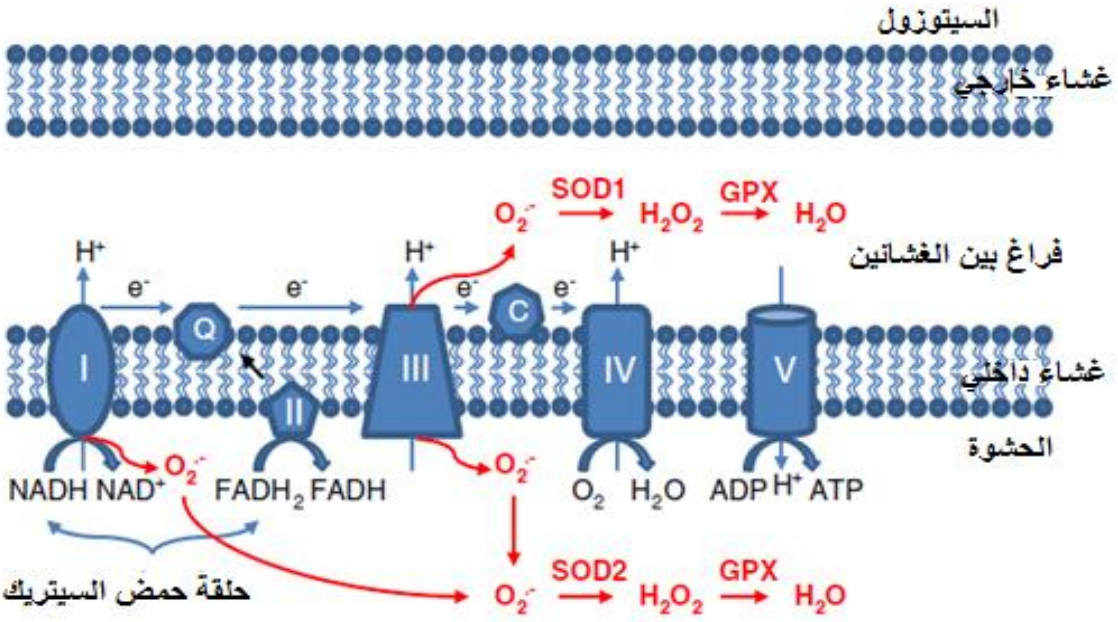
جذر $NO\cdot$ استقرارا أكبر في الأوساط منخفضة الأكسجين (أكثر من 15 ثانية)، كما أن ذوبانه في الأوساط المائية والدهنية يجعله أكثر انتشارا في السيتوبلازم والأغشية الخلوية (Valko وآخرون، 2007). يمكن لهذا الجذر أن يتفاعل مع O_2 وH_2O لتشكيل النيترات وأيون النتريت على التوالي، بالإضافة إلى امكانية اتحاده أيضا مع $O_2^{\cdot-}$ خلال التفاعلات الالتهابية لانتاج كميات معتبرة من أيون $ONOO^{\cdot-}$ الذي يعتبر من أكثر الجذور المؤكسدة للجزيئات البيولوجية خاصة منها الدهون و ADN (Carr وآخرون، 2000).

$$NO\cdot + O_2^{\cdot-} \longrightarrow ONOO^{\cdot-} \quad (10)$$

3.1 مصادر الأنواع الأكسجينية النشطة

1.3.1 المصادر الداخلية

تمثل الميتوكندري مصدرا رئيسيا لإنتاج الأنواع الأكسجينية النشطة (شكل 2)، فحوالي 1-2 % من الأكسجين المستهلك يمكن أن يتحول إلى $O_2^{\cdot-}$ وينتج بشكل أساسي عن طريق انزيم NADH dehydrogenase (المركب I) و ubiquinone-cytochrome- bc1 (المركبIII) (Gutierrez وآخرون، 2006). يكون مستوى $O_2^{\cdot-}$ مرتبطا بنشاط انزيم Mn-SOD الموجود في حشوة الميتوكندري، والذي يحوله إلى H_2O_2 وO_2. يمكن لانزيم monoamine oxidase الواقع في الغشاء الخارجي للميتوكندري أن يكون مصدرا آخرا لانتاج H_2O_2 (Noori، 2012) (شكل 2). تعتبر الميتوكندري أيضا موقعا مهما لانتاج $OH\cdot$ في وجود إجهاد تأكسدي (Thomas وآخرون، 2009).



شكل 2. مواقع إنتاج الأنواع الأكجينية النشطة على مستوى الميتوكندري (Li وآخرون، 2013).

إنزيم NADPH oxidase

نتيجة لتنشيط الخلايا البالعة بما فيها المتعادلة وأحادية النواة والكبيرة بوجود أجسام غريبة مثل البكتيريا يقوم انزيم NADPH oxidase بانتاج كميات عالية من جذر $O_2^{\cdot-}$ بتحويل الإلكترونات من NADPH إلى الأكسجين الجزيئي. إن جذر $O_2^{\cdot-}$ الناتج يمكنه أن يكون طليعا لمركبات أخرى لها قدرة أكبر على أكسدة الجزيئات البيولوجية (Quinn و Schepetkin، 2009). تحتوي الخلايا الليفية وخلايا العضلة الملساء الوعائية على هذا الانزيم الذي يستعمل NADH أو NADPH لإنتاج $O_2^{\cdot-}$ (Griendling وآخرون، 2000؛ Rey و Pagano 2002).

إنزيم Xanthine oxidase (XO)

يعتبر XO مصدرا مهما لانتاج جذر $O_2^{\cdot-}$ و H_2O_2 من خلال أكسدة xanthine أو hypoxanthine إلى حمض اليوريك خلال الأمراض الإلتهابية (Kelley وآخرون، 2010). وجد أيضا أن XO

يستطيع تحويل nitrate و nitrite إلى nitrite و $NO^{\cdot}$ على التوالي، كما يمكن لهذا الانزيم أن ينشط تفاعل $NO^{\cdot}$ و $O_2^{\cdot-}$ لانتاج $OONO^{\cdot-}$ (Godbar وآخرون، 2000).

إنزيم Nitric oxide synthase (NOS)

يتم انتاج $NO^{\cdot}$ في الأنسجة الحيوانية بواسطة انزيم nitric oxide synthase الذي يتواجد على ثلاثة أشكال وهي eNOS (endothelial nitric oxide synthase) و nNOS (neuronal nitric oxide synthase) و iNOS (inducible nitric oxide synthase). ينظم عمل الشكلين الأول والثاني بوجود أيونات الكاليسيوم ويحفزان أكسدة L-arginine في وجود الأكسجين الجزيئي و tetrahydrobiopterin (BH4) و NADPH كمرافقات انزيمية لانتاج كميات منخفضة من $NO^{\cdot}$ قصد أداء وظائف فيزيولوجية معينة. بينما يعمل iNOS (NOS2) بطريقة مستقلة عن الكالسيوم ويكون منظما بواسطة NFkB وينشط بوجود وسائط التهابية مثل السيتوكينات والنواتج البكتيرية فيؤدي إلى انتاج كمية من NO أكبر بـ 100 مرة من تلك المنتجة من طرف الانزيمات الأساسية. في غياب L-arginine أو tetrahydrobiopterin لوجود إجهاد تأكسدي يحدث إرجاع الأكسجين الجزيئي إلى $O_2^{\cdot-}$ (Lavie، 2014).

انزيم myeloperoxidase

ينتج انزيم myeloperoxidase من طرف الخلايا المتعادلة والأحادية خلال تنشيطها بسبب عدة عوامل كدخول الأجسام الغريبة ويستعمل H_2O_2 لانتاج حمض hypochlorous (HOCl)، كما يملك انزيم myeloperoxidase نشاطية peroxidase الذي يؤكسد عدة مواد عضوية لتشكيل أنواع نشطة أخرى (Wassmann وآخرون، 2004).

انزيم lipoxygenase و cyclogenase

يعتبر انزيم 5-lipoxygenase مصدرا مهما لانتاج ROS في الخلايا اللمفاوية (Bonizzi وآخرون، 2000) ويقوم هذا الإنزيم بأكسدة الأحماض الدهنية غير المشبعة في مواقع كربونية نوعية لإعطاء أحماض الهيدروبيروكسيل (LOOH). تؤكسد العديد من الانزيمات النوعية مثل 5-LO، 12-LO ، 15-LO حمض arachidonic لتعطي مركبات تحدث تغيرا في توازن الأكسدة والارجاع متسببة في تحريض مسالك نقل الاشارة وتعبير المورثات (Yamamoto، 1992)، يتدخل LOX أيضا في انتاج جزيئات H_2O_2 على مستوى الخلايا اللمفاوية بعد ارتباطه على CD_{28} وبالاستجابة إلى الانترلوكين 1 (Bonizzi وآخرون، 2000). يساهم انزيم cyclogenase في انتاج ROS في الخلايا المحفزة بواسطة عامل النخر الورمي (TNF) والأنترلوكين 1 والسكريات الليبيدية البكتيرية (Feng Xi وآخرون، 1995).

المعادن

تعتبر أيونات المعادن المرجعة الموجودة بشكل حر مثل النحاس والحديد محفزات قوية في تفاعلات الأكسدة، فبتفاعل أيونات الحديد بشكلها المرجع (Fe+2) مع H_2O_2 في وجود الأكسجين تتشكل جذور أكثر أكسدة من نوع ferryl (FeO^{2+}) و perferryl (FeO_2^{+}) والتي تؤدي إلى ادخال الليبيدات في سلسلة تفاعلات الأكسدة، كما أن تفاعل H_2O_2 مع أيونات الحديد يؤدي إلى تشكيل OH^{-} الأكثر فعالية وأكسدة للجزيئات البيولوجية (Reis و Spickett، 2012). يمكن للعوامل البيئية والأشعة المؤينة مثلUV والأجسام الغريبة والتعرض لدخان السجائر أن ترفع من إنتاج ROS (Halliwell و Gutteridge، 1999).

4.1 نتائج الاجهاد التأكسدي

تقوم الأنواع الأكسجينية النشطة بتراكيز ضعيفة بأدوار فيزيولوجية مهمة، فهي تستعمل كوسائط منظمة للوظائف البيولوجية مثل توسع الأوعية الدموية أو استعمالها كمراسيل عصبية، كما يتم انتاجها من أجل الدفاع عن الجسم ضد الأجسام الغريبة إلا أن الانتاج المفرط لها يؤدي إلى أضرار على مستوى الجزيئات الخلوية مثل أكسدة الدهون بما فيها الكولسترول الغشائي والأحماض الدهنية الحرة والجزيئات الكبيرة في السائل خارج خلوي والكولاجان (Favier، 2003؛ Michel وآخرون، 2004). وبذلك تلعب الأنواع الأكسجينية النشطة بتراكيزها المرتفعة دورا مهما في تطور العديد من الأمراض مثل مرض السكري وتصلب الشرايين والأمراض العصبية الانحلالية والروماتيزم (Dröge، 2002).

1.4.1 أكسدة الليبيدات

تعتبر الدهون وأساسا الأحماض الدهنية غير المشبعة من الأهداف المهمة لهجوم الجذور الحرة وتمر بثلاث مراحل هي الابتدائية والانتشار والمرحلة النهائية. تبدأ الأكسدة بمهاجمة جذر الهيدروكسيل للجزيئات الدهنية الذي ينزع ذرة هيدروجين من ذرات الكربون الواقعة بين الروابط المزدوجة لتشكيل جذر دهني ($L^{\cdot}$)، يتفاعل هذا الجذر مع الأكسجين الجزيئي لاعطاء جذر البيروكسيل ($LOO^{\cdot}$) وفي مرحلة الانتشار يقوم هذا الأخير بمهاجمة أحماض دهنية أخرى وبهذا تدخل في سلسلة لأكسدة الليبيدات ليتحول إلى جذر آخر هو الهيدروبيروكسيد (Catal'a، 2006). يمكن لجذور الهيدروبيروكسيد الناتجة أن تخضع إلى عدة تغيّرات فإما أن ترجع بواسطة انزيم glutathion peroxydase وإما أن تواصل أكسدتها في وجود الأيونات

المعدنية ويحدث لها تجزءا إلى أحماض ألدهيدية وألكان (ايثان، ايثيلان، بنتان)، حيث التخلص منها عن طريق المسالك الرئوية. يمكن لجذر البيروكسيل بعد تحوله إلى بيروكسيد حلقي وقطع الجزيئة أن يحرر ألدهيدات سامة وهي hydroxynonenal و malonaldialdehyde (شكل 3). يمس هجوم الجذور الحرة البروتينات الليبيدية الجارية في الدم أو الفوسفوليبيدات الغشائية وينتج عن أكسدة هذه الليبيدات الشكل المؤكسد لـ LDL الذي يلتهم من طرف البالعات مشكلا بذلك ترسبات ليبيدية وهذا ما يحدث في أمراض القلب والأوعية، أما أكسدة الليبيدات الغشائية فيغيّر من ميوعة الغشاء وبالتالي تغيير وظائف العديد من المستقبلات والنواقل وعملية نقل الإشارات (Catal'a، 2006).

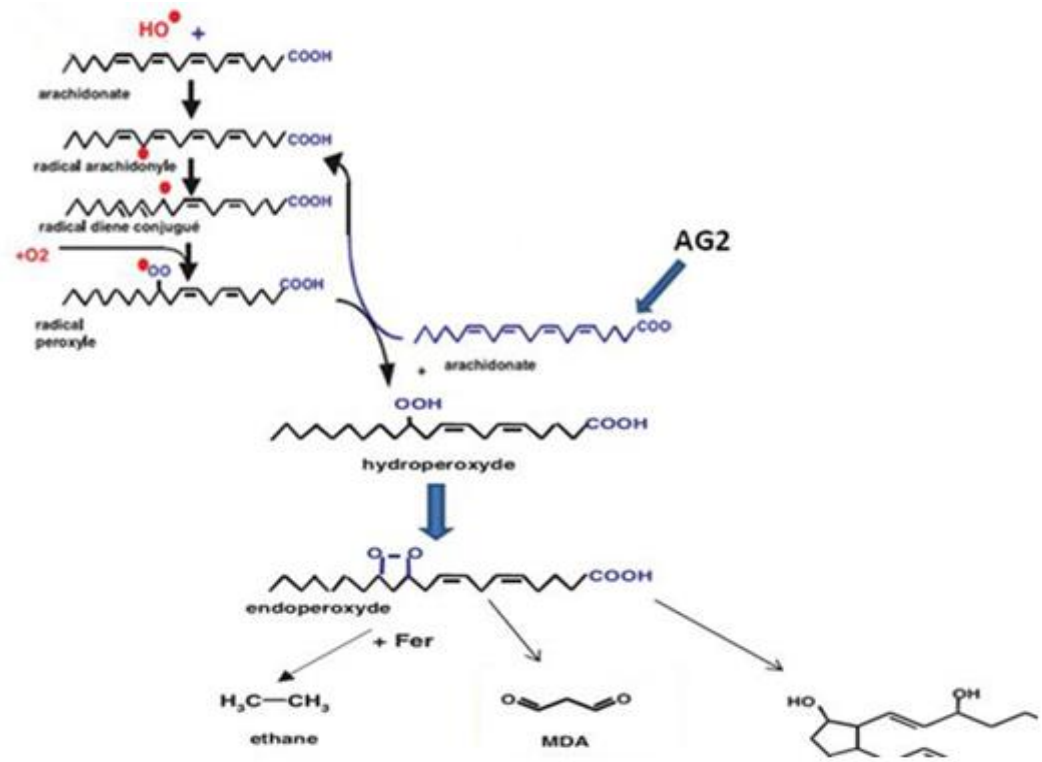
2.4.1 أكسدة DNA

يعتبر الحمض النووي DNA جزيءا حساسا جدا لهجوم الجذور الأكسجينية إذ يتعرض يوميا إلى حوالي 10000 هجوم ويوجد خمس أقسام رئيسية للأضرار الناتجة عن هجوم $OH^{\cdot}$ وهي القواعد المؤكسدة، المواقع اللاقاعدية، الإضافات الداخلية، قطع الأذرع والجسور بين البروتينات و DNA (Cadet وآخرون، 2002). تتعرض القواعد المكونة لل DNA وخاصة الغوانين إلى الأكسدة مؤديا إلى تشكيل قواعد متغيرة منها:

8-oxoguanine، Formamido uracile، formamido pyimidine ، 8- oxoadénine، 8-nitro guanine،

وقد يؤدي الإجهاد التأكسدي إلى قطع الرابطة الموجودة بين القاعدة والسكر الريبي مشكلا مواقعا لاقاعدية ويمكن أن يهاجَم السكر نفسه، كما يمكن للألدهيدات الناتجة عن أكسدة الليبيدات (MDA) أن تشكل إضافات على القواعد الأزوتية من النوع guanine بالإضافة إلى

أن الهجوم الجذري على البروتينات التي لها اتصال بـ DNA مثل الهيستونات والانزيمات وعوامل الاستنساخ والتضاعف يؤدي إلى تشكيل جسور في هذه البروتينات أو إضافات على مستوى القواعد من النوع lysinoguanine (Favier، 2003).



شكل 3. مراحل فوق أكسدة اللبيدات (Favier، 2003).

3.4.1 أكسدة البروتينات

تعتبر البروتينات الحاملة للوظيفة الكبريتية أكثر عرضة للأكسدة مثل الإنزيمات الخلوية وبروتينات النقل، ويؤدي هذا إلى إحداث أضرار غير عكسية، حيث تخضع لتجمعات شبكية أو تتعرض لقطع في حالة الصدمات القوية أو إلى تغيرات على مستوى الأحماض الأمينية عند التعرض لصدمات معتدلة. تفقد البروتينات خصائصها البيولوجية وتصبح أكثر عرضة للتحلل فتصبح هذه البروتينات المؤكسدة كارهة للماء بتثبيط مجموعة الأمين المتأينة أو

بإظهار المناطق الكارهة للماء المركزية وبذلك تشكل كتلا ترتبط مع الليبيدات لتشكل مايعرف lipofuschine المميزة للأنسجة المسنة (Favier، 2003).

5.1 مضادات الأكسدة

تستعمل الخلايا العديد من مضادات الأكسدة وتستهلك الكثير من الطاقة لمراقبة مستوى الأنواع الأكسجينية النشطة. حيث تعرف هذه المركبات على أنها كل مادة لها فعالية ضد الأضرار التأكسدية، توجد بتراكيز ضعيفة وتستطيع أن تؤخر أو تثبط أكسدة الجزيئات، ويمكن تقسيمها إلى انزيمية وغير انزيمية (Sacca` وآخرون، 2013).

1.5.1 مضادات الأكسدة الإنزيمية

إنزيم Superoxide dismutase (SOD)

هناك ثلاث أنواع من إنزيم SOD في الأنظمة الخلوية تختلف فيما بينها في المعدن المرافق لها والمكان المتواجدة فيه وهي: Cu,Zn-SOD المتواجد بصفة غالبة في السيتوزول بالإضافة إلى الليزوزومات والنواة، Mn-SOD المتواجد في الميتوكندري في حين أن الشكل EC-SOD فيتواجد في المناطق خارج خلوية (Wu وآخرون، 2009)، يحفز هذا الانزيم عملية إرجاع $O_2^{\cdot -}$ إلى H_2O_2 عن طريق التفاعل التالي:

$$O^{\cdot -}_2 + O^{\cdot -}_2 + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

إنزيم Catalase

يتواجد انزيم catalase في أغلب أعضاء الجسم إلا أنه يتواجد بتراكيز مرتفعة في الكبد وتكون نشاطيته عالية في البيروكسيزوم وفي حالة ارتفاع تراكيز H_2O_2 يقوم هذا الانزيم بتحويله إلى ماء وأكسجين (Cemeli وآخرون، 2009) حسب التفاعل الآتي:

$$H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O+O_2$$

إنزيم Glutathione peroxidase (GPx)

ينتشر انزيم GPx في أنسجة الانسان والحيوان، أما مستوياته المرتفعة فتكون في الكلية والكبد، يعمل الانزيم على إرجاع H_2O_2 إلى ماء وأكسجين، يحتاج هذا التفاعل إلى تدخل جزيئتين من GSH التي تتحول الى GSSG (Cemeli وآخرون، 2009) حسب التفاعلين التاليين:

$$H_2O_2 + 2GSH \longrightarrow 2H_2O + GSSG$$

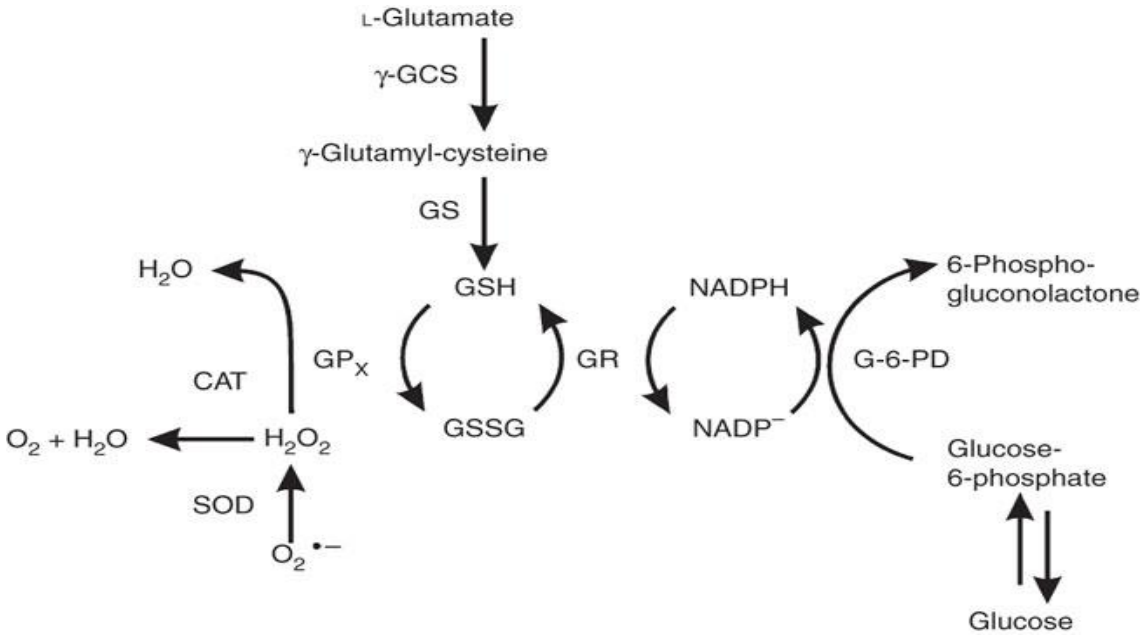
$$ROOH + 2GSH \longrightarrow ROH + H_2O + GSSG$$

يتدخل انزيم glutathion reductase ليجدد GSH ابتداءا من GSSG باستعمال NADPH كعامل مساعد.

$$GSSG + NADPH + H^+ \longrightarrow 2GSH + NADP^+$$

يتدخل انزيم glucose-6-phosphate-dehydrogenase (G6PD) ليحول $NADP^+$ إلى NADPH

وبهذا يكون هناك تكامل بين أدوار الانزيمات المضادة للأكسدة (شكل 4).



شكل 4. طرق التكامل بين مضادات الأكسدة الانزيمية (Weydert و Cullent، 2010).

2.5.1 مضادات الأكسدة غير الإنزيمية

تعمل بعض المركبات داخلية المنشأ على إزاحة وتثبيط عمل الجذور الحرة، تتميز بأوزان جزيئية صغيرة مثل glutahion وحمض اليوريك و10 ubiqinol وأخرى ذات مصدر غذائي مثل الفيتامين C والفيتامين E وعديدات الفينول والكاروتنويدات (Alok وآخرون، 2014).

(Q10) Coenzyme 10

يعتبر مرافق الانزيم Q10 الذي يسمى أيضا ubiquinol 10 من المركبات الذائبة في الدهون، يتواجد تقريبا في جميع الخلايا، يعرف بوظيفته المهمة في إنتاج الطاقة على مستوى الغشاء الداخلي للمتوكندري وهو وسيط له القدرة على تحويل الالكترونات من مركب انزيمي لآخر (NADH deshydrogenase وcytochrom reductase)، يتواجد أساسا في الشكل المرجع (Ubiquinol: CoQ10H2) ويملك خصائصا مهمة مضادة للأكسدة وذلك لقدرته على التثبيط المباشر لفوق أكسدة الليبيدات كما يساهم في تجديد الفيتامين E، بالإضافة إلى أنه يحمي LDL من الأكسدة أكثر من الفيتامين E وlycopene وb-carotene (Alam وRahman، 2014). أثبت الدراسات أيضا أن أخذ Co-Q10 بتركيز 150 مغ يرفع من نشاطية الإنزيمات المضادة للأكسدة عند الأشخاص المصابين بمرض القلب التاجي (Lee وآخرون، 2012).

حمض اليوريك

حمض اليوريك هو الناتج النهائي لأكسدة قواعد البيورين على مستوى الأنسجة الحية ففي التراكيز العادية له لوحظ أنه يتفاعل مع الأنواع الأكسجينية النشطة خاصة جذر الهيدروكسيل كما لوحظ أنه يحمي حمض الأسكوربيك من الأكسدة داخل البلازما (Bandyopadhuyaya وآخرون، 2004). يعتبر حمض اليوريك من أقوى مضادات الأكسدة

البلازمية حيث يمكنه أن يزيح جذور البيروكسيل و$^1O_2$ وO_3 و$NO^\cdot$ وجذور نتروجينية أخرى، كما يستطيع حماية البروتينات من الأكسدة عن طريق استخلاب أيونات الحديد والنحاس التي من المصادر المهمة لانتاج الجذور الحرة (Kohen وNyska، 2002).

جزيئة Glutathion (GSH)

وهي عبارة عن ثلاثي الببتيد (L-γ-glytamyl-L-cysteinyl-glycine) تتميز بوزن جزيئي منخفض تتواجد بشكل مرجع (GSH) وشكل مؤكسد (GSSG)، تتميز بتأثيرها المضاد للأكسدة لوجود الوظائف الكبريتية SH للحمض الأميني Cysteine (Lobo وآخرون، 2010). يتواجد GSH في خلايا الإنسان والحيوان والبكتيريا الهوائية، تتراوح تراكيزها بين 0.5-10 ميلي مولر في خلايا الكلى وكريات الدم الحمراء والبيضاء والكبد (أكثر من 10 ميلي مولر)، تؤثر كعامل مساعد لانزيم peroxidase وتعمل كمضاد أكسدة غير مباشر بتوفير الالكترونات اللازمة للتخلص من H_2O_2. يعمل هذا المركب أيضا على تحفيز العديد من المسالك البيوكيميائية الأخرى والوظائف الخلوية المحتوية على الاستقلاب مثل تجديد حمض الأسكوربيك وحماية أكسدة البروتينات الحاملة لوظائف SH ونقل النحاس (Gul وآخرون، 2000؛ Shah وآخرون، 2013)، يعمل GSH على الازاحة المباشرة للكثير من الجذور الحرة منها أيون $O_2^{\cdot-}$ و$OH^{\cdot}$ وO^1_2 والجذور المؤكسدة للبروتينات وDNA (Shah وآخرون، 2013).

حمض الليبويك

يتواجد حمض الليبويك (lipoic acid) على الشكلين المؤكسد (lipoic acid: LA) والمرجع (dihydrolipoc acid: DHLA)، يتميز بذوابنيته في الأوساط المائية والدهنية وانتشاره في أي نوع

من الخلايا أو الأنسجة وحتى العضيات داخل خلوية (Packer وآخرون، 1997؛ Rochette وآخرون، 2013). يعتبر كعامل مساعدا للانزيمات، ويؤدي وظيفته في عملية نزع الكربوكسيل (CO_2) بشكله المرجع (α-dihydrolipoic acid) (Moini وآخرون، 2002)، يمكن استعمال هذا الحمض كمادة حافظة تسمح بالتقليل من تأثير الاجهاد التأكسدي (Ayaz وآخرون، 2005). يعمل حمض α-lipoic أيضا كمثبط لأكسدة السكريات ويستطيع ازاحة الجذور الحرة في كل من الأوساط الدهنية والمائية بشكليه المؤكسد (LA) والمرجع (DHLA) (Cilard وآخرون، 2006؛ Packer، 1995). يعمل DHLA عل تجديد الفيتامين C والفيتامين E، كما يساهم في رفع مستويات الغليتاتيون الخلوي (Kleinkauf-Rocha وآخرون، 2013).

الفيتامين C

يصنف الفيتامين C (vit C) ضمن الفيتامينات الذائبة في الماء، يمكن تصنيعه من طرف النباتات وبعض الحيوانات، يمتلك هذا الفيتامين العديد من الوظائف البيوكيميائية بالإضافة إلى نشاطيته كمزيح للجذور الحرة، حيث يستطيع أن يمنحها الكترونات معطيا بذلك مركبات أكثر استقرارا ويلعب vit C دورا مهما في نقل الالكترونات بين السيتوبلازم والوسط خارج خلوي، كما يشارك أيضا في إعادة تشكيل الفيتامين E مساهما بذلك في تثبيط أكسدة الليبيدات (Bandyopadhuyaya وآخرون، 2004). في وجود الأيونات المعدنية مثل الحديد والنحاس يمكن أن يصبح vit C كطليع مؤكسد عن طريق ارجاع هذه المعادن وتحفيز تفاعل fenton و haber weiss، يتواجد هذا الفيتامين في السيتوبلازم والليزوزومات ويمكن أن يتفاعل مباشرة مع الأنواع الأكسجينية النشطة مثل OH^- و $O_2^{\cdot-}$ و $ROO^{\cdot}$ مشكلا بذلك جذر

semidehydroascorbate الأقل فعالية والذي يتحول بسرعة إلى dehydroascorbate بوجود انزيم NADPH reductase، يتعاون vit C مع الفيتامين E (vit E) في حماية LDL من الأكسدة مؤديا بذلك إلى الوقاية من الإصابة بمرض تصلب الشرايين (Du وآخرون، 2012).

الفيتامين E

يعتبر vit E (Tocopherol) من المركبات الأساسية المتواجدة في الأغشية البيولوجية والتي تؤدي أدوارا مهمة سواءا كانت مضادة أو أخرى غير مضادة للأكسدة. وهناك أربع مماكبات لمركبات tocopherol (α، β ، δ، γ) وتنظم النشاطية المضادة للأكسدة لهذه المماكبات على الشكل التالي: α> β> γ > δ وتختلف حسب عدد المجاميع الميثيلية المرتبطة بالحلقة الفينولية للرأس المحب للماء ويعتبر α- tocopherol من أكثر المماكبات التي تملك نشاطية مضادة للأكسدة لاحتوائه على ثلاث مجاميع ميثيلية (Kamal-Eldin و Appelqvist، 1996) ويتم بناؤه فقط من طرف النباتات والطحالب ويتواجد في جميع أجزاء النبات (Kruk وآخرون، 2008)، يمنع vit E أكسدة الليبيدات من خلال تفاعله مع جذور الألكوكسيل وجذور البيروكسيل وجذور الألكيل واعطائها الكترونات ليصبح عبارة عن جذر tocopheroxyl (TOH·) الذي يرجع إلى tocopherol بواسطة vit C أو GSH أو Coenzyme Q (Serbinova و Pacher، 1994). يؤثر vit E كمزيح لجذر $^1O_2$ إلا أن التراكيز المرتفعة له وفي وجود المعادن المرجعة يؤدي إلى تحوله إلى طليع مؤكسد (Blokhina وآخرون، 2003).

الكاروتنويدات

تشكل الكاروتنويدات مجموعة من المركبات الكيميائية الذائبة في الدهون المتواجدة في النباتات وخاصة في الثمار، تمتلك نشاطية مضادة للأكسدة كتلك الموجودة عند tocopherol، فعن طريق السلسة الكربونية الطويلة لها والغنية بالروابط المزدوجة يمكنها ازاحة جذور البيروكسيل وجذر $^1O_2$، فجزيئة واحدة من الكاروتنويدات تستطيع تثبيت العديد من الجذور الحرة (Rolland، 2004).

2. المركبات الفينولية

تمثل المركبات الفينولية مجموعة واسعة من المواد النباتية التي تعرف على أنها مستقلبات ثانوية في المملكة النباتية، تستعملها للدفاع ضد الأشعة فوق البنفسجية أو الأجسام الغريبة، تصنف هذه المركبات إلى مجموعات مختلفة حسب عدد الحلقات الفينولية المكونة لها بالإضافة إلى عدد المجاميع الميثيلية والهيدروكسيلية المرتبطة، يؤدي هذا الاختلاف إلى إعطاء العديد من المركبات: أحماض فينولية وفلافونويدات ودباغ وstilbens وlignans (Manach وآخرون، 2004).

1.2 الأحماض الفينولية

هي جزيئات فينولية بسيطة تمثل الوحدة الأساسية لبناء المركبات الفينولية الأخرى (Morton وآخرون، 2000)، تتواجد في النباتات الطبية (Psotova وآخرون، 2003) وتنقسم إلى قسمين رئيسيين هما قسم الأحماض المشتقة من حمض Hydroxybenzoic وقسم الأحماض المشتقة من حمض Hydroxycinnamic (شكل5).

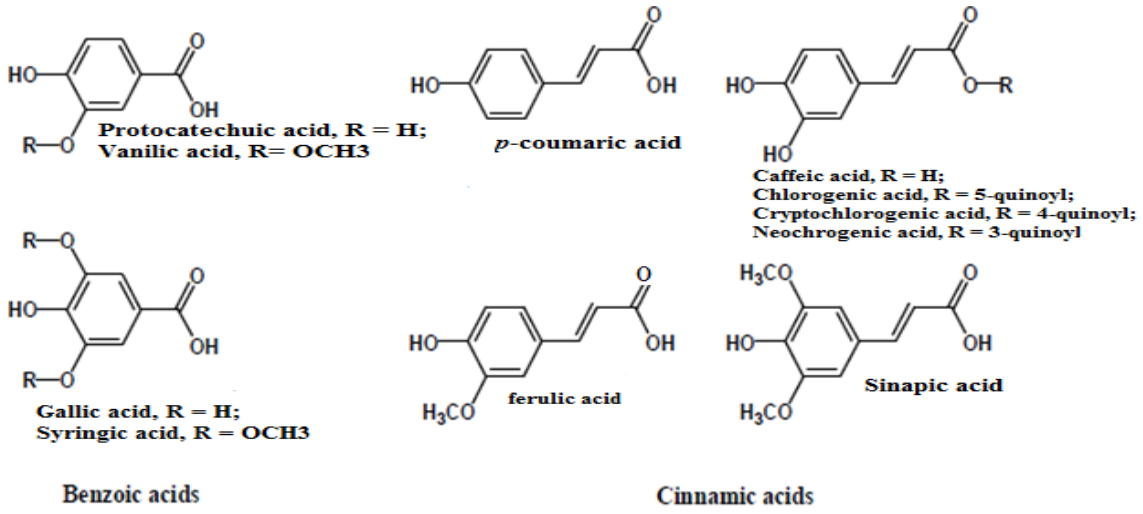
1.1.2 الأحماض المشتقة من حمض Hydroxybenzoic

لها هيكل مكون من C6-C1 وهي تتواجد بكميات ضعيفة في النباتات المأكولة ما عدا بعض الفواكه الحمراء والبصل، حيث تمتلك هذه الأخيرة حوالي 10 ملغاكغ من الوزن الطازج، يمثل الشاي مصدرا مهما لحمض gallic فقد تحتوي أوراقه على كميات تصل إلى 4.5 غاكغ من الوزن الطازج (Tomas-Barberan و Clifford، 2000). تعتبر الأحماض المشتقة من حمض hydrobenzoic المركبات الأساسية لبناء الدباغ المميهة بنوعيها gallotanins و ellagitanins (Clifford و Scalbert، 2000).

2.1.2 الأحماض المشتقة من حمض Hydroxycinnamic

يمثل هذا القسم الأكثر تواجدا مقارنة بمشتقات حمض Hydroxybenzoic ويشتمل على حمض p-coumaric وحمض cafeic وحمض ferulic وحمض sinapic ونادرا ما تتواجد هذه الأحماض بشكل حر ما عدا في حالات التجميد والتخمير والتعقيم. إن الأشكال المرتبطة عبارة عن مشتقات سكرية أو أسترات لأحماض quinic و shikimic و tartaric. يتحد حمض cafeic مع حمض quinic لتشكيل حمض chlorogenic الموجود في العديد من الفواكه وبتراكيز عالية في القهوة حيث أن كوبا واحدا يحتوي على 70–350 مغ من هذا الحمض (Manach وآخرون، 2004). يمثل حمض cafeic الحر والمرتبط من 75 إلى 100% من مشتقات hydroxycinamic في أغلب الفواكه. تتواجد أحماض hydroxycinamic في جميع أجزاء الفواكه خاصة الأجزاء الخارجية عند النضج وتتناقص بتناقص حجم الفاكهة. ويعتبر حمض ferulic من أكثر

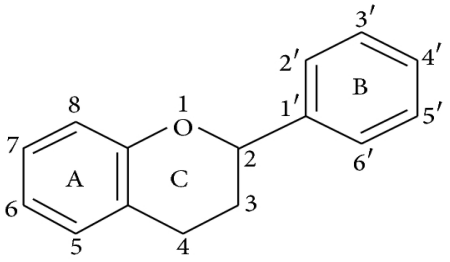
الأحماض الفينولية تواجدا في البذور حيث يحتوي القمح على حوالي 0.8 إلى 2 غ/كغ من الوزن الجاف ويوجد بكثرة في الأجزاء الخارجية للبذور (Manach وآخرون، 2004).



شكل 5. أقسام الأحماض الفينولية (Tsao، 2010).

2.2 الفلافونويدات

تمثل الفلافونويدات مجموعة واسعة من المركبات الفينولية الموجودة في النبات، حيث شخص حوالي 8000 مركبا فلافونويديا تختلف فيما بينها في عدد وتوزع المجاميع الهيدروكسيلية وكذلك إضافة المجاميع السكرية والمثيلية. تملك الفلافونويدات بنية موحدة ممثلة في C6-C3-C6 وتمثل الوحدتين C6 الحلقة A و B أما C3 فتمثل حلقة pyrane (شكل 6) وحسب درجة إضافة المجاميع الهيدروكسيلية والتغيرات الحاصلة على مستوى الحلقة C تقسم الفلافونويدات إلى مختلف المجاميع: flavone، flavanols، flavonols، flavanones، anthocyanins وتتكون أغلب الفلافونويدات بارتباط الحلقة B بالكربون رقم 2 للحلقة C، غير أن في بعض الفلافونويدات مثل isoflavonoids و neoflavonoids ترتبط الحلقة B بالكربون رقم 3 و4 على التوالي (شكل 7) (Tsao، 2010).



