وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

كليـــة علـــوم الطبيعـــة والحيـــاة

قســـم بيولوجيـــا الحيـــوان

رقم الترتيب:

رقم التسلسل:

رسالة

قدمت لنيل شهادة الدكتوراه في العلوم البيولوجية

تخصص علم السموم الخلوي

تحت عنوان

دراسة تأثير بعض مستخلصات نبات *Globularia alypum* L. على سلالات خلوية ورمية بشرية IN VITRO وإمكانية استعمالها في الوقاية من السمية القلبية الناتجة عن مضاد السرطان Doxorubicin

إعداد: قـــارة علي وهيبـــة

تاريخ المناقشة: 30 ديسمبر 2009

أمام لجنة المناقشة

د. خليفي تهامي فاطمة	رئيسة	أستاذة محاضرة	جامعة منتوري-قسنطينة
د. عبيدلي نصيرة	مقررة	أستاذة محاضرة	جامعة منتوري-قسنطينة
د. لحول مصباح	ممتحن	أستاذ محاضر	جامعة جيجل
د. بولبدة ناجي	ممتحن	أستاذ محاضر	جامعة منتوري قسنطينة

السنة الجامعية: 2009-2010

شكر وتقدير

الحمد والشكر لله أولا وأخرا, فهو الذي نعمه لا تعد, وفضله لا يحصى, وهو الذي بتفضله وكرمه أعان على إتمام هذا الجهد, ويسره, فله الحمد الدائم والشكر الأبدي.

وان من تمام شكر الله تعالى أن أشكر كل من أسدى إلي نصحا مفيدا, أو رأيا صائبا, وقد قال رسول الله صلى الله عليه وسلم: **«لا يشكر الله من لا يشكر الناس»**, وأخص بذلك كلا من:

الأستاذة الغالية, الدكتورة "**عبيدلي نصيرة**" – رئيسة اللجنة البيداغوجية لهذا الماجستير– التي أتاحت لنا الفرصة بفتح هذا التخصص وكشفه وكذا المشرفة على هذا العمل, عرفانا لها بتشجيعها, دعمها الفعال وحرصها على سير هذا البحث وإنهائه.

الأستاذة المحترمة, الدكتورة "**خليفي توهامي فاطمة**" على دعمها لفتح هذا التخصص وعلى تشريفها لي بقبولها رئاسة لجنة المناقشة.

الأستاذ المحترم, الدكتور "**لحول مصباح**" من جامعة جيجل والأستاذ المحترم الدكتور "**بولبدة ناجي**" من كلية الصيدلة بالمستشفى الجامعي بقسنطينة لقبولهما مناقشة هذه الرسالة.

شكر خاص لكل من الأستاذ " **دهيمات العيد**" عميد كلية علوم الطبيعة والحياة وكذا الأستاذ

" **لعلاوي قريشي**" رئيس قسم بيولوجيا الحيوان على كل التسهيلات المقدمة لانجاز الجزء العملي.

كما أتقدم بالشكر إلى:

الأستاذة الدكتورة " **كعبوش زهية**" أستاذة بقسم الكيمياء بجامعة منتوري قسنطينة على استقبالها لنا بمخبرها L.O.S.T وكل المساعدات المقدمة في الجزء الفيتوكيميائي من هذه الرسالة بفضلها وفضل كل أعضاء المخبر وأخص بالذكر **أسيا, نجوى, نعيمة و فيروز.**

الأستاذة الدكتورة "**بن لطرش شريفة**" مسؤولة مخبر الكيمياء الحيوية بالمستشفى الجامعي ابن باديس بقسنطينة على المساعدات المقدمة في انجاز مختلف المعايرات البيوكيميائية.

الأستاذة الدكتورة "**خلف الله نظيرة**" أستاذة بكلية علوم الطبيعة والحياة على استقبالها لنا بمخبرها ومساعداتها لنا في انجاز الصور الميكروسكوبية.

السيد "**يخلف محمد**" رئيس مصلحة التشريح المرضي وعلم الأنسجة بالمستشفى الجامعي ابن باديس بقسنطينة على مساعدته لإتمام الدراسة النسيجية.

إلى كل الزميلات والزملاء, أعبر عن تشكراتي لهم على مساعداتهم وتشجيعاتهم أثناء تحضير هذه الرسالة.

وفي الختام أتقدم بالشكر إلى كل من ساهم من قريب أو من بعيد وأسدى لي المساعدة من بداية هذا البحث إلى نهايته.

شكرا لكم جميعا وجزاكم الله خيرا.

الإهداء

اللهم أسألك أن تجعل عملي هذا خالصا لوجهك الكريم وأن تجعل

جزاءه ثوابا لأمي وأبي – حفظهما الله تعالى–

« رب ارحمهما كما ربياني صغيرا»

وأهدي ثمرة جهدي هذا إلى:

أخواتي الغاليتان نادية ومنيرة

أخوتي الأعزاء رفيق و فريد

كل من يحمل لقب قارة علي ولزعر

جميع أفراد دفعتي دون استثناء

وإلى كل من علمني حرفا

الفهـــــرس

مقدمـــــة.....1

استعـــــراض المراجـــــع

I. الجــذور الحــرة, الإجهــاد التأكســدي ومضــادات الأكســدة.....4

مدخل.....4

1. المجاميع الأكسوجينية النشطة.....5

1.1. تعريف.....5

2.1. تشكيل المجاميع الأكسوجينية النشطة.....6

3.1. مصادر المجاميع الأكسوجينية النشطة.....9

1.3.1. المصادر الخارجية.....9

2.3.1. المصادر الداخلية.....10

4.1. الدور الفيزيولوجي للمجاميع الأكسوجينية النشطة.....12

2. الإجهاد التأكسدي.....13

1.2. تعريف.....13

2.2. التأثيرات البيوكيميائية للإجهاد التأكسدي.....13

1.2.2. فوق الأكسدة الليبيدية.....13

2.2.2. أكسدة البروتينات.....16

3.2.2. أكسدة ADN.....18

3.2. الأمراض الناتجة عن الإجهاد التأكسدي.....19

3. مضادات الأكسدة.....20

1.3. تعريف.....20

2.3. مضادات الأكسدة الداخلية.....21
1.2.3. مضادات الأكسدة الإنزيمية.....21
2.2.3. مضادات الأكسدة الغير إنزيمية.....23
3.3. مضادات الأكسدة الخارجية.....26
II. مـــرض السرطـــان.....30
1. تعريف المرض.....30
2. العوامل المسببة للسرطان.....31
1.2. الإجهاد التأكسدي سبب لظهور السرطان.....31
2.2. العوامل المسممة للمورثات- Génotoxic Agents-.....32
1.2.2. المواد المسرطنة الكيميائية.....32
2.2.2. المواد المسرطنة الفيزيائية.....33
3.2. العدوى الفيروسية.....33
4.2. الخلل الهرموني.....34
5.2. التغيرات الوراثية.....34
3. الآلية الوراثية لتشكل السرطان.....34
4. تشخيص السرطان.....35
5. علاج السرطان.....35
1.5. العلاج الكيميائي- Chemotherapy-.....36
2.5. العلاج الإشعاعي- Radiotherapy-.....36
3.5. العلاج الجراحي- Surgery-.....36
6. مضادات السرطان وسميتها.....36
1.6. تعريف مضادات السرطان.....36

2.6. أنواع مضادات السرطان.....37
1.2.6. مضادات المستقلبات.....37
2.2.6. العوامل المؤثرة على مستوى DNA 37
3.2.6. مركبات مؤثرة على الوظائف الخلوية.....38
3.6. سمية مضادات السرطان.....38
1.3.6. التأثيرات الغير نوعية الأساسية.....38
2.3.6. التأثيرات النوعية.....39
III. Doxorubicin والسميـــة القلبيـــة.....40
1. Doxorubicin (DOXO).....40
1.1. تعريفه وبنيته الكيميائية.....40
2.1. الحركية الصيدلانية لـــ Doxo.....41
1.2.1. امتصاص وتوزيع Doxo.....41
2.2.1. التحول الحيوي لـــ Doxo و طرحه.....41
3.1. آلية تأثير Doxo.....42
1.3.1. التداخل مع القواعد الآزوتية لـــ ADN.....43
2.3.1. تثبيط إنزيم Topoisomérase II.....43
3.3.1. تثبيط إنزيم Helicase.....43
2. آلية السمية القلبية لـــ Doxo.....44
1.2. الجذور الحرة والسمية القلبية لـــ Doxo.....44
1.1.2. المسار الإنزيمي.....45
2.1.2. المسار المعتمد على أيونات الحديد.....46
2.2. الآلية المعتمدة على ارتفاع أيونات الكالسيوم..... 47

3.2. التغير في التعبير عن مورثات خلايا العضلة القلبية.....47
4.2. تحريض الموت الخلوي المبرمج 47
VI. الفلافونويـدات.....49
مدخل.....49
1. البنية الكيميائية للفلافونويدات وأقسامها.....50
2. الاصطناع الحيوي للفلافونويدات.....52
1.2 . الاصطناع الحيوي للهيكل القاعدي" C6-C3-C6".....52
1.1.2 . طريق الخلات.....52
2.1.2. طريق الشيكيميك.....53
2.2. الاصطناع الحيوي لمختلف هياكل الفلافونويدات – طريق الشالكون-.....54
3. تثبيت المجموعات الاستبدالية على الهيكل الفلافونويدي.....56
1.3. تثبيت مجموعة الهيدروكسيل.....56
2.3. تثبيت مجموعة الميثيل.....56
3.3. تثبيت السكريات.....57
4. الفعاليـــة البيولوجية للفلافونويدات.....59
1.4. التأثير المضاد للسرطان.....59
2.4. التأثير المضاد للحساسية.....59
3.4.التأثير المضاد للالتهاب.....60
4.4. النشاط المضاد للفيروسات والبكتيريا.....60
5. الفلافونويدات, الجذور الحرة والنشاط المضاد للأكسدة.....61
1.5. العلاقة بين بنية الفلافونويد والنشاط المضاد للأكسدة.....61
2.5. آلية الفلافونويدات المضادة للأكسدة.....62
1.2.5. اقتناص الجذور الحرة.....62

2.2.5. حجز الأيونات المعدنية.....63
3.2.5. تثبيط الأنزيمات.....64
6. الفعل البادئ للأكسدة للفلافونويدات.....65
7. امتصاص, ميتابوليزم وطرح الفلافونويدات.....67
V. نبـــات *Globularia alypum* L......68
مدخل.....68
1. وصف نبات *Globularia alypum* L. وتوزيعه الجغرافي.....68
2. الوضع ضمن التصنيف النباتي.....70
3. تركيبتها الكيميائية.....70
4. استعمالاتها في الطب الشعبي ونشاطتها البيولوجية.....73
مـــــــواد و طـــــــرق العمـــــــل.....74
أولا . المـــادة النباتيـــة والدراســـة الفيتوكيميائيـــة.....74
I. المـــادة النباتيـــة.....74
1. جمع المادة النباتية.....74
2. طريقة تحضير المستخلص النباتي.....74
II. الدراســـة الفيتوكيميائيـــة للمستخلـــص.....77
1. اختبار الكشف عن الفلافونويدات.....77
1.1. الاختبار الأول.....77
2.1. الاختبار الثاني.....77
2. معايرة متعددات الفينول.....77
3. معايرة الفلافونويدات.....79
4. الدراسة الكروماتوغرافية للمستخلص البيتانولي.....81

1.4. كروماتوغرافيا الورق.....81
2.4.كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة 82
3.4. دراسة السلوك الكروماتوغرافي.....84
1.3.4.اللون الاستشعاعي.....84
2.3.4. ثابت الانحباس – RF-.....86
5. مطيافية امتصاص الأشعة الفوق بنفسجية.....87
1.5. طيف الامتصاص في الوسط الميثانولي المتعادل.....87
III. تقديـــر النشـــاط الآســـر للجـــذور الحـــرة (اختبـــار °DPPH).....88
ثانيا. دراســـة تأثيـــر المستخلص البيتانولـــي لنبـــات *Globularia alypum* على الس[illegible] ل- Doxorubicin.....90
I. الحيوانـــات التجريبيـــة.....90
1. تربية الحيوانات.....90
2. معاملة الحيوانات.....90
3. سحب العينات الدموية وتحضير العينات البيولوجية.....91
II. تقديـــر المؤشـــرات البيوكيميائيـــة للتسمـــم القلبـــي في البلازمـــا.....91
1. تقدير نشاط CPK.....91
2. تقدير نشاط LDH.....92
3. تقدير نشاط TGO -AST –.....92
III. تقديـــر الإجهـــاد التأكســـدي في المجنس القلبـــي.....92
1. معايرة MDA السيتوزولي للقلب.....92
2. معايرة الجلوتاتيون (GSH) السيتوزولي للقلب.....94
IV. الدراسة النسيجية لتأثير المستخلص البيتانولي على نسيج القلب.....95

1. تحضير المقاطع النسيجية.....95
2. تصوير المقاطع النسيجية.....95
ثالثا. دراسة تأثير المستخلص المائي لنبات *Globularia alypum* على سلالات خلوية ورمية في المخبر - IN VITRO -.....96
I. تحضير المستخلص المائي لنبات *Globularia alypum*.....96
II. النشاط المضاد للأورام للمستخلص المائي لنبات *Globularia alypum*.....97
1. استنبات الخلايا – Cell Culture-.....97
2. اختبار التضاعف الخلوي – Cell Viability Assay-.....98
رابعا.الدراسة الإحصائية.....99
النتائج والتعليق.....100
أولا . الاستخلاص والدراسة الفيتوكيميائية.....100
I . الاستخلاص.....100
II. الدراسة الفيتوكيميائية للمستخلص.....100
1. اختبار الكشف عن الفلافونويدات.....100
2. معايرة متعدد الفينول.....101
3. معايرة الفلافونويدات.....102
4. نتائج الدراسة الكروماتوغرافية.....104
1.4. كروماتوغرافيا الورق.....104
2.4. كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة.....105
5. طيف امتصاص الأشعة الفوق بنفسجية.....108

III. تقديـــر النشـــاط الآســـر للجـــذور الحـــرة (اختبار°DPPH).....109

ثانيا. نتائـــج دراســـة تأثيـــر المستخلص البيتانولـــي لنبـــات *Globularia alypum* على السميـــة القلبيـــة لـــ Doxorubicin.....114

I. نتائج دراسة المؤشرات البيوكيميائية للتسمم القلبي في البلازما.....114

1. نشاط CPK في البلازما.....114

2. نشاط LDH في البلازما.....116

3. نشاط AST في البلازما.....118

II. تقديـــر مؤشرات الإجهـــاد التأكســـدي في المجنـــس القلبـــي.....120

1. معايرة MDA السيتوزولي للقلب.....120

2. معايرة GSH لمخلص ئ يقي ب.....122

III. نتائج الدراسة النسيجية لتأثير المستخلص البيتانولي على نسيج القلب 124

ثالثا. دراسة تأثير المستخلص المائي لنبات *Globularia alypum* على سلالات خلوية ورمية في المخبر IN VITRO.....133

المناقشـــــة.....136

الاستنتـــــاج.....156

التوصيـــــات.....159

المراجـــــع.....160

الملخصـــــات

Abréviations - المختصـــــــرات

$ABTS^{\cdot+}$	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
Ac.Ac	Acétylacétone
ADP	Adenosine diphosphate
AST	Aspartate transaminase
ATP	Adenosine triphosphate
BAW	Butanol-Acetic acid- Water
CAT	Catalase
CHS	Chalcone Synthase
CPK	Creatinine Phosphokinase
CR	Carbonyl Reductase
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonucleic acid
DNPH	Dinitrophenylhydrazine
DOXO	Doxorubicin
DPPH°	1, 1-diphenyl-2- dipicrylhydrazyl
DTNB	5, 5'-dithiobis 2-nitrobenzoic acid
EBV	Epstein-Barr virus
EQ	Quercetin Equivalent
FAD	Flavine-adénine dinucléotide
FBS	fetal bovine serum
FL-O°	Flavonoxy
GAE	Gallic Acid Equivalent
GPx	Glutathione Peroxidase
G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase

GR	Glutathione Reductase
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione disulfide
GST	Glutathione transferase
HBV	Hepatitis B virus
HClO	Hypochlorous acid
HCT-116	Colon carcinoma cells
HCV	Hepatitis C virus
H&E	Hematoxylin and eosin
Hep G2	Human hepatocarcinoma cell line
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HK	Hexokinase
HNE	4-Hydroxy-2-nonenol
H_2O_2	Hydrogen peroxide
IL2	Interleukin-2
L°	Alkyl radical
LD50	Lethal dose of 50%
LDL	Low-density lipoproteins
LDH	Lactate dehydrogenase
LH	Polyunsaturated fatty acid
LO°	Alkoxyl radical
LOO°	Peroxyl radical
LOOH	Organic Hydroperoxide
MDA	Malondialdehyde
MEC	Méthyléthylcétone
ME (OH)	Methanol
MIC	Minimum growth Inhibitory Concentration

MPO	Myeloperoxidase
MTT	3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NADH	Reduced nicotinamide dinucleotide
NADPH	Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate
NO°	Nitric oxide radical
NOS	Nitric oxide synthase
$O_2^{\circ-}$	Superoxide ion radical
$^1O_2$	Singlet oxygen
OH°	Hydroxyl radical
$ONOO^-$	Peroxynitrite
PC	Paper Chromatography
PH	Hydrogen ion concentration
Redox	Reduction-Oxidation
RF	Frontal rate
RNA	Ribonucleic acid
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
SH	Sulfhydril
SOD	Superoxyde dismutase
TBA	Thiobarbituric acid
TCA	Trichloroacetic acid
TEP	Tetraetoxypropane
TGO	Glutamic-oxaloacetic transaminase
TLC	Thin Layer Chromatography
TNF	Tumor Necrosis factor
TOH	Tocopherol

Txn	Thiorédoxin
UDP-glu	Uridine diphosphate glucose
UV	Ultraviolet radiation
Vit C	Vitamin C
Vit E	Vitamin E
XO	Xanthine oxidase

قائمـــــــة الأشكـــــال

الشكل 1. تشكيل ROS باكتساب الأكسجين المتتابع للإلكترون.....6

الشكل 2. تشكيل مختلف المجاميع الأكسوجينية النشطة.....9

الشكل 3. تشكل ROS بتأين الماء بالإشعاعات المؤينة في وجود وغياب O2.....10

الشكل 4. مختلف مراحل فوق الأكسدة الليبيدية.....15

الشكل 5. تسلسل تفاعلات فوق الأكسدة الليبيدية.....16

الشكل 6. بعض تغيرات السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية بعد هجومات الجذور الحرة.....18

الشكل 7. بعض القواعد الأزوتية المؤكسدة بالجذور الحرة.....19

الشكل 8. الأضرار التأكسدية الناتجة عن أكسدة الجذور الحرة للمادة الوراثية للخلية.....19

الشكل 9. البنية الكيميائية للجلوتاتيون المرجع والمؤكسد.....24

الشكل 10. النظام الرودوكسي للجلوتاتيون.....25

الشكل 11. أكسدة واسترجاع Thiorédoxin.....26

الشكل 12. البنية الكيميائية للفيتامين E.....26

الشكل 13. إعادة تشكيل Alpha-Tocophérol من جذر Alpha- Tocophéroxyl.....27

الشكل 14. مخطط يلخص مسارات تشكل ROS ونشاط مختلف مضادات الأكسدة في أسرها والتقاطها.....29

الشكل 15. مختلف مراحل تشكل السرطان.....30

الشكل 16. أكسدة قاعدة guanine بجذر الهيدروكسيل °OH.....31

الشكل 17. تفاعل MDA مع القواعد الأزوتية لـــ ADN.....32

الشكل 18. البنية الكيميائية لـــ DOXO.....40

الشكل 19. التحول الحيوي لـــ DOXO.....42

الشكل 20. المسار الإنزيمي لتشكيل الجذور الحرة ابتداء من DOXO.....46

الشكل 21. الهيكل القاعدي للفلافونويدات.....50

الشكل 22 . تشكيل Malonyl-CoA انطلاقا من Acétyl- CoA ،CO2.....53

الشكل 23. تحول حمض p-coumaric إلى p-coumaroyl CoA.....53

الشكل 24. تشكيل نواة الشالكون.....54

الشكل 25. الاصطناع الحيوي لمختلف هياكل الفلافونويدات انطلاقا من الشالكون.....55

الشكل 26. التحول الإنزيمي لـــ Lutéolin إلى Chrysoériol.....57

الشكل 27. تثبيت الجلوكوز على هيكل quercetin.....58

الشكل 28. المواقع الفعالة في النشاط المضاد للأكسدة للفلافونويدات.....61

الشكل 29. مخطط يوضح اقتناص الفلافونويدات للجذور الحرة.....63

شكل 30. أهم المواقع النشطة في التقاط الأيونات المعدنية.....64

الشكل 31. الآلية مقترحة من طرف Hester van der Woude et al حول العلاقة بين الأشكال النشطة للكرستين ونشاطها البادئ للأكسدة.....66

الشكل 32. صور فوتوغرافية لنبات *Globularia alypum*.....69

الشكل 33. الصيغ الكيميائية لبعض المركبات المعزولة من نوع *Globularia alypum* 72

شكل 34. مراحل استخلاص الفلافونويدات من نبات *Globularia alypum*.....76

الشكل 35. المنحنى القياسي لحمض القاليك -Gallic acid.....78

الشكل 36 . المعقدات المشكلة بين الفلافونويد و الألمنيوم Al^{3+} 79

الشكل 37. المنحنى القياسي لفلافونويد Quercetin.....80

الشكل 38. ترافق مجموعة الكربونيل مع الحلقتين البنزينيتين A و B.....88

الشكل 39. الصيغة الكيميائية الجذرية والمرجعة لـــ DPPH°.....89

الشكل 40. الصيغة الكيميائية لـــ MDA (Malondialdehyde).....93

الشكل 41. تفاعل GSH مع كاشف Ellman.....94

الشكل 42. مراحل تحضير المستخلص المائي لنبات *Globularia alypum* 96

الشكل43. كروماتوغرام الورق أحادي البعد للمستخلص البيتانولي لنبتة *Globularia alypum*.....104

الشكل 44. الخريطة الكروماتوغرافية ثنائية البعد للمستخلص البيتانولي لنبتة *Globularia alypum* 106

الشكل 45. طيف امتصاص الأشعة الفوق بنفسجية للمستخلص البيتانولي لنبتة *Globularia alypum*.....108

الشكل 46. مقارنة الفعل الأسر لجذر DPPH° لكل من المستخلص البيتانولي و الكرستين عند تراكيز كتلية مختلفة.....111

الشكل47. النسبة المئوية لإرجاع المستخلص البيتانولي لجذر DPPH° بدلالة التركيز.....112

الشكل 48. تأثير مختلف المعاملات على نشاط إنزيم CPK في البلازما.....115

الشكل 49. تأثير مختلف المعاملات على نشاط إنزيم LDH في البلازما.....117

الشكل 50. تأثير مختلف المعاملات على نشاط إنزيم AST في البلازما.....119

الشكل 51. تأثير مختلف المعاملات على معدل MDA السيتوزولي للقلب.....121

الشكل 52. تأثير مختلف المعاملات على معدل GSH السيتوزولي للقلب.....123

الشكل 53. منحنى يوضح النسبة المئوية للخلايا الورمية Hep-G2, HCT-116 و خلايا 1301 الحية بدلالة تراكيز مختلفة للمستخلص المائي لنبات *Globularia alypum*.....134

الشكل 54. مخطط يلخص آلية السمية القلبية لـــ Doxo ومختلف تأثيراته.....153

الشكل 55. آلية مقترحة لتأثير فلافونويدات *Globularia alypum* في الحماية ضد السمية القلبية لـــ DOXO.....154

الشكل 56. آلية مقترحة لتثبيط المستخلص المائي لنبتة *Globularia alypum* تضاعف كل من السلالات الخلوية الورمية البشرية Hep-G2 و HCT-11.....155

قائمـــــــة الجـــــــداول

جدول 1. أهم المجاميع الأكسوجينية النشطة.....5

جدول 2. تصنيف نبات *Globularia alypum*.....70

جدول 3.المركبات الكيميائية المعزولة من نوع *Globularia Alypum*.....71

جدول 4. العلاقة بين لون المركب تحت الأشعة الفوق بنفسجية - UV- وبنيته الكيميائية.....85

الجدول 5. العلاقة بين ثابت الانحباس – RF – وبنية الفلافونويد.....86

الجدول 6. أهم الانزياحات الملاحظة للعصابتين I و II في الميثانول.....88

جدول7. المردود (النسبة المؤوية) لمستخلصات الجزء الهوائي لنبات *Globularia alypum*.....100

جدول 8. تركيز متعدد الفينول في المستخلص البيتانولي *Globularia alypum*.....102

جدول 9. تركيز الفلافونويدات في المستخلص البيتانولي لـــ *Globularia alypum*.....103

جدول 10. نتائج السلوك الكروماتوغرافي على الورق للمستخلص البيتانولي.....105

الجدول 11. نتائج السلوك الكروماتوغرافي – TLC– للمستخلص اليتانولي.....107

الجدول 12. اختلاف الفعل الأسر لجذر °DPPH لكل من المستخلص البيتانولي لنبتة *Globularia alypum* وفلافونويد الكرستين بدلالة تراكيز كتلية مختلفة.....110

الجدول 13. تأثير مختلف المعاملات على نشاط إنزيم CPK في البلازما.....114

الجدول 14. تأثير مختلف المعاملات على نشاط إنزيم LDH في البلازما.....116

الجدول 15. تأثير مختلف المعاملات على نشاط إنزيم AST في البلازما.....118

الجدول 16. تركيز MDA السيتوزولي للقلب.....120

الجدول 17. تركيز GSH السيتوزولي للقلب.....122

الجدول 18. التأثير المثبط للنمو للمستخلص المائي لنبات *Globularia alypum* على السلالات الخلوية الورمية البشرية الكبدية Hep-G2 , المعوية HCT-116 واللمفاوية 1301 cells.....133

الجدول19. تركيز المستخلص المائي لنبات *Globularia alypum* المثبط لـــ 50% - IC_{50}- للسلالات الخلوية الورمية البشرية Hep-G2, HCT-116 و خلايا1301.....134

مقدمة

المقدمـــــــة

السرطان هو من الأمراض الأكثر انتشارا في العالم حيث يسجل سنويا 9 ملايين من الأشخاص الجدد المصابين وحوالي 5 ملايين يتوفون من هذا المرض)1(ويعزى تشكل هذا المرض إلى تحول الخلايا السليمة إلى خلايا سرطانية نتيجة حدوث تغيرات (طفرات) في المادة الوراثية ADN)2(سببها عدة عوامل مسرطنة منها الداخلية والخارجية وتشكل المجاميع الأكسوجينية النشطة ROS (الجذور الحرة) أحد أهم العوامل الداخلية, حيث تسبب أكسدة ADN وبالتالي حدوث الطفرات المؤدية إلى تشكيل الخلايا السرطانية (5.4.3).

تتم معالجة مرض السرطان بالجراحة Surgery، بالعلاج الكيميائي Chemotherapy أو بالعلاج الإشعاعي Radiotherapy إضافة إلى علاجات أخرى و يُختار العلاج حسب مكان السرطان درجته مرحلته و حالة المريض)6(.

إن العلاج الكيماوي فعال ضد أنواع عديدة من السرطانات, لكن بقدر ما يبدي من فعالية وكفاءة في النشاط الصيدلاني تجاه الأورام السرطانية فإنه يظهر مفعول تسممي عالي نتيجة التداخل الكبير بين مجالات الجرعة العلاجية الشفائية والجرعة التسممية. فنتيجة لكون الأهداف الجزيئية لهذه الأدوية عبارة عن عناصر بيوكيميائية لا تختلف عن تلك الموجودة بالخلايا السليمة فهي تمارس سمية كبيرة عليها وتكون التأثيرات غير نوعية (بمعظم مضادات السرطان) خاصة على الأنسجة ذات التجديد السريع كالنسيج الدموي, مخاطية الجهاز الهضمي ,الحويصلات الشعرية ونخاع العظم)7(كما يمكن أن تكون عبارة عن تأثيرات نوعية (بمضاد سرطان معين) مثل سمية كلوية بـــ Cisplatin)8(سمية كبدية بـــ Methotrexate, سمية عصبية بـــ Vincristine, سمية رئوية بـــ bliomycine والسمية القلبية التي تمارسها طائفة الأنتراسيكلينات)12.11.10.9(.

أسباب السمية الناتجة عن مضادات السرطان غالبا ما يكتنفها الغموض لأن خطورة المرض التحتي لا تسمح باستعمال فحوص التي تكون أحيانا مضرة وغير مضمونة النجاح على مستوى النتائج العلاجية غير أنه تم إثبات إسهام الجذور الحرة في الآلية السمية لبعض مضادات السرطان مثل طائفة الأنتراسيكلينات والتي منها Doxorubicin .

Doxorubicin مضاد حيوي استخدم في العلاج الكيمياوي لأنواع عديدة من السرطان الذي يصيب البشر ومع ذلك فان استخدامه مازال محدودا بسبب سميته القلبية المرتبطة بالجرعة والناتجة عن الجذور الحرة)16.15.14.13(.

توجه البحث في السنوات الأخيرة إلى التنقيب عن الجزيئات الفعالة للنباتات الطبية والتي أثبت الكثير منها فعله المضاد للخلايا الورمية)20.19.18.17(من جهة وكذا تأثيرها الواقي للاضطرابات والتغيرات الوظيفية الناتجة عن المعالجة الكيميائية بمضادات السرطان من جهة أخرى)22.21(, فيمكن للجزيئات الطبيعية للنباتات الطبية أن تساهم تأزريا مع مضادات السرطان بحيث يمكنها مهاجمة الخلايا السرطانية وبالتالي فهي تدعم الفعل المضاد للسرطان إضافة إلى وقايتها من الفعل التسممي لهذه المركبات.

تشكل الفلافونويدات إحدى أهم المستقلبات الثانوية للنباتات التي يعلق عليها الأمل كثيرا لما تتميز به من خصائص مضادة للجذور الحرة (مضادات للأكسدة) وذلك من خلال الفعل المانح للهيدروجين, الأسر الجذري, تعزيز الأنظمة المضادة للأكسدة ومخلبة الأيونات المعدنية, سندا واعدا ضد الجذور الحرة)23(المسببة للسرطان وللسمية الناتجة عن المعالجة الكيميائية له, كما أثبت نشاطها المضاد للخلايا الورمية في عدة أبحاث.

لقد وقع الاختيار على نبتة *Globularia alypum* المستعملة بكثرة في الطب الشعبي في شمال إفريقيا حيث استعملت كمخفضة لنسبة السكر في الدم, مفرزة للصفراء, مدرة للعرق, منقية للدم, مسكنة للألم كما أنها فاتحة للشهية ومساعدة على الهضم. وقد تم استعمالها أيضا في معالجة الأمراض القلبية الوعائية والأمراض الكلوية, كما أثبتت الفعالية الكبيرة للمستخلص المائي لهذه النبتة ضد سرطان الدم. وقد أدلت دراسات مرجعية على هذا النوع نشاطه المضاد للأكسدة ويرجع هذا خاصة إلى الفلافونويدات)24(.

تهدف هذه الدراسة إلى تقصي تأثير المستخلص البيتانولي للأجزاء الهوائية لنبات *Globularia alypum* عيى السمية القلبية المحرضة في جرذان wistar بمضاد السرطان Doxorubicin وكذا تأثير المستخلص المائي لنفس النبات المضاد لتضاعف سلالات خلوية ورمية بشرية في المخبر– IN VITRO– وقد بوبت هذه الدراسة في فصلين:

1. الفصل الفيتوكيميائي ويضم:

- تحضير مختلف مستخلصات نبات *Globularia alypum* باستخدام مذيبات عضوية مختلفة.
- اختبارات الكشف عن أهم المركبات الفعالة لهذه النبتة وهي الفلافونويدات.
- معايرة الفلافونويدات ومتعددات الفينول

- التعرف الأولي عن أصناف الفلافونويدات الموجودة في المستخلص بتقنية الكروماتوغرافيا (كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة والورق) وكذا طيف امتصاص الأشعة الفوق بنفسجية في الوسط الميثانولي.
- دراسة النشاط المضاد للجذور الحرة باستخدام الجذر الحر الثابت °DPPH.

2. الفصل البيولوجي ويضم:

- دراسة تأثير المستخلص البيتانولي على السمية القلبية لـــ Doxorubicin من خلال:
  - المعايرات البيوكيميائية للإنزيمات البلازمية الدالة على التسمم القلبي (CPK, LDH, AST).
  - تقدير بعض مؤشرات الإجهاد التأكسدي في نسيج القلب وذلك بمعايرة GSH و MDA
  - رصد الاستجابة البنيوية لخلايا العضلة القلبية من خلال الدراسة المجهرية.

- دراسة النشاط المضاد للأورام - Anti-tumor activity - للمستخلص المائي للأجزاء الهوائية لنبتة *Globularia alypum* من خلال:

  - اختبار MTT – MTT Cell Viability Assay - حيث تم هذا على ثلاث أنواع من السلالات الخلوية الورمية البشرية تمثلت في سلالة خلوية ورمية بشرية للكبد (Human (Hep G2 hepatocarcinoma cell line, سلالة خلوية ورمية بشرية للأمعاء Colon carcinoma cells (HCT-116) ، سلالة خلوية ورمية بشرية لمفاوية (T-lymphocyte cells) lymphoblastic leukemia cells (1301).

استعراض المراجع

I. الجذور الحرة, الإجهاد التأكسدي ومضادات الأكسدة

مدخـــل

يعتبر الأكسجين جزئ مهم لإنتاج الطاقة)ATP(الضرورية لمختلف نشاطات الجسم وذلك من خلال إرجاعه التام داخل الميتوكندري إلى جزئتي ماء, و بالمقابل فان الإرجاع أحادي الإلكترون للأكسجين يؤدي إلى ظهور المجاميع الأكسوجينية النشطة والتي من ضمنها الجذور الحرة كجذر الهيدروكسيل, جذر فوق الأكسيد و بيرو كسيد الهيدروجين, وينتجها الجسم بصفة مستمرة وبتراكيز ضعيفة أو معتدلة حيث تؤمن العديد من الفعاليات الفيزيولوجية كما هو الحال في الاستجابات المناعية, الموت الخلوي المبرمج, كما يمكنها أن تعمل كإشارات فيزيولوجية (سيتوكينات وعوامل نمو) في تأمين التواصل الخلوي)25.26.27. 28(.

يحافظ الجسم على التراكيز المعتدلة لهذه المجاميع وبالتالي دورها البيولوجي بمجموعة معقدة من الأنظمة المضادة للأكسدة ذات المصدر الداخلي والطبيعة الإنزيمية من أهمها:

Catalase , Glutathione peoxidase, superoxde dismutase أو ذات المصدر الخارجي كالفيتامينات المضادة للجذور الحرة B- caroténe, Vit C, Vit E ومركبات طبيعية مثل الفلافونويدات)28.29(.

إن الزيادة في معدل المجاميع الأكسوجينية النشطة بسبب الفرط في إنتاجها, نقص أو العجز في الأنظمة المضادة لها يحدث حالة من اختلال التوازن الداخلي بين العوامل المولدة للأكسدة (الجذور الحرة) والمضادة للأكسدة وهو ما يعرف بالإجهاد ألتأكسدي)30.31.32(وينتج عنه عدة تأثيرات سلبية على الجزيئات الحيوية للخلية كتشويه الأحماض النووية, تحريض ميكانيزمات فوق الأكسدة الليبيدية, إتلاف بعض البروتينات والإنزيمات و أكسدة السكريات مما يولد عدة أمراض كمرض السرطان, الأمراض القلبية الوعائية كتصلب الشرايين, مرض السكري وبعض الأمراض العصبية كالألزهايمرو الباركينسون)33.34.35(.

1.المجاميع الأكسوجينية النشطة (ROS)

1.1. تعريف

تعرف المجاميع الأكسوجينية النشطة (ROS) على أنها جزيئات عضوية أو غير عضوية تحتوي على عنصر الأكسجين ولها قابلية للتفاعل بنشاط مع جزيئات أخرى, ويوجد منها نوعين: الجذور الحرة و المشتقات الأكسوجينية الغير جذرية.

الجذور الحرة هي كل ذرة أو جزئ يتميز بوجود إلكترون منفرد في المدار الخارجي حيث يولد هذا الأخير مجالا مغناطيسيا نتيجة غياب دوران الإلكترون الثاني في الاتجاه المعاكس مما يجعله غير مستقر كيميائيا وبالتالي تكون له القابلية للتفاعل بكفاءة أعلى من الذرة أو الجزيء المنحدر منه بحيث يتفاعل مع الجزيئات داخل الخلية إما باكتساب أو إعطاء إلكترون وهذا لتأمين حالة أكثر استقرارا.

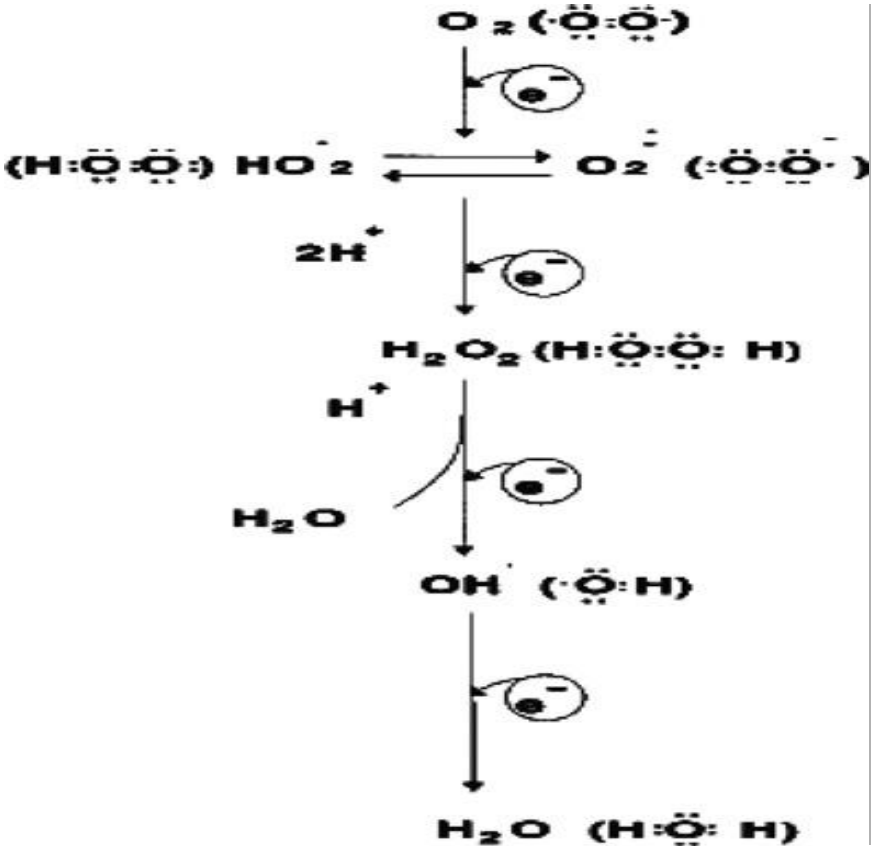
أما المشتقات الأكسوجينية الغير جذرية هي جزيئات أكسوجينية لا تملك إلكترون حر في مدارها الخارجي لكن ذات قابلية للتفاعل بنشاط مع الجزيئات الأخرى)40.39.38.37.36.35.25(.

جدول1. أهم المجاميع الأكسوجينية النشطة)42.41(.

المجاميع الأكسوجينية النشطة	التسمية	الصيغة الكيميائية
الجذور الحرة الأكسوجينية	جذر فوق الأكسيد	$O2^{\circ-}$
	جذر الهيدروكسيل	OH°
	جذر البيروكسيل	LOO°
	جذر ألكوكسيل	LO°
	جذر أحادي أكسيد الآزوت	NO°
المشتقات الأكسوجينية الغير جذرية	أكسجين مفرد	$1O_2$
	فوق أكسيد الهيدروجين	H_2O_2
	فوق أكاسيد الذهون	LOOH
	فوق أكسيد النيتريت	$ONOO^-$

2.1. تشكيل المجاميع الأكسوجينية النشطة

تعتبر الجزيئة الأكسوجينية ذات الخاصية المؤكسدة عنصرا مهما لإنتاج الطاقة ; تؤمن الميتوكندريا من خلال العديد من المعقدات الإنزيمية لغشائها الداخلي نقل الالكترونات إلى الأكسجين ليتم إرجاعه التام إلى جزيئتي ماء ونتيجة لذلك تتخلق الطاقة على شكل جزيئات ATP)25(, غير أن حوالي 2-5 % من الأكسجين المستهلك تتحول إلى مجاميع أكسجينية نشطة وذلك من خلال الاستيعاب المتتابع للالكترونات لجزيئة الأكسجين كما هو موضح في الشكل1)39(.



الشكل 1تشكل ROS كنتيجة لاكتساب الأكسجين المتتابع للالكترونات (43).

الإرجاع أحادي الإلكترون للأكسجين الجزيئي O_2 يؤدي إلى تشكيل جذر فوق الأكسيد $O2^{\circ-}$ (46).

$$O2 + 1é \longrightarrow O2^{\circ-}$$

ويحفز هذا التفاعل بتدخل عدة إنزيمات كإنزيم Cytochrome oxydase للميتوكندري,NADPH oxydase لغشاء الخلايا البلعمية (44.43) أو بتحفيز من إنزيم xanthine oxydase (46.45.40) كما يمكن لهذا الجذر أيضا أن يتشكل بطريق غير أنزيمي وذلك بتدخل المركبات النشطة في تفاعلات الأكسدة و الإرجاع للسلسلة التنفسية للميتوكندريا كمركب semiubiquinone)51.46(. إن زمن نصف حياة $O2^{\circ-}$ القصير نسبيا (بعض الميلي ثواني) يحد من انتشاره عن موقع تشكيله ويتحول بسرعة إلى باقي العناصر الأكسوجينية النشطة)50(.

يتحول جذر فوق الأكسيد $O2^{\circ-}$ إما تلقائيا عند PH حمضي أو بتحفيز من إنزيم SOD إلى بيرو كسيد الهيدروجين H_2O_2 و الأكسجين الجزيئي O_2 (46.44.43.32).

$$2\ O_2^{\circ -} + 2H^+ \xrightarrow{(SOD)} O_2 + H_2O_2$$

H_2O_2 مشتق أكسوجيني غير جذري ويملك زمن نصف حياة طويل نسبيا وبالتالي بإمكانه اختراق الأغشية الخلوية ويؤكسد عدد كبير من الجزيئات الحيوية على بعد مسافات من مكان تشكيله)38(.

يتفاعل بيروكسيد الهيدروجين مع أنيون فوق الأكسجين في وجود الأيونات المعدنية وخاصة أيونات الحديد أوالنحاس(Cu I ,Fe II(لإنتاج جذر الهيدروكسيل وذلك من خلال تفاعل Haber-Weiss .

$$H_2O_2 + 2O_2^{0-} \longrightarrow OH^0 + O_2 + OH^-$$

ويتم هذا التفاعل على مرحلتين:

في المرحلة الأولى يتفاعل بيروكسيد الهيدروجين مع الأيونات المعدنية (Fe II أو Cu I(عن طريق تفاعل فنتون)Fenton réaction(.

$$Fe\ (II)/Cu\ (I) + H_2O_2 \longrightarrow OH^\circ + OH^- + FeIII/CuII$$

أما في المرحلة الثانية فيتم إرجاع الأيونات المعدنية المؤكسدة Fe^{3+}/Cu^{+2} بجذر فوق الأكسجين كما هو موضح في التفاعل التالي)46.44.43.39.32(.

$$O2^{\circ-} + Fe\ (III)/Cu\ (II) \longrightarrow O2 + Fe\ II\ /\ Cu\ I$$

يعتبر جذر الهيدروكسيل OH° من أخطر المجاميع الأكسوجينية النشطة)46(, فله زمن نصف حياة قصير)43(جدا حوالي 10^{-9} ثانية وبهذا فهو نشط جدا ويؤثر في مكان تشكله بطريقة غير نوعية حيث يعمل على نزع الالكترونات لعدة جزيئات عضوية حيوية (بروتينات, ليبيدات,أحماض نووية وسكريات))38(مؤديا بذلك إلى تشكيل عدة مركبات جذرية كما يلي:

$$RH + OH^{\circ} \longrightarrow R^{\circ} + H_2O$$

وبتفاعل الجذر العضوي مع الأكسجين الجزيئي ينتج جذر البيروكسيل

$$R^{\circ} + O2 \longrightarrow RO2^{\circ}$$

إضافة إلى كل هذه المجاميع الأكسوجينية النشطة ينتج الجسم مجاميع أخرى تملك مجموعة أزوت وتعرف بالمجاميع النيتروجينية النشطة RNS وتضم كل من جذر أحادي أكسيد الآزوت NO° ، فوق أكسيد النيتريت $ONOO^{-}$.

ينتج NO° في الأنسجة البيولوجية نتيجة لتفاعل استقلاب الحمض الأميني الأرجنين إلى سيترولين بتحفيز من الإنزيم النوعي (nitric oxide synthases (NOSs)49.48.47(

$$O_2 + arginine + NADPH \xrightarrow{NOSs} NO^{\circ} + citrulline + H_2O + NADP^{+}$$

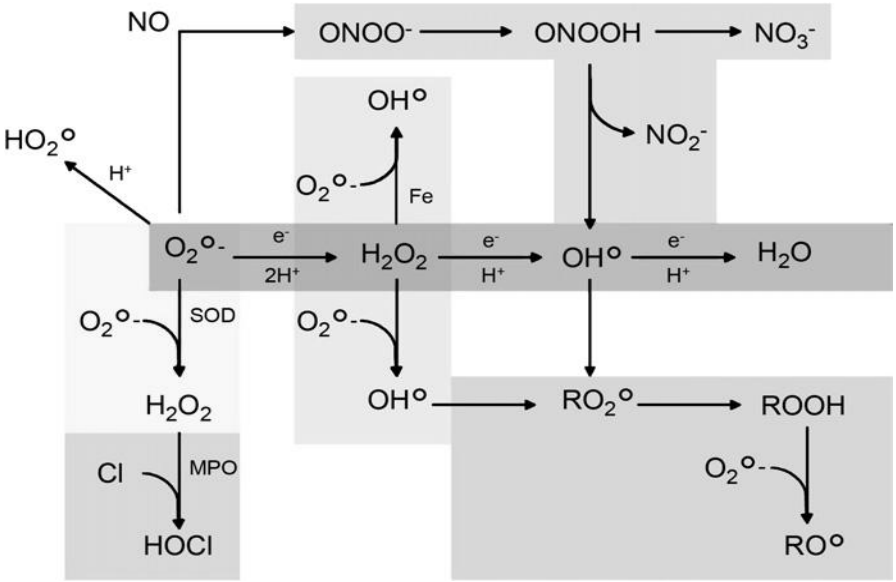
إنNO° غير نشط في التفاعل مع أغلبية الجزيئات البيولوجية لكن يصبح سام بعد تحوله إلى الأنواع النيتروجينية النشطة الثانوية, وأشهر تفاعل بيولوجي لـــ NO°هو ارتباطه مع أنيون فوق الأكسجين لتشكيل فوق أكسيد النيتريت peroxynitrite)-ONOO( )43.40.38.32(.

$$NO^{\circ} + O2^{\circ-} \longrightarrow ONOO^{-}$$

عند PH الفيزيولوجي تضاف البروتونات لفوق أكسيد النيتريت ليتشكل حمض ONOOH النشط في إتلاف الأحماض النووية, البروتينات و الليبيدات.

كما ينتج في مواقع الالتهاب نوع آخر من المجاميع الأكسوجينية النشطة والمتمثل في حمض Hypochlore (HClO) وهو جد نشط في أكسدة الجزيئات البيولوجية وخاصة المجاميع الأمينية ويتشكل بأكسدة أيونات الكلور CL^- في وجود فوق أكسيد الهيدروجين بتحفيز من إنزيم myeloperoxidase (MPO) المشتق من الخلايا البلعمية المتعادلة)43.32(.

$$H_2O_2 + Cl^- \xrightarrow{MPO} HClO + OH^\circ$$



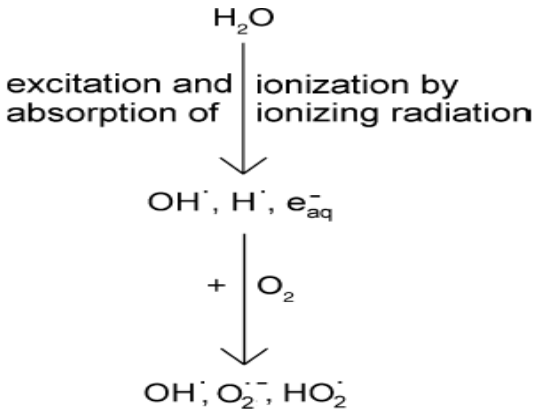
الشكل 2. تشكيل مختلف المجاميع الأكسوجينية النشطة)45(.

3.1. مصادر ROS

مصادر المجاميع الأكسوجينية النشطة عديدة ومتنوعة وعموما تصنف إلى مصادر فيزيولوجية أو داخلية ومصادر خارجية (53.41).

1.3.1. المصادر الخارجية

- الإشعاعات الكهرومغناطيسية سواء الغير مؤينة مثل الأشعة الفوق بنفسجية (UV) أو المؤينة كالأشعة X و قاما; وتسبب هذه الأخيرة تأين الماء الداخل خلوي وانتاج عدد واسع من المجاميع الجذرية والغير جذرية كما هو(52.41. 53) موضح في الشكل التالي:



الشكل3. تشكل ROS بتأين الماء بالإشعاعات المؤينة في وجود وغياب O_2(42).

- ملوثات الهواء كالدخان الناتج عن احتراق التبغ, الغازات الصناعية ووسائل النقل) 41(.
- بعض الأدوية وخاصة مضادات السرطان مثل Doxorubicin والذي يؤدي إلى السمية القلبية نتيجة أكسدة الأحماض الذهنية عديدة عدم التشبع بجذر الهيدروكسيل الناتج عن حلقة الأكسدة والإرجاع لهذا الدواء)41.15. 46(.
- المركبات الخارجية الحيوية Xenobiotics كمبيدات الطفيليات الحيوانية والنباتية)DTT(ومبيدات الأعشاب الضارة مثل paraquat وبعض المركبات الكيميائية كالكحول وتنتج ROS كحصيلة ثانوية لاستقلابها بحلقة الأكسدةوالإرجاع داخل الجسم)41(.
- غزو البكتيريا والفيروسات للجسم) 41(.
- الأغذية المحتوية على مختلف أنواع المؤكسدات كالبيروكسيد, الألدهيد ,الأحماض الذهنية المؤكسدة والأيونات المعدنية)Cu, Fe( )41(.

2.3.1. المصادر الداخلية

ينتج الجسم العناصرالأكسوجينية النشطة باستمرار و بعدة آليات فيزيولوجية والتي تكون مرتبطة أساسا بالاستقلاب الخلوي للأكسجين إضافة إلى تفاعلات الأكسدة والإرجاع ومن أبرز مصادرها الداخلية ما يلي:

- **السلسلة التنفسية للميتوكندري**

تعتبر الميتوكندريا مركزا مهما لمختلف فعاليات الأكسدة بالخلية, فعلى مستوى غشاءها الداخلي تتأكسد مرافقات الإنزيم FADH, NADH محررة بروتونات والكترونات فتتجمع البروتونات في الحشوة, في حين تؤمن السلسلة التنفسية من خلال أكثر من 80 ببتيد منتظمة في أربع معقدات إنزيمية نقل الالكترونات إلى الجزيئة الأكسوجينية فيتولد نتيجة لهذا حركية البروتون من الحشوة إلى الفراغ البين غشائي لتستعمل الطاقة الناتجة من هذا التدرج البروتوني في إنتاج جزيئات ATP عبر المعقد الخامس, وبالمقابل تعتبر السلاسل التنفسية أحد أهم مصادر تشكل ROS ; فيمكن أن يحدث خلل أثناء انتقال الالكترونات حيث ينحرف إلكترون عن مساره في عدة مواقع من السلسلة التنفسية وخاصة عند المعقد I و III ubiquinol cytochrome c Reductase و NADH Coenzyme Q reductase على الترتيب مما يتسبب في الإرجاع أحادي الإلكترون لـــ O_2 وبالتالي تشكيل أنيون فوق الأكسيد $O_2^{\circ -}$ الذي سرعان ما يتحول بتحفيز من إنزيم SOD إلى فوق أكسيد الهيدروجين H_2O_2 هذا بدوره يهدم في وجود معادن العبور (Fe II و Cu I) إلى جذر OH° عبر تفاعل Haber-Weiss .)56.55.54.51.25(

- **الخلايا البلعمية**

إن تنشيط الاستجابة المناعية الطبيعية نتيجة غزو الكائنات الغريبة (كالبكتيريا والفيروسات) يترجم بتحفيز فعاليات البلعمة بتدخل الخلايا البلعمية (خلايا الماكروفاج ومتعددة النوى المتعادلة) والتي بعد تنشيطها يزداد استهلاكها للأكسوجين والذي يرافقه زيادة في استعمال الجلوكوز وبالتالي إنتاج جزيئات NADPH بمسار البنتوز فوسفات ومن جهة أخرى ينشط الإنزيم الغشائي NADPH oxydase الذي يعمل على أكسدة NADPH وإرجاع O_2 إلى $O_2^{\circ -}$.

$$2O_2 + NADPH + H^{+} \xrightarrow{\text{NADPH oxydase}} 2O2^{\circ -} + NADP^{+} + 2H^{+}$$

وفي مرحلة ثانية و بتحفيز من إنزيم SOD ينتج فوق أكسيد الهيدروجين H_2O_2 الذي في وجود معادن العبور يتحول إلى جذر OH° من خلال تفاعل Haber-Weiss. كما يمكن لـــ H_2O_2 أن يتفاعل

مع أيونات الكلور الخلوية بتحفيز من إنزيم myeloperoxidase لهذه الخلايا منتجا بذلك (HClO(وهو أحد أخطر المؤكسدات الفيزيولوجية)58.57.53.41.40.28.25(.

- **المصادر الإنزيمية**

يمكن لمعظم الأنظمة البيولوجية الإنزيمية أن تساهم في إنتاج ROS, يتشكل أنيون فوق الأكسيد $O_2^{\circ -}$ بتحفيز من إنزيم cytochrome oxydase الميتوكندري وإنزيم NADPH oxydase الغشائي عبر فعاليات البلعمة)59.44.43.35(.كما يساهم نضام xanthine / xanthine oxydase في تخليق الجذر الأنيوني $O_2^{\bullet -}$ إذ يحفز إنزيم Xanthine oxydase المرحلة الأخيرة لاستقلاب البيورين purine من خلال أكسدة xanthine إلى حمض اليوريك في وجود O_2)59.46.45.40.35(.

$$\text{Xanthine} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{xanthine oxydase}} \text{Acide urique} + 2O2^{o-} + 2H^+$$

بينما يحفز nitric oxide synthases (NOSs) تشكل جذر NO° الذي يتدخل في عدة وظائف فيزيولوجية كنقل الاشارت الداخل والخارج خلوية لكن بزيادة تركيزه يتفاعل مع $O_2^{\circ -}$ لإنتاج $ONOO^-$ النشط في أكسدة الجزيئات الحيوية)59.49.48.47(. كما يمكن لدورات Redox عبر المسارات السيتوكرومية للميكروزومات – إنزيمات Cyt P450 – عند تفاعلاتها البيوكيميائية في إزالة سمية المركبات الخارجية الحيوية – xenobiotic - أن تساهم في إنتاج ROS (46) .

4.1. الدور الفيزيولوجي لـــ ROS

إن التراكيز المحدودة لـــ ROS لاغنى عنها, حيث أنها تؤمن العديد من الفعاليات الفيزيولوجية:

- التدخل في الاستجابات المناعية; فنتيجة لغزو الكائنات الغريبة يتنشط الإنزيم الغشائي NADPH Oxydase المسؤول على إنتاج $O_2^{\bullet -}$ وتحت تأثير إنزيمات NO synthase, SOD ، MPO يتشكل كل من H_2O_2, ONOOH و HClO على الترتيب وكلها عوامل نشطة في القضاء على الأجسام الغريبة من خلال أكسدة مختلف مكوناتها)60.58.57.53.41.40.28.25(.
- المساهمة في ظاهرة الالتهاب ; بحيث تتفاعل ROS وخاصة $O_2^{\bullet -}$ مع مكونات الأغشية الخلوية مثل حمض الأرشيدونيك لإنتاج ليبيدات الجذب الكيميائي chemotactic lipids وهي مركبات

- Eicosanoids التي تشكل عائلة مهمة من الليبيدات النشطة بيولوجيا وتضم كل من prostaglandins, Thromboxanes وهذا بتحفيز من إنزيم prostaglandin H synthase cyclooxygenase أو lipoxygenases وكل هذه الليبيدات تعمل على الجذب الكيميائي للخلايا متعددة النوى المتعادلة إلى موقع العدوى لتضخم بذلك الاستجابة الالتهابية) 46.32(.
- تعديل التعبير على المورثات المشفرة للإنزيمات المضادة للأكسدة, فالمورثات المضادة للأكسدة الأكثر تحريضا بالإجهاد ألتأكسدي هي تلك الخاصة بـــ Mn-SOD, CAT, thioredoxin في حين Cu-Zn SOD و glutathion peroxydase هي أقل تحريضا)61(.
- تحريض الموت الخلوي المبرمج للخلايا السرطانية)28.27(.
- فعاليات تكاثر وتمايز الخلايا)46(.
- نقل الإشارات الخلوية(46) لتأمين التواصل الخلوي وكمثال عن ذلك تدخل $O_2^{\circ -}$ في زيادة قدرة الحيوانات المنوية وتفاعل الجسيم الطرفي)32.28(.

2. الإجهاد التأكسدي

1.2. تعريف

الإجهاد التأكسدي هو اضطراب في هيموستازيا الرودوكس Redox ويعرف على أنه اختلال في التوازن الداخلي بين المؤكسدات ROS ومضادات الأكسدة لصالح الكفة التأكسدية كنتيجة لفرط إنتاج المجاميع الأكسوجينية النشطة, نقص أو عجز في الأنظمة المضادة للأكسدة أو اشتراك الظاهرتين معا مما يؤدي إلى عدة أضرار بسبب هدم الجزيئات الحيوية للخلية)63.62.60.44.40.32.31.30(.

2.2. التأثيرات البيوكيميائية للاجهاد التأكسدي

تنعكس تأثيرات الإجهاد ألتأكسدي على مختلف الجزيئات الحيوية للخلية وخاصة الدهون,البروتينات الأحماض النووية و السكريات)66.65.64.45.39(.

1.2.2. فوق الأكسدة الليبيدية

بما أن الأغشية الخلوية غنية بالأحماض الذهنية عديدة عدم التشبع فهي هدف مباشر للجذور الحرة وخاصة جذر الهيدروكسيل °OH الذي يحرض ميكانيزمات فوق الأكسدة الليبيدية lipid peroxydation

مما ينتج عنها تغير في ميوعة الغشاء وبالتالي الإخلال بجميع وظائفه الحيوية كالمبادلات ونقل الإشارات الخلوية. وتتم ميكانيزمات فوق الأكسدة الليبيدية على شكل سلسلة من التفاعلات تقسم إلى ثلاث مراحل)40.27. 45. 68.67.57(:

- **مرحلة البداية**

تبدأ فعاليات فوق الأكسدة الليبيدية بمهاجمة جذر الهيدروكسيل للحمض الذهني عديد عدم التشبع (LH) بهدف انتزاع ذرة هيدروجين وهذا عند الكربون المشبع الذي يقع بين رابطتين زوجيتين فينتج عن ذلك جذر ليبيدي يعرف بجذر الألكيل) L° (.

$$LH + R^{\circ} \longrightarrow L^{\circ} + RH$$

- **مرحلة الانتشار**

وتتم هذه المرحلة في خطوتين:

يتفاعل جذر الألكيل مع الأكسجين الجزيئي ليتشكل جذر البيروكسيل)LOO°(.

$$L^{\bullet} + O_2 \longrightarrow LOO^{\bullet}$$

يعمل جذر البيروكسيل على أكسدة حمض ذهني مجاور عديد عدم التشبع إلى جذر الألكيل الذي يخضع لنفس التفاعلات السابقة (التفاعل مع O_2) , بينما يتحول جذر البيروكسيل الى هيدروبيروكسيد)LOOH(, وينتشر بذلك تفاعل الأكسدة الليبيدية.

$$LOO^{\circ} + LH \longrightarrow LOOH + L^{\circ}$$

جزيء الهيدروبيروكسيد المتشكل خلال هذه المرحلة ثابت نسبيا غير أنه في وجود معادن العبور يولد من جديد جذور ليبيدية (جذر الألكوكسيل LO° و البيروكسيل LOO°).

$$LOOH + Fe\ II \longrightarrow LO^{\circ} + OH^{-} + Fe\ (III)$$

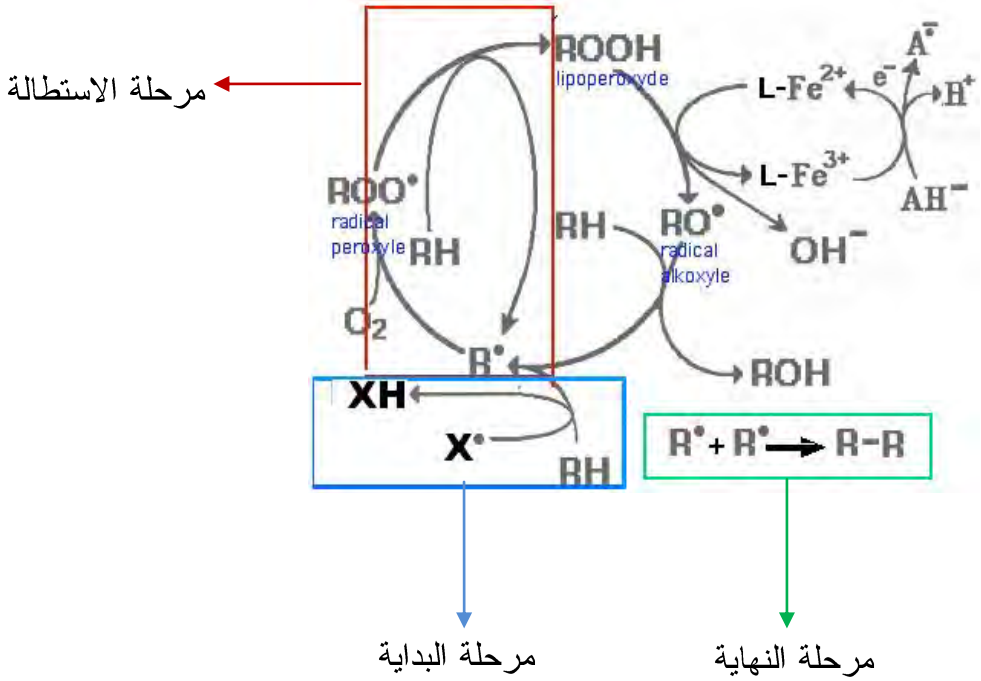
$$Fe\ (III) + LOOH \longrightarrow LOO^{\circ} + H^{+} + Fe\ II$$

كما يمكن للهيدروبيروكسيد أن يهدم إلى سلاسل قصيرة ألكانية (إيثان, بنتان....) وعدة ألدهيدات سامة مثل: المالونالدهيد MDA (malondialdéhyde) و HNE (4-hydroxynonenal) وكلاهما يستعمل كمؤشر لفوق الأكسدة الليبيدية.

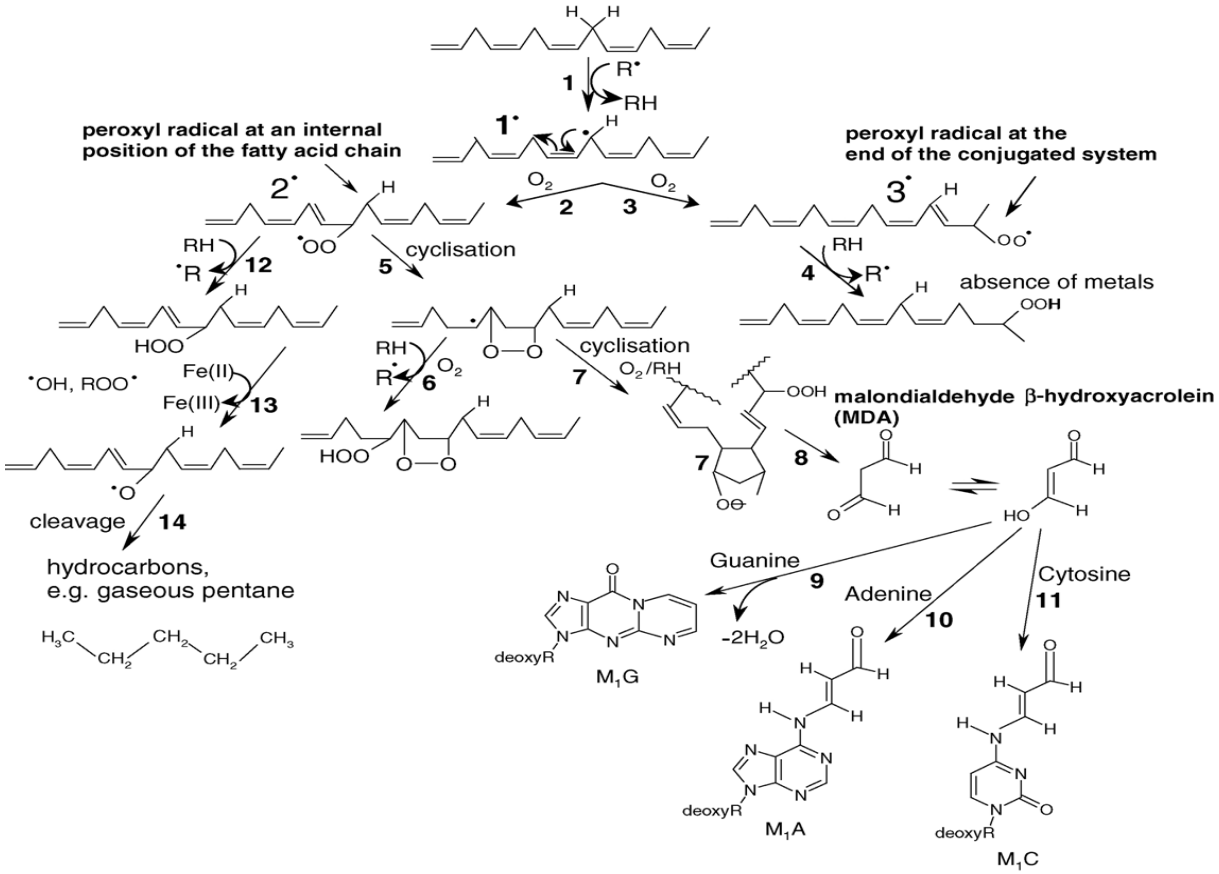
- **مرحلة النهاية**

تنتهي سلسلة تفاعلات فوق الأكسدة الليبيدية بتشكيل رابطة تكافؤية بين جذرين ليبيديين أو بتفاعل الجذر الليبيدي مع مضاد أكسدة يذوب في الذهون كالفيتامين E)68.67.60.39.27(.

$$L^{\cdot} + L^{\cdot} \longrightarrow L\text{-}L$$



شكل 4. مختلف مراحل فوق الأكسدة الليبيدية



الشكل 5. تسلسل تفاعلات فوق الأكسدة الليبيدية (27).

2.2.2. أكسدة البروتينات

إن تأثيرات ROS على البروتينات معقدة, بداية من أكسدة الهيكل البروتيني وبالتالي شطر سلسلة متعدد الببتيد الى التأثير على مختلف السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية المكونة له هذا ما يؤدي الى فقد البروتينات لمختلف وظائفها البيولوجية سواء كإنزيمات أو كبروتينات بنائية مما يجعلها جد حساسة للإنزيمات المحللة للبروتينات Protéase وخاصة الـــ Protéasome)60.39(.

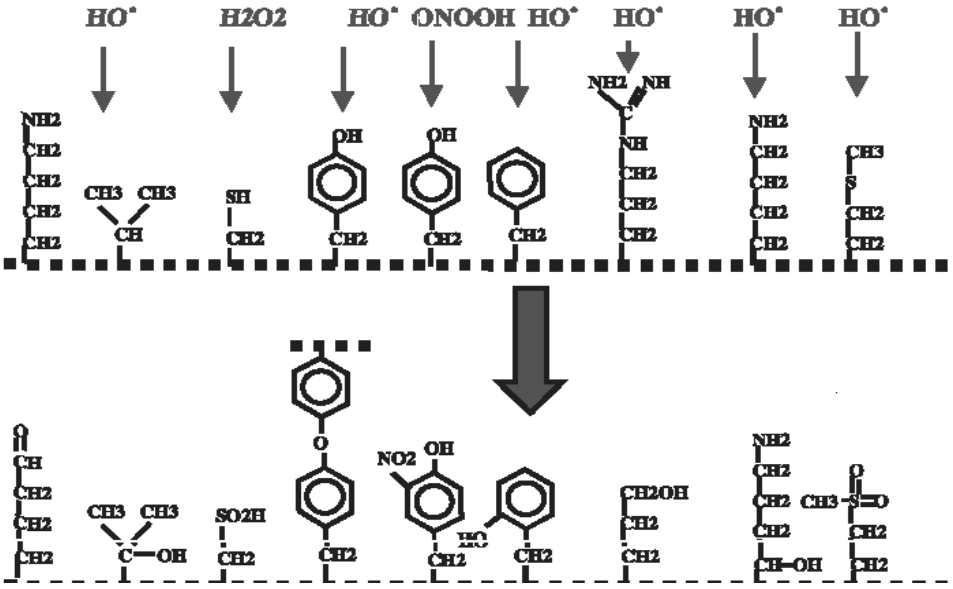
تشكل الأحماض الأمينية العطرية مثل: Tryptophane, Histidine و Tyrosine أكثر الأحماض الأمينية أكسدة بالجذور الحرة وخاصة جذر الهيدروكسيل °OH فيتأكسد Tyrosine إلى nitrotyrosine Histidine إلى 2-oxohistidine ´Tryptophan إلى عدة مشتقات هيدروكسيلية.

الأحماض الأمينية الكبريتية مثل methionine و cysteine باحتوائها على مجاميع الثيول)SH(حساسة أيضا للأكسدة بالجذور الحرة, فيتأكسد methionine إلى methionine sulfoxide بينما ينتج عن أكسدة cysteine عدد كبير من النواتج تضم: مركبات ثنائية الكبريت disulfides(تتشكل جسور ثنائية الكبريت)S-S(إما داخل الجزيئة البروتينية, بين جزيئتين مختلفتين من البروتين أو بين البروتين والجلوثاثيون), جزيئات S-nitrosylation وحمضي sulfinic و sulfonic.

كما يمكن للألدهيدات السامة الناتجة عن فوق الأكسدة الليبيدية مثل MDA و 4-HNE أن ترتبط بالبروتينات وتغيرمن هيكلها البنائي.

إن البعض من البروتينات المؤكسدة يتم ارجاعها إلى حالتها الطبيعية(تفاعل عكسي) ويتعلق الأمر بإرجاع بقايا الأحماض الأمينية الكبريتية المؤكسدة)methionine sulfoxide, disulfides(وهذا بتدخل عدة إنزيمات; حيث يحفز إنزيم methionine sulfoxide reductase إرجاع methionine sulfoxide إلى methionine بتدخل thioredoxin كعامل مرافق, في حين يتم إرجاع ثنائيات الكبريت إلى بقايا cysteine بصنف من الإنزيمات الناقلة لمجاميع الثيول مثل (glutathione S-transferase).

غير أن أغلب تفاعلات أكسدة البروتينات بالجذور الحرة تتم بصفة غير عكسية وفي هذه الحالة فان السبيل الوحيد لإصلاح البروتين يتم من خلال هدمه وإعادة بنائه من جديد)protein turnover(, وتجدر الإشارة إلى أن بعض البروتينات المؤكسدة تصبح مقاومة للهدم بـــ Protéasome وقد تم إثبات أن البروتينات المتغيرة بإضافة 4-HNE لاتقاوم الهدم فحسب بل بامكانها كبح هدم باقي البروتينات المؤكسدة وهذا بتثيطها لهذا الإنزيم)70.69(.



الشكل 6. بعض تغيرات السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية بعد هجومات الجذور الحرة)60(.

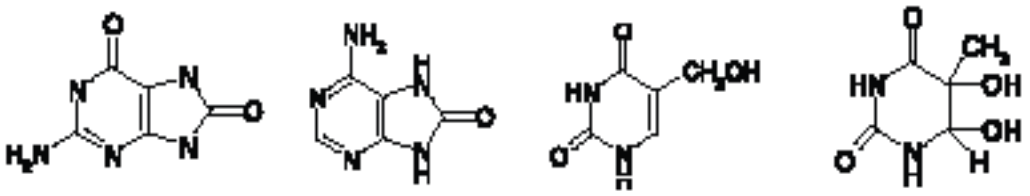
3.2.2. أكسدة ADN

يشكل ADN بنوعيه سواء النووي أو الميتوكندري أحد الأهداف الأساسية للجذور الأكسجينية, غير أن معدل القواعد المؤكسدة لـــ ADN الميتوكندري أعلى بـــ 2-3 مرات من ADN النووي)47(. تؤثر الجذور الحرة وخاصة جذر الهيدروكسيل على جزيئة ADN في عدة مواقع مؤدية إلى عدة أضرار تأكسدية, فتؤدي أكسدة القواعد الأزوتية إلى تشكيل عدد كبير من القواعد المتغيرة مثل:

8oxo guanine, 8 nitro guanine, 8oxo adénine, formamidopyrimidine, 5 hydoxy cytosine, 5 hydoxy méthyl uracile, thymine glycol , oxazolone, formimidouracile)60(.

مثلا يضاف جذر °OH إلى الرابطة الزوجية لقاعدة guanine فينتج 8-hydroxyguanine الذي يستخدم كمؤشر بيولوجي للهجومات التأكسدية على الأحماض النووية)44.39.27(.

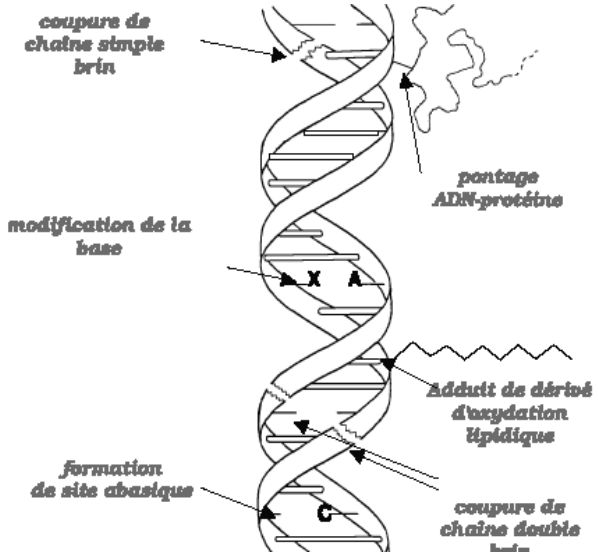
تهاجم الجذور الحرة الروابط بين القواعد وسكر الريبوز المنقوص الأكسجين مما ينتج عنه مواقع بدون قواعد أزوتية, كما يمكنها مهاجمة السكر مباشرة مؤدية إلى كسر أحد سلسلتي ADN.



8- oxo guanine 8- oxo adénine 5-OH methyl uracile Thymine glycol

الشكل 7. بعض القواعد الأزوتية المؤكسدة بالجذور الحرة)60(

يمكن للجذور الحرة أن تؤثر على ADN بطريقة غير مباشرة وذلك من خلال ارتباط نواتج فوق الأكسدة الليبيدية مع القواعد الأزوتية مثل)MDA-guanine) وتشكيل جسور من نوع بروتين – ADN.)60(



الشكل 8. الأضرار التأكسدية الناتجة عن أكسدة الجذور الحرة للمادة الوراثية للخلية)60(

3.2. الأمراض الناتجة عن الإجهاد التأكسدي

إن مساهمة المجاميع الأكسوجينية النشطة كوسائط هدمية شاملة لمختلف الجزيئات الحيوية للخلية يجعلها تتدخل في ظهور عدة أمراض, إما كعامل مولد للمرض أو كسبب في المضاعفات الناتجة عنه. تظهر أغلبية الأمراض الناتجة عن المجاميع الجذرية مع التقدم في السن, حيث أنه نتيجة للشيخوخة

تنخفض أنظمة الدفاع المضادة للأكسدة إضافة إلى الإنتاج المفرط للجذور الحرة من الميتوكندري ومن بين الأمراض نميز)60(:

- السرطان, فتساهم ROS في ظهور هذا المرض من خلال عدة آليات مثل: تنشيط مولدات السرطان وتحويلها إلى مواد مسرطنة, حدوث طفرات في ADN سواء في المورثات الكابحة لظهور المرض أو المورثات الورمية.)72.71.60.33(.
- مرض تصلب الشرايين Atherosclerosis والناتج أساسا عن أكسدة ROS للبروتينات الليبدية منخفضة الكثافة LDL) 60.73.33(.
- داء السكري, حيث تبين أن الجذور الحرة تتسبب في تخريب خلايا B لجزر لانجرهانس)60.74(.
- الأمراض الانتكاسية العصبية ; فالتركيز المرتفع للأحماض الذهنية عديدة عدم التشبع اضافة إلى النشاط الاستقلابي المرتفع للجهاز العصبي يجعله عرضة للأضرار التأكسدية لـــ ROS وبالتالي ظهور عدة أمراض عصبية كالألزهيمر والباركينسون)64.32(.

3. مضادات الأكسدة

1.3. تعريف

للحفاظ على التوازن الرودوكسي الداخلي يسخر الجسم مجموعة معقدة من أنظمة الدفاع المضادة للأكسدة تعمل على الحد من التأثيرات السلبية للجذور الحرة والتي تكون في غالبيتها غير عكسية.)39(مضادات الأكسدة هي مجموعة من الجزيئات تتواجد بتراكيز قليلة مقارنة ببادئات التأكسد ولكن لها القدرة على خفض أو تثبيط أكسدتها)76.75.40.39(وتشمل المركبات داخلية المصدر ذات طبيعة إنزيمية مثل GPx , SOD CAT وبعض الجزيئات الغير انزيمية GSH, Thioedoxin وأخرى ذات مصدر خارجي من بينها الفيتامينات المضادة للجذور الحرة كالفيتامين E و C, مركبات طبيعية مثل متعددات الفينول كالفلافونويدات وبعض المعادن الأثرية خاصة الزنك)Zn(, السيلينيوم (Se) والنحاس (Cu))53.77. 31.29.25(. ورغم تنوع مضادات الأكسدة فإنها تؤثر على مستويين:

- الوقاية من الإنتاج المفرط للجذور الحرة.
- الأسر الجذري من خلال التقاط الالكترونات العازبة للجذور الحرة وتحويلها إلى جزيئات ثابتة (76).

2.3. مضادات الأكسدة الداخلية

1.2.3. مضادات الأكسدة الانزيمية

- **إنزيم SOD - Superoxide dismutase-**

اكتشف إنزيم SOD عام 1969 من طرف Mc Cord, Fridovich وهو من الإنزيمات المعدنية بحيث يحتوي موقعه الفعال بالضرورة على ذرات معدنية (النحاس والزنك أو المنغنيز أو الحديد) (40.39.60) وعلى حسب نوع المعدن الداخل في تركيب الإنزيم يصنف إلى عدة نظائر: Cu/ZnSOD اكتشف في سيتوزول حقيقيات النوى, Mn-SOD والذي يتمركز في الميتوكندري و EC-SOD وهو يشبه النوع الأول بحيث يحتوي على ذرتي Cu/Zn لكنه يتواجد في الفراغ البين خلوي, في حين يميز عند النبات والبكتيريا وجود نوع أخر يحتوي على ذرة الحديد وهو Fe-SOD (39. 78 .79) . يشكل إنزيمSOD أول خط دفاعي ضد الإجهاد التأكسدي, فيعمل على تحول أنيون فوق الأكسيد إلى فوق أكسيد الهيدروجين والأكسجين من خلال تفاعل يعرف بـــ dismutation والذي يتم فيه عملية أكسدة وإرجاع عكسية للذرات المعدنية في الموقع الفعال للأنزيم (83.82.81.80.60) .

$$SOD\text{-}Cu^{2+} + O_2^{\cdot -} \longrightarrow SOD\text{-}Cu^{1+} + O_2 \qquad (1)$$

$$SOD\text{-}Cu^{+1} + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \longrightarrow SOD\text{-}Cu^{+2} + H_2O_2 \qquad (2)$$

وتكون المعادلة الإجمالية للتفاعل كما يلي:

$$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2 \qquad (3)$$

إن نشاط SOD مرتبط إجباريا بنشاط كل من إنزيم CAT و Gpx في هدم بيروكسيد H_2O_2 الهيدروجين ومنع تراكمه)39(.

- **إنزيم CAT – Catalase–**

يتكون من أربعة سلاسل ببتيدية بوزن جزيئي قدره 240 كيلودالتون, تضم كل سلسلة مجموعة هيم haem تحتوي على أيون الحديد والذي يشكل الموقع النشط للإنزيم)84.59.41.39(. في الأنسجة فان نشاط CAT مرتفع جدا في الكبد متبوع بالكلى, الرئتين, القلب ثم المخ ويتوزع على مستوى الخلية في السيتوبلازم وعضيات Peroxysomes والميتوكندري)85.84(. يحفزCAT تحول فوق أكسيد الهيدروجين إلى جزيئتي ماء; فيعمل عنصر الحديد للهيم على شطر O-O لجزئ H_2O_2 منتجا H_2O و Fe(IV)=O عالي النشاط, يمكن لهذا الأخير أن يؤكسد جزيئة H_2O_2 جديدة ليعطي O_2وجزيئة ماء ثانية كما هو موضح في التفاعلات التالية)41(:

$$H_2O_2 + Fe(III)\text{-}E \longrightarrow H_2O + O{=}Fe(IV)\text{-}E \qquad 1$$

$$H_2O_2 + O{=}Fe(IV)\text{-}E \longrightarrow O_2 + Fe(III)\text{-}E + H_2O \qquad 2$$

$$2H_2O_2 \xrightarrow{CAT} O_2 + 2H_2O \qquad 3$$

- **إنزيمي GPx – Glutathion peroxydase – و GR- Glutathion réductase**

يتشكل GPx من أربع تحت وحدات تحتوي كل تحت وحدة على ذرة السيلينيوم Se الضرورية لنشاطه. يتواجد في البلازما وفي الخلايا فهو يتوضع على مستوى الغشاء السيتوبلازمي, السيتوزول وفي عضيات النواة, الميتوكندري و الشبكة الأندولازمية كما يتواجد شكل لهذا الإنزيم في الخلايا الهضمية. يتمثل دوره الحيوي في إرجاع فوق أكسيد الهيدروجين إلى جزيئة ماء ومن جهة أخرى فهو يساهم في اختزال فوق أكاسيد الدهون)LOOH(الناتجة من أكسدة الأحماض الذهنية عديدة عدم التشبع والكولسترول الى كحولات. يتطلب GPx في نشاطه مساعدة مرافق إنزيمي والمتمثل في الجلوتاتيون المرجع)GSH(والذي يؤكسد خلال هذه التفاعلات الى جلوتاتيون مؤكسد)GSSG(حسب التفاعلان التاليان)87.84.60.56(:

$$H_2O_2 + 2\,GSH \xrightarrow{GPx} 2H_2O + GSSG$$

$$LOOH + 2GSH \xrightarrow{GPx} LOH + H_2O + GSSG$$

يحفز إنزيم GR المتواجد في السيتوزول والميتوكندري تفاعل استرجاع GSH انطلاقا من جلوتاتيون مؤكسد (GSSG) وخلال هذا التفاعل فان GR يحتاج إلى H^+ NADPH كمرافق إنزيمي :

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2GSH + NADP^+$$

في حين يتشكل NADPH من جديد بتدخل إنزيم Glucose6-Pdeshydrogénase (G6PD) (86.84.67) :

$$NADP^+ \xrightarrow{G6PD} NADPH$$

2.2.3. مضادات الأكسدة الغير إنزيمية

- **الجلوتاتيون – Glutathion-**

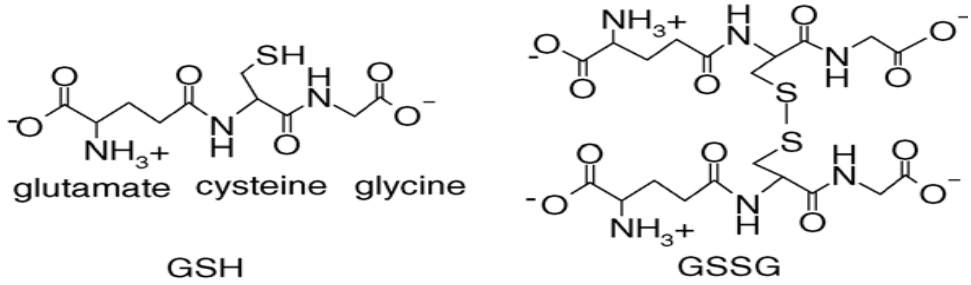
يعتبر GSH من أهم منظمات الجهد الرودوكسي الداخل خلوي, وهو ثلاثي ببتيد يتشكل من ثلاث أحماض أمينية (Glutamique, Cysteine, Glycine) ويقدر تركيزه في البلازما بـــ (0.5-10µM) في حين أن تركيزه الداخل خلوي أعلى بـــ 1000 مرة (0.5-10mM) (90.86). يتخلق GSH على مستوى الخلية بتدخل كل من إنزيم γ - glutamyl cysteine synthetase الذي يحفز تشكيل الرابطة الببتيدية بين Cysteine و Glutamique في حين يعمل Glutathion synthetase على إضافة Glycine (88).

يعتبر GSH من أهم مضادات الأكسدة الداخلية للخلية وترجع خواصه المضادة للأكسدة أساسا إلى احتواء بنيته على مجموعة sulfhydril (SH) التي تكسبه الخاصية المرجعة (90). يتدخل GSH بآليتين لمنع التأكسد, فيمكن أن يتفاعل مباشرة مع المجاميع الأكسوجينية النشطة بتفاعل غير إنزيمي بحيث يساهم بدور المانح الهيدروجيني كما في التفاعل التالي (91.89.39).

$$GSH + R^{\circ} \longrightarrow GS^{\circ} + R\text{-}H$$

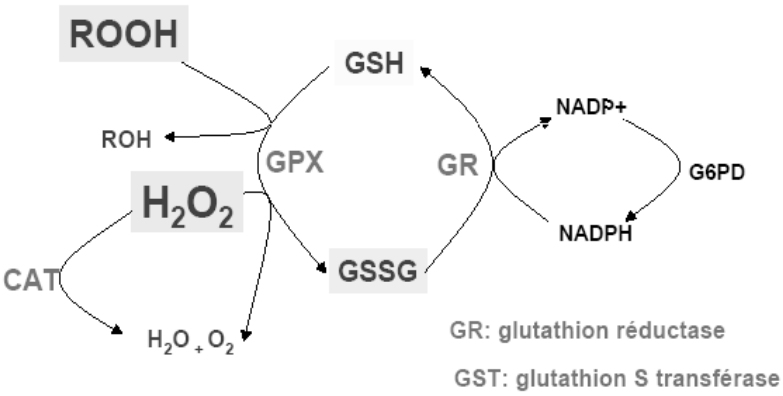
$$GS^{\circ} + GS^{\circ} \longrightarrow GSSG$$

غير أن GSH يستعمل أساسا كمرافق إنزيمي لإنزيم GPx)50.39(الذي يؤمن إرجاع كل من فوق أكسيد الدهون وفوق أكسيد الهيدروجين, كما يمكن لـــ GSH أيضا أن يتداخل في اعادة استرجاع بعض مضادات الأكسدة كالفيتامين C و الفيتامين E)64.39(. خلال نشاط الجلوتاتيون المضاد للأكسدة فانه يتحول من الصورة المرجعة GSH إلى المؤكسدة GSSG, حيث تسترجع الصورة المرجعة من جديد بتحفيز من إنزيم GR ومرافقه الإنزيمي $NADPH\ H^{+}$)86(.



الشكل 9. البنية الكيميائية للجلوتاتيون المرجع والمؤكسد)27(

بالإضافة إلى الدور المانع للأكسدة فان GSH يؤمن العديد من الوظائف الفيزيولوجية فهو مزيل لسمية xenobiotics وذلك بتحفيز من إنزيم GST وهو من أهم الإنزيمات الميكروزومية بالطور الاستقلابي الثاني إذ يساهم في إزالة السمية عن طريق تأمين اقتران المستقلبات الالكتروفيلية بالـــ GSH استعدادا لطرحها عبر الصفراء, و يقوم GSH أيضا بصيانة المجاميع الكبريتية بالبروتينات كما يساهم في تخزين ونقل الـــ Cysteine)92(.

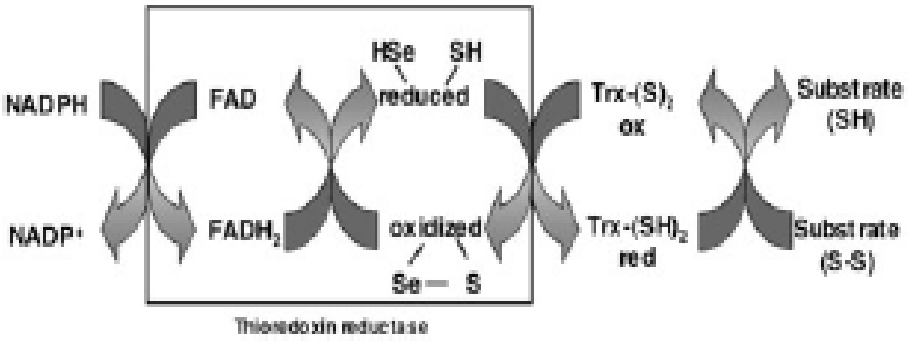


الشكل10. النظام الرودوكسي للجلوتاتيون

- **Thiorédoxin**

يعتبر Txn أحد أهم الأنظمة الردوكسية المنضمة للثيول الخلوي)93(, وهو بروتين صغير الوزن الجزيئي (12 كيلودالتون) يتكون من 105حمض أميني ويتميز بنشاط أكسدة وإرجاع مثل كل البروتينات التي تحتوي على مجاميع الثيول)SH(. تم تمييز ثلاث أنواع لبروتين Thiorédoxin: Txn_1 السيتوزولي ويمكن أن يتواجد كذلك في النواة وبلازما الدم, Txn_2 الذي يتوضع في الميتوكندري وTxn_3 الذي يعبر عليه على مستوى الحيوانات المنوية)95.94(. يقل تركيز Txn بـــ 100 إلى 1000 مرة مما هو عليه الجلوتاثيون)96(. وبعكس الجلوتاثيون الذي يشكل ثنائيات كبريتية ما بين جزيئية فان Txn يشكل عادة ثنائيات كبريتية داخل جزيئية)97(.

إن أكسدة Txn بتحفيز من انزيم Txn Peroxidase تؤدي إلى إرجاع الهيدروبيروكسيدات وألكيلات الهيدروبيروكسيد إلى ماء وكحولاتها المقابلة, ولقيام Txn بهذا الدور من جديد ينبغي أن يسترجع صورته المختزلة التي يؤمنها له انزيم Thiorédoxin reductase ومرافقه الإنزيمي NADPH)94((شكل11). كما يساهم Txn في تنبيه مضادات الأكسدة وتجديد الأسكوربات)98(.



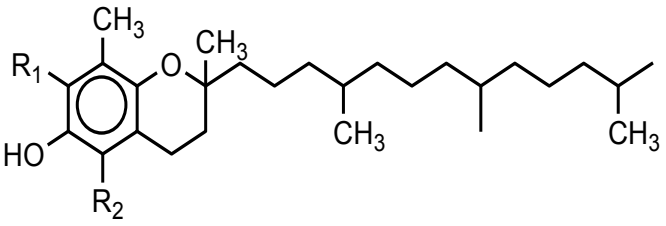
الشكل11. أكسدة واسترجاع Thiorédoxin)94(.

3.3.مضادات الأكسدة الخارجية

- **الفيتامين E**

مصطلح الفيتامين E يشمل مجموعة من المماكبات تعرف بعائلة Tocopérols(Gamma Alpha, Béta, Delta,) والأكثر نشاطا بيولوجيا فيها هو Alpha-Tocophérol(39) . تتشكل مماكبات الفيتامين E من نواة Chromanol -6 وسلسلة خطية جانبية Isoprénoid مكونة من 16 ذرة كربون.

R1	R2	Tocophérols
CH3	CH3	alpha
H	CH3	beta
CH3	H	gamma
H	H	delta



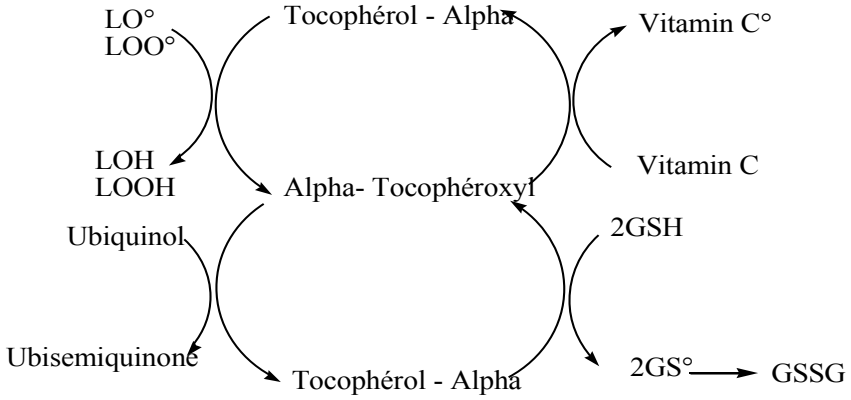
الشكل 12. البنية الكيميائية للفيتامين E)86(

إن الخاصية المحبة للدهون للـــ Alpha-Tocophérol والراجعة أساسا إلى السلسلة الجانبية المكونة له تسمح بدمجه على مستوى الغشاء الخلوي الغني بالأحماض الذهنية عديدة عدم التشبع أين يساهم بفعالية في إعاقة انتشار)propagation(سلسلة تفاعلات فوق الأكسدة الليبيدية المحرضة بالمجاميع الأكسجينية النشطة وذلك من خلال تفاعله مع جذر الألكوكسيل)°LO(و البيروكسيل)°LOO( )41.29(مؤديا

إلى استقرارها وهذا بفضل مجموعة الهيدروكسيل لنواة Chromanol -6 المكونة له وبهذا يتحول إلى جذر Alpha-TO°(Alpha- Tocophéroxyl)الثابت نسبيا.

$$\text{Alpha- TOH} + \text{LOO°/ LO°} \longrightarrow \text{LOOH} + \text{LOH} + \text{Alpha-TO°}$$

تساهم مضادات أكسدة أخرى وهي: الفيتامين C, الجلوتاثيون(100) أو ubiquinone في عملية إرجاع جذر Alpha-TO° إلى Alpha - Tocophérol ليعاد استعماله من جديد, وتجدر الإشارة إلى أن التأثير المضاد للأكسدة لهذا الفيتامين قد يتحول إلى فعل بادئ للأكسدة Pro-oxydant في حالة غياب الأنظمة الخاصة باعادة تشكيله)86.39(.



الشكل 13. إعادة تشكيل Alpha-Tocophérol من جذر Alpha- Tocophéroxyl)86(

- **الفيتامين C**

يعرف بحمض الأسكوربيك Ascorbic acid وهو من الفيتامينات الكارهة للدهون والمحبة للماء)39(. مصدره التغذية, يتواجد في الخلية على مستوى السيتوبلازم و الليزوزومات)86(.

يتدخل في عمليات الأكسدة والإرجاع على المستوى الخارجي للغشاء الخلوي كما يلعب دور المرافق الإنزيمي لعدة إنزيمات مثل Proline hydroxylase و dopamine-*B*-hydroxylase)41(. إن أهم خاصية للفيتامين C هي تواجده في ثلاث أشكال : الشكل المرجع والمتمثل في حمض الأسكوربيك, الشكل النصف المرجع (أحادي التأكسد) وهو الشكل الجذري ويعرف بـــ semidehydroascorbate أو ascorbate radical و الصورة المؤكسدة أوحمض dehydroascorbate)39(, لهذا يعتبر حمض الأسكوربيك من مضادات الأكسدة الجد فعالة فأثناء أكسدته إلى الجذر الوسطي

semidehydroascorbate ثم إلى حمض dehydroascorbate يحرر الالكترونات التي تعمل على إرجاع الجذور الحرة كجذر °OH و $O2^{-\circ}$ وبالتالي تساهم في حماية الجزيئات الحيوية للخلية من الأكسدة)41(, كما يلعب دورا مهما مع الجلوتاثيون GSH في إرجاع جذر Alpha-(Alpha- Tocophéroxyl °TO(وتحويله إلى Alpha-Tocophérol (Alpha- TOH))99.86(. يؤمن الجسم عملية تجديد لحمض الأسكوربيك بتدخل عدة إنزيمات وعوامل مرجعة, فيتم إرجاع جذر semidehydroascorbate باكتسابه للإلكترون من العوامل المرجعة مثل: GSH أو NADH بتحفيز من إنزيم NADH-semidehydroascobate في حين يتم إرجاع الصورة المؤكسدة بإنزيم dehydroascorbate reductase واستهلاك جزيئتين للـــ GSH)100.41.29(.

- **الفلافونويدات**

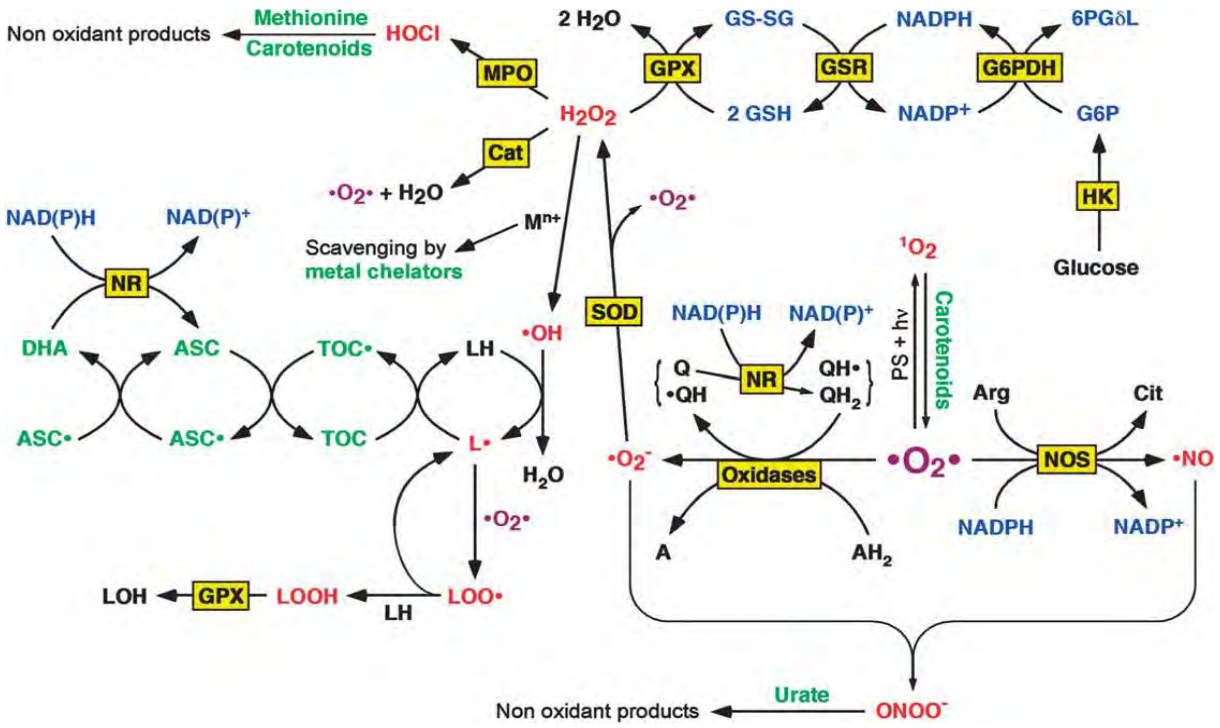
تشكل قسما معتبرا من الجزيئات البوليفينولية وهي تنتشر بشكل واسع على مستوى النباتات الراقية, عادة ما تعرف باسم الفيتامين P(100). يعتبر الدور المانع للأكسدة من أهم الفعاليات التي تبديها الفلافونويدات بيولوجيا وذلك كما يلي: أسر الجذور الأكسوجينية النشطة, التثبيط الإنزيمي ومخلبة الآثار المعدنية المولدة للـــ ROS إضافة إلى حماية الأنظمة المضادة للأكسدة الداخلية)103.102.101((الفصل VI).

- **الكاروتينويدات)beta- caroténe(**

وتسمى هذه المركبات أيضا بمولدات الفيتامين A (precursor of vitamin A ( )75(هي مجموعة من الصبغات الطبيعية كثيرة الانتشار في الطبيعة حيث تتواجد عند النباتات و الكائنات الدقيقة وهي مسؤولة عن ألوان الفواكه والنباتات. يتواجد في الطبيعة حوالي 600 نوع من الكاروتينويدات. يضم مصطلح caroténoids كل من carotènes وهي عبارة عن هيدروكربونات غير مشبعة و مشتقاتها الأكسوجينية وهي xanthophylles إضافة إلى lycopene)104(. زيادة على دورها كمولدات للفيتامين A فان الكاروتينويدات تملك قدرات مضادة للأكسدة مشابهة لتلك الخاصة بالفيتامين E فهي لواقط جيدة لجذر البيروكسيل °LOO , °OH, $^{\circ}O_2$ وكذلك الأكسجين المفرد $^1O_2$)86.27(.

- **الآثار المعدنية**

تلعب العناصر المعدنية ذات المصدر الغذائي مثل الزنك, النحاس, السيلينيوم والمغنيزيوم دورا هاما في الدفاع ضد ROS بحيث تساهم كمرافقات للأنزيمات المضادة للأكسدة ويؤدي العوز لأحد هذه العناصر أو عدد منها إلى حساسية متزايدة للإجهاد التأكسدي وظهور الأمراض المرتبطة بالجذور الحرة)67(.



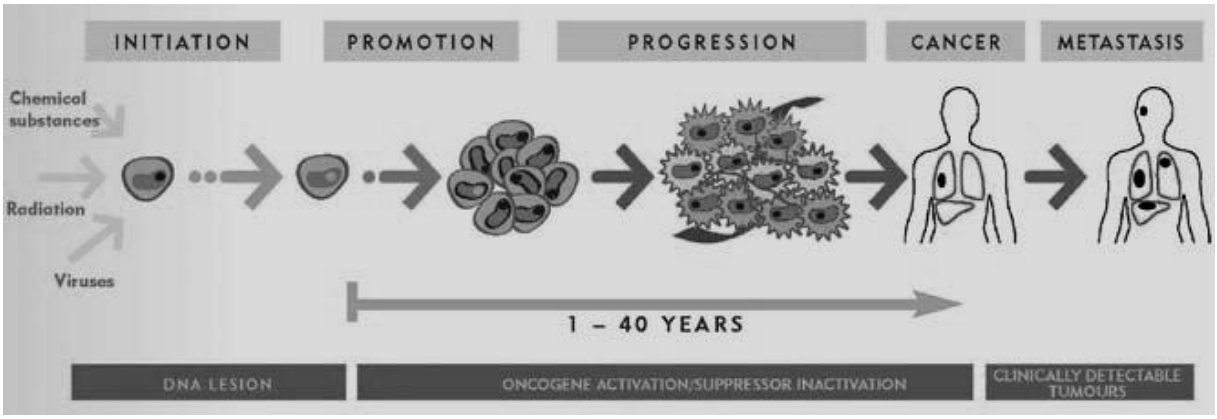
الشكل 14. مخطط يلخص مسارات تشكل ROS ونشاط مختلف مضادات الأكسدة في أسرها والتقاطها)32(.

II. مرض السرطان

1. تعريف

السرطان هو من الأمراض الأكثر انتشارا في العالم حيث يسجل سنويا 9 ملايين من الأشخاص الجدد المصابين وحوالي 5 ملايين يتوفون من هذا المرض)1(, ويحتل المرتبة الثانية في ترتيب الأمراض القاتلة بعد الأمراض القلبية (126).

يتميز مرض السرطان بحدوث طفرات في المادة الوراثية للخلايا السليمة وتحولها إلى خلايا سرطانية تتميز بانقسامها الغير محدود مما يؤدي إلى ظهور نمو أو تضخم غير طبيعي ، أو ظهور كتلة غريبة في الجسم و قدرة هذه الأخيرة على غزو Invasion أنسجة مجاورة وتدميرها، أوالانتقال إلى أنسجة بعيدة في عملية نطلق عليها اسم Metastasis (النقلية) ويتم هذا في عدة مراحل كما يوضحه الشكل 15)105.2(., وكل هذه صفات الورم الخبيث على عكس الورم الحميد، والذي يتميز بنمو محدد وعدم القدرة على الغزو وليس لهُ القدرة على الانتقال أو النقلية)106(.



الشكل15. مختلف مراحل تشكل السرطان)105(

يتم تصنيف كل نوع من السرطانات حسب النسيج الذي ينشأ منه السرطان فيسمى:

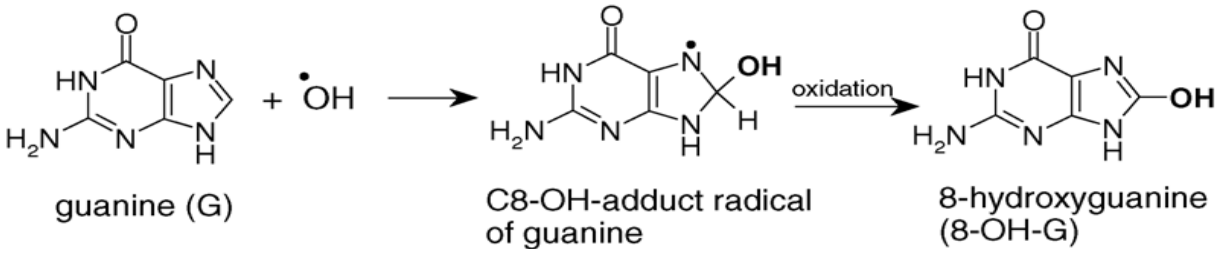
- Carcinoma عندما ينشأ من الخلايا الظهارية - Epithelial Cells- ويشكل أكبر مجموعة من السرطانات عامة، وخصوصاً سرطان الثدي, البروستات, الرئة و البنكرياس.
- Sarcoma عندما ينشأ من النسيج الضام - Connective tissue-
- Lymphoma و Leukemia عندما ينشأ من الخلايا المكونة للدم Hemapoietic cells.
- Gliomes عندما يكون منشأه الجهاز العصبي خاصة في الدماغ)106(.

2. العوامل المسببة للسرطان

يعزى تحول الخلايا السليمة إلى خلايا سرطانية إلى حدوث تغييرات في المادة الوراثية (طفرات) يتسبب فيها عدة عوامل نذكر منها:

1.2. الإجهاد التأكسدي سبب لظهور السرطان

وجد أن أغلبية العوامل الخارجية المسؤولة على ظهور السرطان مثل التدخين, الكحول, الاشعاعات المؤينة, المبيدات والعدوى الفيروسية مسؤولة كذلك على تشكيل ROS ظهور الإجهاد التأكسدي, غير أنه في الحقيقة فان هذا الأخير هو الآلية الرابطة بين مختلف هذه العوامل وظهور السرطان (107). وتتدخل ROS في ظهور السرطان نتيجة أكسدتها للقواعد الأزوتية المكونة لـــ ADN وتحريضها لطفرات مثبطة للمورثات الكابحة للأورام مثل مورثة P53 أ طفرات منشطة للمورثات المولدة لظهور الأورام Proto-oncogene)113.108.107.33(. أغلب الدراسات حول أكسدة الجذور الحرة للقواعد الأزوتية ركزت حول أكسدة قاعدة guanine بجذر °OH وتشكيل 8-hydroxyguanine 8-OH-Dg(كما هو موضح في الشكل 16, وتتضمن الطفرة الناتجة عن هذه القاعدة المؤكسدة الانتقال من زوج القاعدة GC إلى الزوج TA وهذا بعد التضاعف بحيث أن القاعدة المؤكسدة 8OHDg عوض أن تشكل رابطة مع السيتوزين فإنها ترتبط مع الأدنين)111.110.109.27.5(ولوحظت هذه الطفرة في كل من المورثة الورمية ras وكذا في المورثة الكابحة لظهور الأورام p53 وهذا في كل من سرطان الرئة والكبد)111(. وتشكل 8-OH-Dg مؤشر بيولوجي لتشكل السرطان (biomarker of carcinogenesis))110(.

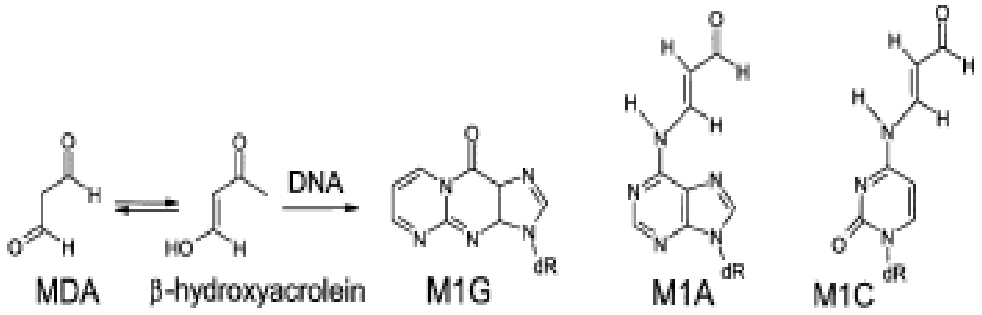


الشكل 16. أسس قاعذة guanine بجذر الهيدروكسيل °OH)27(

كما يمكن للجذور الحرة أن تحدث طفرات بطريقة غير مباشرة وذلك من خلال تفاعل أحد نواتج أكسدتها للبيبيدات والمتمثلة في MDA مع القواعد الأزوتية المكونة لـــ ADN حيث يمكنها أن تتفاعل مع كل من قاعدة الأدنين, الغوانين والسيتوزين فينتج كل من المركبات التالية)109.110(:

- M1G dG [pyrimido[1,2-a]purin-10(3H)-one]
- M1A dA [N6-(3-oxopropenyl) deoxyadenosine]
- M1C dC [N4-(3- oxopropenyl) deoxycytidine]

أثبتت الدراسات أن MDA تحدث الطفرات بنسبة مرتفعة في الخلايا البكتيرية وخلايا الثدييات وأنها جد مسرطنة عند الجرذان)109(.



الشكل17. تفاعل MDA مع القواعد الأزوتية لـــ ADN)110(

2.2. العوامل المسممة للمورثات- Génotoxic Agents-

وهي عبارة عن مواد مُطفِرة (أي بإمكانها إحداث طفرات) وتعرف بالمواد المسرطنة وتكون إما كيميائية أو فيزيائية)108(.

1.2.2. المواد المسرطنة الكيميائية

وهي نشطة في حالتها الطبيعية لكن في كثير من الأحيان يكون نشاطها بعد تحولها الحيوي, وهي عديدة ونذكر منها)108(:

- الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات مثل benzo[a]pyrène المتواجد في دخان التبغ)107.108. 112.114(.

- الأمينات العطرية المتواجدة في دخان التبغ)112.108.107(
- النيتروزامينات nitrosamines اىَخاّجذة فلًَىح ٌه ٍِشقِاثاىٍْ ِىح ٍ فً دخ ا اوِخك)114.108.107(.
- الأفلاتوكسين ب1 Aflatoxin B وهو سم فطري يلوث الأغذية (الشعير, الذرة ,الأرز و الفول السوداني))112.108(.

2.2.2. المواد المسرطنة الفيزيائية

وتتمثل في مختلف الاشعاعات مثل:

- الأشعة المؤينة كالأشعة α, β, γ و X)118.108.107(
- التعرض إلى أشعة الشمس الفوق بنفسجية قد تؤدي إلى حدوث سرطانات)108.107.3(.

3.2. العدوى الفيروسية

حوالي 15% من السرطانات تحدث بسبب عدوى فيروسية و تعد هذه الأخيرة السبب الثاني بعد التدخين، في الإصابة بالسرطانات الكبدية و سرطان عنق الرحم ومن أهم الفيروسات المرتبطة بالسرطانات هي فيروس الورم الحليمي البشري , الالتهاب الكبدي الوبائي ب)HBV(, الالتهاب الكبدي الوبائي سي)HCV(, فيروس EBV (Epstein-Barr virus) فَيْروسُ اللِّمْفومةِ وابْيضَاض الدَّم البَشَريّ)116.115.107(. وتحفز الفيروسات ظهور السرطان بأليتين:

- يحمل الفيروس جين يحفز إنتاج بروتين من المورثة الورمية وعندها تتحول الخلية السليمة إلى خلية سرطانية.
- يندمج جينوم الفيروس في مكان قريب من المورثة الورمية في الخلية السليمة, وبما أن الفيروس يقوم بتشفير جيناته، فبسبب تجاور الجين الفيروسي و المورثة الورمية يتم أيضا تشفير هذه الأخيرة. ولكن هذه الآلية هي نادرة الحدوث لأن في الغالب يكون التحام الفيروس عشوائي مع جينوم الخلية المصابة.

وقد تم اكتشاف علاقة بين سرطان المعدة و بكتيرية *Helicobacter pylori* والتي تُحدث التهاب في جدار المعدة وقد تؤدي إلى إصابتها بالسرطان)117(.

4.2. الخلل الهرموني

قد يحدث الخلل الهرموني آثار تشابه آثار المسرطانات غيرالمطفرة (Epigenetic (non-genotoxic)27(فهي تزيد من سرعة نمو الخلايا, ومن أكثرها انتشارا سرطان الثدي وسرطان غدة البروستات وتلعب الهرمونات الجنسية دور كبير في ظهورها وتطورها. كما يتدخل هرمون الغدة الدرقية TSH في ظهور وتطور سرطان هذه الغدة)3(.

5.2. التغيرات الوراثية

وهي ناتجة عن حدوث خطأ عشوائي في نسخ الحمض النووي DNA عند التضاعف أو عند تصحيح ADN)108.3(.

3. الآلية الوراثية لتشكل السرطان

إن المورثات الطافرة المسؤولة على تحول الخلايا السليمة إلى خلايا سرطانية هي تلك المورثات المتدخلة في الفعاليات الحيوية للخلية, وتخص تلك المتدخلة في تصحيح الأخطاء الناتجة عن تضاعف ADN، تنظيم الدورة الخلوية، الموت الخلوي المبرمج , التمايز الخلوي والشيخوخة الخلوية. ويتم إحصاء أكثر من 100 مورثة لها القدرة على تشكيل السرطان وهذا بعد حدوث طفرات بها. وتصنف هذه المورثات إلى نوعين)108(:

- **مورثات Proto-oncogenes (3)** والتي تحفز نواتجها التضاعف الطبيعي وتنظيمه و التمايز الخلوي فهي تشفر بروتينات تتدخل أساسا في (108):
  - المراقة الايجابية للدورة الخلوية
  - المراقبة السلبية للموت الخلوي المبرمج
- **مورثات كابحة للورم (3)** وتثبط نواتجها التضاعف والتمايز الخلوي, فهي تشفر بروتينات تساهم في (108):
  - المراقة السلبية للدورة الخلوية
  - المراقبة الايجابية للموت الخلوي المبرمج
  - تصحيح أخطاء تضاعف ADN

فحدوث طفرات منشطة لمورثة Proto-oncogenes يؤدي إلى تحولها إلى مورثات ورمية وبالتالي التغير في الوظائف الطبيعية لها إما بزيادة معدل البروتين المعبرة عليه (طفرة كمية) أو بالتعبير عن بروتين يملك خواص جديدة فيكون أكثر نشاطا أو نشط باستمرار (طفرة نوعية), كما أن الطفرات المثبطة للمورثات الكابحة للأورام تؤدي إلى الفقد الجزئي أو الكلي للوظيفة الطبيعية للمورثة من خلال عدم التعبير أو خفض التعبير عن البروتين (طفرة كمية) أو تشفير بروتين أقل نشاطا (طفرة نوعية) هذا ما يؤدي إلى تحول الخلايا السليمة إلى الخلايا سرطانية (108).

4. تشخيص السرطان

لاتوجد اختبارات بيولوجية تسمح بالتأكيد على الإصابة بالسرطان باستثناء بعض المعايرات الدموية مثل معايرة Alpha foeto-proteine (1) غير أن تشخيص المرض يتم عن طريق أعراضه والمتمثلة في:

- **أعراض موضعية:** تكون كتلة أو ظهور ورم غير طبيعي، نزيف، ألام و ظهور تقرحات, بعض السرطانات قد تؤدي إلى اصفرار العين والجلد كما في سرطان البنكرياس.
- **أعراض النقلية:** تضخم العقد الليمفاوية، و تضخم في الكبد Hepatomegaly، وجع في العظام.
- **أعراض تظهر بجميع الجسد :** انخفاض الوزن، فقدان للشهية، تعب وإرهاق، التعرق خصوصا خلال الليل، حدوث فقر دم (106.1).