شكل 6 . البنية الأساسية للفلافونويدات (Kumar و Pandy، 2013).

الفلافونولات

تملك الفلافونولات (Flavonols) رابطة مزدوجة بين C2 و C3 مع وجود مجموعة هيدروكسيل في الكربون 3 للحلقة C وتمثل المجموعة الأكثر انتشارا في الأغذية ومن أهم أمثلتها quercetin ويعتبر البصل من أهم مصادر flavonols (أكثر من 1.2 غ\كغ من الوزن الطازج) ووجد أن بناء هذه المركبات يكون محفزا بواسطة الأشعة الضوئية وبذلك تكون مخزنة في الأجزاء الهوائية للفواكه (Cortell و Kemdy، 2006).

الفلافونات

تتميز بنية الفلافونات (Flavones) بوجود رابطة مزدوجة أيضا بين C2 و C3 وتعتبر هذه المجموعة الأقل معرفة من بين الفلافونويدات الأخرى.

الفلافانونات

تتميز مركبات الفلافانونات (Flavanones) بغياب الرابطة المزدوجة في الحلقة C ووجود ذرة أكسجين في الكربون رقم 4 لنفس الحلقة كما تتميز باضافة سكريات ثنائية على مستوى الكربون 7، وتتواجد هذه المركبات بتراكيز عالية في ثمار الليمون كما يمكن ان ينتشر في الطماطم والنباتات العطرية (D'Archivio، 2007). من أهم المركبات غير السكرية لهذه

المجموعة نجد naringenin و hesperetin و eriodictyol و isosakuranetin (Peterson وآخرون، 2006).

الإزوفلافونات

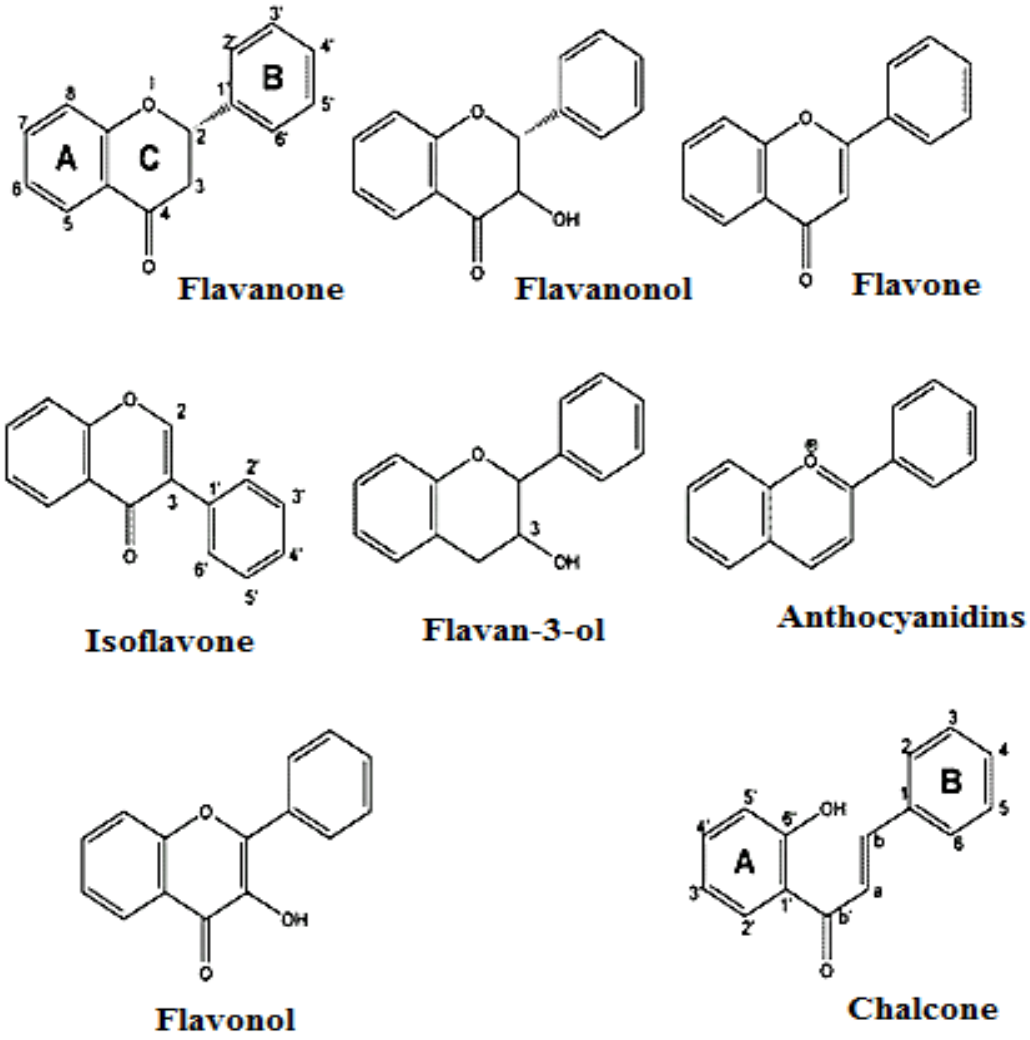
بنية الإزوفلافونات (Isoflavones) شبيهة ببنية estrogens، تتميز بوجود مجموعة الهيدروكسيل في الكربون 7 و4 مثل جزيئة estradiol، تستطيع الارتباط بمستقبلات estrogen لذلك كانت تصنف ضمن الاستروجينات النباتية، تتواجد isoflavones في البقوليات وتعتبر الصويا من أهم مصادرها ومن أهم مركباتها: genistein، daidzein، glycilein، تتواجد في الغالب بشكل مركبات غير سكرية (Sacks وآخرون، 2006).

الأنثوسيانينات

الأنثوسيانينات (Anthocyanins) هي صبغات ذائبة في الماء، مسؤولة عن أغلب الألوان الحمراء والزرقاء والبنفسجية للفواكه والخضر والأزهار (Mazza وآخرون، 2004)، تظهر بشكل مركبات سكرية ترتبط أساسا في الكربون 3 للحلقة C أو في الكربون 5 و7 للحلقة A، كما أنه نادرا ما يتم اضافة السكريات على مستوى '3 و'4 و'5 للحلقة B. تكون هذه المركبات واسعة الانتشار في غذاء الانسان حيث توجد في بعض الحبوب والخضر مثل الكرنب والفاصولياء والبصل ولكن بكميات أكبر في الفواكه (D'Archivio وآخرون، 2007).

الفلافانولات

تحمل بنيات الفلافانولات (Flavanols) رابطة مشبعة على مستوى الحلقة C وتتواجد بشكل أحادي أو متعدد الوحدات مثل catechin و proanthocyanidin على التوالي، وخلافا عن الأقسام الأخرى للفلافونويدات تنتشر مركبات هذه المجموعة بشكل غير سكري ومن أمثلتها catechin و epicatechin المتواجدة بكثرة في الفواكه في حين أن gallocatechin و epigallocatechin gallate يتواجد خصوصا في الشاي (Arts وآخرون، 2000).



شكل 7. الأقسام المختلفة للفلافونويدات (Lago وآخرون، 2014).

3.2 الستيبينات

تتواجد الستيبينات (stibbenes) بكميات منخفضة في غذاء الانسان تكون ممثلة أساسا بمركب resveratrol، تتحد في الغالب مع السكريات وتنتجها النباتات دفاعا ضد الأجسام الغريبة (Delmas وآخرون، 2006) أو خلال وجود إجهاد تأكسدي (Bavaresco، 2003).

4.2 اللجنينات

يتم انتاج اللجنينات (lignins) عن طريق أكسدة وحدتين من phenyl propane، تتواجد غالبا بشكل حر في حين ارتباطها بالسكريات يكون قليلا، تُمثّل هذه المجموعة بمركب secoisolariciresinol (Adlercrentz وآخرون، 1997)، تتفكك على مستوى الأمعاء إلى enterodiol و enterolactone ونظرا لأهمية هذه المركبات ومشتقاتها خاصة لامتلاكها قدرة مضادة للسرطان وتأثيرات أخرى زاد الاهتمام بها في الآونة الأخيرة (Saleem وآخرون، 2005).

5.2 الدبـاغ

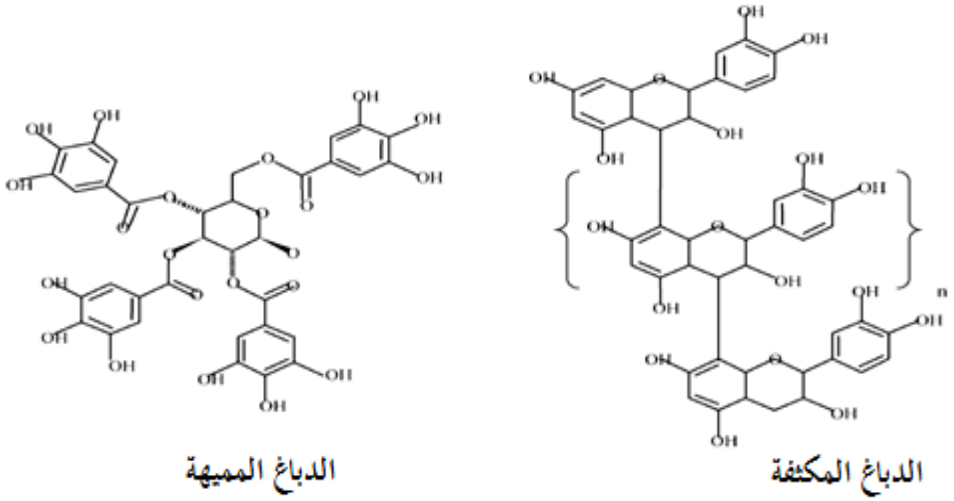
الدباغ (Tannins) مركبات معقدة من عديدات الفينول تعرف على أنها مستقلبات ثانوية بأوزان جزيئية عالية تتروح ما بين 500 و3000 دالتون، لها القدرة على تشكيل معقدات مع البروتنات والسكريات والقلويدات والأحماض النووية والمعادن، تنقسم الدباغ الى مجموعتين هما الدباغ المكثفة والدباغ المميهة (شكل 8) (Frutos وآخرون، 2004).

1.5.2 الدباغ المميهة

وهي عبارة متعدد وحدات غير متجانسة تتكون نتيجة لأسترة المجاميع الهيدروكسيلية للغلوكوز بأحماض فينولية سواءا كان حمض gallic وتسمى الدباغ في هذه الحالة بـ gallotanins أو حمض ellagic وتدعى عندئذ ellagitanin. تتفكك الدباغ المميهة بسهولة في الأوساط الحامضية والقاعدية وبواسطة بعض الإنزيمات لتحرير الغلوكوز وأحماض فينولية (Chung وآخرون، 1998).

2.5.2 الدباغ المكثفة

تمثل مركبات flavan-3-ols (catechin) ومركبات flavan-3, 4-dilos الوحدات الأساسية في تشكيل الدباغ المكثفة، ترتبط فيما بينها بروابط كربون-كربون مايجعلها أكثر مقاومة للإماهة (He وآخرون، 2008).



شكل 8. أقسام الدباغ (Krause وآخرون، 2005).

6.2 الخصائص البيولوجية للفلافونويدات

إضافة إلى الدور المعروف للفلافونويدات في إعطاء لون ورائحة النبات، تعمل هذه المركبات على مراقبة نمو وتطور النبات من خلال التداخل بطريقة معقدة مع هرمونات النمو النباتية إضافة إلى دورها الأساسي في حماية النباتات من الإصابات البكتيرية والفطرية، تمتلك الفلافونويدات قدرة على التدخل في العديد من النشاطات البيولوجية، حيث سميت بالمعِدلات الطبيعية للاستجابات البيولوجية من خلال تثبيط واختزال مختلف الانزيمات مثل lipo-oxygenase و telomerase و cycloxygenase والمساهمة في مسارات نقل الإشارة الخلوية وتنظيم الدورة الخلوية (D'archivio وآخرون، 2007)، كما تعمل هذه المركبات على خفض السيتوكينات الإلتهابية المفرزة من طرف الخلايا المناعية (Gao وآخرون، 2001). تقي الفلافونويدات من الاصابة

بأمراض الأوعية والقلب وتعمل على تحفيز الموت الخلوي المبرمج وتمنع تكاثر الخلايا السرطانية (Hirota وآخرون، 2005). سجلت مركبات flavanols (quercetin و rutin و morin) و flavanones (hesperetin و hesperidin) تأثيرات مضادة للإلتهاب الحاد والمزمن in vivo، حيث تبين أن rutin هو الأكثر تأثيرا في تفاعلات الالتهاب المزمنة وأساسا التهاب المفاصل، بينما لوحظ فقط قدرة flavanones في خفض الالتهابات العصبية المحرضة بمحلول xylene (Rotelli وآخرون، 2003). أظهر Paradkar وآخرون (2004) أن مركبات isoflavone ومشتقاتها السكرية لها القدرة على تعديل التفاعلات الالتهابية على مستوى أمعاء وكبد الفئران. وجد أن فلافونويد rutin (quercetin-3-rhamnosylglucoside) له القدرة على الحماية من تقرحات المعد المحرضة بواسطة الإيثانول (Izzo وآخرون، 1994). يعتبر الكبد من أكثر الأعضاء تضررا بالتعرض للعديد من المركبات مثل phalloidin (سم مستخرج من الفطريات السامة من نوع *Amanita phalloides*) ورباعي الكلوريد والايثانول إلّا أن وجود بعض الفلافونويدات يقي من الالتهابات الكبدية حيث أبدت كل من flavonolignans (silymarin) و hispidtulin و isobutrin فعلا وقائيا وعلاجيا (Frantisek وآخرون، 2006). في دراسة أخرى أظهرت أن silymarin له دور علاجي لسمية الكبد المحرضة بواسطة سم microcyclin-lr المفرز من طرف الطحالب الزرقاء من نوع *Microcystis aeruginosa* وهو أكثر فعالية بمقارنته بفلافونويدات apigenin و quercetin و naringeni (Carlo وآخرون، 1993). عرفت كل من فلافونويدات quercetin و morin و rutin و dihydroquercetin (taxifolin) و apigenin و catechin و hesperidine بنشاطيتها المضادة لـ11 نوعا من الفيروسات وأكدت الدراسة أن هذه النشاطية

مرتبطة بوجود الفلافونويدات غير السكرية والفلافونويدات الحاملة لمجموعة الهيدروكسيل في الموقع 3 (Tapas وآخرون، 2008)، كما وجد أن الفلافونولات أكثر فعالية من الفلافونات ضد فيروس *Herpes simplex* (Tim Cushnie و Andrew، 2005). إن استهلاك الفواكه والخضر الغنية بالفلافونويدات من نوع فلافونول quercetin يقي من أنواع كثيرة من السرطانات (الرئة، البروستات، المعدة والقولون). تؤثر الفلافونويدات كمضادات للسرطان بتثبيط تعبير مورثة P53 (kumar و Pandy، 2013).

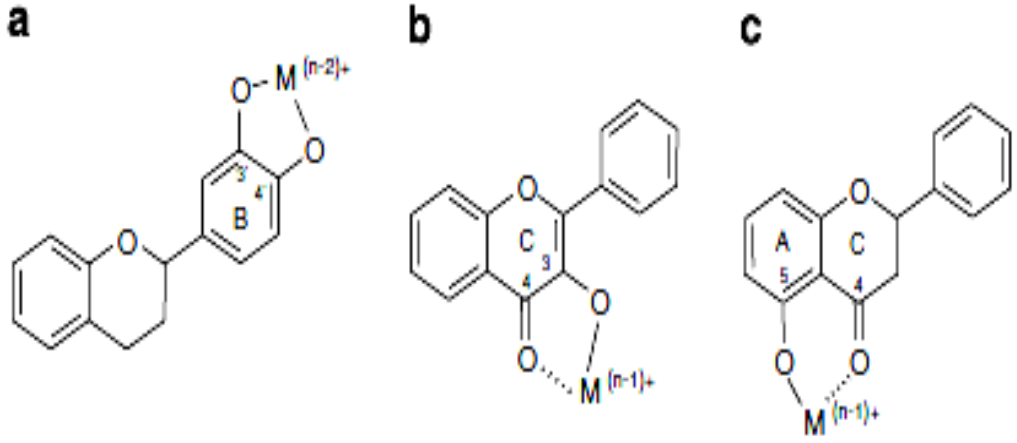
7.2 النشاطية المضادة للأكسدة لعديدات الفينول

لوحظ أن النظام الغذائي الغني بالمركبات الفينولية يلعب دورا مهما في حماية الانسان، حيث أن تناول الفواكه والخضر والحبوب المعروفة بغناها بالمركبات الفينولية مرتبط بتخفيض أخطار الاصابة بالعديد من الأمراض مثل السرطان وأمراض الأوعية والقلب والالتهاب والعديد من الأمراض الانحلالية (Scalbert وآخرون، 2005؛ Duthie و Brohn، 1994). وجد أن عديدات الفينول مضادات أكسدة قوية تستطيع تعديل الجذور الحرة باعطاء الكترونات أو ذرات هيدروجينية، ويرتبط التأثير المضاد للأكسدة ببنية المركبات الفينولية، حيث أن إضافة مجموعة الهيدروكسيل على مستوى الكربون 3 لمركبات flavonol يجعلها مضادات أكسدة قوية، كما يمكن أن تؤثر المركبات الفينولية بالازاحة المباشرة للجذور الحرة المتسببة في أكسدة الليبيدات (Rice-evans وآخرون، 1996؛ Guo وآخرون، 2009). إضافة إلى هذا يمكن أن تستعمل عديدات الفينول كملتقطات للمعادن مثل الحديد وبذلك الحد من تفاعلات fenton المتسببة في إنتاج جذر الهيدروكسيل الذي يعتبر من أخطر الجذور الحرة (Perron

و Brumaghim، 2009). يمكن لعديدات الفينول أيضا أن تؤثر كمساعدات لمضادات الأكسدة الأخرى عن طريق إعادة تجديد الفيتامينات (Zhou وآخرون، 2005)، كما تستطيع أن تثبط انزيمات xanthine oxidase والرفع من مضادات الأكسدة الداخلية (Disilvestro، 2001). تقوم عديدات الفينول بتحفيز الانزيمات المضادة للأكسدة: glutathion peroxidase و catalase و superoxide-dismutase التي تخلص من جذور الهيدروبيروكسيد و H_2O_2 و $O_2^{\cdot-}$ على التوالي (Du وآخرون، 2007).

8.2 علاقة البنية الكيميائية بالنشاطية المضادة للأكسدة

ترتبط النشاطية المضادة للأكسدة ببنية المركبات الفينولية فلقد وجد أن الفلافونويدات لها قدرة على مسك المعادن بوجود مجموعة o-diphenol -3' , 4' في مواقع dihydroxy للحلقة B (شكل a6) وبنية 4-keto مع 3-hydroxyl للحلقة C (شكل b9) أو 4-keto مع 5-hydroxy للحلقة C والحلقة A (شكل c6) (Rice-evans وآخرون، 1997)، غير أن إضافة السكريات على المجاميع الهيدروكسيلية يؤدي إلى التقليل من قدرة الفلافونويدات على مسك المعادن.



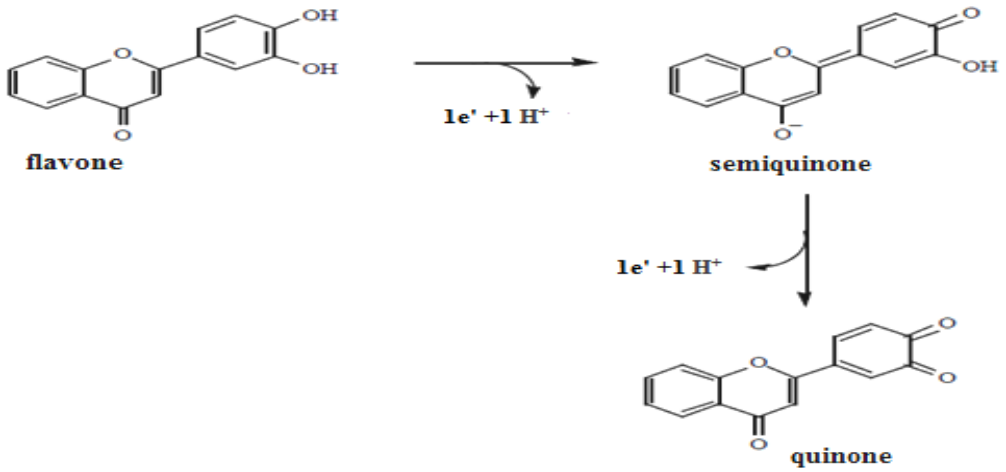
شكل 9. مواقع مسك الحديد من طرف الفلافونويدات (Laguerre وآخرون، 2007).

إن القدرة الازاحية للفلافونويدات مرتبطة ببنية الحلقة C ونوع وعدد المجاميع المرتبطة بالحلقة B و C حيث تقوم بمنح الكترون حر لتسمى بجذر semiquinone ثم quinone (Cotelle وآخرون، 2001) (شكل 10). وأغلب المواقع المؤثرة في الازاحة هي:

1- البنية ortho-dihydroxy في الحلقة B التي تملك أحسن خصائص منح للالكترونات معطية بذلك استقرارا أكبر وتشارك في تنقل الالكترونات بين مجاميع الهيدروكسيل للحلقة B (Balasundram، 2006).

2- الرابطة المزدوجة بين C2 و C3 المرتبطة بالوظيفة 4-oxo في الحلقة C والمسؤولة عن تحويل الالكترونات من الحلقة B (Balasundram، 2006).

3- إتحاد مجموعتي الهيدروكسيل في 3 و5 مع 4-oxo للحلقتين A و C من أجل نشاطية قصوى وبذلك فإن الفعالية القوية المضادة للأكسدة تتطلب وجود 3-OH المتحدة بالرابطة المزدوجة (3–2) ووظيفة carbonyl في الحلقة C (Rice- Evans وآخرون، 1996).



شكل 10. آلية تأثير الفلافونويدات الازاحي للجذور الحرة (Cotelle وآخرون، 2001).

تستطيع الفلافونويدات تثبيط انتاج ROS بتثبيط الانزيمات المنتجة لها، حيث أظهرت الدراسات التي أجريت على المستخلصات النباتية والمركبات النقية أنها يمكن أن تكون مصدرا مهما لتثبيط xanthine oxidase، حيث قام Cos وآخرون (1998) بتقدير نشاطية ثلاثين مركبا فلافونويديا وتأثيرها على انتاج حمض اليوريك بواسطة انزيم xanthine oxidase فوجد أن هناك علاقة بين البنية الكيميائية للفلافونويدات ونشاطيتها المثبطة لانزيم XO. أظهرت نفس الدراسة أن مركبات flavonols و flavones فقط لها القدرة على تثبيط الانزيم، هذا ما يبين أهمية وجود الرابطة المزدوجة (2-3) وبمقارنة نشاطية flavonols و flavone تأكد أن غياب مجموعة OH في الكربون رقم 3 يرفع قليلا من قدرة التثبيط، كما تبين أن الفلافونويدات المرتبطة بالسكريات تملك نشاطية أقل من المركبات غير السكرية في عملية التثبيط (Cos وآخرون، 1998)

9.2 التأثير المؤكسد لعديدات الفينول

تعتبر عديدات الفينول من المركبات المضادة للأكسدة والالتهاب والسرطان غير أن التراكيز المرتفعة لها وتحت ظروف معينة، يمكن لهذه المركبات أن تؤثر بطريقة سلبية كمحفزات للأكسدة (Rucinska وآخرون، 2007). لاحظ Galati وآخرون (2002) أن التناول المفرط لعديدات الفينول يمكن أن تتحول عن طريق انزيم peroxidase إلى الشكل المؤكسد (جذر phenoxyl) الذي يكون في بعض الحالات فعالا بشكل كاف لأكسدة GSH و NADH المرتبط باستهلاك كبير للأكسجين وبالتالي تكوين الأنواع الأكسجينية النشطة. تقوم عديدات الفينول أيضا المحتوية على حلقات catechol بأكسدة حمض الأسكوربيك بتدخل جذر

semiquinone الناتج عن أكسدة الفلافونويدات. بينت التجارب أيضا أن حضن الخلايا الكبدية (hepatocytes) بوجود عديدات الفينول ذات حلقات فينولية متعددة يؤدي إلى الأكسدة الجزئية لـ GSH إلى GSSG الموجود في هذه الخلايا في حين أن المركبات الفينولية ذات حلقات catechol تؤكسد جميع GSH بتحويله إلى GSH مزدوج (conjugate GSH) (Rietjens وآخرون، 2002). تعمل المركبات الفينولة متعددة الحلقات على أكسدة بروتين oxyhemoglobin المتواجد في كريات الدم الحمراء للإنسان مسببة تحللها بصفة أكبر وأسرع من وجود المركبات الفينولية ذات حلقة catechol واحدة وبهذا تعتبر المركبات الفينولة ذات حلقات الفينول المتعددة عموما أكثر المركبات تحريضا على الأكسدة من مركبات ذات حلقة catechol الواحدة. تؤدي الأكسدة الانزيمية والكيميائية للفلافونويدات إلى تشكيل جذور semiquinones التي يمكن أن تزاح بواسطة GSH وبذلك يعاد تجديد الفلافونويد ولكن بانتاج نوع جديد من الجذور الناتجة عن أكسدة GSH (جذر Thiyl)، يتفاعل هذا الأخير مع جزيئة أخرى من GSH لتكوين جذر disulfide الذي يرجع بسرعة الأكسجين الجزيئي (O_2) وتشكيل جذور $O^{\cdot-}_2$ (Rietjens وآخرون، 2002). من خلال لدراسة أخرى، تبين أن الفلافونويدات تستطيع أن تحفز الاجهاد التأكسدي على مستوى ADN عن طريق انتاج جذور حرة في وجود النحاس والأكسجين الجزيئي، كما يمكن أن تحفز فوق أكسدة الدهون في وجود معادن Al وMg وZn وCa (Sakihama وآخرون، 2002).

3. النباتات المستعملة في الدراسة

3. 1 نبات الضرو *Pistacia lentiscus* L.

3. 1.1 الوصف النباتي

ينتمي نبات *P. lentiscus* إلى عائلة Anacardiaceae ويسمى محليا بنبات الضرو وهو شجرة ثنائية المسكن، محبة للحرارة يتراوح طولها بين 1 و5 متر وتتميز برائحة صمغها القوية وقشرتها الناعمة والرمادية اللون في المراحل المتقدمة من العمر. تتميز بأوراق مركبة دائمة الاخضرار، تتوضع بشكل متناوب، يحمل الغصن الواحد من 4 الى 10 وريقات صغيرة لامعة من الأعلى وباهتة اللون من الأسفل يصل قطرها بين 4 و5 مم. تتوضع أزهارها بشكل عنقودي أما ثمارها فهي كروية الشكل حمراء ثم يتحول لونها الى الأسود خلال مرحلة النضج (More و White، 2005) (شكل 11).

2.1.3 التوزيع الجغرافي

ينتشر هذا النبات في المناطق الجافة لقارة آسيا ومناطق حوض البحر المتوسط لأوروبا وإفريقيا حتى جزر الكناري (Bellakhdar، 2003) ويتواجد في الجزائر على طول التل والمناطق الغابية (More و White، 2005).

3.1.3 المكونات الكيميائية

يعرف نبات الضرو باحتوائه على زيوت أساسية وثابتة (Grosjean، 2007) ودباغ ممهية ومكثفة (Abbas و Boudriche، 2007) و triterpens (Atmani وآخرون، 2009). وجد أن مادة الريزين المستخرجة من الساق والأغصان تحتوي على زيوت أساسية من نوع monoterpens بكميات كبيرة sesqueterpens بكميات متوسطة وأسترات تربانية بكميات منخفضة (Baudoux، 2003؛ Grosjean، 2007). عزل من أوراق *P. lentiscus* دباغا مكثفة (proanthocyanidin) ومميهة

من نوع الدباغ الغاليكية وفلافونويدات سكرية بالاضافة إلى مشتقات حمض gallic و quinic (Longo، 2007). وفي دراسة قام بها Romani وآخرون (2002) وجد أن أوراق *P. lentiscus* تحوي مركبات delphinidine 3-O-glucoside و cyanidin 3-O-glucoside (anthocyan) و flavonol مثل quercetin و myrecetin.

شكل 11. أجزاء نبات *Pistacia lentiscus* .

1. 4.3 الخصائص البيولوجية لنبات *P. lentiscus* واستعمالاته في الطب الشعبي

يتم استعمال الزيت المستخلص من فواكه نبات الضرو في الطب الشعبي الجزائري في علاج الحروق والمشاكل التنفسية الناتجة عن الحساسية وأمراض القرحة المعدية (Bandoux، 2003؛ Grosjean، 2007). تستعمل الأجزاء الهوائية لنبات *P. lentiscus* في علاج ارتفاع ضغط الدم عن طريق خصائصه المدرة للبول (Nahida وآخرون، 2012). إن غلي الجذور المجففة للضرو فعال جدا ضد التهاب الأمعاء والمعدة (Ouelmouhoub، 2005)، ووجد أيضا أن أوراق هذا النبات لها تأثيرات مضادة للالتهاب ومضادة للميكروبات (Nahida وآخرون، 2012). كما

استعمل صمغ الضرو في الطب الشعبي كمضادات لأورام الثدي والكبد والمعدة والطحال والمثانة (Assimopoulou و Papageorgiou، 2005).

2.3 نبات التقفت *Artemisia campestris* L.

2.3. 1 الوصف النباتي

يعتبر Artemisia من أكثر الأجناس انتشارا عبر العالم، حيث ينتمي إلى عائلة Asteraceae حوالي 500 نوع (salido وآخرون، 2004)، أما في الجزائر فيوجد حوالي 11 نوعا من بينها *Artemisia campestris* المعروفة بتقفت (Ghorab وآخرون، 2013). وهي نبتة برية، معمرة يتراوح علوها بين 10 و 80 سم، ساقها ليفية مخططة وقائمة، كثيرة الفروع المتراصة. أوراقها قصيرة، دقيقة، مزغبة قليلا مفصصة ريشية، داكنة الخضرة، السفلية منها أذينية والباقي جالسة. أزهارها صغيرة القد، أنبوبية الشكل، صفراء اللون تكون لماعة من شهر أوت حتى أكتوبر، إبطية الإرتكاز ثمارها دقيقة للغاية، طعمها مر، رائحتها زكية (شكل 12). تنمو في المناطق الجافة وشبه الجافة للجزائر (Baba-Aissa، 1991؛ Chalchat وآخرون، 2003).

شكل 12. أجزاء نبات *Artemisia campestris* L.

2.3. 2 المكونات الكيميائية

تم عزل العديد من مركبات flavanones والممثلة في sakuranetin و pinostrobin و pinocembrin و naringenin، بالاضافة إلى مركبات flavones المتمثلة في hispidulin و dihydroflavonol (7-methyl aromadendrin) (Akrout وآخرون، 2012). وجد من خلال بعض الدراسات أن نبات *A. campestris* يحتوي على العديد من المركبات مثل α و pinene B و p-cymene و caryophyllene oxide و spathulenol و dehydro-1,8-cineole و limonene و gamma-terpinene و (Z)-beta-ocimene و aromadendrene D و germacrene (Neffati وآخرون، 2008؛ Akrout وآخرون، 2001؛ Dob وآخرون، 2005). وجد أيضا أن جميع أنواع Artemisia تحتوي على مركبات lactones و santonine و Artemisine المسؤولة عن طرد ديدان الأمعاء (Akrout وآخرون، 2012).

3.2.3 الخصائص الطبية

أُستعمل نبات *A. campestris* في الطب الشعبي كمعقم ومقوي للمعدة ومضاد للسموم، كما يعمل على تخفيض ضغط الدم المرتفع، استعملت النبتة أيضا كعامل مجهض لانهاء الحمل المصحوب بمشاكل (Akrout وآخرون، 2010). ينتشر النبات بكثرة في جنوب تونس ويستعمل مغلى الأوراق التي تجمع في الصيف ضد الالتهاب والروماتيزم والميكروبات والسموم (Akrout وآخرون، 2010). يمكن أن يستعمل مسحوق النبات كاملا ككمادات لعلاج الروماتيزم والاكزيما والجروح ومختلف التقرحات بالاضافة إلى التهاب العين. استعمل منقوع الجذور عند الأطفال لمداواة فروة الرأس. أظهرت الدراسات أن مستخلصات النبات وزيوته مضادات أكسدة ولها القدرة على حماية الكبد، كما أنها مضادات للفيروسات والبكتيريا والحشرات (Djeridane وآخرون، 2006؛ Akrout وآخرون، 2010). تتميز مستخلصات أوراق *A. campestris* بقدرتها على

تخفيض نسبة السكر والدهون في الدم ويمكن أن يرجع ذلك إلى خصائصها المضادة للأكسدة (Sefi وآخرون، 2010). استعملت أوراق النبات لعلاج اضطرابات الهضم وأمراض الروماتيزم والتهابات العين (Saoudi وآخرون، 2010).

3.3 نبات الأرغانيا *Argania spinosa* L.

1 .3.3 الوصف النباتي

الأرغانيا شجرة معمرة يصل عمرها إلى 250 سنة تنتمي إلى عائلة sapotaceae، تنتشر في ولاية تندوف بالجزائر والجنوب الشرقي للمغرب الأقصى (Msanda، 2005). يصل ارتفاع هذه الشجرة إلى 10 أمتار، ساقها معوجة وقصيرة يتراوح طولها ما بين 2 إلى 3 م، يعلوها الكثير من الأغصان المتشابكة (Nouaim وآخرون، 1991). أوراقها طويلة (2-3 سم)، متناوبة ودائمة، لكن يمكن أن تفقد أوراقها من أجل مقاومة التبخر لسنوات عديدة، أما الفاكهة فهي معروفة باسم نواة الأرغان ذات لون أخضر يميل إلى الاصفرار أثناء النضج، لها أشكال دائرية أو بيضوية أو مغزلية وبأحجام مختلفة، تتكون الفاكهة من قشرة سميكة والتي تمثل 55 الى 75% من الوزن الطازج (M’hirit وآخرون، 1998). تملك الفاكهة نواة صلبة جدا ذات شكل كروي أو بيضوي أو مخروطي، لونها متابين بين الأخضر والأصفر الفاتح (Alaoui وآخرون، 2002). (شكل 13).

شكل 13. أجزاء نبات *Argania spinosa* L.

2.3.3 التوزيع الجغرافي

يمثل شمال إفريقيا الموطن الأصلي لشجرة الأرغانيا وتتواجد أساسا في الجزائر والمغرب وتعتبر ثروة غابية مهمة استعملت منذ قرون من طرف البربر، تشغل أشجار الأرغانيا نطاقا جغرافيا واسعا شمال غرب ولاية تندوف (Aribi وآخرون، 2013). يمكن أن يكون أصل الأرغانيا المتواجدة في تندوف هو نفسه بالنسبة للأرغانيا المتواجدة في المغرب.

3.3.3 المكونات الكيميائية

يعتبر quercetin و myrecitin ومشتقاتهما السكرية من المركبات الفلافونويدية الأساسية الموجودة في أوراق الأرغانيا مثل (quercetrin، myricitrin، hyperoside، myricitin-3-O-

galactoside) حيث تمثل الفلافونويدات السكرية لـ myricetin حوالي 20 مغ/غ للوزن الجاف في حين أن مشتقات الكرستين فهي تمثل 8 مغ/غ الوزن الجاف (Tahrouch وآخرون، 2000). تحتوي أوراق الأرغانيا على مركبات طيارة وزيوت أساسية بنسبة 0.03 إلى 0.07 % (ElKabouss وآخرون، 2002)، كما تحتوي على نسبة مهمة من الليبيدات (Chernane، 1999).

4.3.3 الاستعمال الطبي

تستعمل الأرغانيا في مجالات مختلفة حيث أن لخشبه نوعية جيدة ومقاومة تستعمل في المجال الإقتصادي، بالإضافة إلى أن الأوراق والفواكه تستعمل كغذاء للحيوانات. تحتوي نواة الفاكهة على زيت الأرغان الذي يملك العديد من الخصائص الغذائية والتجميلية (Charrouf، 2002).

المواد والطرق

1. المواد

1.1 العينات النباتية

أختيرت العينات النباتية في هذه الدراسة على أساس استعمالها الشائع في الطب الشعبي وجلبت من مناطق مختلفة، حيث تم جلب أوراق الضرو *Pistacia lentiscus* L. من جبال سيدي ابراهيم بولاية برج بوعريريج في شهر أفريل، أوراق *Aretmisia campestris* L. جلبت من مدينة بوسعادة في شهر أكتوبر أما أوراق شجرة *Argania spinosa* L. فقد تم جلبها من ولاية تندوف. عرفت العينات النباتية بمخبر علم النبات، بكلية علوم الطبيعة والحياة، جامعة سطيف. جففت الأجزاء المستعملة للنباتات الثلاث في درجة حرارة الغرفة ثم طحنت وخزنت في الظلام حتى الاستعمال.