ولكن يبقى التشخيص النهائي عن طريق الفحوصات الإشعاعية وأكثر من ذلك فحص الأخصائي الباثولوجي وذلك من خلال أخذه لعينة Biopsy ليتم التعرف على درجة السرطان و مرحلته وهذا لأجل تحديد نوع العلاج(1).

5. علاج السرطان

بما أن مرض السرطان عبارة عن مجموعة من الأمراض، لذا فالعلاج عبارة عن مجموعة من العلاجات مثل الجراحة Surgery، العلاج الكيميائي Chemotherapy العلاج الإشعاعي Radiotherapy وعلاجات أخرى, و يُختار علاج كل حالة حسب مكان السرطان, درجته, مرحلته و حالة المريض.

1.5. العلاج الكيميائي – Chemotherapy –: هو علاج السرطانات بالأدوية الكيميائية (أدوية مضادة للسرطان Anticancer Drugs) وهي عبارة عن أدوية بإمكانها إعاقة تكاثر الخلايا الورمية كما تؤثر على جميع الخلايا المتميزة بالانقسام السريع (9.7).

2.5. العلاج الإشعاعي – Radiotherapy–

هو استخدام قدرة الأشعة في تأين الخلايا السرطانية لقتلها أو لتقليص أعدادها و يتم تطبيقه على جسم مريض من الخارج ويسمى بعلاج حزمة الأشعة الخارجي External beam radiotherapy أو يتم تطبيقه داخل جسم المريض عن طريق العلاج المتفرع Branchytheray. تأثير العلاج الإشعاعي تأثير موضعي و مقتصر على المنطقة المراد علاجها حيث يعمل على تدمير المادة الوراثية للخلايا وبالتالي إيقاف انقسامها. ويعتبر تأثيره على الأنسجة المجاورة السليمة أهم أثر جانبي لهذا النوع من العلاجات.

3.5. العلاج الجراحي– Surgery-

نظريا، السرطانات الصلبة يمكن شفائها بإزالتها عن طريق الجراحة، مثل جراحة استئصال الثدي Mastectomy أو جراحة أستئصال البروستات Prostactomy ويتم إزالة الجزء المصاب بالسرطان أو قد تتم إزالة العضو كله حيث أن خلية سرطانية مجهرية واحدة تكفي لإنتاج سرطان جديد، وهو ما يطلق عليه الانتكاس Recurrence. لكن عند انتشار السرطان وتنقله إلى أماكن أخرى في الجسم يجعل العلاج الجراحي غير مجدي (106).

6. مضادات السرطان وسميتها

1.6. تعريف مضادات السرطان

تعرف مضادات السرطان (Anticancer Drugs), على أنها الأدوية التي تعيق تكاثر الخلايا الورمية, حيث أنها تؤثر في مختلف مستويات الدورة الخلوية: الطور M,G1,G2,S من الدورة الخلوية. فبعض هذه الأدوية تؤثر دون تفريق على كل خلايا الدورة الخلوية سواء في طور الانقسام M أو في طور الراحة G0, مشتقات أخرى تؤثر على الخلايا في طور الانقسام مهما كان الدور دون المساس بالخلايا في طور الراحة G0 وتعرف بـــ cycle dependent والمجموعة الأخيرة تؤثر على دور واحد من الدورة الخلوية وتعرف بـــ phase dependent (9).

2.6. أنواع مضادات السرطان

وتصنف تبعا لموقع تأثيرها إلى:

- مضادات المستقلبات
- العوامل المؤثرة على مستوى DNA
- عوامل مؤثرة على الوظائف الخلوية (120.10).

1.2.6.مضادات المستقلبات -Antimetabolites-

هي عبارة عن أدوية لها تركيب مشابه لتركيب المواد الأيضية والمرافقات الإنزيمية المتدخلة أثناء عمليات التركيب الحيوي للأحماض النووية والبروتينات ويكون تأثير هذه الأدوية عن طريق التثبيط التنافسي ونذكر منها: مضاداتGlutamine ,مشابهات القواعد البيورينية و البيريميدية (120.10.9.7).

2.2.6. العوامل المؤثرة على مستوى DNA

وتعمل على تثبيط تخليق الأحماض النووية وهي نوعين:

- **العوامل المؤلكلة – Alkylating agents–:** هي مواد ذات طبيعة كيميائية جد متنوعة, تتميز بامتلاكها مجاميع الكتروفيلية. تؤثر هذه العوامل إما على مستوى قواعد guanine أو مجاميع الفوسفات مؤدية إلى إعطاء قواعد مغايرة, كما يمكن أن تشكل روابط تكافؤية بين قواعد نفس السلسلة أو السلسلتين المكملتين لبعضهما البعض وحدوث كسور مما يؤدي إلى إتلاف عملية تضاعف DNA وأحيانا الموت الخلوي ومن أمثلتها Aziridines ,مشتقاتNitrogen mustards , Alkyl sulfonates و مشتقات methylhydrazine (120.10.9.7).
- **Intercalating agents:** أدوية ذات تركيب وشكل يسمحان لها بالتوضع موازية لمستويات أزواج قواعد DNA (A-T, G-C). تؤدي إلى تشكيل روابط تكافؤية ثابتة مع DNA مما ينتج عنه تغير تداخل جزيئات DNA مع كل البروتينات التي ترتبط بها : DNA and RNA polymerases, المستقبلات الهرمونية , Topoisomerase II, إنزيمات تصليح DNA وغيرها وبهذا فهي تثبط عمليتي التضاعف والاستنساخ ومن هذه العوامل نذكر المضادات الحيوية وخاصة Anthracyclineمثل doxorubicin و daunorubicin ومضادات حيوية أخرى (120.10.9.7).

3.2.6. مركبات مؤثرة على الوظائف الخلوية(120.10.9.7).

- **مثبطات بلمرة tubuline (مضادات الانقسام):** هي مثبطات المغزل الخلوي اللالوني التي توقف الانقسام الخلوي في الطور الاستوائي, تؤثر على بروتين ثنائي الجزيئات مشكل من تحت وحدتين يعرف بـــ tubuline حيث تثبط بلمرته إلى microtubulines التي تشارك في تركيب المغزل أثناء الانقسام الخلوي, من هذه المركبات القلويدات المعزولة من *Vinca rosea* مثل Vinblastine و Vincristine ومركب Taxol, المستخلص من خشب *Taxus brevifolia*.
- **الإنزيمات المضادة للأورام:** مثل الإنزيم المضاد للأكسدة SOD حيث يمكن أن يستخلص الشكل Cu-Zn SOD من كبد وكريات الدم الحمراء للعجل. وتأثيره الأساسي هو تعديل كمية الجذور الحرة الأكسوجينية المتشكلة أثناء تشكل الأورام وتحت تأثير الأدوية المستعملة كمضادات للسرطان كا streptozotoxine , doxorubicine.

3.6. سمية مضادات السرطان

تتميز مضادات السرطان بأنها قليلة الاختيارية فنظرا لكون الأهداف الجزيئية لهذه الأدوية عبارة عن عناصر بيوكيميائية لا تختلف عن تلك الموجودة بالخلايا السليمة, فان السمية الخاصة لهذه الأدوية تظهر على كل الخلايا وتكون التأثيرات غير نوعية خاصة على الأنسجة ذات التجديد السريع (نخاع العظم, الخلايا الدموية, مخاطية الجهاز الهضمي والحويصلات الشعرية....) (120.12.10.9.7).

1.3.6. التأثيرات الغير نوعية الأساسية

- **سمية دموية– Hematological Toxicity -:** تتمثل في إصابة النسيج المكون للدم مؤدية إلى انخفاض العناصر المصورة له مثل: قلة كريات الدم البيضاء – Leucopenia-, قلة الصفائح الدموية – Thrombopenia- وفي بعض الحالات يكون التسمم حادا ويبرز في الضمور النخاعي - medullary aplasia- الذي من مظاهره فقر الدم والنزيف.
- **سمية هضمية– digestive Toxicity** -: وتتمثل مظاهرها في الغثيان, القيء و الإسهال.
- **سمية جلدية– مخاطية– Cutaneo – Mucous Toxicity:** اسوداد الجلد, التهاب غشاء الفم والبلعوم و سقوط الشعر لإصابة الجريبات الشعرية.

- **سمية مثانية- Vesical Toxicity-** وتتميز ببولة دموية.
- **التثبيط المناعي: - Immuno-Depressor Effect-** للعديد من مضادات السرطان خصائص تثبيطية مناعية,حيث أن استعمالها يمكن أن يرافق بعدوى بكتيرية عالية, إصابات فطرية أو فيروسية.
- **سمية تناسلية- Gonadic Toxicity-** تسبب مضادات السرطان عند الرجل اصابة النسيج الظهاري التوالدي (الأنابيب المنوية) فبإمكانها أن تسبب ضمور خلوي وفقد الحيوانات المنوية, أما عند المرأة فتؤدي إلى قصور مبيضي مؤديا إلى انقطاع الحيض (120.12.10.9.7).

2.3.6. التأثيرات النوعية

- **سمية قلبية -cardiac Toxicity-**

وهي مؤكدة بالنسبة لـــ anthracyclines وتشمل:

-**سمية مبكرة:** تتميز بتسارع خفقان القلب tachycardia والانقباض الزائد للقلب.

-**سمية متأخرة:** تتمثل في التهاب عضلة القلب وتقلص عضلي قلبي خطير.

- **سمية عصبية- Neurological Toxicity-**

تظهر إصابات على مستوى الجهاز العصبي المحيطي عند استعمال vincristine.

- **سمية رئوية- pulmonary Toxicity-**

تتمثل في حدوث تليف رئوي عند استعمال bliomycine.

- **سمية كلوية – Renal Toxicity-**

تتميز بارتفاع creatininemia بصورة خاصة مع cisplatin.

- **سمية كبدية- Hepatic Toxicity-**

تتميز بارتفاع Transaminases والتليف الكبدي عند المعالجة بـــ methotrexate (120.12.10.9.7).

III. Doxorubicin والسمية القلبية

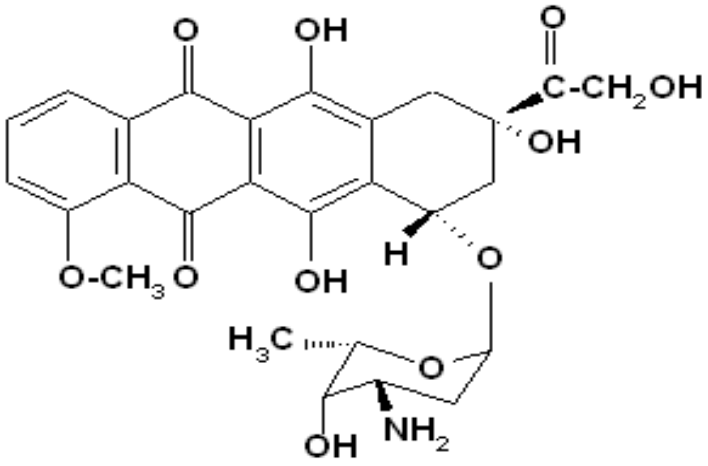
1. Doxorubicin

1.1. تعريفه وبنيته الكيميائية

DOXO دواء مضاد للسرطان, يعرف أيضا بـــ Adryamycin أو Adriblastin ويستخدم في العلاج الكيميائي لأنواع عديدة من الأورام السرطانية كسرطان الثدي, سرطان المبيض, سرطان الدم وأنواع أخرى من السرطانات. وهو مضاد حيوي سكري من طائفة الأنثراسايكلين Anthracycline, تنتجه طبيعيا خميرة *Streptomyces peucetius var caesius* حيث تم عزله أول مرة عام 1960 وأصبح من الممكن الآن صناعته كيميائيا)125.124.123.122.121(. من الناحية الكيميائية يعرف DOXO بـــ

(1S, 3S) -3-glycoloyl-1,2, 3, 4, 6,11-hexahydro-3, 5,12-trihydroxy-10-methroxy-6,11-dioxonaphtacen-1-yl-3-amino-2, 3,6-trideoxy-a-L-lyxopyranoside Hydrochloride.

وتتمثل صيغته الإجمالية بـــ $C_{27}H_{29}NO_{11}H\ Cl^-$ أما وزنه الجزيئي فيقدر بـــ 580, وهو مكون من أربع حلقات Tetracycline مرتبطة برابطة سكرية مع السكر الأميني daunosamine,. تتميز بنيته بوجود كل من نواة الكينون Quinone والهيدروكينون Hydroquinone والتي تجعل جزيء DOXO قابل لفقد أو اكتساب الالكترونات, كما تنسب لهما أيضا خاصية حجز الأيونات المعدنية واللون الأحمر لهذا المركب)126(.



الشكل 18. البنية الكيميائية لـــ Doxo)129.128.127(

2.1. الحركية الصيدلانية لـــ DOXO

1.2.1. امتصاص وتوزيع DOXO

إن امتصاص DOXO عند إعطائه عن طريق الفم ضعيف جدا لذلك فانه يحقن داخل الوريد فيتواجد مباشرة في البلازما حيث يرتبط بالبروتينات البلازمية بنسبة 75% وخاصة بالألبومين بنسبة 74%. خُصع DOXO بسرعة إلى مختلف أنسجة الجسم أين يتركز في أنوية الخلايا, فيتواجد بتركيز عالي في كل من الكبد, القلب, الرئتين, الكلى, الطحال و الأمعاء الدقيقة بينما يكون بتركيز ضعيف في الدماغ (130.126).

2.2.1. التحول الحيوي لـــ DOXO و طرحه

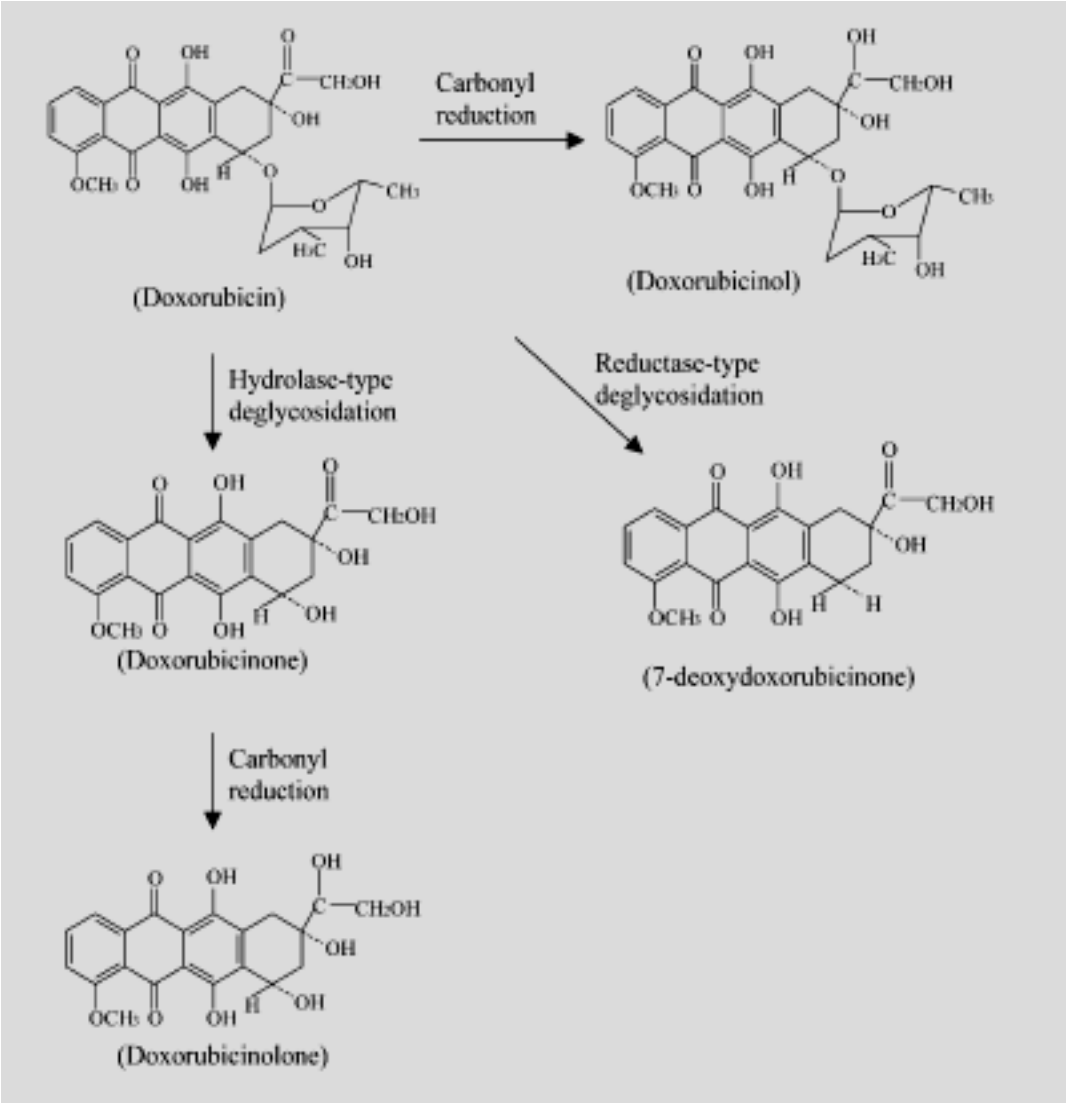
يتم التحول الحيوي لـــ DOXO أساسا على مستوى الكبد وهي عملية جد معقدة وتتضمن عدة تفاعلات من أهمها:

- إرجاع وظيفة الكربونيل (C=O) لذرة الكربون 13 للسلسلة الجانبية لـــ DOXO إلى الوظيفة الكحولية (OH) وهذا بتحفيز من الإنزيم السيتوبلازمي NADPH-dependent aldo-keto reductase وبذلك يتشكل المستقلب الكحولي C13 hydroxy Doxorubicine والمسمى بـــ doxorubicinol وهو المستقلب الأساسي لهذا الدواء, كما يحتفظ بالنشاط المضاد للسرطان (132.131.122.125.123) وتجدر الإشارة إلى أن هذا المستقلب يتشكل أيضا بإنزيم Carbonyl reductase المتواجد في سيتوبلازم الخلايا القلبية وله تأثير تسممي كبير على العضلة القلبية أكبر من ذلك الخاص بـــ DOXO (131.122).
- نزع الجزيء السكري déglycosylation وذلك بتحفيز من إنزيم NADPH dependent cytochrome P450 reductase فيتشكل Hydroxy aglycones أو Deoxy aglycones (128.125.122).

إلى جانب هذه التفاعلات الأساسية نميز تفاعلات إضافية أخرى نذكر منها تفاعلات التزاوج إما بإضافة مجموعة سيلفات O-sulfation أو مجموعة جليكورونيك O-B-glucoronidation وتفاعل نزع مجموعة الميتيل O-Demethylation.

تعتبر الصفراء هي المسار الأساسي لطرح DOXO ومستقلباته(123.122). تطرح أكبر نسبة من هذا الدواء بعد 24–48 ساعة من حقنه على شكل DOXO أو doxorubicinol, في حين أنه بعد 48

ساعة يطرح على شكل متزاوج مع sulfates و glucoronides. لوحظ أقل من 10%من هذا الدواء في البول)126(.



الشكل 19. التحول الحيوي لـــ Doxo)122(

3.1. آلية تأثير DOXO

يدخل DOXO إلى الخلية وينتقل إلى النواة)130(أين يؤثر على مستوى الحمض الريبي النووي المنقوص الأكسجين ADN وذلك بعدة آليات نذكر منها:

1.3.1. التداخل مع القواعد الآزوتية لـــADN

يمكن لـــDOXO وبالضبط الجزء الغير سكري aglycone أن يتوضع بين القواعد الآزوتية لـــADN بشكل عمودي على محور الحلزون المزدوج intercalation (124. 148) مما يؤدي إلى تغير البنية ثلاثية الأبعاد لـــ ADN ويعيق بذلك ارتباط الإنزيمات به, كإنزيمات التضاعف ADN polymérase, إنزيمات الاستنساخ ARN polymérase, إنزيمات تصليح ADN ... وعليه تكبح عمليتي التضاعف والاستنساخ)126.121(.

2.3.1. تثبيط إنزيم Topoisomérase II

يعمل إنزيم Topoisomérase II على فض حالة الالتفاف الزائد لجزيء ADN وذلك بشطر فرعي الحلزون المزدوج, مما يسمح بتداخله مع مختلف الإنزيمات المساهمة في عمليتي التضاعف والاستنساخ)134(.

يرتبط DOXO بالمعقد Topoisomérase II - ADN بروابط تكافؤية ثابتة (غير عكسية) فيتشكل المعقد الثلاثي Topoisomérase II - ADN - DOXO وهو ثابت وغير عكسي, وبذلك يتثبط إنزيم Topoisomérase II مما يكبح صناعة كل من ADN و ARN هذا الذي يؤدي إلى الموت الخلوي)121 .) 156.148.123 .133.125.124

3.3.1. تثبيط إنزيم Helicase

يعمل إنزيم الهيليكازعلى إزالة التحلزن بحيث ينتقل على طول خيط ADN المزدوج ويقوم بفتح السلسلتين من خلال كسر الروابط الهيدروجينية)134(. بينت دراسات حديثة تثبيط DOXO لهذا الإنزيم.

كما يمكن لـــ DOXO أن يؤثر على الخلية السرطانية من خلال مساهمته في تشكيل الجذور الحرة هذه التي تؤدي إلى إتلاف ADN والأغشية الخلوية ,غير أن إنتاج هذه الأخيرة يمثل إحدى الآليات الأساسية في السمية القلبية لهذا الدواء)133.121(.

2. آلية السمية القلبية لـــ DOXO

مازال استخدام DOXO محدودا بسبب سميته القلبية المرتبطة بالجرعة والتي تكون إما حادة أو مزمنة (138.137.136.135). فتظهر السمية القلبية الحادة خلال الساعات الأولى من الحقن الوريدي لـــ DOXO ومن أعراضها نميز غثيان, تقيؤ, اضطراب في ضربات القلب و تسارعها, التهاب التأمور إضافة إلى انخفاض في ضغط الدم وهي أعراض انتقالية وعابرة (138.124). أما السمية المزمنة فتظهر خلال السنة الأولى للعلاج أو بعد سنوات من نهايته ومن أبرز أعراضها السريرية التلف التدريجي للبطين الأيسر للقلب. وقد تبين أن السمية المزمنة لهذا الدواء مرتبطة بالجرعة المتراكمة له. ففي دراسة حديثة تمت على 630 مريض كانت نسبة الخطورة متعلقة بكمية الجرعة المتراكمة فقدرت بنسبة 26% لجرعة متراكمة قدرها 550 مغ/ م2 و 48 % لجرعة قدرها 700 مغ/م2.

إن التأثير السام لـــ DOXO على خلايا العضلة القلبية لايعتمد على تثبيط صناعة ADN لأن هذه الخلايا لا تتضاعف (144), غير أنه يسبب السمية القلبية بعدة آليات نذكر منها:

- تشكيل الجذور الحرة
- ارتفاع في تركيز أيونات الكالسيوم Ca_2^+ الداخل سيتوبلازمي
- التغير في التعبير عن مورثات خلايا العضلة القلبية
- تحريض الموت الخلوي المبرمج
- تغير وظيفة غشاء الميتوكندري (156 .143.140.138.133.15).

1.2. الجذور الحرة والسمية القلبية لـــ Doxo

تتدخل الجذور الحرة الناتجة عن DOXO في نفس الوقت في الآلية المضادة للسرطان والآلية السمية (121) و يعد تأثيرها المضاد للسرطان ثانوي مقارنة بتأثير DOXO على ADN وإنزيم Topoisomerase II.

يعد تشكيل الجذور الحرة من أهم الآليات المسببة لسمية DOXO (153.152.151.150.146.124) وتعتبر خلايا العضلة القلبية أكثر حساسية لهذه الجذور مقارنة بباقي الأعضاء الاستقلابية الأخرى كالكبد و الكلى وهذا راجع إلى:

- جاذبية DOXO المرتفعة للـــ Cardiolipine وهو من الفوسفوليبيدات العديدة عدم التشبع والمتواجدة أساسا في الغشاء الداخلي لميتوكندري خلايا العضلة القلبية مما يؤدي إلى تراكم هذا الدواء في نسيج هذا العضو)160.148.147.136.128.121(.
- المستوى المنخفض للإنزيمات المضادة للأكسدة (CAT,GST وGpx...) في القلب مقارنة بتلك الموجودة في أعضاء أخرى كالكبد)145.138.136.121.15. 154. 156(.
- الاستقلاب التأكسدي المرتفع للخلايا القلبية)121(.
- المستوى المرتفع للإنزيمات Reductase ، Dehydrogenase مثلNADP dehydrogenase و nitric oxide synthase)NOS(و التي تلعب دور مهم في تشكيل الأنواع المؤكسدة وهذا بتحويلها للالكترونات)139.128(.

وتتشكل الجذور الحرة الناتجة عن DOXO وفق مسارين أحدهما إنزيمي والآخر معتمد على أيونات الحديد)147.145.141.136.15(.

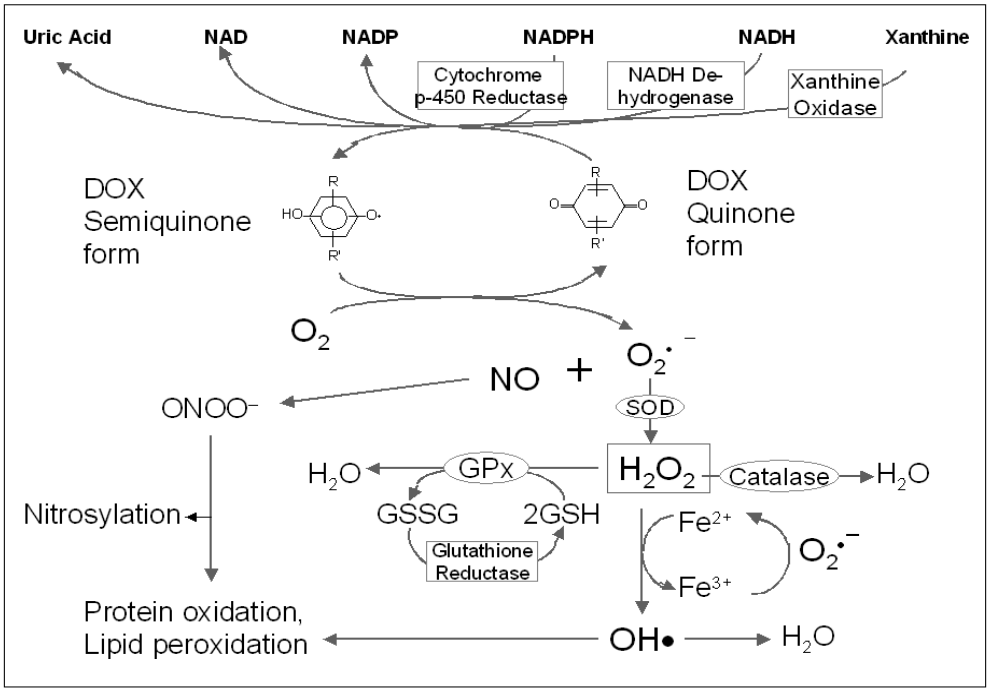
1.1.2. المسار الإنزيمي

الخلايا القلبية غنية بعضيات الميتوكندري بحيث تشكل نسبة قدرها 40 % من الحجم الإجمالي الداخل خلوي, وتؤدي جاذبية DOXO المرتفعة للفوسفوليبيد الغشائي لهذه العضيات (Cardiolipine) إلى تراكم هذا الدواء بداخلها.

في ميتوكندري الخلايا القلبية يواجه DOXO تفاعل أكسدة وإرجاع بحيث يتم إرجاع مجموعة الكينون quinone- – لهذا الجزئ بتدخل عدة جزيئات معطية للإلكترون مثل: NADPH بتحفيز من إنزيم Cytochrome P450 reductase , NADH بتحفيز من إنزيم NADH déhydrogénase (Complexe I للميتوكندري) و Xanthine بتحفيز من إنزيم Xanthine oxidase فينتج بذلك جذر semi-quinone هذا الذي لايلبث إلا أن يتفاعل مع الأكسجين الجزيئي O_2 مشكلا بذلك أنيون فوق الأكسجين $O_2^{\circ-}$ وبالتالي يتم استرجاع شكل الكينون لـــ DOXO)148.142.138.128.124. 121(.

إن حلقة أكسدة و إرجاع DOXO بين شكل quinone و semi-quinone يؤدي إلى تخليق نسبة مرتفعة من $O_2^{\circ-}$ والذي بدوره يساهم في تشكيل المجاميع الأكسوجينية والنيتروجينية النشطة والتي تتضمن كل من H_2O_2, OH°, $ONOO^-$ كما هو موضح في الشكل20)155. 148.128.15(.

وكل هذه العوامل وخاصة جذر OH° جد سامة لمكونات الخلية فبإمكانها التفاعل مع الليبيدات, البروتينات و الأحماض النووية فينتج عنها الأكسدة الليبيدية, حذف مجاميع SH –Sulfhydryl– للبيبتيدات وإتلاف ADN)136(.



الشكل 20. المسار الإنزيمي لتشكيل الجذور الحرة ابتداء من DOXO)138(.

2.1.2. المسار المعتمد على أيونات الحديد

تتشكل الجذور الحرة وفق هذا المسار بآلية غير إنزيمية حيث يتفاعل DOXO مع أيونات الحديد الداخل خلوي وذلك بعد ما يحررها من بروتين Feritin والذي يعتبر من أهم البروتينات المخزنة لهذه الأيونات)128(.

ترتبط أيونات الحديد الثلاثي Fe^{3+} مع الوظيفتين الكيتونية والهيدروكسيلية في الموقع C11 و C12 لجزيء DOXO ويتبع هذا التداخل بتفاعل أكسدة و إرجاع داخل المعقد حيث يتم إرجاع Fe^{3+} إلى Fe^{2+} باكتسابه لإلكترون من المجموعة الهيدروكسيلية لـ C14 فينتج بذلك الجذر الحر المعقد

Fe^{2+} – DOXO هذا الأخير الذي يعمل على إرجاع O_2 إلى أنيون فوق الأكسجين $O_2^{\circ -}$ وبالتالي تخلق باقي المجاميع الأكسوجينية الأخرى)148.143.138.124.121. 159(.

2.2. الآلية المعتمدة على ارتفاع أيونات الكالسيوم

بينت عدة دراسات اختلال في مستويات الكالسيوم بعد المعالجة بمضاد السرطان DOXO, هذا الذي يعمل على تحفيز تحرير ايونات Ca^{+2} من الشبكة الأندوبلازمية وذلك من خلال التثبيط الانتخابي في التعبير عن مورثتي كل من إنزيم Ca^{+2} -ATPase وقناة نقل الكالسيوم مما يؤدي إلى ارتفاع في معدل هذه الأيونات داخل السيتوبلازم ويسمح بتنشيط الإنزيمات المحللة للبروتينات والليبيدات المعتمدة في نشاطها على الكالسيوم (protéases et lipases Ca^{+2} dépendant))124.15(وبما أن الكالسيوم Ca^{+2} يلعب دور مهم في حلقة التقلص والاسترخاء لعضلة القلب لذا فان اختلال التوازن الداخلي لهذا الأيون يؤدي إلى قصور قلبي)148.136.121(.

3.2. التغير في التعبير عن مورثات خلايا العضلة القلبية

أثبت في مزارع خلوية لخلايا عضلية قلبية بأن DOXO يخفض انتخابيا من التعبير على المورثات المشفرة للبروتينات المتدخلة في تقلص هذه الخلايا كبروتين Troponine I, بروتين السلسلة الخفيفة للميوزين, بروتين الأكتين وإنزيم الكرياتين كيناز الخاص بالعضلة القلبية, وتعتبر هذه التأثيرات من بين الانعكاسات المبكرة للسمية القلبية DOXO)136.15(.

4.2. تحريض الموت الخلوي المبرمج – Apoptose -

يحرض DOXO الموت الخلوي المبرمج لبعض الخلايا السرطانية وخلايا أنسجة أخرى كخلايا الشعر, مخاطية الأمعاء وأنسجة أخرى. ويشكل الموت الخلوي المبرمج لخلايا العضلة القلبية أحد الآليات المسببة للسمية القلبية الغير عكسية لهذا الدواء بسب عدم قدرتها على التجديد)163.162. 161.148.136.124.149(.

بالإضافة إلى كل هذه الآليات يساهم DOXO بعدة آليات أخرى في السمية القلبية نذكر منها:

- DOXO يؤدي إلى زيادة معدل الكاتيكول أمينات في الدم مسببا بذلك إلى اضطراب في دقات القلب)157.15(.

- DOXO يحرر السيتوكينات المسببة للسمية القلبية مثل عامل نخر الورم TNF و IL2 (15).
- تراكم doxorubicinole الناتج عن استقلاب DOXO بتحفيز من إنزيم Carbonyl reductase (CR) في نسيج القلب (151.124.121) وهو أكثر سمية من المركب الأصلي, حيث تبين تأثيره في تثبيط إنزيمات الشبكة الأندوبلازمية Ca^{+2}-ATPase, Na^+/K^+ ATPase, H^+ − ATPase (158).

VI. الفلافونويدات

مدخـــــل

اهتم الباحثون في حقل المنتجات الطبيعية بالمركبات التي تتصف بالخاصية الفينولية وذلك لتعددها وتباين الهياكل البنائية لها, من هذه المركبات آخذت الفلافونويدات حيزا كبيرا من اهتمام الباحثين باعتبارها من أهم المجموعات الفينولية والقسم البالغ الأهمية من نواتج الأيض الثانوي التي تحدث في جميع خلايا وأنسجة النباتات)164(.

اكتشفت الفلافونويدات من طرف عالم الكيمياء الحيوية Albert Szent – gyorgyi عام 1938والذي صنفها على أساس أنها فيتامين P وأدرك أنها تزيد وتعزز من دور الفيتامين C)165. 166(.

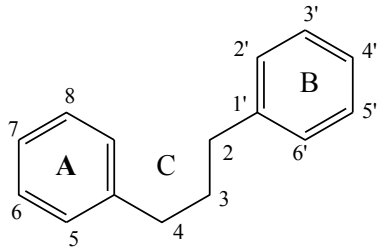
أما كلمة فلافونويد فقد أدخلت عام 1952 من طرفGeissman إشارة إلى جميع الصبغات التي تملك الهيكل القاعدي)C6-C3-C6(المكون من حلقتين عطريتين C6 (A ,B) ترتبطان بسلسلة من ثلاث ذرات كربون C3)167(. والمصطلح في اللغة الأجنبية flavonoids مشتق من الكلمة اليونانية Flavus وتعني اصفر, وهي عبارة عن صبغات نباتية صفراء مسؤولة على ألوان الأزهار, الفواكه وأحيانا الأوراق (168. 169(. تنتشر الفلافونويدات بشكل واسع وتنوع كبير في النباتات الراقية خاصة على مستوى بعض العائلات مثل المركبة, القرعية والخيمية)170(وبشكل جد محدود عند النباتات الدنيئة)171(, وهي موزعة في جميع أجزاء النبات وبشكل اكبر في الجزء الهوائي منه)168(, ففي الأوراق فهي تتمركز في الأدمة أو قد تتوزع ما بين الأدمة والطبقة الوسطى, وبالنسبة للأزهار فهي تتمركز في خلايا البشرة (172), أما على مستوى الخلية فتتواجد في الفجوات بشكل hétérosides منحلة في الماء وهذا لارتباط الجزء السكري بها (فلافونويدات ذوابة في الماء) بينما تتمركز في السيتوبلازم على شكل فلافونويدات عديدة الميتوكسيل (فلافونويدات ذوابة في المذيبات غير القطبية))173(.

تلعب الفلافونويدات دورا مهما عند النبات فتتعدد أدوارها في الأجزاء المختلفة منه, ففي الأزهار تكون مسؤولة عن إعطاء اللون المميز الذي يمنحها الصفة الجاذبة للحشرات والطيور التي تنقل حبات الطلع بهدف التلقيح وبذلك تمنح دورة جديدة لحياة هذه النباتات)174(. أما دورها على المساحات الورقية فهو دفاعيا فهي تحمي النبات من الأشعة الفوق بنفسجية لكونها تمتص الضوء الفوق البنفسجي في المجال (250-270 نانومتر) وبذلك فهي تحمي البروتينات والأحماض النووية من الآثار السامة

لهذه الإشعاعات إضافة إلى حماية النبات من الإصابات التي تسببها البكتيريا والفطريات)177.176.175.174(كما تساهم الفلافونويدات في عمليات التركيب الضوئي والتنفس وبإمكانها التحكم في مراقبة نمو وتطور النبات وهذا بتفاعلها بطريقة معقدة مع مختلف هرمونات النمو النباتية)178(.

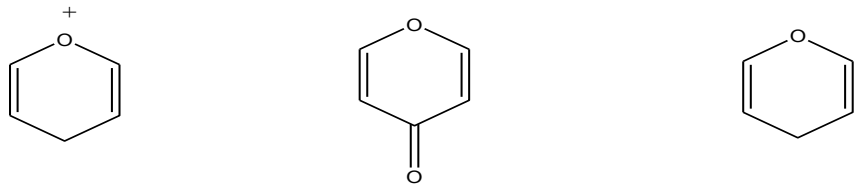
1. البنية الكيميائية للفلافونويدات وأقسامها

إن التركيبة الأساسية للفلافونويدات عبارة عن هيكل كربوني مكون من 15ذرة كربون موزعة على الشكل C6-C3-C6 أو ما يعرف بـــ 1,3-diphenyl propane)181.179.167(وهي تتكون من حلقتين بنزينيتين) B,A(مرتبطتين من خلال حلقة غير متجانسة تحتوي على عنصر الأكسجين أو مايسمى بالحلقة)C(.



الشكل21. الهيكل القاعدي للفلافونويدات)167(

تختلف البني الفلافونويدية حسب طبيعة الحلقة الأكسوجينية غير المتجانسة C هذه الأخيرة التي تكون مشتقة إما من pyrone ,pyrane أو pyrylium)185(.



وحسب درجة تأكسد الحلقة الأكسوجينية الغير متجانسة تتشكل الهياكل الفلافونويدية وتنقسم إلى عدة أقسام والمتمثلة في)180(:

- **في حالة الحلقة C على شكل pyrone:** تكون الوحدة الأساسية للفلافونويد عبارة عن 2-phénylchromones

ويتفرع من هذه البنية كل من:

- **الفلافونات - flavones -:** وهي مركبات فلافونويدية تحتوي على مجموعة أو أكثر من مجاميع الهيدروكسيل, الميتوكسيل او السكريات (سكر أحادي أو ثنائي) على الحلقتين A وB أو على إحداهما.

- **الفلافونولات – flavonols-:** هي المركبات الفلافونويدية التي تحتوي في الوضع3 على مجموعة هيدروكسيلية حرة أو مستبدلة وهي تشكل النواة الأساسية للعديد من المركبات الطبيعية.

- **الفلافانونات – flavanones- :** وهي المركبات التي تكون فيها الرابطة C2-C3 في هيكل الفلافون مشبعة, وتتميز بوجود مركز اللاتناظر.

- **الايزوفلافونات – isoflavones-:** وهي لا تختلف في بناءها عن الفلافونات إلا باختلاف موضع ارتباط الحلقة B بالحلقة C, حيث تكون مرتبطة بالموقع 3 بدلا من الموقع 2)171. .)185.183.182.180

- **في حالة الحلقة C على شكل pyrane:** تكون الوحدة الأساسية للفلافونويد عبارة عن 2-phénylchromane

حيث يتفرع من هذه البنية كل من:

- **الفلافان 3,4 ثنائي الأول – flavan-3,4-diols-**

- **فلافان 3 أول- -flavan -3ols-**

تحتوي أقسام هذه المجموعة على وظيفة هيدروكسيل في الموقع C3, و تتميز عن باقي الأقسام بغياب مجموعة الكربونيل في C4 للحلقة المركزية, هذا الموقع الذي يكون حر في حالة فلافان 3 أول)flavan -3ols-(بينما يحتوي على مجموعة هيدروكسيل في حالة الفلافان 3,4 ثنائي الأول flavan-3,4-diols-)171. 183.182.180(.

- **في حالة الحلقة C على شكل pyrylium:** تكون الوحدة الأساسية للفلافونويد عبارة عن 2-phénylbenzopyriliums

خ ف ش ع ِ ز ى ح ذة :

- **الأنثوسيانات – anthocyanes -:** يشكل الأنثوسيانيدين)anthocyanidine(الهيكل القاعدي الذي تتشكل انطلاقا منه كل الأنثوسيانات وذلك بإضافة أو حذف مجاميع الهيدروكسيل, الميثلة (إضافة مجاميع المثيل CH3(أو بعملية الجلكزة (إضافة السكريات). وتشكل الأنثوسيانات المجموعة الأكثر أهمية و الأكثر تواجدا في الصبغات النباتية)171. 183.182.180 .185(.

- **في حالة الحلقة C مفتوحة:** نميز:

-**الشالكون وثنائي هيدروشالكون – chalcones, dihydrochalcones-:** تتميز بغياب الحلقة غير المتجانسة المركزية ووجود سلسلة ثلاثية الكربون سيتونية α,β غير مشبعة . وتكون الاستبدالات التي تحدث على الحلقة A في الشالكونات مماثلة للاستبدالات الأخرى في الفلافونويدات الأخرى أما الحلقة B فتكون غير مستبدلة)171. 183.182.180 .185(.

- **في حالة الحلقة C على شكل فيران- furane -:** نميز:

الأورونات- aurones- أو- benzylidène coumaranone -2 : وتشتق مباشرة من الشالكون بدون محفز)180. 185(.

2. الاصطناع الحيوي للفلافونويدات

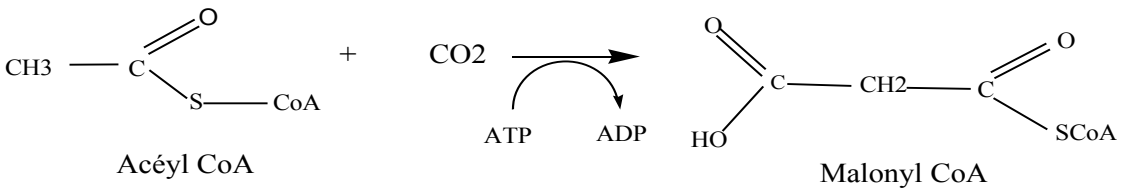
نظرا لأهمية الفلافونويدات وانتشارها الواسع فقد أثارت اهتمام العديد من الباحثين: كيميائيين, بيولوجيين, وحتى علماء الوراثة وقاموا بتوجيه أبحاثهم لمعرفة كيفية تصنيعها حيويا. أخذت الدراسات في هذا المجال تتطور وتعطي نتائج هامة بعد اعتماد تجارب الوسم باستعمال C14 والتي بينت طريق الاصطناع الحيوي للفلافونويدات, حيث تبين أن الهيكل الفلافونويدي القاعدي)C6-C3-C6(يتصنع وفق طريق الخلات و طريق الشيكميك في حين أن الاصطناع الحيوي لمختلف الهياكل الفلافونويدية يتم وفق طريق الشالكون)184(.

1.2 . الاصطناع الحيوي للهيكل القاعدي C6-C3-C6

1.1.2 . طريق الخلات

تبين دور حمض الأستيك في تشكيل الحلقة A عند اصطناع cyanidin بدءا من الأسيتات الموسومة بـــ C^{14} على مجموعة الميثيل أو مجموعة الكربونيل, اتضح توزيع الإشعاع بين ذرات الكربون للحلقة A.

كمرحلة أولى يتم تثبيت مجموعة كربوكسيل مع أستيل مرافق الإنزيم أ Acétyl-CoA فينتج عنه وحدة Malonyl-CoA.



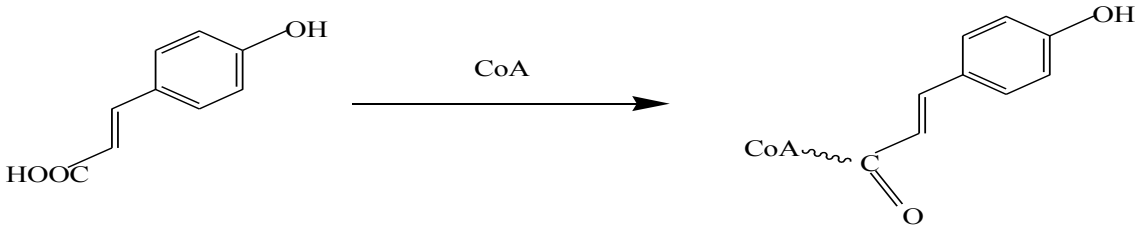
الشكل 22. تشكيل Malonyl- CoA انطلاقا من Acétyl- CoA و CO2

وتتشكل الحلقة البنزينية A من تكاثف رأس–ذيل لثلاث وحدات من Malonyl- COA)186(.

2.1.2. طريق الشيكيميك

أثبت الباحث Davis سنة 1955 دور حمض الشيكيميك في تكوين الحلقة البنزينية B والسلسلة الكربونية الثلاثية وذلك بدأ بالجلوكوز ليتشكل Ac.p-coumaric.

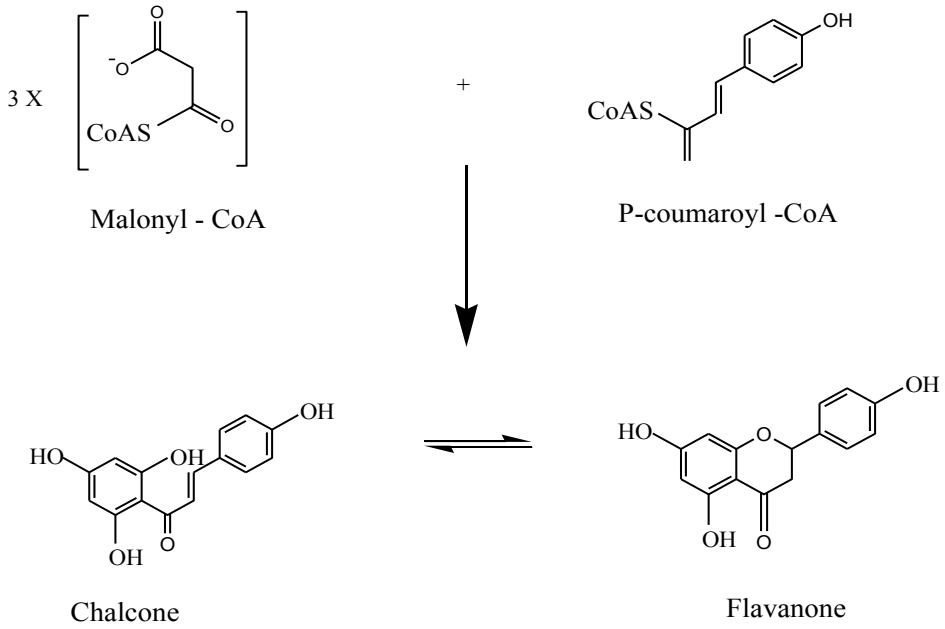
يليه تحول الناتج والمتمثل في Ac.p-coumaric إلى 4-coumaroyl-CoA الذي يكون جاهزا للإتحاد مع Malonyl-CoA في مرحلة قادمة)202(.



Ac.p-coumaric p-coumaroyl CoA

الشكل 23. تحول p-coumaric acid إلى p-coumaroyl CoA

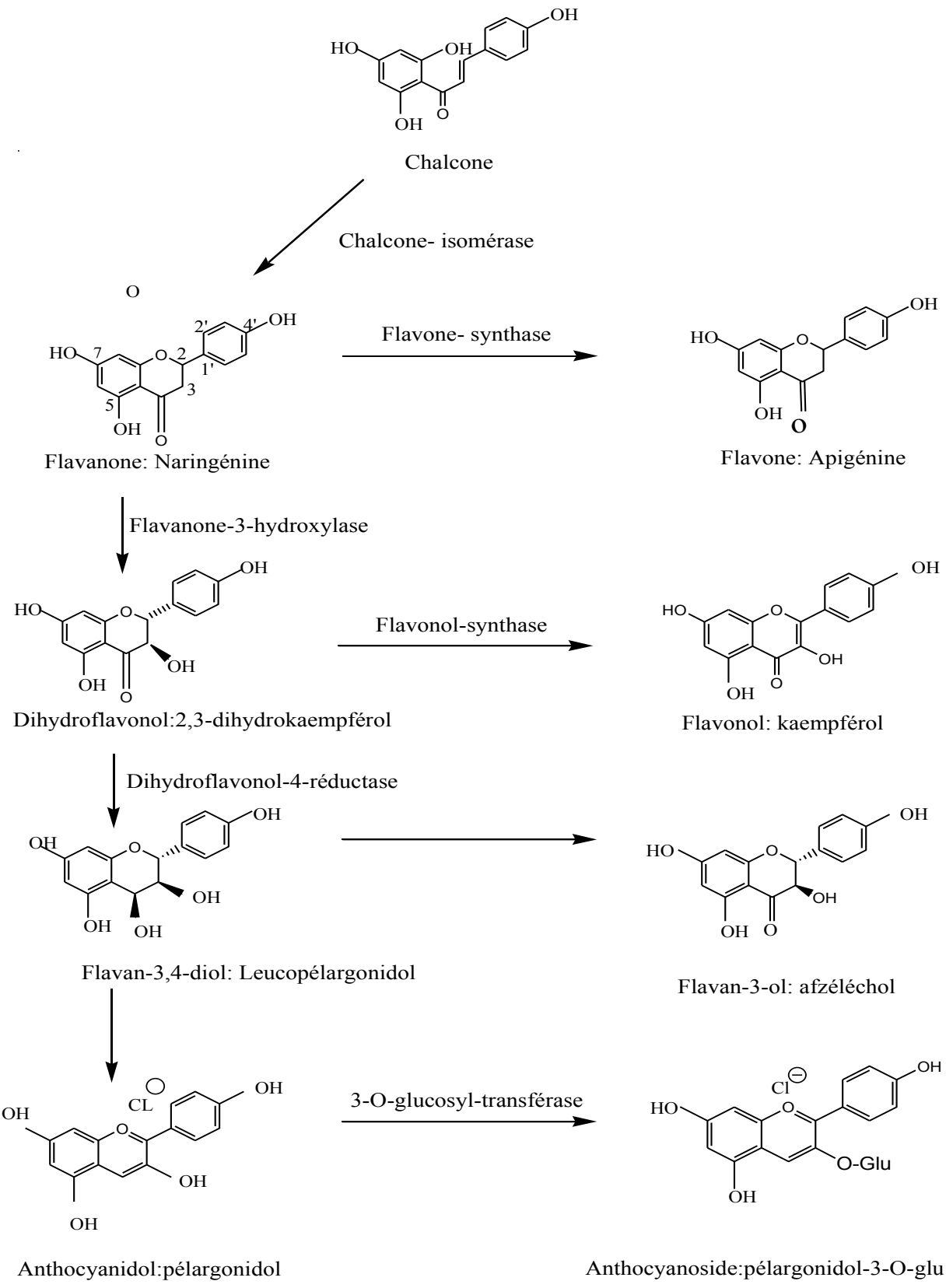
إن المرحلة الأساسية لتشكيل الهيكل القاعدي الفلافونويدي هو تشكيل نواة الشالكون والذي يتكون من تكاثف ثلاث جزيئات malonyl-CoA (الحلقة A) مع حمض 4-coumaoyl-CoA(الحلقة B والسلسلة الكربونية الثلاثية C6-C3(وذلك بتحفيز من الإنزيم المفتاحي Chalcone synthase) CHS( )187.167.165(.



الشكل24. تشكيل نواة الشالكون)203.185(

2.2. الاصطناع الحيوي لمختلف هياكل الفلافونويدات – طريق الشالكون–

يعتبر الشالكون النواة الرئيسية التي تنحدر منها مختلف هياكل الفلافونويدات وهذا بوجود إنزيمات محفزة تخص كل مرحلة من المراحل المختلفة)102(. الشكل **25**



الشكل25. الاصطناع الحيوي لمختلف هياكل الفلافونويدات انطلاقا من الشالكون)167(

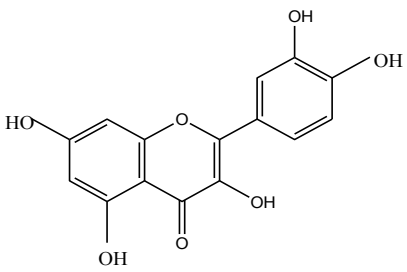
3. تثبيت المجموعات الاستبدالية على الهيكل الفلافونويدي

ينتج التنوع الفلافونويدي أساسا من تعدد السبل لعمليات الاستبدال ومنها:

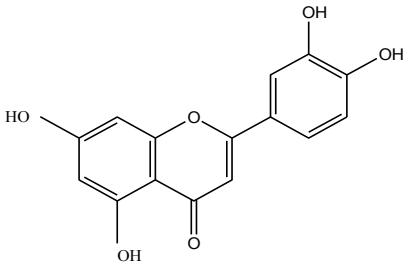
1.3. تثبيت مجموعة الهيدروكسيل

إن تثبيت المجموعات الهيدروكسيلية OH في الموضعين 5 و7 للحلقة A يتم قبل تشكيلها, ولهذا فهي تعتبر مجموعات أصلية,كذلك الحال بالنسبة لهيدروكسيل الموضع 4' في حلقة B.

أما تثبيت مجموعة الهيدروكسيل في الموضع 3 يتم في مرحلة تكوين الشالكون على خلاف الموضع 3' الذي يتم فيه تثبيت مجموعة الهيدروكسيل بعد مرحلة الشالكون أي بعد غلق الحلقة C)204(



Quercétine



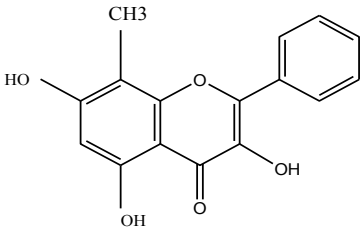
Lutéoline

2.3. تثبيت مجموعة الميثيل

أن تثبيت مجموعة الميثيل CH3 يتم بعد تثبيت الهيدروكسيل, ويتم ذلك على هيكل الاجليكون في حالتين:

- **الحالة الأولى:**

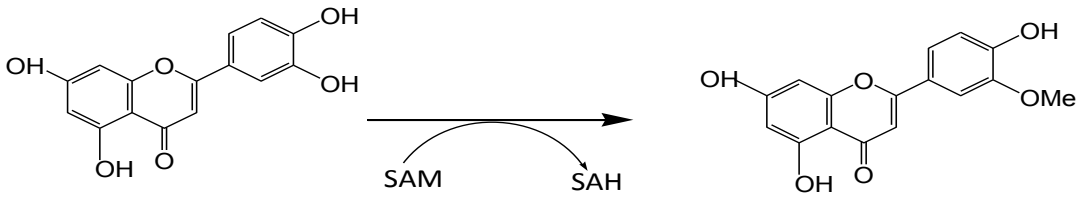
تكون الرابطة بين كربون الميثيل وكربون النواتين A و(أو) B ومثال على ذلك المركب 8-C- méthylgalangine.



8-C- méthylgalangine

- **الحالة الثانية:**

هي ميثلة المجموعات الهيدروكسيلية التي تم تثبيتها من قبل)O- méthylation(وهذا في وجود أنزيم O-methyl transférase كمانح للمثيل والشكل26 يوضح ذلك.



Lutéoline

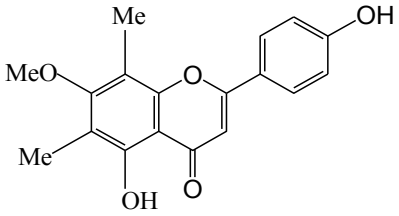
Chrysoériol

SAM : S – adénosyl méthionine

SAH : S – adénosyl homocysteine

الشكل 26. التحول الإنزيمي لـــ Lutéoline إلى Chrysoériol

كما أن هناك مركبات تحتوي على نوعي الارتباط C-Me و C-OMe (كربون الحلقة مع كربون المثيل و أكسجين مجموعة الهيدوكسيل للحلقة مع كربون المثيل) ومثال على ذلك المركب Sidéroxyline.



Sidéroxyline

3.3. تثبيت السكريات

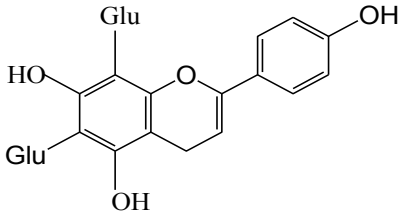
بعض المركبات الفلافونويدية توجد على هيئة جليكوزيدات, أي أن بنائها يحتوي على وحدات سكرية قد تكون أحادية, ثنائية أو ثلاثية كما يمكن أن يدخل في بناء المركب أكثر من مستبدل سكري. ومن السكريات الشائعة الارتباط بالهيكل الفلافونويدي نجد الهكسوزات (D-galactose, D-glucose…) أو

البنتوزات(D-Xylose ,L-Arabinose ...( )171(ويستثنى وجود سكر الفراكتوز. كما قد تكون مشتقات جليكوزيلية أو جلاكتوزيلية.

وهناك حالتين لتثبيت السكر على الهيكل الفلافونويدي:

- **الحالة الأولى**

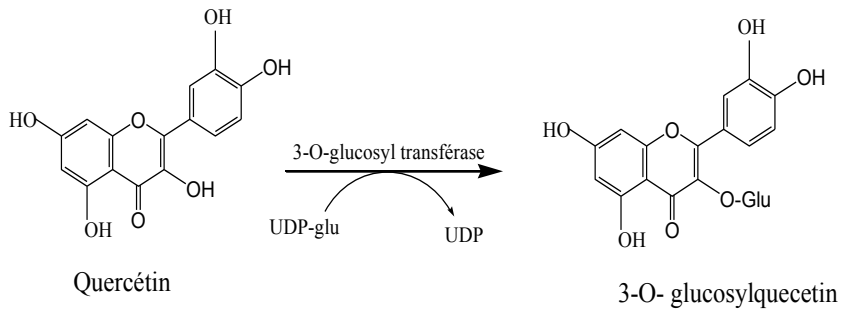
ترتبط وحدة السكر بإحدى ذرات كربون الحلقة العطرية للهيكل الفلافونويدي أي أن الرابطة من النوع C- hétérosidique)171(وتتشكل الرابطة في هذه الحالة بين ذرة الكربون C1 لجزيء السكر وأحد الموضعين C6 أو C8 للأجليكون, وتنشأ رابطة من نوع كربون– كربون, وتتم بعد تكوين الشالكون مباشرة, ومثال على ذلك مركب vitexine.



6,8-di-C-B-D glucopyranosyl apigénin

- **الحالة الثانية**

ترتبط وحدة السكر بذرة أكسجين مجموعة الهيدروكسيل مباشرة أي من نوع O-hétérosidique)171(وعادة يكون هيدروكسيل الموضع 7 للفلافونات وهيدروكسيل الموضع 3 للفلافونولات ويتم تثبيت السكر في وجود إنزيم O-glucosyl transférase ومانح للسكرمثل: Uridine (UDP-glu diphosphate glucose(والشكل التالي يوضح ذلك)187.205(.



Quercétin

3-O- glucosylquecetin

الشكل 27. تثبيت الجلوكوز على هيكل quercetin

4. الفعالية البيولوجية للفلافونويدات

إن الفعالية البيولوجية للفلافونويدات بدأت منذ اكتشافه عام 1938 من خلال أعمال Szent Gyorigyi الذي عرفه على أساس أنه فيتامين p وأدرك أنه يزيد ويعزز من دور الفيتامين C)102(, وزاد الاهتمام في السنوات الأخيرة بهذه المركبات بحيث بينت نتائج أبحاث مكثفة في ميدان الطب والبيولوجيا فعاليتها المضادة للسرطان (206), المضادة للأكسدة, المضادة للحساسية,المضادة للفيروسات والبكتيريا وفعاليات أخرى.

1.4. التأثير المضاد للسرطان

أثبتت تجارب عديدة ومكثفة الدور الواقي للفلافونويدات ضد ظهور السرطان, ويعتبر النشاط المضاد للأكسدة لهذه المركبات إحدى الآليات الأولى التي تمت دراستها.تعمل الفلافونويدات على اقتناص الجذور الحرة التي تؤدي إلى إحداث تشوهات بالحمض الريبي النووي المنقوص الأكسجين ADN وبالتالي حدوث طفرات في المورثات الورمية أو الكابحة لظهور الأورام, التي تعتبر بادرة لظهور هذا المرض (224).

يمكن للفلافونويدات أن تثبط الإنزيمات المتدخلة في تنشيط procarcinogènes وتحويلها إلى مواد مسرطنة (207), حيث تم إثبات دور كل من الـــ quercetine, kaempferol و galangin وكلها من صنف الفلافونول إضافة إلى apigénine من صنف الفلافون في تثبيط إنزيم Cyt p 450 من عائلة CYP1 A وهو من إنزيمات المرحلة الأولى للتحول الحيوي في الكبد والذي يعمل على زيادة نشاط أغلب المواد الكيميائية المولدة للسرطان كالهيدروكربونات العطرية لجعلها قادرة على الارتباط بـــ ADN وإحداث الطفرات)229(.

في حين يعمل كل من quercetin و naringin على تثبيط Cyp 3A4 وهو من الإنزيمات الأكثر تواجدا في الكبد ويعمل على استقلاب عدد كبير من مولدات السرطان والأدوية)229(.

2.4. التأثير المضاد للحساسية

يعود هذا الفعل إلى تأثير الفلافونويدات على إنتاج الهيستامين المسبب للحساسية, فتعمل الفلافونويدات على تثبيط بعض الإنزيمات المحررة للهيستامين من خلايا الماستوسيت والخلايا القاعدية كـــ AMP cyclique phosphodiesterase و ATPase Ca2+ - dépendante فمثلا يعمل هذا الأخير على تحرير

الطاقة من اماهة ATP لتسهيل امتصاص الكالسيوم من قبل الأغشية الخلوية هذا الذي يسمح بتحرير الهيستامين المخزن داخل الحويصلات الخلوية. وأثبتت الدراسات أن مركب quercetin أظهر قدرة أكبر من تلك التي لـــ Cromoglycate de sodium والمستعمل كدواء مضاد لتحرير الهيستامين (225).

3.4. التأثير المضاد للالتهاب

إن استقلاب حمض الأراشيدونيكarachidonic acid تحت تأثير كل من إنزيمي cyclooxygénase و lipooxygénase يؤدي إلى إنتاج كل من prostaglandines و leucotriènes المسؤولة على مظاهر الالتهاب. وقد تبين أن بعض الفلافونويدات قادرة على تغيير مسار استقلاب حمض الأراشيدونيك داخل الصفائح الدموية, حيث ثبت أن كلا من quercetin و myricétin بتراكيز عالية يثبطان كلا من cyclooxygénase و lipooxygénase أما عند التراكيز المنخفضة فيثبطان إنزيم lipooxygénase في حين أن كلا من apigénin و chrysin يوقفان نشاط إنزيم cyclooxygénase)226(.

4.4. النشاط المضاد للفيروسات والبكتيريا

أكثر ما ركزت عليه الأبحاث فيما يخص نشاط الفلافونويدات المضاد للفيروسات هو دراسة تأثير هذه المركبات على فيروس HIV المسؤول عن أعراض العوز المناعي المكتسب (السيدا) (174) . وقد تم إثبات فعالية الفلافونويدات على كبح تضاعف فيروس السيدا وذلك بتثبيطها لإنزيم الاستنساخ العكسي revers transcriptase) 224.208(.لكن تأثيرها الكابح على كل من إنزيمي ADN و ARN بوليمراز)l'ADN et l'ARN polymérase(للخلية العائل أكبر من ذلك الملاحظ على revers transcriptase الفيروسي)210.209(. بينت تجارب حديثة التأثير الانتقائي لبعض الفلافونويدات على فيروسHIV وذلك بتداخلها مع بروتين سكري glycoprotéine موجود على سطحه وهو gpl20 مما يعيق ارتباط هذا الفيروس بالخلية العائل)211(. نظريا للفلافونويدات تأثير مضاد للبكتيريا وهذا من خلال إثبات فعاليتها المثبطة لإنزيم ADN gyrase على النماذج المخبرية in vitro)212(. أظهرت دراسة حديثة نشاط الفلافانونات المضاد لبكتيريا *staphylococcus aureus*)213(وتعتبر الآليات التي تؤثر من خلالها الفلافونويدات ضد الميكروبات جد معقدة ونذكر من بين الفرضيات ما يلي:

- تثبيط الإنزيمات الميكروبية الخارج خلوية.
- حجز المواد الضرورية للنمو الميكروبي و التقاط بعض المعادن مثل الحديد.
- تثبيط المسار الاستقلابي للميكروبات)214(.

5. الفلافونويدات, الجذور الحرة والنشاط المضاد للأكسدة

إن من أهم مميزات الفلافونويدات هو نشاطها المضاد للأكسدة والناتج أساسا عن خاصيتها القابلة للأكسدة والإرجاع, وبذلك فهي تعمل على الوقاية من الإجهاد ألتأكسدي الناتج عن الجذور الحرة.

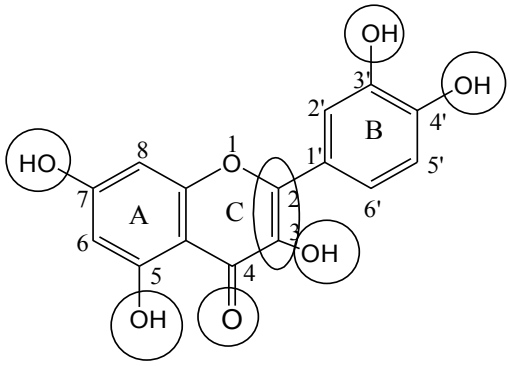
1.5. العلاقة بين بنية الفلافونويد والنشاط المضاد للأكسدة

أدت الأبحاث التي أجريت على النماذج المخبرية والتي اهتمت بالعلاقة بين البنية الكيميائية للفلافونويد ونشاطه المضاد للأكسدة للتوصل إلى التعرف على المجاميع والمواقع النشطة في الآلية المضادة للأكسدة والمتمثلة في:

- مجموعة أرثو ثنائي هيدروكسي 4',3' للحلقة B – ortho dihydroxy- أو ما يعرف بمجموعة cathécol.
- الرابطة الزوجية بين الموقعين (C3-C2) والمترافقة مع الوظيفة الكيتونية (مجموعة الكربونيل) 4-oxo للحلقة C.
- مجموعة الهيدروكسيل في الموقع 3 للحلقة C.
- مجموعتي الهيدروكسيل في الموضعين 5,7 للحلقة A.

ويعد quercétin بـ[illegible]لاكه لكل هذه المجاميع من أحسن الفلافونويدات فعالية (216.174.171.102).

والشكل 28 يوضح هذه المواقع.



شكل 28. المواقع الفعالة في النشاط المضاد للأكسدة للفلافونويدات (102)

فعلى سبيل المثال تم اضهار أنlutéolin والذي يحتوي على مجموعة cathécol يقتنص كل من جذر peroxyl, superoxide , peroxynitrite بفعالية أكبر من Kaempferol الذي لايحتوي عليها (228).

بينت أغلب الأبحاث ضرورة ترافق الرابطة الغير مشبعة C3-C2 مع الوظيفة الكيتونية 4-oxo للحصول على نشاط عالي, فنقص إحدى البنيتين أو كلاهما يؤدي إلى نشاط أقل من ذلك الملاحظ بوجودهما معا)228(. حيث في دراسة حول تثبيط تخليق MDA الناتج عن الأكسدة الليبيدية تم إثبات أن النشاط الكابح لـــ quercetin والذي تترافق فيه البنيتين أكبر من ذلك الملاحظ لـــ taxifolin الذي يحتوي على رابطة مشبعة بين C3-C2)228(. كما تجدر الإشارة إلى أن كل من المجاميع السكرية ومجاميع الميتوكسيل تنقص من فعالية الفلافونويد المضادة للأكسدة, وذلك من خلال حجزها لمجاميع الهيدروكسيل الضرورية لاقتناص الجذور الحرة.

أثبتت عدة دراسات أن الفعالية المضادة للأكسدة للفلافونويدات الغير سكرية aglycone أعلى من الفلافونويدات السكرية , واعتمادا على عدة دلائل فنزع المجاميع السكرية بالإنزيمات والبكتيريا المعوية تزيد من نشاط الفلافونويدات الغذائية داخل الجسم)228(.

2.5.آلية الفلافونويدات المضادة للأكسدة

إن النشاط المضاد للأكسدة يرجع للفعاليات التالية)165.101.102.62(:

- الاقتناص المباشر للجذور الحرة.
- حجز أو التقاط الأيونات المعدنية المتدخلة في تخليق الجذور الحرة.
- تثبيط الإنزيمات المولدة للجذور الحرة.
- حماية أنظمة الدفاع المضادة للأكسدة .

ويتم النشاط المضاد للأكسدة للفلافونويدات بالآليات التالية:

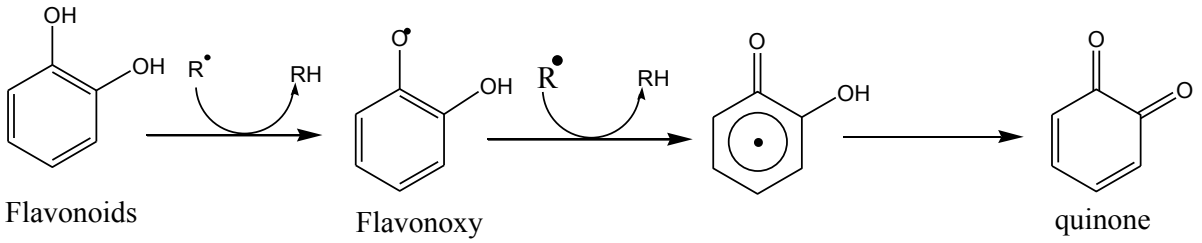
1.2.5. اقتناص الجذور الحرة

في وجود الجذور الحرة تتأكسد الفلافونويدات بفقدها لذرة هيدروجين وتتحول إلى جذر الفلافونوكسي flavonoxy (FL-O°) الأقل نشاطا وبالمقابل يتم إرجاع الجذر الحر كما في المعادلة التالية)224(:

$$Fl\text{-}OH + R^{\bullet} \longrightarrow Fl\text{-}O^{\bullet} + RH$$

R°: الجذر الحر, Fl-OH : الفلافونويد, FL-O°: جذر الفلافونوكسي

وتعتبر مجاميع الهيدروكسيل للحلقة B الأكثر نشاطا في اقتناص الجذور الحرة)228(, يتفاعل فيما بعد جذر الفلافونوكسي مع جذر أخر فتنتج بنية الكينون quinone المستقرة كما هو موضح في المخطط التالي:



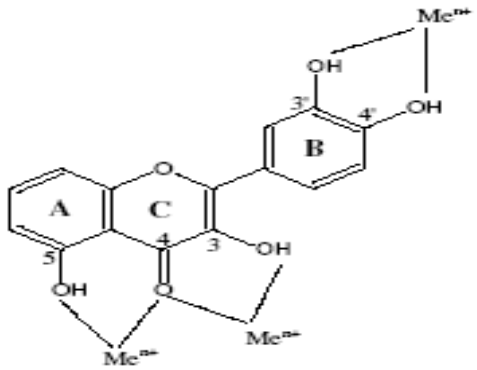
الشكل29. مخطط يوضح اقتناص الفلافونويدات للجذور الحرة)102(

2.2.5. حجز الأيونات المعدنية

إن لبعض الأيونات المعدنية مثل: Fe^{2+} و Cu^{+} دورا هاما في بعض الوظائف الفيزيولوجية إذ تدخل في تركيب بعض البروتينات المتجانسة Hémoprotéines أو كونها محفزات Cofacteurs لمختلف الإنزيمات المضادة للأكسدة, لكن في نفس الوقت يمكن أن تكون مصدر لبعض الجذور الحرة وذلك من خلال تفاعل Fenton (كما سبق ذكره في الفصل الأول).

$$H_2O_2 + Fe^{2+}/Cu^{+} \longrightarrow OH^{\bullet} + OH^{-} + Fe^{3+}/Cu^{2+}$$

وتعتبر الفلافونويدات لاقطات جيدة للأيونات المعدنية بحيث تشكل معها مركبات مستقرة وبذلك فهي تحد من إنتاج الجذور الحرة والشكل 30 يوضح المواقع النشطة في حجز الأيونات المعدنية:)200.199.165.102(.



الشكل 30. أهم المواقع النشطة في التقاط الأيونات المعدنية)165.201.102(

3.2.5. تثبيط الأنزيمات

للفلافونويدات القدرة على تثبيط عدد كبير من الأنزيمات المتدخلة في إنتاج الجذور الحرة مثل:

Xanthine oxydase, nitrique oxyde synthases (NOS), lipoxygénases, cyclooxygénases)165(

- **Xanthine oxydase**

يحفز XO تحول Hypoxanthine إلى xanthine وهذا الأخير إلى حمض اليوريا ويرافق هذا التفاعل تخليق كل من جذر ما فوق الأكسجين $O_2^{\circ-}$ و الماء الأكسوجيني H_2O_2 انطلاقا من الأكسجين الجزيئي O_2)224.165.102(حسب التفاعل الموضح في الفصل الأول.

ففي دراسة حول مرضla goutte (مرض ناتج عن ارتفاع نسبة حمض اليوريك في الدم) ثبت أن الفلافونويدات تستطيع أن تؤثر على نشاط XO وبالتالي تخفيض تركيز كل من حمض اليوريك وجذر ما فوق الأكسجين, مما يساعد على السيطرة على هذا المرض)196(.وقد تأكدت هذه النتائج بأعمال أثبت من خلالها دور الرابطة الثنائية C3-C2 بالنسبة للفلافونات والفلافونولات في تثبيط هذا الأنزيم)197(.

وبمساعدة طرق الكيمياء الكمية تبين أن هناك تشابه بنيوي والكتروني بين حلقة البيورين purineلإنزيم XO والحلقة A للفلافونويد مما يجعلها تتصف بصفات المثبطات, ويكون التثبيط إما تنافسي أو غير تنافسي)227(.

- **NOS nitric oxide synthases**

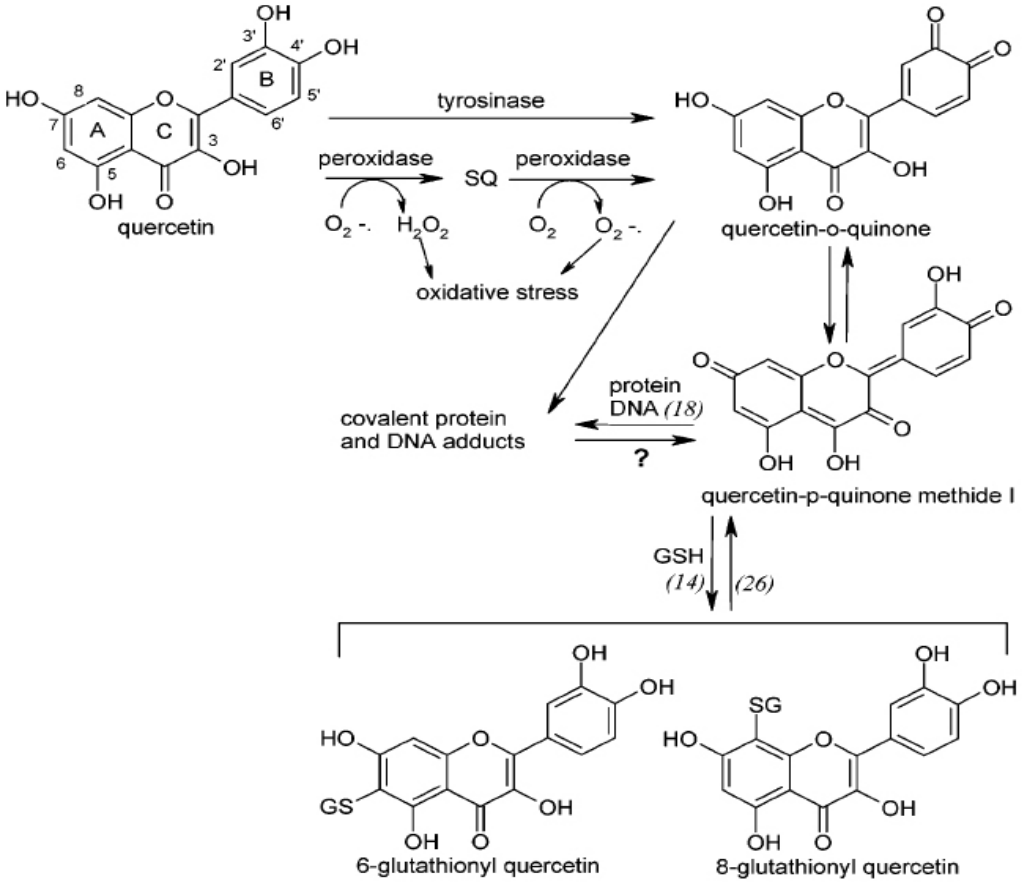
هي مجموعة من الأنزيمات تعمل على تشكيل أكسيد النتريك NO ابتداءا من ذرة الآزوت النهائية للحمض الأميني الأرجنين في وجود الأكسجين ومختلف العوامل المرافقة كالأدنين ثنائي النكليوتيد فوسفات)NADPH(والفلافين أدنين ثنائي النكليوتيد (FAD))165(وذلك في عدة خلايا كالخلايا العصبية ,الماكروفاج وخلايا أخرى, وعلى الرغم من أن إنتاج أكسيد النتريك NO مهم للحفاظ على توسع الأوعية الدموية بالإضافة إلى أدوار أخرى فأن زيادة تركيزه يؤدي إلى عدة أضرار بالخلايا خاصة بتفاعله مع أنيون فوق الأكسيد $O2^{-}$ لتشكيل أحد أخطر الجذور الحرة وهو Peroxinitrite $ONOO^{-}$ الذي يلعب دور كبير في الأكسدة الليبيدية وخاصة البروتينات الليبيدية المنخفضة الكثافة)LDL( )224(. وقد تم إثبات نشاط عدة فلافونويدات في تثبيط هذه الأنزيمات ومن بينها الكرستين)224(, كما يمكن لبعض الفلافونويدات الأخرى أن تقتنص NO مباشرة أو الجذور الحرة مثل أنيون فوق الأكسيد وبالتالي تكبح إنتاج ($ONOO^{-}$).

- **Lipoxygénases**

وهو من الأنزيمات المسئولة على أكسدة الأحماض الذهنية عديدة عدم التشبع فينتج هيدروبيروكسيد hydroperoxyde الذي يختلف على حسب نوع كل من الحمض الذهني والأنزيم فمثلا اللوكوترين leucotriènes الذي يتدخل في التفاعلات الالتهابية يتشكل ابتداء من حمض linoléate بتحفيزمن إنزيم 5-lipoxygénase (165). كما أن هذه الأنزيمات هي مصدر لتشكيل عدة جذور حرة, ويعتبر تثبيطها بالفلافونويدات هدف لعدة دراسات حديثة, ويشكل الكرستين الجزيء الأكثر دراسة, فمثلا يتم تثبيط 3-lipoxygénase بحمض protocatéchuique والناتج عن هدم الكرستين بنفس الأنزيم)198.195(.

6. الفعل البادئ للأكسدة للفلافونويدات - prooxydation-

أحيانا يكون للفلافونويدات تأثير بادئ للأكسدة prooxydant وذلك من خلال قدرتها على الأكسدة الذاتية, ويعتقد أن هذا الفعل مرتبط مباشرة بالعدد الإجمالي لمجاميع الهيدروكسيل في المركب. بعد أكسدتها ذاتيا تتحول الفلافونويدات إلى مركب semiquinones ٔ quinones ويرافق هذا إنتاج لعدة مجاميع أكسجينية نشطة ROS)192 .191.190.189.188(. إن وجود كل من الرابطة الزوجية في الوضع C2-C3 ووظيفة الكربونيل في الوضع 4 يسمح بتماكب لبنية quinone إلى quinones méthides هذا الأخير المسؤول على تلف كل من الأحماض النووية والأحماض الأمينية. لاتزال آليات الفعل البادئ للأكسدة غير واضحة, لكن تم اقتراح عدة آليات تأثير منها ما هو موضح في الشكل31.



الشكل 31. آلية مقترحة من طرف Hester van der Woude et al حول العلاقة بين الأشكال النشطة للكرستين ونشاطها البادئ للأكسدة)190(

كما تمت دراسة تشكيل الإضافات وذلك من خلال تشكيل روابط تكافئية بين quinones أو مماكبه quinones méthides مع الجلوتاتيون المرجع GSH)190.193.194(.

كما قد ينتج الفعل البادئ للأكسدة للفلافونويدات إلى إرجاع الأيونات المعدنية مثل أيون Fe^{3+} إلى Fe^{2+} هذا الأخير الذي يتفاعل إما مع O_2 أو H_2O_2 لإنتاج جذر الهيدروكسيل OH° المسؤول على أكسدة سكر الريبوز المنقوص الأكسجين لـــ ADN و مختلف قواعده الأزوتية إضافة إلى أكسدته لليبيدات)171(.

7. امتصاص, ميتابوليزم وطرح الفلافونويدات

إن امتصاص الفلافونويدات يكون على مستوى الأمعاء, فالأجليكونات (الفلافونويدات الغير سكرية) يتم امتصاصها مباشرة في حين أن المركبات السكرية تحدث لها اماهة بتحفيز من إنزيمات Hydrolases للبكتيريا المعوية)222.221.220.219.217.215(خاصة الأنواع الغير هوائية مثل : *Bacteroides distasonis, B. uniformis, B. ovatus* فكلها تملك إنزيمات glucosidases القادرة على اماهة الفلافونويدات السكرية بكفاءة عالية)216(. تتدخل هذه البكتيريا أيضا في هدم الفلافونويد إلى الأحماض الفينولية)223.216(. بعدها تنتقل الأجليكونات ومستقلباتها محمولة على بروتين الألبومين إلى الكبد عبر الوريد البابي الكبدي) 224.218.216(. يعتبر الكبد العضو الأساسي لميتابوليزم الفلافونويدات كما لانهمل دور أنسجة أخرى كمخاطية الأمعاء أو الكلية والتي تحتوي على عدة إنزيمات مثل)171(: cytochrome P 450, Catechol-o-methyl transfease.

في الكبد تحدث تفاعلات التحول الحيوي في مرحلتين, ففي المرحلة الأولى تحدث عملية ميثلة لمجاميع الهيدروكسيل(عادة يتشكل 4,'3' ميثيل ايثر), إضافة مجاميع هيدروكسيل في المواقع 4,'3,'2' وإرجاع لمجموعة الكربونيل للحلقة C للفلافانون)216(.

في تفاعلات المرحلة الثانية – تفاعلات التزاوج– يحدث ربط إما لمجموعة سيلفات sulfateأو حمض الجليكرونيك Acide glucuronique للفلافونويدات وأشكالها الاستقلابية. توجه مشتقات الفلافونويدات الناتجة عن تفاعلات التزاوج إلى الاطراح إما في البول والذي يمثل نسبة 3–6% من الاطراح الكلي أو في الصفراء)216.171(. عند إفرازها في الصفراء فإنها تصب في العفج وتنتقل إلى الأمعاء الغليظة أين تحدث اماهة لمعقدات التزاوج (فلافونويد– سيلفات أو فلافونويد – جليكرونيك) فتتحرر المعقدات الفلافونويدية التي يعاد امتصاصها وتخضع إلى حلقة . enterohépatic Cycle)216(.

V. نبات *Globularia alypum* L.

مدخـــل

تضم عائلة العينونيات Globulariaceae جنسين, *Globularia* و *Poskea* وحوالي 30 نوع موزعة في أوروبا وشمال إفريقيا)231.230(. ولقد ركزنا في هذه الدراسة على جنس *Globularia* والذي يتواجد منه في الجزائر الأنواع التالية:

Globularia vesceritensis, Globularia eriocephala وكلاهما يتواجد في مركزالصحراء (الهقار والطاسيلي) ونوع *Globularia alypum*)231(وهو هدف دراستنا في هذا البحث.

1. وصف نبات *Globularia alypum* L. وتوزيعه الجغرافي

مصطلح Globularia مشتق من الكلمة الأجنبية globuleuse وتعني مستدير وهذا نسبة لأزهارها المستديرة الشكل, أما alypum فأصلها من الكلمة اليونانية alypon ومعناها مسكن للألم)232(. ذكرها ابن البيطار باسم العينون وللنبتة عدة تسميات شعبية فتسمى عندنا بتسلغا وفي تونس تعرف بالزريقا)231(أما في المغرب فيطلق عليها عين الأرنب)233(.

وهي جنبة (شجيرة) برية معمرة, مخشوشبة وجد متفرعة, مرة المذاق من فصيلة العينونيات ارتفاعها ما بين 30-60 سم, مسكنها المناطق الجبلية ذات التربة الجيرية, فترة إزهارها من الشتاء إلى بداية الربيع (جانفي إلى مارس/ أفريل). ساقها صلبة بنية اللون وهي قائمة, متفرعة وفروعها خضراء. أوراقها صغيرة بيضوية الشكل ذات عنق صغير, لها عرق واحد, خضراء اللون, متبادلة التوزيع ومتباعدة. أما أزهارها فهي مستديرة الشكل زرقاء اللون, كأسها أنبوبي, بتلاتها مفصصة تكون متزاحمة في القاعدة ومنشرحة في الأعلى وتنتهي بشفة مفصصة إلى ثلاث فصوص رقيقة, تحتوي على أربعة أسدية وهي فردية القلم والميسم)232(.

تتواجد هذه النبتة في منطقة البحر الأبيض المتوسط حيث تكون موزعة في جنوب أوروبا وشمال إفريقيا(الجزائر, المغرب, تونس وليبيا))234(.

شكل 32. صور فوتوغرافية لنبات *Globularia alypum*

2. الوضع ضمن التصنيف النباتي

جدول2. تصنيف نبات *Globularia alypum*)231(

Règne	*Plantes*	**المملكة**
Sous-règne	*Tracheobiontes*	**تحت المملكة**
Embranchement	*Spermatophytes*	**الفرع**
Sous-embranchement	*Angiospermes*	**تحت الفرع**
Division	*Magnoliophytes*	**القسم**
Classe	*Magnoliopsides*	**الصنف**
Sous classe	*Asteridae*	**تحت الصنف**
Ordre	*Scrophulariales*	**الرتبة**
Famille	*Globulariaceae*	**العائلة**
Genre	*Globularia*	**الجنس**
Espèce	*Alypum*	**النوع**

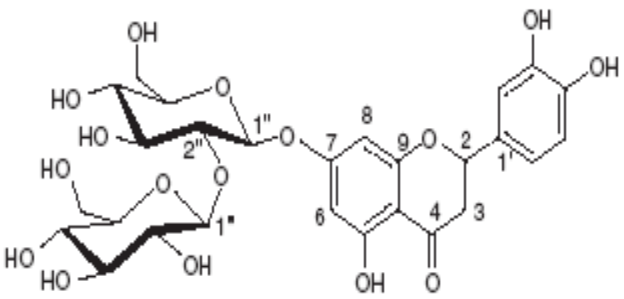
3. تركيبتها الكيميائية

من خلال دراسات فيتوكيميائية سابقة لنوع *Globularia Alypum* تم الفصل والتعرف على عدة مركبات وأهمها الفلافونويدات, phenylethanoids وهي عبارة عن فنيل الايتانول متحد مع جزيء سكري ومرتبط بوظيفة أستيرية مع حمض السينماميك كما أثبتت الدراسات أيضا وجود نوع آخر من المستقلبات الثانوية وهي Iridoïds والتي تتشكل من اتحاد لحلقة خماسية Cyclopentan و عدة حلقات بيرانية) cycles pyraniques) (236.235).

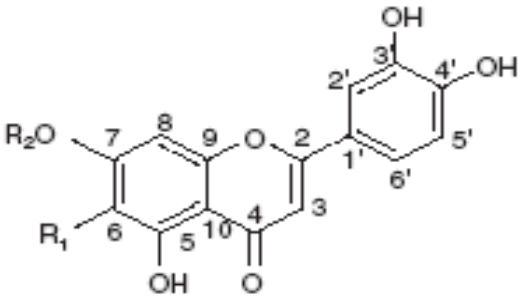
والجدول التالي يوضح مختلف المركبات المعزولة من هذا النوع:

جدول3. المركبات الكيميائية المعزولة من نوع *Globularia Alypum*

جزء النبتة المدروس	المركبات المعزولة من النبتة	المرجع
/	Cinnamic acid Pyrocatechuic acid	)237(
الأوراق	Globulain — Cinnamic acid Catalpol — Caffeic acid Rutin — Ferulic acid Luteolin 7-glucoside — p-coumaric acid Chlorogenic acid	)238(
كامل أجزاء النبات	Globularimin — Globularin Globularinin — Catalpol Globularidin — Liriodendrin Globularicisin — Syringin	)240-239(
كامل أجزاء النبات	4',7-dihydoxyflavone Apigenin -7-glucoside Quercetol Luteolin-7-glucoside 8-C-glucosyl-4',7-dihydroxyflavone Rutoside Cyanidine Peonidin Vanillic acid Syringic acid Caffeic acid Sinapic acid p-coumaic acid Ferulic acid b-resorcylic acid	)241(
الأوراق	Globularin	)242(
الأجزاء الهوائية	Globulariosid	)236(



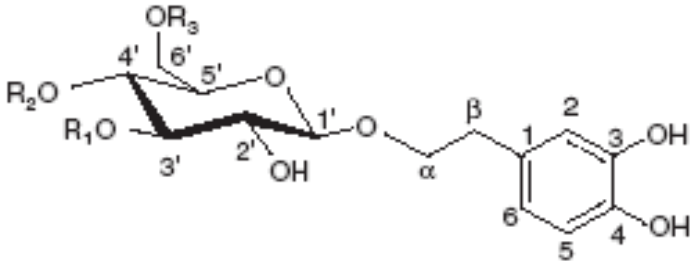
F_4



F_1:R_1= OH, R_2= Glucosyl-(1→3)-glucosyl

F_2:R_1= OH, R_2= Glucosyl

F_3:R_1= H, R_2= Glucosyl-(1→2)-glucosyl

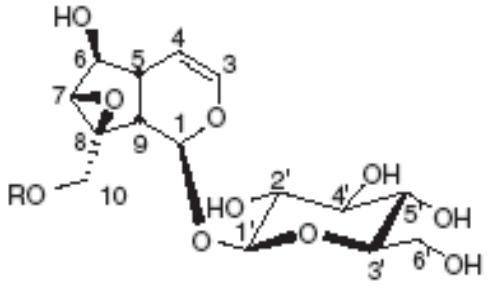


P_1:R_1= H, R_3= Rhamnosyl, R_2= *E*-Caffeoyl

P_2:R_1= Rhamnosyl,R_3= H, R_2= *E*-Caffeoyl

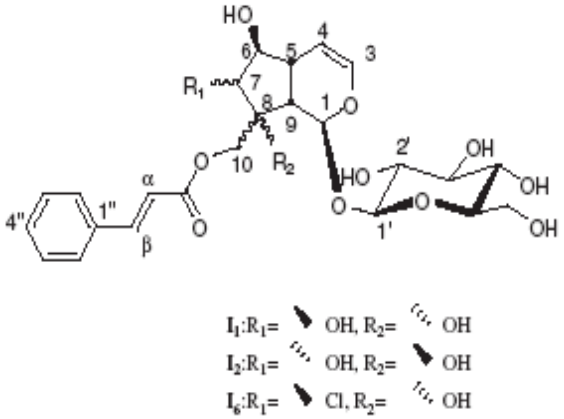
P_3:R_1= Rhamnosyl,R_2=H, R_3= *E*-Caffeoyl

P_4:R_1=R_2=H, R_3= *E*-*p*-Coumaroyl



I_3:R= *Z*-Cinnamoyl

I_5:R= *E*-Cinnamoyl



I_1:R_1= ◣ OH, R_2= ◥ OH

I_2:R_1= ◥ OH, R_2= ◣ OH

I_6:R_1= ◣ Cl, R_2= ◥ OH

F = flavonoids, I = iridoids, P = phenylethanoids

الشكل 33. الصيغ الكيميائية لبعض المركبات المعزولة من نوع *Globularia alypum*)235(

4. استعمالاتها في الطب الشعبي ونشاطتها البيولوجية

تشتهر نبتة التسلغا في الطب الشعبي بعدة منافع وهي مستعملة بكثرة في شمال إفريقيا إما على شكل مطبوخ أو نقيع (234). والأجزاء المستعملة تتمثل في الأوراق, الأزهار والسيقان غير أن الأوراق هي الأكثر استعمالا. ومن منافعها ما يلي:

مخفضة لنسبة السكر في الدم, مفرزة للصفراء, مدرة للعرق, منقية للدم, مسكنة للألم كما أنها فاتحة للشهية ومساعدة على الهضم كما استعملت لإزالة الإمساك. وقد تم استعمالها أيضا في معالجة الأمراض القلبية الوعائية والأمراض الكلوية (243 234.235.236).

وأثبتت دراسات بيولوجية على هذا النوع عدة فعاليات والمتمثلة في:

- نشاطها المضاد للأكسدة ويرجع هذا خاصة إلى الفلافونويدات, مركبات phenylethanoids وبنسبة قليلة إلى مركبات Iridoïds)235.233(.
- نشاطها المضاد للميكروبات.
- تخفيض نسبة السكر في الدم, بحيث أظهرت الدراسات على حيوانات التجارب(الجرذان) فعالية نقيع – infusion – هذه النبتة سواء عن طريق الفم أو تحت الغشاء البريتوني في تخفيض معدل الجلوكوز في دم جرذان مصابة بداء السكري وذلك من خلال زيادة إفراز هرمون الأنسولين).)245.244(.
- فعالية كبيرة للمستخلص المائي ضد سرطان الدم)246.236(.

كما بينت تجارب حديثة على النماذج المخبرية (IN VITRO) فعالية كل من المستخلص الميثانولي ومستخلص ثنائي كلورو الميثان في تخفيض التقلص الناتج عن الهيستامين والسيروتونين)247(.

وفي دراسة حول سمية هذه النبتة قدرت الجرعة القاتلة لـــ 50%)LD50(للمستخلص المائي على الجرذان بـــ 14.5 غ/كغ مما يدل على عدم سميتها)245(.

مواد و طرق العمل

مـــــــواد و طرق العمـــــــل

تم تحقيق هذه الدراسة التجريبية في كل من:

- مخبر بيولوجيا البيئة لكلية علوم الطبيعة والحياة جامعة منتوري– قسنطينة
- مخبر تحصيل المركبات العلاجية لقسم الكيمياء جامعة منتوري– قسنطينة
- مخبر البيوكيمياء للمستشفى الجامعي ابن باديس – قسنطينة.
- مخبر التشريح المرضي وعلم الأنسجة للمستشفى الجامعي ابن باديس– قسنطينة.

أولا. المادة النباتية والدراسة الفيتوكيميائية

I. المادة النباتية

1. جمع المادة النباتية

تم جمع المادة النباتية *Globularia alypum* في أواخر شهر فيفري من سنة 2008 في فترة إزهارها من منطقة الميلية – ولاية جيجل– حيث تم قطف الأجزاء الهوائية (سيقان, أوراق وأزهار) وتم التعرف عليها من قبل الأستاذة الدكتورة خلف الله نضرة بجامعة منتوري قسنطينة , أجريت لها عملية تجفيف بوضعها في أماكن خاصة تحت الضل وبعيدا عن الرطوبة, ثم تمت تنقيتها من الشوائب وقطعت إلى أجزاء صغيرة وكانت الكتلة المستعملة 1779غ.

2. طريقة تحضير المستخلص النباتي)249.248(

تمت عملية الاستخلاص على مراحل:

- **المرحلة الأولى**

غمرت الأجزاء النباتية في خليط هيدروكحولي مكون من ماء– ميثانول بنسبة (7/3) وتركت مدة 48 ساعة مع التحريك من حين إلى آخر, بعدها قمنا بعملية الترشيح ثم ركز الراشح بتبخيره تحت الضغط المنخفض حتى الجفاف باستعمال جهاز التبخير عند درجة حرارة قدرت بـــ 47°. كررت العملية السابقة ثلاث مرات بحيث في كل مرة رشح وركز الراشح بتبخير أكبر كمية ممكنة من الميثانول , مع العلم أنه في المرة الثالثة تم تسخين المحلول الهيدروكحولي قبل إضافته إلى الأجزاء النباتية أين تحصلنا على المستخلص الخام الميثانولي.

- **المرحلة الثانية**

عولج المستخلص الخام الميثانولي المحصل عليه في المرحلة السابقة بالماء المقطر المغلى, استعملنا لتر من الماء المقطر (كمية الماء تكون حسب كمية المستخلص بمعنى أن تكون كافية لتذويب كل المستخلص), ثم ترك المحلول المائي للمستخلص الميثانولي ليلة كاملة بعدها قمنا بعملية الترشيح وهذا بهدف التخلص من الشوائب. في نهاية هذه المرحلة تحصلنا على الطور المائي.

- **المرحلة الثالثة**

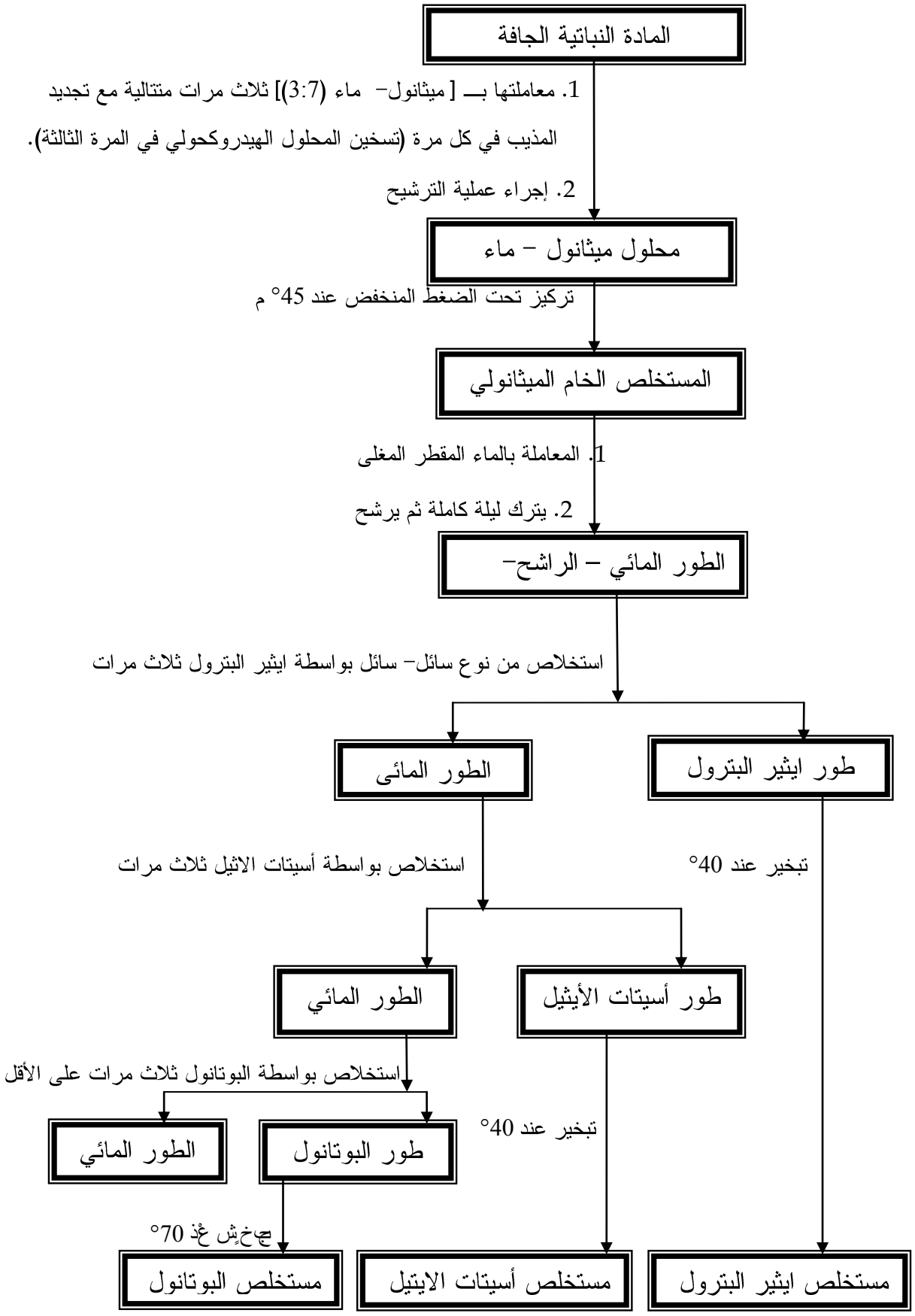
أجريت على الطور المائي عدة عمليات استخلاص من نوع سائل- سائل مع أيثيرالبترول, أسيتات الايتيل ثم البوتانول.

بدأنا عملية الاستخلاص بأثير البترول بهدف التخلص من المركبات الطبيعية ذات القطبية الضعيفة مثل الدهون، التربينات, الكلوروفيل...

وضع الطور المائي مع ايثير البترول داخل حوجلة فصل, بحيث قدر حجم ايثير البترول المستعمل 3/1 حجم الطور المائي, بعد الرج الجيد ترك الخليط لينفصل إلى طورين (طور عضوي ومائي), بعدها تم فصل الطور العضوي في حين كررت العملية على الطور المائي ثلاث مرات, جمعت الأطوار العضوية على بعضها وركزت عند درجة الحرارة 40°, لايهمل هذا المستخلص لأنه قد يحتوي على بعض الفلافونويدات الغير قطبية (أجليكونات ميتوكسيلية).

أما الطور المائي فتمت معاملته بثلث حجمه من أسيتات الايتيل, كررت العملية ثلاث مرات وجمعت الأطوار العضوية وركزت عند 40°, يؤدي أسيتات الايتيل إلى استخلاص المركبات الأجليكونية وبعض المركبات الايثيروزيدية أحادية السكر وأحيانا ثنائية السكر, خاصة إذا كررت العملية أكثر من مرة.

في آخر عملية الاستخلاص عاملنا المستخلص المائي الناتج عن الاستخلاص بأسيتات الايتيل بحجم قدره 3/1 من البوتانول, بعدها تم فصل الطور العضوي وكررت هذه العملية حتى تم الحصول على طور عضوي شفاف تقريبا, وجمعت الأطوار العضوية على بعضها وركزت عند 70°, ويؤدي البوتانول إلى استخلاص المركبات ثنائية وثلاثية السكر وكذا المركبات من النوع C-glycoside.



الشكل 34. مراحل استخلاص الفلافونويدات من نبات *Globularia alypum*

II. الدراسة الفيتوكيميائية للمستخلص

استعملنا في هذه الدراسة المستخلص البيتانولي, أما بقية المستخلصات المتحصل عليها (اثير البترول وأسيتات الأيتيل) تم حفظها لدراسة مستقبلية.

1. اختبار الكشف عن الفلافونويدات

1.1. الاختبار الأول

تمت إضافة 5 ملل من محلول الأمونياك المخفف إلى جزء من رشاحة المحلول المائي المخففة للمستخلص البيتانولي. ظهور اللون الأصفر واختفاءه بعد إضافة بعض القطرات من حمض الكبريت المركز, يدل على وجود الفلافونويدات في المستخلص (250).

2.1. الاختبار الثاني

بعض القطرات من محلول كلورير الألمنيوم ($AlCl_3$ 1%) تضاف إلى جزء من الرشاحة المائية للمستخلص. ظهور اللون الأصفر يدل على وجود الفلافونويدات في المستخلص)250(.

2. معايرة متعددات الفينول

تم قياس تركيز متعدد الفينولات polyphénols للمستخلص البيتانولي لنبات *Globularia alypum* وفقا لطريقة bleu de Prusse)251(.

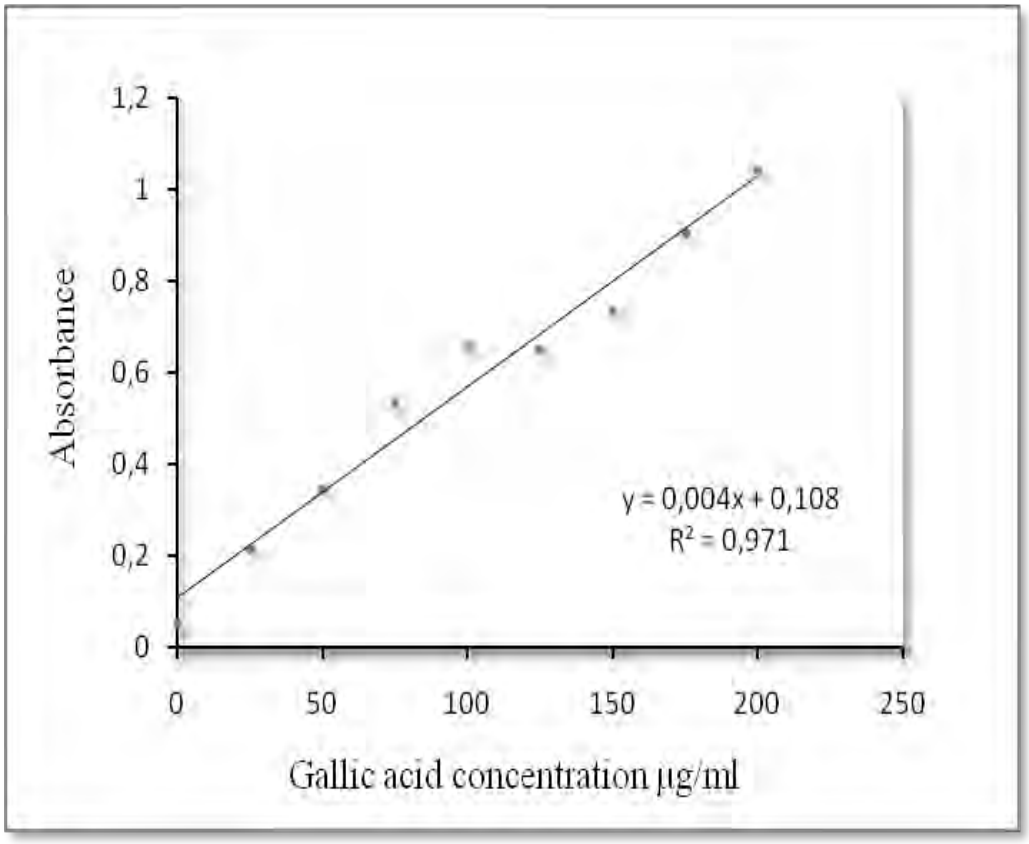
- **مبدأ التفاعل**

يعتمد هذا التفاعل على أساس أكسدة مركب ferricyanide de potassium ($K_3Fe[CN]_6$) بمتعدد الفينولات للمستخلص لإعطاء أيونات الحديد الثنائي (Fe^{2+}), هذه الأخيرة تتفاعل مع كلورير الحديد ($FeCl_3$) فينتج معقد bleu de Prusse الذي يمتص عند طول موجة قدره 700 nm.

- **طريقة العمل**

استعملنا لهذه المعايرة أربع تراكيز من المحلول الميثانولي للمستخلص(0.5, 1, 1.5, 2 مغ/مل). تمت إضافة 0.1 مل من المستخلص المذوب في الميثانول إلى 3ملل من الماء المقطر. بعد الخلط 1مل من $K_3Fe(CN)_6$ (0.016 M) ثم 1 مل من $FeCl_3$ (0.02 M) محضر في حمض HCl (0.1 N) تضاف

بالتتابع خلال فاصل زمني قدره 1 دقيقة. بعد الحضن لمدة 15 دقيقة أضيفت 5 ملل من المحلول المثبت المكون من 30 ملل من الصمغ العربي 1%, 30 مل من حمض الفوسفوريك 85% و 90 مل من الماء المقطر. تمت قراءة الكثافة الضوئية عند 700 نانومتر, حدد تركيز متعدد الفينول بالاعتماد على منحنى القياسي (Gallic acid) المحضر في نفس الشروط التجريبية باستعمال عدة تراكيز لحمض القاليك (Gallic acid) (0-200 µg / ml) ويعبر عن هذا التركيز بـــ ما يعادل ميلي غرام من حمض القاليك لكل غرام من المستخلص. (mg EAG / g E).



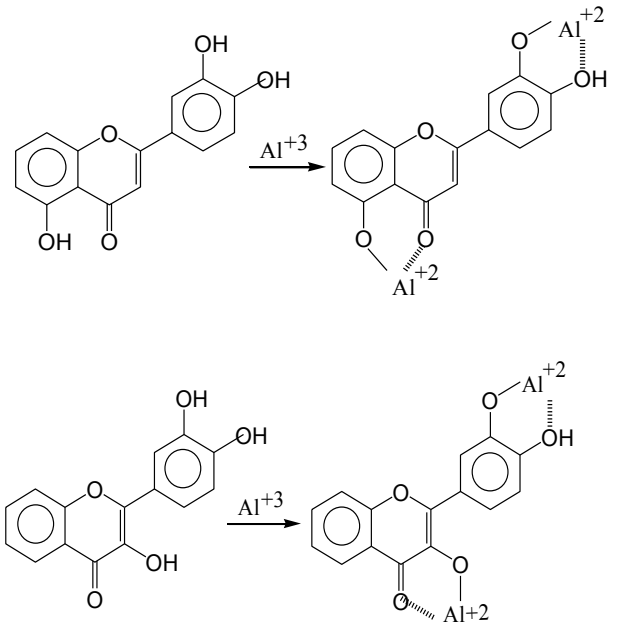
الشكل 35. المنحنى القياسي لحمض القاليك Gallic acid . كل نقطة من المنحنى تمثل المعدل ± الخطأ المعياري (n=3) .

3. معايرة الفلافونويدات

قدر محتوى الفلافونويدات الكلية للمستخلص البيتانولي لنبات *Globularia alypum* وفقا للطريقة اللونية لكلورير الألمنيوم $AlCl_3$ (252).

- **مبدأ التفاعل**

أساس هذا التفاعل هو تشكيل معقدات بين كلورير الألمنيوم $AlCl_3$ مع المجموعة الكيتونية في الوضع C4 وأحد المجموعات الهيدروكسيلية في الوضع C3 و C5 لكل من الفلافون و الفلافونول كما يمكن أيضا أن يشكل $AlCl_3$ معقد مع وظيفتي الهيدروكسيل الحرة في الوضع ortho للحلقة B كما هو موضح في الشكل. تتميز هذه المعقدات بامتصاص الأشعة عند طول موجة قدره 430 نانومتر.

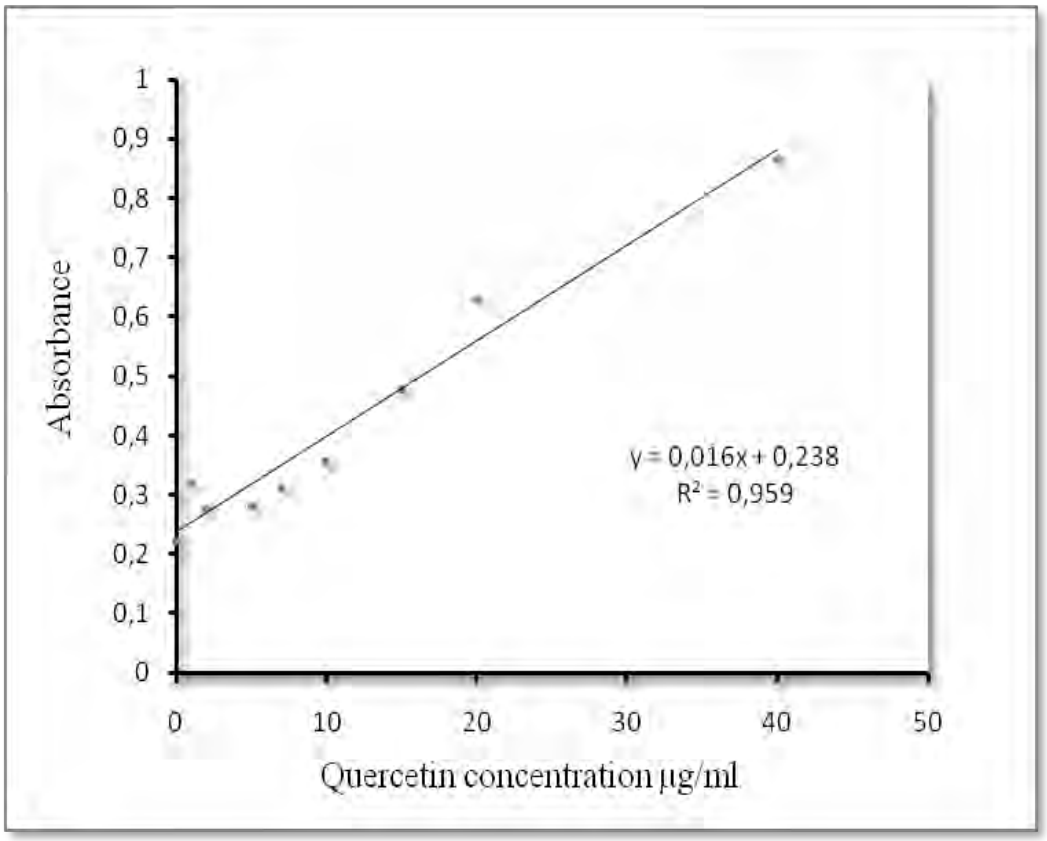


الشكل 36. المعقدات المشكلة بين الفلافونويد و الألمنيوم Al^{3+}

- **طريقة العمل**

1مل لكل تركيز من تراكيز المستخلص البيتانولي (0.5, 1, 1.5, 2 مغ/مل) المحضرة في الميثانول كل على حدى تضاف إلى 1 مل من محلول $AlCl_3$ (2% محضر في الميثانول), بعد الحضن مدة 10 دقائق تمت قراءة الكثافة الضوئية عند 430 نانومتر. حدد تركيز الفلافونويدات للمستخلص بالاعتماد على منحنى المعايرة الذي رسم بين (0-40µg/ml) وحضرت هذه

التراكيز في الميثانول, وعبر عن تركيز الفلافونويدات بما يعادل ميلي غرام كرستين لكل غرام من وزن المستخلص (mg EQ / g E).



الشكل 37. المنحنى القياسي لفلافونويد Quercetin. كل نقطة من المنحنى تمثل المعدل ± الخطأ المعياري (n=3).

4. الدراسة الكروماتوغرافية للمستخلص البيتانولي

يعتمد مبدأ الكروماتوغرافيا على الهجرة التفاضلية لمختلف مكونات المستخلص, وكذا توزيعها بين طورين:

- طور مستقر(ثابت) - stationary phase - يبدي أو يظهر قوة استبقاء أو احتباس rétention فيعمل على تأخر هجرة المكونات.
- طور متحرك (مملص) - mobile phase - يحدث قوة تحريك لجر مكونات العينة وإبعادها عن بعضها البعض ومن ثم إبعادها عن مكان وضعها الابتدائي قدر المستطاع.

ومحصلة هاتين القوتين (قوة الاستبقاء و قوة التحريك) تتغير بحسب الجزيء المراد فصله, ومن ثم سيكون لكل جزيء سرعة هجرة نوعية(خاصة به).

تجرى هذه التقنية بهدف إعطاء فكرة عن المحتوى الفلافونويدي للمستخلص البوتانولي.

1.4. كروماتوغرافيا الورق -PC-

- **مبدأ التقنية**

وهي من أفضل التقنيات الكروماتوغرفية وأكثرها شيوعا في فصل المركبات الفلافونويدية خاصة القطبية كالفلافونويدات السكرية بسبب قدرة الامتصاص العالية التي يتمتع بها الورق وسهولة الكشف باستخدام مصباح UV)248(.

يعتمد الفصل في كروماتوغرافيا الورق على الاختلاف في معاملات التوزيع للمواد المراد فصلها بين طور ثابت, وهو عبارة عن طبقة رقيقة من الماء ممتزة على ورقة ترشيح لذلك فكل أنظمة الفصل تحتوي على الماء, وطور متحرك الذي يكون عادة مذيبا عضويا. خلال عملية الفصل تنتقل مركبات العينة وكذا الطور المتحرك خلال ألياف سيليلوزية مائية متوازية لورقة الترشيح وفق خاصية الثقل إذا كنا بصدد الكروماتوغرافيا النازلة أوالخاصية الشعرية إذا كنا بصدد الكروماتوغرافيا الصاعدة.

ومن أنواع الورق الموجودة هي Arches, Durieux, Schull, Schleider, Whatman ; والأكثر انتشارا هو واتمان. توجد ثمانية أنواع من ورق واتمان مرتبة حسب سمكها, وحسب نسيج مساحتها وكذا سرعة انتشار الماء بها. عمليا ولفصل المركبات الفلافونويدية نستعمل ورق واتمان رقم I أ III.)254.205.185(.