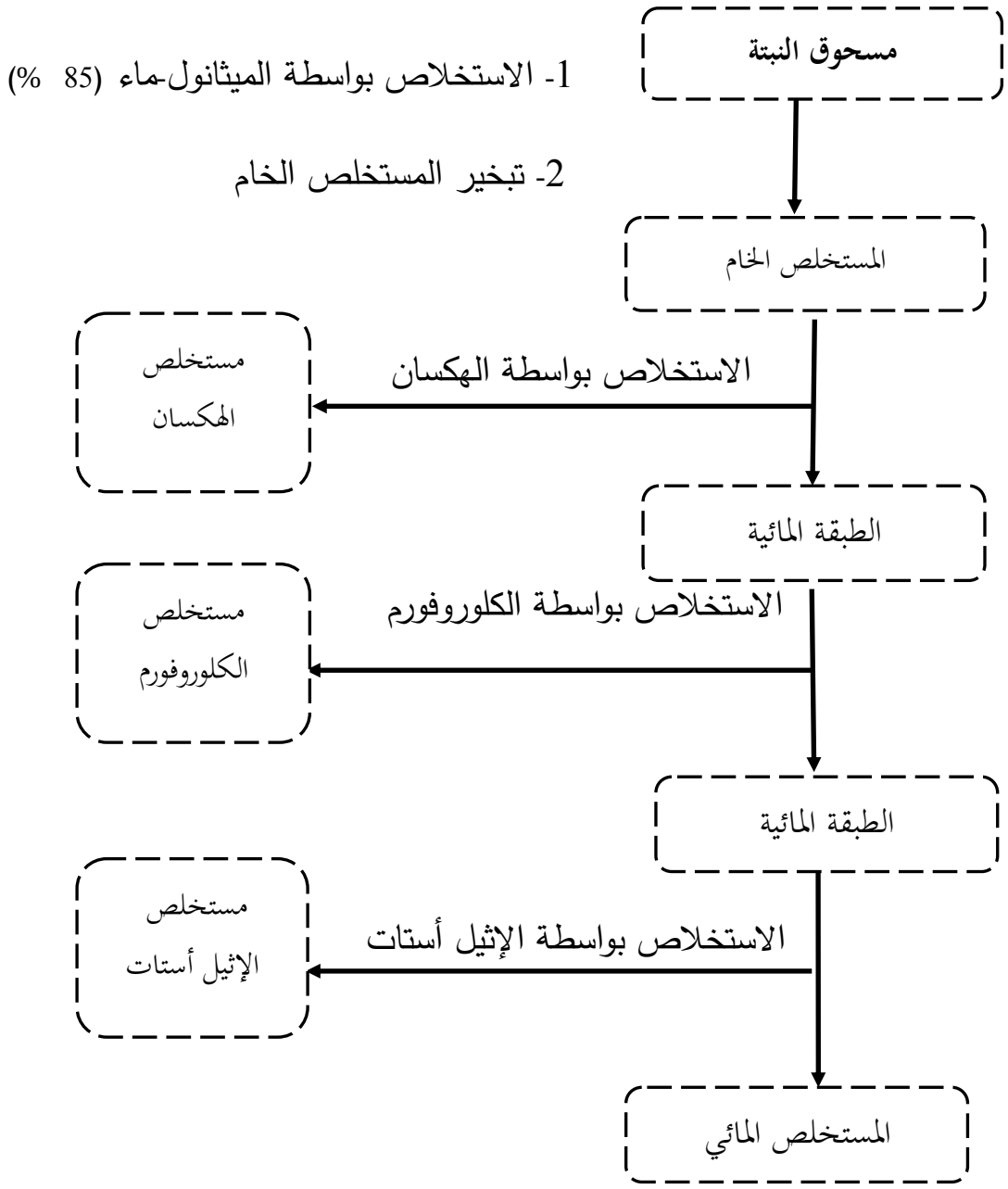
2.1 المواد الكيميائية

استعملت في هذه الدراسة عدة مذيبات عضوية مثل الميثانول والإيثانول وإيثيل الأستات والكلوروفورم ذات درجة تحليلية (analytical grade) من مصادر مختلفة. كما استعملت العديد من المركبات مثل حمض الليبوييك (Linoleic acid)، ammonium thiocyanate، b-carotene، butylated hydroxytoluene (BHA) (Fluka)، 2, 2-diphenyl-1- (DPPH) picryl- hydrazyl، ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)، gallic acid من Sigma. Potassium ferricyanide، trichloroacetic acid (TCA)، thiobarbituric acid (TBA)، ferrous و ferric chloride من Merck. بالاضافة إلى Tween 40 و Tween20.

2. الطرق

1.2 استخلاص المركبات الفينولية

لأن هناك تنوع كبير في ذوابانية المركبات الفينولية فقد تم استخلاصها باستعمال مذيبات عضوية متزايدة القطبية إتباعا لطريقة Markham (1982). وتتم هذه الطريقة باستخلاص 100غ من مسحوق النبات في 1 لتر من الميثانول والماء (85: 15 حجم \حجم) لمدة 3 أيام وقد تم استعمال مزيج هذا المحلول لاستخلاص أكبر عدد من المركبات التي أظهرت خصائصا مضادة للأكسدة (Anwar وآخرون، 2012)، وبعد عملية الترشيح وتبخير الميثانول، يحفظ جزء منه كمستخلص خام، أما الجزء المتبقي فيتم غسله بمحلول hexane عدة مرات للتخلص من الكلوروفيل والدهون ثم يطرح هذا الطور ويغسل المستخلص المتبقي بمحلول الكلوروفورم لاستخلاص الفلافونويدات غير السكرية ثم الايثيل أستات لاستخلاص الفلافونويدات المرتبطة بالسكريات الأحادية. في كل مرة يتم تبخير هذه المحاليل للحصول على مستخلصات الكلوروفورم والايثيل أستات على التوالي أما الجزء الباقي فيمثل المستخلص المائي. المستخلصات الناتجة يتم تجفيفها وتخزينها في المجمد. يتم حساب مردود الاستخلاص لكل عينة وتستعمل العينات المجففة في الاختبارات المجراة في هذه الدراسة (الشكل 14).

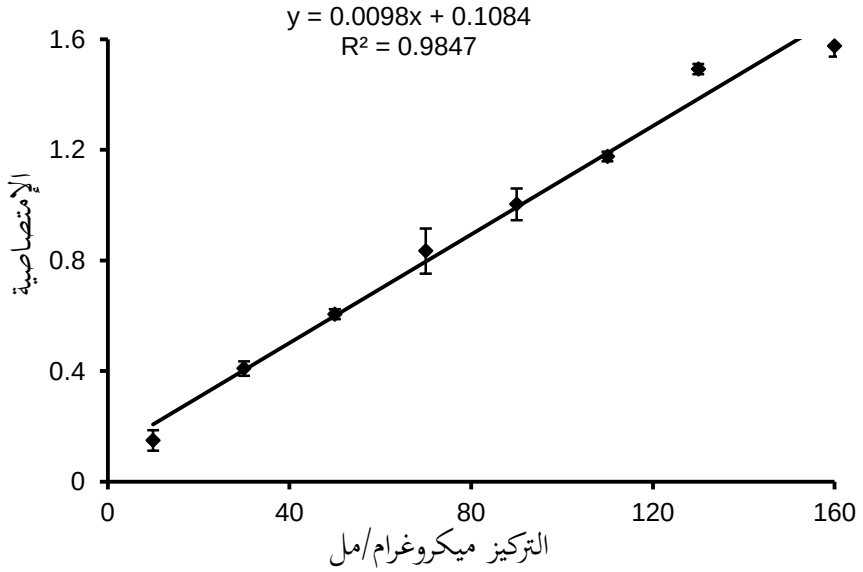


شكل 14. خطوات إستخلاص المركبات الفنولية لأوراق *P. lentiscus* والجزء الهوائي *A. campestris* وأوراق *A. spinosa* (Markham، 1982).

2. 2 تقدير عديدات الفينول الكلية

تم استعمال طريقة Folin-Ciocalteu لتقدير عديدات الفينول الكلية لمختلف المستخلصات النباتية (Li وآخرون، 2007). نضع 100 ميكرولتر من العينة في أنبوب الاختبار ثم نضيف لها 500 ميكرولتر من كاشف Folin-Ciocalteu (المخفف 10 مرات). بعد 4 دقائق، نضيف 400

ميكرولتر من كربونات الصوديوم 7.5 %، تقاس امتصاصية الخليط في طول موجة 765 نانومتر بعد مرور 1 سا و30 د. يعبر عن النتائج بعدد الملغرامات المكافئة لحمض الغاليك لكل غرام من الوزن الجاف للمستخلص النباتي، وتم إنشاء المنحنى العياري للغاليك (10-160 ميكرروغرام/مل) من أجل هذا الاختبار الموضح في الشكل 15.

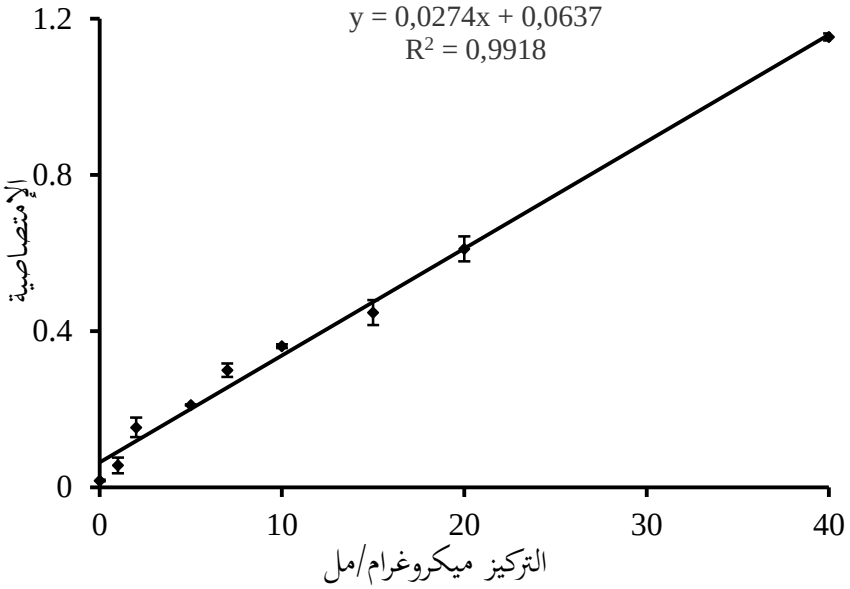


الشكل 15. منحنى العيارية لحمض الغاليك من أجل تقدير عديدات الفنول الكلية. كل نقطة من المنحنى تمثل الوسيط الحسابي± الانحراف المعياري (SD+M) (n=3).

2. 3 تقدير كمية الفلافونويدات

تم تقدير كمية الفلافونويدات للمستخلصات النباتية بطريقة $AlCl_3$ (Bahorun وآخرون، 1996). نضيف 1 مل من محلول التخفيف المختار للمستخلص إلى 1 مل من $AlCl_3$ بتركيز 2 % والمذاب في الميثانول ثم ترج الأنابيب وتحضن في درجة حرارة المخبر لمدة 10 دقائق وبعد فترة التفاعل نقيس الامتصاصية في طول موجة 430 نانومتر. نستعمل الكرستين (1- 40 ميكروغ/مل) لتحديد منحنى العيارية الموضح في الشكل 16 ويتم التعبير عن النتائج بعدد

الملغرامات المكافئة للكرستين لكل غرام من وزن المستخلص الجاف الخاص بكل مستخلص (شكل 16).

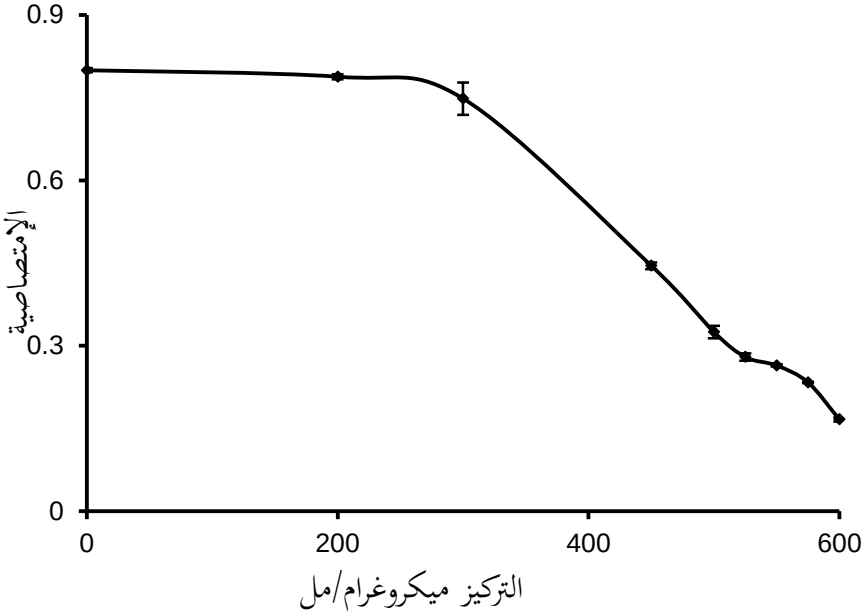


الشكل 16. منحنى العيارية للكرستين لتقدير الفلافونويدات في مستخلصات *P. lentiscus* و *A. campestris* و *A. spinosa*. كل نقطة من المنحنى تمثل الوسيط الحسابي (M ± SD) (n=3).

4.2 تقدير كمية الدباغ الكلية

تم تقدير كمية الدباغ الموجودة في المستخلصات النباتية بالاعتماد على خاصية ترسيب الهيموغلوبين الذي تتميز به الدباغ (Gharzouli وآخرون، 1999). باختصار يضاف حجم من الدم (امتصاصيته = 1.6) إلى نفس الحجم من المستخلص (تركيز مناسب)، بعد الحضن لمدة 20 دقيقة وفي درجة حرارة الغرفة يتم اجراء عملية الطرد المركزي لمدة 10 دقائق وبقيمة 4000 دورة/د، يتم قراءة الجزء الطافي عند طول الموجة 576 نانومتر. يستعمل حمض التانيك (0-600 ميكروغرام /مل) لتحديد منحنى العيارية الموضح في الشكل 17 ويتم التعبير عن النتائج

بعدد الملغرامات المكافئة لحمض التانيك لكل غرام من وزن المستخلص الجاف الخاص بكل مستخلص.



شكل 17. منحنى العيارية لحمض التانيك لتقدير كمية الدباغ الكلية في مستخلصات *P. lentiscus* و *A. campestris* و *A. spinosa*. كل نقطة من المنحنى تمثل الوسيط الحسابي (M± SD) (n=3).

2. 5 التأثير الإزاحي باستعمال اختبار DPPH

تعتبر DPPH من أكثر الطرق استعمالا في تقدير التأثير الازاحي للمركبات الفينولية والمستخلصات النباتية حيث يستعمل هذا الاختبار جذر 2,2'-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) وهو جذر مستقر ذو لون بنفسجي وبتفاعله مع العامل المضاد للأكسدة (AH) يتحول لونه إلى الأصفر (Benabadji وآخرون، 2004). تضاف 50 ميكرولتر من مختلف تراكيز عينات المستخلصات النباتية والمركبات الفنولية إلى 5 مل من المحلول الميثانولي DPPH (0.004%)، ويستعمل الكرستين والروتين وحمض الغاليك كمعايير للمقارنة. تحضن في درجة حرارة الغرفة وفي الظلام لمدة 30 دقيقة، بعد مرور هذه الفترة نقيس الكثافة الضوئية للمحاليل

في طول موجة 517 نانومتر مقارنة مع الشاهد (الذي يحتوي كل مواد التفاعل ماعدا المادة المختبرة). نحسب نسبة تثبيط الجذر الحر DPPH (I%) كما يلي:

$$I\% = (A_{\text{الشاهد}} - A_{\text{العينة}})/A_{\text{الشاهد}} * 100$$

$A_{\text{الشاهد}}$: امتصاصية الشاهد الذي يحتوي على جميع المتفاعلات ما عدا العينة.

$A_{\text{العينة}}$: الامتصاصية في وجود العينة.

يتم حساب التركيز الموافق لتثبيط 50 % من الجذر الحر (IC_{50}) من منحنى نسب التثبيط (I%) مع تراكيز المستخلصات أو المركبات الفنولية و القيمة الأقل ل IC_{50} تمثل التأثير الإزاحي الأكبر للمستخلص المعاين.

6.2 إختبار ازاحة جذر ABTS

تم استعمال اختبار ABTS الذي يعتبر أيضا من أكثر الطرق استعمالا لتحديد التأثير الازاحي للمستخلصات النباتية وقد تم باتباع طريقة (Re وآخرون، 1999). يتم أولا تحضير جذر ABTS بمزج محلول ABTS (7 ميلي مول/ل) ومحلول potassium persulfate (2.45 ميلي مول/ل) لليلة كاملة ثم يخفف هذا المحلول بالميثانول للحصول على إمتصاصية بقيمة 0.7 عند طول موجة 734 نانومتر. تضاف 50 ميكرولتر من مختلف تراكيز عينات المستخلصات النباتية إلى 1 مل من المحلول الميثانولي لـ ABTS ويستعمل trolox كمعيار للمقارنة، يكرر كل تركيز 3 مرات. تحضن في درجة حرارة الغرفة وفي الظلام لمدة 30 دقيقة، بعد مرور هذه الفترة نقيس الكثافة الضوئية للمحاليل في طول موجة 734 نانومتر مقارنة مع الشاهد (الذي

يحتوي كل مواد التفاعل ماعدا المادة المختبرة). نحسب نسبة تثبيط الجذر الحر ABTS (I%) بنفس طريقة DPPH.

7.2 إختبار ازاحة جذر الهيدروكسيل

يعتبر تفاعل fenton المصدر الرئيسي في الخلية لانتاج جذر الهيدروكسيل وبذلك تعتمد التجربة على تشكيل هذا الجذر من خلال تفاعل H_2O_2 مع أيونات الحديد المرجع، يقوم جذر $OH^{\cdot}$ الناتج بأكسدة المركبات العطرية المحتوية على مجاميع هيدروكسيلية والتي يمكن تقديرها بالطرق اللونية. إن إضافة المادة المضادة للأكسدة تؤدي إلى ارجاع جذر $OH^{\cdot}$ والتقليل من درجة الأكسدة وبذلك قياس قدرة هذه المضادات على ازاحة الجذر، يتم ذلك عن طريق الإختبار المستعمل من طرف Li وآخرون (2008). تتلخص الطريقة في إضافة 600 ميكرولتر phenanthroline (5 ميلي مولر)، 600 ميكرولتر من $FeSO_4$ (5 ميلي مولر)، 600 ميكرولتر EDTA (15 ميلي مولر)، 400 ميكرولتر من المحلول الفوسفات المنظم (0.2 مولر، pH =7.4)، 800 ميكرولتر من H_2O_2 (0.01 %) إلى 600 ميكرولتر من المادة المراد دراسة تأثيرها الازاحي لجذر الهيدروكسيل، وبعد ساعة من الحضن في درجة حرارة 37 م$^{\circ}$، يتم قراءة الامتصاصية في طول موجة 536 نانومتر. أستعمل الفيتامين C كمرجع للمقارنة.

8.2 القدرة الارجاعية

يعتبر إرجاع Fe^{+3} ككاشف لنشاطية منح الالكترونات والتي تمثل آلية مهمة في النشاط المضاد للأكسدة للمركبات الفينولية (Ozsoy وآخرون، 2008). تم قياس القدرة الارجاعية لمستخلصات النباتات (المذابة في مختلف المحاليل العضوية) باستعمال طريقة Chung

وآخرون (2005). يمزج 0.1 مل من مختلف تراكيز العينة مع نفس الحجم من المحلول المنظم (0.2 مولر، pH =6.6) و0.1 مل من K_3FeCN_6 بعد الحضن لمدة 20 دقيقة وفي 50 م° لارجاع ferricyanide إلى ferrocyanide، يضاف 0.25 مل من (1%) حمض trichloroacetic لايقاف التفاعل ثم تجرى عملية طرد مركزي بسرعة 3000 دورةادقيقة لمدة 10 دقائق. يؤخذ 0.25 مل من الجزء الطافي ويضاف له 0.25 مل من الماء المقطر، 0.5 مل $FeCl_3$ (0.1 %)، تقرأ الامتصاصية عند طول موجة 700 نانومتر لتقدير كميةferric ferrocyanide المتشكل (أزرق بروسي) باستعمال جهاز spectrophotometer.

9.2 اختبار النشاطية المضادة لأكسدة حمض الينولييك Ferric thiocyanate (FTC)

تستعمل طريقة Ferric thiocyanate لتحديد كمية الجذور الناتجة عن المرحلة الأولى لأكسدة الليبيدات باتباع طريقة Chang وآخرون (2002). يحضر مستحلب حمض linoleic (0.02 مولر) بمزج 155 ميكرولتر من حمض linoleic و155 ميكرولتر من Tween 20 مع محلول الفوسفات النظامي (50 مل، 0.02 مولر، pH = 7.4). يحتوي محلول التفاعل على مستخلص النبات بتراكيز مختلفة (0.5 مل) ومستحلب حمض linoleic (2.5 مل) والمحلول المنظم (2 مل)، ترج الأنابيب وتحفظ في الظلام في درجة حرارة 40 م° لتقاس فيما بعد درجة التأكسد. نأخذ 0.1 مل من محلول التفاعل، يضاف له 4.7 مل من الإيثانول (75%) و0.1 مل من ammonium thiocyanate (10%)، بعد 3 دقائق يضاف 0.1 مل من $FeCl_2$ (0.02 مولر في 3.5 % HCL)، تقدر مباشرة كمية جذور البيروكسيد الناتجة بقياس الامتصاصية عند طول موجة

500 نانومتر كل 24 ساعة إلى غاية انخفاض إمتصاصية الشاهد. أستعمل BHT C كمعيار للمقارنة.يتم حساب نسبة التثبيط باستعمال العلاقة التالية:

$$I\% = (1 - A_{\text{العينة}} / A_{\text{الشاهد}}) * 100$$

$A_{\text{الشاهد}}$: جميع المركبات ما عدا المستخلص.

10.2 إختبار بيتا-كاروتين/حمض اللينولييك

تقدر النشاطية المضادة للأكسدة في هذا الاختبار بقياس تثبيط تشكل الهيدروبيروكسيد الثنائية (diene conjugated hydroperoxide) والمواد العضوية الطيارة الناتجة عن أكسدة حمض اللينولييك (Aslan وآخرون، 2006). نذيب 0.5 مغ من β-carotene في 1 مل كلوروفورم، ثم نضيف 25 ميكرولتر حمض اللينولييك و200 مغ من Tween 40 مع الرج، ثم يتم تبخير الكلوروفورم كليا في جهاز التبخير في 40 ْم، ونضيف 100 مل ماء مقطر مشبع بالأكسجين (لمدة 30 دقيقة، سرعة التدفق 100 مل/دقيقة) مع الرج. في الأخير نضع 2.5 مل من الخليط المحضر سابقا في أنابيب الاختبار، ونضيف له 350 ميكرولتر من العينات المحضرة بتركيز 2 مغ/مل، نفس العملية تجرى مع BHT كشاهد موجب، ومع مذيبات المستخلصات النباتية كشواهد سالبة (الماء المقطر والميثانول)، يكرر الاختبار ثلاث مرات مع كل مستخلص، وتحضن الأنابيب في درجة حرارة المخبر في الظلام، لنقيس امتصاصية المحاليل في طول موجة 490 نانومتر بعد ساعة ثم بعد ساعتين و4 ساعات و6 ساعات و24 و48 ساعة. تقارن النشاطية المضادة للأكسدة للعينات مع BHT والشاهد السالب. ويتم حساب نشاطية المستخلصات والمركبات الفنولية المضادة للأكسدة النسبية (RAA%) حسب المعادلة التالية:

$$RAA\% = A_{\text{العينة}} / A_{BHT} * 100$$

$A_{\text{العينة}}$: امتصاصية العينة، و A_{BHT}: امتصاصية في وجود BHT.

11.2 إختبار استخلاب الحديد

تعتبر المعادن المرجعة الموجودة بشكل حر مثل الحديد محفزات قوية في تفاعلات الأكسدة وانتاج الجذور الحرة، تقوم مستخلصات النباتات المدروسة بتثبيط تشكيل معقد Fe^{+2}-Ferrozine اتباعا لطريقة Decker و Welch (1990). تضاف إلى 500 ميكرولتر من مختلف تراكيز عينات المستخلصات النباتية أو EDTA 100 ميكرولتر من $FeCl_2$ (0.6 ميلي مولر) و 900 ميكرولتر من الميثانول، بعد رج الخليط وتركه في درجة حرارة المخبر لمدة 5 دقائق يضاف 100 ميكرولتر من ferrozine (5 ميلي مولر). تقرأ امتصاصية المعقد Fe^{+2}-Ferrozine المتشكل عند طول موجة 562 نانومتر بعد 10 دقائق من التفاعل. يحتوي الشاهد على كل المتفاعلات ماعدا العينة أو EDTA. نحسب نسبة استخلاب الحديد كما يلي:

$$(\%) = (A_{\text{الشاهد}} - A_{\text{العينة}}) / A_{\text{الشاهد}} * 100$$

$A_{\text{الشاهد}}$: امتصاصية الشاهد الذي يحتوي على جميع المتفاعلات ما عدا العينة.

$A_{\text{العينة}}$: الامتصاصية في وجود العينة.

يتم حساب التركيز الفعال الموافق لتثبيط 50 % من الجذر الحر (IC_{50}) من منحنى نسب التثبيط (I %) مع تراكيز المستخلصات والقيمة الأقل لـ IC_{50} تمثل التأثير الإستخلابي الأكبر للمستخلص المعاين.

2. 12 القدرة المضادة لانحلال كريات الدم الحمراء

تم قياس النشاطية المضادة لانحلال الدم للمستخلصات النباتية باتباع طريقة Girard وآخرون (2006). تعتمد هذه الطريقة على تعريض عينة من دم الفئران إلى هجوم من طرف جذر AAPH، في هذه الحالة نقوم باضافة المستخلصات النباتية لاختبار قدرتها على حمايتها من الأكسدة. يضاف 136 ميكرولتر من محلول AAPH (300 ملي مولر) إلى 80 ميكرولتر من الدم المخفف (4%) ويتم تتبع انخفاض الامتصاصية نتيجة انحلال كريات الدم في طول موجة 630 نانومتر الذي يعتبر كشاهد سالب. يتم تتبع حماية المستخلصات النباتية لكريات الدم الحمراء ويتم حساب الزمن اللازم لانحلال 50 % من كريات الدم الحمراء (half-hemolysis Time, HT_{50}).

13.2 دراسة النشاطية المضادة للأكسدة للمستخلصين الخامين لنباتي *P. lentiscus* و *A. Campestris* على مستوى الأنسجة الحية.

2. 13. 1 معاملة الحيوانات

استخدمت في هذه الدراسة التجريبية إناث بالغة للجرذان البيضاء تتراوح أوزانها بين 150-190 غ وقد تم توزيعها في أقفاص بلاستيكية بمعدل ستة حيوانات في كل قفص مع وفرة الغذاء الذي تحصلنا عليه من مصنع غذاء الحيونات O.N.A.B بمنطقة القصر بولاية بجاية كما قدّمت للحيوانات رضّاعات تحتوي على ماء الحنفية، ولقد كانت درجة حرارة المكان المخصص للتجربة مثلى في حدود 25م°. من أجل دراسة تأثير المستخلصين النباتيين أجريت الدراسة على الجرذان البيضاء كمايلي:

قسمت الحيوانات إلى9 مجاميع متوافقة من ناحية الوزن و يتراوح عددها بين 5 و 6 جرذان في كل مجموعة و قد أجريت معاملتها لمدة 14 يوما حسب Sathiyanarayanan وآخرون (2010) كالآتي:

جرذان المجموعة الأولى: أعطيت جرذان هذه المجموعة المحلول الفيزيولوجي NaCl بتركيز 0.9 %.

جرذان المجموعة الثانية: أعطيت جرذان هذه المجموعة الفيتامين C 100 مغ/كغ من وزن الجرذ.

جرذان المجموعة الثالثة والرابعة والخامسة: أعطيت جرذان هذه المجموعات المستخلص الخام لنبات *P. lentiscus* بتركيز 100 و200 و400 مغ/كغ من وزن الجرذ على التوالي.

جرذان المجموعة السادسة والسابعة والثامنة: أعطيت جرذان هذه المجموعات المستخلص الخام لنبات *A. campestris* بتركيز 100 و200 و400 مغ/كغ من وزن الجرذ على التوالي. تم إعطاء تحضيرات المستخلصات عن طريق الفم باستخدام أنبوبة معدية خاصة بالجرذان (Gastric tube) وقد تم أخذ أوزان الحيوانات قبل بدء المعاملات وبعدها، وكذلك روقبت يوميا وذلك قصد تسجيل أيا من الأعراض الإكلينيكية أو حالات الوفاة.

2. 13. 2 أخذ الدم

بعد المعاملة الأخيرة لكل جرذ تم الحصول على حجم كاف من الدم من 3 إلى 4.5 مل (في أنابيب تحتوي على الهيبارين المضاد للتخثر الدموي)، أين أجريت له عملية الطرد المركزي بسرعة 3500 دورة/د لمدة 15 دقيقة، يؤخذ المصل ويخزن في درجة حرارة (−20 م°) إلى حين استعماله.

2. 13. 3 قتل الحيوانات و أخذ الأعضاء

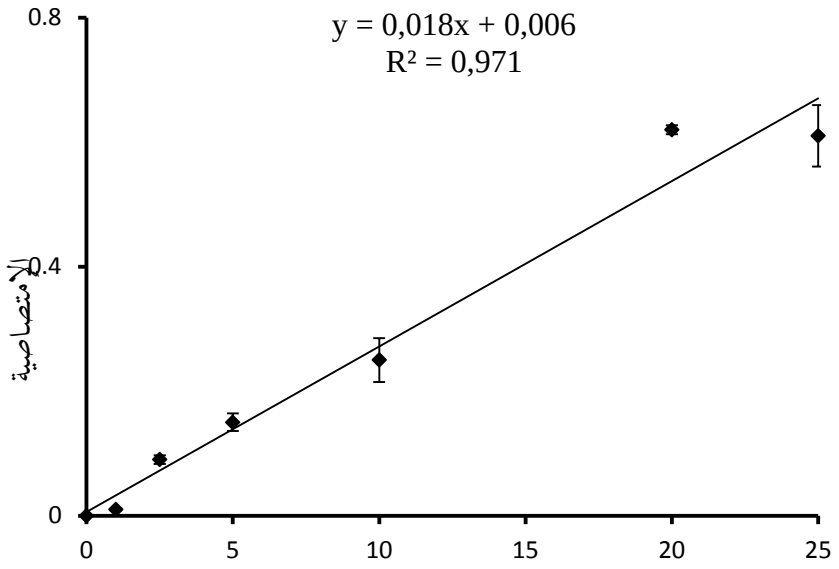
بعد استنزاف الدم من جرذان التجربة، قتلت من أجل إجراء تشريح كل جرذ على حدى، حيث عزلت الكبد من كل جرذ بسرعة وقد تم غسلها جيدا بالمحلول الفيزيولوجي (0.9 %) المبرد أين وضعت الأعضاء بين ورقتي ترشيح لادمصاص المحلول الفيزيولوجي وقد تم وزنها ثم قطعت إلى قطع بهدف تحضير الخليط المتجانس، ولتحضير هذا الأخير قمنا بإضافة KCl (1.15 %) للقطعة الموزونة بنسبة 1غ في 9 مل من المحلول وبعد عملية التجانس باستعمال الخلاط الكهربائي المتجانس (Homogenizer) تم الحصول على خليط متجانس أجري له عملية طرد مركزي بسرعة 4000 دورة/د لمدة 10 دقائق في درجة حرارة 4 م° باستعمال جهاز الطرد المركزي لإزالة البقايا الخلوية وأخذ الجزء الطافي لغرض قياس المؤشرات غير الإنزيمية (MDA و GSH) والانزيمية (catalase).

2. 13. 4 تقدير البروتينات الكلية

تم تقدير كمية البروتينات حسب طريقة Biuret باستعمال الكاشف المرجعي (**REF: 1001291**)، تعطي البروتينات لونا أزرقا- بنفسجيا بتفاعلها مع كبريتات النحاس في وسط قاعدي ويتم قياس اللون المتشكل عند طول موجة 540 نانومتر الذي يكون مرتبطا بتركيز البروتينات في نسيج الكبد. يعبر عن الكمية بـ مغ/دل باستعمال منحنى العيارية لبروتين الألبيمين في نفس الشروط.

2. 13. 5 تقدير أكسدة الليبيدات (TBARS) في الكبد

يعتبر MDA معيارا مهما لأكسدة الليبيدات والتي يتم تحديد قيمتها بطريقة Okhawa وآخرون (1979). تتفاعل كل جزيئة MDA مع جزيئتين من حمض thiobarbitiric (TBA) في وسط حامضي ودرجة حرارة مرتفعة لتشكيل مركب ذو لون وردي يمكن قياسه عند طول موجة 532 نانومتر. يضاف للخليط المتجانس للكبد 0.5 مل TCA (20 %) و1 مل TBA (0.67 %)، يسخن المزيج حتى الغليان لمدة 15 د ثم يبرد. يضاف 4 مل n-butanol يصحبها عملية طرد مركزي لمدة 15 د و3000 دورة/د، يقاس الجزء الطافي عند طول موجة 532 نانومتر ويعبر عن النتائج بنانومول/غ النسيج باستعمال منحنى العيارية لمركب 1,1',3,3'ethoxypropane الموضح في الشكل (18).

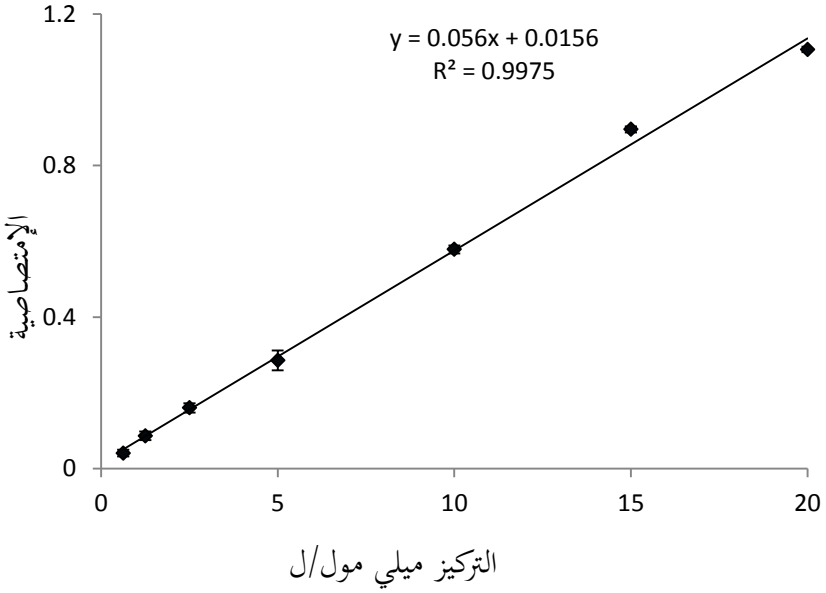


شكل 18. منحنى العيارية لـ 1,1,3,3-tetraetoxypropane لحساب كمية MDA. كل نقطة من المنحنى تمثل الوسيط الحسابي (M ± SD) (n=3).

2. 13. 6 تقدير مستوى GSH

تم تقدير مستوى الغليتاتيون المرجع (GSH) باستعمال طريقة Ellman وآخرون (1959). تعتمد هذه الطريقة على إرجاع كاشف Ellman بواسطة المجاميع الكبريتية (SH) لتشكيل حمض-2

nitro-5- mercaptobenzoïc الذي يتم تقديره عند طول موجة 412 نانومتر وتم حساب كمية الغليتاتيون باستعمال منحنى العيارية الموضح في الشكل (19).



الشكل 19. منحنى العيارية لتقدير كمية الغليتاتيون (GSH). كل نقطة من المنحنى تمثل الوسيط الحسابي (M ± SD) (n=3).

2. 13. 7 تقدير النشاطية الإنزيمية لـ catalase

تم قياس نشاطية إنزيم catalase في نسيج الكبد باتباع طريقة Clairborne (1985)، تعتمد على اتباع انخفاض الامتصاصية عند طول موجة 240 نانومتر الناتج عن تجزئة H_2O_2 إلى ماء وأكسجين بواسطة الانزيم. يضاف 50 ميكرولتر من الخليط المتجانس الى 2.950 مل من H_2O_2 (19 ميلي مولر) المخفف في محلول الفوسفات (0.1 مولر، pH= 7.4). يتم متابعة التغير في الامتصاصية عند t=0، t=1 د، t=2 د. يعبر عن النشاط الإنزيمي بمفهوم عدد الوحدات الدولية لكل غ من وزن نسيج (UI /g weight tissue) وذلك حسب الفاعل التالي:

$$K = \frac{2.303}{T} \times \log (A_1/A_2)$$

حيث أن:

A1: الامتصاص في الزمن t=0

A2: الامتصاص في الزمنt=1

T: الفرق الزمني بالدقائق

14.2 التحليل الاحصائي

تم التعبير عن النتائج التجريبية على شكل متوسط حسابي (M) لكل القيم المتحصل عليها ± الانحراف المعياري (SD). وتم استعمال اختبار one-way analyse (ANOVA) متبوع باختبار Dunnet لمقارنة قيم المستخلصات مع الشواهد وكذلك استعمل إختبار student لمقارنة قيم المستخلصات فيما بينها بتوفر المعايير التالية $p < 0.05$.

النتائج والمناقشة

1. استخلاص المركبات الفينولية

تم تحضير مستخلصات نباتات *P. lentiscus* و *A. campestris* و *A. spinosa* باستعمال محاليل متزايدة القطبية بداية بالمستخلص الخام (Markham، 1982). استعمل الهكسان لإستخلاص الليبيدات والكلوروفيل والشموع و محلول الكلوروفورم لإستخلاص الفلافونويدات غير السكرية ومحلول إثيل أسيتات لإستخلاص الفلافونويدات أحادية وثنائية السكر، في حين يحتوي الجزء المائي المتبقي على الفلافونويدات الأكثر قطبية، ثلاثية ورباعية السكر. أظهر تقدير مردود الاستخلاص بالنسبة لـ 100 غ من الوزن الجاف للنبتة أن المستخلص الخام (CE) لنبات *P. lentiscus* يمتلك القيمة الأعلى والتي قدرت بـ 20.2 % في حين أظهر مستخلص الكلوروفورم القيمة الأضعف بقيم 0.8 % لهذا النبات. تميز المستخلص الخام لنبات *A. campestris* أيضا بأعلى مردود بقيمة 14.6% في حين سجلت القيمة الأدنى عند مستخلص الكلوروفورم بـ 2.8%. بالنسبة لنبات *A. spinosa* أيضا كانت القيمة الأكبر للمردود عند المستخلص الخام بقيمة 27.7% بينما القيمة الأضعف عند مستخلص الكلوروفورم بقيمة 0.7 %.