- **كيفية إجراء كروماتوغرافيا الورق**

تم القيام بعملية الفصل باستعمال ورق واتمان من النوع I, وحضرت الورقة بأبعاد تتلاءم مع الحوض, بحيث تم طيها من الناحية العلوية, ووضع المستخلص بواسطة ماصة باستور على بعد 2 سم من الهامش وهذا بعد إذابته في الميثانول, عندما جفت الحزمة وضعت الورقة داخل الحوض الزجاجي بحيث غمست حافتها العلوية المطوية في الطور العضوي لخليط المذيبات(المملص أو الطور المتحرك) المشكل ٍ ِ:

البوتانول / حمض الخل / الماء)B.A.W(

وذلك بالنسب التالية: 4: 1: 5

ويعمل هذا الأخير على إنزال الحزم تسلسليا. استمرت العملية من 16 إلى 18 ساعة, بعدها جففت الورقة وتم تحديد الحزم بمصباح للأشعة الفوق البنفسجية (365 نانومتر) ومن تم دراسة سلوكها الكروماتوغرافي.

2.4. كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة للمستخلص البيتانولي -TLC -

حققت حسب طريقة (253).

- **مبدأ التقنية**

تشبه هذه التقنية كروماتوغرافيا الورق إلا أنها تختلف عنها في ميكانيكية الفصل, حيث تعتمد كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة أساسا على ظاهرة الادمصاص أو الامتزاز – adsorption- فينتقل الطور المتحرك خلال طور مستقر مثبت على صفيحة زجاجية أو ورقة لينة من مادة البلاستيك أو الألمنيوم, ويكون هذا الانتقال تبعا للخاصية الشعرية (كروماتوغرافيا صاعدة), في حين ينتقل كل مكون من مكونات المستخلص بسرعته الخاصة خلف جبهة المذيب, وتتوقف هذه السرعة الخاصة على:

– القوى الكهروساكنة التي تعمل على احتباس المكونات على الطور المستقر
– ذوبا نية مكونات المستخلص في الطور المتحرك (185).

- **كيفية إجراء كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة**

– إعداد الطور الثابت: حضرت طبقة رقيقة ذات سمك منتظم (0.25 ملم) من متعدد الأميد على صفائح من زجاج ذات الأبعاد (20 سم–20 سم) بحيث استعملنا 50مل من الميثانول لكل 10غ من متعدد الأميد وبواسطة جهاز خاص وهو الناشر– Etaleur – حضرت 5 صفائح وبعدها تركت لتجف.

- تم وضع المستخلص بعد إذابته في الميثانول (لايكون لا مركز ولا مخفف) ويوضع باستعمال أنبوبة شعرية على بعد 1.5 سم من أحد أضلاع الصفيحة.

- الفصل على البعد الأول : يتكون الطور المتحرك للفصل في هذا البعد من المذيبات التالية:

(H_2O / MeOH / méthyléthylcétone / Acétyl acetone)

وذلك بالنسب التالية: 1: 3: 3: 13

بعد وضع الطور المتحرك في الحوض الزجاجي, توضع الصفيحة بداخله بحيث نراعي أن لا تنغمس نقطة وضع المستخلص.

يهاجر المملص مارا بالمستخلص إلى أعلى الصفيحة بحيث يفصل مكونات هذا الأخير كلا حسب قوة امتزازه على الدعامة الثابتة وعندما تقترب جبهة المذيب من الضلع بحوالي 1 سم تم إخراجها من الحوض.

الفصل على البعد الثاني: تركت الصفيحة لتجف بعد الفصل بالبعد الأول ثم غمست في مملص آخر بعد إدارتها بمقدار 90° و استعملنا للفصل في هذا البعد المذيبات التالية:

Toluène / méthyléthylcétone / ME(OH)

وكانت النسب كما يلي: 4:3:3

وقد استغرقت العملية في البعد الأول 7 ساعات بينما في البعد الثاني 4 ساعات.

عند نهاية الهجرة, وفصل المكونات الفلافونويدية للمستخلص تم تحديد المكان الذي وصلت إليه جبهة المذيب لمعرفة المسافة التي قطعها. وبعد تجفيف الصفيحة اتجهنا إلى رسم الخريطة الكروماتوغرافية بالاستعانة بمصباح للأشعة الفوق بنفسجية (365 نانومتر) ومن ثم دراسة السلوك الكروماتوغرافي لها.

لمعرفة نوع الفلافونويد المفصول نعتمد على خواصه الكروماتوغرافية كلونه الاستشعاعي وثابت انحباسه.

3.4. دراسة السلوك الكروماتوغرافي

1.3.4. اللون الاستشعاعي

يمكن الحصول على عدة معلومات أولية تساعدنا على تحديد بنية المركبات الفلافونويدية من خلال اللون الاستشعاعي لهذه المركبات أثناء تعريضها للأشعة الفوق بنفسجية UV, إذ أن كل المركبات الفلافونويدية باستثناء Isoflavone ترى تحت الأشعة فوق البنفسجية على شكل بقع ملونة و أحيانا تظهر البقع مشعة. توجد هناك علاقة وثيقة بين اللون الاستشعاعي للمركبات وطبيعتها وكذا طبيعة مستبدلاتها, والجدول الموالي يبين ذلك.

الجدول 4. العلاقة بين لون المركب تحت الأشعة الفوق بنفسجية - UV- وبنيته الكيميائية

لون المركب الفلافونويدي تحت الأشعة	صنـــف الفلافونيـــد	المرجـــــع
بني داكن	– فلافونولات سكرية أو فلافونات سكرية – فلافونويدات ثنائية وأحيانا فلافونات مستبدلة	(183)
بنفسجي – نيلي	– فلافونول أو فلافانول يملك هيدروكسيل في الوضع 3 – فلافون أو فلافانون بدون OH في الوضع 5 – فلافونول مستبدل في الوضع 3 أو بدون OH في الموضع 5	(248) (168)
أصفر أو أصفر باهت	– فلافونول مع OH حر في الموضع 3 ومع أو بدون OH في الموضع 5	(248), (168)
أصفر مخضر	أورون	(248) (168)
أخضر	بعض الشالكونات	(248) (168)
أزرق	أحماض فينولية, كومارينات	(255)

فتمت ملاحظة البقع تحت مصباح للأشعة الفوق بنفسجية عند 365 نانومتر.

2.3.4. ثابت الانحباس – RF –

يعرف ثابت الانحباس بأنه النسبة بين المسافة المقطوعة من طرف المركب انطلاقا من نقطة البداية والمسافة المقطوعة من طرف المذيب من نفس النقطة. إذ يعتبر قيمة مميزة للمركب في شروط كروماتوغرافية معينة من درجة الحرارة, المملص, طبيعة المادة الدامصة, تركيز العينة, سمك الطبقة)185(.

ونلجأ في أغلب الأحيان إلى حساب RF لتحديد البنية الجزيئية المحتملة وهذا لوجود علاقة بين RF وطبيعة المركب, حيث أن قيمته تتأثر بالمستبدلات ومواقعها على الجزيء, فانطلاقا من قيم معامل الانحباس يمكننا التمييز ما إذا كان المركب أجليكونا أو جليكوزيديا وكذا ما إذا كان عديد الميثوكسيل بالنسبة للأول أو أحادي, ثنائي أو متعدد السكر بالنسبة للثاني كما يوضحه الجدول.

الجدول 5. العلاقة بين ثابت الانحباس – RF – وبنية الفلافونويد)257.256)

البنية الفلافونويدية	ثابت الانحباس – RF –
الزيادة في مجاميع الهيدروكسيل	نقصان RF في المذيبات العضوية
تثبيت المجموعات السكرية – الجلكزة –	نقصان RF في المذيبات العضوية زيادة RF في المذيبات المائية
استبدال مجموعة OH بمجموعة CH3	زيادة قيمة RF في المذيبات العضوية ونقصانها في المذيبات المائية

عندما اقتربت جبهة المذيب من الضلع العلوي بحوالي 1سم بالنسبة لكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة وكذا 1سم من الحافة السفلية لكروماتوغرافيا الورق أخرجت الصفيحة من الوعاء والورقة من الحوض الزجاجي.

حدد المكان الذي وصلت إليه جبهة المذيب لمعرفة المسافة التي قطعها, كما تم تعيين مراكز البقع بالاستعانة بمصباح UV ومن تم يمكن تحديد المسافة التي قطعتها كل حزمة وبالتالي حساب قيمة RF لها.

5. مطيافية امتصاص الأشعة الفوق بنفسجية

تحتوي الفلافونويدات على مجموعات وظيفية هي المسؤولة عن قدرتها على امتصاص الأشعة فوق البنفسجية والتي تدعى بـــ Chromophores (مواقع غنية بالالكترونات كما قد تكون عبارة عن مجموعات كيميائية مثل مجموعة الهيدروكسيل OH -, الميثوكسيل CH3O-...(.

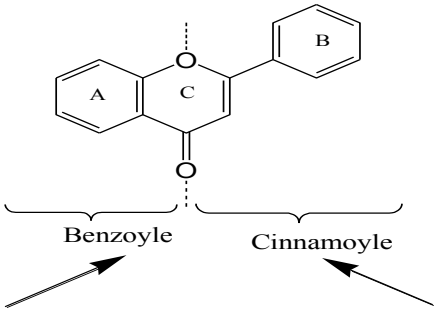
تعد مطيافية الأشعة فوق البنفسجية من أهم الوسائل المستعملة للتعرف على البنية الكيميائية للمركبات الفلافونويدية رغم تطور طرق التحليل الأخرى وقد نشرت أبحاث عديدة تؤكد ذلك حيث يرجع هذا إلى أسباب عديدة كسهولة وسرعة تحقيقها, لا تحتاج إلى كمية كبيرة من المركب لانجازها كما أنها تعطي معلومات وافية عن البنية الكيميائية لهذه المركبات.)205.186.166(.

1.5. طيف الامتصاص في الوسط الميثانولي المتعادل

يتكون طيف امتصاص الأشعة الفوق البنفسجية للفلافونات و الفلافونولات من عصابتي امتصاص:

- **العصابة I:** ذات قيمة امتصاص عضمى في حدود(300-385 نانومتر) وتنتج عن الشكل الرنيني Cinnamoyl الناتج بدوره عن ترافق مجموعة كربونيل C4 مع الرابطة الثنائية والحلقة العطرية B إذ تسمح بتمييز الفلافونول عن الفلافون حيث تعطي معلومات عن التغيرات البنيوية للحلقتين B و C.

- **العصابة II:** ذات قيمة امتصاص عظمى في حدود (250-280 نانومتر) وهي راجعة إلى امتصاص الصورة Benzoyl الناجمة عن ترافق مجموعة الكربونيل مع الحلقة العطرية A)205.186(.



العصابة I العصابة II

الشكل 38. ترافق مجموعة الكربونيل مع الحلقتين البنزينيتين A وB

إن التمييز بين بنية الفلافون و الفلافونول يكون من خلال وضعية العصابة I في الطيف الميثانولي)166(. فالحزمة تظهر بين (305–350 نانومتر) بالنسبة للفلافون وبين (350–385 نانومتر) بالنسبة للفلافونول .

الجدول6. أهم الانزياحات الملاحظة للعصابتين I و II في الميثانول)248(

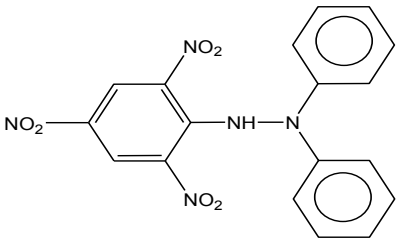
العصابة I نانومتر	العصابة II نانومتر	نوع الفلافونويد
350-310	280-250	فلافون
360-330	280-250	فلافونول 3OH مستبدل
385-350	280-250	فلافونول 3OH حر
330-310 330-300	275-245 295-275	ايزوفلافون ايزوفلافون(5-dioxy-6,7 dioxygéné)
390-340	270-230 شدة منخفضة	شالكون
380-340	270-230 شدة منخفضة	أورون
465-360	280-270	أنتوسيانيدين و انتوسيانين

III. تقدير النشاط الآسر للجذور الحرة (اختبار °DPPH)

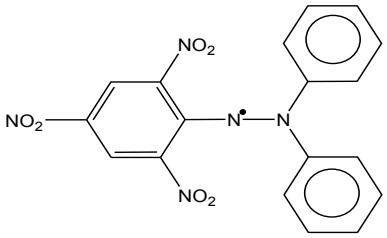
حددت قدرة المستخلص البيتانولي على أسر والتقاط الجذور الحرة بالطريقة اللونية)258(وذلك باستعمال الجذر الحر الثابت °DPPH 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl وتعتبر من أهم الاختبارات المعتمدة في تقييم الدور المانع للأكسدة.

- **مبدأ التفاعل**

يعتمد هذا التفاعل على أساس إرجاع جذر DPPH° بالجزيئات المعطية لذرات الهيدروجين للمستخلص البيتانولي (الجزيئات المضادة للأكسدة), بحيث يتم إرجاع جذر DPPH° (ذو اللون البنفسجي) باقتناصه لذرة هيدروجين إلى مركب DPPH-H (ذو اللون الأصفر) ويترجم هذا التغير في اللون بنقص في الامتصاص بدلالة الزمن عند طول موجة 517 نانومتر. وفيما يلي شكل يوضح كل من الصورة الجذرية والمرجعة لـــ DPPH°.



الصيغة المرجعة (DPPH-H)



الصيغة الجذرية (DPPH°)

الشكل 39. الصيغة الكيميائية الجذرية والمرجعة لـــ DPPH° (182)

- **طريقة العمل**

انطلاقا من محلول ميثانولي ذو التركيز C1= 5مغ/مل للمستخلص البيتانولي حضرت التخفيفات التالية:C2 = 3 مغ/مل, C3 = 2 مغ/مل, C4 = 1 مغ/مل, C5 = 0.5 مغ/مل, C6 = 0.25 مغ/مل, C7 = 0.125 مغ/مل.

أخذ حجم قدره 15µl لكل تركيز من تراكيز المحلول الميثانولي للمستخلص البيتانولي (كل تركيز على حدى) ويضاف لها 1.5مل من المحلول الميثانولي لجذر DPPH° بتركيز 100 ميكرومول/لتر (100µM), بعد الخلط الجيد تم حضن الخليط التفاعلي في الظلام عند درجة حرارة المخبر لمدة 15 دقيقة وتمت قراءة الكثافة الضوئية عند 517 نانومتر مقابل الشاهد المحضر في نفس الشروط التجريبية لكن باستعمال الميثانول بدل محلول المستخلص وكانت القراءة كل 30 ثانية مدة 5 دقائق. تمت مقارنة النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص البيتانولي بتلك الخاصة بالفلافونويد التجاري Quercetin. حدد النشاط المضاد للأكسدة لـــ Quercetin بنفس البروتوكول التجريبي الخاص بالمستخلص.

ثانيا. دراسة تأثير المستخلص البيتانولي لنبات *Globularia alypum* على السمية الحادة لـ Doxorubicin

I. الحيوانات التجريبية

1. تربية الحيوانات

لإجراء الدراسة التجريبية, تم اختيار جردان بيضاء من جنس ذكري (Wistar strain) جلبت من معهد باستور للجزائر العاصمة, عمرها حوالي ثلاث أشهر وقدر وزنها بـــ 180غ ± 30غ. ربيت في مستودع الحيوانات لجامعة منتوري قسنطينة حيث قسمت في أقفاص تربية إلى أربع مجموعات, كل مجموعة مكونة من ستة جرذان وفر لها الغداء ,الماء والنظافة واحتفظ بها في ظروف تجريبية قياسية من الحرارة (25 ± 5°م) والرطوبة تحت فترات متناوبة من الإضاءة والظلام (12سا) مع العلم أنه قبل بداية البروتوكول التجريبي تركت الحيوانات لمدة أسبوع لتتأقلم على هذه الظروف الجديدة.

2. معاملة الحيوانات

عوملت الحيوانات حسب البروتوكول التجريبي التالي:

مجموعة الشاهد: تلقت المحلول الملحي الفيزيولوجي NaCl 0.9% بحجم قدره 5مل/كغ عن طريق الفم 6أيام في الأسبوع لمدة 4 أسابيع.

مجموعة المستخلص البيتانولي: تلقت المستخلص البيتانولي بجرعة قدرها 100 مغ/كغ عن طريق الفم 6أيام في الأسبوع لمدة 4 أسابيع.

مجموعة Doxorubicin : تلقت المحلول الملحي الفيزيولوجي NaCl 0.9% بحجم قدره 5مل/كغ عن طريق الفم لمدة 4 أسابيع وفي اليوم الأخير حقنت بمضاد السرطان DOXO, تحت الغشاء البريتوني بجرعة قدرها 20مغ/كغ (22).

مجموعة المستخلص البيتانولي– Doxorubicin : حقنت بمضاد السرطان DOXO تحت الغشاء البريتوني بجرعة قدرها 20مغ/كغ. بعد أن عوملت بالمستخلص البيتانولي بجرعة 100 مغ/كغ عن طريق الفم 6أيام في الأسبوع لمدة 4 أسابيع.

3. سحب العينات الدموية وتحضير العينات البيولوجية

بعد 48 ساعة من حقن DOXO لمجموعة المستخلص ومجموعة المستخلص– DOXO تم أخذ عينات الدم لكل المجاميع من الزاوية الأنسية للعين باستعمال أنابيب شعرية, ثم جمعت هذه العينات في أنابيب تحتوي على مادة الهيبارين وأجريت لها عملية طرد مركزي عند 6000 دورة لكل دقيقة مدة 15 دقيقة بعدها فصل السائل الطافي (البلازما) لغرض تقدير المؤشرات البيوكيميائية الإنزيمية للتسمم القلبي (LDH, CPK, AST).

قتلت الجرذان بالفصل الدماغي- cervical dislocation - وتم تشريحها لعزل عضلة القلب التي غسلت جيدا (لعدة مرات) بالمحلول الملحي الفيزيولوجي NaCl 0.9% المثلج لغرض التخلص من بقايا الدم ثم جففت باستعمال ورق ترشيح بعدها قسمت إلى جزأين:

- الجزء الأول وضع في Formol بتركيز 10% من أجل استعماله للدراسات النسيجية.
- الجزء الثاني استعمل لتحضير المجنس القلبي; حيث تمت عملية التجانس في ملح KCl بتركيز 1.15% وحجم قدره 4.5 مل لكل 0.5غ من النسيج باستعمال Ultra-Turrax homogenizer T 25 ثم عومل الخليط المتجانس بعملية الطرد المركزي على 4000 دورة لكل دقيقة لمدة 10 دقائق وفصل السائل الطافي لاستعماله في تقدير الإجهاد ألتأكسدي من خلال معايرة GSH و MDA .

II. تقدير المؤشرات البيوكيميائية للتسمم القلبي في البلازما

قدر نشاط كل من CPK, LDH و AST باستعمال Automatique Analyzer

(Architect Abbott ci 8200)

1. تقدير نشاط CPK

- **مبدأ التفاعل**

يعمل إنزيم creatine phosphokinase على فسفرة ADP بالكرياتين فوسفات Phosphate creatine لإنتاج جزيئة ATP. وهذا التفاعل مرتبط بالتفاعلات المحفزة بكل من إنزيم hexokinase (HK) .)G6P-DH(glucose 6 phosphate dehydrogenase

$$\text{Phosphocreatine} + \text{ADP} \xrightleftharpoons{\text{CPK}} \text{creatine} + \text{ATP}$$

$$\text{ATP} + \text{Glucose} \xrightarrow{\text{HK}} \text{ADP} + \text{Glucose-6- phosphate}$$

$$\text{G6P} + \text{NADP}^{+} \xrightarrow{\text{G6P-DH}} \text{6- Phosphogluconate} + \text{NADPH} + \text{H}^{+}$$

معدل $NADPH_2$ المتشكل يتناسب مع نشاط CPK الموجود في العينة (البلازما).

2. تقدير نشاط LDH

- **مبدأ التفاعل**

يحفز إنزيم LDH تفاعل إرجاع Pyruvate بمرافق الإنزيم $NADH_2$ إلى Lactate حسب التفاعل التالي:

$$\text{Pyruvate} + \text{NADH} + \text{H}^{+} \xrightarrow{\text{LDH}} \text{L- lactate} + \text{NAD}^{+}$$

نقص تركيز $NADH_2$ يتناسب مع نشاط إنزيم LDH الموجود في البلازما.

3. تقدير نشاط TGO -AST -

- **مبدأ التفاعل**

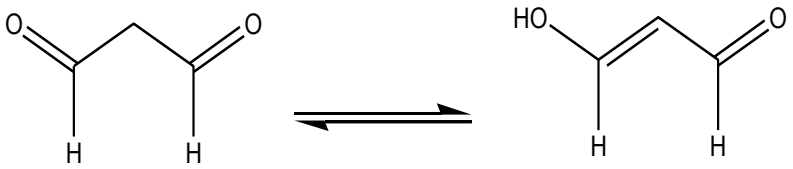
يحفز إنزيم AST تفاعل نقل مجموعة الأمين من Aspartate إلى 2-oxoglutarate لتشكيل oxaloacetate و glutamate. نشاط AST يتناسب مع معدل oxalate المتشكل في مدة زمنية محددة ويتم قياس هذا النشاط بتفاعل يتدخل فيه 2,4- dinitrophenylhydrazine (DNPH) في وسط قاعدي.

III. تقدير بعض مؤشرات الإجهاد التأكسدي في المجنس القلبي

1. معايرة MDA السيتوزولي للقلب

يعتبر Malondialdehyde (MDA) أحد النواتج النهائية المتشكلة خلال فوق الأكسدة الليبيدية التي تتسبب فيها الجذور الحرة للأحماض الذهنية عديدة عدم التشبع والتي تملك على الأقل ثلاث روابط

زوجية وهو بذلك من أحد المؤشرات المستعملة لتقييم الإجهاد التأكسدي. استعملنا لهذه المعايرة طريقة (259).



الشكل40. الصيغة الكيميائية لـــ MDA(Malondialdehyde) (27)

- **مبدأ التفاعل**

تعتمد هذه المعايرة على أساس تفاعل جزيئة واحدة من MDA مع جزيئتين لحمض TBA)Thiobarbituric acid(في وسط حمضي (درجة PH بين 2- 3) وتحت درجة حرارة 100°م لمدة 15 دقيقة, حيث يتكون ناتج من خضاب ملون بلون قرنفلي(أحمر وردي) Pink pigment product, يستخلص هذا الخضاب باستعمال المذيبات العضوية مثل n-butanol وبالتالي يمكن قراءة كثافته الضوئية على طول موجة قدرها 535 نانومتر.

- **طريقة العمل**

لتحقيق هذه المعايرة استعملنا 0.5 مل من العينة (المجنس القلبي) وأضفنا لها 0.5 مل من حمض TCA trichloracetic بتركيز 20 % و 1مل من حمض TBA بتركيز 1% مع العلم أنه تم تحضير ثلاث اختبارات لكل عينة.

تم تسخين الخليط التفاعلي في حمام مائي عند 100° ًىَذة 15 دقيقة غطيت عندها الأنابيب بإحكام, بعد ذلك برد الخليط جيدا وأضيف له 4 ٍو ٍ n-butanol أين تم مزجه بسرعة وبقوة.

عومل الخليط بجهاز الطرد المركزي عند 3000 دورة لكل دقيقة مدة 15 دقيقة لغرض فصل طبقة n-butanol. قراءة الكثافة الضوئية كانت على السائل الطافي (طبقة n-butanol) عند طول موجة قدرها 535 نانومتر مقابل الشاهد الذي حضر في نفس الشروط التجريبية لكن بتعويض العينة بالماء المقطر.

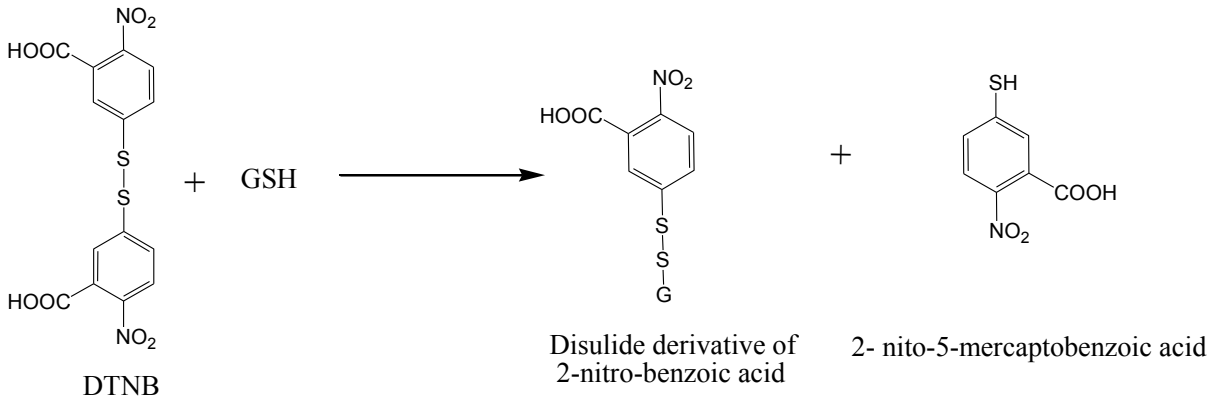
حدد تركيز MDA في العينة اعتمادا على منحنى المعايرة المحضر في نفس الشروط التجريبية باستعمال عدة تراكيز لـــ TEP(Tetraetoxypropane)ب- n mole/l وهو مركب ينتج عن اماهة MDA.

2. معايرة الجلوتاتيون (GSH) السيتوزولي للقلب

- **مبدأ التفاعل**

لمعايرة كمية الجلوتاتيون السيتوزولي القلبي اعتمدنا على طريقة)260(وذلك باستعمال كاشف الألمن)Ellman's reagent(DTNB ([5,5'- dithio-bis- [2- nitrobenzoic acid).

يعتمد أساس التفاعل على عملية إرجاع DTNB بواسطة مجموعات الثيول (SH) للجلوتاتيون فيتشكل حمض 2-nitro-5-mercaptobenzoic acid كما هو موضح في التفاعل التالي:



الشكل41. تفاعل GSH مع كاشف Ellman

يتميز حمض Nitromercaptobenzoic بلون شديد الصفرة مما يمكن من قياسه بواسطة جهاز المطياف الضوئي على طول موجة 412nm.

- **طريقة العمل**

تمت عملية طرد مركزي للعينة على 2000 rpm لمدة 5 دقائق وبعدها أخذ 0.2 مل من السائل الطافي وأضيف له 1.7مل من منظم الفوسفات (PH 7, 0.1M) و 0.1 مل من كاشف الألمن 0.396 غ/100مل وتمت القراءة على طول موجة 412nm مقابل الشاهد الذي حضر في نفس الشروط التجريبية.

حدد تركيز GSH للعينة اعتمادا على منحنى القياسي المحضر في نفس الشروط التجريبية باستعمال عدة تراكيز للجلوتاتيون المختزل GSHب- µmol/ml.

IV. الدراسة النسيجية لتأثير المستخلص البيتانولي على نسيج القلب

1. تحضير المقاطع النسيجية

أجريت الدراسة النسيجية على قلب جرذان المجموعات الأربعة تحت الدراسة وتمت هذه الدراسة كما يلي:

تم تثبيت قطع النسيج القلبي في Formol المعدل المخفف إلى 10% لمدة 12-24ساعات بعدها تم غسل النسيج بالماء لإزالة هذا الأخير بالايثانول متزايد العيار (Deshydration) ثم غمرت في xylène بغرض تشفيفها (Eclaircissement). بعد وضع القطع في حمام من paraffin عند 52-54° مدة 12 ساعة تم تضمينها أو طمرها في شمع البارافين (Inclusion in paraffin) باستعمال جهاز التضمين Leica EG 1160 وهذا بهدف إعطائها صلابة كافية للقطع. قطعت قوالب paraffin بواسطة جهاز Microtome إلى مقاطع ذات سمك 5 ميكرومتر ثم بسطت ولصقت على شرائح زجاجية مغطاة بماء جيلاتيني. تمت إزالة paraffin من الشرائح باستعمال Xylene و اتبعت هذه العملية بإعادة التمييه Rehydratation باستعمال الايثانول 100°.

قمنا بتلوين المقاطع Coloring topographic باستعمال صبغة Hematoxylin and Eosin بحيث لونت المقاطع في أول الأمر بـــ Hematoxylin (Hemalun) لمدة 10-20 ثانية, الذي يعمل على تلوين الأنوية بلون أزرق بنفسجي عاتم بعدها غسلت بالماء لإزالة الصبغ الزائد ثم لونت بـــ Eosin لمدة 5 دقائق والذي يلون السيتوبلازم بلون وردي ونغسل بالماء مرة أخرى لإزالة اللون الأحمر من سطح الشرائح, ولتنضيف المقاطع الملونة وتشفيفها مررت في الايثانول 100° ثم Xylene بعدها غطيت ما بين شريحة وساترة بواسطة صمغ كاره للماء Eukit وتركت لتجف تحت درجة حرارة المخبر أين أصبحت جاهزة للملاحظة تحت المجهر الضوئي.

2. تصوير المقاطع النسيجية

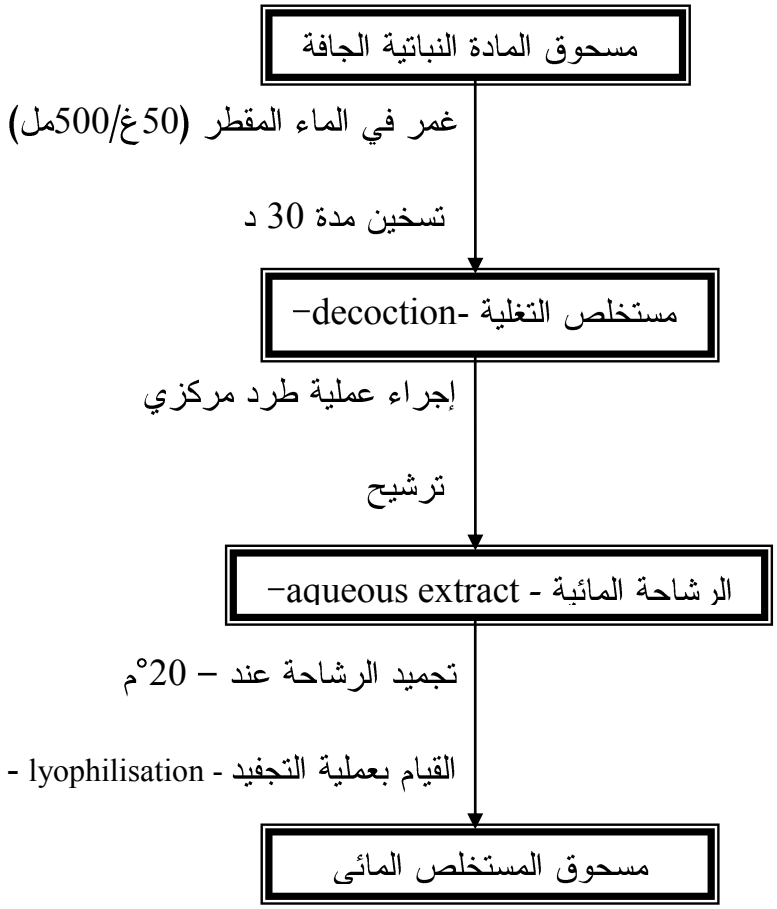
لتوضيح مختلف الملاحظات المجهرية للمقاطع النسيجية بعد الفحص النسيجي, أخذت الصور باستعمال مجهر ضوئي مزود بآلة تصوير مستعملين العدسات الشيئية x 40 و x 100(استعملنا immersion oil).

ثالثا. دراسة تأثير المستخلص المائي لنبات *Globularia alypum* على سلالات خلوية ورمية في المخبر IN VITRO

I. تحضير المستخلص المائي - aqueous extract – لنبات *Globularia alypum*

تم غمر مسحوق الأجزاء الهوائية الجاف للنبتة في الماء المقطر (50غ مسحوق نباتي لكل 500 مل من الماء المقطر) ثم سخن الخليط مدة 30 دقيقة, عومل بعدها المستخلص المغلى بعملية طرد مركزي ثم قمنا بترشيحه.

جمدت الرشاحة عند – 20°م وبعدها تم تجفيدها lyophilised) FreeZone^{R} Dry 4.5, USA(وحفظت عند –20 °م حتى استعمالها (284).



الشكل 42. مراحل تحضير المستخلص المائي لنبات *Globularia alypum*

II. النشاط المضاد للأورام للمستخلص المائي - Anti-tumor activity -

تمت دراسة النشاط المضاد للأورام – (cytotoxic effect) – للمستخلص المائي لنبات *Globularia alypum* على سلالات خلوية ورمية من المعهد القومي للأورام بالقاهرة – مصر – حيث استعملت السلالات الخلوية الورمية التالية:

- سلالة خلوية ورمية بشرية للكبد (Human hepatocarcinoma cell line (Hep G2.
- سلالة خلوية ورمية بشرية للأمعاء (Colon carcinoma cells (HCT-116.
- سلالة خلوية ورمية بشرية لمفاوية (T-lymphocyte cells) lymphoblastic leukemia cells (1301).

1. استنبات الخلايا – Cell Culture-

تمت زراعة الخلايا باستعمال وسط الزراعة القاعدي لـــEagle والمحور بواسطة Dulbeco) DMEM) (Dulbeco's Modified Eagle's Medium) المكون من المضادات الحيوية التالية:

- 100 وحدة دولية /مل من صوديوم بنسيلين ج (100 units/ml penicillin G sodium)
- 100 وحدة دولية /مل من السيلفات ستربتوميسين (100 units/ml streptomycin sulphate)

وهي عوامل مضادة للبكتيريا.

- 250 نانوغرام/مل من أمفوتريسين ب (250 ng/ml amphotericin B) وهو مضاد للفطريات

و أضيف له: 2 ميلي مول/ ل من الجلوتامين - 2 mM L-glutamine - ، 10% من مصل جنين البقر fetal bovine serum (FBS) الغني بعوامل النمو, الألبومين, الإنزيمات المضادة لتحلل البروتينات Antiprotéase وعوامل الالتصاق Attachements factor.... , حفظت الخلايا في محضن عند درجة حرارة 37°م في هواء رطب يحتوي على 5% من CO_2. قمنا بدراسة النشاط المضاد للأورام للمستخلص باستعمال اختبار التضاعف الخلوي.

2. اختبار التضاعف الخلوي Cell Proliferation Assays - Cell Viability Assay -

استعملنا في هذا اختبار MTT Cell Viability Assay)285(.

- **مبدأ التقنية**

يعتمد اختبار MTT (3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) على قدرة الإنزيم الميتوكندري النشط Dehydrogenase للخلايا الحية في شطر حلقة Tetrazolium في MTT ذو اللون الأصفر مشكلا Formazan وهو مركب بلوري غير قابل للذوبان ذو لون أزرق مسود لا يستطيع النفاذ عبر الغشاء الخلوي مما يؤدي إلى تراكمه داخل الخلايا الحية. ينتج عن انحلال الخلايا تحرر البلورات التي يتم إذابتها. يتناسب عدد الخلايا الحية مباشرة مع مستويات مركب Formazan المنحل ذو اللون الأزرق المسود. يقدر إرجاع MTT بقياس الامتصاص عند 570 نانومتر.

- **طريقة العمل**

توضع الخلايا في صفيحة دقيقة microplate تحتوي على 96 حجيرة)well(, يوضع في كل واحدة منها 0.5X105 خلية (0.5X105 cells/ well) وذلك في وسط الزراعة القاعدي DMEM الذي يحوي على 10% من FBS, تعامل بعدها الخلايا بـ DMSO (<0.5%) (الشواهد) أو بـ 20µl من مختلف التراكيز للمستخلص المائي, حيث استعملنا التراكيز التالية: (12.5µg/ml, 25µg/ml, 50 µg/ml, 100µg/ml) تمت إذابة المستخلص باستعمال dimethyl sulphoxide (DMSO) حيث قدر التركيز النهائي لهذا الأخير بـ 0.1% (V/V))295(, تركت الخلايا للحضن مدة 48 ساعة عند درجة حرارة 37°م في هواء رطب يحتوي على 5% من CO_2. بعد الحضن تم نزع وسط الزراعة وأضيف 40µl من محلول MTT المحضر في الماء الفيزيولوجي)NaCl 0.9%(بتركيز 5 مغ/مل ثم تم الحضن لمدة 4 ساعات إضافية. قمنا بإذابة بلورات formazan بإضافة 180µl من الايزوبروبانول الحمضي (180 µl of acidified isopropanol / well) isopropanol(في 0.4N من HCl(وحضنت عند 37°م طوال الليل وبعدها تمت قراءة الامتصاص الضوئي عند 570 نانومتر. تم التعبير عن النتائج بنسبة النمو percentage of viability وتم حساب هذه النسبة حسب المعادلة التالية:

[امتصاص الخلايا المعاملة بالمستخلص / امتصاص الخلايا الشاهدة] × 100

[Absorbance of treated cells/ Absorbance of control cells)] X 100

يتم حساب التركيز المثبط لـ 50 % (IC_{50}) من منحنى نسبة النمو بدلالة تركيز المستخلص.

رابعا. الدراسة الإحصائية

تم التعبير عن النتائج في شكل المعدل ± الانحراف المعياري. قدر التغير الإجمالي الموجود في النتائج بواسطة Student's *t* test وهذا باستعمال النظام الإحصائي SPSS . تم تحليل الاختلافات ما بين المعدلات بواسطة تحديد أصغر فرق معنوي LSD(Least significant difference)عند مجال الثقة %95 (P < 0.05) .

- P < 0.05: تعبر عن تأثير غير معنوي
- P > 0.05: تعبر عن تأثير معنوي
- P > 0.01: تعبر عن تأثير جد معنوي
- P > 0.001: تعبر عن تأثير معنوي عالي جدا – مثالي–

النتائج و التعليق

النتـــــــــائج والتعليـــــــق

أولا . الاستخلاص والدراسة الفيتوكيميائية

I. الاستخلاص

بعد الاستخلاص الانتقائي لمختلف الفلافونويدات للأجزاء الهوائية لنبات *Globularia alypum* باستعمال المذيبات المتفاوتة القطبية (ايثيرالبترول, أسيتات الايتيل والبوتانول) تحصلنا على المستخلصات التالية:

- المستخلص الجاف الخام لايثير البترول
- المستخلص الجاف الخام لأسيتات الايتيل
- المستخلص الجاف الخام للبوتانول

وكان المردود المتحصل عليه لكل مستخلص كما يلي:

جدول7. المردود (النسبة المؤوية) لمستخلصات الجزء الهوائي لنبات *Globularia alypum*

كتلة المـــــادة النباتيـــــة	المستخلصات	الكتلـــــــة	المـــــردود
1779غ	**ايثير البترول**	2غ	% 0.11
	أسيتات الايتيل	5.56غ	%0.31
	البوتانول	238.31غ	%13.39

II. الدراسة الفيتوكيميائية للمستخلص

خلال دراستنا, قمنا باستخلاص أحد أهم نواتج الأيض الثانوي لنبات *Globularia alypum* وهي الفلافونويدات, وكانت نتائج الدراسة الفيتوكيميائية التي ركزت على المستخلص البوتانولي كما يلي:

1. اختبار الكشف عن الفلافونويدات

كانت نتيجة الاختبارين الكيميائيين للكشف عن الفلافونويدات في المستخلص البيتانولي ايجابية, فمن خلال الاختبار الأول تمت ملاحظة اللون الأصفر عند استعمال محلول الأمونياك المخفف والذي اختفى بعد إضافة بعض القطرات من حمض الكبريت المركز كما تبين من خلال الاختبار الثاني ظهور اللون الأصفر بعد إضافة بعض القطرات من كلورير الألمنيوم (AlCl3 1%) للرشاحة المائية للمستخلص مما يؤكد وجود الفلافونويدات في المستخلص البيتانولي للجزء الهوائي لنبات *Globularia alypum*.

2. معايرة متعدد الفينول

أعطت معايرة متعدد الفينول للمستخلص البيتانولي باستعمال طريقة (251) النتائج التالية:

- **معادلة منحنى القياسي المحضر باستعمال حمض القاليك (Gallic acid)**

$$y = 0.004\,X + 0.108, \quad R^2 = 0.971$$

Y: قيمة الامتصاص الضوئي مقاسة بجهاز المطياف الضوئي

X: تركيز المحلول الميثانولي لحمض القاليك

- **تركيز متعدد الفينولات في المستخلص البيتانولي**

عبرعن تركيز متعدد الفينولات بما يعادل ميلي غرام من حمض القاليك لكل غرام من المستخلص الجاف - Gallic Acid Equivalents/g dry weight - (mg GAE / g extrait) ، تم حسابه اعتمادا على معادلة منحنى القياسي كما يلي:

$$C = (Y - 0.108)/0.004 \quad (\mu g/ml)$$

Y : قيمة الامتصاص الضوئي للخليط التفاعلي للمستخلص البيتانولي

C: تركيز متعدد الفينولات في المحلول الميثانولي للمستخلص البيتانولي والمعبر عليها بما يعادل حمض القاليك(GAE(بـــ (µg/ml)

والجدول التالي يوضح كمية متعدد الفينولات في المستخلص البيتانولي والمعبر عليها بما يعادل ميلي غرام من حمض القاليك لكل غرام من المستخلص (mg GAE/ g):

جدول 8. تركيز متعدد الفينول في المستخلص البيتانولي لـــ *Globularia alypum*

المحلول الميثانولي للمستخلص البيتانولي	تركيز متعدد الفينول في المستخلص البيتانولي (mg GAE/ g extrait)	
	الاختبار الأول	الاختبار الثاني
1مغ/مل	98	108
2مغ/مل	105.25	104

يقدر معدل متعددات الفينول في المستخلص البيتانولي للأجزاء الهوائية لنبات *Globularia alypum* والمعبر عليه بما يعادل حمض القاليك بـــ:

C=103.81 ± 3.65 mg GAE / g dry weight

3. معايرة الفلافونويدات

باستعمالنا لطريقة)252(لمعايرة الفلافونويدات في المستخلص البيتانولي تحصلنا على النتائج التالية:

- **معادلة منحنى القياسي المحضر باستعمال فلافونويد الكرستين– Quercetin-**

$$Y = 0.016\,X + 0.238 \qquad R^2 = 0.959$$

Y: قيمة الامتصاص الضوئي مقاسة بجهاز المطياف الضوئي

X : تركيز المحلول الميثانولي لفلافونويد الكرستين بـــ)µg/ml(

- **تركيز الفلافونويدات في المستخلص البيتانولي**

عبرعن تركيز الفلافونويدات بما يعادل ميلي غرام من فلافونويد الكرستين لكل غرام من المستخلص الجاف (mg QE / g extrait) – Quercetin Equivalents/ g dry weight- ' تم حسابه اعتمادا على معادلة منحنى القياسي كما يلي:

$$C = (Y - 0.238)/0.016 \quad (\mu g/ml)$$

Y : قيمة الامتصاص الضوئي للخليط التفاعلي للمستخلص البيتانولي

C : تركيز الفلافونويدات في المحلول الميثانولي للمستخلص البيتانولي والمعبر عليها بما يعادل الكرستين (QE) بـــ (µg /ml)

والجدول التالي يوضح كمية الفلافونويدات في المستخلص البيتانولي والمعبر عليها بما يعادل ميلي غرام من الكرستين لكل غرام من المستخلص (mg QE / g extrait):

جدول9. تركيز الفلافونويدات في المستخلص البيتانولي لـــ *Globularia alypum*

المحلول الميثانولي للمستخلص البيتانولي	تركيز الفلافونويدات في المستخلص البيتانولي (mg QE / g extrait)		
	الاختبار الأول	الاختبار الثاني	الاختبار الثالث
1مغ/مل	21.37	23.25	23.87
2مغ/مل	19.75	20.37	20.68

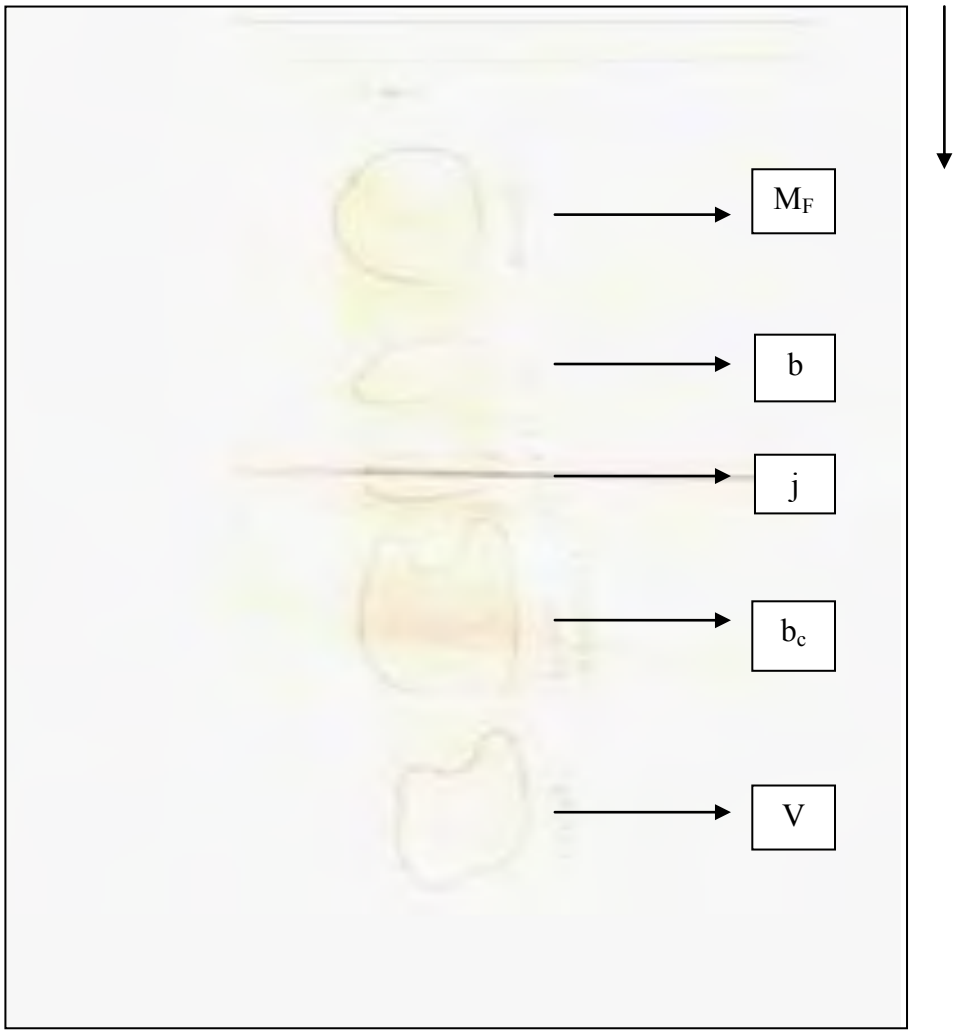
يقدر معدل الفلافونويدات في المستخلص البيتانولي للأجزاء الهوائية لنبات *Globularia alypum* والمعبر عليه بما يعادل فلافونويد الكرستين بـــ

C=21.55 ± 1.51 mg QE / g dry weight

4. نتائج الدراسة الكروماتوغرافية

1.4. كروماتوغرافيا الورق

بعد فصل مكونات المستخلص البيتانولي بورق واتمان رقم I وباستعمال الطبقة العضوية للمملص المكون من ماء/حمض الخل / بوتانول (BAW) بالنسب (4:1:5) حيث كان الفصل على بعد واحد حددنا الحزم المفصولة بالاستعانة بمصباح للأشعة الفوق بنفسجية UV عند 365 نانومتر وتحصلنا على الخريطة الكروماتوغرافية الممثلة في الشكل التالي:



M_F: بني داكن b: أزرق V: بنفسجي

b_c: أزرق فاتح j: أصفر

الشكل43. كروماتوغرام الورق أحادي البعد للمستخلص البيتانولي لنبتة

Globularia alypum

قيم ثابت الانحباس - RF- وكذا اللون الاستشعاعي تحت الأشعة الفوق البنفسجية مدونة في الجدول التالي:

جدول10. نتائج السلوك الكروماتوغرافي على الورق للمستخلص البيتانولي

ثابت الانحباس- RF-	0.19	0.41	0.48	0.72	0.86
اللون تحت أشعة -UV-	بني غامق	أزرق	أصفر	أزرق فاتح	بنفسجي

2.4. كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة -TLC-

بالإضافة إلى كروماتوغرافيا الورق لجأنا إلى الفصل بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة ثنائية البعد باستعمال متعدد الأميد كدعامة صلبة وهذا لتوضيح أكثر.

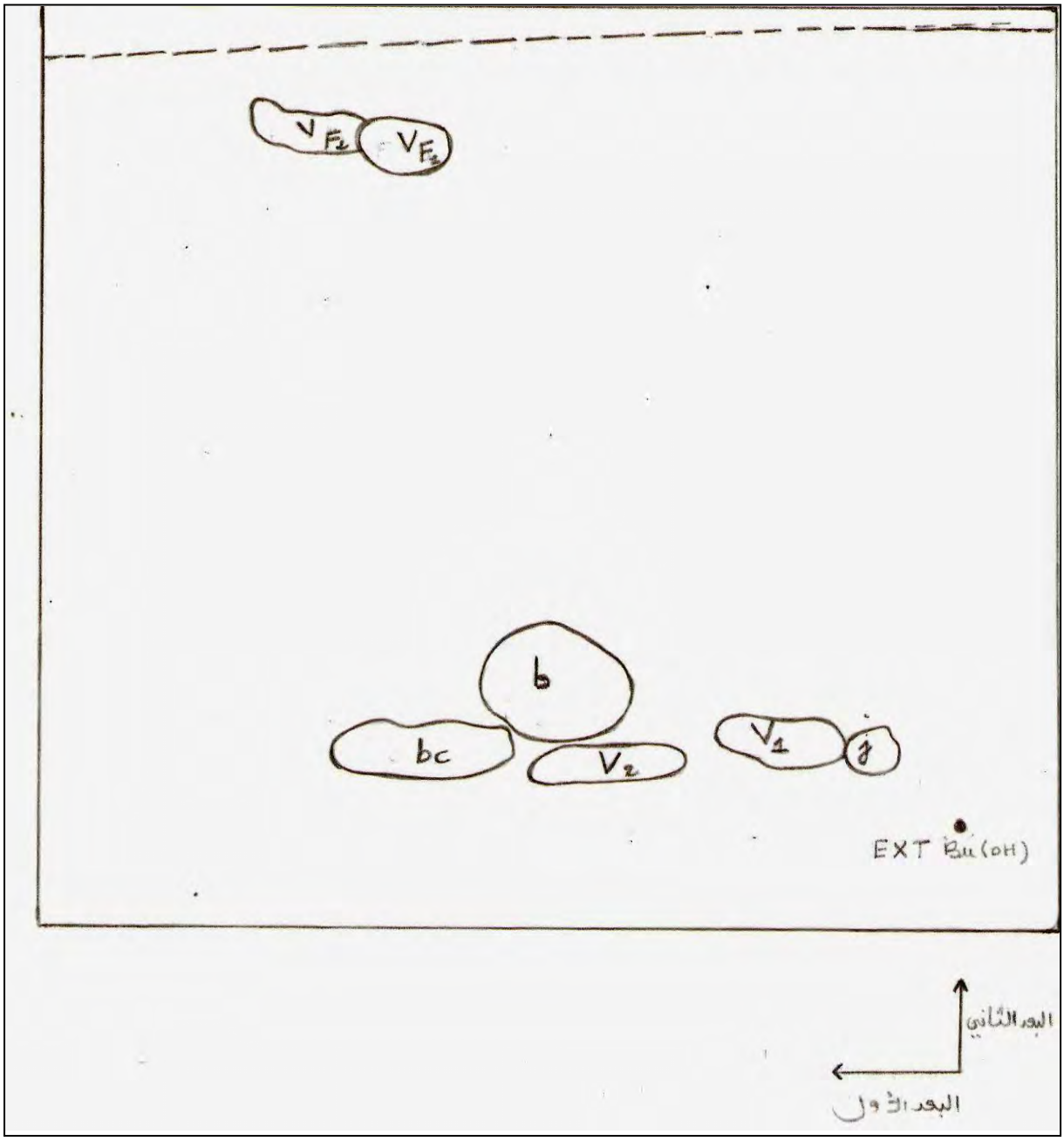
فكان النظام المستعمل للفصل في البعد الأول عبارة نظام مائي:

H_2O_2 / MeOH / MEC / Ac.Ac: (13/3/3/1)

أما النظام المستعمل للفصل في البعد الثاني كان عضويا:

Toluéne / MEC / MeOH: (4 / 3 / 3)

بعد الفصل وتحديد حزم الكروماتوغرام بمصباح للأشعة الفوق بنفسجية عند 365 نانومتر, تحصلنا على الخريطة الكروماتوغرافيا الممثلة في الشكل التالي:



V: بنفسجي j: أصفر V_F: بنفسجي غامق

b: أزرق b_c: أزرق فاتح

الشكل 44. الخريطة الكروماتوغرافية ثنائية البعد للمستخلص البيتانولي لنبتة

Globularia alypum

قيم ثابت الانحباس - RF- وكذا اللون الاستشعاعي تحت الأشعة الفوق البنفسجية مدونة في الجدول التالي:

الجدول11. تحليل كروماتوغرافي على شكل طيف – TLC – للمستخلص البيتانولي

اللون تحت أشعة -UV-	أصفر	بنفسجي	بنفسجي	أزرق	أزرق فاتح	بنفسجي غامق	بنفسجي غامق
ثابت الانحباس - RF-	0.09	0.11	0.08	0.16	0.09	0.77	0.79

من خلال نتائج السلوك الكروماتوغرافي نستنتج ما يلي:

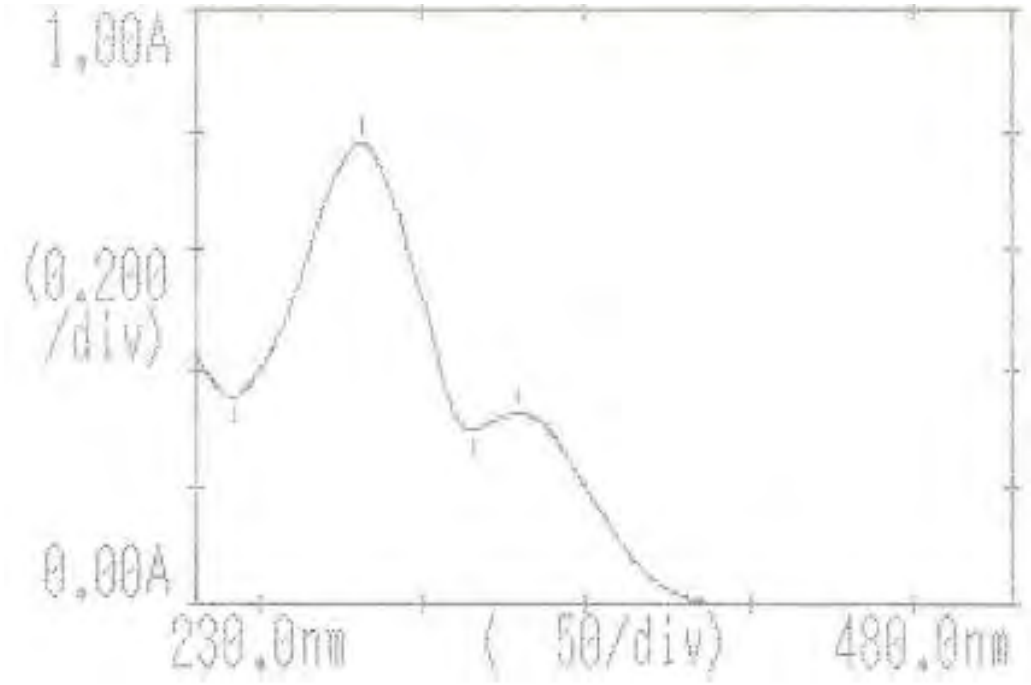
باستعمال كروماتوغرافيا الورق أحادية البعد وباستعمال النظام العضوي (BAW) بالنسب (4:1:5) فان البنى الكيميائية المحتملة تتمثل في:

- الحزمة البنية الداكنة والتي قدرت قيمة RF لها بـــ 0.19 عبارة عن فلافونويدات سكرية, حيث أن نقصان قيمة RF في النظام العضوي كما هو الحال في النظام المستعمل (BAW) يدل على أن المركب قطبي أي يحتوي على مجموعة كبيرة من مجاميع OH (256) ويكون مستبدل بسكر واحد أو مجموعة من السكريات, كما أن اللون البني الداكن تحت الأشعة الفوق بنفسجية يدل على وجود الفلافونويدات السكرية سواء فلافونولات سكرية أو فلافونات سكرية (183).
- الحزمة الزرقاء التي ظهرت في الكروماتوغرام تحت الأشعة UV تدل على وجود الأحماض الفينولية والكومارينات في المستخلص البيتانولي)255(.
- الحزمة الصفراء تدل على أن المركب عبارة عن فلافونولات مع OH حر في الوضع 3 ومع أو بدون OH في الوضع 5 (168. 248).
- تشير الحزمة الزرقاء الفاتحة إلى أن الفلافونويدات عبارة عن فلافونات بدون OH حر في الوضع 5 أو فلافونولات بدون OH حر في الوضع 5 مع OH مستبدل في الوضع 3.
- إن زيادة قيمة RF في النظام العضوي تدل على زيادة مجاميع الميتوكسيل (OCH3) أي أ ايَشمبكِشقطبً, وبالتالي فان الحزمة البنفسجية ذات RF المقدرة بـــ 0.86 في النظام العضوي المستعمل (BAW) عبارة عن فلافونويدات تحتوي مجموعة الميتوكسيل (فلافون, فلافانون أو فلافونول تحتوي على مجموعة ميتيل).

إن الفصل بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة ثنائية البعد باستعمال كل من النظام المائي والعضوي أدى إلى فصل حزم أخرى و أكد على وجود الفلافونويدات السكرية من النوع فلافونات أو فلافونولات, فلافونويدات تحتوي على مجاميع الميثيل, إضافة إلى أحماض فينولية و كومارينات.

5. طيف امتصاص الأشعة الفوق بنفسجية

بين طيف الامتصاص في الوسط الميثانولي للمستخلص البيتانولي لنبتة *Globularia alypum* ظهور عصابتين كما هو موضح في الشكل:



الشكل45. طيف امتصاص الأشعة الفوق بنفسجية للمستخلص البيتانولي لنبات *Globularia alypum*

- **العصابة I:** ظهرت في المجال بين 300–385 نانومتر وهذا نتيجة امتصاص الصورة cinnamoyl الناجمة عن ترافق مجموعة الكربونيل C4 مع الرابطة الثنائية و الحلقة البنزينية B للفلافونويدات, وكانت هذه العصابة منحازة أكثر للمجال 305–350 نانومتر هذا ما يدل على أن المستخلص البيتانولي غني بالفلافونات– Flavones -.
- **العصابة II:** ظهرت في المجال بين 250–280 نانومتر وهي راجعة إلى امتصاص الصورة Benzoyl الناجمة عن ترافق مجموعة الكربونيل مع الحلقة العطرية A.

هذا ما يثبت احتواء المستخلص البيتانولي لنبات *Globularia alypum* على الفلافونويدات.

III. تقدير النشاط الآسر للجذور الحرة (اختبار°DPPH)

لتقييم النشاط المضاد للأكسدة, حددت قدرة المستخلص البيتانولي على أسر والتقاط الجذور الحرة على النماذج المخبرية – IN VITRO - حيث حددت النسبة المئوية لإرجاع الجذر الحر الثابت °DPPH ومقارنة هذه النسبة بتلك الخاصة ف ّ ناخ ج اس ي ا ش س خ ٍ - Quercetin-.

استعملنا لكل من المستخلص البيتانولي و الكرستين التراكيز التالية: 5مغ/مل, 3 مغ/مل, 2 مغ/مل, 1مغ/مل, 0.5 مغ/مل, 0.25 مغ/مل و 0.125 مغ/مل. غير أن التراكيز التي أخذناها بعين الاعتبار لتقييم النشاط الأسر للجذر °DPPH هي تلك الموجودة بالخليط التفاعلي – أي بعد التخفيف–

فالتركيز 5مغ/مل يوافق التركيز التالي:

التركيز قبل التخفيف x الحجم قبل التخفيف = التركيز بعد التخفيف x الحجم بعد التخفيف

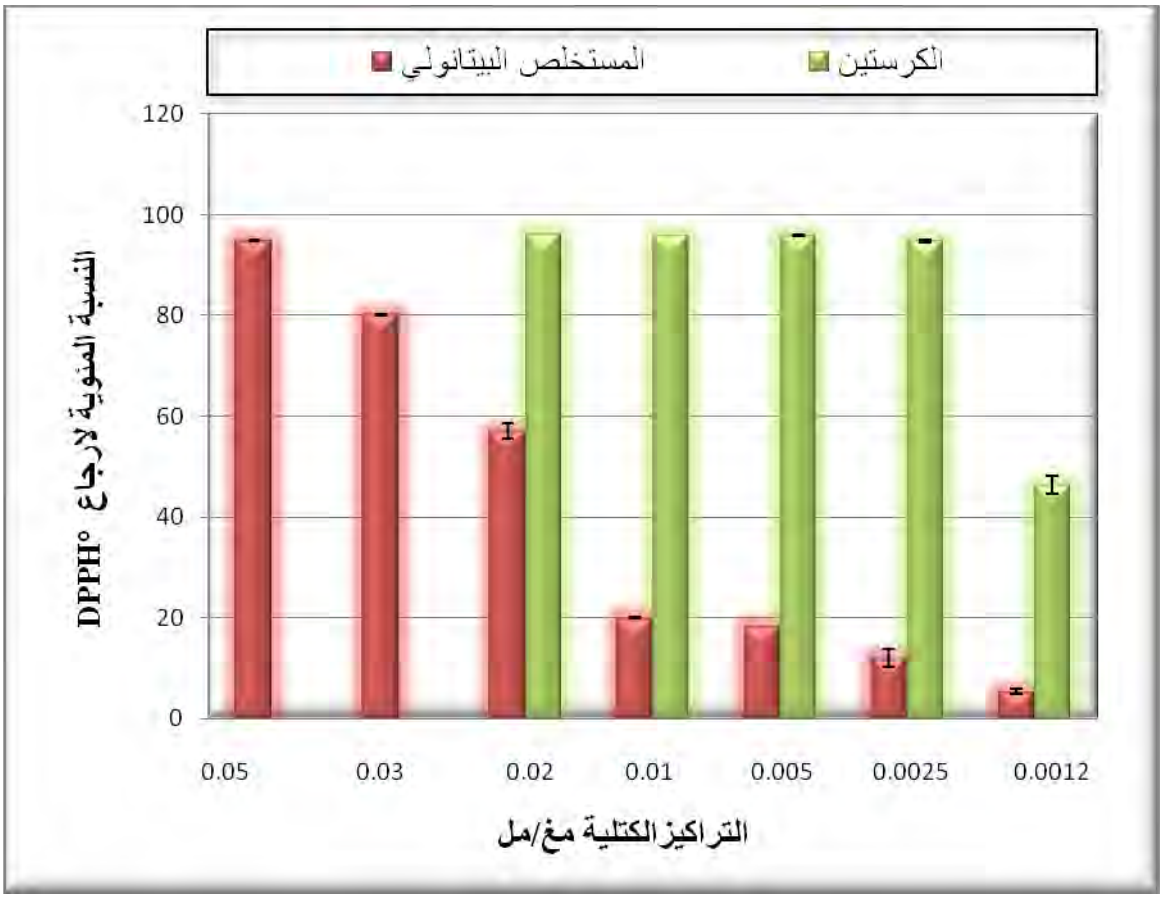
5 مغ/مل x 0.015 مل (15µl) = التركيز بعد التخفيف x 1.515 مل

التركيز بعد التخفيف أو في الخليط التفاعلي هو: 0.0495 مغ/مل

الاختلاف بين قدرتي الأسر الجذري للمستخلص البيتانولي وكذا الكرستين لجذر °DPPH بدلالة مختلف التراكيز الكتلية موضحة في الجدول رقم 12 والشكل 46.

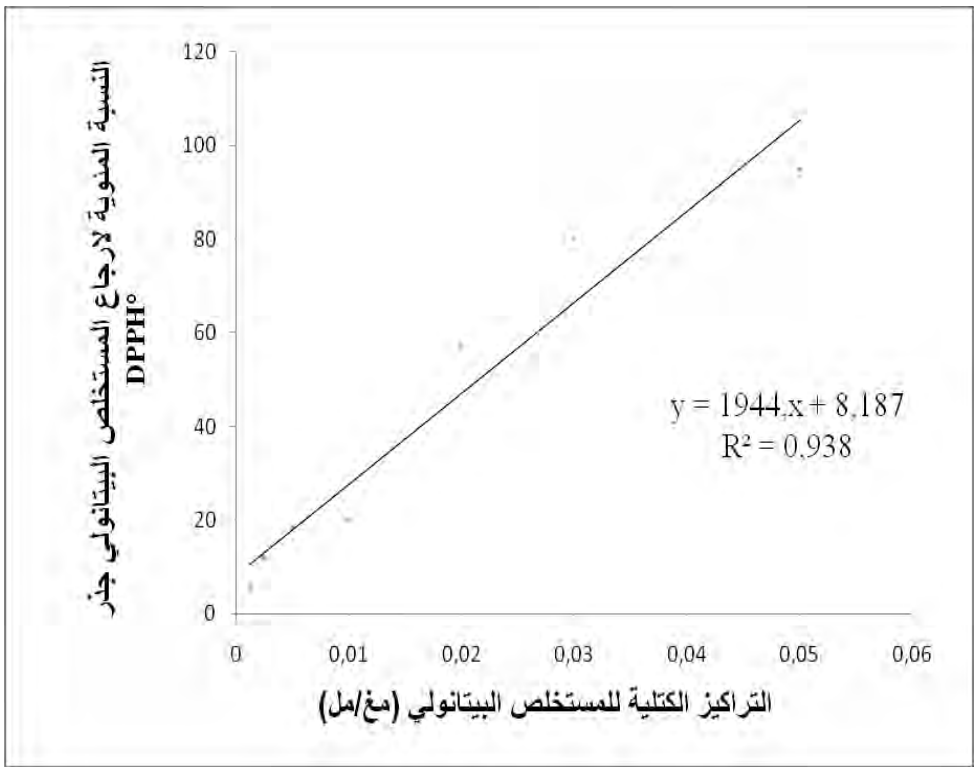
الجدول12.اختلاف الفعل الأسر لجذر DPPH° لكل من المستخلص البيتانولي لنبتة *Globularia alypum* وفلافونويد الكرستين بدلالة تراكيز كتلية مختلفة

تراكيز المستخلص البيتانولي و الكرستين (مغ/مل)		% لإرجاع DPPH °	
التركيز الابتدائي	التركيز في الخليط التفاعلي	المستخلص البيتانولي	الكرستين
5	0.05	94.89 ± 0.17	/
3	0.03	80.17 ± 0.09	/
2	0.02	57.06 ± 1.49	96.06 ± 0.04
1	0.01	20.04 ± 0.1	95.91
0.5	0.005	18.43	95.81 ± 0.13
0.25	0.0025	12.11 ± 1.78	94.72 ± 0.3
0.125	0.0012	5.47 ± 0.53	46.45 ± 1.78



الشكل46. مقارنة الفعل الأسر لجذر DPPH° لكل من المستخلص البيتانولي و الكرستين عند تراكيز كتلية مختلفة.

- **تقدير تركيز المستخلص البيتانولي المثبط لـــ 50% - IC_{50} -**



الشكل47. النسبة المئوية لإرجاع المستخلص البيتانولي لجذر DPPH° بدلالة التركيز

كل نقطة من المنحنى تمثل المعدل ± الخطأ المعياري (n=3).

تم حساب التركيز المثبط لـــ 50% اعتمادا على معادلة منحنى % لإرجاع المستخلص البيتانولي لجذر DPPH° بدلالة التراكيز الكتلية:

$$Y = 1944\,X + 8.187$$

إذا كانت Y نسبة الإرجاع المقدرة بـــ 50% تكون IC_{50} كما يلي:

$$X = \frac{50 - 8.187}{1944} = 0.021$$

يقدر تركيز المستخلص البيتانولي لنبات *Globularia alypum* المثبط لـــ 50% من جذر DPPH°بـ:

$$IC_{50} = 0.021 \pm 0.0001\ \text{mg/ml}$$

أثبتت النتائج المحصل عليها فعالية المستخلص البيتانولي للأجزاء الهوائية لنبات *Globularia alypum* في أسر والتقاط الجذور الحرة, حيث قدر التأثير الآسر الأعضمي لجذر °DPPH- بـ 94.89 % وهذا عند التركيز 0.05 مغ/مل وبقي تأثير هذا المستخلص ذو فعالية حتى التراكيز الجد منخفضة المستعملة حيث قدر عند التركيز 0.0012 مغ/مل بـــ 5.47 %, في حين قدر التركيز الآسر لـــ 50 %-IC50- بـــ 0.021 مغ/مل.

وعند مقارنة الفعالية المانعة للأكسدة للمستخلص البيتانولي بتلك الخاصة بالفلافونويد التجاري الكرستين والذي يعرف بأنه من أكفئ الفلافونويدات المضادة للأكسدة نجد أنه عند التركيز 0.02 مغ/مل قدرت نسبة إرجاع جذر °DPPH بالمستخلص بـــ 57.06 % في حين سجلت عند نفس التركيز بـــ 96.06 % للكرستين, أي أن تأثير المستخلص كان حوالي نصف ذلك الملاحظ للفلافونويد الكرستين.

ثانيا. نتائج دراسة تأثير المستخلص البيتانولي لنبات *Globularia alypum* على السمية لقلب الجرذ لـ Doxorubicin

I. نتائج دراسة المؤشرات البيوكيميائية للتسمم القلبي في البلازما

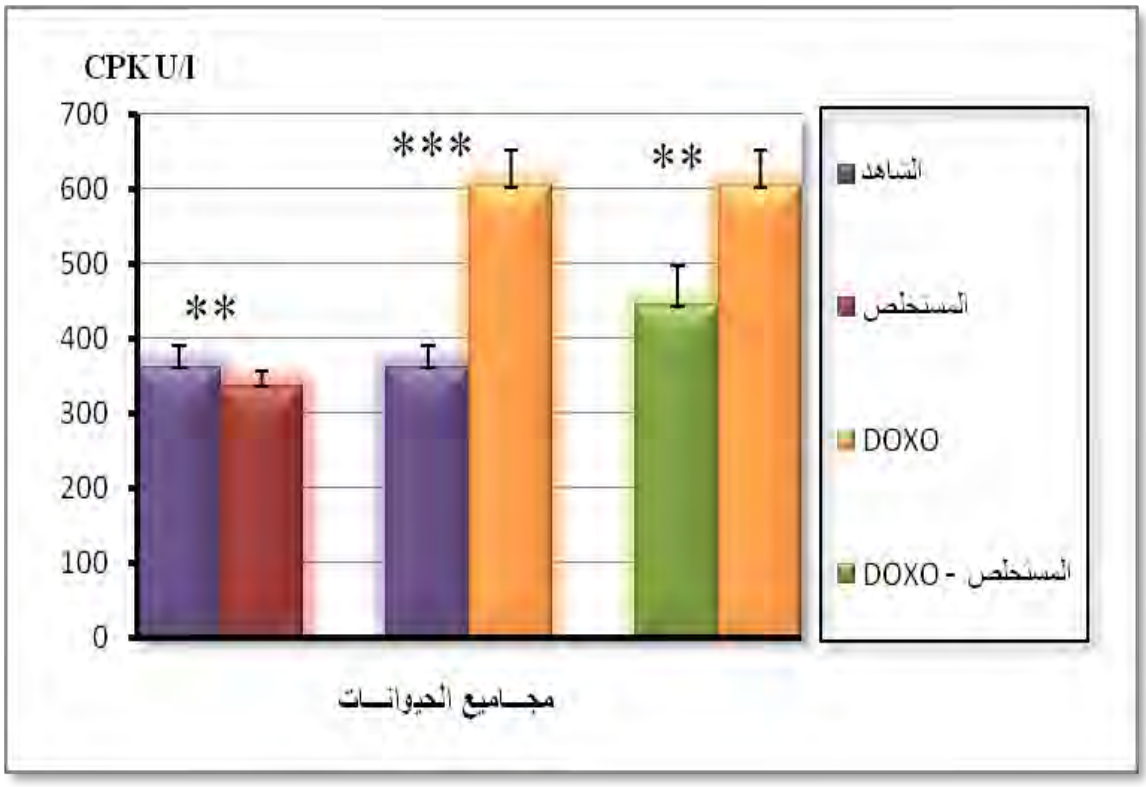
كانت نتائج تأثير مختلف المعاملات على نشاط الإنزيمات البلازمية الدالة على التسمم القلبي CPK, LDH و AST لكل المجاميع كما يلي:

1. نشاط CPK في البلازما

الاختلاف في نشاط إنزيم CPK في البلازما اثر مختلف المعاملات لكل المجاميع مدونة في الجدول 13 و الشكل 48.

الجدول13. تأثير مختلف المعاملات على نشاط إنزيم CPK في البلازما

مجاميع الحيوانات	نشاط إنزيم CPK في البلازما (U/L)
مجموعة الشاهد	28.35 ± 361.16
مجموعة المستخلص البيتانولي	20.33 ± 336.66
مجموعة DOXO	48.77 ± 603.5
مجموعة المستخلص البيتانولي– DOXO –	53.51 ± 444.66



الشكل 48. تأثير مختلف المعاملات على نشاط إنزيم CPK في البلازما

النتائج معبر عليها في شكل المعدل ± الخطأ المعياري (mean ± S.E, n = 6جش رلىنو ِجَغّت, حَج ِقاسّت ا ىَجَ ّخ ِ المستخلص و DOXO مع مجموعة الشاهد ثم مجموعة DOXO مع مجموعة مستخلص- DOXO, تم تحليل الاختلافات ما بين المعدلات بواسطة إجراء أصغر فرق معنوي Least significant difference (LSD) عند مجال الثقة 95 % (P < 0.05) بواسطة Student's *t* test (* *) تعبر عن تأثير جد معنوي (p < 0.01). (***) تعبر عن تأثير معنوي عالي جدا (p < 0.001).

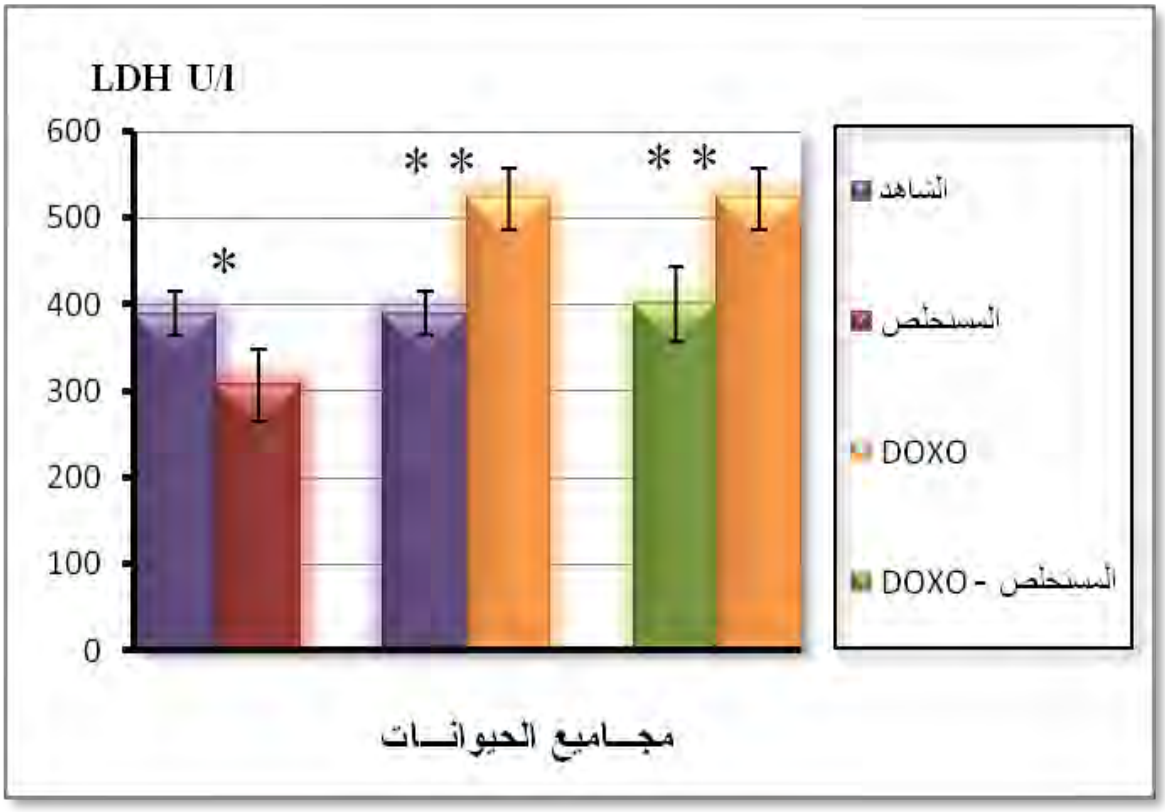
- نلاحظ زيادة نشاط CPK عند مجموعة DOXO حيث قدرت بـــ 603.5 ± 48.77 مقارنة بمجموعة الشاهد أين قدرت بـــ 361.16 ± 28.35 وتعتبر هذه الزيادة إحصائيا عالية جدا (p < 0.001).
- أدى المستخلص إلى خفض نشاط CPK حيث قدر بـــ 444.66 ± 53.51, إحصائيا فان هذا الانخفاض جد معنوي (p < 0.01).

2. نشاط LDH في البلازما

التغيرات في نشاط إنزيم LDH في البلازما اثر مختلف المعاملات لكل المجاميع مدونة في الجدول 14 و الشكل 49

الجدول 14. تأثير مختلف المعاملات على نشاط إنزيم **LDH** في البلازما

مجـــــاميع الحيوانـــــات	نشـــــاط إنزيم LDH في البلازمـــــا (U/L)
مجموعة الشاهد	24.96 ± 389.66
مجموعة المستخلص البيتانولي	41.90 ± 306.83
مجموعة DOXO	35.4 ± 522.16
مجموعة المستخلص البيتانولي– DOXO –	43.65 ± 400.16



الشكل 49 . تأثير مختلف المعاملات على نشاط إنزيم LDH في البلازما

النتائج معبر عليها في شكل المعدل ± الخطأ المعياري (mean ± S.E, n = 6 جرذان لكل مجموعة), تمت مقارنة المجموعتين المستخلص و DOXO مع مجموعة الشاهد ثم مجموعة DOXO مع مجموعة مستخلص- DOXO, تم تحليل الاختلافات ما بين المعدلات بواسطة إجراء أصغر فرق معنوي Least significant difference (LSD) عند مجال الثقة 95 % (P < 0.05) بواسطة Student's *t* test)*(تعبر عن تأثير معنوي (p < 0.05).)**(تعبر عن تأثير جد معنوي (p < 0.01).

- أدت معاملة الجرذان بـــ DOXO إلى زيادة تركيز إنزيم LDH في البلازما حيث قدر بـــ 522.16 ± 35.4 مقارنة مع مجموعة الشاهدة 389.66 ±24.96 وهي زيادة جد معنوية (p < 0.01) من الناحية الإحصائية.

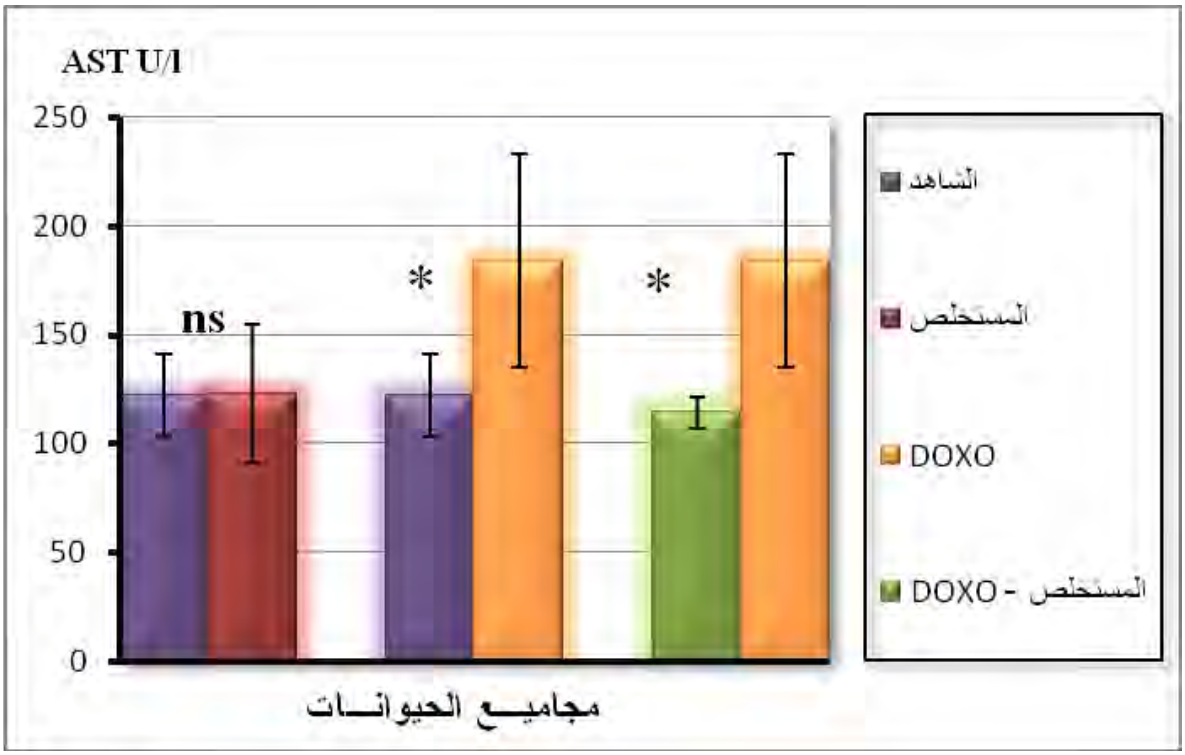
- أدت المعاملة المسبقة بالمستخلص إلى انخفاض جد معنوي (p < 0.01) في التركيز البلازمي لهذا الإنزيم 400.16 ± 43.65 مقارنة بمجموعة DOXO.

3. نشاط AST في البلازما

الاختلاف في نشاط إنزيم AST في البلازما اثر مختلف المعاملات لكل المجاميع مدونة في الجدول 15 و الشكل 50.

الجدول15. تأثير مختلف المعاملات على نشاط إنزيم **AST** في البلازما

مجـــــاميع الحيوانـــــات	نشـــــاط إنزيم AST في البلازمـــب (U/L)
مجموعة الشاهد	18.8 ± 122
مجموعة المستخلص البيتانولي	31.91 ± 122.66
مجموعة DOXO	56.88 ± 184
مجموعة المستخلص البيتانولي– DOXO –	7.57 ± 114.16



الشكل50. تأثير مختلف المعاملات على نشاط إنزيم AST في البلازما

النتائج معبر عليها في شكل المعدل ± الخطأ المعياري (mean ± S.E, n = 6جش رلىنو ِجَغت, تمت مقارنة المجموعتين المستخلص و DOXO مع مجموعة الشاهد ثم مجموعة DOXO مع مجموعة مستخلص- DOXO, تم تحليل الاختلافات ما بين المعدلات بواسطة إجراء أصغر فرق معنوي Least significant difference (LSD عند مجال الثقة 95 % (P < 0.05) بواسطة Student's *t* test) *(تعبر عن تأثير معنوي (p < 0.05.)ns(تعبر عن تأثير غير معنوي (P> 0.05).

- نلاحظ أن التركيز البلازمي لـــ AST عند مجموعة المستخلص كان أكبر بقليل من ذلك الملاحظ عند مجموعة الشاهد لكن هذه الزيادة ليس لها معنى احصائي (P> 0.05).

- أدى DOXO إلى زيادة معنوية (p < 0.05 في التركيز البلازمي لهذ ا الإنزيم 184 U/l ± 56.88 مقارنة بمجموعة الشاهد 122 ± 18.8, في حين أدت المعاملة المسبقة بالمستخلص إلى انخفاض معنوي (p < 0.05 في تركيزه البلازمي أُرفق ب- 114.16 U/l ± 7.57 .

II. تقدير مؤشرات الإجهاد التأكسدي في المجنس القلبي

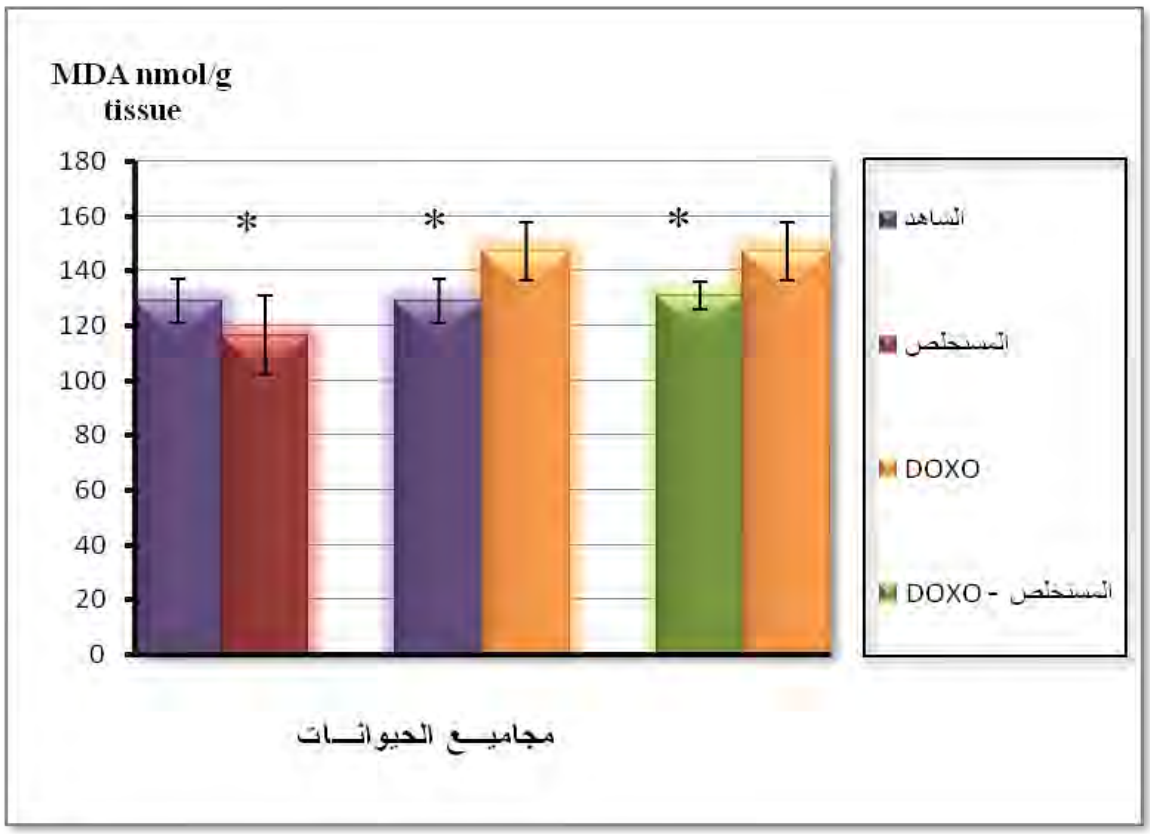
كانت نتائج تأثير المستخلص البيتانولي لنبات *Globularia alypum* (100مغ/كغ) على مؤشرات الإجهاد التأكسدي في المجنس القلبي بعد المعاملة بـــ Doxorubicin (20 مغ/كغ) كما يلي:

1. معايرة MDA السيتوزولي للقلب

نتائج تأثير المستخلص البيتانولي (100مغ/كغ) لمدة أربع أسابيع على معدل MDA السيتوزولي للقلب بعد المعاملة بـــ Doxorubicin (20 مغ/كغ) مدونة في الجدول 16 و الشكل51.

الجدول16. تركيز MDA السيتوزولي للقلب

مجـــــاميع الحيوانـــــات	تركيز MDA السيتوزولي للقلب (nmole/g tissue)
مجموعة الشاهد	128.95 ± 8.07
مجموعة المستخلص البيتانولي	116.51 ± 14.30
مجموعة DOXO	146.98 ± 10.57
مجموعة المستخلص البيتانولي– DOXO –	130.84 ± 5.12



الشكل 51. تأثير مختلف المعاملات على معدل MDA السيتوزولي للقلب

النتائج معبر عليها في شكل المعدل ± الخطأ المعياري (mean ± S.E, n = 6جش رلىنو ِجَغت, تمت مقارنة المجموعتين المستخلص و DOXO مع مجموعة الشاهد ثم مجموعة DOXO مع مجموعة مستخلص- DOXO, تم تحليل الاختلافات ما بين المعدلات بواسطة إجراء أصغر فرق معنوي Least significant difference (LSD) عند مجال الثقة 95 % تأثير معنوي ($p < 0.05$). بواسطة Student's *t* test) *(تعبر عن تأثير معنوي ($p < 0.05$).

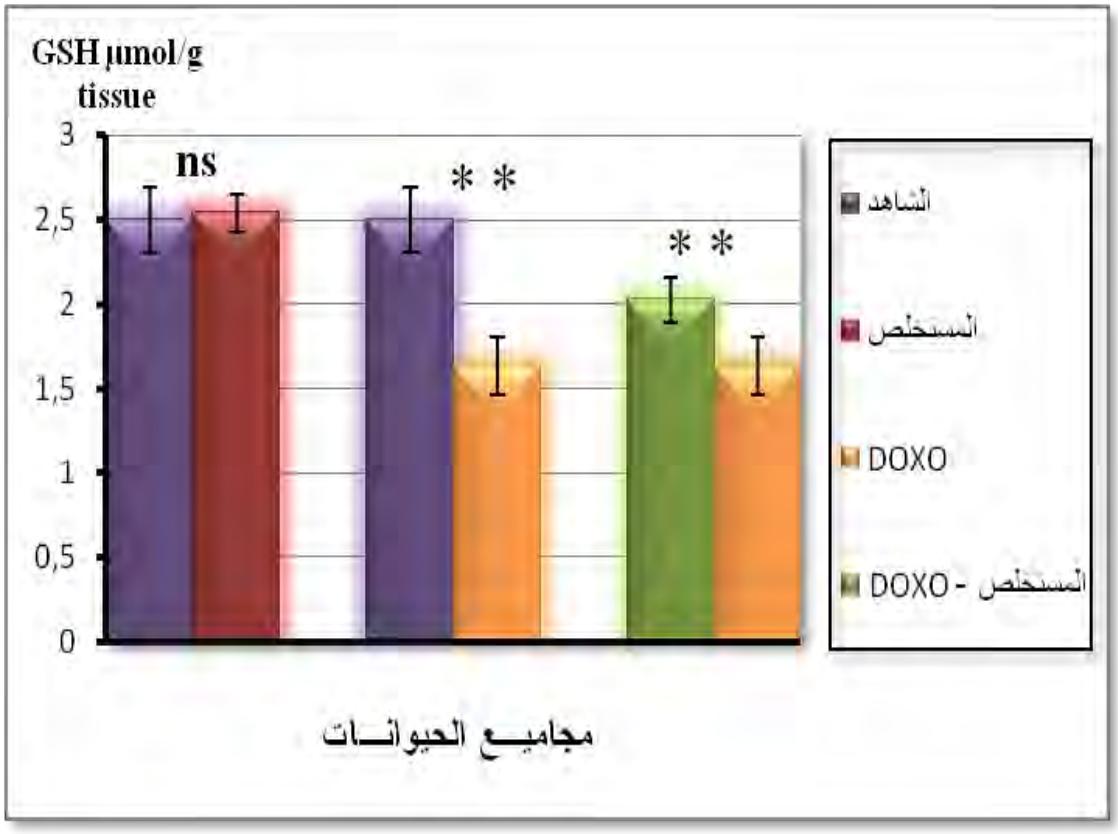
من خلال هذه النتائج المحصل عليها نلاحظ زيادة معنوية ($p < 0.05$) فً معدلات MDA عند مجموعة DOXO مقارنة بمجموعة الشاهد, كما أن الحقن المسبق بالمستخلص أدى الى خفض في تركيز هذا المؤشر مقارنة بمجموعة DOXO.

2. معايرة GSH السيتوزولي للقلب

نتائج تأثير المستخلص البيتانولي (100مغ/كغ) لمدة أربع أسابيع على معدل GSH السيتوزولي للقلب بعد المعاملة بـــ Doxorubicin (20 مغ/كغ) مدونة في الجدول 17 و الشكل52.

الجدول17. تركيز GSH السيتوزولي للقلب

مجـــــاميع الحيوانـــــات	تركيز GSH السيتوزولي للقلب (nmole /g tissue)
مجموعة الشاهد	0.19 ± 2.5
مجموعة المستخلص البيتانولي	0.11 ± 2.54
مجموعة DOXO	0.16 ± 1.63
مجموعة المستخلص البيتانولي– DOXO –	0.13 ± 2.02



الشكل 52. تأثير مختلف المعاملات على معدل GSH السيتوزولي للقلب

النتائج معبر عليها في شكل المعدل ± الخطأ المعياري (mean ± S.E, n = 6 جرذان لكل مجموعة, تمت مقارنة المجموعتين المستخلص و DOXO مع مجموعة الشاهد ثم مجموعة DOXO مع مجموعة مستخلص- DOXO, تم تحليل الاختلافات ما بين المعدلات بواسطة إجراء أصغر فرق معنوي Least significant difference (LSD) عند مجال الثقة 95 % (P < 0.05) بواسطة Student's *t* test (**) تعبر عن تأثير جد معنوي ($p < 0.01$). (ns) تعبر عن تأثير غير معنوي ($P> 0.05$).

من خلال هذه النتائج المحصل عليها نلاحظ نقصان في تركيز GSH بشكل جد معنوي ($p < 0.01$) عند مجموعة DOXO مقارنة بمجموعة الشاهد, كما أن الحقن المسبق بالمستخلص أدى الى زيادة جد معنوية في تركيز هذا المؤشر مقارنة بمجموعة DOXO ($p < 0.01$).

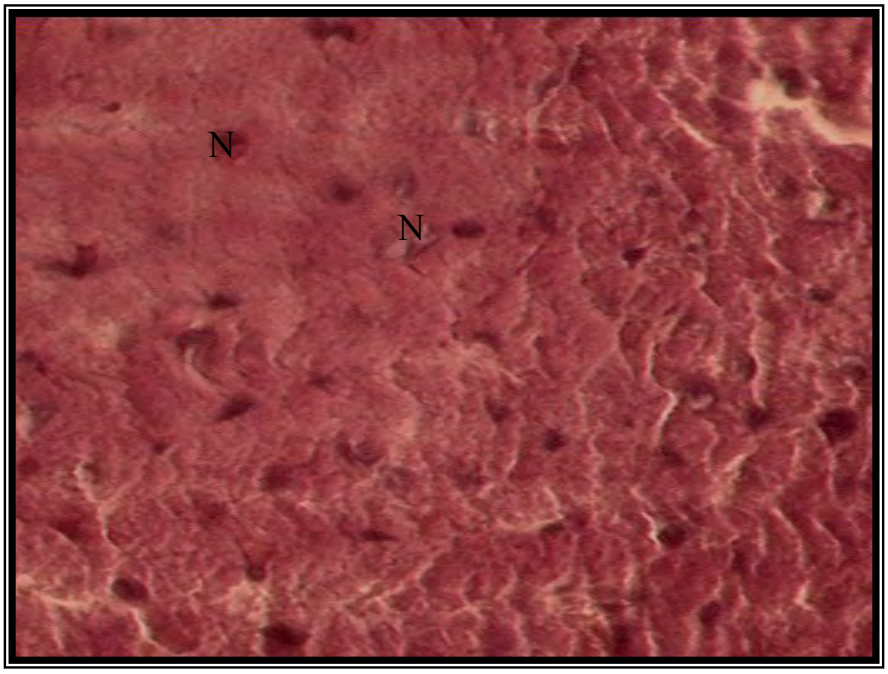
III. نتائج الدراسة النسيجية

أبدت نتائج دراسات المجهرالضوئي (H&E 100×) بأن عينات قلب الجرذ الشاهد الطبيعي(الصورتان A1, A2) يظهر بها خلايا عضلية سليمة ذات سيتوبلازم محفوظ جيدا وأنوية بارزة.

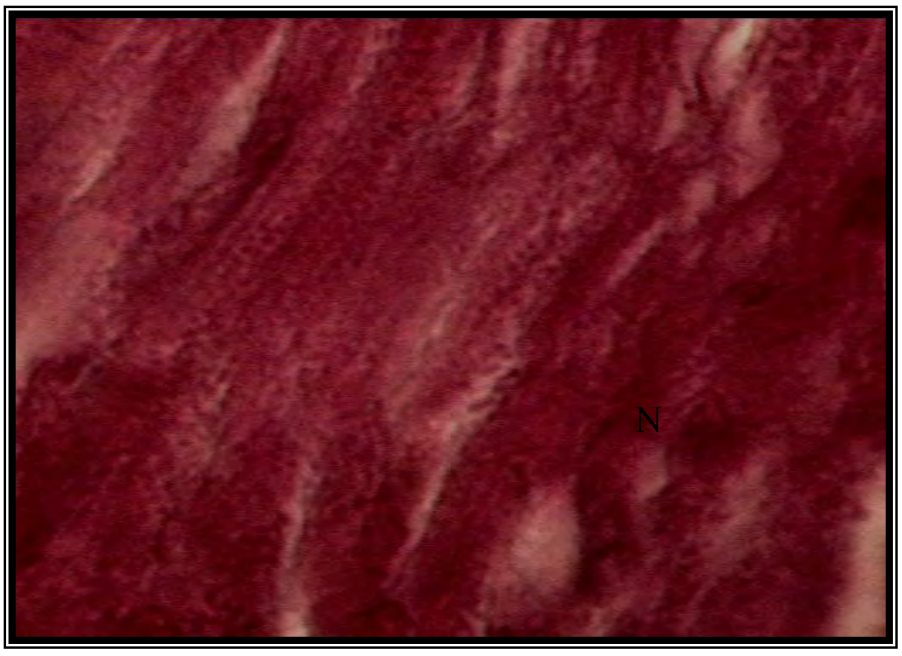
- في حين أظهرت الصور (B1, B2, B3, B4, B5, B6) والتي تمثل مقطع في قلب جرذ معامل بـــ DOXO فقط عدة اختلالات بنيوية تمثلت في:
- تشوه الخلايا العضلية القلبية حيث أصبحت غير محددة المعالم (Deformed Myocytes فقد للشكل المغزلي للخلية العضلية).
- غياب التماسك بين الخلايا العضلية حيث تجلى هذا في العديد من الفراغات البين الخلوية Numerous Intercellular Spaces.
- مظاهر نكرزة جزئية partial necrosis واضحة في عدة مناطق من النسيج تميزت بانحلال في الخلايا العضلية القلبية Myocytolysis وكذا تحرر للأنوية Nuclear Pyknosis.
- ظهور النواة بشكل كتلة مكثفة Condensed Nuclei .
- انتشار واسع وملحوظ للفجوات في السيتوبلازم Vacuolization.
- تشكل انتفاخات مائية – ودمة – Edema
- ارتشاح أو تسلل للخلايا الالتهابية - وحيدة النواة - Infiltration of Inflamatory Cells.

أدت المعاملة المسبقة للجرذان بالمستخلص البيتانولي لنبتة *Globularia alypum* إلى التحسن في هذه التغيرات النسيجية الصور (C1,C2,C3,C4,C5).

إن معاملة الجرذان بالمستخلص البيتانولي فقط لم تؤدي إلى أي تغيرات هيستولوجية في نسيج القلب الصورتين (D1, D2).

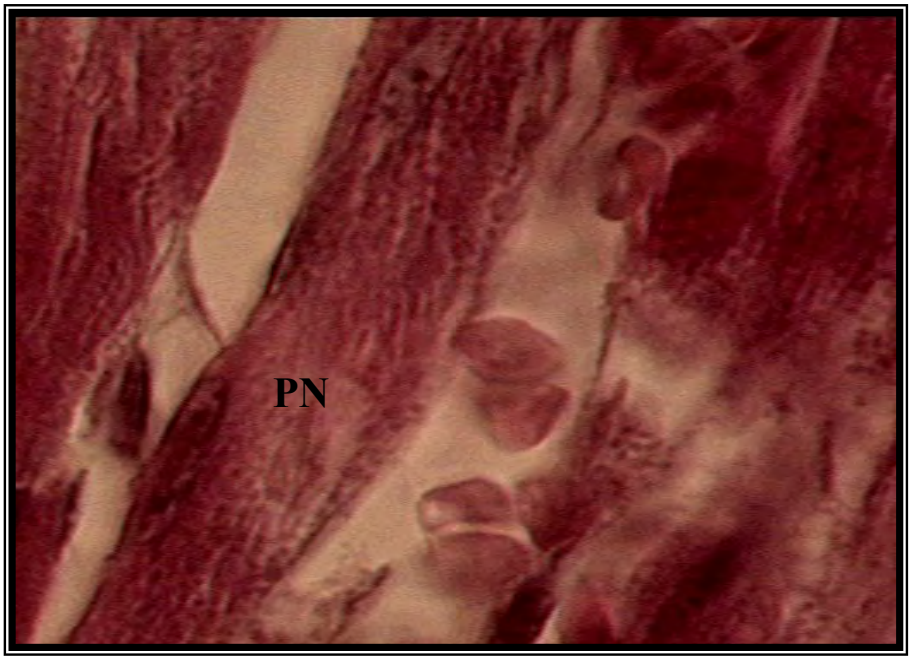


الصورة A1. صورة فوتوغرافية لمقطع في القلب لجرذ من مجموعة الشاهد (H&E x 40)

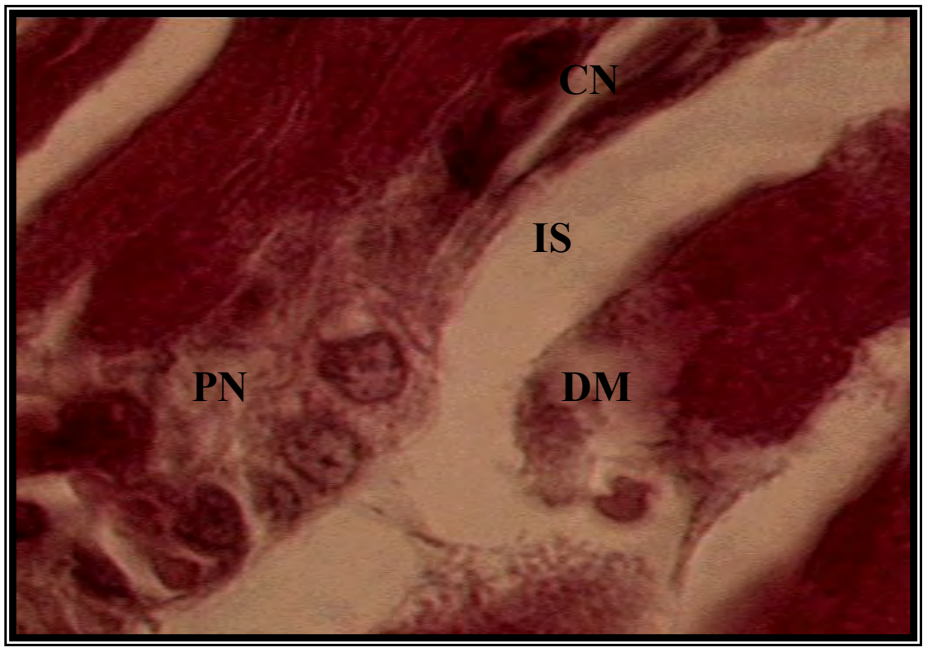


الصورة A2. صورة فوتوغرافية لمقطع في القلب لجرذ من مجموعة الشاهد (H&E × 100)

N : nucleus



الصورة B1

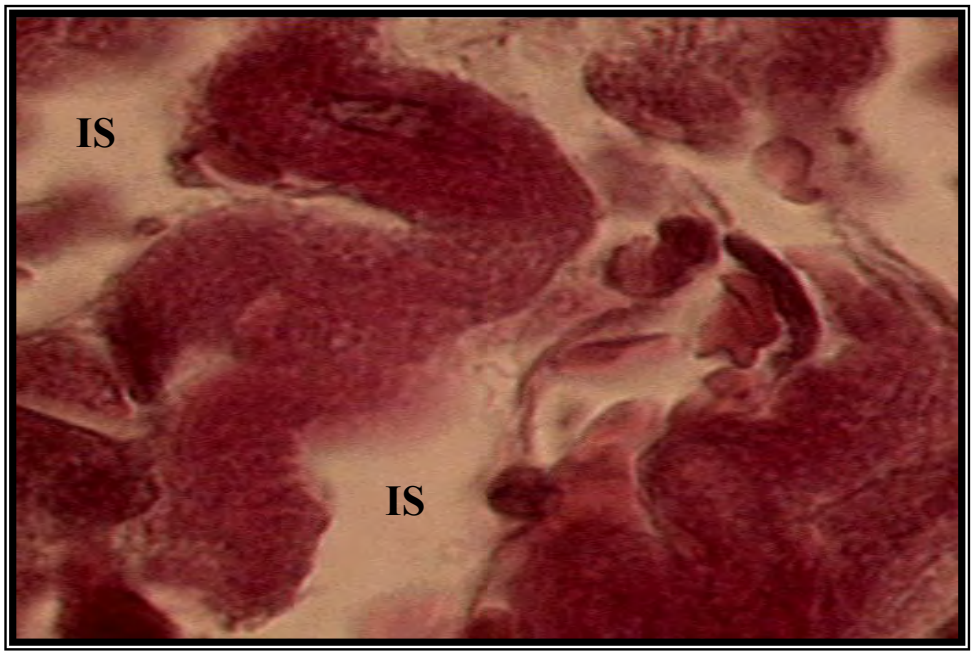


الصورة B2

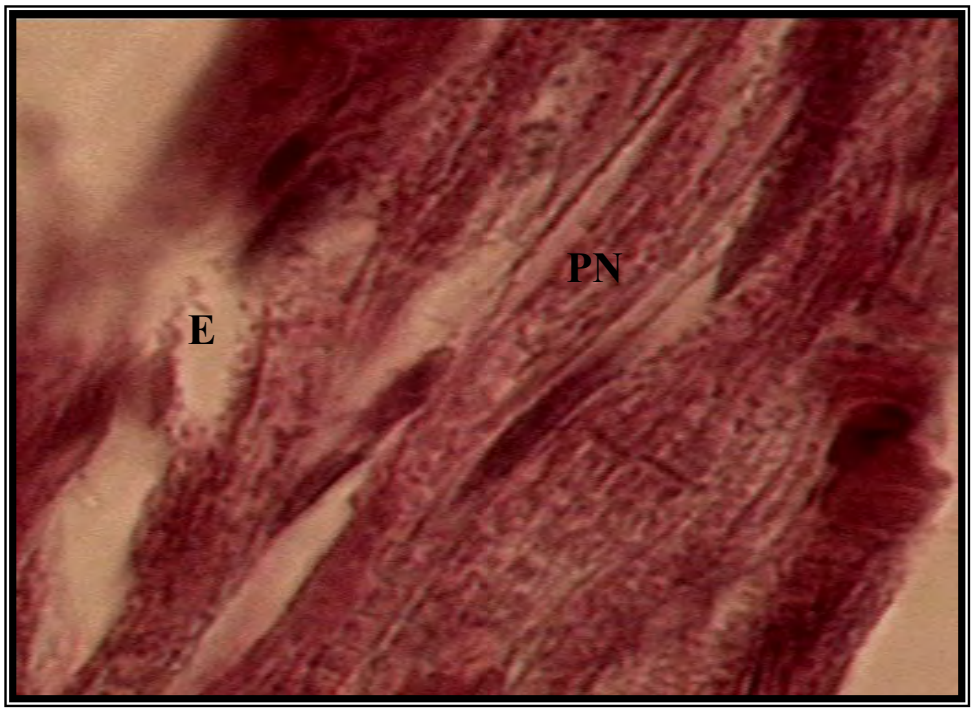
صور فوتوغرافية لمقطع في القلب لجرذ من مجموعة DOXO (H&E × 100)

PN: partial necrosis **CN:** Condensed Nuclei

DM: Deformed Myocytes



الصورة B3

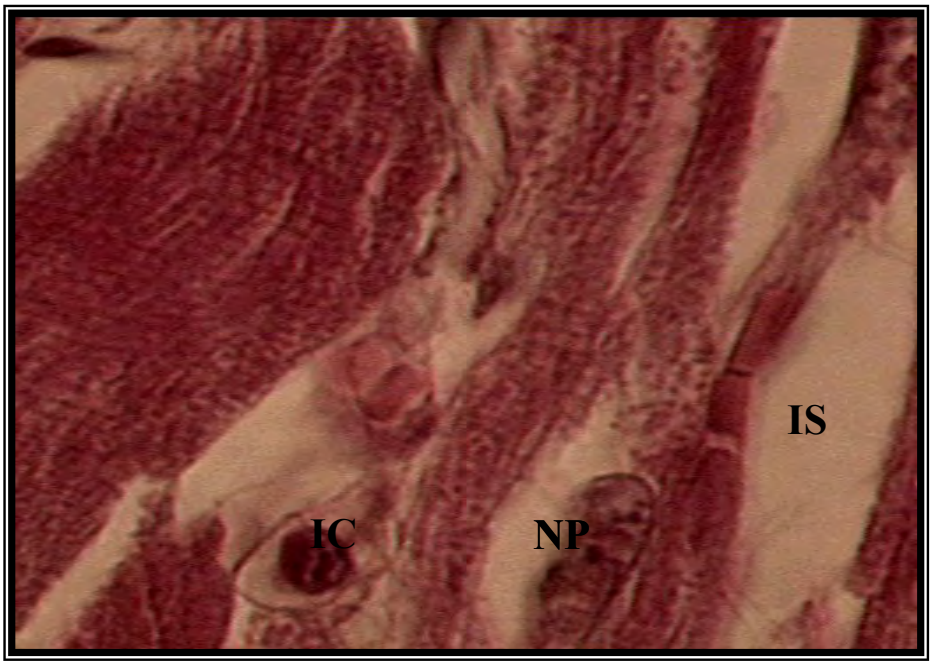


الصورة B4

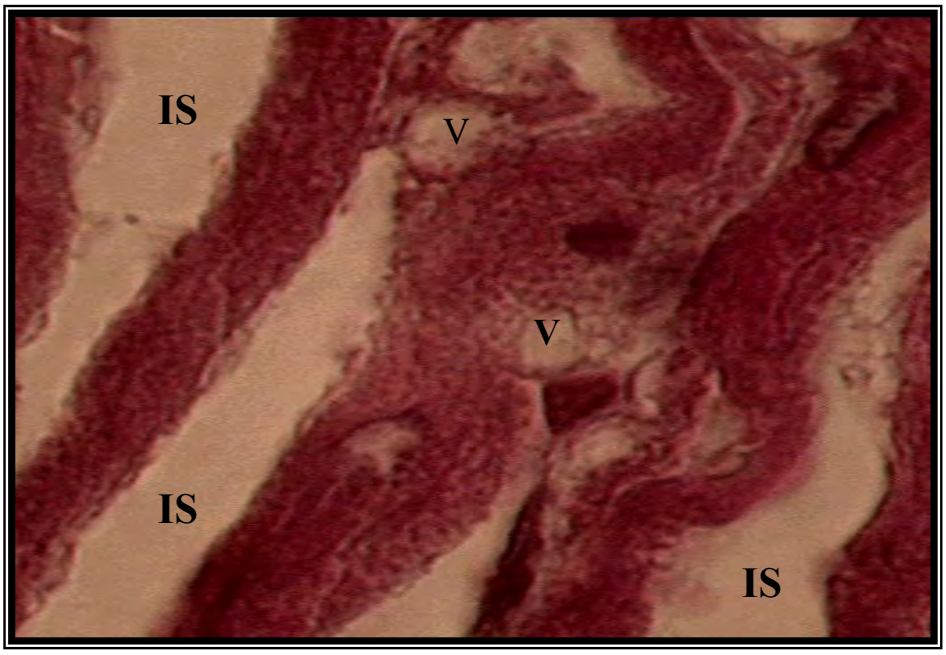
صور فوتوغرافية لمقطع في القلب لجرذ من مجموعة DOXO (H&E × 100)

IS : Intercellular Spaces **PN:** partial necrosis

E : Edema



الصورة B5



الصورة B6

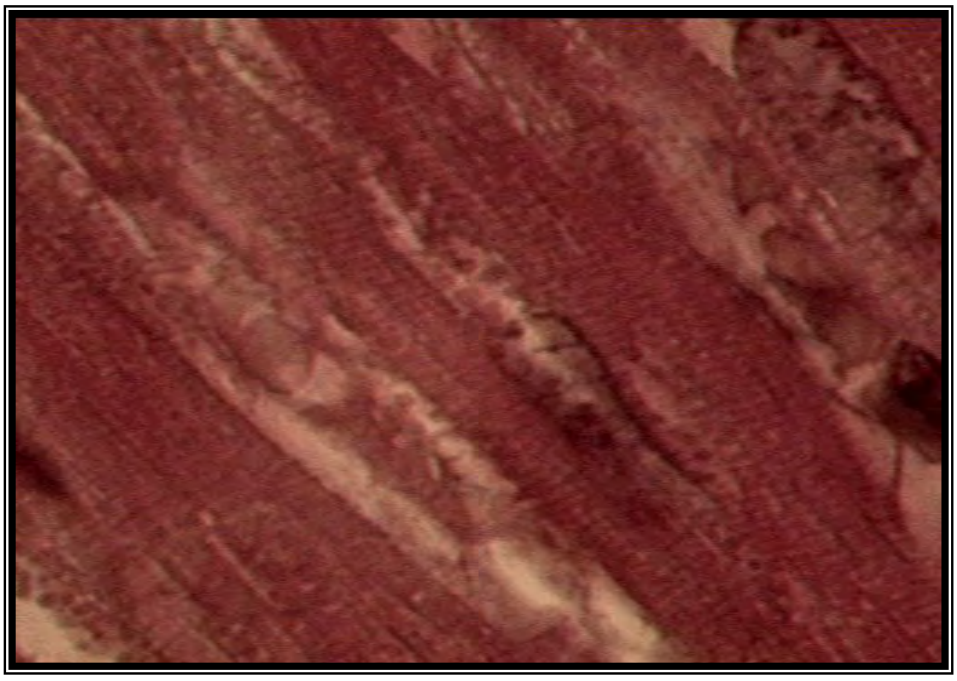
صور فوتوغرافية لمقطع في القلب لجرذ من مجموعة DOX (H&E × 100)