جدول1. مردود استخلاص عديدات الفينول في نباتات *P. lentiscus* و *A. campestris* و *A. spinosa*

مردود الاستخلاص %	*P. lentiscus*	*A. campestris*	*A. spinosa*
مستخص الهيدروميثانول CE	3.02 ± 20.2	1.05 ± 14.6	2.98 ± 27.7
مستخلص الكلوروفورم CHE	0.08 ± 0.8	0.08 ± 2.8	0.064 ± 0.7
مستخلص الإيثيل أستات EAE	0.91 ± 6.8	1.45 ± 4.9	0.08 ± 2.1
المستخلص المائي AQE	2.01 ± 19.6	1.67 ± 11.2	1.95 ± 18.1

تعتبر عملية استخلاص المركبات النباتية الخطوة الأولى لاستعمالها في مختلف المجالات كحوافظ غذائية أو مواد صيدلانية أو في مجال التجميل وتستخلص المركبات الفينولية ابتداءا من عينات نباتية طازجة أو مجمدة أو مجففة وتستعمل على شكل مسحوق من أجل تسهيل دخول المحلول إلى الخلايا النباتية المحطمة وبذلك استخراج كمية أكبر من المكونات الخلوية (Abascal وآخرون، 2005). عموما يرتبط مردود استخلاص مختلف المركبات النباتية بقطبية المحلول الذي يحدد كل من كمية ونوع المركبات المستخلصة المضادة للأكسدة، كما أن وقت الاستخلاص ودرجة الحرارة ونسبة العينة بالنسبة للمحلول والتركيب الكيميائي للنبات لها دور مهم في عملية الاستخلاص (Robards، 2003). أظهرت نتائجنا أن الميثانول مع الماء يمكنه أن يرفع من مردود الإستخلاص وهذا ما تثبته العديد من الدراسات التي بيّنت أن المحاليل القطبية خاصة الميثانول والايثانول ومزيج هذه المحاليل مع الماء من أكثر وأحسن الأنظمة استعمالا لاستخلاص المركبات الفينولية، كما أظهرت فعاليتها في استخلاص المركبات الفينولية من مختلف أجزاء النباتات مثل الفواكه والبذور والأوراق والتي تمتلك تأثيرات مضادة للأكسدة (Sultana وآخرون، 2009). في دراسة أخرى قام بها Xiao وآخرون (2008) بيّن من خلالها أن مردود الفلافونويدات يزداد بإضافة الماء وذلك لذوبانية المكونات النباتية فيه. جاء ترتيب مردود الإستخلاص كالتالي: CHE < EAE < CE، تتوافق هذه النتائج مع تلك المسجلة بالنسبة لإستخلاص المركبات الفينولية لنبات *Teucrium polium* (Boumerfeg وآخرون، 2012)، وهذا باعتماد نفس الطريقة.

2. تقدير المركبات الفينولية والفلافونويدات والدباغ من العينات النباتية

تم تقدير المركبات الفينولية الكلية باستعمال طريقة Folin–Ciocalteu، حيث تعطي هذه المركبات لونا أزرقا بارتباطها مع حمض phosphomolybdic–phosphotungstic (Folin-Ciocalteu) الذي يتم قياس امتصاصيته عند طول موجة 765 نانومتر (Georgé وآخرون، 2005). يعبر عن النتائج بعدد الميلغرمات المكافئة لحمض gallic لكل غ من الوزن الجاف للمستخلص. أظهرت النتائج المدونة في الجدول (2) أن هناك اختلافا في كمية عديدات الفينول لمختلف المستخلصات، حيث تتراوح القيم بين (207 ± 0.021 إلى 390 ± 0.05) ؛ (± 65.5 0.0035 إلى 481.25 ± 0.026)؛ (106.33 ± 0.062 إلى 447.22 ± 0.028 **مغ مكافىء** لحمض gallic/ غ من الوزن الجاف) لكل من مستخلصات *P. lentiscus* و*A. campestris* و*A. spinosa* على التوالي. احتوى CE لنبات *P. lentiscus* الكمية الأكبر لعديدات الفينول، بينما سجل مستخلص CHE القيمة الأقل. بالنسبة لنبات *A. campestris* فقد تميز EAE أيضا باحتوائه على الكمية الأعلى، بينما كانت القيمة الأدنى لدى AQE. يتبين أيضا أن EAE لنبات *A. spinosa* أكثر غنى من حيث عديدات الفينول، في المقابل يظهر CHE القيم الدنيا (جدول 2).

جدول 2. محتوى عديدات الفينول الكلية لمستخلصات نباتات *P. lentiscus* و *A. campestris* و *A. spinosa*.

المستخلصات	مغ مكافئ لحمض الغاليك /غ من الوزن الجاف		
	P. lentiscus	*A. campestris*	*A. spinosa*
CE	0.05 ± 390	0.033 ± 143.4	0.02 ± 256.16
CHE	0.021 ± 207	0.08 ± 169.2	0.062 ± 106.33
EAE	0.085 ± 262	0.026 ± 481.25	0.028 ± 447.22
AQE	0,015 ± 301.5	0.0035 ± 65.5	0.004 ± 216.33

تم تقدير الفلافونويدات باستعمال طريقة $AlCl_3$، حيث يشكل هذا الأخير معقدا مع الوظيفة الكيتونية (CO)\الوظيفة الهيدروكسيلية (OH) على مستوى الحلقة A والحلقة C، كما يمكن أن يشكل معقدا مع وظيفة orthodihydroxyl للحلقة A و B للفلافونويدات، يتم قياس كمية هذا المعقد لونيا باستعمال جهاز spectophotometer، وكلما كانت كمية المعقد أكبر كلما كانت الامتصاصية في 430 نانومتر أكبر (Chang وآخرون، 2002). يعبر عن النتائج بعدد ميلغرامات المكافئة لـ quercetin لكل غ من الوزن الجاف للنبات. بينت النتائج المدونة في الجدول (3) أن EAE لنبات *P. lentiscus* يحتوي على أكبر كمية من الفلافونويدات بقيمة 82.37± 0.043 مغ مكافئ لـ quercetin/غ من الوزن الجاف بالمقابل امتلك AQE الكمية الأقل بـ 13.38 ± 0.03 مغ مكافئ لـ quercetin/غ . سجلت القيمة الأعلى عند نبات *A. campestris* عند CHE بقيمة 34.37 ± 0.056 مغ مكافئ لـ quercetin/غ من الوزن الجاف، أما القيم الأصغر للفلافونويدات عند AQE لنباتات بقيمة 8.56 ± 0.0005 ومغ مكافئ لـ quercetin/غ من الوزن الجاف. تميز نبات *A. spinosa* هو الآخر بغنى EAE (185.93 ± 0.009) وضعف عند AQE

(0.003±1.18). عند مقارنة النباتات الثلاث فيما بينها يلاحظ أن EAE لنبات *A. spinosa* هو الأغنى من حيث الفلافونويدات.

قدرت كمية الدباغ الكلية بالاعتماد على ترسيب الهيموغلوبين ويعبر عن النتائج بعدد الميلغرامات المكافئة لحمض tannic لكل غ من الوزن الجاف للنبات.

من الجدول (4) نلاحظ أن كمية الدباغ المسجلة عند مستخلصات النباتات الثلاث مختلفة كانت أعلاها عند مستخلصات CE وCHE وAQE لنبات *P. lentiscus* وبقيم متقاربة (417.7 ± 4.59؛ 363.5 ± 2.12؛ 344.2 ± 2.47 مغ مكافئ لحمض tannic/غ من الوزن الجاف) على التوالي أما عند نبات *A. spinosa* فقد سجلت الكمية الأكبر للدباغ عند CE بقيمة 325.5 ± 0.70 مغ مكافئ لحمض tannic/غ من الوزن الجاف. سجلت القيم الدنيا للدباغ عند نبات *A. campestris*.

جدول 3. كمية الفلافونويدات مستخلصات نباتات *P. lentiscus* و*A. campestris* و*A. spinosa*.

المستخلصات	*P. lentiscus*	A. *campestris*	*A. spinosa*
	مغ مكافئ للكارستين/غ من الوزن الجاف		
CE	0.029 ± 25.53	0.001 ± 17.75	0.007 ± 18.8
CHE	0.015 ± 25.23	0.056 ± 34 .37	0.004 ± 30.76
EAE	0.043 ± 82.37	0.013 ± 22.11	0.009 ± 185.93
AQE	0.03 ± 13.38	0.0005 ± 8.56	0.003 ± 1.18

جدول 4. كمية الدباغ لمستخلصات نباتات *P. lentiscus* و *A. campestris* و *A. spinosa*.

المستخلصات	مغ مكافئ لحمض التانيك /غ من الوزن الجاف		
	P. lentiscus	*A. campestris*	*A. spinosa*
CE	4.59 ± 417.7	0,21 ± 61,3	0,70 ± 325,5
CHE	2.12 ± 363.5	0,28 ± 115,6	3,25 ± 163,9
EAE	2,12 ± 126,9	3,53 ± 122,3	3,67 ± 36,2
AQE	2,47 ± 344,2	1,97 ± 48,4	1,10 ± 155,1

كل قيمة تمثل المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري (n=3).

تنتشر المركبات الفينولية بشكل واسع في المملكة النباتية وتستعملها في الدفاع ضد الأخطار الخارجية (Manach وآخرون، 2004). تعتبر الفلافونويدات من أهم المجموعات الفينولية وتتواجد في العديد من الأنواع النباتية منها الخضر والفواكه والبذور والأزهار (Middleton، 1998)، كما تمثل الدباغ أيضا مجموعة واسعة من المستقلبات الثانوية والتي تنتشر في العديد النباتات الراقية (Manach وآخرون، 2004) ويمكنها أن تؤدي تأثيرات مزيحة للجذور الحرة لامتلاكها خاصية منح الالكترونات أو الهيدروجين كما يمكنها أن تمسك الأيونات المعدنية المتدخلة في انتاج الجذور الحرة وبذلك تثبيط الأكسدة (Karamać، 2007). في دراسة قام بها Chryssavgi وآخرون (2008) على أوراق *p. lentiscus* وجد أن المستخلص الخام الميثانولي (70%) يحتوي على كميات عالية من عديدات الفينول الكلية والتي قدرت بـ 483 مغ مكافئ لحمض gallic/غ من الوزن الجاف للنبات وهي مقاربة للقيمة المتحصل عليها في دراستنا (390 مغ مكافئ لحمض gallic) ويمكن أن يعود هذا الاختلاف الطفيف إلى اختلاف نسبة

الماء بالنسبة للميثانول المستعمل في الاستخلاص. أثبت دراسة أخرى منجزة من طرف Amessis-Ouchemoukh وآخرون (2014) أن أوراق *P. lentiscus* غنية بعديدات الفنيول والتي قدرت بـ 238 مغ مكافئ لحمض gallic لكل غ من الوزن الجاف للنبات باستخدام محلول الميثانول (100%). نفس الدراسة أدت إلى تقدير كمية الفلافونويدات والدباغ (19 مغ مكافئ لـ quercetin و100 مغ مكافئ لحمض tannic على التوالي). تميز المستخلص الخام لنبات *A. campestris* بكميات أقل من عديدات الفينول مقارنة بنبات *P. lentiscus* و *A. spinosa* قدرت بـ 143 مغ مكافئ لحمض gallic لكل غ من الوزن الجاف للنبات وهي قيمة مشابهة لتلك المسجلة في دراسة قام بها Djerdiane وآخرون (2007) والتي قدرت بـ 103.4 مغ مكافئ لحمض الغاليك باستعمال محلول الميثانول بنسبة 80%. في حين أن هذه القيمة أكبر بحوالي 5 مرات من تلك المسجلة باستعمال محلول الايثانول (70%) (Djerdiane وآخرون، 2006). بالنسبة لنبات *A. spinosa* فإن الدراسات المجراة على أوراقها قليلة جدا وذلك لتركيز أغلب الدراسات حول الزيت المستخلص من ثمارها والذي يمتلك خصائص تجميلية وغذائية. يمكن أن يرجع الإختلاف في القيم باضافة الماء الذي يرفع من ذوابنية المركبات النباتية خاصة الدباغ المميهة، كما يمكن أن يعزى الإختلاف إلى طريقة الإستخلاص ودرجة الحرارة ومدة الإستخلاص ونوع المحلول المستعمل (Cai وآخرون، 2010؛ Khoddami وآخرون، 2013).

3. التأثير الازاحي باستعمال اختبار DPPH وABTS

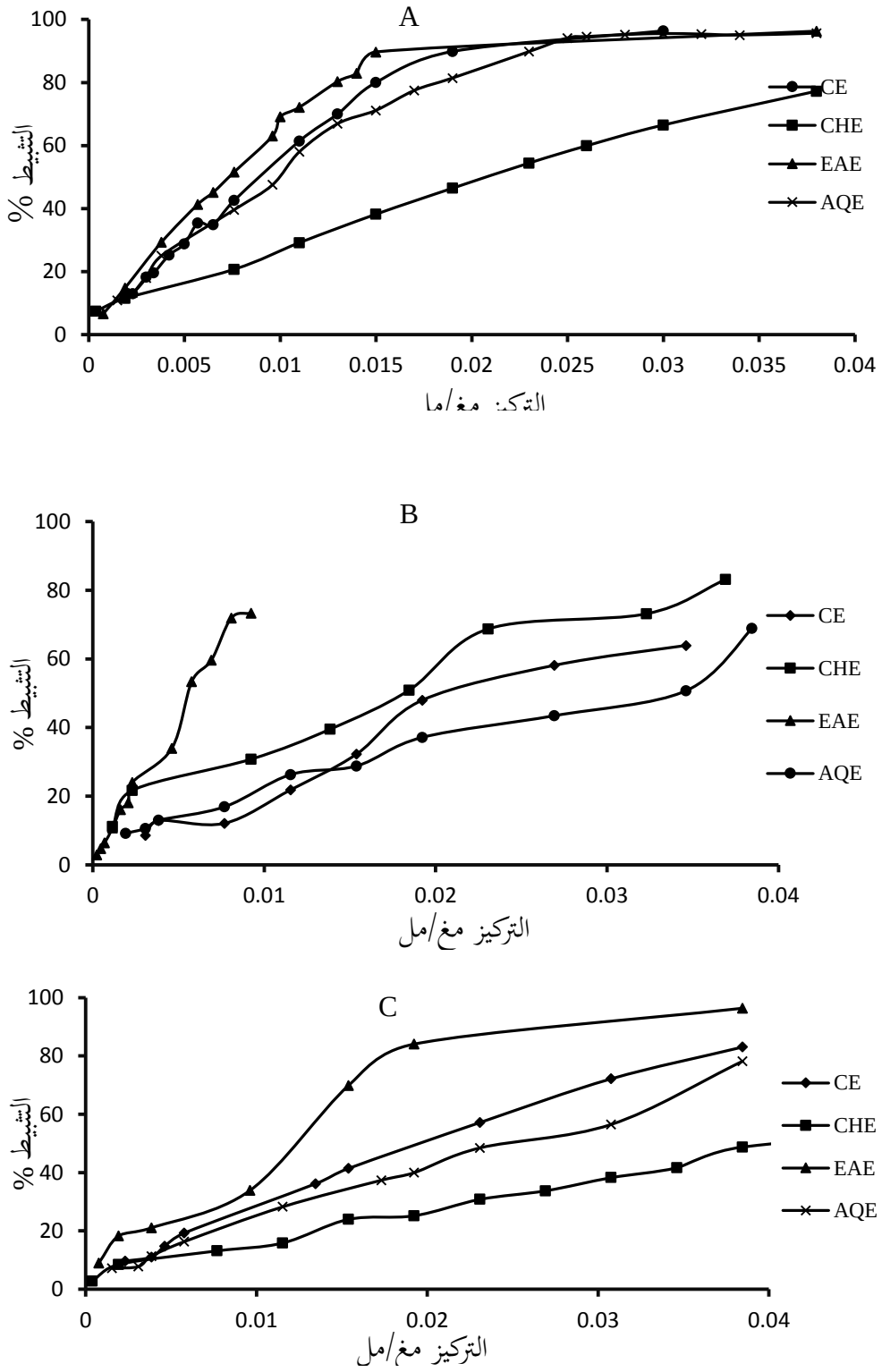
تم تقدير التأثير الازاحي للمستخلصات النباتية عن طريق اختبار DPPH (Burits و Bucar، 2000)، وعموما تستعمل هذه الطريقة بكثرة في تحديد التأثير المضاد للأكسدة سواء للمركبات

النقية أو المستخلصات النباتية وذلك لسرعتها وفعاليتها (Mosquera وآخرون، 2007)، حيث أن درجة التغير من اللون البنفسجي إلى اللون الأصفر يرتبط بالتراكيز المختلفة للعينات والتي يمكن قياسها في طول موجة 517 نانومتر حيث تتناقص الإمتصاصية كلما ارتفع تركيز المستخلص. تعرف طريقة ABTS مثل طريقة DPPH باستعمالاتها الكثيرة في تقدير التأثير الإزاحي للجذور الحرة والقدرة المضادة للأكسدة لمختلف المستخلصات الطبيعية. فهو إختبار جيد لتحديد قدرة المركبات المضادة للأكسدة على منح الهيدروجين (Thaipong وآخرون، 2006). ويعتبر ABTS جذرا أقل استقرارا من DPPH ذو لون أزرق مخضر وعند اضافة المركبات المراد دراسة نشاطيتها تقل شدة اللون إلى أن يختفي ويرتبط ذلك بقدرة هذه المركبات على منح الهيدروجين (Re وآخرون، 1999) وعموما تستعمل هذه الطريقة بكثرة في تحديد التأثير المضاد للأكسدة للمستخلصات الغذائية لأن جذر $ABTS^{\cdot+}$ يملك امتصاصية قصوى عند طول موجة 734 نانومتر في حين أن أغلب الأغذية لاتمتص الضوء عند طول هذه الموجة، بالاضافة إلى أنها صالحة لكل من الأنظمة المحبة للماء والدهون (Packer وآخرون، 1999). تم حساب IC_{50} لهذه المستخلصات والمركبات الفنولية وهو التركيز الموافق لتثبيط 50 % من جذور DPPH و ABTS وأدنى قيمة له تعكس أحسن فعل ازاحي للمركبات. من خلال النتائج الموضحة في شكل 20 نلاحظ أن جميع المستخلصات لها القدرة على إزاحة جذور DPPH بشكل يتوافق مع تركيز مستخلصات نباتات (*P. lentiscus* و *A. campestris* و *A. spinosa*). وبحساب IC_{50} (شكل 21)، أظهر EAE لنبات *P. lentiscus* القدرة الازاحية الأكبر بقيمة IC_{50} مساوية لـ 0.0068± 0.001 مغ/مل، في حين كان CHE الأقل تأثيرا بـ 0.022 ±

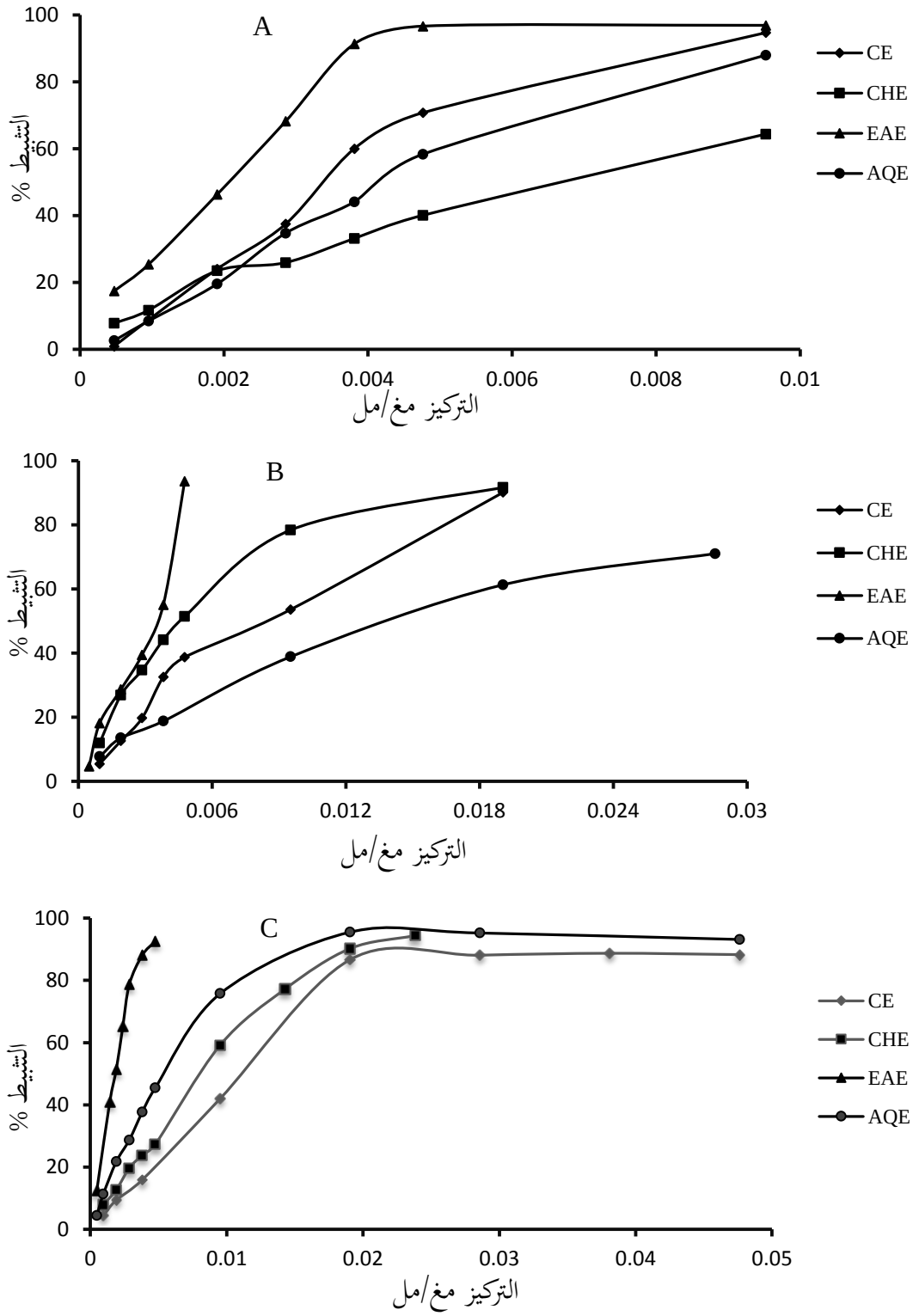
0.0001 مغ/مل. تميز EAE لنبات *A. campestris* أيضا بتأثير إزاحي عال قدر بـ 0.0058 ± 0.001 مغ/مل، بينما أظهر AQE النشاطية الإزاحية الأضعف بـ 0.031 مغ/مل. عند مقارنة مستخلصات *A. spinosa* فيما بينها، لوحظ أن EAE له القدرة الأكبر على إزاحة جذور DPPH (0.014± 0.0001 مغ/مل) في حين أظهر CHE التأثير الأقل (0.048 ± 0.0004 مغ/مل)، كل هذه قورنت بالمركب الفنولي النقي (Rutin 0.004 ± 0.0008 مغ/مل). يظهر شكل 22 أن جميع المستخلصات النباتية (*P. lentiscus* و *A. campestris* و *A. spinosa*) لها القدرة على تثبيط جذر ABTS وهناك علاقة طردية بين تركيز المستخلصات ونسبة تثبيط الجذر. بحساب التركيز المثبط لـ 50 % من جذور ABTS (شكل 23) وبالمقارنة مع trolox (المشابه في تركيبه للفيتامين E)، أظهر EAE للنباتات الثلاث التأثير الإزاحي الأكبر سجل أعلاه عند نبات *A. spinosa* (IC_{50} = 0,0018 مغ/مل) وهي قيمة مقاربة لـ trolox (0.0014 مغ/مل) لكن بفرق معتبر ($p < 0.01$)، أما التأثير الإزاحي الأقل لمستخلص EAE فقد سجل عند نبات *A. campestris* بقيمة IC_{50} = 0.0043 مغ/مل. سجل التأثير الإزاحي الأقل لدى مستخلص AQE بقيمة IC_{50} = 0.017 مغ/مل وهي أقل بحوالي 10 مرات مقارنة بـ trolox ($p < 0.001$). أظهر مستخلص EAE للنباتات الثلاث التأثير الإزاحي الأكبر لجذور DPPH و ABTS وقد يعود هذا إلى الكميات المعتبرة لعديدات الفينول والفلافونويدات فقد أكدت درسات عديدة أن هناك ارتباط وثيق بين المحتوى الفينولي والتأثير الإزاحي للمستخلصات النباتية (Nowak و Gawlik-Dziki، 2007). كما يمكن للفلافونويدات السكرية المميزة لمستخلص الإثيل أستات أن تكون هي المسؤولة عن التأثير الإزاحي لكل من جذور DPPH و ABTS، حيث أثبتت دراسة قام بها

Mishra وآخرون (2003) أن إضافة الوحدات السكرية للفلافونويدات يرفع من التأثير الإزاحي لجذور DPPH أكثر من الفلافونويدات غير السكرية. تميز CE لنبات *P. lentiscus* بتأثير إزاحي كبير مقارنة بالمستخلصات المتبقية الأخرى بالنسبة لجذر DPPH وجذر ABTS بقيمتي 0.0091 و0.0034 مغ/مل على التوالي ويمكن أن يرجع ذلك إلى أن الميثانول الممزوج مع الماء يستطيع أن يستخلص المركبات القطبية وغير القطبية والتي تؤدي دورا تعاونيا فيما بينها لإعطاء دور أقوى (Sintayehu وآخرون، 2012). أكدت الدراسات التي أجريت على المكونات الفنولية للمستخلص الخام لهاته النبتة وتأثيره المضاد للأكسدة أنه يملك تأثيرا إزاحيا بطريقة DPPH والذي قدر بـ 0.011 مغ/مل (Chryssavgi وآخرون، 2008) وهي قيمة مقاربة لتلك المسجلة عند المستخلص المستعمل في دراستنا الحالية (0.0091 مغ/مل). إن النشاطية المضادة للأكسدة والتأثير الإزاحي للمركبات الفنولية مثل الفلافونويدات والدباغ مرتبط بتوزيع المجاميع الوظيفية حول البنية الأساسية بالاضافة إلى عدد وموقع مجاميع الهيدروكسيل المانحة للهيدروجين (Pannala وآخرون، 2001). فلقد وجد أن بعض المركبات تتفاعل بسرعة مع جذور DPPH مرجعة عددا منها مساويا لعدد المجاميع الهيدروكسيلية (Bondet وآخرون، 1997). من جهة أخرى، وجود مجموعة الهيدروكسيل في الموقع رقم 3 بالاتحاد مع 3'،4'- كاتكول ترفع من التأثير الازاحي 10 أضعاف من الفلافونويدات المحتوية على catechol لوحده أو OH حر (Heim وآخرون، 2002). يمكن أن يعود التأثير الإزاحي لمستخلصات الضرو لغناها بالمركبات الفينولية بصفة عامة والفلافونويدات بصفة خاصة، حيث أكدت دراسات سابقة على هذا النبات وجود مركبات فينولية وفلافونويدات وزيوت أساسية

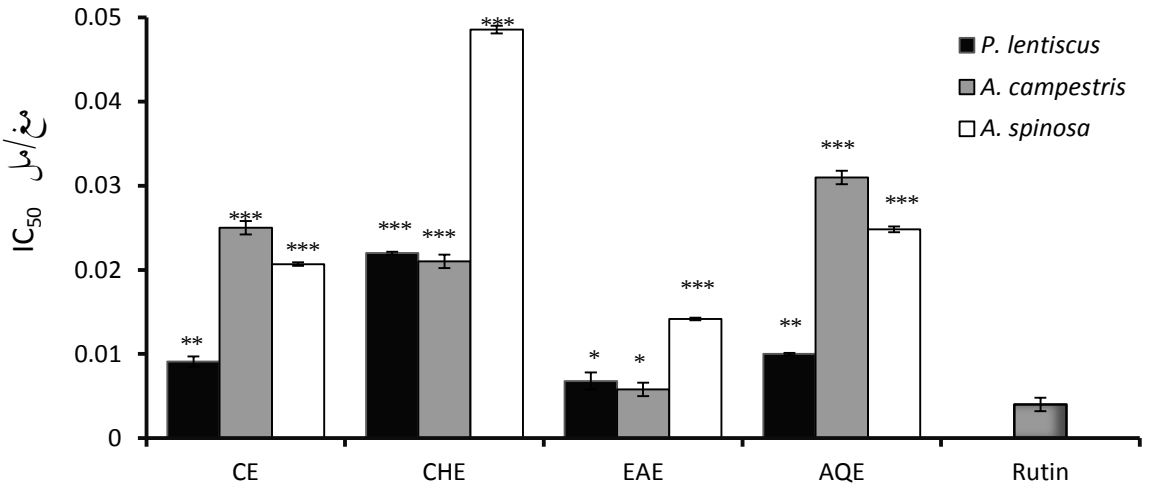
(Benhammou وآخرون، 2008)، هذه المركبات الفينولية لها القدرة على منح الالكترونات أو ذرات الهيدروجين للتخلص من الجذور الحرة (Rice-Evans وآخرون، 1997). يمكن أن يرتبط التأثير الإزاحي ببنية الفلافونويدات، حيث أن الفعالية القوية المضادة للأكسدة تتطلب وجود 3-OH المتحدة بالرابطة المزدوجة (2–3) ووظيفة carbonyl في الحلقة C (Cao وآخرون، 1997؛ Rice- Evans وآخرون، 1996).



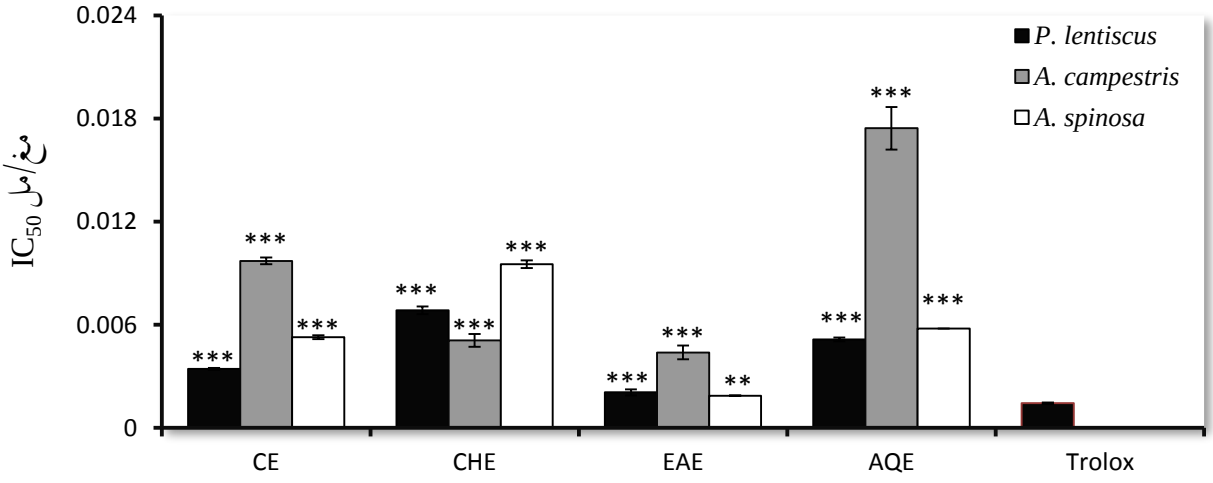
الشكل 20. نسبة تثبيط جذور DPPH لمستخلصات كل من *P. lentiscus* (A) و*A. campestris* (B) و *A. spinosa* (C) بدلالة التركيز. CE: مستخلص الهيدروميثانول. CHE: مستخلص الكلوروفورم. EAE: مستخلص الايثيل أستات. AQE: المستخلص المائي.



شكل 22. نسبة تثبيط جذور ABTS لمستخلصات كل من *P. lentiscus* (A) و *A. campestris* (B) و *A. spinosa* (C) بدلالة التركيز. CE: مستخلص الهيدروميثانول. CHE: مستخلص الكلوروفورم. EAE: مستخلص الايثيل أستات. AQE: المستخلص المائي.



الشكل 21. قيم IC_{50} للمستخلصات نباتات *P. lentiscus* و *A. campestris* و *A. spinosa* لازاحة جذور DPPH. أقل قيمة لـ IC_{50} تمثل التأثير الازاحي الأكبر. CE المستخلص الميثانولي؛ CHE مستخلص الكلوروفورم؛ EAE مستخلص الايثيل أستات؛ AQE المستخلص المائي. * ($0.05 > p$)؛ ** ($0.01 > p$)؛ *** ($0.001 > p$). استعمل Rutin كشاهد موجب. القيم عبارة عن المتوسط الحسابي+ الانحراف المعياري (n=3).



شكل 23. قيم IC_{50} للمستخلصات نباتات *P. lentiscus* و *A. campestris* و *A. spinosa* لازاحة جذور ABTS. أقل قيمة لـ IC_{50} تمثل التأثير الازاحي الأكبر. CE المستخلص الميثانولي؛ CHE مستخلص الكلوروفورم؛ EAE مستخلص الايثيل أستات؛ AQE المستخلص المائي. * ($0.05 > p$)؛ ** ($0.01> p$)؛ *** ($0.001 > p$). استعمل Trolox كشاهد موجب. القيم عبارة عن المتوسط الحسابي+ الانحراف المعياري (n=3).

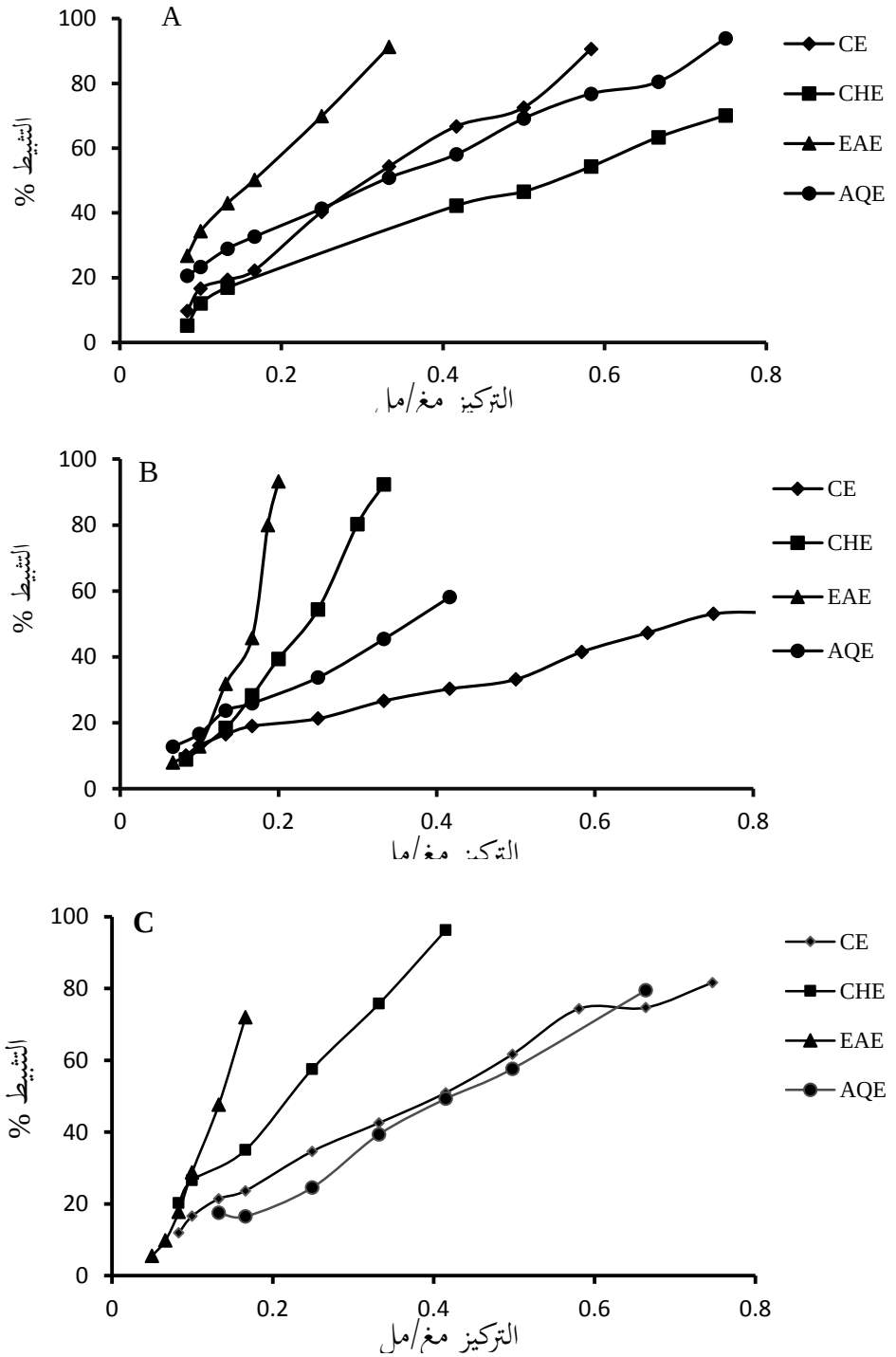
في دراسة قام بها Akrout وآخرون (2011) على مستخلص الايثانول (50%) لنبات *A. campestris* وقدرته على إزاحة جذور DPPH وجد أن IC_{50} = 2.053 مغ/مل، هذه القيمة أقل بكثير من المسجلة لدى مستخلص الميثانول (85%) المستعمل في دراستنا (0.025 مغ/مل) ويمكن أن يعود ذلك الى نوع المحلول المستعمل والذي يؤثر على نوعية المركبات المستخلصة والتي لها صلة بالتأثيرات المضادة للأكسدة (Druzynska وآخرون، 2007).

أما بالنسبة لأوراق *A. spinosa* فقد وجد Jouguet و Maugard (2013) أن مستخلص الإيثانول (70%) له القدرة على إزاحة جذور DPPH بقيمة 28 ميكرولتر/مل وقد أرجع ذلك إلى غنى هذا المستخلص بالفلافونويدات السكرية.