NP : Nuclear Pyknosis

IS : Intercellular Spaces

V : Vacuolization

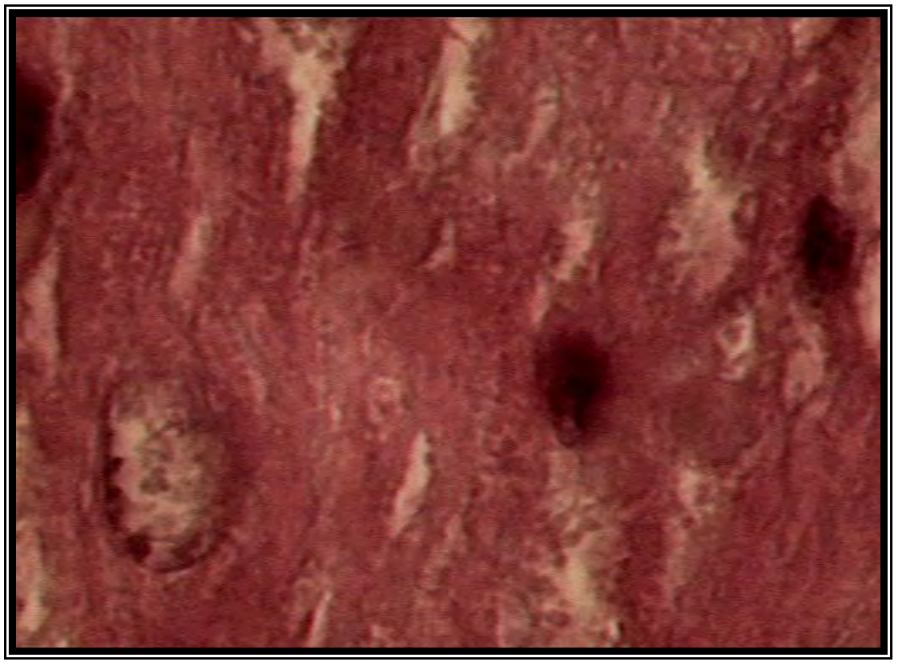
IC: Inflamatory Cells



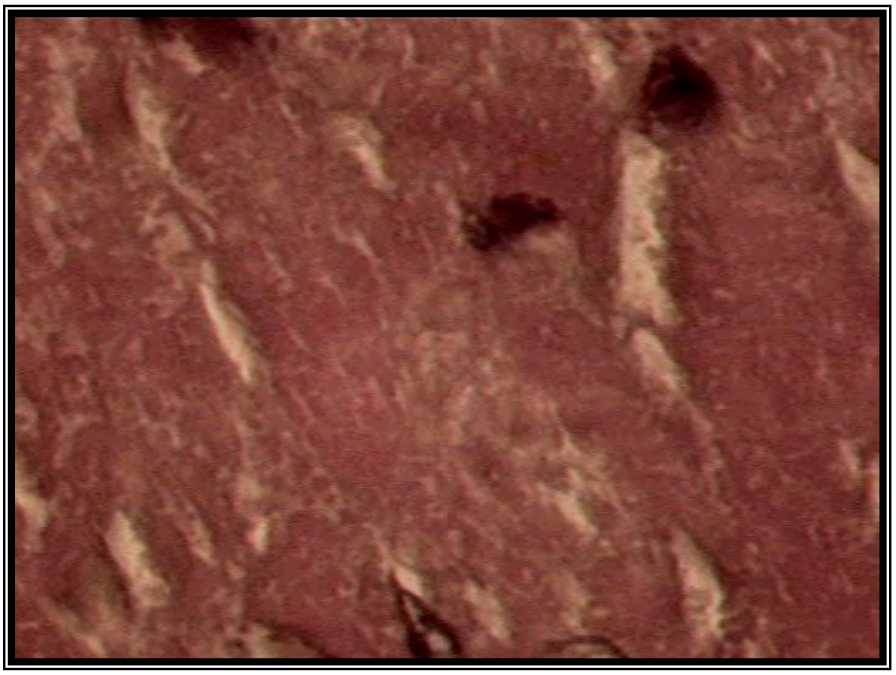
الصورة C1

الصورة C2

صور فوتوغرافية لمقطع في القلب لجرذ من مجموعة DOXOسخيص)100 × H&E(

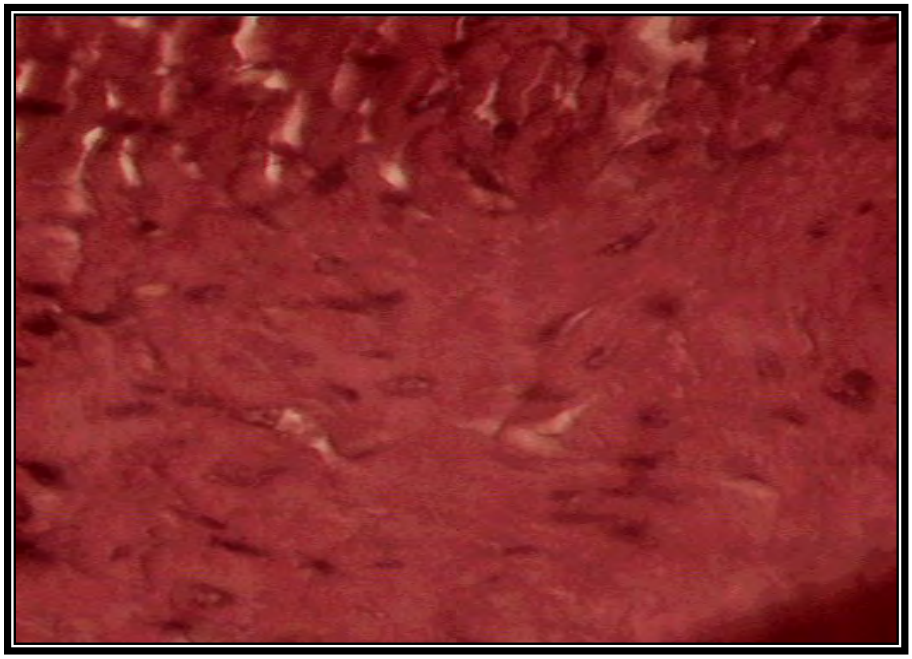


الصورة C3



الصورة C4

صور فوتوغرافية لمقطع في القلب لجرذ من مجموعة مستخلص– DOXO)H&E × 100(

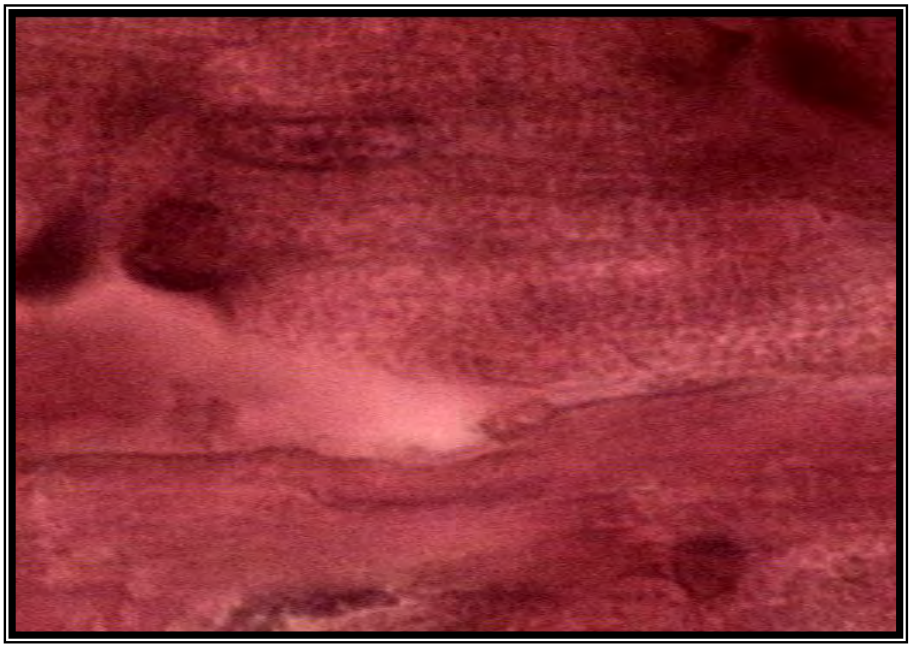


الصورة C5. صورة فوتوغرافية لمقطع في القلب لجرذ من مجموعة مستخلص- DOXO

)x 40 H&E)

الصورة D1. صور فوتوغرافية لمقطع في القلب لجرذ من مجموعة المستخلص

)x 40 H&E)



الصورة D2. صور فوتوغرافية لمقطع في القلب لجرذ من مجموعة المستخلص

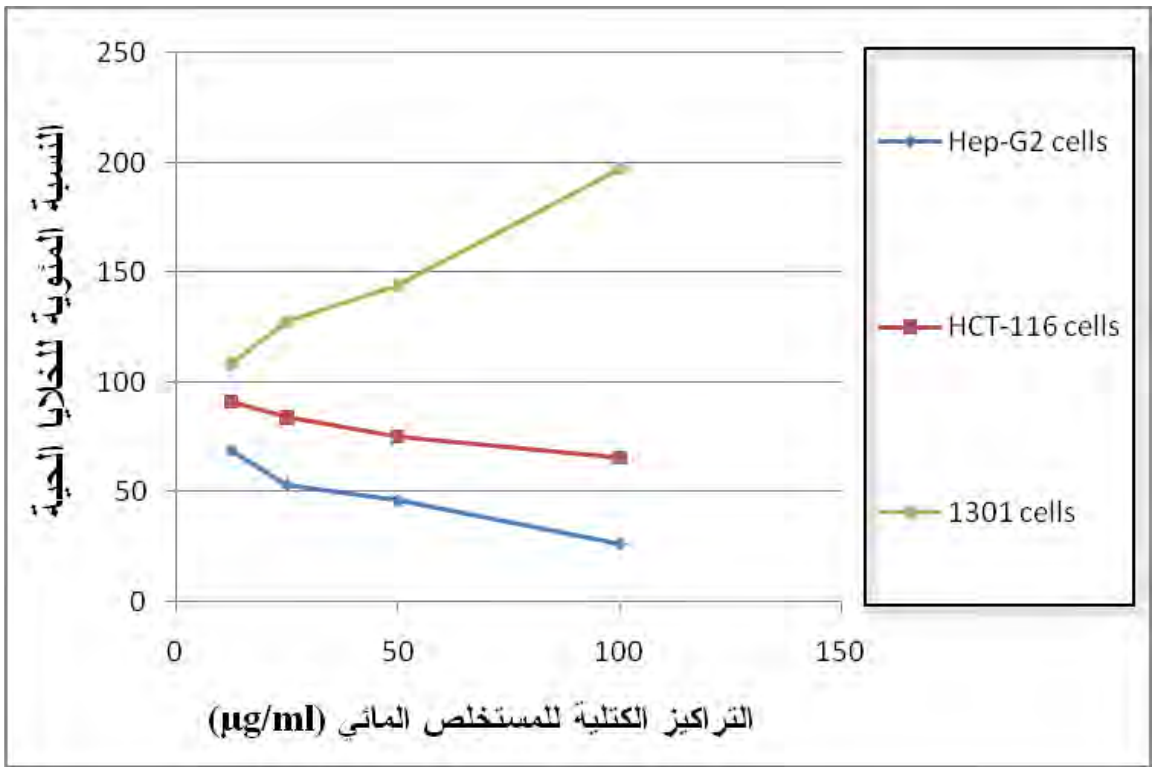
)100 × H&E(

ثالثا. دراسة تأثير المستخلص المائي لنبات *Globularia alypum* على سلالات خلوية ورمية في المخبر IN VITRO

تمت دراسة تأثير المستخلص المائي لنبات *Globularia alypum* على تضاعف سلالة خلوية ورمية بشرية للكبد Hep-G2 Human hepatocarcinoma cell line, سلالة خلوية ورمية بشرية للأمعاء (HCT-116) Colon carcinoma cells و سلالة خلوية ورمية بشرية لمفاوية (1301) lymphoblastic leukemia cells باستعمال اختبار MTT Cell Viability Assay فكانت النتائج مدونة في الجدول 18 والشكل 52

الجدول 18. التأثير المثبط للنمو للمستخلص المائي لنبات *Globularia alypum* على السلالة الخلوية الورمية البشرية الكبدية Hep-G2 , المعوية HCT-116 و اللمفاوية 1301 cells.

تركيز المستخلص المائي لنبات *Globularia alypum* (µg/ml)	النسبة المئوية للخلايا الحية % - % of cell viability-		
	Hep-G2	HCT-116	1301 cells
12.5	4.52 ± 69.08	5.18 ± 91.11	6.27 ± 108.41
25	5.1± 53.37	4.34 ± 83.88	12.01 ± 127.66
50	3.67 ± 45.89	3.77 ± 75.10	10.32 ± 144.11
100	3.35 ± 26.14	3.71±65.58	13.57 ± 197.23



الشكل 53. منحنى يوضح النسبة المئوية للخلايا الورمية Hep-G2, HCT-116 و خلايا 1301 الحية بدلالة تراكيز مختلفة للمستخلص المائي لنبات *Globularia alypum*. كل نقطة من المنحنى تمثل المعدل ± الخطأ المعياري (n=3).

تركيز المستخلص المائي المثبط لـــ 50% من نمو الخلايا مدون في الجدول 19.

الجدول 19. تركيز المستخلص المائي لنبات *Globularia alypum* المثبط لـــ 50% – IC_{50}– للسلالات الخلوية الورمية البشرية Hep-G2, HCT-116 و خلايا1301

السلالات الخلوية الورمية البشرية	تركيز المستخلص المائي المثبط لنمو 50% (µg/ml) - IC_{50} -
Hep-G2	43.82
HCT-116	)100 <(151.40
1301 cells	/

تبين من خلال هذه النتائج أن المستخلص المائي لنبات *Globularia alypum* أدى إلى تثبيط تضاعف السلالة الخلوية الورمية البشرية للكبد Hep-G2 Human hepatocarcinoma cell line حيث قدر التركيز المثبط لـــ 50 %ب- 43.82 µg/ml وكذا السلالة الخلوية الورمية البشرية للأمعاء (HCT-116) Colon carcinoma cells حيث قدرت قيمة IC_{50} بـــ 151.40 µg/ml في حين أدى المستخلص المائي لهذه النبتة إلى تحريض تضاعف السلالة الخلوية الورمية البشرية اللمفاوية (1301) lymphoblastic leukemia cells هذا ما يجعلنا نقترح أنه يمكن أن يكون لهذا المستخلص نشاط محفز لتضاعف الخلايا اللمفاوية Lymphostimulatory activity .

المناقشة

المناقشـــــــة

ينتج الجسم باستمرار وبمختلف الآليات الفيزيولوجية جذورا حرة حيث أن التراكيز المحدودة منها لاغنى عنها إذ تؤمن العديد من الفعاليات الفيزيولوجية كما هو الحال في الاستجابات المناعية, الموت الخلوي المبرمج كما يمكنها أن تعمل كإشارات فيزيولوجية في تأمين التواصل الخلوي , إلا أن الميل في زيادتها بسب فرط إنتاجها ونقص أو عجز مضاداتها (مضادات الأكسدة) يؤدي إلى حالة من اختلال التوازن الرودوكسي للجسم تعرف بالإجهاد التأكسدي هذا الذي ينتج عنه أكسدة مختلف الجزيئات الحيوية للخلية (ليبيدات, ADN, بروتينات وسكريات))32.31.30(التي تكون سببا لظهور عدة أمراض كمرض السرطان, الأمراض الوعائية القلبية كتصلب الشرايين, مرض السكري وبعض الأمراض العصبية كالألزهايمرو الباركينسون)35.34.33(. يحافظ الجسم على التراكيز المعتدلة لهذه المجاميع وبالتالي دورها البيولوجي بمجموعة معقدة من الأنظمة المضادة للأكسدة ذات المصدر الداخلي وذات الطبيعة الإنزيمية من أهمها: catalase .Glutathione peoxidase, superoxde dismutase, أو ذات المصدر الخارجي كالفيتامينات المضادة للجذور الحرة caroténe, Vit C, Vit E B- ومركبات طبيعية مثل الفلافونويدات)29.28(.

تتشكل الجذور الحرة من عدة مصادر داخلية وخارجية)53.41(. وتعتبر بعض الأدوية وخاصة مضادات السرطان من طائفة الأنتراسيكلينات مثل Daunorubicin, Epirubicin , Idarubicin و Doxorubicin من المصادر الخارجية لها)147.15(.

Doxorubicin هو مضاد حيوي استخدم في العلاج الكيماوي لأنواع عديدة من السرطانات ومع ذلك فان استخدامه مازال محدودا بسبب سميته القلبية (16) الناتجة أساسا عن تشكيل الجذور الحرة خلال حلقة الأكسدة والإرجاع عند استقلابه بعدة إنزيمات مثل NADPH - Cytochrome P450 reductase , Xanthine oxidase …)148.142.138.128.124. 121(.

قمنا من خلال هذه الدراسة بتقصي تأثير المستخلص المائي لنبات *Globularia alypum* المستعملة بكثرة في الطب الشعبي لشمال إفريقيا (234)على سلالات خلوية ورمية بشرية في المخبر– IN VITRO– حيث كانت الدراسة على سلالة خلوية ورمية بشرية للكبد (Hep G2), سلالة خلوية ورمية بشرية للأمعاء (HCT-116) و سلالة خلوية ورمية بشرية لمفاوية (1301cells) وكذا دراسة تأثير المستخلص البيتانولي لنفس النبتة على السمية القلبية لـــ doxorubicin الناتجة عن الجذور الحرة

والمستحدثة عند جرذان من سلالة wistar بغية إمكانية استغلال الفعاليات المضاد للأكسدة لفلافونويدات هذه النبتة ضد الجذور الحرة الناتجة عن استقلاب هذا الدواء والمسببة لهذه السمية حيث يرجع الفعل المانع للأكسدة للفلافونويدات إلى ما يلي(62) :

منع تشكل الجذور الحرة من خلال تثبيط الإنزيمات المولدة لها مثل xanthine oxidase, cyclooxygenase, lipoxygenase, السلوك الممخلب للمعادن, أسر والتقاط الجذور الحرة إضافة إلى دعم وحماية الأنظمة المضادة للأكسدة الداخل خلوية.

فالهدف المرجو من هذه الدراسة هو السعي إلى أن تكون المعالجة الكيميائية بـــ Doxo فعالة أكثر وبأقل سمية ممكنة.

تم اختيار نبات *Globularia alypum* كمصدر لهذه الدراسة اعتمادا على عدة معايير كان مصدرها الدراسات المرجعية حول هذا النوع وذلك من خلال: استعمالها في الطب الشعبي كمخفضة لنسبة السكر في الدم, مفرزة للصفراء, مدرة للعرق, منقية للدم, مسكنة للألم فاتحة للشهية ومساعدة على الهضم وكذا مضادة للامساك, وقد تم استعمالها أيضا في معالجة الأمراض القلبية الوعائية والأمراض الكلوية)243 236.235.234(. كما بينت عدة دراسات احتوائها على المركبات ذات النشاط المضاد للأكسدة كمتعددات الفينول بصفة عامة والفلافونويدات بصفة خاصة)237, 238, 241, 236(حيث تعتبر هذه المركبات هدفنا من خلال هذه الدراسة, فقد تم إثبات النشاط المضاد للأكسدة الليبيدية للمستخلص الميثانولي للأجزاء الهوائية لهذه النبتة على النماذج المخبرية)IN VITRO( )233(إضافة إلى النشاط المضاد للأكسدة لعدة مركبات نقية معزولة منها والمتمثلة في: الفلافونويدات, Phenylethanoids و Iridoids)235(هذا من جهة ومن جهة أخرى لم تسجل أي دراسة حول النشاط المضادة للأكسدة لمستخلصاتها IN VIVO.مَا ىٌ حس ج و أي سمية لهذه النبتة على الجرذان حيث قدرت قيمة الجرعة القاتلة لـــ 50%)LD50(للمستخلص المائي عند إعطائه عن طريق الفم بـــ 14.5 غ/ كغ)245(, علاوة على هذا فقد ثبت فعالية المستخلص المائي لهذه النبتة ضد سرطان الدم)246.236(.

وتمت الدراسة السمية الناتجة عن DOXO باستعمال المستخلص البيتانولي لأنه من خلال الدراسات الاستطلاعية تبين أن أغلب فلافونويدات هذا النوع عبارة عن مركبات سكرية حيث عزل ّ ع ٍ ٍ ـ luteolin diglycoside -7 (235) كما تم عزل كل من مركب Apigenin-7-glucoside و مركب

8-C-glucosyl-4',7, dihydroxyflavone (241) ويعتبر كحول البوتانول Bu(OH) المذيب المفضل لفصل الفلافونويدات السكرية عالية القطبية.

كما تحصلنا خلال عملية الاستخلاص على نسبة قدرها 13.39% من المستخلص البيتانولي مقابل نسبة قدرت بـ 0.31% فقط لمستخلص أسيتات الايتيل (مستخلص الفلافونويدات الغير سكرية– الأجليكونات–) ما شجع كذلك على استعمال المستخلص المائي لاحقاً.

في حين تم استعمال المستخلص المائي لهذه النبتة في النشاط المضاد للسلالات الخلوية الورمية (Hep G2, HCT-116 خلايا 1301) وهذا لإثبات فعالية هذا المستخلص ضد سرطان الدم (246.236).

وقبل السعي في دراسة إمكانية وقاية المستخلص البيتانولي للسمية القلبية المستحدثة بـ DOXO عند الجرذان ارتأينا أولا إلى القيام بدراسة كيميائية تحليلية على المستخلص البيتانولي اختصت ببعض الاختبارات الأولية للكشف عن الفلافونويدات, قياس تركيزها وتركيز متعددات الفينول الكلية, طيف امتصاص الأشعة الفوق بنفسجية في الوسط الميثانولي. إضافة إلى التقصي عن أصناف الفلافونويدات الموجودة في المستخلص بتقنية كروماتوغرافيا الورق PC وكذا كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC.

فبينت نتائج اختبارات الكشف الكيميائية احتواء المستخلص على الفلافونويدات و أكد هذا طيف امتصاص المستخلص للأشعة الفوق بنفسجية في الوسط الميثانولي حيث أظهر عصابتي امتصاص فكانت العصابة الأولى عند طول الموجة بين 350–385 و الثانية بين 250–280 كما بينه المنحنى وكلاهما خاصة بامتصاص الفلافونويدات وأعطت المعايرة الضوئية لهذه المركبات قيمة معتبرة حيث قدرت بـ 1.51 mg QE / g extrait ± 21.55 ما يؤكد أيضا وجود الفلافونويدات في المستخلص.

في حين أعطت معايرة متعددات الفينول الكلية قيمة 3.65 mg GAE / g extrait ± 103.81 ما يبين الطبيعة الفينولية للمستخلص, حيث تشكل متعددات الفينول العائلة الكبيرة التي تتميز مركباتها بالنشاط المضاد للأكسدة والتي من ضمنها الفلافونويدات.

وفي دراسات سابقة قدرت قيمة الفلافونويدات الكلية في مستخلص أسيتات الايتيل لنبتة *Globularia alypum* بـ 0.09 mg RE/g extrait ± 4.54 في حين قدر تركيز متعددات الفينول لنفس المستخلص بـ 0.81 mg GAE/g dry weight ± 21.54 (261) وهي نسب قليلة مقارنة بتلك المتحصل عليها في دراستنا للمستخلص البيتانولي هذا ما زاد من ميولنا إلى استعمال هذا المستخلص في دراسة تأثيره على السمية القلبية لـ Doxo.

أظهرت تقنية الكروماتوغرافيا التحليلية (CP و TLC) من جهتها الطبيعة الفلافونويدية للمستخلص, وبينت احتوائه على: الفلافونويدات السكرية من النوع فلافونات أو فلافونولات وتؤكد هذا عدة نتائج لدراسات سابقة حيث تم عزل 3 أنواع من الفلافونويدات السكرية وتتمثل في: Apigenine-7-glucoside، Luteoline-7-glucoside و8-C-glucosyl-4',7-dihydroxyflavone (241) وهي من صنف الفلافونات وفي دراسة بعدها تم عزل أربع أنواع من الفلافونويدات السكرية منها الأحادية والثنائية وكلها من نوع الفلافونات (الشكل 30- الصيغ الكيميائية لبعض المركبات المعزولة من نوع *alypum* *Globularia*-) (235) عزل من أوراق هذه النبتة فلافونويد Rutin وهو من صنف الفلافونولات السكرية (238). كما يحتوي المستخلص أيضا عيى فلافونويدات تحتوي على مجاميع الميثيل دلت عليها زيادة قيمة RF في المذيب العضوي (256), فلافونولات وفلافونات حيث فصل من هذه النبتة فلافون 4',7-dihydoxyflavone (241) كما يحتوي هذا المستخلص على أحماض فينولية و كومارينات حيث أثبت احتواء هذه النبتة على Vanillic acid وهو حمض فينولي (241).

كان الهدف الأول من هذه الدراسة هو اختبار نشاط الفلافونويدات المستخلصة من نبتة *Globularia alypum* المضاد للجذور الحرة الناتجة عن استقلاب DOXO والمسببة لسميته على الجرذان أي IN VIVO لدى فضلنا في البداية التأكد من هذا النشاط وتقييمه على النماذج المخبرية أولا أي IN VITRO و اعتمدنا في هذا على اختبار DPPH° والذي يعتبر من أهم الاختبارات في تقييم الدور المانع للأكسدة حيث أدلت النتائج فعالية فلافونويدات المستخلص البيتانولي للأجزاء الهوائية لنبتة *Globularia alypum* في أسر والتقاط جذر DPPH° عند التركيز 100µmol وظهر هذا بوضوح بتغير لون المحلول الميثانولي لـــ DPPH° من اللون البنفسجي (الشكل المؤكسد) إلى اللون الأصفر (الشكل المرجع), وقدر التأثير الآسر الأعضمي بـــ 94.89 % وهذا عند التركيز 0.05 مغ/مل وبقي تأثير هذا المستخلص ذو فعالية حتى التراكيز الجد منخفضة المستعملة حيث قدر عند التركيز 0.0012 مغ/مل بـــ 5.47 %, في حين قدر التركيز الآسر لـــ 50 % -IC_{50}- بـــ 0.021 مغ/مل.

وعند التركيز 0.02 مغ/مل قدرت نسبة إرجاع جذر DPPH° بـــ 57.06 % بالنسبة للمستخلص مقابل 96.06 % بالنسبة للكرستين والذي يعتبر من أكفئ الفلافونويدات في أسر والتقاط الجذور الحرة وهذا عند نفس التركيز.

تؤكد النتائج التي تحصلنا عليها الدور المضاد للجذور الحرة لمستخلصات هذه النبتة والذي يتوافق مع أعمال تم من الىى (236) دراسة النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص الميثانولي للأجزاء الهوائية لـــ

Globularia alypum وذلك باختبار القدرة المختزلة لـــ DPPH°, إضافة إلى اختبار نشاط عدة مركبات عزلت من نفس هذه النبتة والمتمثلة في الفلافونويدات سكرية , مركبات phenylethanoids ٔ Iridoids)235((الشكل 30- الصيغ الكيميائية لبعض المركبات المعزولة من نوع *Globularia alypum* -),

فتبين أن كل من هذه المركبات تملك نشاط معتبرا في إرجاع جذر DPPH° وهذا بالمقارنة مع كل من فلافونويد الكرستين والفلافونويد الصناعي BHT غير أن نشاط الفلافونويدات السكرية و phenylethanoids كان أكبر من ذلك الملاحظ لـــ Iridoids)235(.

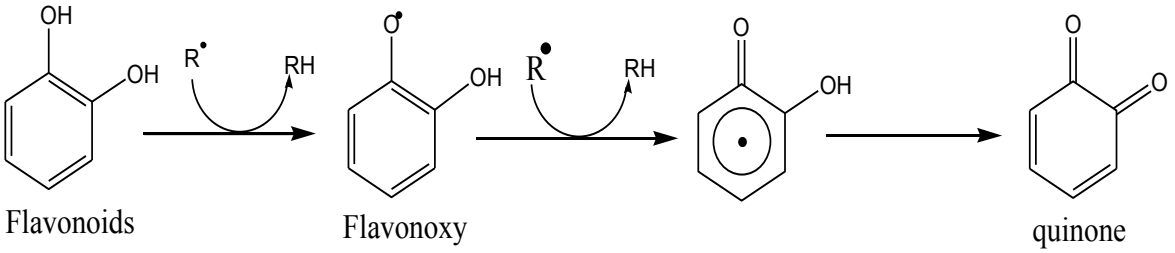
كما أثبت النشاط المضاد للأكسدة ل لمستخلص الايثانولي لهذه النبتة باستعمال اختبار Equivalent Trolox Antioxidant Capacity (TEAC) وذلك بواسطة جذر $ABTS^{+}$

2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) حيث قدر بـــ 20.31 mmol TEAC/g dry weight)261(.

تتفق نتائجنا أيضا مع ما هو مذكور في الدراسات المرجعية حول نشاط الفلافونويدات المضاد للجذور الحرة IN VITRO حيث تبين أن فلافونويد catéchin وهو من الفلافونولات يعمل على إرجاع حوالي 70% من جذر DPPH° (100µM) عند التركيز 0.1 مغ/مل في حين أنه عند التركيز 0.5 مغ/مل يعمل على إرجاع 80%(262). يساهم فلافونويد quercetin عند التركيز 0.01 مغ/مل في إرجاع 50% من محلول لجذر DPPH° ذو التركيز 100µM (263) , هذا بالإضافة إلى ماسبق ذكره حول النشاط المضاد للأكسدة لأربع فلافونويدات سكرية لنبتة *Globularia alypum* والمتمثلة في)235(: luteolin 7- Glucosyl-(1→2)-glucosyl , luteolin 7- Glucosyl-(1→3)-glucosyl و luteolin 7- Glucosyl وكلها من الفلافونات إضافة إلى فلافونويد من صنف الفلافانون والمتمثل في: 7- Flavanone diglycoside. حيث قدر التركيز المثبط لـــ 50% (IC_{50}) لجذر DPPH° لهذه الفلافونويدات بـــ 7.8 µM, 6.6 µM, 7.1µM و 12.2µM على الترتيب مقابل 7.8µM لفلافونويد الكرستين و 30µM للفلافونويد الصناعي BHT والتي استخدمت كشواهد مرجعية فمن خلال هذه الدراسة يظهر أن الفلافونويد السكري Luteoline 7-Glucosyl-(1→3)-glucosyl ($IC_{50=}$ 6.6 µM) (يتواجد في المستخلص البيتانولي للنبتة محط دراستنا) يملك نشاط أكبر من ذلك الملاحظ لفلافونويد الكرستين ($IC_{50=}$7.8 µM) الذي يعتبر من أحسن الفلافونويدات فعالية في التقاط الجذور الحرة في حين كان نشاط Luteoline 7-Glucosyl-(1→2)-glucosyl ($IC_{50=}$7.8 µM) مماثل لنشاط الكرستين بينما كان نشاط كل من Luteoline 7-Glucosyl ($IC_{50=}$7.1µM) ٔ Flavanone 7-diglycoside ($IC_{50=}$7.1µM)

أقل من نشاط الكرستين لكنه معتبر, غير أن الفلافونويدات الأربعة أظهرت نشاط أعلى من الفلافونويد الصناعي BHT. ما يؤكد الفعالية الكبيرة لفلافونويدات *Globularia alypum* وبالتالي المستخلص البيتانولي لها ضد الجذور الحرة.

تشير الدراسات المرجعية التي تمحورت حول النشاط المضاد للجذور الحرة للفلافونويدات بأن قدرة الاختزال الجذري لهذه المركبات يرجع أساسا إلى قدرتها على منح ذرات الهيدروجين وذلك كما يلي:



اقتناص الفلافونويدات للجذور الحرة)102(

حيث في وجود الجذور الحرة تتأكسد الفلافونويدات بفقدها لذرة هيدروجين وتتحول إلى جذر الفلافونوكسي الأقل نشاطا flavonoxy (FL-O°) وبالمقابل يتم إرجاع الجذر الحر ($R^{\bullet}$), في حين يتفاعل جذرflavonoxy مع جذر حر آخر لإعطاء بنية كينونية مستقرة)102, 224(.

تشير العديد من الدراسات السابقة أن هناك علاقة بين البنية الكيميائية للفلافونويدات وقدرتها على اختزال الجذور الحرة إذ بينت الأبحاث في مجال دراسة العلاقة IN VITRO بين البنية الكيميائية لهذه المركبات ووظيفة الأسر الجذري إلى التعرف على المجاميع والمواقع النشطة في الآلية المضادة للأكسدة والمتمثلة في: مجموعة أرثو ثنائي هيدروكسي 3',4' للحلقة B – Ortho Dihydroxy- أو ما يعرف بمجموعة الكاتيكول- cathécol-المسؤولة على ثبات جذر flavonoxyوانتقال الالكترونات, الرابطة الزوجية بين الموقعين)C3-C2(والمترافقة مع الوظيفة الكيتونية (مجموعة الكربونيل) "4-oxo" للحلقة C, مجموعة الهيدروكسيل في الموقع 3 للحلقة C. مجموعتي الهيدروكسيل في الموضعين 5,7 للحلقة A(216.174.171.102).

وبما أن الدراسات الفيتوكيميائية التي قمنا بها أثبتت أن المستخلص البيتانولي محط دراستنا مكون من فلافونولات وفلافونات وكلاهما يحتوي على العناصر البنيوية المذكورة أعلاه وهذا ما يفسر فعالية هذا المستخلص المعتبرة ضد جذر DPPH°.

بعد التأكد من فعالية فلافونويدات المستخلص البيتانولي للأجزاء الهوائية لنبتة *Globularia alypum* في اختزال الجذور الحرة IN VITRO قمنا باستعماله ضد تلك المتشكلة IN VIVO وذلك من خلال دراسة تأثيرها ضد السمية القلبية لـــ DOXO الناتجة أساسا عن الإجهاد التأكسدي الذي تسببه الجذور الحرة و المستحدثة عند جرذان من سلالة Wistar باستعمال جرعة من DOXO قدرها 20 مغ/كغ تحت الغشاء البريتوني حيث شملت هذه الدراسة:

- المعايرات البيوكيميائية لنشاط الإنزيمات البلازمية الدالة على التسمم القلبي CPK, LDH و AST
- تقدير بعض مؤشرات الإجهاد التأكسدي في نسيج القلب وذلك بمعايرة GSH و MDA
- رصد الاستجابة البنيوية لخلايا العضلة القلبية من خلال الدراسة المجهرية.

استعمل بكثرة نشاط كل من إنزيم LDH, CPK AST على المستوى السريري كمؤشرات بيولوجية في تشخيص الإصابات القلبية حيث أنه خلال تضرر خلايا العضلة القلبية تتحرر هذه الإنزيمات في البلازما مما يؤدي إلى زيادة نشاطها, واعتمد عدة باحثين على تقدير نشاط هذه الإنزيمات الثلاث لتقييم تأثير عدة مركبات على السمية القلبية لـــ DOXO (267.266.265.264.21).

من خلال دراستنا ظهر جليا أن الجرذان المعاملة بالمستخلص البيتانولي فقط عند جرعة 100 مغ/كغ ستة أيام في الأسبوع لمدة أربع أسابيع لم تؤدي إلى ارتفاع في نشاط إنزيمات LDH, CPK AST فـ البلازما مما يدل على أن المستخلص لا يؤدي إلى أي إصابة في العضلة القلبية.

بينما أبدت الجرذان المعاملة بجرعة وحيدة لـــ DOXO قدرها 20 مغ/كغ تحت الغشاء البريتوني سمية قلبية لوحظت بوضوح بعد 48 ساعة من الحقن وهذا من خلال الارتفاع المعنوي في المستويات البلازمية لإنزيمات LDH, CPK AST.

ويتفق هذا مع ماذهب إليه عدة باحثين (268.267.265.16). حيث تبين أن حقن جرعة من DOXO قدرها 30 مغ/كغ تحت الغشاء البريتوني للجرذان تؤدي بعد 48 ساعة إلى زيادة في مؤشرات تضررعضلة القلب والمتمثلة في LDH, CPK (16) وأثبت ارتفاع في مستويات هذين الإنزيمين في مصل الجرذان بعد ثلاث أيام من حقن جرعة من DOXO قدرها 20 مغ/كغ تحت الغشاء البريتوني (267) كما تم إظهار زيادة كبيرة في النشاط المصلي لكل من LDH, CPK AST بعد يوم واحد من حقن الجرذان بجرعة 15مغ/كغ من DOXO تحت الغشاء البريتوني (265) , كما أن إعطاء جرعة وحيدة قدرها 7.5mg/kg عبر الوريد تؤدي إلى زيادة معنوية في نشاط هذه الإنزيمات (268) .

وحسب الدراسات المرجعية يفسر الارتفاع المعنوي في نشاط كل من LDH, CPK AST في مصل الجرذان المعاملة بـــ DOXO إلى تحريرها من خلايا العضلة القلبية نتيجة الاختلال في تكامل غشائها الخلوي اثر تغير ميوعته والذي تسببه الجذور الحرة الناتجة عن استقلاب هذا الدواء والمؤدية إلى ما فوق الأكسدة الليبيدية للأحماض الذهنية عديدة عدم التشبع المكونة له (268(.

إن معاملة الجرذان بالمستخلص بجرعة قدرها 100مغ/كغ ستة أيام في الأسبوع لمدة أربع أسابيع قبل حقنها بجرعة من DOXO قدرها 20 مغ/كغ تحت الغشاء البريتوني أدى إلى تراجع في مستويات الإنزيمات البلازمية الدالة على التسمم القلبي LDH, CPK AST مقارنة بتلك التي عوملت مباشرة بـــ DOXO.

توضح هذه النتائج دور فلافونويدات المستخلص البيتانولي لنبتة *Globularia alypum* في الوقاية من سمية DOXO على خلايا العضلة القلبية. تتطابق هذه النتائج مع أعمال سابقة تم التوصل من خلالهاإلى أن المعاملة المسبقة للفئران بمركبات proanthocyanidins المستخلصة من بذور العنب (متعددات فينول) بجرعة 100مغ/كغ عن طريق الفم كل يوم لمدة تسعة أيام قبل حقنها بجرعة من DOXO 20مغ/كغ تحت الغشاء البريتوني خفضت من نشاط CPK في المصل)270(. وأظهرت دراسات أخرى أن استعمال جرعات مختلفة للمستخلص الايثانولي لنبتة *Phyllanthus maderaspatensis* (200 مغ/كغ, 400 مغ/كغ و 600 مغ/كغ) لمدة 7 أيام يؤدي إلى الوقاية من السمية المحرضة عند الفئران بـــ DOXO (15مغ/كغ تحت الغشاء البريتوني) حيث خفضت من تركيز كل من إنزيمي LDH, CPK بطريقة معتمدة على الجرعة المستعملة للمستخلص حيث لوحظ أنه كلما زادت جرعة المستخلص زاد انخفاض تركيز هذين الإنزيمين)21(. ولقد أشير إلى فعالية الدنج)propolis((غني بالفلافونويدات) ضد السمية القلبية لـــ DOXO عند الجرذان حيث أن المعاملة المسبقة بالدنج بجرعة 100 مغ/كغ كل يوم مدة خمسة أيام متبوعة في اليوم السادس بجرعة 10 مغ/كغ لهذا الدواء عبر الوريد خفضت من نشاط إنزيمي CPK و AST (269) . كما أن نتائجنا مشابهة أيضا لدراسات عدة باحثين آخرين (271.268.146).

يمكن أن نفسر الانخفاض في نشاطات LDH, CPK AST في بلازما الجرذان المزودة بالمستخلص البيتانولي ثم بـــ DOXO إلى حماية فلافونويدات هذا المستخلص للتكامل البنيوي والوظيفي لغشاء الخلايا العضلية للقلب ضد هجومات الجذور الحرة الناتجة عن استقلاب هذا الدواء والمسببة لفوق الأكسدة الليبيدية للأحماض الذهنية عديدة عدم التشبع المكونة له.

اعتمد العديد من الباحثين على تقدير مؤشرات الإجهاد التأكسدي كمعايرة MDA , GSH وقياس نشاط عدة إنزيمات مضادة للأكسدة (SOD, CAT, GPx) في تقييم السمية القلبية لـــ DOXO .)272.271.270.21(

يشكل MDA أحد النواتج النهائية السامة المتشكلة خلال تفاعلات فوق الأكسدة الليبيدية للأغشية الخلوية والتي تسببها مهاجمة الجذور الحرة للأحماض الذهنية عديدة عدم التشبع المكونة لها. يملك MDA زمن نصف حياة أطول من الجذور الحرة مما يسهل انتشاره وبالتالي تأثيره عند مسافات بعيدة من مكان تشكله فباستطاعته أن يرتبط مع القواعد الأزوتية لـــ ADN ويشكل الطفرات التي قد تؤدي إلى ظهور السرطان .

خلال تفاعل الأكسدة الليبيدية, تزداد معدلات MDA لدى تسمح معايرته بتقييم مدى انتشار هذا التفاعل وبالتالي تقدير مستوى الإجهاد التأكسدي (274. 275) .

بينت نتائج معايرتنا أن قيمة MDA عند المجموعة المعاملة بالمستخلص البيتانولي (100مغ/كغ) فقط كانت طبيعية إذا ما قورنت بالمجموعة الشاهدة هذا ما يدل على أن هذا المستخلص لم يحرض تفاعل فوق الأكسدة الليبيدية.

أبدت الحيوانات المعاملة بـــ DOXO فقط بجرعة 20 مغ/كغ زيادة معتبرة في قيم MDA مقارنة بما سجل عند مجموعتي الشاهد والمستخلص, هذا الارتفاع في معدلات MDA ناتج عن تحريض DOXO لتفاعل فوق الأكسدة الليبيدية للأغشية الخلوية لعضلة القلب بالجذور الحرة الناتجة عن استقلاب هذا الدواء وهذا ما يؤدي إلى السمية القلبية له, حيث أسفرت نتائج عدة دراسات مرجعية إلى أن تشكيل الجذور الحرة يعتبر من أهم الآليات المسببة لسمية DOXO وتعتبر خلايا العضلة القلبية أكثر حساسية لهذه الجذور مقارنة بباقي الأعضاء الاستقلابية الأخرى كالكبد و الكلى وهذا راجع إلى:

جاذبية DOXO المرتفعة لـــ Cardiolipine وهو من الفوسفوليبيدات العديدة عدم التشبع والمتواجدة أساسا في الغشاء الداخلي لميتوكندري خلايا العضلة القلبية مما يؤدي إلى تراكم هذا الدواء في نسيج هذا العضو)160.148.147.136.128.121(, المستوى المنخفض للإنزيمات المضادة للأكسدة (CAT,GST وGpx...) في القلب مقارنة بتلك الموجودة في أعضاء أخرى كالكبد)145.138.136.121.15. 154. 156(, الاستقلاب التأكسدي المرتفع للخلايا القلبية)121(, المستوى المرتفع للإنزيمات Reductase ٔ Dehydrogenase مثلNADP dehydrogenase

و NOS(nitric oxide synthase)والتي تلعب دور مهم في تشكيل الأنواع المؤكسدة وهذا بتحويلها للالكترونات)139.128(إضافة إلى كل هذا احتواء القلب على إنزيم CR الذي يحفز استقلاب DOXO إلى doxorubicinol والذي يمارس سمية قلبية أكثر من تلك الملاحظة للمركب الأصلي .)151.124.121(

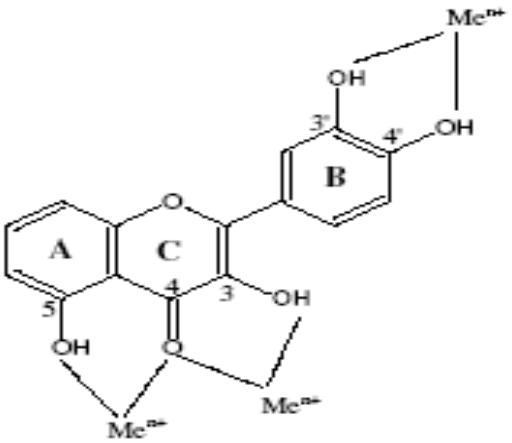
في الخلايا القلبية يخضع DOXO إلى حلقة أكسدة وإرجاع فيتم إرجاع مجموعة الكينون المكونة له بإنزيم Cytochrome P450 réductase أو بإنزيمات أخرى كا NADH déhydrogénase أو xanthine oxidase فينتج جذر semi-quinone الذي بتفاعله مع الأكسجين الجزيئي O_2 يشكل أنيون فوق الأكسجين $O_2^{\circ-}$ والذي بدوره يساهم في تشكيل باقي الجذور الحرة كا H_2O_2 و OH°) 121.15 .148.142.138.128.124. 155(, كما يمكن لهذه الجذور أن تتشكل أيضا بدون تحفيز إنزيمي وذلك من خلال ارتباط أيونات الحديد الثلاثي Fe^{3+} مع جزيئ DOXO أين يتم إرجاعها باكتسابها للإلكترون الناتج عن أكسدة هذا الأخير فيتشكل الجذر الحر المعقدDOXO – Fe^{2+} هذا الذي يعمل على إرجاع O_2 إلى O_2^{-} وبالتالي تخلق باقي الجذور الحرة الأخرى)121.124.138.143.148. 159(.

كل الجذور الحرة المتشكلة وخاصة جذر OH° جد سامة للجزيئات الحيوية لخلايا العضلة القلبية وخاصة الأحماض الذهنية عديدة عدم التشبع المكونة للغشاء الخلوي والتي تساهم إلى حد بعيد في تأمين السيولة الغشائية فيحرض OH° ميكانيزمات فوق الأكسدة الليبيدية وإنتاج أنواع جذرية أخرى مثل LO° ،LOO° . إضافة إلى مستويات مرتفعة من جزيئات MDA وبالتالي التغير في البنية الفسيفسائية المائعة للغشاء والإخلال بجميع وظائفه الحيوية وقد يؤدي هذا إلى التحلل الكلي للخلية (cell lysis) وتحرير مكوناتها)276.171.68.67.57.45.40.27(. وهذا ما يفسر ما سبق ذكره حول زيادة المستويات البلازمية لإنزيمات LDH, CPK ،AST عند مجموعة الـــ DOXO.

عندما عوملت الحيوانات مسبقا بالمستخلص البيتانولي بتركيز 100مغ/كغ ستة أيام في الأسبوع مدة أربع أسابيع قبيل إخضاعها لجرعة حادة من DOXO (20مغ/كغ تحت الغشاء البريتوني) وجد أن معدلات MDA كانت أكبر من تلك الملاحظة بالنسبة لمجموعة المستخلص لكنها أقل من تلك المسجلة في مجموعة DOXO. فيبدوا من خلال هذه النتيجة أن المستخلص خفض من تفاعل فوق الأكسدة الليبيدية حيث ظهر هذا بوضوح في التقليل من تراكم جزيئات MDA. تؤكد هذه النتيجة دور المستخلص البيتانولي في الوقاية من السمية القلبية لـــ DOXO.

إن نشاط المستخلص في تخفيض فعاليات فوق الأكسدة الليبيدية قد يكون ناتجا عن نشاط الفلافونويدات والتي قد يكون البعض منها ذو طبيعة ليبوفيلية وبالتالي بامكانها التغلغل بين الأغشية أين تمارس نشاطها المضاد للأكسدة أوالكابح لسلسلة التفاعلات المؤكسدة لليبيدات الغشائية (277(وذلك كما يلي:

مخلبتها للأيونات المعدنية كأيونات الحديد فتكبح بهذا تخليق الجذور الحرة الناتجة سواء بتفاعل Fenton المولد لجذر °OH أو المتشكلة بعد ارتباط هذه الأيونات بجزيئ DOXO ويرجع هذا إلى احتواء الفلافونويدات على المواقع الهامة لمخلبة الأيونات المعدنية والمتمثلة في نواة الكاتيكول للحلقة B, مجموعة 4-OXO و 3-OH للحلقة C و مجموعة 4-OXO و 5-OH بين الحلقتين A و C)200.199.165.102(.



فعل الفلافونويدات الممخلب للمعادن

أسرها للجذور الحرة المتشكلة من خلال استقلاب DOXO كجذر $O_2^{\cdot -}$,°OH وكذا الجذور الناتجة عن تفاعلات فوق الأكسدة الليبيدية كالجذورالألوكسيلية °LO ً البيروكسيلية °LOO عبر المنح الهيدروجيني (278), التقاطها لجزيئات MDA وكذا تدعيمها للأنظمة المضادة للأكسدة كتدعيم توليد Alpha-Tocophérol(Vit E(وهذا باختزالها لجذر °Alpha-TO. يعتبر Vit E من الفيتامينات المحبة للدهون مما يسمح بدمجه على مستوى الغشاء الخلوي الغني بالأحماض الذهنية عديدة عدم التشبع أين يساهم بفعالية في إعاقة انتشار)propagation(سلسلة تفاعلات فوق الأكسدة الليبيدية وذلك من خلال تفاعله مع جذر الألكوكسيل)°LO(و البيروكسيل)°LOO(مؤديا إلى استقرارها متحولا بذلك إلى جذر°Alpha-TO .

الجلوتاتيون (GSH(ثلاثي ببتيد يتشكل من ثلاث أحماض أمينية Glutamique, Cysteine, Glycine وهو من المركبات الكبريتية اللابروتينية بالخلية)90.86(. وينصب أغلب الاهتمام على أهم مجموعة يحتويها سيستيئين هذا الجلوتاتيون وهي مجموعة sulfhydril) SH(والتي يعزى لها نشاطه المضاد للأكسدة حيث تكسبه الخاصية المرجعة)90(. فيعتبر GSH ملتقطا جيدا لكل من H_2O_2 ,OH° ,LO°, LOO° و $O_2^{\cdot-}$)44(إما بشكل مباشر(بدون تحفيز إنزيمي) أو بتحفيز من إنزيم GPx بحيث يشكل GSH مادة تفاعل لهذا الأخير)50.39(فيؤمن بذلك فعاليات استبعاد البيروكسيدات والهيدروبيروكسيدات بتحويله إلى الجلوتاتيون المؤكسد)GSSG(ىلإزيٌشجعـسا فـً ٌج دّ GR اعتمادا على NADPH المولد عبر المسارات البنتوزية)86(. يتداخل GSH أيضا تساهميا مع عدة جزيئات مضادة للأكسدة كالفيتامين E والفيتامين C)86.64.39(.

وقد خلصت معايرتنا لـــ GSH في نسيج القلب إلى مايلي:

انخفاض في معدلات GSH السيتوزولي لخلايا العضلة القلبية عند المجموعة المعاملة بـــ DOXO فقط. وبدون شك فان السبب الأساسي لهذا الانخفاض هو أكسدة GSH إلى GSSG خلال نشاطه في اختزال الجذور الحرة الناتجة عن استقلاب هذا الدواء وكذا مجابهة تفاعلات فوق الأكسدة الليبيدية. كما يمكن أن يرجع هذا الانخفاض إلى قلة كفاءة الخلية القلبية في تخليق وصيانة هذه الجزيئات, ويعزز الانخفاض أو الاستنفاذ الجلوتاتيوني كل من الأكسدة الليبيدية وأكسدة مجاميع الثيول للبروتينات.
وبإمكاننا صيانة مستويات الـــ GSH بتدخل عدة مركبات لها القدرة على زيادة تصنيع هذه الجزيئات أو بإمكانها التقاط الجذور الحرة.

المعاملة المسبقة للجرذان بالمستخلص البيتانولي لنبتة *Globularia alypum* بجرعة 100 مغ /كغ ستة أيام في الأسبوع مدة 4 أسابيع قبيل إخضاعها لجرعة حادة من DOXO (20 مغ /كغ تحت الغشاء البريتوني) عمدت إلى إعاقة الانخفاض في مستويات GSH مقارنة بما لوحظ عند المجموعة المستقبلة للدواء فقط, كما أعطت معدلات قريبة من تلك المسجلة عند المجموعة الشاهدة ومجموعة المستخلص.

تدل هذه النتيجة على التأثير الواقي لمستخلص هذه النبتة ضد الانخفاض في تركيز معدل GSH السيتوزولي للقلب والمحرض بـــ DOXO.

قد يرجع سبب نشاط المستخلص البيتانولي في استرجاع أو صيانة مستويات GSH بعد نقصها من جراء السمية الحادة المستحدثة بهذا الدواء إلى نشاط الفلافونويدات المكونة له وذلك بالآليات المقترحة التالية: تحريض الفلافونويدات تخليق جزيئات GSH من جديد أو إعادة استرجاعها بعد أكسدتها حيث

يمكن للفلافونويدات اختزال GSSG تحويله إلى GSH(كما يمكن أن تقوم بالتأثيرين معا أو أسر الفلافونويدات للجذور الحرة وللمستقلبات النشطة السامة الناتجة عن ميثابوليزم DOXO, بحيث عوض أن تتفاعل هذه الأخيرة مع جزيئات الجلوتاتيون مؤدية إلى استنفاذها فإنها تلتقط بواسطة الفلافونويدات وبهذا فهي تحافظ على معدلات GSH.

وبتفحصنا لدراسات الآخرين حول تأثير عدة مركبات مضادة للأكسدة أو مستخلصات نباتية في تقدير مؤشرات الإجهاد التأكسدي الناتج عن السمية القلبية المستحدثة بـــ DOXO وجدنا بأن نتائجنا تتفق إلى حد بعيد مع ما أشير إليه في دراسة للتأثير الوقائي للمستخلص البيتانولي (يحتوي على الفلافونويدات) لنبات *Terminalia arjuna* للسمية القلبية للـــ DOXO حيث توصلت هذه الدراسة إلى ما يلي: زيادة معدلات MDA ونقصان في مستويات GSH عند الجرذان التي حرضت فيها سمية حادة بـــ DOXO بجرعة تحت الغشاء البريتوني قدرها 20مغ/كغ مقارنة بالمجموعة الشاهدة. في حين أن المعاملة المسبقة للحيوانات بالمستخلص البيتانولي عن طريق الفم باستعمال عدة جرعات (0.425 مغ/كغ, 0.85 مغ/كغ, 1.7 مغ/كغ, 3.4مغ/كغ, 6.8 مغ/كغ) أدت إلى نقصان تركيز الـــ MDA وزيادة تركيز GSH زا إذا ما قورنت بمجموعة DOXO)22(.

كما تبين أنه بإمكان المستخلص الايثانولي لنبات *Phyllanthus maderaspatensis* الوقاية من الإجهاد التأكسدي الناتج عن السمية المحرضة عند الفئران بـــ DOXO (15مغ/كغ تحت الغشاء البريتوني) حيث تجلى هذا من خلال تحسين مستويات GSH)21(.

تتطابق نتائجنا كذلك مع دراسة تمت حول التأثير الواقي لـــ p- coumaric وهو حمض فينولي منتشر بكثرة عند النباتات له نشاط مضاد للأكسدة ضد السمية القلبية المحرضة بـــ DOXO عند الجرذان والتي أوصلت إلى أن حقن الحيوانات بجرعة من هذا الدواء قدرها 15مغ/كغ تحت الغشاء البريتوني أدت إلى سمية قلبية كان سببها الإجهاد التأكسدي حيث بدا هذا جليا من خلال: زيادة معدلات MDA أين قدرت بـــ

86.3 ±1.76 nM /g protein مقارنة بـــ 57.7 ± 1.22 nM /g protein عند الحيوانات الشاهدة وكذا نقصان في معدلات GSH والذي قدر بـــ 2.7 ± 0.08 µmol/g tissue مقارنة بالمجموعة الشاهدة أين قدرت قيمته بـــ 4.2 ±0.09 µmol/g tissue . في حين تبين أن هذا الحمض أدى إلى الوقاية من تأثيرات الإجهاد التأكسدي الذي سببه DOXO , فتزويد الجرذان بهذا الحمض الفينولي بجرعة قدرها 100 مغ /كغ عن طريق الفم مدة خمس أيام أدى إلى نقصان قيم MDA و وزياد GSH أين قدرت بـــ

nM /g protein 55.6 ±1.36 و µmol/g tissue 0.15 ± 3.5ع ياى خشخ ٍب وهي متقاربة مع تلك المتحصل عليها في المجموعة الشاهدة)271(.

إن الدراسات النسيجية جسدت مدى استجابة الخلية العضلية للسمية القلبية المستحدثة لدى الجرذان بـــ DOXO (20 مغ/ كغ تحت الغشاء البريتوني) ويبدوا هذا باختلالات هيموستازية تنعكس وظيفيا وبنيويا. فقد بينت دراسات المجهر الضوئي (H&E 100×) ما يلي: غياب المعالم الهندسية للخلية العضلية القلبية, عدة فراغات بين خلوية, انتشار للفجوات, تكثف النواة, تشكل انتفاخات مائية و مظاهر نكرزة واضحة تجلت في انحلال للخلايا العضلية القلبية إضافة إلى ارتشاح لعدة خلايا التهابية.

وكل هذه التغيرات النسيجية تفسر ما توصلنا إليه من نتائج حول المؤشرات الإنزيمية الدالة على التسمم القلبي وكذا مؤشرات الإجهاد التأكسدي. فيترجم تحلل الخلايا العضلية (التنكرز) تحرر للإنزيمات LDH, CPK و AST دلالة على تمزق الأغشية الخلوية نتيجة فقدها لحيويتها تحت تأثير الجذور الحرة المسببة لتفاعلات فوق الأكسدة الليبيدية.

تتفق ملاحظتنا هذه مع عدة أعمال سابقة ; فقد أدت معاملة الفئران بجرعة 20 مغ/كغ تحت الغشاء البريتوني إلى عدة تغيرات بنيوية في نسيج القلب تمت ملاحظاتها بالمجهر الضوئي عند التكبير 100× مشابهة لتلك التي تحصلنا عليها تجلت في: تحلل محدود لخلايا العضلة القلبية, تكثف للأنوية, تشوه في بنية الخلوية وكذا العديد من الفراغات البين خلوية)270(.

كما لوحظ ارتشاح للخلايا الالتهابية وكذا ظهور لعدة فجوات في سيتوبلازم الخلايا العضلية القلبية عند مجاميع الجرذان المعاملة بـــ DOXO (20 مغ/كغ تحت الغشاء البريتوني) (265). كما تتطابق نتائجنا مع أعمال عدة باحثين آخرين(273.268.267.152.145.135.16).

بينت نتائج هذه الدراسة النسيجية أن المعاملة المسبقة بالمستخلص البيتانولي لنبتة *Globularia alypum* أدى إلى التحسن في التغيرات النسيجية التي سببها DOXO وذلك بمهاجمة الفلافونويدات للجذور الحرة التي تعتبر المسبب الرئيسي لمختلف هذه الأضرار النسيجية.

نتائجنا متوافقة مع الدراسة التي تمت باستعمال المستخلص البيتانولي لنبتة *Terminalia arjuna* (غني بالفلافونويدات) والذي أدى إلى التقليل من الإصابات النسيجية التي سببتها حقنة من DOXO قدرها 20 مغ/كغ تحت الغشاء البريتوني)22(. كما أظهر ٍس خ خ ي ص proanthocyanidin لبذور العنب بجرعة 100مغ/كغ عن طريق الفم وقاية واضحة لنسيج القلب من السمية المحرضة بجرعة من DOXO

قدرها 20مغ/كغ تحت الغشاء البريتوني)270(. وعليه فان هذه الدراسة النسيجية دعمت ما تم التوصل إليه في الدراسة البيوكيميائية.

بينت دراسات عدة باحثين دور الفلافونويدات المضاد للسمية القلبية لـــ DOXO, فتم إظهار أن العلاج المرافق لكل من فلافونويد Rutin أو luteolin بجرعة 100 µmole/kg أدى إلى حماية الفئران من مظاهر السمية القلبية لـــ DOXO والتي تجلت بوضوح في انخفاض مستويات فوق أكاسيد الذهون وكذا تعديل نشاط الإنزيم المضاد للأكسدة والمتمثل في GSHpx مقارنة بالحيوانات المعاملة بـــ DOXO فقط أين أبدت نقصان في نشاط هذا الإنزيم وكذا زيادة في تركيز فوق أكاسيد الذهون)279(. كما أثبت الفعل الواقي لفلافونويد Catechin ضد مظاهر السمية القلبية لهذا الدواء)280(.

تم التوصل إلى الفعالية الواقية والمرتبطة بالجرعة للفلافونويد النصف صناعي (semisynthetic) -7 monohydroxyethylrutoside ضد سمية DOXO القلبية و المحرضة عند الفئران دون التدخل في نشاطه المضاد للسرطان)281. 282(.