4. اختبار ازاحة جذر الهيدروكسيل

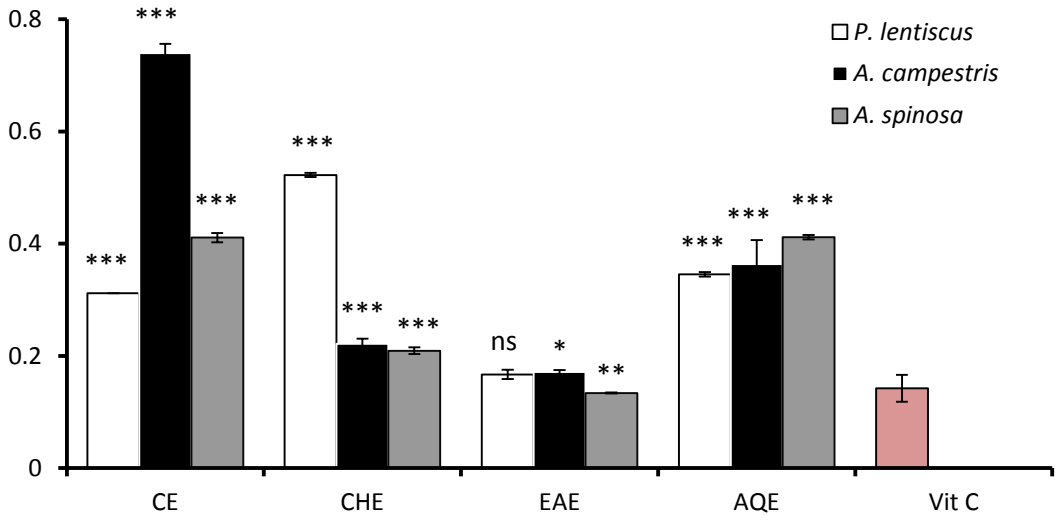
يعتبر جذر الهيدروكسيل أكثر الجذور خطورة على الجزيئات البيولوجية، ولقد تم تقدير التأثير الإزاحي له عن طريق التغير في اللون الذي يعكس درجة تأكسد مركب Phenanthroline-Fe (II) المستعمل في التجربة. من خلال هذا الاختبار يقوم جذر OH^{-} المنتج بوجود H_2O_2 و Fe^{+2} بأكسدة مركب phenanthrolene-Fe^{2+} إلى phenanthrolene-Fe^{3+} الذي تقاس امتصاصيته عند طول موجة 536 نانومتر. تزداد نسبة تثبيط جذور الهيدروكسيل بزيادة تركيز مستخلصات نباتات (*P. lentiscus* و *A. campestris* و *A. spinosa*) ولكن بدرجات متفاوتة (شكل 24). أظهر مستخلص الإيثيل أستات (EAE) لنبات *P. lentiscus* نسبة تثبيط وصلت إلى 51 % عند التركيز 0.16 مغ/مل، متبوعا بمستخلصي CE و AQE بقيمة 22 % و 32 % عند نفس التركيز، في حين أن مستخلص CHE كان له نسبة التثبيط الأضعف بأكثر من 11 %. من

خلال الشكل 24 تبين أيضا أن مستخلص EAE له نسبة التثبيط الأعلى من بين المستخلصات الأخرى لنبات *A .campestris* حيث أنه عند التركيز 0.16 مغ/مل وصلت نسبة التثبيط الى 45 % ، يليه CHE ثم AQE وفي الأخير CE بقيم 28.27 % و25.94 % و19 % على التوالي. بمقارنة مستخلصات نبات *A. spinosa* وجد أن EAE يثبط جذور الهيدروكسيل بنسبة 72.02% يتبعه CHE و CE وAQE بقيم 35 % و 23.65 % و16.47% عند التركيز 0.16 مغ/مل.



الشكل 24. ارتفاع نسبة تثبيط جذر الهيدروكسيل بدلالة التركيز لكل من مستخلصات نباتات (A) *P. lentiscus*؛ (B) *A. campestris*؛ (C) *A. spinosa*. CE المستخلص الميثانولي؛ CHE مستخلص الكلوروفورم؛ EAE مستخلص الايثيل أستات؛ AQE المستخلص المائي. * ($p < 0.05$)؛ ** ($p < 0.01$)؛ *** ($p < 0.001$). القيم عبارة عن المتوسط الحسابي+ الانحراف المعياري (n=3).

بحساب التركيز المثبط لـ 50 % من جذور الهيدروكسيل (شكل 25) وبالمقارنة مع الفيتامين C الذي استعمل كمقياس للمقارنة لوحظ أن CE (0.31 ± 0.0002 مغ/مل) و CHE (0.52 ± 0.003 مغ/مل) و AQE (0.34 ± 0.003 مغ/مل) لنبات *P. lentiscus* تملك تأثيرا زاحيا لجذر الهيدروكسيل أقل من الفيتامين C (0.15 ± 0.005 مغ/مل) وبفرق معتبر (P <0.05). بينما سجل التأثير الازاحي الأكبر لدى EAE بمقارنته مع المستخلصات الأخرى لنفس النبات ± 0.008 (0.16مغ/مل) وهي القيمة المشابهة للتي سجلت عند الفيتامين C (P > 0.05). كما سجل أيضا EAE لنباتي *A. campestris* و *A. spinosa* التأثير الأقوى وبقيمتين مقاربتين أيضا للفيتامين C (0.17 ± 0.003؛ 0.13 ± 0.008 مغ/مل على التوالي) (P > 0.05).



شكل 25. قيم IC_{50} لمستخلصات نباتات *P. lentiscus* و *A. campestris* و *A. spinosa* من أجل ازاحة جذور الهيدروكسيل باستعمال طريقة phenantroline. أقل قيمة لـ IC_{50} تمثل التأثير الازاحي الأكبر. CE المستخلص الميثانولي؛ CHE مستخلص الكلوروفورم؛ EAE مستخلص الايثيل أستات؛ AQE المستخلص المائي؛ Vit C ، Vitamin C؛ * (p < 0.05)؛ ** (p < 0.01)؛ *** (p < 0.001). القيم عبارة عن المتوسط الحسابي+ الانحراف المعياري (n=3).

بالنظر إلى النتائج نلاحظ أن EAE للنباتات الثلاث يملك التأثير الإزاحي الأكبر لجذر DPPH وجذر OH^- وقد يعود هذا لغناه بالفلافونويدات مقارنة بالمستخلصات الأخرى فلقد أظهرت بعض الدراسات أن هناك علاقة إيجابية بين المحتوى الفينولي والنشاطية المضادة للأكسدة للنباتات الطبية (Abdille وآخرون، 2005). يقوم محلول الايثيل أستات باستخلاص الفلافونويدات ذات سكريات أحادية وقد أعطى التأثير الإزاحي الأكبر مما يؤكد أن هذا المستخلص يحوي مركبات فعالة في عملية الإزاحة، ففي دراسة قام بها Delazar وآخرون (2010) على فلافونولات سكرية معزولة من نبات *Ribes biebersteinii* (quercetin 3-O-sophoroside، quercetin 3-O-sambubioside، kaempferol 3-O-sophoroside، kaempferol 3,5-di-O-b- D-glucopyranoside)، أثبت خلالها أنها تملك تأثيرا إزاحيا قويا، حيث بيّن أن وجود هذه المركبات في النبات يجعله ذو خصائص مهمة مضادة للأكسدة. وعموما كما ذكر من قبل فإن التأثير المضاد للأكسدة والتأثير الإزاحي للمركبات الفينولية مثل الفلافونويدات مرتبط بتوزع المجاميع الوظيفية حول البنية الأساسية لها وبذلك يعتبر عدد وتوزع الوظائف الهيدروكسيلية المانحة للهيدروجين من أهم البنيات المؤثرة على القدرة المضادة للأكسدة للفلافونويدات (Cao وآخرون، 1997). إن وجود مجموعة ortho-dihydroxyl في الحلقة B لـ rutin وارتباط السكريات في الموقع رقم 3 يجعله من أقوى المزيحات للجذور الحرة، وهو فلافونويد سكري منتشر بكثرة في الطبيعة (Sintayehu وآخرون، 2012). أظهرت دراسة على أوراق نبات *P. lentiscus* على أنها تحتوي على كميات كبيرة من حمض gallic ومشتقات galloyl (Romani وآخرون، 2002)، هذه المركبات لها القدرة على إزاحة جذر الهيدروكسيل

ومنع أكسدة LDL (Barotto وآخرون، 2003). كما أن وجود الفلافونولات مثل quercetin و myricetin المرتبطين بالسكريات يرفع من التأثير الإزاحي لهذ النبات (Longo وآخرون، 2007).

5. اختبار β-carotene / حمض اللينولييك

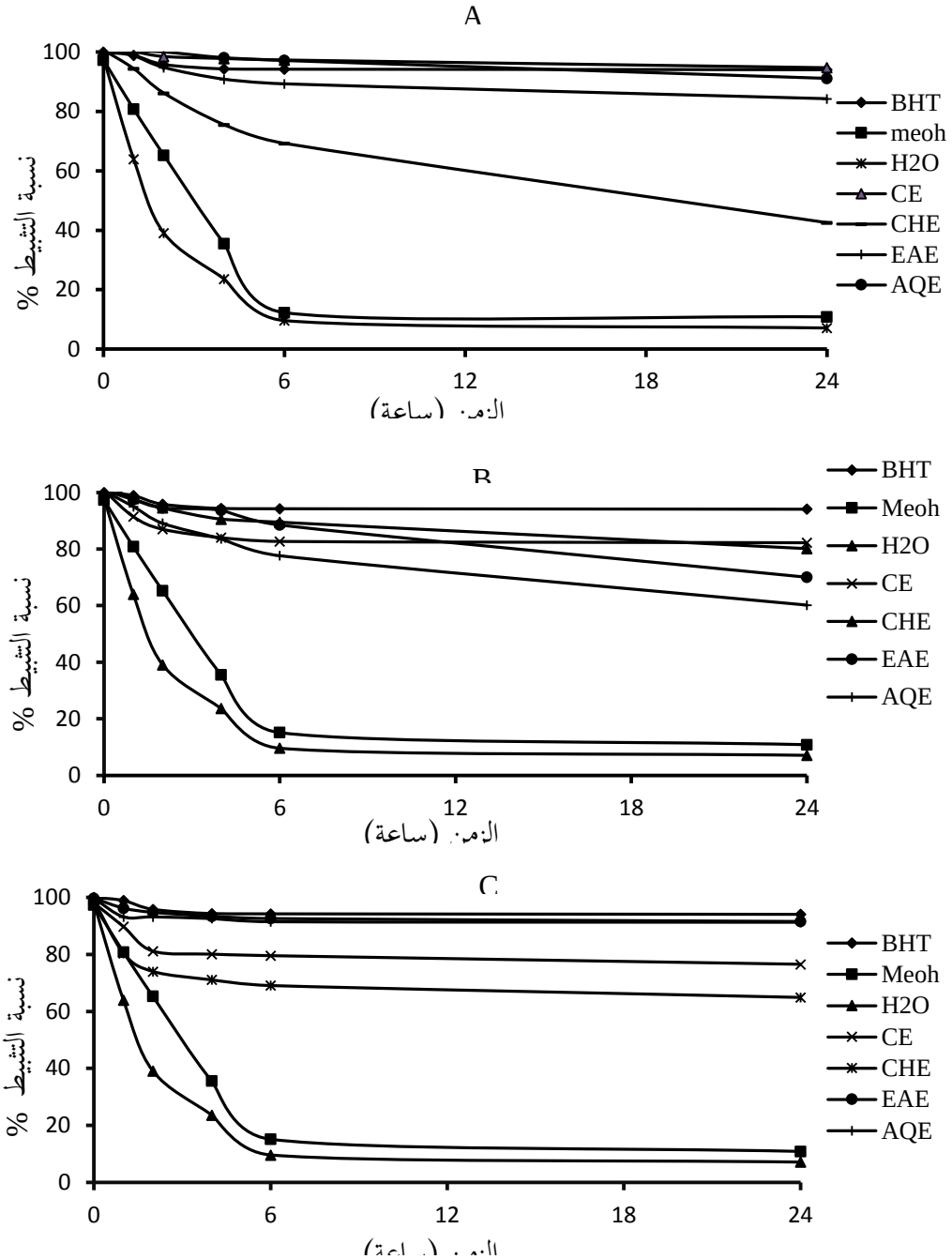
باستعمال طريقة β-carotene / حمض اللينولييك يتم انتاج جذور hydroperoxide، إذ أنه خلال عملية الأكسدة يحدث فقد لذرة الهيدروجين من مجموعة الميثيلان النشطة لحمض اللينولييك الواقعة في ذرة الكربون رقم 11 (Frankel، 1998). تقوم الجذور المتشكلة بمهاجمة الروابط المزدوجة لـ b-carotene لاستعادة استقرارها مؤدية بذلك إلى فقدان اللون البرتقالي الذي تتميز به الكاروتنويدات بصفة عامة وبذلك زوال لونها وخفض امتصاصيتها. إن وجود المركبات المضادة للأكسدة يمكن أن تقلل من إمتداد عملية زوال اللون عن طريق تعديل جذور البيروكسيد، من هذا المنطلق أصبح بالامكان تقدير النشاطية المضادة لأكسدة الدهون للمستخلصات النباتية. قدرت النشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات *P.lenticus* و *A. campestris* و *A. spinosa* بتركيز 2 مغ\مل بمتابعة زوال لون b-carotene مع مرور الزمن عند طول الموجة 490 نانومتر. نتائج نسب التثبيط بدلالة الزمن مدونة بالشكل 26 والتي تبين قدرة كل المستخلصات النباتية على تثبيط أكسدة b-carotene لكن بنسب مختلفة. من خلال مقارنة نسب تثبيط المستخلصات النباتية مع BHT الذي يعتبر من أقوى مضادات الأكسدة المنتجة صناعيا بعد مرور 24 ساعة (شكل 27)، تميز المستخلص الهيدروميثانولي(CE) للنباتات الثلاث بقدرة عالية على تثبيط أكسدة b-carotene والتي قدرت بـ (94.73 ± 1,16 %) عند

نبات *P. lentiscus* وهي مقاربة لقيمة التثبيط لـ BHT (94.9 ± 2,11 %) وكان هذا الاختلاف غير معنوي ($p > 0.05$) يليه كل من مستخلص *A. campestris* ومستخلص *A. spinosa* بقيم 82.74 ± 1.75 % و76.54 ± 3.36 % على التوالي. أعطى EAE قدرة عالية أيضا على التثبيط أعلاها عند *A. spinosa* (91.56 ± 1.74 %) يليها مستخلص *P. lentiscus* (84.11 ± 0.62 %) وفي الأخير مستخلص *A. campestris* (71.06 ± 0.29 %).

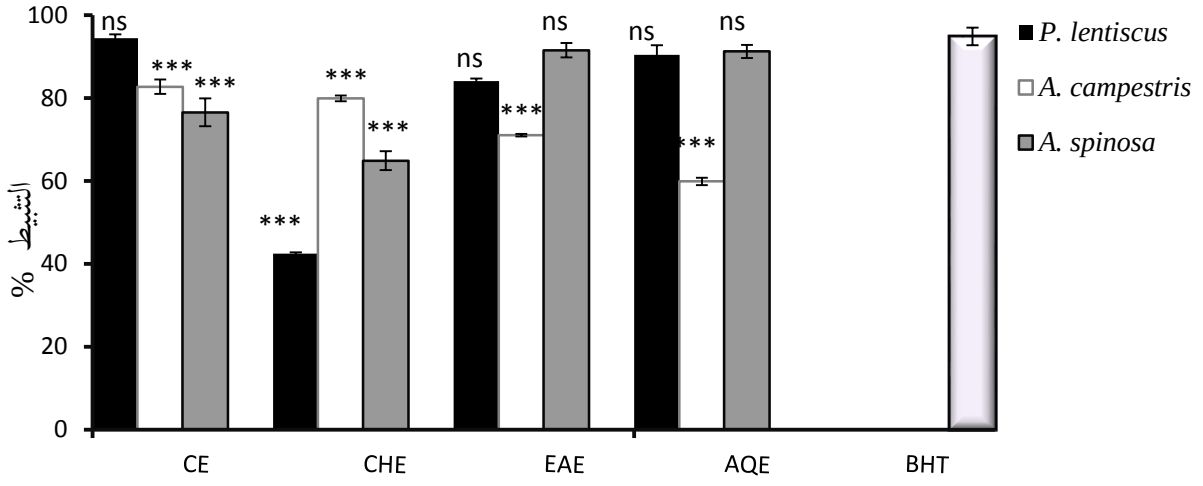
باستثناء مستخلص AQE لنبات *A. campestris* (59.91 ± 0.9 %) أظهر كل من AQE لنبات *A. spinosa* و*P. lentiscus* قدرة عالية على التثبيط بقيم متقاربة (91.28 ± 1.57 % و90.47 ± 2.25 %) وبفرق غير معتبر ($P > 0.05$) مقارنة بـ BHT. أظهرت مستخلصات الكلوروفورم قدرة على التثبيط أعلاها عند CHE لنبات *A. campestris* (79.92 ±0.69 %) وأدناها عند CHE *P. lentiscus* (42.47 ± 2.26 %).

هذه النتائج تبين أن مختلف مستخلصات النباتات الثلاث تملك قدرة فعالة على التفاعل مع الجذور الحرة وتحوليها إلى أنواع غير نشطة موقفة بذلك سلسلة التفاعلات الجذرية. كما يمكن أن يتبين هنا أن المركبات لها تأثيرات مضادة للأكسدة في الأوساط المائية والدهنية. وبذلك يمكن استعمال هذه المركبات التي تملك هذه الخاصية في الحفاظ على مختلف الأغذية (Moure وآخرون، 2001). وجد Maggi ومساعديه (2009) أن الزيوت الأساسية المستخلصة من الأنواع المنتمية إلى عائلة Asteraceae لها نشاطية مضادة لفوق أكسدة الليبيدات بسبب وجود المستوى العالي للمركبات الأكسجينية (كحولات). كما أن نفس الدراسة أكدت أن النشاطية المضادة للأكسدة لأي مركب مرتبط بوجود مجاميع سهلة الأكسدة مثل

الوظائف الهيدروكسيلية الموجودة على الكربوهيدرات. تستطيع الفلافونويدات أن تثبط أكسدة الدهون عن طريق التأثير المزيح لجذور البيروكسيد قاطعة بذلك سلسلة التفاعلات الجذرية وذلك لامتلاكها لخاصية منح الهيدروجين (Sandhar وآخرون، 2011).



الشكل 26. قدرة مستخلصات *P. lentiscus* [A] و *A. campestris* [B] و *A. spinosa* [C] على تثبيط أكسدة b-carotene بدلالة الزمن. CE المستخلص الميثانولي؛ CHE مستخلص الكلوروفورم؛ EAE مستخلص الايثيل أستات؛ AQE المستخلص المائي. * ($p < 0.05$)؛ ** ($p < 0.01$)؛ *** ($p < 0.001$). القيم عبارة عن المتوسط الحسابي+ الانحراف المعياري (n=3). استعمل BHT كشاهد موجب واستعمل H2O و MeOH كشاهدين سالبين.



شكل 27. مقارنة نسبة التثبيط لمستخلصات *P. lentiscus* و *A. campestris* و *A. spinosa* عند 24 ساعة باستعمال طريقة b-carotene/حمض الينولييك. CE المستخلص الميثانولي؛ CHE مستخلص الكلوروفورم؛ EAE مستخلص الايثيل أستات؛ AQE المستخلص المائي؛ BHT كشاهد موجب؛ * ($p < 0.05$)؛ ** ($p < 0.01$)؛ *** ($p < 0.001$).

من خلال دراستنا هذه تبين أنه لا يوجد علاقة طردية بين فعالية المركبات باستعمال طريقة B-carotene/حمض اللينولييك والمحتوى الفينولي لنبات *A. campestris* (R^2=0.005) وهذا مدعم بدرسات أخرى أجريت من طرف kyselova و Ivanova (2006) والتي أظهرت عدم التوافق بين المحتوى الفينولي والنشاطية المضادة للأكسدة، في حين أن هناك توافق نسبي بين المحتوى الفينولي لنبات *P. lenticus* ونبات *A. spinosa* والنشاطية المضادة الأكسدة باستعمال b-carotene (R^2=0, 67، R^2=0,59) على التوالي. من جهة أخرى، أظهرت مستخلصات الميثانول (الأكثر قطبية) قدرة عالية على التثبيط وقد يعود ذلك إلى أن هذا المستخلص يجمع بين عدد كبير من المركبات المحبة والكارهة للماء لها نشاطية مضادة للأكسدة بشكل تعاوني. هذه النتائج لا تتوافق مع الدراسة التي قام بها Frankel وآخرون (1994) والذي وصف اختبار تبييض b-carotene على أنه نظام مكون من مستحلب لليبيدات موجودة في الماء، كما اقترح

Frankel و Meyer (2000) أن مضادات الأكسدة غير القطبية تظهر خصائص مضادة للأكسدة أكثر أهمية لأنها مركزة في وسط النظام ليبيد-ماء مايسمح بحمايته من تشكيل الجذور الليبيدية وأكسدة b-carotene. في حين أن مضادات الأكسدة القطبية تبقى مخففة في وسط مائي وبذلك تكون أقل فعالية في حماية الدهون. يمكن أن يعود التأثير المثبط لأكسدة b-carotene إلى نوعية الفلافونويدات المتواجدة في المستخلصات، حيث أكدت الدراسات أن فواكه وأوراق *P. lentiscus* غنية بالمركبات الفينولية (Romani وآخرون، 2002) وتتمثل هذه المركبات الموجودة في الفواكه في الفلافونويدات من النوع α- aglycone و b-glycoside (Hasan وآخرون، 2011) و anthocynine (أغلبها cyanine-3-o- glucoside) (Longo وآخرون، 2007)، في حين أن الأوراق غنية بـ myricetin و quercetin و isoflavone والأحماض الفنولية، هذه المركبات لها تأثيرات مضادة للأكسدة.

كما تبين أن نبات *A. campestris* يحتوي على عدد من flavanones (pinostrobin و pinocembrin و naringenin) و dihydroflavonol (7-methyl aromadendrin) و flavone (hispidulin) (Hurabielle وآخرون، 1982) قد تؤدي إلى خصائص مضادة للأكسدة على مستوى أنسجة البنكرياس للجرذان والمرتبطة بالتأثيرات المخفضة لنسبة السكر والليبيدات (Sefi وآخرون، 2010).

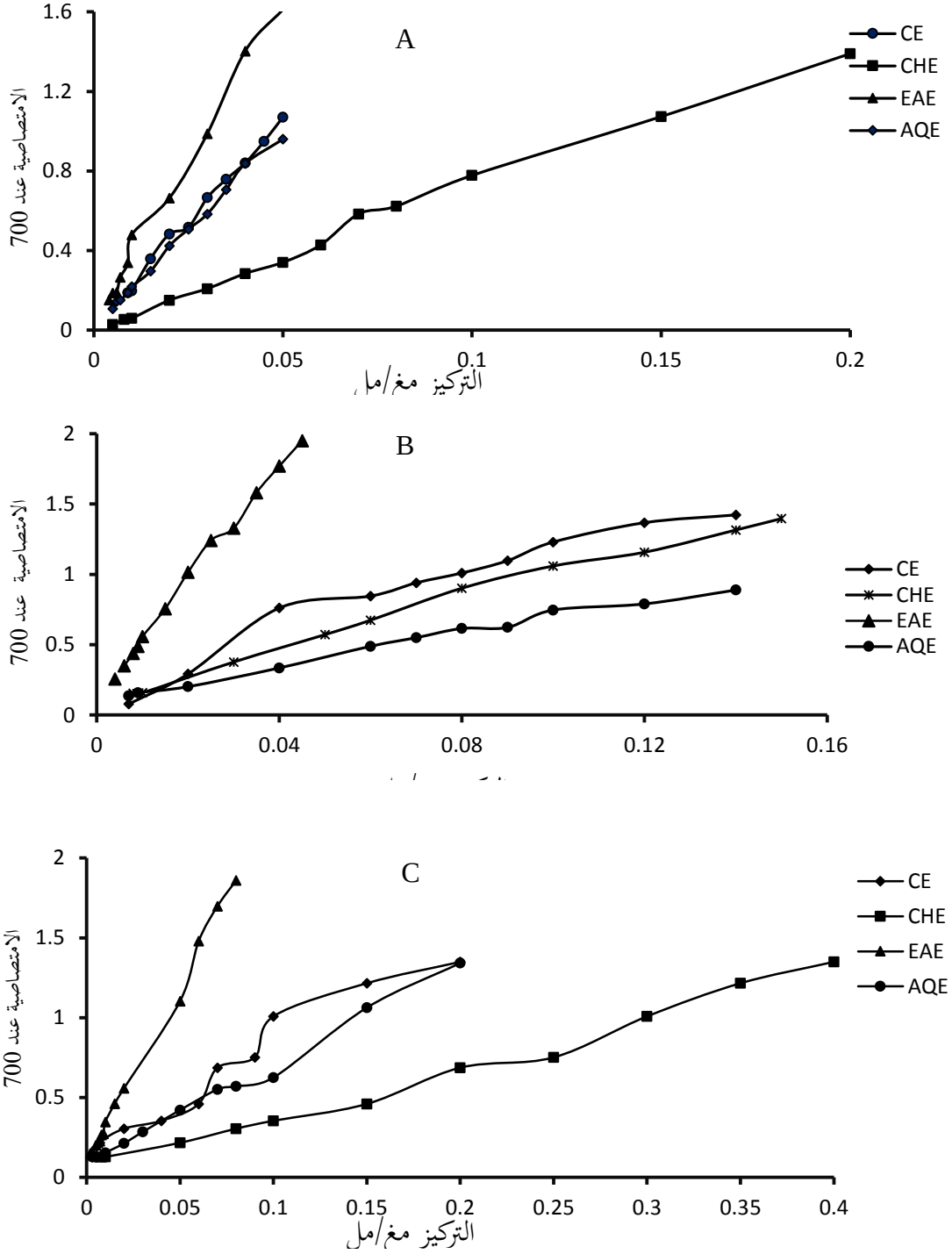
في دراسة للنشاطية المضادة للأكسدة قام بها Akrout وآخرون (2011) على ثلاث مستخلصات لنبات *A. campestris* وهي الزيت الأساسي ومستخلص الايثانول (50%) والمستخلص المائي باستعمال طريقة إزالة اللون لـb-carotene، وجد من خلالها أن المستخلص

الايثانولي سجل نسبة تثبيط بقيمة 34 % وهي قيمة أقل من المسجلة في دراستنا بأكثر من مرتين رغم احتوائه على على حوالي 450 مغ مكافئ لحمض gallic ويمكن تفسير ذلك باختلاف نوعية المركبات الفينولية المستخلصة بين محلول الإيثانول والميثانول. في حين تبقى الدراسات قليلة على مستوى مستخلصات أوراق *A. spinosa* لأن أغلبها تركز على دراسة تأثيرات الزيوت المستخلصة منها. وفي الأخير يمكن القول أن المركبات الموجودة في هذه المستخلصات يمكن استعمالها لحماية الدهون من الأكسدة بدلا من المركبات المصنعة مثل BHT و BHA. هذه المواد معروفة باستعمالها كمواد حافظة في الأغذية والتي تؤدي إلى تأثيرات سلبية عند استهلاكها فهي تعتبر كمواد مسرطنة ومضرة بأنسجة الكبد (Linderschmidt وآخرون، 1986).

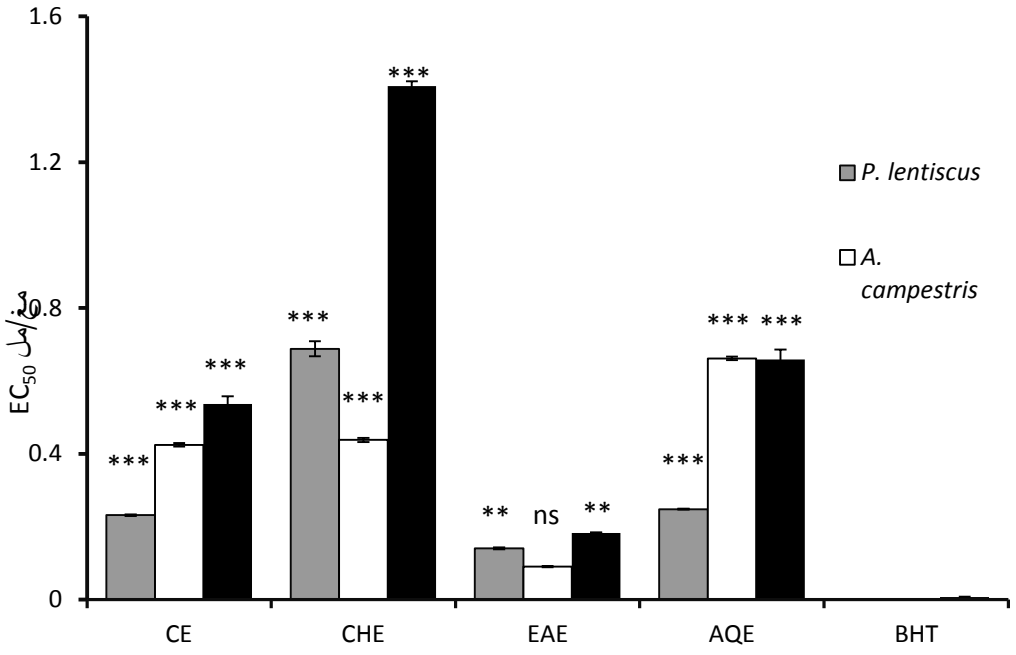
6. القدرة الارجاعية

تعكس الخاصية الارجاعية قدرة المركبات الفعالة على منح الالكترونات والتي تعتبر من الآليات المضادة للأكسدة، يمكن أن يكشف عن هذه القدرة الارجاعية لمختلف المواد مباشرة بتحول مركب Fe[(CN)6]3 إلى Fe[(CN)6]2 بوجود المركبات المرجعة، هذا المعقد ذو اللون الأزرق المخضر يمتص عند 700 نانومتر. من خلال هذه التجربة يتحول اللون الأصفر للمركبات المدروسة إلى اللون الأزرق المخضر بدرجات متفاوتة حسب درجة الارجاع للمواد المضادة للأكسدة (Gülçin وآخرون، 2011). يظهر الشكل 28 أن جميع المستخلصات لها القدرة على إرجاع Fe^{+3} إلى Fe+2 والذي يعبر عنه بزيادة الامتصاصية عند طول الموجة 700 نانومتر وذلك بزيادة التركيز.

فمثلا عند (04. 0-0.45 مغ/مل) زادت امتصاصية EAE لنبات *A. campestris* من0.245 الى 1.9 بينما وصلت امتصاصية EAE لنبات *P. lentiscus* وEAE لنبات *A. spinosa* إلى 1.612 و1.103 على الترتيب عند التركيز 0.05 مغ/مل. بحساب التركيز الفعال (EC50: effective concentration) لاعطاء إمتصاصية بقيمة 0.5 وكلما كانت قيمته أقل دلت على القدرة الارجاعية الأكبر للمستخلص، وبملاحظة الشكل 29 وجد أن EAE يعطي امتصاصية 0.5 عند تراكيز ضعيفة وصلت الى 0.09 مغ/مل و0.14 مغ/مل و0.18 مغ/مل لكل من *A. campestris* و*P. lentiscus* و*A. spinosa* على التوالي. قورنت النتائج بـ BHT الذي أعطى EC_{50} بقيمة (0.0077 مغ/مل).



شكل 28. القدرة الارجاعية لمستخلصات نباتات *P. lentiscus* (A) و *A. campestris* (B) و *A. spinosa* (C) بدلالة التركيز. CE المستخلص الميثانولي؛ CHE مستخلص الكلوروفورم؛ EAE مستخلص الايثيل أستات؛ AQE المستخلص المائي؛ * ($p < 0.05$)؛ ** ($p < 0.01$)؛ *** ($p < 0.001$). القيم عبارة عن المتوسط الحسابي+ الانحراف المعياري (n=3).



شكل 29. القدرة الإرجاعية لمستخلصات نباتات *P. lentiscus* و *A. campestris* و *A. spinosa*. أقل قيمة لـ EC_{50} تمثل القدرة الارجاعية الأكبر. CE المستخلص الخام؛ CHE مستخلص الكلوروفورم؛ EAE مستخلص الايثيل أستات؛ AQE المستخلص المائي؛ * ($p < 0.05$)؛ ** ($p < 0.01$)؛ *** ($p < 0.001$).

تلعب بنية الفلافونويدات دورا مهما في النشاطية المضادة للأكسدة، حيث قام Zhang وآخرون (2011) بدراسة التأثير الازاحي والقدرة الارجاعية لـ 5 فلافونويدات أحادية وهي:

5,7,3´,4´-tetrahydroxy-6-C-[β-D-apiose-(1→4)]-β-D-glycopyranosylflavone (1) و isorientin (2) و orientin (3) و isovitexin (4) و vitexin (5)، كل هذه المركبات تملك مجموعة هيدروكسيل في الموقع 5 و7 و4' ويملك المركبين 2 و4 مجموعة OH اضافية في الموقع 3' مقارنة بالمركبين 2 و5، فوجد أن الفلافونويد (1) الذي يحمل وحدتين سكريتين إمتلك القدرة الارجاعية الأعلى والتأثير الإزاحي الأكبر لجذور DPPH مقارنة بالمركبات الأخرى بالاضافة إلى أن موقع السكر في الحلقة A يرفع من التأثير المضاد للأكسدة. كذلك وجود المجاميع الهيدروكسيلية المرتبطة بالفلافونويدات يوفر خاصية منح الإكترونات لتعديل الجذور الناتجة

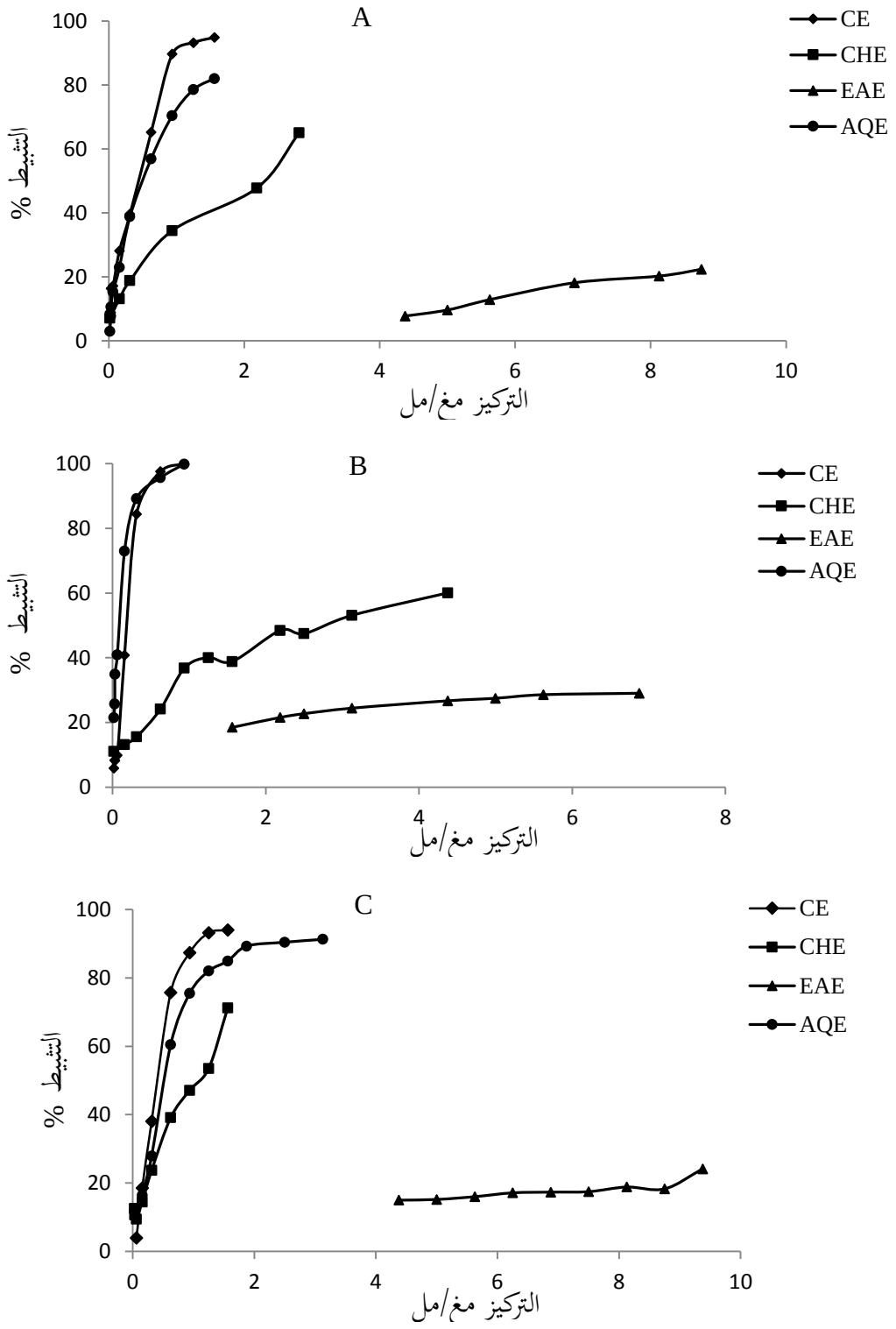
عن أكسدة الليبيدات (LOO°) محوّلة إياها إلى مركبات أكثر استقرارا (LOOH) وبذلك تعتبر هذه المجاميع من أهم العوامل المؤثرة في النشاط المضاد للأكسدة (Zhang وآخرون، 2011)، كما أن وجود مجموعة catechol للحلقة B و OH للحلقة C والرابطة الزوجية بين 2 و 3 للحلقة C لها دور مهم في ارجاع Fe^{+3}، من جهة أخرى فلقد أظهرت التجارب أن إرجاع النحاس مرتبط ارتباطا وثيقا بعدد المجاميع الهيدروكسيلية للفلافونويدات (Mira وآخرون، 2002). أظهر مستخلص الهيدروميثانول لنبات *P. lentiscus* قدرة على إرجاع أيونات الحديد وقد يرجع ذلك إلى غناه بالفلافونويدات والدباغ وهذا ما تؤكده الدراسات التي قام بها Chryssavgi وآخرون (2008)، حيث بين أن المستخلص الهيدروميثانولي (70%) له القدرة على الارجاع باستخدام طريقة FRAP قدرت بـ 84.6 –131.4 ميلي مولFe^{+2}/ل من مستخلص النبات وقد أرجع ذلك إلى المحتوى الفينولي وكذلك إلى بنية عديدات الفينول. وجد أن نبات الضرو يحتوي على العديد من الفلافونويدات مثل myricetin و quercetin ومشتقات catechin والأحماض الفينولية مثل حمض gallic وهذا ما يعطيها تنوعا في آليات نشاطيته المضادة للأكسدة.

7. قدرة المستخلصات النباتية على مسك الحديد

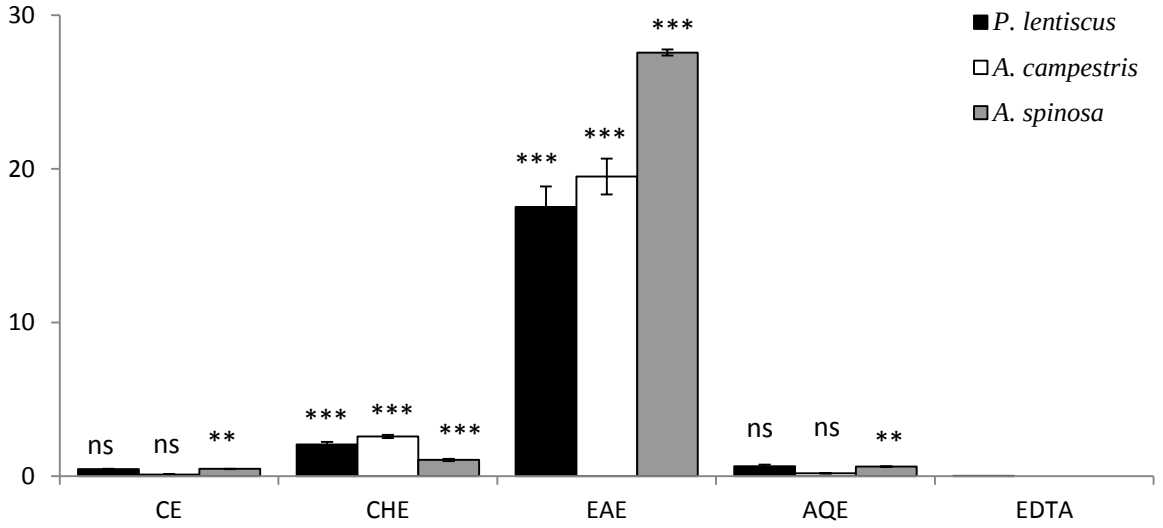
تعتبر الأيونات المعدنية الموجودة بشكل حر مثل النحاس والحديد محفزات قوية لتفاعلات الأكسدة وانتاج الجذور الحرة خاصة جذر الهيدروكسيل الذي يعد من الجذور الأكثر فعالية في الأنظمة البيولوجية إذ يتشكل وفقا لتفاعل Fenten بوجود H_2O_2. يؤدي انتاج هذا النوع من الجذور إلى أضرار وخيمة على مستوى الجزيئات الخلوية مثل الأحماض الدهنية الحرة والجزيئات الكبيرة الموجودة في السائل خارج خلوي والكولاجان (Lehucher-Michel وآخرون،

2001)، وهذا ما يؤدي إلى تطور العديد من الأمراض مثل مرض السكري وأمراض القلب والأوعية والأمراض العصبية الانحلالية والروماتيزم وأمراض أخرى عديدة مثل أمراض الجهاز الهضمي (Droge، 2002). وبهذا فإن عملية مسك أيونات الحديد تؤدي إلى تثبيط تفاعل fenten وبذلك التخفيض من إنتاج جذور الهيدروكسيل، بالإضافة إلى أنه يمكن للمستخلصات أو المركبات التي لها نشاطية مسك الحديد أن تثبط أكسدة الليبيدات عن طريق تعديل أيونات الحديد (wu و Ng، 2008). يشكل مركب الـferrozine معقدا مع أيونات الحديد المرجع (Fe^{+2}) وفي وجود عوامل أخرى ممسكة للحديد ينخفض تشكيل المعقد (ferrozine-Fe^{+2}) وذلك بتتبع انخفاض اللون البنفسجي. يسمح قياس نسبة انخفاض اللون البنفسجي بتقدير نشاطية مسك الحديد لمختلف المركبات (Decker و Welch، 1990). من خلال هذه الدراسة أظهرت مستخلصات نباتات*P. lentiscus* و*A. campestris* و*A. spinosa* و EDTA الذي استعمل كمعيار للمقارنة قدرة على تثبيط تشكل المعقد Ferrozine-Fe^{+2}، لكن بدرجات مختلفة وبعلاقة طردية مع التركيز(شكل 30). وبالنظر إلى التركيز الفعال، لوحظ أن جميع المستخلصات النباتية لها القدرة على مسك الحديد بقيم أقل من EDTA (الشكل 31). أظهرت مستخلصات CE للنباتات الثلاث القدرة الأكبر على مسك الحديد وفي مقدمتها مستخلص CE لنبات *A. campestris* بقيمة IC_{50} (0.11 ± 0.014 مغ/مل) يليها مستخلص CE لنبات *P. lentiscus* (Ic_{50} = 0.45 ± 0.028 مغ/مل) بقيم أقل من EDTA (Ic_{50} = 0.0073 ± 0.0001 مغ/مل)، لكن بفرق غير معتبر (P> 0.05). وفي الأخير مستخلص CE لنبات *A. spinosa* (Ic_{50}=0.47 ± 0.012 مغ/مل). بالنظر إلى المستخلصات المائية للنباتات الثلاث، أظهر أيضا

AQE لنبات *A. campestris* القدرة الأكبر لمسك الحديد بقيمة مقاربة لـ CE لنفس النبات (IC_{50} = 0.18 ± 0.016 مغ/مل) يليها كل من AQE لـ *A. spinosa* و *P. lentiscus* بقيمتين متقاربتين (0.62 ± 0.016 مغ/مل و0.65 ± 0.10 مغ/مل) على التوالي. كانت هذه القيم أقل من المتحصل عليها عند EDTA (0.0073 ± 0.0001 مغ/مل) الذي استعمل كشاهد موجب للمقارنة.



الشكل 30. نسبة مسك أيونات الحديد لمستخلصات نباتات *P. lentiscus* (A) و *A. campestris* (B) و *A. spinosa* (C) بدلالة التركيز. CE المستخلص الميثانولي؛ CHE مستخلص الكلوروفورم؛ EAE مستخلص الايثيل أستات؛ AQE المستخلص المائي. القيم عبارة عن المتوسط الحسابي+ الانحراف المعياري (n=3).



شكل 31. قيم IC_{50} لمستخلصات نباتات *P. lentiscus* و *A. campestris* و *A. spinosa* من أجل عملية مسك الحديد باستعمال طريقة ferrozine. CE المستخلص الميثانولي؛ CHE مستخلص الكلوروفورم؛ EAE مستخلص الايثيل أستات؛ AQE المستخلص المائي؛ * ($p < 0.05$)؛ ** ($p < 0.01$)؛ *** ($p < 0.001$).

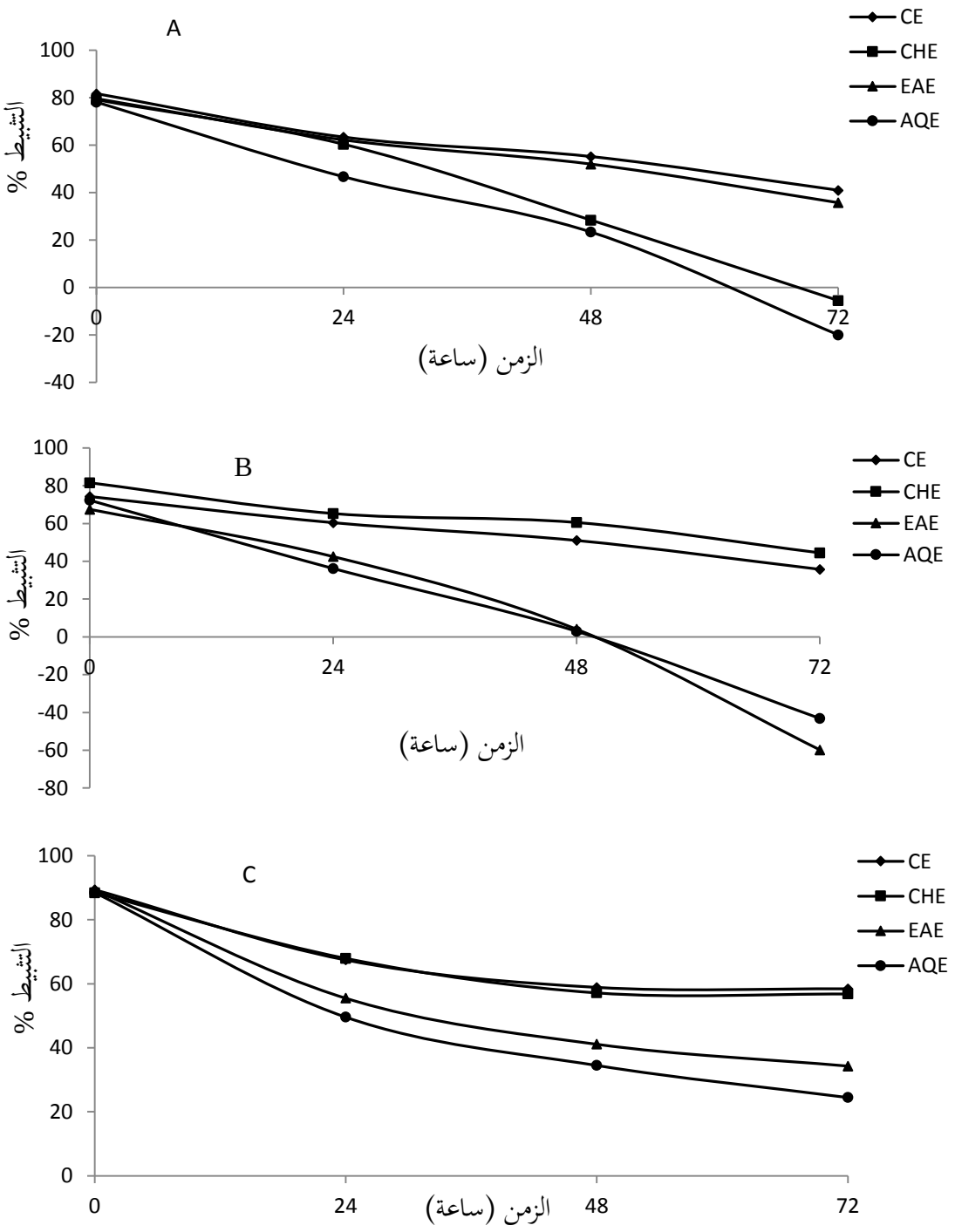
تمثل العوامل التي تشكل روابطا مع الأيونات المعدنية مضادات أكسدة ثانوية لأنها تخفض من تفاعلات الأكسدة والإرجاع مؤدية إلى إعطاء الشكل المؤكسد للأيونات المعدنية والتي تكون أقل فعالية. تظهر النتائج على عكس الطرق الأخرى التي بينت الفعالية الأكبر لمستخلص EAE، أن هذا المستخلص إمتلك القدرة الأضعف على مسك الحديد رغم إحتوائه على كميات عالية من عديدات الفينول الكلية وهذا ما يمكن أن نفسره بأن هناك علاقة ضعيفة بين مسك الحديد والمحتوى الفينولي وبذلك يمكن أن نستنتج أن عديدات الفينول الموجودة في المستخلصات غير مسؤولة ولو بصفة أساسية عن مسك الحديد، هذه النتائج مشابهة لتلك المنجزة من طرف Ozsoy وآخرون (2008) التي بينت أن مستخلص الايثانول إمتلك القدرة الأكبر لمسك الحديد بينما كانت قدرة EAE الأضعف والتي قدرت بـ 16% عند التركيز 1.2 مغ/مل. من المعلومات المتحصل عليها من الشكل (31) يلاحظ أن مستخلص

CE بين قدرة مسك أيونات الحديد أكبر من CHE و EAE. يمكن أن نفسر ذلك بأن المركبات الفينولية ليست ممسكات حديد أساسية، حيث يحتوي CE على مركبات أخرى مثل الأحماض العضوية والأحماض الأمينية والسكريات التي تعمل أيضا على مسك أيونات الحديد (Wong وآخرون، 2006). كما تبين أن المستخلصات الغنية بعديدات الفينول لها القدرة الأضعف على مسك الحديد وذلك لعدم توفر المجاميع الوظيفية المهمة لهذا الغرض (Van- Acker وآخرون، 1996)، كما أن المجاميع الفينولية المرتبطة مع الوظائف الكربوهيدراتية الذي يعطي عديدات الفينول السكرية يجعلها غير قادرة على الارتباط مع الأيونات المعدنية (Meziti وآخرون، 2012). وعلى العموم تعتبر المركبات المحتوية على النيتروجين ممسكات معادن أقوى من المركبات الفنولية (Chan وآخرون، 2007). من خلال الشكل (25) أيضا يتبين لنا أنه لا يمكن إهمال قدرة مستخلصات AQE للنباتات للثلاث، تتميز هذه المستخلصات بغناها بالدباغ، حيث أكدت الدراسات أن لها خصائص قوية مضادة للأكسدة بالمقارنة مع المركبات الفينولية منخفضة الوزن الجزيئي (Amarowic وآخرون، 2005)، وتتمثل هذه الخصائص في الإزاحة المباشرة للجذور الحرة (Karamać، 2009) والقدرة على الارتباط بالأيونات المعدنية خاصة منها Fe^{+2} و Cu^{+2} مما يؤدي إلى تعديل النشاطية المؤكسدة لهاته الأيونات (Andrade وآخرون، 2005).

8. أكسدة الليبيدات باختبار Ferric thiocyanate

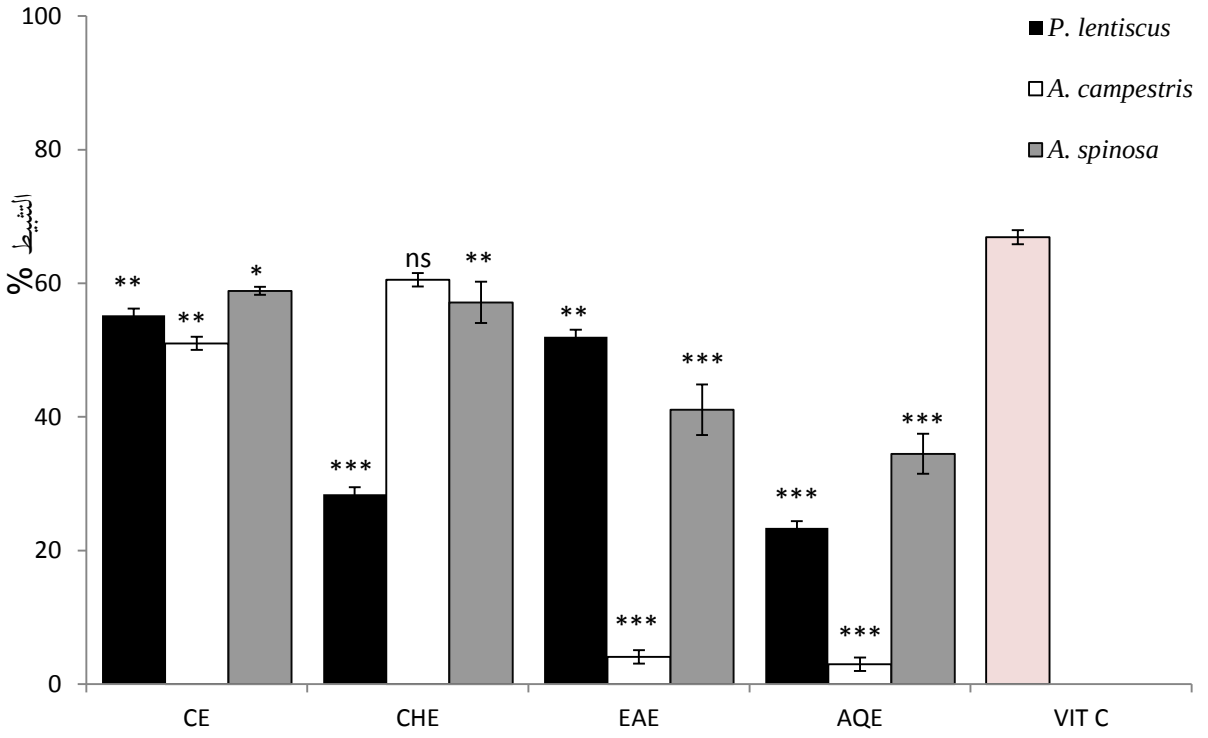
يعتبر تقدير كمية جذور البيروكسيد عاملا مهما لتقدير أكسدة الليبيدات في مرحلتها الأولى، حيث تتفاعل أيونات الحديد المؤكسدة الناتجة عن تفاعل جذور البيروكسيد والشكل المرجع

مع مركب thiocyanate لتشكيل معقد ذو لون أحمر يمتص عند 500 نانومتر (Elmastas وآخرون، 2006)، وكلما زادت كثافة اللون الأحمر ازدادت كمية جذور البيروكسيد الناتجة عن أكسدة حمض اللينولييك. تم تقدير قدرة مستخلصات *P. lentiscus* و*A. campestris* و *A. spinosa*(2 مغ\مل) على حماية حمض اللينولييك من الأكسدة بمتابعة زيادة اللون الأحمر مع مرور الزمن عند طول الموجة 500 نانومتر ونتائج تغير نسب التثبيط لهذه المستخلصات بدلالة الزمن مدونة بالشكل (32).



الشكل 32. قدرة مستخلصات نباتات *P. lentiscus* (A) و *A. campestris* (B) و *A. spinosa* (C) على تثبيط أكسدة حمض الينولييك باستعمال طريقة ferric thiocyanate بدلالة الزمن. CE المستخلص الميثانولي؛ CHE مستخلص الكلوروفورم؛ EAE مستخلص الايثيل أستات؛ AQE المستخلص المائي. القيم عبارة عن المتوسط الحسابي+ الانحراف المعياري (n=3).

من خلال مقارنة نسب تثبيط الأكسدة باستعمال طريقة thiocyanate خلال 48 ساعة (شكل 33) لوحظ أن هناك اختلاف في التأثير المضاد للأكسدة للمستخلصات النباتية، فقد أظهر CHE نبات *A. campestris* التأثير الأكبر بنسبة 60 % هي قيمة مقاربة للفيتامين C (66.89 %) وبفارق معنوي غير معتبر (P> 0.05). يليه مستخلصي CE وCHE لنبات *A. spinosa* بقيمتين متقاربتين (58 و57 %) على التوالي وهذه القيم أقل من القيمة المسجلة عند حمض الأسكوربيك (66 %) (P< 0.05).



شكل 33. مقارنة نسبة التثبيط لمستخلصات *P. lentiscus* و*A. campestris* و*A. spinosa* عند 48 ساعة باستعمال طريقة thiocyanate. CE المستخلص الميثانولي؛ CHE مستخلص الكلوروفورم؛ EAE مستخلص الايثيل أستات؛ AQE المستخلص المائي؛ Vit C ، Vitamin C؛ * (p <0.05)؛ ** (p < 0.01)؛ *** (p < 0.001).

بمقارنة مستخلصات *P. lentiscus* فيما بينها أظهر مستخلص CHE وAQE القيم الدنيا للتثبيط في حين سجلت القيم العليا عند مستخلصي CE وEAE ففي دراسة مشابهة أنجزت من قبل

Rezaeizadeh وآخرون (2011) والتي أكدت أن مستخلص الميثانول لنبات *Momordica charantia* له القدرة على حماية حمض الينوليك من الأكسدة الذاتية أكثر من مستخلص الكلوروفورم.كما أن هناك دراسة أخرى تدعم نتائجنا، وجدت أن مستخلص الإيثيل أستات يملك القدرة الأكبر على حماية أكسدة الليبيدات باستعمال نفس الطريقة يليه المستخلص الميثانولي وفي الأخير مستخلص الكلوروفورم (Emynur shafekh وآخرون، 2012). يمكن أن يعود هذا إلى غنى هذين المستخلصين بعديدات الفينول وكذا كمية الفلافونويدات، فلقد وجد أن الفلافونويدات بصفة عامة لها القدرة على إنهاء أكسدة الليبيدات عن طريق إزاحة جذور البيروكسيل (LOH). واستنادا لبعض الدراسات فإن هذه النشاطية مرتبطة بعدد مجاميع الهيدروكسيل (Cao وآخرون، 1997) الموجودة في المحاليل القطبية والممثلة في دراستنا هذه بخليط من الميثانول والماء بنسبة 85 %.

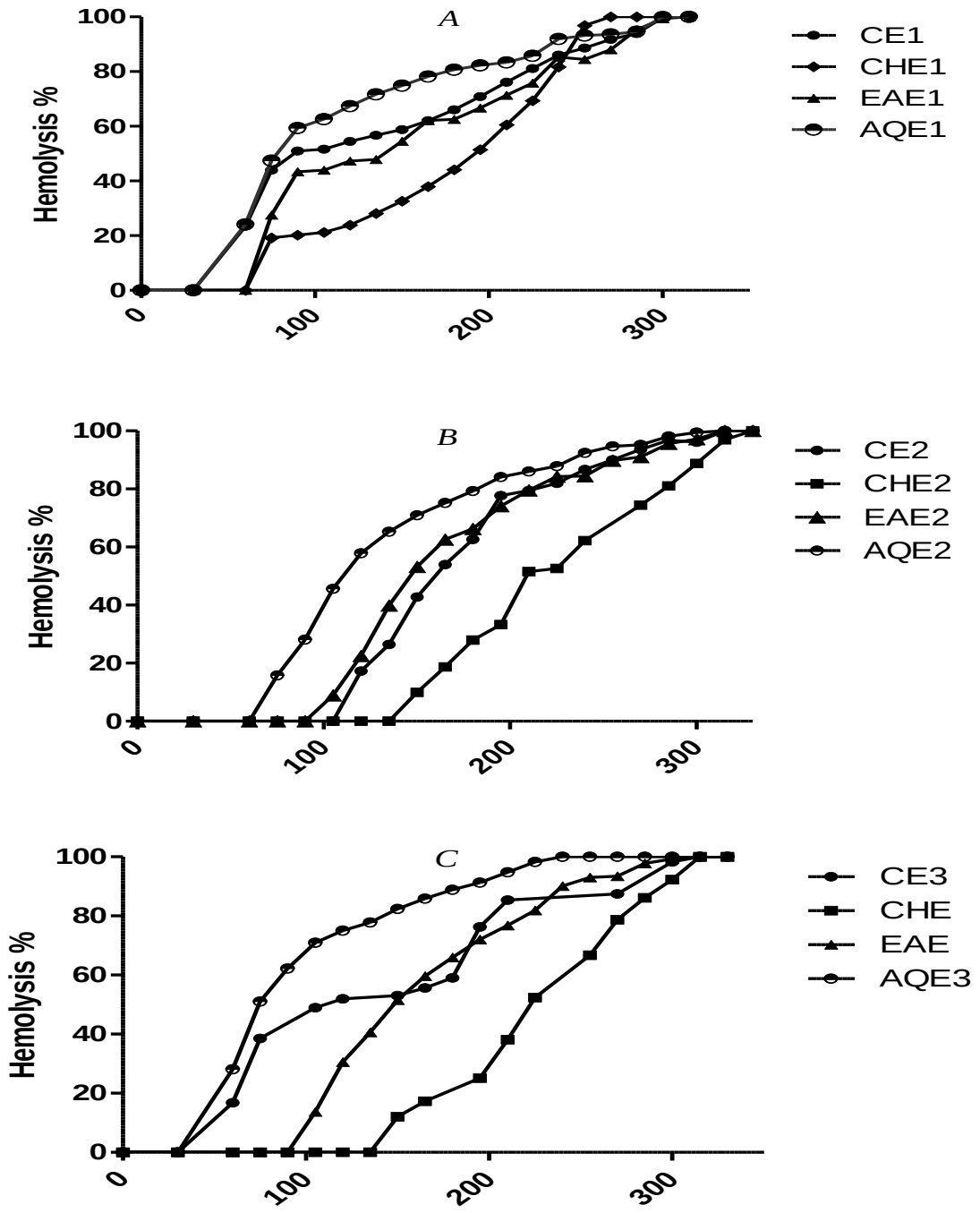
بالنسبة لنبات *P. lentiscus* و *A. spinosa* فقد امتلك مستخلص CE التأثير الأكبر لتثبيط أكسدة الليبيدات وقد يعزى ذلك إلى نوع المحاليل المستعملة في الإستخلاص. ففي دراسة قام بها (Anwar و Przybylsk (2012) لمعرفة تأثير نوع المحلول على النشاطية المضادة للأكسدة، والتي استعملت فيها أربعة أنواع من أوساط الإستخلاص وهي: الإيثانول والميثانول والإيثانول-ماء والميثانول-ماء، وجدا أن نسبة التثبيط لأكسدة الليبيدات كانت أعلى عند مستخلص الهيدروايثانول بـ 81.7 % متبوعا بمستخلص الميثانول (77.4 %) ثم المستخلص الهيدروميثانولي (63 %) وفي الأخير مستخلص الايثانول بنسبة 56.7%.

من جهة أخرى فإن النتائج المتعلقة بتثبيط أكسدة الليبيدات بوجود المستخلصات العضوية لنبات *Clematis flammula* تختلف عن هذه النتائج، حيث أن الآليات المتدخلة في أكسدة الليبيدات مثل الوسط المحب للدهون وبنية الغشاء أكثر تعقيدا من الإزاحة البسيطة لجذور البيروكسيل ولا تقتصر فقط على المحاليل المستعملة (Ollila وآخرون، 2002).

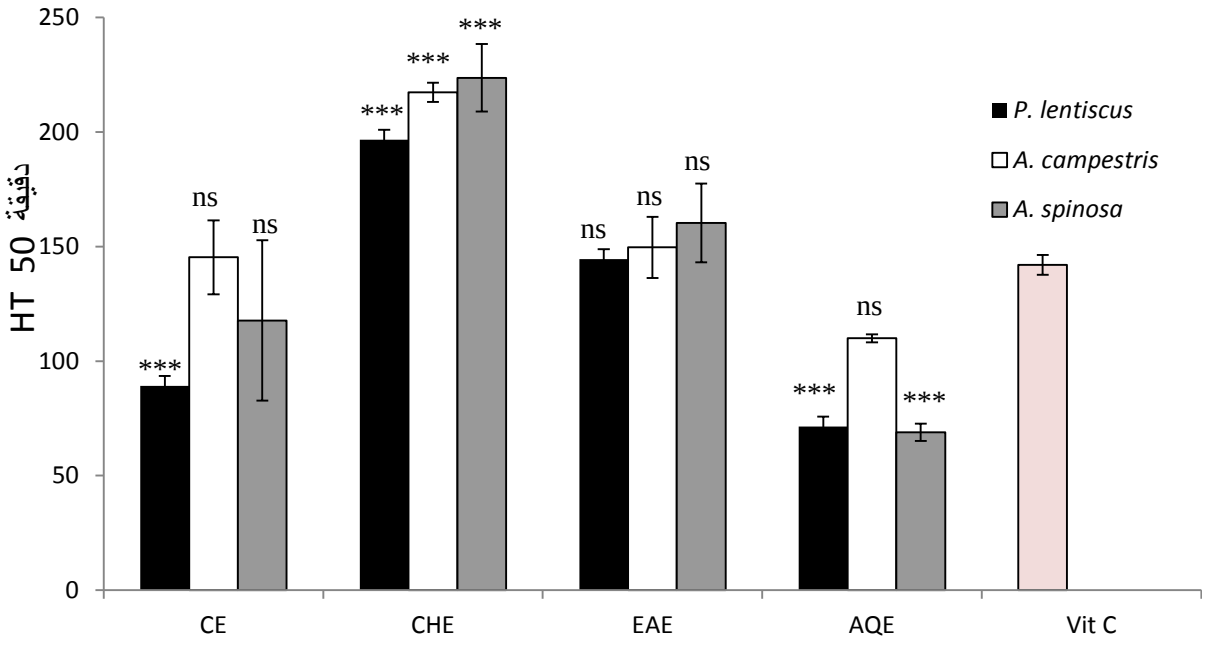
9. قدرة المستخلصات النباتية على حماية كريات الدم من الإنحلال

إن اختيار كريات الدم الحمراء كنموذج لدراسة التفاعلات الحاصلة بين المؤكسدات ومضادات الأكسدة لأنها تتميز بغشاء غني بالأحماض الدهنية غير المشبعة التي تكون أكثر حساسية للجذورة الحرة مؤدية بذلك إلى أكسدتها (Shiva Shankar Reddy وآخرون، 2007). يمكن أن تحدث أكسدة ليبيدات الكريات الحمراء نتيجة التقدم في السن وتكون مرتبطة بالعديد من الأمراض (Ko وآخرون، 1997). في هذه الدراسة استعمل 2,2'-azobis(2-amidinopropane dihydrochloride) (AAPH) كجذر حر يحفز الإجهاد التأكسدي على مستوى كريات الدم الحمراء، فأكسدته في درجة حرارة فيزيولوجية تشكل جذور البيروكسيل (ROO°) في وسط مائي التي تؤدي إلى مهاجمة الغشاء وبذلك انحلاله (Aman وآخرون، 2013). يتم متابعة قدرة كريات الدم على مقاومة الجذور الحرة بوجود المستخلصات النباتية ويحسب الوقت اللازم لانحلال 50 % من الكريات الحمراء (HT_{50}) وكلما كانت قيمة هذا الأخير أكبر كانت القدرة على حماية الإنحلال أكبر. يظهر الشكل (34) أن المستخلصات النباتية استطاعت أن تؤخر من عملية الإنحلال بمرور الزمن. من خلال قيم HT_{50} الممثلة في شكل 35 أبدى مستخلص الكلوروفورم للنباتات الثلاث (*P. lentiscus* و *A. campestris* و *A. spinosa*) القدرة الأكبر على

وقاية الكريات الحمراء من الإنحلال المحرض بـ AAPH بقيم (196.66± 6.65 و217± 4.16 و223±14.7 دقيقة على الترتيب) في حين تميزت المستخلصات المائية القدرة الأضعف (71.46±6.88 و110±1.73 و 68.9 ± 3.81 دقيقة على الترتيب).



شكل 34. التأثير المثبط لانحلال كريات الدم الحمراء من طرف مستخلصات *P. lentiscus* (A) و *A. campestris* (B) و *A. spinosa* (c). CE المستخلص الميثانولي؛ CHE مستخلص الكلوروفورم؛ EAE مستخلص الايثيل أستات؛ AQE المستخلص المائي). القيم عبارة عن المتوسط الحسابي+ الانحراف المعياري (n=3).



شكل 35. قيم HT_{50} لمستخلصات نباتات *P. lentiscus* و *A. campestris* و *A. spinosa* من أجل حماية كريات الدم الحمراء من الإنحلال المحرض بـ AAPH. CE المستخلص الميثانولي؛ CHE مستخلص الكلوروفورم؛ EAE مستخلص الإيثيل أستات؛ AQE المستخلص المائي. Vit C، Vitamin C؛ * (p <0.05)؛ ** (p < 0.01)؛ *** (p < 0.001) ns (p > 0.05).

في الواقع من خلال تفاعل كريات الدم الحمراء مع AAPH دون وجود للمستخلصات النباتية يظهر أن هناك حماية لها من الإنحلال أيضا لكن بنسبة أقل من وجود المستخلصات نتيجة لوجود مضادات أكسدة داخلية مثل الغليتاتيون وحمض الأسكوربيك والإنزيمات المضادة للأكسدة على مستوى الكريات الحمراء (Delmas- Beauvieux وآخرون، 1995)، إلا أن إضافة المستخلصات النباتية إلى وسط التفاعل ساهم في الزيادة من حمايتها من الأكسدة. أظهرت العديد من الدراسات الحديثة قدرة المركبات الفينولية على حماية كريات الدم الحمراء من أضرار الإجهاد التأكسدي (Valente وآخرون، 2011). ويمكن أن يكون ذلك نتيجة تموقع الفلافونويدات ضمن الأغشية الخلوية التي تعتبر موقعا لأكسدة الليبيدات (Ferrali وآخرون،

1997). تتميز مستخلصات الكلوروفورم باحتوائها على فلافونويدات أقل قطبية أي محبة للذوبان في الدهون ما يزيد من سهولة عبورها للطبقة الفوسفوليبيدية للغشاء. هذا ما تدعمه نتائج الدراسة التي قام بها Dai وآخرون (2006)، حيث أثبتت أن مركبات الفلافونول(flavonol) ومشتقاتها السكرية لها قدرة على حماية الكريات الحمراء من الانحلال ويعود ذلك لاحتوائها على بنية ortho-dihydroxyl، حيث يمكن أن تتفاعل مع الفيتامين E لترفع من قدرته المضادة للأكسدة وذلك بالمساهمة في تجديد الجذور الناتجة عنه (Zhou وآخرون، 2000).

10. تأثير المعاملة بالمستخلص الخامين لـ *P. lentiscus* و *A. campestris*

10. 1 تقدير أوزان الجرذان

من خلال هذه الدراسة أجريت تجارب على إناث الجرذان البيضاء البالغة المعاملة مسبقا بالمستخلصين الخامين لنباتي *P. lentiscus* و *A. campestris* بتراكيز 100 و200 و400 مغ/غ من وزن الجرذ لمدة 14 يوما متتالية فكانت النتائج الآتية:

يبين الجدول 4 أوزان مجموعات الجرذان قبل وبعد المعالجة لمدة 14 يوما بالمستخلصين الخامين لنباتي *P.lentiscus* و *A. campestris* بتراكيز مختلفة مقارنة بالمجموعة الشاهدة وكذا نسبة التغير في الوزن لكل مجموعة. يلاحظ عموما زيادة في وزن جرذان المجموعات الثمانية خلال 14 يوما من المعاملة ولكن بنسب مختلفة حيث يلاحظ أكبر نسبة زيادة عند المجموعة المعالجة بمستخلص نبات *P. lentiscus* بتركيز 400 مغ/كغ من وزن الجرذ والتي قدرت بـ 27.24 %، بينما سجلت المجموعة المعالجة بمستخلص *A. campestris* بتركيز 200 مغ/كغ من

وزن الجرذ القيمة الأقل بنسبة زيادة الوزن قدرت بـ 15.95 %. بالنسبة للمجموعة المعالجة بالفيتامين C فقد كان هناك زيادة في الوزن بقيمة مقاربة للمجموعة الشاهدة (18.67 %).

جدول 5. تأثير مستخلصات *P. lentiscus* و *A. campestris* على أ وزان الجرذان

المجموعات	مغ/كغ من وزن الجرذ	وزن الجرذ قبل المعالجة (غ)	وزن الجرذ بعد المعالجة (غ)	نسبة التغير في الوزن (%)
الشاهدة	محلول فيزيولوجي	9.3 ± 153.5	9.3 ± 183.6	19.65
Vit C	100 Vit C	13.3 ± 156.1	16.3 ± 185.3	18.67
P. lentiscus	100	7.7 ± 142.5	7.4 ± 170.8	19.88
	200	6.6 ± 149.1	16.4 ± 184.5	23.68
	400	13.4 ± 139.5	8.9 ± 177.5	27.24
A. campestris	100	9.5 ± 134	11.9 ± 168.5	25.74
	200	13 ± 149.3	18.1 ± 173.1	15.95
	400	6.5 ± 149.4	8.9 ± 174	16.46

يتبين أن هناك علاقة طردية بين زيادة نسبة التغير في وزن جرذان المجموعات المعالجة بالمستخلص الخام لنبات *P. lentiscus* ولقد كان الفرق معتبرا بالنسبة للمجموعات المعالجة بتركيز 200 و400 مغ/كغ من وزن الجسم مقارنة بالمجموعة الشاهدة ($P < 0.001$)، وهذا مايظهر عدم تأثير هذه المستخلصات على فقدان شهية الجرذان. بالنسبة لنبات *A.campestris* ، كان هناك زيادة في وزن الجرذان المعالجة بتركيز 200 و400 مغ/كغ من وزن الجسم أقل

من المجموعة المعالجة بتركيز 100 مغ/كغ وكان الفرق معتبرا مقارنة بالمجموعة الشاهدة (P < 0.001). وبذلك يعتبر تقدير وزن الجسم معيارا مهما لتقييم سمية العديد من المركبات وكذلك النباتات الطبية، حيث أثبتت العديد من الدراسات أن هناك عوامل كثيرة تؤدي إلى التأثير على الوزن فمثلا تؤدي المبيدات الفسفوعضوية من نوع Diazinone إلى نقصان في وزن الجسم ووزن بعض الأعضاء لدى جرذان التجارب (Yusuf وآخرون، 2006). كما أن فقدان الوزن مرتبط بالحالة الفيزيولوجية للحيوان والذي يمكن تفسيره ليس فقط بفقدان الشهية وإنما أيضا بسبب تعطيل عملية الإستقلاب (Mukinda و Syce، 2007).

10. 2 تركيز بروتينات الكبد ووزنه

تخلق البروتينات المصلية بشكل أساسي في الكبد وخلايا الدم والعقد اللمفاوية والطحال والنخاع العظمي. يمكن أن ينخفض تركيز البروتينات الكلية وكذا مختلف الجزيئات البروتينية في الحالة المرضية، يعبر انخفاض تركيز البروتينات عن وجود اضطرابات كلوية وكبدية واختلال في عملية امتصاصها، أما ارتفاع تركيزها عن الحالة الطبيعية فهو يعبر حالات مرضية أخرى مثل أورام النخاع المتعددة لذلك نقوم بمعايرة البروتينات الكلية في تشخيص ومتابعة مجموعة من أمراض الكبد والكلى والنخاع العظمي و كذا أمراض استقلابية وغذائية أخرى. من خلال النتائج الموضحة في الجدول 5 يتبين أنه لايوجد إختلاف في تركيز البروتينات الكلية للكبد في كل المجموعات المعالجة بمقارنتها بالمجموعة الشاهدة (30.80 P > 0.05). يعتبر التغير في وزن الأعضاء عاملا مهما في الكشف عن سميتها بعد التعرض لأي نوع من المركبات

الكيميائية (Raza وآخرون، 2002). من خلال قياس وزن الكبد لكل جرذ لم يلاحظ أي تغير معنوي لجميع المجموعات مقارنة بالمجموعة الشاهدة (7.82 ± 1.30 غ، P > 0.05).

جدول 6. تأثير مستخلصات *P. lentiscus* و *A.campestris* على تركيز بروتينات الكبد ووزنه

	تركيز المستخلص مغ/كغ من وزن الجرذ	تركيز بروتينات الكبد (مغ/مل)	وزن الكبد (غ)
P. lentiscus	100	1.05 ±27.22	1.04 ±7.25
	200	7.27 ±31.30	1.31 ±7.77
	400	1.88 ±30.07	0.70 ±7.43
A. campestris	100	2.51 ±33.79	0.99 ±7.08
	200	1.62 ±29.75	0.57 ±8.04
	400	3.23 ±28.30	0.41 ±7.65
الفيتامين C	100	1.49 ±26.87	1.05 ±7.45
الشاهد	محلول فيزيولوجي	1.81 ±30.80	1.3 ±7.82

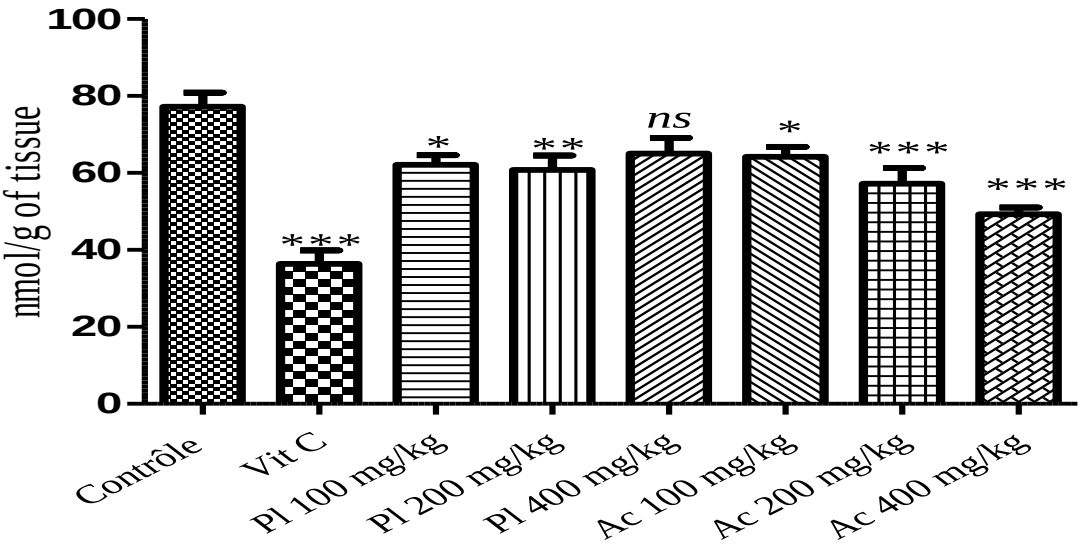
كل قيمة تمثل المتوسط الحسابي±SEM

يمكن أن يتأثر وزن الكبد بكميات الكربوهيدرات والدهون والبروتينات في الغذاء المتبع (Anderson وآخرون، 1984)، لكن يبقى الزيادة في وزن الكبد ضعيفا بوجود هذه المواد الغذائية مقارنة بالتعرض للمبيدات والأدوية والمضادات الحيوية. من النتائج المتحصل عليها ومن الدراسات السابقة يمكن القول أن مستخلصات نبات *P. lentiscus* و *A. campestris* ليس لها

تأثير سلبي على حجم الكبد وبالتالي لا يسبب سمية له غير أن هذا الاستنتاج غير كافي، إذ يجب التأكد من ذلك عن طريق تقدير بعض المعايير الأخرى.

10. 3 مستويات MDA في الكبد

يظهر الشكل 36 أن جميع المستخلصات النباتية (*P. lentiscus* و *A. campestris*) لها القدرة على تثبيط أكسدة اليبدات على مستوى أنسجة الكبد وبالتالي الخفض من انتاج مركبات MDA. مقارنة مع مجموعة الشاهد (81.64 نانومول/غ وزن النسيج) يلاحظ انخفاض في مستويات MDA لدى المجموعات المعالجة بمستخلصات *A. campestris* بوجود علاقة طردية بين انخفاض MDA وتركيز المستخلص الهيدروميثانولي وبفرق جد معنوي (P< 0.001) بالنسبة للمجموعتين المعالجتين بتركيز 200 و400 مغ/كغ من وزن الجرذ بقيمتي 57.17 و49.29 نانومول /غ من وزن الكبد على التوالي. بالنسبة لنبات *P.lentiscus* فقد أظهرت المجموعة المعالجة بتركيز200 مغ/كغ من وزن الجرذ القدرة الأكبر على خفض مستويات MDA بقيمة 60.77 نانومول/غ من وزن النسيج (P< 0.01). تم استخدام الفيتامين C كشاهد ايجابي وقد أدى إلى خفض مستويات MDA بقيمة 36.35 نانومول/ غ من وزن النسيج.



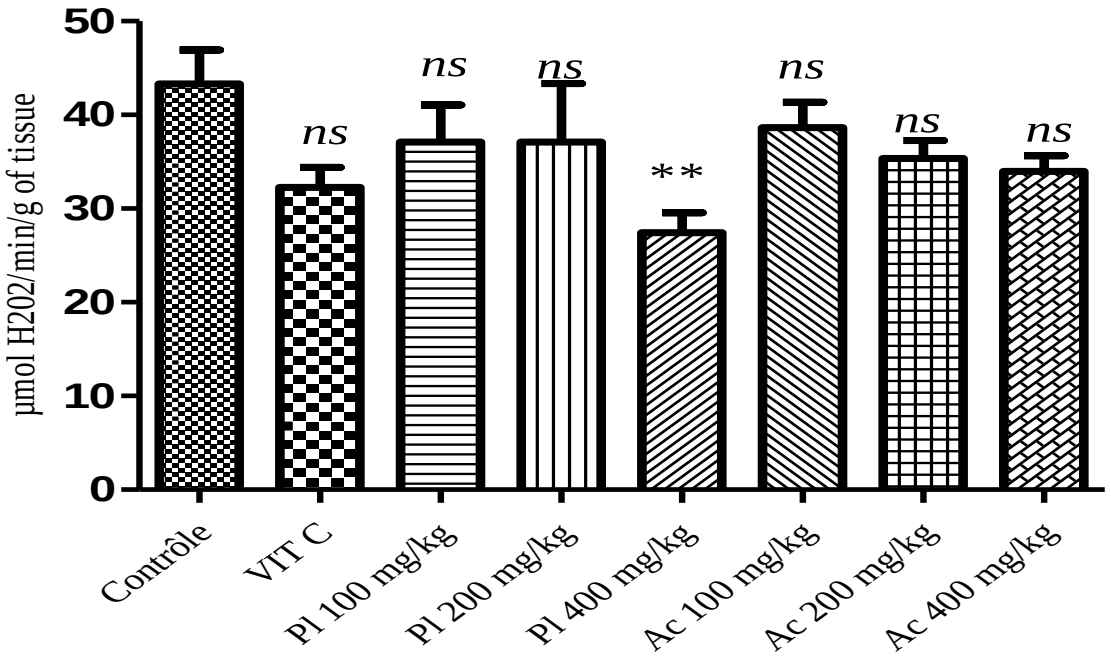
الشكل 36. تأثير المستخلصات الخامة لنباتي *P. lentiscus* و*A. campestris* على مستويات MDA الناتجة عن أكسدة الليبيدات في نسيج الكبد مقدرة بالنانومول/غ من الكبد (nmol/g of tissue). Pl، *P. lentiscus* ؛ Ac، *A. campestris*؛ Vit C ، Vitamin C؛ * (p <0.05)؛ ** (p < 0.01)؛ *** (p < 0.001) ns (p > 0.05).

إن الزيادة في أكسدة الليبيدات تضعف وظيفة الأغشية عن طريق خفض ميوعة الغشاء وتعطيل نشاطية الانزيمات والمستقبلات المرتبطة بالأغشية، هذه المركبات تكون مضرة بالخلايا ومرتبطة بالعديد من الأمراض مثل أمراض الشرايين والكلى بالاضافة إلى العديد من الأضرار النسيجية (Kakkar وآخرون، 1998). تظهر النتائج المتحصل عليها في دراستنا هذه أن إعطاء المستخلص الهيدروميثانولي لنبات *A. campestris* (400 مغ/كغ) لمدة 14 يوما سمح بتخفيض معدل MDA على مستوى نسيج الكبد بطريقة فعالة وقد يرجع ذلك إلى غناها بالمركبات الفينولية، حيث تؤكد العديد من الدراسات أنها تحتوي على الدباغ والفلافونويدات بالإضافة إلى الزيوت الأساسية والمعادن (Akrout، 2011). هناك العديد من المركبات المستخلصة بواسطة محاليل الكلوروفورم والهيكسان والكحول مثل الفلافونويدات والكرومون والأستوفنون (De Pascual وآخرون، 1980؛ Vasconcelos وآخرون، 1998) أثبتت مسؤوليتها عن

العديد من التأثيرات البيولوجية كالنشاطية المضادة للأكسدة والمضادة للبكتيريا ومضادة للسموم وكعوامل واقية للكبد (Aniya وآخرون، 2000؛ Memmi وآخرون، 2007). تدعم نتائجنا بدراسة قام بها (Sefi وآخرون، 2011) حيث أثبتت أن العلاج بواسطة أوراق *A. campestris* تحمي من أضرار الكبد عند التعرض للفوتونات عن طريق الخفض من مستويات MDA. بالنسبة لنبات *P. lentiscus* فقد أظهرت المجموعة المعالجة بالمستخلص ذو تركيز 200 مغ/كغ القيم الأقل لمركبات MDA، بينما ترتفع قيمها عند المجموعة المعالجة بالمستخلص ذو تركيز 400 مغ/كغ. أظهرت المركبات الفينولية المستخلصة من فواكه هذا النبات أن وجود حمض الغاليك ومشتقه (1, 2, 3, 4, 6-pentagalloylglucose) يلعب دورا مهما في الحماية من أكسدة الليبيدات المحرضة بـ H_2O_2 (Abdelwahed وآخرون، 2007)، إلا أن إعطاء هذا المستخلص للجرذان لخمسة أسابيع أظهر أنه يحتوي على مركبات تسبب سمية على مستوى الكبد (Ljubuncic وآخرون، 2005).

10. 4 نشاطية catalase

من خلال النتائج الموضحة في الشكل 37، لم يلاحظ تغير معتبر في نشاطية انزيم catalase على مستوى نسيج الكبد بالنسبة للمجموعات المعالجة بالمستخلصات الهيدروميثانولية لنباتي *P. lentiscus* و*A. campestris* بتركيزي 100 و200 مغ/كغ ($p < 0.05$). إلا أن المعاملة بنفس المستخلصات بتركيز 400 مغ/كغ أدى إلى خفض نشاطية هذا الإنزيم بطريقة معتبرة بالنسبة لنبات *P. lentiscus* (27.25 ميكرومول/دقيقة/غ من وزن النسيج) مقارنة بالمجموعة الشاهدة التي قدرت نشاطيته فيها بـ 43.30 ميكرومول/دقيقة/غ من وزن النسيج ($p < 0.01$).



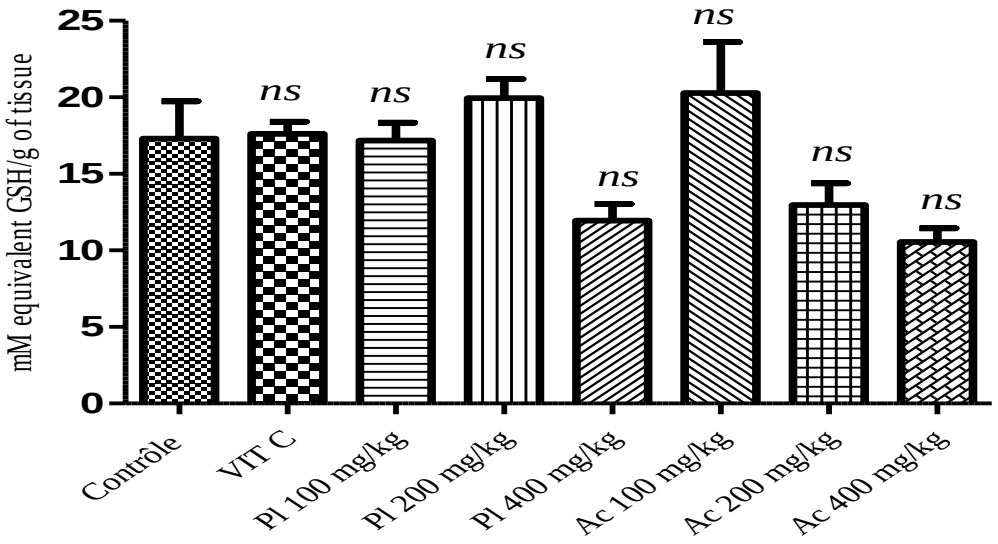
شكل 37. تأثير مستخلصات *P. lentiscus* و *A. campestris* على نشاطية catalase مقدرة بالميكرومول لـ H_2O_2/دقيقة/غ من الكبد (µmol H_2O_2/g of tissue). Pl، *P. lentiscus* ؛ Ac، *A. campestris*؛ Vit C ، Vitamin C؛ * (p <0.05)؛ ** (p < 0.01)؛ *** (p < 0.001)؛ ns (p > 0.05).

يعتبر catalase إنزيما مسؤولا عن تجزئة H_2O_2 إلى ماء وأكسجين في الشروط الفيزيولوجية، وهو إنزيم نشط جدا، حيث أن جزيئة واحدة منه قادرة على تفكيك ملايين الجزيئات H_2O_2 في الدقيقة (Nancy وآخرون، 2006). وترتفع نشاطية انزيم catalase خاصة عندما يكون مستوى الاجهاد التأكسدي مرتفعا أو عندما تكون كمية انزيم glutathion peroxidase محدودة، حينها يلعب إنزيم catalase دورا فعالا في مواجهة الإجهاد التأكسدي من طرف الخلايا (Niki وآخرون، 2007). من خلال هذه الدراسة يتبين أن مستخلصات نباتي *P. lentiscus* و *A. campestris* بتركيزي 100 و 200 مغ/كغ لا تؤثر على نشاط الإنزيم ويمكن تفسير ذلك بأن هذه التراكيز لا تحث على إنشاء إجهاد تأكسدي على مستوى نسيج الكبد يؤدي إلى الزيادة من

نشاط الانزيمات المضادة للأكسدة. وهذا ما بينته دراسات أخرى أجريت من طرف Sefi وآخرون (2011)، حيث وجدت أن معالجة الجرذان السليمة بأوراق نبات *A. campestris* لا يؤثر على إنزيم catalase. يمكن تدعيم نتائجنا بدراسة قام به Pereira وآخرون (2014) الذي وجد أن استعمال المستخلصات النباتية يؤدي إلى خفض الإنزيمات المضادة للأكسدة على مستوى كريات الدم الحمراء وأنسجة الكبد. ويمكن أن يكون ذلك نتيجة تأثير مضادات الأكسدة ذات المصدر الغذائي مخفضة بذلك الحاجة لاستعمال الانزيمات عندما تكون مضادات الاكسدة الخارجية بتراكيز مرتفعة في الجسم (Breinholt وآخرون، 1999).

10. 5 مستويات GSH في الكبد

تم قياس كمية الغليتاتيون (GSH) في نسيج الكبد لمعرفة تأثير المستخلصات النباتية على أحد مضادات الأكسدة غير الانزيمية ولقد أظهرت النتائج المسجلة في الشكل 38 أنه لا يوجد فرق معنوي في قيم GSH لدى المجموعتين المعالجتين بـ 100 و200 مغ/كغ بالنسبة للمستخلص الهيدروميثانولي لنبات *P. lentiscus* (17.18 و19.95 ميلي مولر مكافئ للغليتاتيون/غ من وزن الكبد على الترتيب) مقارنة بالمجموعة الشاهدة (17.25 ميلي مولر مكافئ للغليتاتيون/غ من وزن الكبد. يلاحظ أيضا إنخفاضا غير معنوي ($p > 0.05$) في مستوى GSH عند المجموعة المعالجة بنفس المستخلص بتركيز 400 مغ/كغ. سجلت المجموعة المعالجة بمستخلص *A. campestris* ذو تركيز 100 مغ/كغ القيم الأعلى للغليتاتيون في حين انخفض مستواها في المجموعتين المعالجتين بتركيز 200 و400 مغ/كغ.



الشكل 38. تأثير المستخلصات الخامة لنباتي *P. lentiscus* و A. campestris على مستويات الغليتاتيون (GSH) في الكبد مقدرة بالميلي مولر مكافئ لـ GSH/غ من وزن الكبد (m M equivalent GSH/g of tissue). Pl، *P. lentiscus*؛ Ac، *A. campestris*؛ Vit C ، Vitamin C؛ * (p <0.05)؛ ** (p < 0.01)؛ *** (p < 0.001) ns (p > 0.05).

الغليتاتيون هو عبارة عن ببتيد ثلاثي معروف بفعاليته الكبيرة المضادة للأكسدة، حيث يعمل على مراقبة تفاعلات الأكسدة والإرجاع (Menon و Goswami، 2007)، يعمل GSH على حماية الخلايا من الجذور الحرة والبيروكسيدات ومركبات سامة أخرى، إلا أن الإنخفاض في مستوياته يرفع من حساسية الخلايا لمختلف الأضرار مؤدية إلى اضطرابات على مستوى الأنسجة (Jollow، 1980). تؤكد العديد من الدراسات أن عديدات الفينول مثل heperin و rotenone تعمل على التحفيز الفعال للمورثات المعبرة لإنزيمات SOD و CAT و GPx (Sánchez-Reus وآخرون، 2007)، كما يمكن أن تنظم أيضا بناء GSH (Chen وآخرون، 2012). من خلال دراستنا الحالية يظهر أن التراكيز العالية للمستخلصات النباتية قد تؤدي إلى تأثيرات عكسية، فقد بينت الدراسات السابقة أن الزيادة في نشاط مختلف الإنزيمات المضادة للأكسدة وعلى العكس الانخفاض المحسوس في مستوى GSH هو دليل على وجود إجهاد

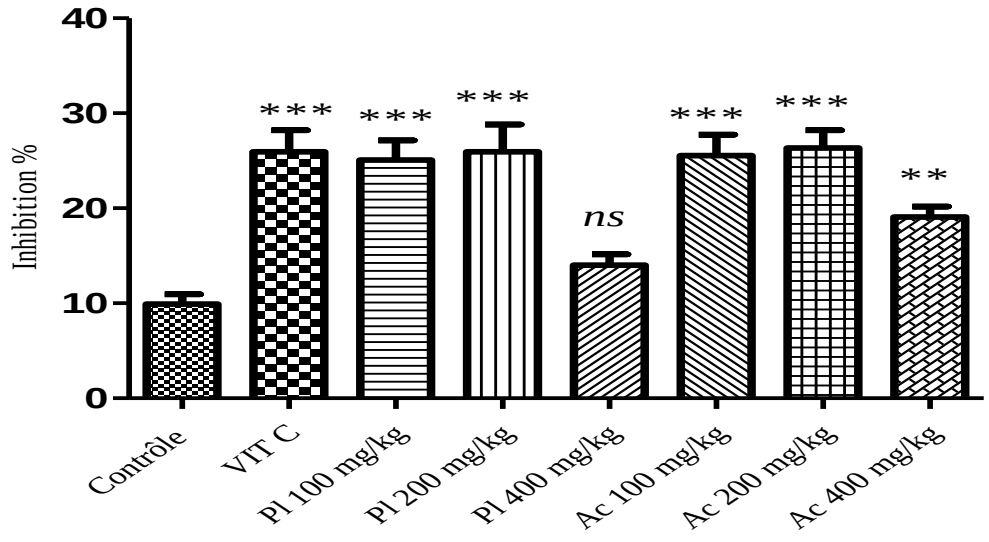
تأكسدي (Ismail و Ismail، 2008). وبذلك يمكن القول التراكيز العالية للمستخلصات النباتية يعمل على مستويات GSH ويمكن أن يعود ذلك إلى التأثير العكسي للمركبات الفينولية، فقد لاحظ Galati وآخرون (2002) أن التناول المفرط لعديدات الفنول يمكن أن تتحول عن طريق انزيم peroxidase إلى الشكل المؤكسد (جذر phenoxyl) الذي يكون في بعض الحالات فعالا بشكل كاف لأكسدة GSH و NADH المرتبط باستهلاك كبير للأكسجين وبالتالي تكوين الأنواع الاكسجينية النشطة. تقوم عديدات الفينول أيضا المحتوية على حلقات catechol بأكسدة حمض الأسكوربيك بتدخل جذر semiquinone الناتج عن أكسدة الفلافونويدات.

أظهرت التجارب أن حضن الخلايا الكبدية (hepatocytes) بوجود عديدات الفينول ذات حلقات فنولية متعددة يؤدي إلى الأكسدة الجزئية لـ GSH إلى GSSG الموجود في هذه الخلايا في حين أن المركبات الفينولية ذات حلقات Catechol تؤكسد جميع GSH لتحوله إلى GSH المزدوج (GSH conjugate) (Rietjens وآخرون، 2002).

10. 6 النشاطية المضادة للأكسدة للبلازما باستعمال اختبار DPPH

طورت العديد من الطرق من أجل قياس النشاطية المضادة للأكسدة للبلازما من بينها اختبار إزاحة DPPH و ABTS والقدرة المرجعة للحديد عن طريق اختبار FRAP (Huang وآخرون، 2005). الشيء الذي يربط بين هذه الطرق هو أنها سهلة الاستعمال وموثوق بها من أجل تقدير الإجهاد التأكسدي للبلازما أو الأعضاء (Katalinic وآخرون، 2005). من النتائج الممثلة بالشكل 39 يتبين أن إعطاء مستخلص نبات *P. lentiscus* بتركيزي 100 مغ/كغ وتركيز 200 مغ/كغ يرفعان من النشاطية المضادة للأكسدة على مستوى البلازما (25.09 % و 25.96 %)

مقارنة بالمجموعة الشاهدة (09.92 %) بطريقة معتبرة (P <0.001)، غير أن تركيز 400 مغ/كغ لم يرفع من النشاطية المضادة للأكسدة بالقيمة المسجلة بوجود التركيزين السابقين (14.02%) ويعتبر الفرق في هذه الحالة غير معنويا مقارنة بالمجموعة الشاهدة (P > 0.05). بالنسبة لنبات *A. campestris* فقد أظهرت المجموعتين المعالجتين بتركيزي 100 و200 مغ/كغ قدرة على رفع النشاطية المضادة للأكسدة بطريقة معتبرة (25.56 و26.35 %) مقارنة بالمجموعة الشاهدة (P < 0.001). يعمل المستخلص الهيدروميثانولي بتركيز 400 مغ /كغ على رفع النشاطية المضادة للأكسدة لكن بطريقة أقل من التركيزين السابقين (19.06 % ؛ P < 0.01).



شكل 39. نسبة تثبيط جذور DPPH للمستخلصات الخامة لنباتي *P. lentiscus* و*A. campestris* على مستوى البلازما. Pl، *P. lentiscus* ؛ Ac، *A. campestris*؛ Vit C ، Vitamin C؛ * (p <0.05)؛ ** (p < 0.01)؛ *** (p < 0.001) ns (p > 0.05).

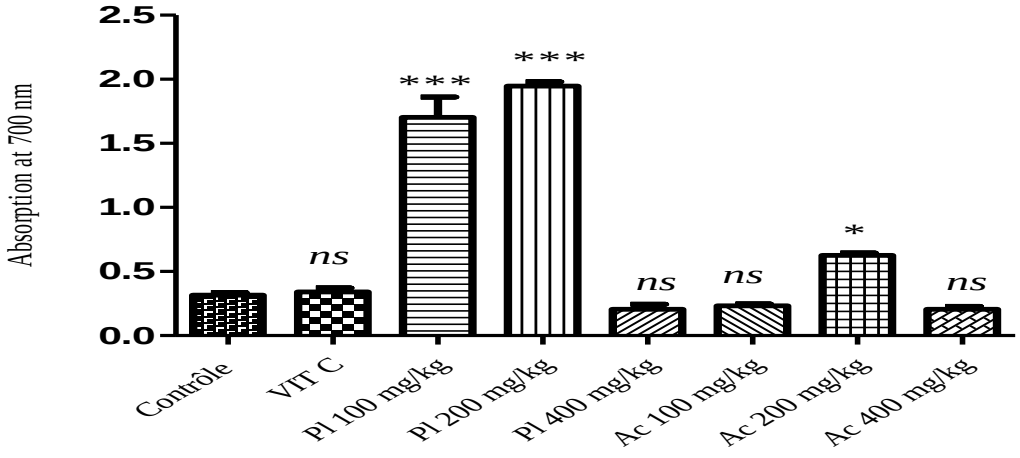
تحتوي البلازما على العديد من مضادات الأكسدة داخلية المنشأ ما يفسر قدرة جميع المجموعات بما فيها المجموعة الشاهدة على إزاحة جذر DPPH لكن يمكن أن يرجع الاختلاف إلى وجود مركبات فينولية مصدرها المستخلصات النباتية هي المسؤولة عن الرفع

من قدرة البلازما المضادة للأكسدة عن طريق ما يسمى بالفعل التعاوني بين المركبات داخلية وخارجية المنشأ.

10. 7 القدرة الإرجاعية للبلازما

تعتبر القدرة الإرجاعية لمختلف المركبات عاملا مهما في قياس فعاليتها المضادة للأكسدة (Bhandari و Kawabata، 2004). يظهر الشكل 40 أن المجموعتين المعالجتين بالمستخلص الخام لنبات *P. lentiscus* بتركيزي 100 و200 مغ/كغ من وزن الجرذ سجلتا القدرة الإرجاعية الأعلى بقيمتي 1.703± 0.38 و1.947± 0.0.04 على الترتيب ($P < 0.001$)، بينما سجلت المجموعة المعالجة بنفس المستخلص بتركيز 400 مغ/كغ القيمة الأقل (0.206 ± 0.08) بفرق غير معنوي مقارنة بالمجموعة الشاهدة ($P > 0.05$).

أظهرت المعالجة بالمستخلص الخام لنبات *A. campestris* أن التركيز 200 مغ/كغ أعطى القدرة الإرجاعية الأكبر(0.625 ± 0.04) بفرق معنوي دائما مقارنة بالمجموعة الشاهدة ($P < 0.01$).



شكل 40. تأثير المستخلصات الخامة لنباتي *P. lentiscus* و *A. campestris* على القدرة الإرجاعية للبلازما. Pl، *P. lentiscus* ؛ Ac، *A. campestris*؛ Vit C ، Vitamin C؛ * ($p < 0.05$)؛ ** ($p < 0.01$)؛ *** ($p < 0.001$) ns ($p > 0.05$).

تحتوي البلازما مركبات تعمل على تثبيط الجذور الحرة مثل GSH والبروتينات الحاملة لمجموعة SH والفيتامين C والبيليريبن وحمض اليوريك والفلافونويدات والكاروتنويدات بعضها يصنع من طرف الخلية في حين أن البعض الآخر يتم الحصول عليه من الغذاء (Benzie وStrain، 1996). أكدت الدراسات أيضا أن GSH تتدخل في إرجاع Cu^{+2} إلى Cu^{+} التي تكون مصدرا لإنتاج الجذور الحرة (Lushchak، 2012). إلا أننا لاحظنا زيادة في القدرة الإرجاعية للبلازما عند معالجة الجرذان بالمستخلصات النباتية ويمكن تفسير ذلك بوجود مركبات أخرى مصدرها هذه المستخلصات هي التي رفعت من القدرة الإرجاعية للبلازما. تظهر الدراسات أن بعض مضادات الأكسدة لها القدرة على التفاعل مع مضادات أكسدة أخرى مؤدية بذلك إلى الرفع من قدرتها وهذا ما يعرف بالتكامل بين هذه المركبات (Jacob، 1995). بمقارنة نتائج القدرة الإرجاعية للمستخلصات النباتية in vitro وin vivo نلاحظ أن المستخلص الهيدروميثانولي لنبات *P. lentiscus* أظهر قدرة إرجاعية أكبر من المستخلص الهيدروميثانولي لنبات *A. campestris*، لكن هناك إختلاف في القدرة الإرجاعية بين in vitro وin vivo ويمكن أن يعود ذلك إلى تأثر المركبات الفينولية بالميتابوزم على مستوى الأنسجة، حيث تظهر الدراسات أن المركبات الفينولية ذات المصدر النباتي يمكنها أن ترتبط ببروتينات البلازما مشكلة بذلك مركبات مستقرة نسبيا (Schwedhelm وآخرون، 2003)، هذه المعقدات المتشكلة يمكن أن تكون أقل نشاطية وبالتالي يقل تأثيرها على إرجاع أيونات الحديد Fe^{+3} ويمكن

تفسيره بقلة مجاميع OH التي ارتبطت بالأحماض الأمينية للبروتينات (DeGraft-Johnson وآخرون، 2007).

خاتمة

ازداد الاهتمام باستعمال النباتات الطبية في علاج مختلف الأمراض مثل أمراض الأوعية والقلب والأمراض العصبية ومختلف الإلتهابات، ولقد أكدت العديد من الدراسات ارتباط علاج هذه الأمراض بمضادات الأكسدة الطبيعية. تمثل المركبات الفينولية القسم الأكثر انتشارا في المملكة النباتية والتي تتميز بخصائص مضادة للأكسدة بآليات مختلفة وذلك لتنوع بنياتها. تستعمل نباتات *P. lentiscus* و *A. campestris* في الطب الشعبي في الجزائر لعلاج أمراض الجهاز الهضمي، أما زيت الأرغانيا فيستعمل لأغراض تجميلية وغذائية دون إستعمال لأوراقها. لذا كان الهدف من دراستنا تقدير المحتوى الفينولي والنشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات *P. lentiscus* و *A. campestris* و *A. spinosa* وتأثيراتها على مستوى الأنسجة الحية.

من خلال استخلاص المركبات الفينولية باستعمال محاليل عضوية متزايدة القطبية وهي الهكسان والكلوروفورم والايثيل أستات، امتلك مستخلص الميثانول الممزوج مع الماء بنسبة 85 % لكل من النباتات الثلاث المردود الأكبر مقارنة بالمستخلصات الأخرى، وهذا لأن الميثانول مع الماء يؤدي إلى استخلاص عدد كبير من الجزيئات النباتية. من ثم تم تقدير المحتوى الفينولي باستعمال طريقة Folin-ciocalteu فوجد أن مستخلصات النباتات الثلاث غنية بعديدات الفينول لكن أعلاها سجل عند EAE لنبات *A. campestris* و *A. spinosa* على التوالي. بالنسبة لكمية الفلافونويدات المقدرة بطريقة $AlCl_3$، امتلك EAE لنبات *A. spinosa* و *P. lentiscus*، الكمية الأعلى أما كمية الدباغ المقدرة بالاعتماد على ترسيب البروتينات

بواسطة هذه المركبات فقد لوحظ أن جميع مستخلصات *P. lentiscus* غنية بهذه المركبات بالإضافة إلى غنى CE لنبات *A. spinosa* مقارنة بالمستخلصات الأخرى. في خطوة أخرى تم دراسة النشاطية المضادة للأكسدة لهذه المستخلصات بطرق عديدة لمعرفة مختلف الآليات المستخدمة في هذا التأثير. فاستعمال طريقة DPPH و ABTS أظهر EAE لنباتات *P. lentiscus* و *A. campestris* و *A. spinosa* القدرة الازاحية الأكبر. سجل EAE للنباتات الثلاث أيضا التأثير الإزاحي الأعلى لجذر الهيدروكسيل (OH^{-}) باستعمال طريقة phenanthroline-Fe^{+2} الذي يعتبر من أكثر الجذور خطورة للجزيئات البيولوجية. باستعمال طريقة β-carotene / حمض اللينولييك تميز المستخلص الهيدروميثانولي للنباتات الثلاث بقدرة عالية على تثبيط أكسدة b-caroteneأعلاها عند نبات *P. lentiscus* وهي مقاربة لقيمة التثبيط لـ BHT، كما أعطت مستخلصات EAE قدرة عالية أيضا على التثبيط أعلاها عند *A. spinosa* يليها مستخلص *P. lentiscus* وفي الأخير مستخلص *A. campestris* . كشفت عملية إرجاع الحديد الذي يعكس خاصية منح الالكترونات والتي تعتبر من أهم الآليات المضادة للأكسدة للمركبات الفينولية أن EAE يعطي امتصاصية 0.5 عند تراكيز ضعيفة لكل من *A. campestris* و *P. lentiscus* و *A. spinosa* على التوالي وقد يعود هذا إلى المحتوى الفينولى الكبير لهذه المستخلصات. من خلال دراسة نشاطية مسك الحديد أظهرت مستخلصات CE للنباتات الثلاث القدرة الأكبر على مسك الحديد وفي مقدمتها مستخلص CE لنبات *A. campestris* ثم مستخلص CE لنبات *P. lentiscus* و CE لنبات *A. spinosa* في المقابل سجلت مستخلصات EAE القدرة الأضعف رغم غناها بالمركبات الفينولية وتأثيراته الفعالة في معظم الإختبارات المستعملة ويمكن ارجاع

ذلك التأثير التعاوني بين المركبات الموجودة في المستخلص الهيدروميثانولي. يعتبر تقدير كمية جذور البيروكسيد عاملا مهما لتقدير أكسدة اللبيدات باستعمال طريقة ferric-thiocyanate فبعد مرور 48 ساعة سجل CE و CHE لنبات *A. spinosa* التأثير الأعلى يليه CHE لنبات *A. campestris* و CE لنبات *P. lentiscus* . تم أيضا تقدير تأثير المستخلصات الخامة (CE) لنباتي *P. lentiscus* و *A. campestris* على مضادت الأكسدة غير الإنزيمية ممثلة بالغليتاتيون ومضادات الأكسدة الانزيمية ممثلة في انزيم catalase، بالإضافة إلى تأثيرها على أكسدة الليبيدات في أنسجة الكبد بالنظر إلى أنه العضو الأكثر تعرضا لمختلف المركبات. تم أيضا قياس القدرة الإرجاعية للبلازما وكذا قدرتها على إزاحة جذور DPPH في وجود هذه المستخلصات بتراكيز 100 و 200 و 400 مغ/كغ من وزن الجرذ. من خلال تقدير كمية MDA الناتجة عن أكسدة الليبيدات على مستوى نسيج الكبد وجد أن المستخلص الخام بتركيز 400 مغ/كغ من وزن الجرذ لكلا النباتين أعطى القدرة الأكبر على حماية الأغشية من الأكسدة مقارنة بالمجموعة الشاهدة. بالنسبة لدراسة تأثير مستخلصات *P. lentiscus* و *A. campestris* على مستويات GSH فلقد وجد أن التركيز 400 مغ /كغ من وزن الجرذ أدت إلى انخفاض في كمية GSH مقارنة بالمجموعة الشاهدة. جميع التراكيز لمستخلصي النباتين لم تؤثر تأثيرا معنويا على نشاطية انزيم catalase باستثناء المعالجة بمستخلص *P. lentiscus* بتركيز 400 مغ/كغ الذي أدى إلى خفض نشاطية الإنزيم بطريقة فعالة. من خلال دراسة النشاطية المضادة للأكسدة للبلازما باستعمال DPPH سجلت مستخلصات *P. lentiscus* و *A. campestris* بتركيز 100 و 200 مغ/كغ التأثير الإزاحي الأكبر وبفرق معتبر. كما أدى تقدير

القدرة الإرجاعية للبلازما إلى إظهار القدرة الفعالة لمستخلص *P. lentiscus* بتركيز 100 و200 مغ /كغ. في الأخير يتبين أن EAE له قدرة كبيرة مضادة للأكسدة باستعمال أغلب الطرق وقد يعود ذلك إلى المحتوى الفينولي الكبير الذي يتميز به هذا المستخلص وكذلك نوعية المركبات الفينولة التي يحتويها، كما يمكن استنتاج أن التراكيز المرتفعة للنباتات يمكن أن تؤثر على مضادات الأكسدة الإنزيمية وغير الإنزيمية بطريقة سلبية. تبقى هذه الدراسة أولية إذ من المهم معرفة المواد المكونة لهذه المستخلصات وتنقيتها ومعرفة المواد الفعالة لها. يجب أيضا معرفة التأثيرات السمية لهذه النباتات من أجل استعمالها بطريقة آمنة كأدوية.

المراجع

Abascal K, Ganora L, Yarnell, E. (2005) The effect of freeze-drying and its implications for botanical medicine: a review. *Phytother Res*. 19: 655-660.

Abdille MH, Singh RP, Jayaprakasha GK, Jena BS. (2005) Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. *Food Chem*. 90(4): 891-896.

Adlercreutz H, Mazur W. (1997) Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med.* 29: 95-120.

Abdelwahed A, Bouhlel I, Skandrani I, Valenti K, Kadri M, Guiraud P, Steiman R, Mariotte AM, Ghedira K, Laporte F, Dijoux-Franca MG, Chekir-Ghedira L. (2007) Study of antimutagenic and antioxidant activities of Gallic acid and 1,2,3,4, 6 pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus* Confirmation by microarray expression profiling. *Chem Biol Interact.* 165: 1-13.

Akrout A, Chemli R, Chreif I, Hammami M. (2001) Analysis of the essential oil of *Artemisia campestris* L. *Flavour Frag J*. 16: 337-339.

Akrout A, El Jani H, Amouri S, Neffati M. (2010) Screening of antiradical and antibacterial activities of essential oils of Artemisia campestris L., Artemisia herba alba Asso and Thymus capitatus Hoff. Et Link. *RRST*. 2(1): 29-39.

Akrout A, Gonzalez LA, El Jani HJ, Madrid PC. (2011) Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaeahirsuta* from southern of Tunisia. *J Food Chem Tox.* 49: 342-347.

Akrout A, Mighri H, Krid M, Thabet F, Turki H, El-Jani H, Neffati M. (2012) Chemical Composition and Antioxidant Activity of Aqueous Extracts of Some Wild Medicinal Plants in Southern Tunisia. *IJLSMS.* 2 (1): 1- 4.

Alam A, Rahman M. (2014) Mitochondrial dysfunction in obesity: potential benefit and mechanism of Co-enzyme Q10 supplementation in metabolic syndrome. *Diabetes Metab Disord*. 13(60): 1-11.

Alaoui A, Charrouf Z, Soufiaoui M, Carbone V, Malorini A, Pizza C, Piacente. (2002) Triterpenoic sponins from the shells of Argania spinosa seeds. *J Agric Food Chem*. 50: 4600-4603.

Alok S, Jain KS, Verma A, Kumar M, Mahor A, Sabharwal M. (2014) Herbal antioxidant in clinical practice: A review. *Asian Pac J Trop Biomed*. 4(1): 78-84.

Aman S, Moin S, Owais M, Siddiqui MU. (2013) Antioxidant activity of thymol: protective role in AAPH-induced hemolysis in diabetic erythrocytes. *Int J Pharm Sci Invent.* 2: 55-60.

Amarowic R, Troszyńska A, Shahidi F. (2005) Antioxidant activity of almond seed extract and its fractions. *J Food Lipids*. 12: 344-358.

Amessis-Ouchemoukha N, Madania K, Pedro LV, Faléb M, Serralheirob L, Duarda ME, Araújo M. (2014) Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterraneanmedicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. *Ind Crops Prod*. 53: 6– 15.

Anderson KE, Kappas TA, Conney AH, Bradlow HL, Fishman J. (1984) The Influence of Dietary Protein and Carbohydrate on the Principal Oxidative Biotransformations of Estradiol in Normal Subjects. ***J*** *Clin Endocrinol Metab*. 59(1): 103-107.

Andrade RG, Dalvi LT, Silva JMC, Lopes GKB, Alonso A, Hermes-Lima M. (2005) The antioxidant effect of tannic acid on the in vitro copper mediated formation of free radicals. *Arch Biochem Biophys*. 437: 1-9.

Anwar F, Jamil A, Iqbal S, Sheikh MA. (2006) Antioxidant activity of various plant extracts under ambient and accelerated storage of sunfl ower oil. *Grasas Aceites*. 57:189-197.

Anwar F, Przybylski R. (2012) Effect of solvents extraction on total phenolics and antioidants activity of extracts from Flaxseed (Linum usitatissimum L.). *Acta Sci Pol Technol Aliment*. 11(3): 293-301.

Aribi B, Zerizer S, Kabouche Z. (2013) IMMUNOMODULATORY ACTIVITY OF ARGANIA SPINOSA SEEDS. *Int J Pharm Pharm Sci*. 5(3) : 488-491.

Arts IC, Van de Putte B, Hollman PC. (2000) Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *J Agric Food Chem*. 48:1746-1751.

Aruoma IO. (1999) Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia Pacific J Clin Nutr*. 8(1): 53–63.

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*. *Pharm Biol*. 44: 247-252.

Ayaz SA, Bhandari U, Pillai KK. (2005) Influence of α-lipoic acid and vitamine E against doxorubicin-induced biochemical and histological changes in the cardiac tissue of rats. *Indian J Pharmacol*. 37: 294-299.

Baba Aissa F. (1991) Les plantes medicinales en Algerie. Coedition Bouchene et Addiwane, Alger, Algerie.

Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunete C, Dine T, Vasseur J, Gazin JC, Pinkas M, Luycky M, Gazin M. (1996) Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneim Forsch/Drug Res*. 1-6.

Balasundram N, Sundram K, Samman S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial byproducts: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chem*. 9: 191-203.

Bandyopadhyay D, Chattopadhyay A, Ghosh G, Datta AG. (2004) Oxidative Stress-Induced Ischemic Heart Disease: Protection by Antioxidants. *Curr Med Chem*. 11: 369-387.

Barotto MC, Tattini M, Galardi C, Pinelli P, Romani A, Visioli F, Basosi R, Pogni R. (2003) Antioxidant activity of galloyl quinic derivatives isolated from *P. lentiscus* leaves. *Free Radic Res*. 37: 405-412.

Bavaresco L. (2003) Role of viticultural factors on stilbene concentrations of grapes and wine. *Drugs Exp Clin Res*. 29:181-7.

Benabadji SH, Wen R, Zheng JB, Dong XC, Yuan SG. (2004) Anticarcinogenic and antioxidant activity of diindolylmethane derivatives. *Acta Pharmacol Sin*. *25*: 666-671.

Benhammou N, Atik Bekkara F, Kadifkova Panovska T (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of the Pistacia lentiscus and *Pistacia atlantica* extracts. *Afric J Pharm Pharmacol*. 2(2): 22-28.

Benzie IF, Strain JJ. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 239(1):70-6.

Benzyane M. (1995) Le rôle socio-économique et environnemental de l'arganier. Acte des Journées d'étude sur l'arganier, Essaouira, 29-30 septembre.

Blokhina O, Violainen E, Fagerstedt KV. (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot*. 91: 179-194.

Bonizzi G, Piette J, Merville MP, Bours V. (2000) Cell type-specific role for reactive oxygen species in nuclear factor B activation by interleukin-1. *Biochem Pharmacol*. 59: 7- 11.

Boumerfeg S, Baghiani2 A, Djarmouni M, Ameni D, Adjadj M, Belkhiri F, Charef N, Khennouf S, Arrar L. (2012) Inhibitory Activity on Xanthine Oxidase and Antioxidant Properties of *Teucrium polium* L. Extracts. *Chinese Medicine*. 3: 30-41.

Bravo L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*. 56(11):317-33.

Breinholt, V, Lauridsen, ST, Dragsted LO. (1999). Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat. *Xenobiotica*. 29: 1227–1240.

Burits M, Bucar F. (2000) Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother Res*. 14: 323-328.

Cadet J, Bellon S, Berger M, bourdat AG, douki T, Duarte V, Frelon S, Gasparutto D, Muller E, Ravanat JL, Salvaigo S. (2002) Recent aspects of oxidative DAN damage: guanine lisions, measurement and substrate specificity of DNA repairglycosylase. *Boil chem*. 383(6): 1-93.

Cai W, Gu X, Tang J. (2010) Extraction, Purification, and Characterisation of the Flavonoids from *Opuntia milpa alta* Skin. *Czech J Food Sci.* 28 (2): 108–116.

Cao G, Sofic E, Prior RL. (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure–activity relationships. *Free Radic Biol Med*. 22: 749-760.

Carlo GD, Autore G, Izzoaa, Moiolino P, MascoloN, Viola P, Diurno MV, Capawa F. (1993) Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats; structure-activity relationships. *J Pham Pharmacol*. 45:1045-59.

Carr A, McCall MR, Frei B. (2000) Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species-reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*. 20: 1716-1723.

Catal´a A. (2006) An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol*. Review. 38: 1482–1495.

Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D. (2009) Antioxidants and the Comet assay. *Mutat Res*. 681(1): 51-67.

Chalchat JC, Cabassu P, Petrovic SD, Maksimovic ZA, Gorunovic, MS. (2003) Composition of essential oil of Artemisia campestris L. From Serbia. *J Essent Oil Res*. 15: 251-253.

Chan, EWC, Lim YY, Mohammed O. (2007) Antioxidant and antibacterial activity of leaves of etlingera species (Zingiberaceae) in peninsular Malaysia. *Food Chem*. 104: 1586-1593.

Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JCh. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal*. 10: 178-182.

Charrouf Z, Guillaume D, Driouich A. (2002) The argan tree, an asset for Morocco (in French) *Biofutur*. 220: 54-57.

Chaudhuri S, Banerjee A, Basu, K, Sengupta, B, Sengupta, PK. 2007. Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins, antioxidant and antihemolytic effects. *Int J Biol. Macromol*. 41: 42–48.

Chen JH, Ou HP, Lin CY, Lin FJ, Wu CR, Chang SW, Tsai CW. (2012) Carnosic acid prevents 6 hydroxydopamine-induced cell death in SH-SY5Y cells via mediation of glutathione synthesis. *Chem Res Toxicol.* 25: 1893-1901.

Chernane H, Hafidi A, El Hadrami I, Ajana H. (1999) Phenolic derivatives from the pulp of the fruits of Argan tree (Argania spinosa L. skeels) and their relationships with morphologic features (in French). *Agrochimica*. 43: 137-150.

Chryssavgi G, Vassiliki P, Athanasios M, Kibouris T, Michael K. (2008) Essential oil composition of Pistacia lentiscus L. and Myrtus communis L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chem*. 107: 1120–1130.

Chung KT, Wong TY, Wei CI, Huang YW, Lin Y. (1998) Tannins and human health: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 38(6): 421-464.

Chung YC, Chen SJ, Hsu CK, Chang CT, Chou ST. (2005) Studies on the antioxidative activity of Graptopetalum paraguayense E. Walther. *Food Chem*. 91: 419-424.

Cillard J, Cillard P. (2006) Mécanismes de la péroxydation lipidique et des antioxydatons. *OCL*. 13(1): 24-29.

Clairborne A. (1985) Catalase activity. In: Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. *Greenwald, R.A. ed Boca Raton, Fla*: *CRC Press*, 283-284.

Clifford MN, Scalbert A. (2000) Ellagitannins-occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. *J Food Sci Agric*. 80: 1118–1125.

Cortell JM, Kennedy JA. (2006) Effect of shading on accumulation of flavonoid compounds in (Vitis vinifera L.) pinot noir fruit and extraction in a model system. *J Agric Food Chem*.54: 8510-8520.

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

Cotelle N. (2001) Role of Flavonoids in Oxidative Stress. *Curr Top Med Chem*. 1: 569-590.

Daglia M. (2011) Polyphenols as antimicrobial agents. *CURR OPIN BIOTECH*. 23: 1-8.

Dai F, Miao Q, Zhou B, Yang L, Liu ZL. (2006) Protective effects of flavonols and their glycosides against free radical-induced oxidative hemolysis of red blood cells. *Life Sci*. 78: 2488 - 2493.

D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. (2007) Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità* . 43(4): 348-361.

Decker EA, Welch B. (1990) Role of ferritin as lipid oxidation catalyst in muscle food. *J Agric Food Chem*. 36: 674-677.

DeGraft-Johnson J, Kolodziejczyk K, Krol M, Nowak P, Krol B, Nowak D. (2007) Ferric Reducing Ability Power of Selected Plant Polyphenols and Their Metabolites: Implications for Clinical Studies on the Antioxidant Effects of Fruits and Vegetable Consumption. *B C P T*. 100(5): 345-352.

Delazar A, Lasheni S, Fathi-Azad F, Nahar L, Rahman MM, Asnaashari S, Mojarab M, Sarker SD (2010) Free radical scavenging flavonol 3-*O*-glycosides from the leaves of *Ribes biebersteinii* Berl. *Rec Nat Prod.* 4: 96-100.

Delmas-Beauvieux, MC, Combe C, Peuchant E, Carbonneau MA, 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.

Delmas D, Lancon A, Colin D, Jannin B, Latruffe N. (2006) Resveratrol as a chemopreventive agent: a promising molecule for fighting cancer. *Curr Drug Targets*. 7: 423-42.

Disilvestro RA. (2001) Flavonoids as Antioxidants. In Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods; Wildman, R.E.C., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, Chapter 8. pp 127-142.

Djeridane A,Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. (2006) Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compoudns. *J Food Chem*. 97: 654-660.

Djeridane A, Yousfi M, Najemi B, Vidal N, Lesgards JF, Stocker P. (2007). Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic Compouds and their antioxidant activity .*Eur Food Res Techenol.* 224**:** 801-809.

Dorman HJD, Peltoketo A, Hiltunen R, Tikkanen MJ. (2003) Characterization of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chem*. 83: 255-262.

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

Druzynska B, Stepniewska A, Wołosiak R. (2007) THE INFLUENCE OF TIME AND TYPE OF SOLVENT ON EFFICIENCY OF THE EXTRACTION OF POLYPHENOLS FROM GREEN TEA AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OBTAINED EXTRACTS. *Acta Sci Pol Technol Aliment*. 6(1): 27-36**.**

Du J, Cullen JJ, Buettner GR. (2012) scorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. Review. *Biochim. Biophys. Acta*. 1826: 443–457.

Du Y, Guo H, Lou H. (2007) Grape seed polyphenols protect cardiac cells from apoptosis via induction of endogenous antioxidant enzymes. *J Agric Food Chem*. 55: 1695-1701.

Duthie GG, Brown KM. Reducing the risk of cardiovascular disease. In Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals; Goldberg, I., Ed.; Chapman, Hall: New York, NY, USA, 1994; pp. 19-38.

Ellman G. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 82: 70 -7.

El Kabouss A, Charrouf Z, Faid M, Garneau FX, Collin G. (2002) Chemical composition and antimicrobial activity of the leaf essential oil of Argania spinosa L. *Skeels. Essent Oil Res*. 14: 147-9.

Elmastas M, Gulcin I, Isildak O, Kufrevioglu OI, Ibaoglu K, Aboul-Enein HY. (2006) Radical scavenging activity and antioxidant capacity of bay leaf extracts. *J Iran Chem Soc*. 3: 258-266.

Emynur Shafekh S, Mohd Adzim Khalili R, Catherine CCW, Siti Syakiroh ZA, Ummu Habibah A, Norhayati AH, Nor Farhanah MY, Noor Husna Z, Siti Nafizah MB, Azlina M, Noor Shahhida Sazura AR, Ahmad Zubaidi AL. (2012) Total phenolic content and in vitro antioxidant activity of Vigna sinensis. *Food Res Int*. 19(4): 1393-1400.

Favier A. (2003) le stress oxydant. intéret conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *mécanisme biochimique*. 108-115.

Feng Xia LY, Garcia GE, Hwang D, Wilson CB. (1995) Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *J Clin Invest*. 95: 1669-1675.

Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D, Comporti M. (1997) Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett*. 416: 123-129.

Frankel EN, Huang SW, Kanner J, German JB. (1994) Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. *J Agric Food Chem*. 42: 1054-1059.

Frankel EN. (1998) Hydroperoxide formation in Lipid oxidation. *Dundee The Oily Press*. 23-41.

Frankel EN, Meyer AS. (2000) The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J Sci Food Agric*. 80: 1925-1941.

František S, **Tomas V, Julius, A. (2006)** Silymarin and its components scavenge phenylglyoxylic ketyl radicals. *Fitoterapia*. 77: 525-529.

Frutos P, Hervás G, Giráldez FJ, Mantecón AR. (2004) Review. Tannins and ruminant nutrition. *SPAN J AGRIC RES*. 2 (2): 191-202.

Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien, PJ. (2002) Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology*. 177: 91- 104.

Gao X, Xu YX, Janakiraman N, Chapman RA, Gautam SC. (2001) Immunomodulatory activity of resveratrol: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production. *Biochem Pharmacol*. 62: 1299-1308.

Garcia-Salas P, Morales-Soto A, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. (2010) Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*. 15: 8813- 8826.

Georgé S, Brat P, Alter P, Amiot JM. (2005) Rapid determination of polyphénols and vitamin C in plant-derived products. *J Agric Food Chem*. 53: 1370-1373.

Gharzouli K, Khennouf S, Amira S, Gharzouli, A. (1999) Effects of aqueous extracts from Quercus ilex L. root bark, *Punica granatum* L.fruit peel and Artemisia herba-alba Asso leaves on ethanol-induced gastric damage in rats. *Phytother Res.* 13:42-45.

Ghorab H, Laggoune S, Kabouche A, Semra Z, Kabouche Z. Essential oil composition and antibacterial activity of *Artemisia campestris* L. from Khenchela (Algeria). *Scholars Research Library*. 2013, 5 (2):189-192.

Girard A, Madani S, Boukortt 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, Doel JJ, Durgan J, Eisenthal R, Harrison R. (2000) A new route to peroxinitrite: a role for xanthine oxidoreductase. *FEBS Lett.* 475(2): 93-96.

Gordon MH, Paiva-Martins F, Almeida M. (2001): Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *J Agric Food Chem.* 49: 2480-2485.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 86: 494-501.

Gul M, Kutay FZ, Temocin S, Hanninen O. (2000) Cellular and clinical implications of glutathione. *Indian J Exp Biol.* 38: 625-634.

Gülçin l, Topal F, Sarıkaya SBÖ, Bursal E, Bilsel G, Gören AC. (2011) Polyphenol Contents and Antioxidant Properties of Medlar (Mespilus germanica L.). *Rec Nat Prod*. 5(3): 158-175.

Guo JJ, Hsieh HY, Hu CH. (2009) Chain-breaking activity of carotenes in lipid peroxidation: A theoretical study. *J Phys Chem B.* 113: 15699-15708.

Gutierrez J, Ballinger SW, Darley-Usmar VM, Landar A. (2006) Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: the emerging role in signal transduction in vascular cells. *Circ Res*. 99: 924- 932.

Halliwell B, Gutteridge JMC. (1999) Free radicals in biology and medicine. *Oxford University Press.*

Hammami M, Chekir-Ghedira L. (2008) Chemical Composition, Mutagenic and Antimutagenic Activities of Essential Oils from (Tunisian) Artemisia campestris and Artemisia herba-alba. *J Essenl Oil Res*. 20: 471.

Hammond B, Hess ML. (1985) The oxygen free radical system: Potential mediator of myocardial injury. *J Am Col Cardiol*. 6: 215-220.

Handy DE, Loscalzo J. (2012) Redox regulation of mitochondrial function. *Antioxid Redox Signal*. 16(11):1323-67.

Hasan HH, Habib IH, Gonaid MH, Islam M. (2011) Comparative phytochemical and antimicrobial investigation of some plants growing in Al Jabal Al-Akhdar. *J Nat Prod Plant Resour.* 1 (1): 15-23.

He F, Pan Q, Shi Y, Duan CQ. (2008) Chemical Synthesis of Proanthocyanidins *in Vitro* and Their Reactions in Aging Wines. Review. *Molecules.*13: 3007-3032.

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. (2002) Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationship. *J Nutr Biochem*. 13(10). 572-584.

Hendrich AB. (2006) Flavonoid-membrane interactions : possible consequence for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacol Sin*. 27: 27-40.

Hirota A, Kawachi Y, Itoh K, Nakamura Y, Xu X, Banno T. (2005) Ultraviolet A irradiation induces NF-E2-related factor 2 activation in dermal fibroblasts: protective role in UVA-induced apoptosis. *J Invest Dermatol*. 124:825-832.

Huang D, Ou B, Prior RL. (2005) The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J Agric Food Chem*. 53: 1841-1856.

Hung, HC, Joshipura KJ, Jiang R, Hu, FB, Hunter D, Smith-Warner SA, Colditz GA, Rosner B, Spiegelman D, Willett WC. (2004) Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. *J Natl Cancer Inst*. 96: 1577–1584.

Ismail I, Ismail C. (2008). Acute effects of methyl parathion and diazinon as inducers for oxidative stress on certain biomarkers in various tissues of rainbowtrout (Oncorhynchus mykiss). *Pest Biochem Physiol*. 92: 38-42.

Izzo AA, Di Carlo G, Mascolo N, Capasso F. (1994**)** Antiulcer effect of flavonoids: role of endogenous PAF. *Phytother Res.* 8 : 179-181.

Jay D, Hitomi H, Griendling KK. (2006) Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radic Biol Med*. 15: 183-192.

Jing J, Zhang, JL. (2013) Combining myeloperoxidase (MPO) with fluorogenic ZnSalen to detect lysosomal hydrogen peroxide in live cells. *Chem Sci*. 4: 2947–2952.

Joguet N, Maugard T. (2013) Characterization and quantification of phenolic compounds of Argania spinosa L. leaves by HPLC-PDA-ESI-MS analyses and their antioxidant activity. *Chem Nat Compd.* 48: 944-945.

Jokić S, Velić D, Bilić M, Bucić-Kojić A, Plan inić M, Tomas S. (2010) Modelling of the Process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans. *J. Food Sci*. 28: 206-212.

Jollow DJ. (1980) Glutathione thresholds in reactive metabolite toxicity. *Arch Toxicol Suppl.* 3: 95-110.

Kamal-Eldin A, Appelqvist LA. (1996) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids.* 31(7):671-701.

Karamać M. (2007) FE(II), CU(II) and ZN(II) Chelating activity of buckwheat and buckwheat GROATS tannin fractions. *Pol J Food Nutr Sci*. 57(3): 357-362.

Karamać M. (2009) In vitro study on efficacy of tannin fractions of edible nuts as antioxidants. *Eur J Lipid Sci Technol*. 111: 1063-1071.

Katalinic V, Modun D, Music TI, Boban M. (2005) Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2V-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. *Comp Biochem Physiol.* 140: 47-52.

Kelley EE, **Khoo KH**, **Hundley NJ**, **Malik UZ**, **Freeman BA**, **Tarpey M M**. Hydrogen Peroxide is the Major Oxidant Product of Xanthine Oxidase. *Free Radic Biol Med*. 2010 February 15; 48(4): 493–498.

Khoddami A, Wilkes MA, TH. Roberts. (2013) Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*.18: 2328-2375.

Kleinkauf-Rocha J, Bobermin L, Machado M, et al. (2013) Lipoic acid increases glutamate uptake, glutamine synthetase activity and glutathione content in C6 astrocyte cell line. *Int J Dev Neurosci.* 31:165-170.

Ko, FN, Hsiao G, Kuo YH. (1997) Protection of oxidative hemolysis by demethyldiisoeugenol in normal and beta-thalassemic red blood cells. *Free Rad Biol Med.* 22: 215–222.

Kohen R, Nyska A. (2002) Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol Pathol*. 30 (6): 620-650.

Krause DO, Smith WJM, Brooker JD, McSweeney CS. (2005) Tolerance mechanisms of streptococci to hydrolysable and condensed tannins. *Anim Feed Sci Technol.* 121: 59-75.

Kruk J, Szymańska R, Krupinska K. (2008) Tocopherol quinone content of green algae and higher plants revised by a new high-sensitive fluorescence detection method using HPLC – Effects of high light stress and senescence. *J Plant Physiol*. 165 (12): 1238-1247.

Kumar S, Pandey AK. (2013) Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Scientific World Journal*. 2013: 1-16.

Kyselova y, Ivanova D. (2006) correlation between the in vitro antioxydant activity and polyphenol content of aqeueos extracts from Bulgarian herbs. *Phytother Res*. 20: 961-965.

Lago JHG, Toledo-Arruda AC, Mernak M, Barrosa KH, Martins MA, Tibério IFL, Prado CM. (2014) Structure-Activity Association of Flavonoids in Lung Diseases. Review. *Molecules.* 19 : 3570-3595.

Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P. (2007) Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Prog Lipid Res*. 46: 244-282.

Lavie L. (2014) Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia -Revisited - The bad ugly and good: Implications to the heart and brain.. *Sleep Med Rev.* 1-19.

Lee BJ, Huang YC, Chen SJ, Lin PT. (2012) Coenzyme Q10 supplementation reduces oxidative stress and increases antioxidant enzyme activity in patients with coronary artery disease. *Nutrition*. 28:250–255.

Lehucher-Michel MP, Lesgards JF, Delubac O, Stocker P, Durand P, Prost M. (2001) Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*. 30: 1076-1081.

Li WD, Wei CL, White PJ, Beta T. (2007) High-amylose corn exhibits better antioxidant activity than typical and waxy genotypes. *J Agric Food Chem*. 55: 291-298.

Li YH, jiang D, Zhang T, Mu WM, Liu J. (2008) Antioxidant and free radical scavenging activity of chicktea protein hydrolysate(CPH). *Food chem*. 106: 444-450.

Li X, Fang P, Mai J, Choi ET, Wang H, Yang Xf. (2013) Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J Hematol Oncol*. 6: 1-19.

Linderschmidt R, Trylka A, Good M, Witschi H. (1986) The effects of dietary butylated hydroxytoluene on liver and colon tumor development in mice. *Toxicology*. 387: 151-160.

Ljubuncic p, Song H, Cogan U, Azaizeh H, Bomzon A. (2005) The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of *Pistacia lentiscus* in experimental liver disease. *J Ethnopharmacol*. 100 : 198-204.

Lobo V, Patil A, Chandra N. (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 4(8) : 118-126.

Longo L, Scardino A, Vasapollo G. (2007) Identification and quanitification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregrine* L. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 8: 360-364.

Lushchak VI. (2012) Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *J Amino Acids.* 2012 : 1-26.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jime´nez L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*.79:727-747.

Markham KR. (1982) Techniques of flavonoid identification. Academic Press London. pp 133.

Mazza G, Cacace JE, Kay CD. (2004) Methods of analysis for anthocyanins in plants and biological fluids. *J AOAC Int*. 87:129-45.

Menon SG, Goswami, PC. (2007) A redox cycle within the cell cycle : ring in the old with the new. *Oncogene*. 26 :1101-1109.

Meziti A, Meziti H, Boudiaf K, Mustapha B, Bouriche H. (2012) Polyphenolic Profile and Antioxidant Activities of Nigella Sativa Seed Extracts In Vitro and In Vivo. *Waset.* 64: 24-32.

M'hirit O, Benzyane M, Benchakroune F, Yousfi SM, Bendaanoun M. (1998) L'arganier une espèce fruitière- forestière à usage multiple. Margada, (Sprimont) Belgique. 150 p.

Michel JB. (2004) Système rénine-angiotensine et remodelage vasculaire. *Med Sci* . 20: 409-1300.

Michiels JA, Kevers C, Pincemail J, Defraigne JO, Dommes J. (2012) Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chem*. 130(4): 986-993.

Middleton EJ. (1998) Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv ExpMed Biol*. 439: 175-182.

Mishra B, Priyadarsini KI, Kumar MS, Unnikrishnan MK, Mohan H. (2003) Effect of O-Glycosilation on the Antioxidant Activity and Free Radical Reactions of a Plant Flavonoid, Chrysoeriol. *Bioorg Med Chem*. 11: 2677–2685.

Moini H, Packer L, Saris NE. (2002) Antioxydant and prooxydant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol Appl Pharmacol*. 182: 84-90.

Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florencio MH, Jennings KR. (2002) Interactions of flavonoids with iron and copper ions : a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radical Res*. 36: 1199-1208.

Morton LW, Abu-Amsha CR, Puddey IB, Croft KD (2000) Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 27: 152–159.

More D, White J (2005). Encyclopédie des Arbres plus de 1800 Espèces et Variétés du Monde. *Flammarion*. 18-24.

Mosquera OM, Correa YM, Buitrago DC, Niö J. (2007). Antioxidant activity of twenty five plants from Colombian biodiversity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 102: 631-634.

Moure A, Cruz Y, Franco D, Domingues J, Sineiro Y. (2001) Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.* 72:145-171.

Msanda F. (2005) Ecologie et cartographie des groupements végétaux d'Anzi (Anti-Atlas Occidental, Marco) et contribution à l'étude de la génétique de l'Arganier. Thèse de Doctorat, Univérsité Joseph Fourier, Grenoble.

Mukinda JT, Syce JA. (2007). Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. *J Ethnopharmacol*. 112: 138-144.

Nahida SH, Ansari A, Siddiqui N. (2012) *Pistacia lentiscus*: A review on phytochemistry and pharmacological properties. *Int J PharmPharm Sci*.4(4) :16 -20.

Nancy J, Linford SI, Chriner E, Peter S, Rabinovitch I. (2006) Oxidative damage and aging. Spotlight on mitochondria. *Cancer Res*. 66: 2497-2499.

Niki E. (1990) Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxyl radicals. *Methods Enzymol*. 186: 100-108.

Niki L, Reynaert SW, Aesif T, McGovern , Amy B, Emiel FM, Wouters C, Irvin Yvonne MW, Janseen H. (2007) Catalase overexpression fails to attenuate allergic airways disease in the mouce . *J Immunol*. 178 : 3814-3821.

Nouaim R, Chaussod R, El Aboudi A, Shnabel C, Peltier JP. (1991) L'arganier essai de synthèse des connaissances sur cet arbre .Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides. Groupe d'étude de l'arbre, Paris, France. 373-388 pp.

Noori S. (2012) An Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System. Noori, S. (2012). *scientific reports*. 1: 413.

Nowak R, Gawlik-Dziki U. (2007) Polyphenols of Rosa L. leaves extracts and their radical scavenging activity. *Z. Naturforsch*. 62: 32-38.

Okhawa H, Ohishi N, Yagi K, (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Chem*. 95: 351–358.

Ollila F, Halling K, Vuorela P, Vuorela H, Slotte JP. (2002) Characterization of flavonoid-biomembrane interactions. *Arch Biochem Biophys*. 399: 103-108.

Ozsoy N, Can A, Yanardag R, Akev N. (2008) Antioxidant activity of Smilax excelsa L. leaf extracts. *Food Chem*. 110: 571-583.

Packer et al (1995). alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. Free Radical Biology and Medicine. 19: 227-250.

Packer L, Tritschler H, Wessel K (1997) Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med*. 22:359-378.

Pannala AS, Chan TS, O'Brien PJ, Rice-Evans CA. (2001) Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochem Biophys*. *Res Commun*. 282: 1161-1168.

Paradkar PN, Blum PS, Berhow MA, Bauman H, Kuo SM. (2004) Dietary isoflavones suppress endotoxin-induced inflammatory reaction in liver and intestine. *Cancer Lett*. 215: 21-8.

Peltierj P. (1982) La végétation du bassin versant de l'oued Sous (Maroc). Thèse de doctorat d'état, univ.sci.Grenoble, 201p.

Perron NR, Brumaghim JL. (2009) A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys*. 53: 75-100.

Peterson JJ, Beecherb GR, , Bhagwatc SA, Dwyera JT, Gebhardtc SE,. Haytowitzc DB, Holdenc JM. (2006) Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *J Food Comp Anal*. 19: 74–80.

Psotova J, Kolar M, Sousek J, Švagera Z, Vicar J, Ulrichova J. (2003) Biological activities of *Prunella vulgaris* extract. *Phytother Res.* 17: 1082-1087.

Quinn MT, Schepetkin IA. (2009) Role of NADPH Oxidase in Formation and Function of Multinucleated Giant Cells. *J Innate Immun*.1: 509–526.

Raza M, Al-Shabanah OA, El-Hadiyah TM, Al-Majed AA. (2002) Effects of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. *Sci Pharm*. 70: 135-145.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolourisation assay. *Free Radic Biol Med*. 26: 1231-1237.

Reis A, Spickett, CM. (2012) Chemistry of phospholipid oxidation. *Biochim. Biophys Acta*. 1818: 2374–2387.

Rezaeizadeh A, Zuki ABZ, Abdollahi M, Goh YM, Noordin MM, Hamid M and Azmi TI. (2011) Determination of antioxidant activity in methanolic and chloroformic extracts of Momordica charantia. *Afr J Biotechnol*. 10(24): 4932-4940.

Rey FE, Pagano PJ. (2002) The reactive adventitia: fibroblast oxidase **in** vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 22: 1962-1971.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci*. 2: 152-159.

Rice-Evans, CA, Miller NJ, Paganga G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*. 20: 933-956.

Rietjens IMC, Boersma, MG, de Haan L, Spenkelink B, Awad HM, Cnubben NHP, van Zanden JJ, van der Woude H, Alink GM, Koeman JH. (2002) The pro oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environ Toxicol Pharmacol*. 11: 321-333.

Robards K. (2003) Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *J Chromatogr A*. 1000: 657-691.

Rochette L, Ghibu S, Richard C. (2013) Direct and indirect antioxidant properties of α-lipoic acid and therapeutic potential. *Mol Nutr Food Res.* 57:114-125.

Rolland Y. (2004) Antioxydants naturels végétaux. *OCL*. 11: 419-424.

Romani A, Pinelli P, Cantini C, Cimato A, Heimler D. (2006) Characterization of Violetto di Toscana, a typical Italian variety of artichoke (Cynara scolymus L.). *J Food Chem*. 95: 221-225.

Romani A, Pinelli P, Galardi C, Mulinacci N, Tattini M. (2002) Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of Pistacia lentiscus L. *Phytochem Anal*. 13(2):79-86.

Rotelli AE, Guardia T, Jua´rez AO, de la Rocha NE. (2003) Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacol Res*. 48: 601-606.

Rucinska A, Kirko S, Gabryelak T. (2007) Effect of the phytoestrogen, genistein-8-C-glucoside,on Chinese hamster ovary cells in vitro. *Cell Biol Int*.

Sakanaka S, Tachibana Y, and Okada, Y. (2005) Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chem.* 89: 569-575.

Saoudi M, Allagui MS, Abdelmouleh A, Jamoussi J, ElFeki A. (2010) Protective effects of aqueous extract of Artemisia campestris against puffer fish Lagocephalus lagocephalus extract-induced oxidative damage in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 62: 601–605.

Sacca` SC, Roszkowska MA, Izzotti A. (2013) Environmental light and endogenous antioxidants as the main determinants of non cancer ocular diseases. *Mutation Research*. Review. 752: 153-171.

Sacks FM, Lichtenstein A, Van Horn L, Harris W, Kris-Etherton P, Winston M. (2006) Science Advisory for Professionals From the Nutrition Committee Soy Protein, Isoflavones, and Cardiovascular Health: An American Heart Association**.** *Circulation.* 2006;113:1034-1044.

Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H. (2002) Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*. 177: 67-80.

Saleem M, Kim HJ, Ali MS, Lee YS. (2005) An update on bioactive plant lignans. *Nat Prod Rep*. 22: 696-716.

Salido S, Valenzuela LR, Altarejos J, Nogueras M, Sanchez A, Cano E. (2004) Composition and infraspecific variability of Artemisia herba alba from southern Spain. *Bioch Syst Ecol*. 32: 265-277.

Sánchez-Reus MI, Gómez del Rio MA, Iglesias I, Elorza M, Slowing K, Benedí J. (2007) Standardized *Hypericum perforatum* reduces oxidative stress and increases gene expression of antioxidant enzymes on rotenone-exposed rats. *Neuropharmacol*. 52: 606-516.

Sandhar HK, Kumar B , Prasher S, Tiwari P, Salhan M and Sharma P. (2011). A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *IPS.* 1 (1) : 25-41.

Sathiyanarayanan L, Paradkar AR, Mahadik KR. (2010) In vivo and in vitro antioxidant activity of lipid based extract of *Bacopa monniera* Linn. compared to conventional extract and traditional preparation. *EuJIM.* 2 : 93–101.

Scalbert A, Manach C, Morand C. (2005) Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 45:287–306.

Schwedhelm E, Maas R, Troost R, Boger RH. (2003) Clinical pharmacokinetics of antioxidants and their impact on systemic oxidative stress. *Clin Pharmacokinet*. 42: 437-59.

Sefi M, Fetoui H, Makni M, Zeghal N. (2010) Mitigating effects of antioxidant properties of Artemisia campestris leaf extract on hyperlipidemia, advanced glycation end products and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol*. 48: 1986-1993.

Sefi M, Bouaziz H, Soudani N, Boudawara T, Zeghal N. (2011) Fenthion induced-oxidative stress in the liver of adult rats and their progeny: Alleviation by Artemisia campestris. *Pest Biochem Physiol*. 101 (2011) 71-79.

Serbinova EA, Pacher L. *(1994) Antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. Methods Enzymol. 234 : 354-366.*

Shah D, Sah S, Nath SK . (2013) Interaction between glutathione and apoptosis in systemic lupus erythematosus . *Autoimmunity Reviews* 12: 741–751.

Shiva Shankar Reddy CS, Subramanyam MV, Vani R, Asha Devi S. (2007) In vitro models of oxidative stress in rat erythrocytes: effect of antioxidant supplements. *Toxicol In Vitro*. 21: 1355–1364.

Sintayehu B, Asres K, Raghavendra Y. (2012) Radical scavenging activities of the leaf extracts and a flavonoid glycoside isolated from *Cineraria abyssinica* Sch. Bip. Exa. Rich. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 02 (04): 44-49.

Sultana B, Anwar F, Ashraf M. (2009) Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*. 14: 2167-2180.

SUN T, HO CT. (2005) Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chem*. 90: 743-749.

Tahrouch S, Andary C, Rapior S, Mondolot L, Gargadennnec A, Fruchier A. (2000) Polyphenol investigation of Argani spinosa (Sapotaceae) endemic tree from Morocco. *Acta Bot Gallica*. 147: 225-232.

Tapas AR, Sakarkar DM, Kakde RB. (2008) Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Trop J Pharm Res*. 7 (3): 1089-1099.

Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Byrne DH. (2006) Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Comp Anal*. 19: 669-675.

Thomas C, Mackey MM, Diaz AA, Cox DP. (2009) Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation. *Redox Report* .14: 102-108.

Tim Cushnie TPT, Adrew JL. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *INT J ANDROL*. 26: 343-356.

Tomas-Barberan FA, Clifford MN. (2000) Dietary hydroxybenzoic acid derivatives and their possible role in health protection. *J Sci Food Agric*. 80: 1024-32.

Tsao R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*. 2: 2072-6643.

Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin MTD , Mazura M, Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Review. *Int J Biochem Cell B.* 39: 44–84.

Valente MJ, Baltazar AF, 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 Chem Toxicol*. 49: 86–92.

Van Acker SA, Van Den Berg DJ, Tromp MNL, Griffioen DH, Bennenkom WPV, Van Der, Vijgh WJF, Bast A. (1996) Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biol Med*. 20: 331-342.

Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. (2004) Modulation of Oxidant **and** Antioxidant Enzyme Expression **and** Function in Vascular Cells. *Hypertension.* 44: 1-381.

Weydert CJ, Cullen JJ. (2010) Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Biochem prot analy Pharmacol toxicol*. 5: 51 - 66.

Wong SP, Leong LP, William Koh JH. (2006) Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chem*. 99: 775-783.

Wu SJ, Ng LT. (2008) Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (Momordica charantia Linn. var. abbreviata Ser.) in Taiwan. *Lebensm Wiss Technol.* 41: 323-330.

Wu J, Hecker J G, Chiamvimonvat N. (2009) Antioxidant enzyme gene transfer for ischemic diseases. *Adv Drug Deliv Rev*. 61: 351–363.

Xiao WH, Han LJ, Shi B. (2008) Microwave-assisted extraction of flavonoids from Radix Astragali. *Separat Purif Technol*. 62: 614-618.

Yamamoto S. (1992) Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. *Biochim Biophys Acta*. 1128: 117-131.

Yusuf K, Meltem U, Ayse O, Fatma A, Suna, K. (2006) Effects of diazinon on pseudocholinesterase activity and haematological indices in rats: The protective role of Vitamin E. *Environ Toxicol Pharmacol*. 22: 46-51.

Zhang J, Yuan K, Zhou WL, Zhou J, Yang P. (2011) Studies on the active components and antioxidant activities of the extracts of Mimosa pudica Linn. from southern China. *Pharmacogn Mag*. 7(25): 35–39.

Zhou B, Jia ZS, Chen, ZH, Yang L, Wu LM, Liu ZL. (2000) Synergistic antioxidant effect of green tea polyphenols with a-tocopherol on free radical initiated peroxidation of linoleic acid in micelles. *J Chem Soc Perkin Trans*. 2: 785- 791.

Zhou B, Wu LM, Yang L, Liu ZL. (2005) Evidence for alpha-tocopherol regeneration reaction of green tea polyphenols in SDS micelles. *Free Radic Biol Med.* 38: 78-84.