تجدر الإشارة من خلال الدراسات المرجعية بأن الفعل الواقي للفلافونويدات ضد سمية DOXO القلبية قد يرجع إلى آلية أخرى عدا نشاطه المضاد للأكسدة والمتمثلة في تثبيطه لإنزيم carbonyl reductase المتواجد في سيتوبلازم الخلايا القلبية و المسؤول على استقلاب DOXO إلى doxorubicinol هذا الذي يتراكم في العضلة القلبية و يمارس تأثير تسممي أكبر من ذلك الخاص بـــ DOXO)131.122(حيث تبين تأثيره في تثبيط إنزيمات الشبكة الأندوبلازمية Ca^{+2}-ATPase, Na^{+}/K^{+} ATPase, H^{+} – ATPase (158). فقد أثبتت فعالية كل من فلافونويد Quercetin أو Rutin في تثبيط هذا إنزيم (283).

أثبتت فعالية الكثير من المستخلصات النباتية أو مستقلباتها الثانوية ضد الأورام السرطانية سواء على النماذج المخبرية – IN VITRO – أو عند الحيوانات التجريبية -IN VIVO- .

من خلال دراستنا لتأثير المستخلص المائي للأجزاء الهوائية لنبات *Globularia alypum* المثبط لتضاعف – growth-inhibitory effects - ثلاث أنواع من السلالات الخلوية الورمية البشرية IN - VITRO– السلالة الخلوية الورمية البشرية للكبد Human hepatocarcinoma cell line)Hep-G2(, السلالة الخلوية الورمية البشرية للأمعاء Colon carcinoma cells (HCT-116) ، السلالة الخلوية الورمية البشرية اللمفاوية lymphoblastic (1301) leukemia cells وهذا باستعمال اختبار MTT Cell Viability تبين أن المستخلص أدى إلى تثبيط النمو لكل من السلالتين Hep-G2 ، HCT-116 وذلك بطريقة معتمدة على الجرعة وتبين أن السلالة Hep-G2 كانت أكثر حساسية لتثبيط نموها بهذا

المستخلص (IC_{50} = 43.82 µg/ml) مقارنة بسلالة HCT-116 أين تطلبت تركيز عالي جدا (>100 µg/ml) فقدرت قيمة IC_{50} بـــ 151.40 µg/ml. في حين أدى هذا المستخلص إلى تحريض تضاعف 1301 cells بطريقة معتمدة على الجرعة هذا ما يجعلنا نقترح أن لهذا المستخلص نشاط محفز لتضاعف الخلايا اللمفاوية Lymphostimulatory activity.

وقد أظهرت دراسات سابقة تأثير المستخلص المائي لنبات *Globularia alypum* المضاد لسرطان الدم (antileukemic 246.236).

من خلال عدة أبحاث تمت حول تأثير المستخلصات النباتية أو بعض المركبات المعزولة منها ضد تضاعف الخلايا الورمية , يمكننا اقتراح آليتين قد تكون سببا في تثبيط تضاعف كل من السلالتين الورميتين Hep-G2 و HCT-116 بالمستخلص المائي والمتمثلة في:

- كبح الدورة الخلوية – Cell cycle arrest- في أحد مراحلها.
- تحريض الية الموت الخلوي المبرمج – Apoptosis- . (286.287.288. 289 .290. 291).

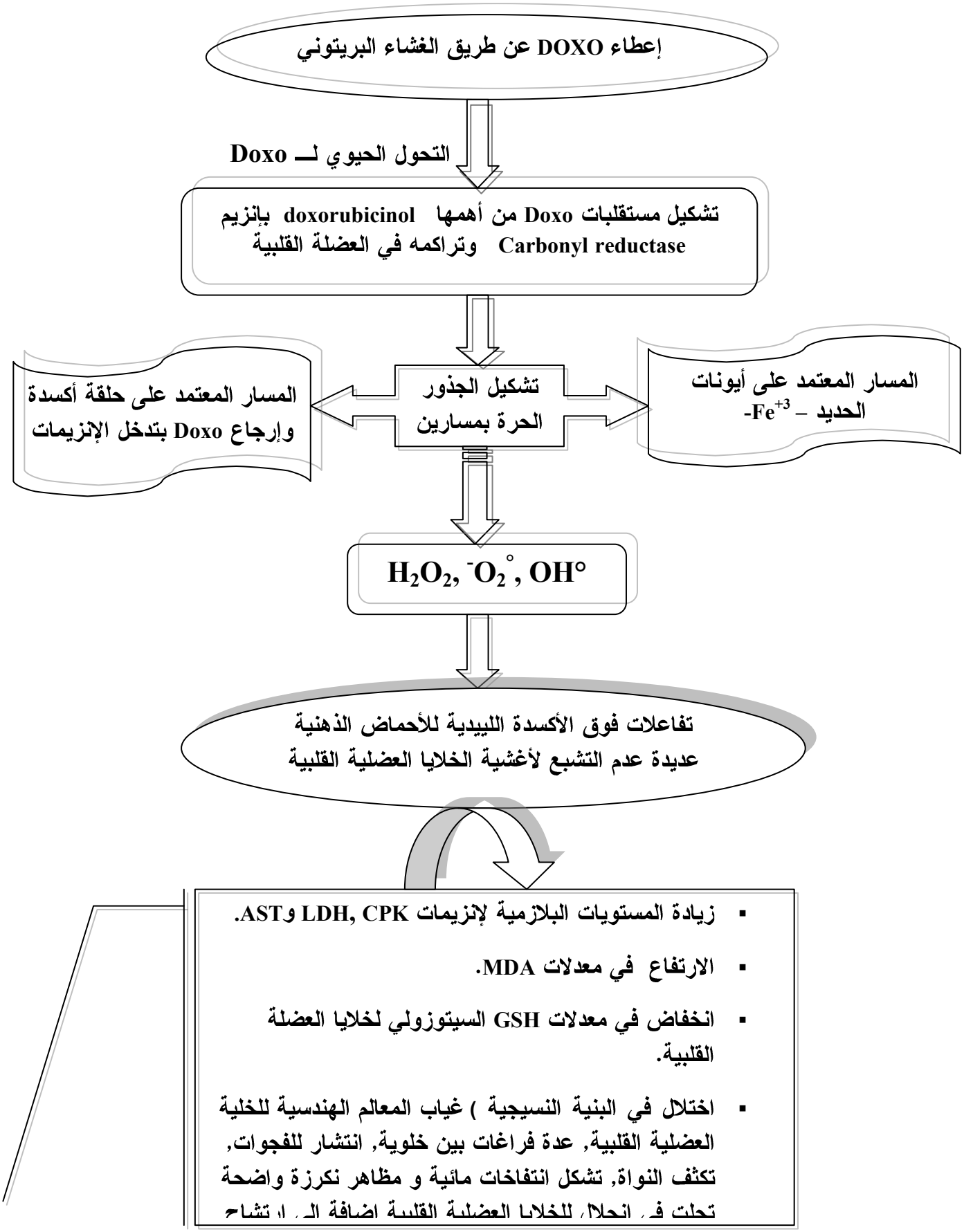
تم إثبات فعالية المستخلص الخام الكلوروفورمي لكل من نبات

Curcuma longa, *Ipomoea batatas*, *Hemerocallis fulva* و *Nasturium officinale* في تثبيط تضاعف عدة سلالات خلوية ورمية للأمعاء (CaCo2, SW480, HCT116, HT29 و SW837) بطريقة معتمدة على الجرعة حيث تراوحت قيمة IC_{50} بين 10-80 µg/ml وتبين أن كل من مستخلص *Hemerocallis fulva* و *Ipomoea batatas* أدى إلى تثبيط الانقسام الخلوي في الدور G1 من طور الراحة للسلالة الخلوية الورمية HCT116 بعد 48 ساعة من المعاملة بالمستخلص. في حين أن كل من مستخلصي *Curcuma longa* و *Nasturium officinale* حرضت الموت الخلوي المبرمج لنفس السلالة الخلوية الورمية بعد 48 ساعة من إعطاء المستخلص (288) وبينت دراسة للمستخلص الايثانولي للنباتات الطبية التالية: *Curcuma zedoaria*, *Derris scandens*, *Dioscorea membranacea*,

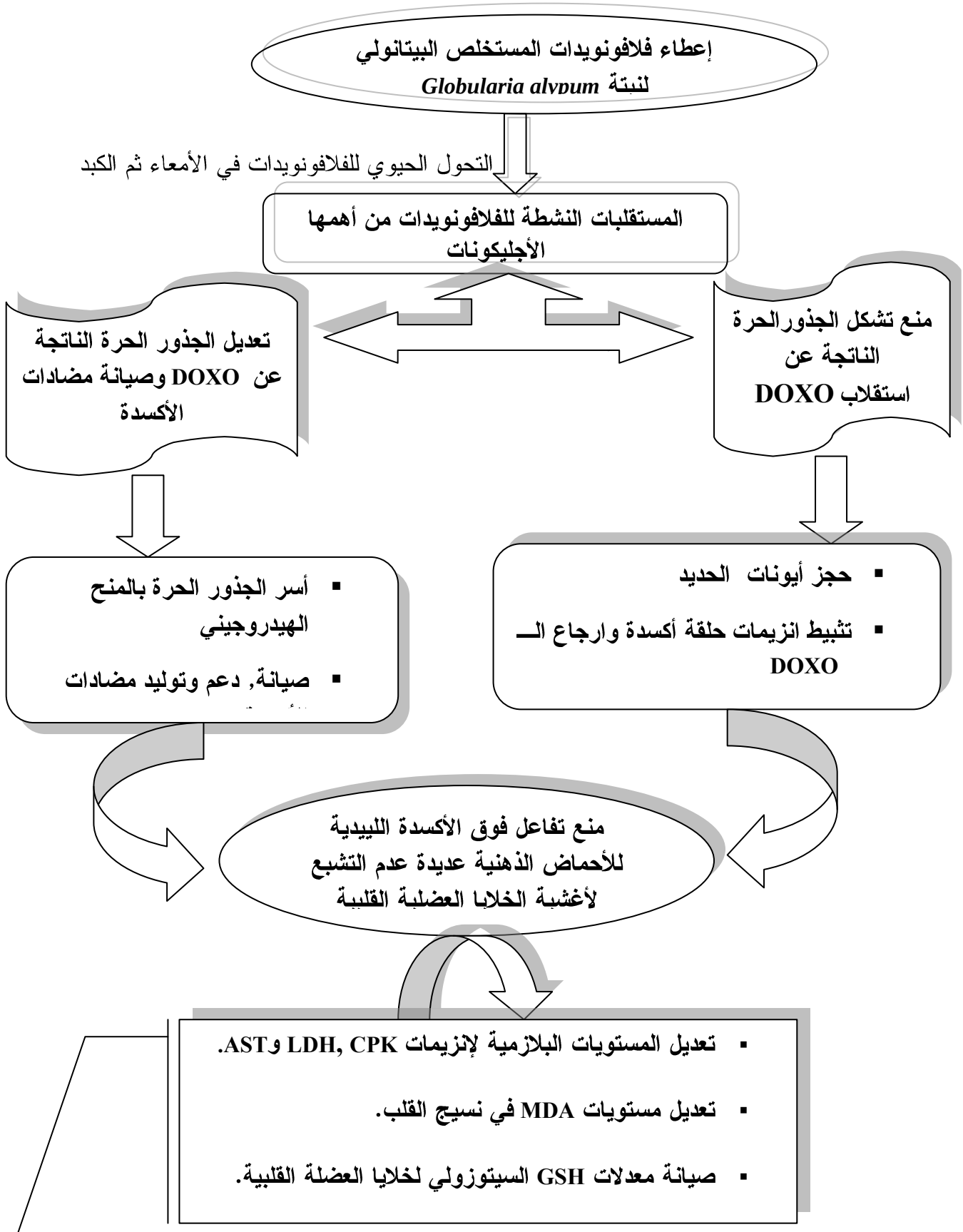
Bridelia ovata, Nardostachys jatamansi و *Rhinacanthus nasutus* نشاطها المثبط لتضاعف كل من السلالة الخلوية الورمية الرئوية (CORL-23) cell lung carcinoma و السلالة الخلوية الورمية للبروستات(PC3) prostate cancer cell lines (IC_{50} < 30µg/ml).

كما أثبت في دراسة أخرى دور متعدد الفينول المضاد لتضاعف عدة سلالات خلوية ورمية بتحريض آلية الموت الخلوي المبرمج مثل السلالة الخلوية الورمية البشرية البنكرياسية (Mia Pa Ca-2) pancreatic, الكبدية hepatocellular carcinoma (HepG2) و المعوية (HCT-116) (289).

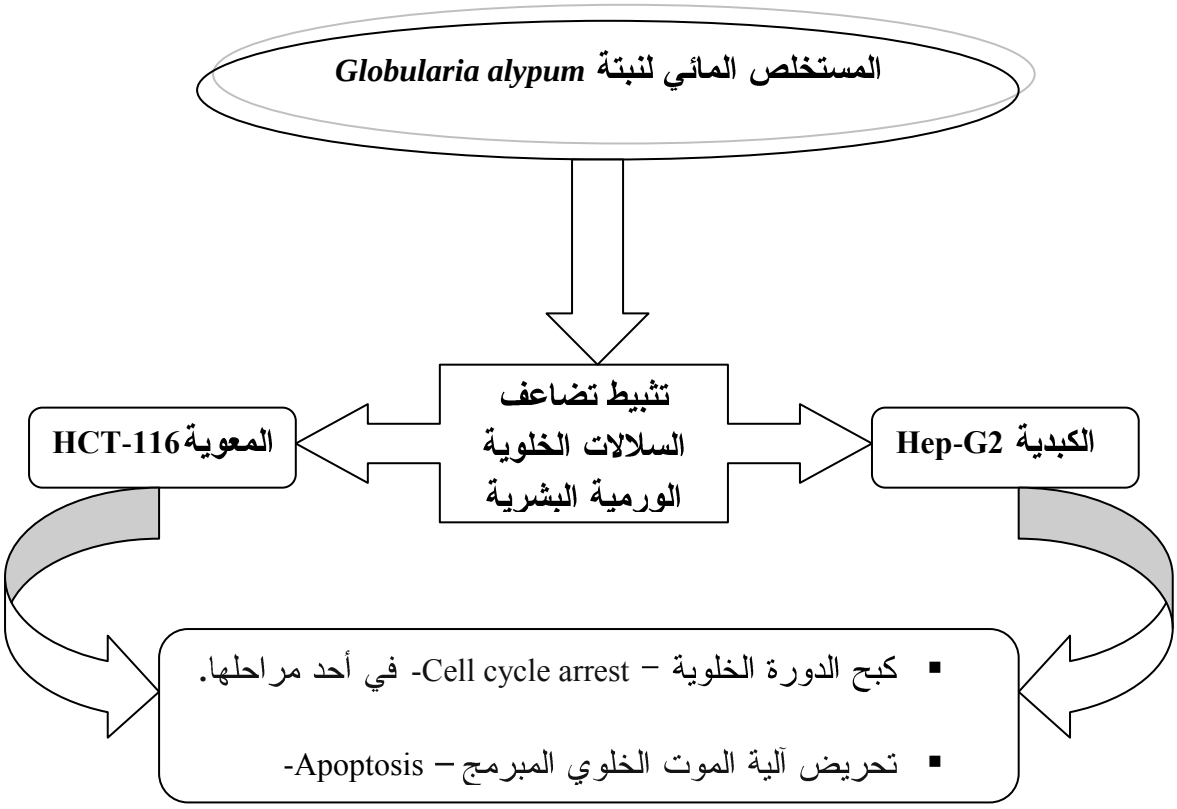
وأظهرت دراسة حول نشاط حمض Ursolic المستخلص من الأجزاء الهوائية لنبات *Salvia officinalis* نشاط مضاد لتضاعف سلالات خلوية ورمية بشرية للبروستات human prostate cancer cells والمتمثلة في)PC-3(و LNCaP cells حيث قدر التركيز المثبط لـــ 50% بـــ 45µM ، 55µM بتحريض آلية الموت الخلوي المبرمج (293). في حين أدى فلافونويد silibinin المستخلص من نبات *Silybum marianum* نشاطا مضاد لتضاعف ثلاث سلالات خلوية ورمية معوية Human Colon Cancer (Fet, Geo, HCT116) باستعمال اختبار MTT فقدر IC_{50} لكل من السلالتين Fet ، Geo بـ- 75µg/ml في حين قدرت بـــ 40 ug/mL بالنسة للسلالة HCT116, وتم تثبيط التضاعف بكبح الدورة الخلوية cell-cycle arrest لكل هذه السلالات , حيث ثبط تضاعف كل من Geo و Fet في الدور G2 وبالنسبة للسلالة HCT116 فقد ثبط الانقسام الخلوي في الدور G1 من طور الراحة)294(.



الشكل 54. مخطط يلخص آلية السمية القلبية لـــ Doxo خٌخٍيفحأثيراته



الشكل 55. آلية مقترحة لتأثير فلافونويدات *Globularia alypum* في الحماية ضد السمية القلبية لـ DOXO



الشكل 56. آلية مقترحة لتثبيط المستخلص المائي لنبتة *Globularia alypum* تضاعف كل من السلالات الخلوية الورمية البشرية Hep-G2 ، HCT-11 .

الإستنتاج و التوصيات

الاستنتـــــاج

رغم ما تتميز به المعالجة الكيميائية المضادة للسرطان من فعالية وكفاءة في النشاط الصيدلاني تجاه الأورام السرطانية فإنها تظهر مفعول تسممي كبير على الخلايا السليمة وهذا راجع لقلة اختياريتها. وتكون تأثيراتها إما غير نوعية حيث تنتج على كل الخلايا ذات التجديد السريع كالخلايا الدموية وخلايا مخاطية الأمعاء وتمارسها معظم أنواع مضادات السرطان أو نوعية و يمارسها مضاد سرطان معين على عضو معين.

إن أسباب هذه السمية غالبا ما يكتنفها الغموض, غير أن تشكيل الجذور الحرة الناتجة عن تحولها الحيوي يعتبر من أهم الآليات المسببة لسميتها من خلال مهاجمتها لمختلف الجزيئات الحيوية للخلية كاليبيدات, الأحماض النووية والبروتينات.

Doxorubicin هو مضاد حيوي سكري من طائفة الأنثراسايكلين Anthracycline يستخدم في العلاج الكيميائي لأنواع عديدة من الأورام السرطانية كسرطان الثدي, سرطان المبيض, سرطان الدم وأنواع أخرى من السرطانات, ومع ذلك فان استخدامه مازال محدودا بسبب سميته القلبية المرتبطة بالجرعة والناتجة أساسا عن تشكيل الجذور الحرة. تسعى الدراسات الحديثة إلى استعمال العديد من المواد الطبيعية المستخلصة من الأعشاب والنباتات الطبية للوقاية من الاضطرابات والتغيرات الوظيفية التي تحدثها المجاميع الجذرية النشطة الناتجة عن استقلاب هذا الدواء, ومن بين هذه المركبات يمكن تحديد الفلافونويدات والتي تشكل قسما معتبرا من الجزيئات البوليفينولية, بحيث تتدخل كمضادات للأكسدة بعدة آليات للتصدي لهجومات المجاميع الجذرية وذلك إما بأسرها والتقاطها, منع تشكلها عن طريق تثبيط الإنزيمات المولدة لها, مخلبة الأيونات المعدنية أو دعم الأنظمة المضادة للأكسدة.

سعت هذه الدراسة إلى إمكانية استغلال فلافونويدات المستخلص البيتانولي للأجزاء الهوائية لنبتة *Globularia alypum* في الوقاية من الجذور الحرة المسببة للسمية القلبية المحرضة بـــ Doxo عند جرذان من سلالة Wistar وهذا بعد إجراء دراسة فيتوكيميائية كمية ونوعية للمستخلص إضافة إلى اختبار نشاطه المضاد للأكسدة على النماذج المخبرية (IN VITRO).

كما سعت هذه الدراسة أيضا إلى تقصي تأثير النشاط المضاد للأورام - Anti-tumor activity - للمستخلص المائي للأجزاء الهوائية لنفس النبات وذلك على ثلاث أنواع مختلفة من سلالات خلوية ورمية بشرية تمثلت في: Hep-G2, HCT-116 ,اخال ا ايسرتلي فيا ت 1301.

أسفرت نتائج الدراسة الفيتوكيميائية للمستخلص البيتانولي عن مايلي:

- غنى المستخلص بمتعددات الفينول والتي من ضمنها الفلافونويدات
- احتواء المستخلص على الفلافونويدات السكرية من صنف الفلافونات والفلافونولات, فلافونويدات مميثلة إضافة إلى أحماض فينولية و كومارينات.

وأظهر اختبار النشاط المضاد للأكسدة IN VITRO فعالية المستخلص البيتانولي في أسر والتقاط الجذور الحرة وهذا من خلال اختبار إرجاع الجذر الحر الثابت °DPPH.

في حين خلصت الدراسة البيولوجية IN VIVO على الجرذان الويستار إلى ما يلي:

- يحرض DOXO بجرعة قدرها 20مغ/كغ تحت الغشاء البريتوني تأثيرات قلبية سامة ظهرت من خلال الارتفاع في مستويات الإنزيمات البلازمية الدالة على التضرر القلبي CPK, LDH و AST اضافة إلى عدة تغيرات نسيجية تمثلت في ظهور فجوات في السيتوبلازم, تنكرز في الألياف العضلية, انتفاخ للميتوكندري إضافة إلى تكثف للأنوية.
- ارتباط السمية القلبية لـــ DOXO بالإجهاد التأكسدي الذي تسببه الجذور الحرة حيث تجلى هذا بوضوح في زيادة معدلات MDA ونقصان مستويات GSH في نسيج القلب.
- نجاعة المستخلص البيتانولي للأجزاء الهوائية لنبتة *Globularia alypum* في وقاية القلب من السمية المستحدثة بـــ DOXO, حيث أثبتت المعالجة المسبقة للجرذان بجرعة من هذا المستخلص قدرها 100مغ/كغ عن طريق الفم ستة أيام في الأسبوع مدة أربع أسابيع في التقليل من التأثيرات السمية لهذا الدواء وذلك من خلال انخفاض في نشاط الإنزيمات البلازمية CPK, LDH و AST المرتفعة, نقصان في معدلات MDA وزيادة في مستويات GSH إضافة إلى تحسين في التغيرات النسيجية.

تبين أن المستخلص المائي لهذه النبتة أدى إلى تثبيط تضاعف السلالة الخلوية الورمية البشرية للكبد Hep-G2 Human hepatocarcinoma cell line حيث قدر التركيز المثبط لتضاعف 50 % - IC_{50} بـ- 43.82 µg/ml في حين كانت قيمة IC_{50} للسلالة الخلوية الورمية البشرية للأمعاء (HCT-116) Colon carcinoma cells أكبر من 100 µg/ml في حين أظهر هذا المستخلص نشاط محفز لتضاعف الخلايا اللمفاوية Lymphostimulatory activity .

نستنتج من ذلك بأن العلاج بالمستخلص البيتانولي لنبتة *Globularia alypum* يمكن أن يحمي من السمية القلبية الحادة لـــ DOXO, وبالتالي قد يكون هذا المستخلص مرشحا مفيدا في العلاج كمرافق لـــ DOXO للحد من الجذور الحرة المسببة للسمية القلبية لهذا الدواء, كما يمكن للمستخلص المائي لنفس النبتة أن يقاوم كل من سرطان الكبد وسرطان الأمعاء.

سمحت دراستنا بإعطاء الآليات المحتملة لوقاية فلافونويدات المستخلص البيتانولي من السمية القلبية لـــ DOXO والتي ارتكزت أساسا على النشاط المضاد للأكسدة لهذه المركبات وهذا من خلال:

- حجز أو مخلبة أيونات الحديد أو ما يعرف بـــ Iron chelation وبالتالي إعاقة تشكيل المعقد $DOXO - Fe^{2+}$ الذي يلعب دور هام في تخليق الجذور الحرة المسببة للآلية السمية.
- أسر الجذور الحرة مثل $O_2^{\cdot -}$, OH° والناتجة عن حلقة الأكسدة والارجاع لـــ DOXO بتدخل عدة إنزيمات وكذا تلك الناتجة عن فوق الأكسدة الليبيدية للأغشية والمتمثلة في جذري الألوكسيل LO° و البيروكسيل LOO° رئيل عبر المنح الهيدروجيني.
- دعم وصيانة الأنظمة المضادة للأكسدة كتدعيم توليد Alpha-Tocophérol(Vit E) وهذا باختزالها لجذر Alpha-TO°, تحريض تخليق جزيئات GSH إ ا ِ ج ت ُ إع ا ش ج ا من جديد بعد أكسدتها إلى GSSG من جهة أخرى.
- تثبيط الفلافونويدات لإنزيم Carbonyl reductase المتواجد في سيتوبلازم الخلايا القلبية والمسؤول على تشكيل مستقلب doxorubicinol الذي يبدي فعل تسممي أعلى من DOXO.

ومن الآليات التي قد تكون سببا في تثبيط تضاعف كل من السلالتين الورميتين Hep-G2 و HCT-116 بالمستخلص المائي نذكر:

- كبح الدورة الخلوية – Cell cycle arrest- في أحد مراحلها.
- تحريض الموت الخلوي المبرمج.

التوصيـــــــات

توصلنا من خلال هذا البحث إلى الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص البيتانولي للأجزاء الهوائية لنبتة *Globularia alypum* على السمية القلبية المستحدثة بـــ Doxo والناتجة أساسا عن تشكيل الجذور الحرة, وهي دراسة تمهيدية تفتح الطريق للعديد من الآفاق التي تساهم بفهم جيد للتأثيرات الواقية الملاحظة أثناء المعاملة المسبقة بهذا المستخلص, فمن المهم إجراء دراسة مكملة ومعمقة تختص بـــ :

- تنقية الفلافونويدات التي قمنا بفصلها في هذه الدراسة من المستخلص البيتانولي (الناتجة عن الفصل بكل من كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة وكروماتوغرافيا الورق) باستعمال كروماتوغرافيا العمود ثم تحديد البنى الكيميائية لها باستعمال مطيافية الأشعة الفوق بنفسجية مطيافية الكتلة ومطيافية الرنين النووي المغناطيسي.

- تحديد الفلافونويد أو الفلافونويدات المسؤولة على الوقاية من السمية القلبية لـــ Doxo مع تحديد الجرعة الفعالة.

- تبيين العلاقة بين بنية الفلافونويد أو الفلافونويدات الفعالة في الوقاية من السمية القلبية لـــ Doxo ونشاطها المضاد للأكسدة)structure – activity relationship(.

- دراسة الحركية الصيدلانية للفلافونويد أو الفلافونويدات الفعالة مع تحديد موقع و آلية تأثيرها على مستوى الخلايا العضلية للقلب.

- دراسة تأثير الفلافونويدات الفعالة على النشاط الصيدلاني لـــ Doxo

بالإضافة إلى كل هذه التوصيات والتي تهدف إلى إيجاد نضام واقي أكثر فعالية فمن الأحسن أن يتم هذا العمل بدراسة نشاط هذه الفلافونويدات المضاد للخلايا السرطانية بحيث يمكن أن يفتح تأثيرها الايجابي المسمم للخلايا السرطانية الطريق إلى استعمالها المستقبلي كعلاج مرافق لـــ Doxo بحيث تساهم في تعزيز نشاط هذا الدواء المضاد للسرطان من جهة وتلغي تأثيراته السامة من جهة أخرى.

- إجراء دراسة فيتوكيميائية على المستخلص المائي لنبات *Globularia alypum*.
- تحديد المواد الفعالة للمستخلص المائي والتي يرجع لها النشاط المضاد للخلايا الورمية.

المراجع

المراجـــــــع

1. **Lahouel M**. Interaction flavonoides-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. *Thése de doctorat de l'université de Mentouri de constantine, Algérie*. 2005; pp 1.

2. **Turner PC, McLennan AG, Bates AD, White MRH**. L'Essentiel en Biologie moleculaire. *Berti éds, Paris*, 1999: 52-329.

3. **Tubiana M**. Généralités sur la cancérogenèse. *C. R. Biologies*. 2008; 331: 114–125.

4. **Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J.** Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry.* , 2004 ; 266: 37–56.

5. **Loft S, Moller P, Cooke MS, Rozalski R, Olinski R**. Antioxidant vitamins and cancer risk: is oxidative damage to DNA a relevant biomarker?. *Eur J Nutr*. 2008; 47: 19–28.

6. **Baguley BC, Kerr DJ.** Anticancer Drug Development**.** *Elsevier Inc*, 2002; 1-11.

7. **Carraz G, Calop J**. Pharmacodynamie spéciale. *Marketing éd*, *Paris*, 1988 : 180-225.

8. **Ginsberg JP, Womer RB**. Preventing organ-specific chemotherapy toxicity. *European Journal of Cancer*. 2005 ; 41: 2690–2700.

9. **Pieri F, Kirkiacharian** S. Pharmacologie et thérapeutique. *Marketing éd, Paris*, 1986 : 457-488.

10. **Elghozi JL, Duval D**. Aide mémoire de pharmacologie. *Flammarion Médecine-Science*, $2^{éme}$ *éd*, *paris*, 1992 : 282-289.

11. **Calabresi P, Robert E, Parks JR**. Alkylating agents, antimetabolites, hormones and other antiprolifeative agents. *In*: the pharmacological basis of therapeutics. Goodman LS, Gilman A, éds. *The Macmillan company,* 4^{th}*edition*, 1970: 1344-1348.

12. **Pinkerton CR, Philip T**. Treatement strategies in paediatric cancer. *Consultant series*.1996; 7: 1-5.

13. **Richard S, Heide V, L'Ecuyer T J.** Molecular basis of anthracycline induced cardiotoxicity. *Heart Metab*. 2007; 35:1–4.

14. **Jain Diwakar**. Cardiotoxicity of doxorubicin and other anthracycline derivatives. *J Nucl Cardiol.* 2000; 7: 53-62.

15. **Petit T**. Toxicité cardiaque des anthracyclines. *Bull Cancer*. 2004 ; 91 : 59-65.

16. **Assiri AMA, Abdel-wahab AFI**. Carnosine protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2003; 11: 23-31.

17. **Kaneshiro T, Suzui M, Takamatsu R, Murakami A, Ohigashi H, Fujino T, Yoshimi N.** Growth Inhibitory Activities of Crude Extracts Obtained from Herbal Plants in the Ryukyu Islands on Several Human Colon Carcinoma Cell Lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2005; 6 : 353-358.

18. **Gol'dberg ED, Amosova EN, Zueva EP, Razina TG, Krylova SG, Reikhart DV.** Effects of Extracts from Medicinal Plants on the Development of Metastatic Process. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2004; 3: 288- 294.

19.**Saetung A, Itharat A, Dechsukum C, Wattanapiromsakul C, Keawpradub N, Ratanasuwan P.** Cytotoxic activity of Thai medicinal plants for cancer treatment. *J. Sci. Technol.* 2005; 27: 469-478.

20. **Ait Mbarek L, Ait Mouse H, Elabbadi N, Bensalah M, Gamouh A, Aboufatima R, Benharref A, Chait A, Kamal M, Dalal A, Zyad A**. Anti-tumor properties of blackseed(*Nigella sativa* L.) extracts. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2007; 1-9.

21. **Bommu P, Nanjan CMJ, Joghee MN, Nataraj SM, Bhojraj S**. *Phyllanthus maderaspatensis*, a dietary supplement for the amelioration of adriamycin-induced toxicity and oxidative stress in mice. *J Nat Med*. 2008; 62: 149-154.

22. **Singh G, Singh AT, Abraham A, Bhat B, Mukherjee A, Verma R, Agarwal SK, Jha S, Mukherjee R, Burman AC**. Protective effects of *Terminalia arjuna* against doxorubicin induced cardiotoxiciy. *Jounal of Ethnopharmacology*. 2008; 1-26.

23**. Halliwell B**. Reactive oxygen species in living systems : source, biochemistry and role in human disease.*Am.j.Med.* 1991; 14-22.

24. **Es-Safi NE, Kollmann A, Khlifi S, Ducrot PH.** Antioxidative effect of compounds isolated from Globularia alypum L. structure–activity relationship. *LWT.* 2007; 40 : 1246–1252.

25. **Wu D, Cederbaum AI**, Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. *Alcohol Research & Health.* 2003; 27: 277-284.

26. **Allen RG, Ballin AK**. Oxidative influence on development and differenciation on overview of free radical theory development. *Free.Radic.Biol.Med*. 1989; 6: 631-661.

27. **Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M**. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological interaction*. 2006; 160: 1-40.

28. **Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA**. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 2007; 1-13.

29. **Comhair SAA, Erzurum SC**. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002; 283:246-255.

30. **Bulger EM, Maier RV**. Antioxidant in critical illness. *Arch Surrg*. 2001; 136: 1201-1207.

31**. Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, Defraigne JO**. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et metabolism.* 2002; 16: 233–239.

32. **Sorg O.** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?. *C. R. Biologies.* 2004; 327: 649–662.

33**. Trilling JS, Jaber R**. Selections from current literature : the role of free radicals and antioxidants in disease. *Fam. Pract*. 13: 322-326.

34. **Hwang ES, Kim GH**. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins *in vitro* and *in vivo* cancer research. *Toxicology*. 2007 ; 229 : 1-10.

35. **Cai H, Harrison DG**. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. *Circ. Res.* 2000; 87: 840-844.

36. **Younes M.** Free radicals and Reactive Oxygen Species**.** *Toxicology*.1999; 111-125.

37. **Sikka SC.** Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience.*1996; 1: 78-86.

38. **Aruoma OI,** Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. *JAOCS*. 1998 ; 75 : 199-212.

39. **Ré DB, Nafia I, Nieoullon A, Le Goff LK, Had-Aissouni L**. Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate ? Implications sur la survie neuronale. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation.*2005; 24 : 502-509.

40**. Fontaine E, Barnoud D, Schwebel C, Leverve X**. Place des anti-oxydants dans la nutrition du patient septique**.** *Réanimation*. 2002 ; 11 : 411-20.

41. **Kohen R, Nyska A.** Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*. 2002; 620-650.

42. **Stark G**. Functional Consequences of Oxidative Membrane Damage. *J. Membrane Biol.* 2005 ; 205 : 1-16.

43. **Genestra M**. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signalling.* 2007; 19: 1807-1819.

44. **Gardès-Albert M, Rousselot DB, Abedinzadeh Z, Jore D.** Comment l'oxygène peut-il devenir toxique *?. l'actualité chimique*. 2003 ; 91-96.

45. **Ramonatxo CK**. Oxygène, stress oxydant et supplémentations antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*. 2006; 20: 165-177.

46. **Al-Omar MA, Beedham C, Alsarra IA.** Pathological role o reactive oxygen species and their defence mechanisms**.** *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2004; 12: 1-18.

47. **Servais S**, Altération mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : Effet de l'age et d'une supplémentation en oméga-3. *Thése de doctorat de l'université de Claude Bernard-lyon 1, France.* 2004*;* pp 19-35.

48**. Haton C**, Effets des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale. *Thése de doctorat de l'université de paris VI, France.*2005 ; pp43-58.

49. **Xia Y, Tasai AL, Berka V. Zweier JL**. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A ca^{2+}/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem*. 1998; 273: 25804-25808.

50. **Hill MF**. Role of oxidative stress in heart failure subsequent to myocardial infraction. *Thesi of doctor of philosophy of the University of Manitoba, Canada*. 1998; pp 24.29.

51**. Turrens JF**. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2003 ; 552.2 : 335-344.

52**. Schrder P, Krutmann J**. Environmental Oxidative Stress Environmental Sources of ROS. *The Handbook of Environmental Chemistry.* 2005 ; 2 :19-31.

53. **Sasaki Y**. Does oxidative stress participate in the development of hepatocellular carcinoma?. *J Gastroenterol* . 2006; 41:1135–1148.

54. **Sas K, Robotka H, Toldi J, Vécsei L**. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *Neurological Sciences*. 2007 ; 257 : 221–239.

55. **Fariss MW, Chan CB, Patel M , Houten BV, Orrenius S.** Role of Mitochondria in Toxic oxidative stress. *Molecular Interventions*. 2005; 5: 94- 111.

56. **Andreyev AY, Kushnareava YE, Starkov AA**. Mitochondrial Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Biochemistry*. 2005; 70: 246-264.

57. **Aurousseau B**. les radicaux libres dans l'organisme des animaux D'élevage : Conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Prod*. 2002 ; 15 : 67-82.

58. **Rahman I, Morrisson D, Donaldson K, Maccnee W**. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. Am. J. Respir. Crit. *Care Med*. 1996; 154: 1055-1060.

59. **Szasz T, Thakali K**, Fink GD, Watts SW. A Comparison of Arteries and Veins in Oxidative Stress: Producers, Destroyers, Function, and Disease. *Experimental Biology and Medicine.* 2007; 27- 37.

60. **Favier A,** Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *l'actualité chimique*. 2003 ; 108-115.
61. **Gardner RR**. Aconitase.Sensitive target and measure of superoxide. *Meth Enzymol*. 2002 ; 349 : 9-23.

62. **Halliwell B, Gutteridge JM**. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys*.1986; 246: 501-514.

63. **Soares AF**. Effets du stress oxidant sur le fonctionnement des adipocytes : Adiponectine et prostaglandines. *Thése de doctorat de institut national des sciences appliquées de lyon.* 2005 ; pp35-36.

64. **Singh RP, Sharad S, Kapur S**. Free Radicals and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Relevance of Dietary Antioxidants. *JIACM.* 2004; 5(3): 218-25.

65. **Boots AW, Haenen GRMM, Bast A**. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European journal of pharmacology*. 2008; 585: 325-337.

66. **Min K, Ebeler SE**. Flavonoid efects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46: 96-104.

67. **Brunet S.** Vue sur les mécanismes de contrôle du cholestérol hépatique suite au stress peroxidatif induit par le fer. *Thése de doctorat de l'université de Montréal canada.*1999 ; pp4-24.

68. **Pre J**. Lipid peroxidation.*Path Biol*.1991 ; 39 : 716-736.

69. **Bertrand F**. Le vieillissement moléculaire et cellulaire et ses futures enjeux. *Actualité Chimique*.2003 ; Review.

70. **Friguet B, Szwed LI**. Inhibition of the multicatalytique proteinase (protéasome) by 4-hydroxyl-2-nonenal-Gross linked protein. *FEBS Lett*.1997; 405: 21.

71. **Hengarther NO**. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000; 407: 770-776.

72**. Vaux DL**, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell*; 1999; 96: 245-54.

73. **Heistad D D**. Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26: 689-695.

74. **Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM.** Are Oxidative Stress_Activated Signaling Pathways Mediators of Insulin Resistance and β −Cell Dysfunction?. *DIABETES.* 2003; 52 :1-8.

75. **Clark SF**. The Biochemistry of Antioxidants Revisited. *Nutr Clin Pract.* 2002; 17 : 5-17.

76. **Suntres ZE**, **Omri A**. The role of liposomal antioxidants in oxidative stress. *Frontiers of Nanotherapy.* 2006 ; 191–205.

77**. Scandalis JG**. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res*. 2005; 38(7): 995-1014.

78. **Scandalis JG**. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant physiol*. 1993; 101: 7-12.

79. **Georgeson GD, Szony BJ, Streitman K, Varga ISz, Kovacs A, Kovacs L, Laszlo A.** Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via caesarean section. *European Gournal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. 2002; 103: 136-139.

80**. Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P**. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*. 2007; 46: 244-282.

81. **Annabi BA, Nehdi A, Hajjaji N, Gharbi N, El-Fazaa S**. Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead. *Comptes Rendus Biologies*. 2007; 330: 581-588.

82. **Maggi-Capeyron MF, Cases J, Badia E, Cristol JP, Rouanet JM, Besançon P, Leger CL**, **Descomps B**. A diet high in cholesterol and deficient in vitamin E induces lipid peroxidation but does not enhance antioxidant enzyme expression in rat liver. *Journal Of Nutritional Biochemistry*. 2002; 13: 296-301.

83. **Menvielle-Bourg FJ**. La superoxyde dismutase, puissant antioxydant naturel, désormais disponible par voie orale. *Phytothérapie.* 2005; 3: 118-121.

84. **Cossette C.** Role de la glutathion peroxydase dans la réponse cellulaire aux rayons ultraviolets B**.** *Thése pour l'obtention du grade de maître des sciences de l'université de Laval canada.* 1997; *PP 23-25.*

85**. Ho YS, Xiong Y, M a W, Spector A, Ho DS**. Mice laking catalase developed normally but slow differencial sensitivity to oxidant tissue injuy. *J Biol Chem*. 2004; 297: 32804-32812.

86. **Jannuel C**. Stress oxydant au niveau des plaquettes sanguines Humaines dans le contexte du diabete, Etude du glutathion et de la glutathion peroxidase. *Thése de doctorat,Institut National des sciences Appliquées de Lyon.* 2003; PP 41.57.

87. **Stehbens WE**. Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc. *Experimental and Molecular Pathology*. 2003; 75: 265-276.

88**. Williamson G**, Plumb GW, Uda Y, Price KR, Rhodes MJC. Dietary quercetin glycosides: antioxidant activity and induction of the anticarcinogenic phase II marker enzyme quinine reductase in Hepal clc 7cells. *Carcinogenesis*. 1996; 17: 2385-2387.

89. **Scheibmeir HD, Christensen K, Whitaker SH, Jegaethesan J, Clancy R, Pierce JD.** A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive and Critical Care Nursing*. 2005; 21: 24-28.

90. **Peter N, Campbell A, Anthony D**. Biochimie illustrée. *Maloine éd*, 2002 : 213-238.

91. **Mialocq P, Oiry J, Puy JY, Riamaniol AC, Imbach JL, Dormont D, Clayette P.** Métabolisme oxydatif dans les macrophages infectés par le VIH: role du glutathione et approche pharrmacologique. *Pathol. Biol*. 2001; 49 : 567-571.

92. **De Ann J, Liska.** The detoxification Enzyme systems. *Alternative medicine Review*.2001; 3: 187-198.

93. **Gasdaska GR, Kirkpatrick DL, Montfort W, Kuperus M, Hill SR, Berggren M, Powis G**. Oxidative inactivation of thioredoxin as a cellular growth factor and protection by a Cys7 Ser mutation. *Biochem Pharmacol*. 1996 ; 5 : 1741-1747.

94. **Haton C**. Effets des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale. *Thése de doctorat de l'université paris VI.* 2005 ; pp 43-58.

95. **Watson WH, Yang X, Eun Choi Y, Jones DP, Kehrer JP**. Thioredoxin and Its Role in Toxicology. *Toxicological sciences*. 2004; 78: 3-14.

96. **Cotgreave IA.** Stress response. *Toxicology in Vitro*. 1998; 12: 569-573.

97. **May JM, Mendiratta S, Hill KE, Burk RF**. Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase. *J Biol Chem*. 1997; 272: 22607-22610.

98. **Raja S, Nazeer Ahamed KFH, Kumar V, Kakali M, Bandyopadhyay A, Pulok KM.** Antioxidant effect of Cytisus scoparius against carbon tetrachloride treated liver injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; 109: 41-47.

99. **Alexandrova ML, Bochev PG**. Oxidative stress during the chronic phase after stroke. *Free Radical Biology & Medicine*. 2005; 39: 297 – 316.

100. **Atanasiu RL.** Etude du mecanisme de cardioprotection de la Ceruloplasmine. *Thèse du grade de Philosophiae Doctor de l'université de Montréal*. 1996 ; pp

101. **Ishige K, Schubert D, Sagara Y**. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic. Biol.Med*. 2001; 30: 433-446.

102. **Marfak A**. Radiolyse gamma des flavonoides : Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation des depsides. *Thése de doctorat de l'université de Limoges. 2003 ; 30-35.*

103. **Halliwell B**. Free Radical and antioxidants: apersonal view. *Nutr Rev*. 1994; 52: 253-265.

104. **Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J**. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2004; 266: 37–56.

105. **Béliveau R, Gingras D.** Role of nutrition in preventing cancer. *Can Fam Physician*. 2007; 53:1905-1911.

106. **Yaker A**. Cancérologie générale. Anatomie pathologique. *Office des publications universitaires*, Alger, 1983; 17-63.

107. **Mena S, Ortega A, Estrela JM**. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutation Research.* 2009; 674 :36–44.

108**. Christian M**. Biologie moléculaire. Biochimie des communications cellulaires. *de boeck éd*, 2005 ; 283-295.

109. **Bont RD, Larebeke NV**. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*. 2004 ; 19(3) : 169-185.

110. **Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J**. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 2004; 266: 37-56.

111. **Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec G**. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal.* 2003; 17: 1195- 1214.

112**. Miller JA, Miller EC**. Natural and Synthetic Chemical Carcinogens in the Etiology of Cancer. *Cancer Research*. 1965; 25: 1292- 1304.

113. **Kakizoe T.** Chemoprevention of Cancer – Focusing on Clinical Trials. *Jpn J Clin Oncol* 2003; 33(9): 421–442.

114. **Berwick M, Schantz S.** Chemoprevention of aerodigestive cancer. *Cancer and Metastasis Reviews.* 1997; 16: 329–347.

115. **Zur Hausen H**. Viruses in human cancers. *Science*. 1991; 254 (5035): 1167-1173.

116. **Franceschi S**. Strategies to reduce the risk of virus-related cancers. *Annals of Oncology*. 2000; 11: 1091-1096.

117. **Peter S, Beglinger C**. "Helicobacter pylori and gastric cancer: the causal relationship. *Digestion.* 2007; 75(1): 35-25.

118. **Kim GJ, Chandrasekaran K, Morgan WF**. Mitochondrial dysfunction, persistently elevated levels of reactive oxygen species and radiation-induced genomic instability. *Mutagenesis*. 2006 ; 21(6) : 361–368.

119. **Fisher B**. From Halsted to prevention and beyond: advances in the management of breast cancer during the twentieth century . *Eur J Cancer*.1999; 73: (14); 1963-1973

120. **Scotté F, colonna P, Andrieu JM**. Cancérologie. *Ellipses éd, Paris*, 2002; 72-93.

121. **Quiles JL, Huerta JR, Battino M, Mataix J, Ramirez-Tortosa MC**. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology*. 2002; 180: 79-95.

122. **Zhou Q, Chowbay B**. Determination of doxorubicin and its metabolites in rat serum and bile by LC: application to preclinical pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002 ; 30 : 1063-1074.

123**. Maluf FC, Spriggs D**. Anthracyclines in the Treatment of Gynecologic Malignancies. *Gynecologic Oncology* .2002; 85: 18-31.

124. **Outomuro D, Grana DR, Azzato F, Milei J**. Adriamycin-induced myocardial toxicity: New solutions for an old problem. *International journal o cardiology*. 2007; 117: 6-15.

125. **Association Française des Enseignants de chimie thérapeutique (AFECT)**. Médicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers.*Technique and Documentation éd, paris*, 2004 ; 363.397.

126. **Abidli N.** effect of verapamil on resistance to doxorubicin in mice bearing Ehrlich Ascites Carcinoma cells.Its influence on dox-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity. *Thése de doctorat de l'université de Mentouri de constantine, Algérie*. 2004 ; pp : 28-39.

127. **Hand KR**. Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biocimica et Biopysica Acta*.1998; 1400: 173-184.

128. **Chen Y, Jungsuwadee P, Vore M, Butterfield DA, Clair DKS.** Collateral Damage in cancer Chemoterapy: Oxidative stress in Nontargeted Tissues. *Molecular interventions*. 2007; 7 (3): 147-156.

129. **Uchegbu IF, double JA, Turton JA, Florence AT**. Distribution, Metabolism and Tumoricidal Activity of Doxorubicin Administred in Sorbitan Monostearate (Span60) Niosomes in the Mouse. *Pharmaceutical Research*. 1995; 12(7): 1019-1024.

130. **Li T**. Early changes in myocardial antioxidant enzymes due to adriamycin and modulation by probucol. *Thesis of doctor of philosophy of the University of Manitoba, Canada. 2000; pp: 4-6.*

131. **Gambliel HA, Burke BE, Cusack BJ, Walsh GM, Zhang YL, Mushlin PS, Olson RD**. Doxorubicin and C-13 Deoxydoxorubicin Effects on Ryanodine Receptor Gene Expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002 ; 291 : 433-438.

132. **Mross K, Mayer U, Hamm K, Burk K, Hossfeld DK**. Pharmacokinetics and metabolism of iodo-doxorubicin and doxorubicin in humans. *EurJ Clin Pharmacol*. 1990 ; 39 : 507-513.

133. **Fajardo G, Bernstein D**. Endocannabinoid Inhibition A New Cardioprotective Strategy against Doxorubicin Cardiotoxicity. *American College of Cardiology Foundation*. 2007 ; 50 (6) : 537-539.

134. **Hames BD, Hooper NM, Houghton JD**. L'essentiel en biochimie. *Berti éds*. 1999: 155-160.

135. **Jiang B, Zhang L, Li M, Wu W, yang M, Wang J, Guo D**. Salvianolic acids prevent acute doxorubicin cardiotoxicity in mice through suppression of oxidative stress. *Food and chemical toxicology*. 2008; 46: 1510-1515.

136. **Jain D.** Cardiotoxicity of doxorubicin and other anthracycline derivatives. *Nuclear cardiology*. 2000; 7:53-62.

137. **Mitra MS, Donthamsetty S, White B, Latendresse JR, Mehendale HM**. Mechanism of protection of moderately diet restricted rats against doxorubicin-induced acute cardiotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2007; 90-101.

138. **Liu X**. Protection of Pifithrin-α and Melatonin against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Thesis of doctor of philosophy. East Tennessee State University.* 2003; pp: 13-24.

139. **Green PS, Leeuwenburgh C**. Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicin- induced apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2002; 1588: 94-101.

140**. Ichihara S, Yamada Y, Kawai Y, Osawa T, Furuhashi K, Duan Z, Ichihara G**. Roles of oxidative stress and Akt signaling in doxorubicin cardiotoxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007; 359: 27-33.

141. **DeAtley SM, Aksenov MY, Aksenova MV, Jordan B**, Carney JM, Butterfield DA. Adriamycin-induced changes of creatine kinase activity in vivo and in cardiomyocyte culture. *Toxicology*. 1999; 134: 51–62.

142. **Den Hartog GJM, Haenen GRMM, Boven E, van der Vijgh WGF, Bast A**. Lecithinized copper,zinc-superoxide dismutase as a protector against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2004; 194: 80-188.

143. **Liu X, Chen Z, Chua CC, Ma YS, Youngberg GA, Hamdy R, Chua BHL.** Melatonin as an effective protector against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 283: 254-263.

144. **Xu X, Persson HL, Richardson DR**. Molecular Pharmacology of the Interaction of Anthracyclines with Iron. *Mol Pharmacol*. 2005 ; 68 : 261-271.

145. **Kelishomi RB, Ejtemaeemehr S, Tavangar SM, Rahimian R, Mobarakeh JI**, Dehpour AR. Morphine is protective against doxorubicin- induced cardiotoxicity. *Toxicology*. 2008; 243: 96-104.

146. **Al-Nasser IA**. In vivo prevention of adriamycin cardiotoxicity by cyclosporin A or FK 506. Toxicology. 1998; 131: 175-181.

147. **Vander Heide RS, L'Ecuyer TJ**. Molecular basis of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Heart Metab*. 2007; 35:1-4.

148. **Tokarska-Schlattner M, Zaugg M, Zuppinger C, Wallimann T, Schlattner U**. New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: The critical role of cellular energetic. *Journal o Molecular and Cellular cardiology*. 2006; 41: 389-405.

149. **Singhal PK, Iliskovic N, Li T, Kumar D**. Adriamycin cardiomyopathy : pathophysiology and prevention. *FASEB J*. 1997; 11: 931-6.

150. **Al-Bekairi AM, Osman AMM, Hafeez MA, Al-Gharably NM, Al-Shabanah OA, Al-Harbi MM**. Effect of desferrioxamine on the hepatotoxicity of adriamycin in normal Mice. *Drug development research*. 1993; 29: 56-62.

151**. Cao Y, Kennedy R, Klimberg VS**. Glutamine protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Journal of Surgical Research*. 1999; 85: 178-182.

152. **Dziegiel P, Jethon Z, Suder E, Sopel M, Rabczynski J, Surowiak p, Zable M**. Role of exogenous melatonin in reducing the cardiotoxic effect of daunorubicin and doxorubicin in the rat. *Exp Toxic Pathol*. 2002; 53: 433-439.

153. **Oliveira PJ, Bjork JA, Santos MS, Leino RL, Froberg MK, Moreno AJ, Wallace KB.** Carvedilol-mediated antioxidant protection against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2004; 200: 159-168.

154. **Chakrabarti KB, Hopewel JW, Wilding D, Plowman PN**. Modification of doxorubicin-induced cardiotoxicity: effect of essential fatty acids and ICRF-187(dexrazoxane). *European Journal of cancer*. 2001; 37: 1435-1442.

155. **Beillerot A, Rodriguez Dominguez JC. Kirsch G, Bagrel D**. Synthesis and protective effects of coumarin derivatives against oxidative stress induced by doxorubicin. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*. 2008; 1-4.

156. **Andrieu-Abadie N, Levade T, Laurent G, Hatem S, Mercadier J**. Le céramide à l'origine de la cardiotoxicité de la doxorubicin?. *Médecine/sciences*. 1999 ; 15 : 1322-4.

157. **Arnolda L, Mc Grath B, Cocks M, Sumithran E, johnston C**. Adriamycin cardiomyopathy in the rabbit an animal model of low output cardiac failure with activation of vasoconstrictor mechanisms. *Cardiovasc. Rec*. 1985; 19: 378-382.

158. **Olson RD, Mushlin PS, Brenner DE, Fleischer C, change BK, bancek RJ**. Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*. 1988; 85: 3585-3589.

159. **Barnabé N, Zastre JA, Venkataram S, Hasinoff BB**. Deferiprone protects against doxorubicin-induced myocyte cytotoxicity. *Free radical biology and Medicine*. 2002; 33 (2): 266-275.

160. **Goormaghtigh E, Ruysschaert J-M**. 1984. Role of the cardiolipin-adriamycin complex in mitochondrial toxicity. *Colloids and Surfaces*. 1984; 10: 239-247.

161. **Jackson TL**. Intracellular accumulation and mechanism of action of doxorubicin in a spatio-temporal tumor model. *j. theor.biol*. 2003; 220: 201-213.

162. **Mizutani H, Toda-oikawa S, Hiraku Y, Kojma M, Kawanishi S**. Mechanisme of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sciences*. 2005; 76: 1439-1453.

163. **Han X, Ren D, Fan P, Shen T, Lou H**. Protective effects of naringenin-7-O- glucoside on doxorubicin-induced apoptosis in H9C2 cells. *European journal of pharmacology*. 2008; 581: 47-53.

164. **Hodek P, Trefil P, Stibovora M**. Flavonoids- potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes. *Chem.biol.interact*. 2002; 139: 1-21.

165. **Fioruccis S.** Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes : Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. *Thése de doctorat de l'université de Nice –Sophia Antipolis*. 2006 ; pp : 14-29.

166. **Mabry TJ, Thomas MB, Markham KR**. The systhematic identification of flavonoids. *Springer-Verlag, Berlin éds*. 1970; pp:13.

167. **Bruneton J**. Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales (3^{éme} édition). *Tec & Doc Lavoisier éds, Paris*, 1999 : 1120.

168. **Harborne JB**. The flavonoids. Tome I, *Academic press*, London, 1975.

169**. Sanni C, Sauvin H**. les couleurs des Fleurs et des fruits, Anthocyannes et flavones. *Editeurs du museum, Paris*, 1952 : 220.

170. **Jurd L, Horowitz L.Spectral.** properties of flavonoid compounds. In Gers sman, T. T., the chemistry of the flavonoids. *Editeur Pergaman Press Oxord*, 1962: 107.

171.**Milane H**. La quercetine et ses derives: molecules à caractére pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; etude et applications thérapeutiques. *Thése de doctorat de l'université de louis pasteur, Strasbourg I*. 2004 ; pp : 22-36.

172. **R- Geyon JB**. The phenolic Compounds of vegetals. *Dunod éds, paris*, 1968.

173. **Harborne JB**. Flavonoids in phytochemistry. Lawrence, p.L. Litton Educational *Publishing inc éds*, 1973; 344.

174. **Harborne JB. Williams CA**. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 2000; 55: 481-504.

175. **Mc.Lure JW**. Physiology and Fonction of flavonoids. *Chapmann and Hall éds*, *London*, 1975: 970-1055.

176. **Pourcel L, Routaboul JM, Cheynier V, Lepiniec L, Debeaujon I**. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *TRENDS in Plant Science*. 2006 ; 12 (1) : 29-36.

177. **Winkel-Shirley B**. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*. 2002; 5:218–223.

178. **Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC**. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev*. 2000, 52 : 673-571.

179. **Rice-Evans CA**, Miller NJ, Paganga G. Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acid. *Free Radical Biology & Medicine*. 1996 ; 20(7): 933-956.

180. **Bruneton J**. Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales (2ème édition). *Tec & Doc Lavoisier éds, Paris*, 1993: 200-311.

181. **Duarte J, Perez-Vizcaino F, Jimenez J, Tamarago J, Zarzuelo A**. Flavonoids and cardiovascular diseases. *Studies in Natural Products Chemistr.* 2001 ; 25 : 565-605.

182**. Dragan A, Dusanka D-A, Drago B, Nenad T**. Structure-radical scavenging activity relationships of flavooids. *Croat. Chem.Acta*. 2003; 76(1): 55-61.

183. **Harborn JB**. Phytochemical methods, a guide to modern techniques of plant analisis. (2ème édition).*Chapman and Hall eds*, 1984: 37-85.

184. **Jensen SR**. Franzyk H, Wallander W. *Phytochemistry*. 2002; 60: 213-231.

185. **Vermerris W, Nicholson R**. Phenolic compound biochemistry. *Springer* , 2006 : 7-15.

186**. Jurd L, Horowitz L**. Spectral properties of flavonoid compounds. In Geissman, T.T., the chemistry of flavonoids. *Editeur Pergaman Press Oxford*. 1962: 107.

187. **Harborne JB**. In biology and chemistry of compositae. 1977. *Heywood*, V. H.

188. **Metodiewa D, Jaiswal AK, Cenas N, Dickancaite E, Segura-Aguilar J**. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radical Biol. Med.* 1999**;** 26(1-2): 107-116.

189. **Awad HM, Boersma MG, Vervoort J, Rietjens IM C M.** Peroxidase-Catalyzed Formation of Quercetin Quinone Methide-Glutathione Adducts. *Arch. Biochem. Biophys.* 2000; **378**(2): 224-233.

190. **Van der Woude H, Alink GM, Van Rossum BEJ, Walle K, Van Steeg H, Walle T, Rietjens IMCM.** Formation of Transient Covalent Protein and DNA Adducts by Quercetin in Cells with and without Oxidative Enzyme Activity. *Chem. Res. Toxicol.* 2005**; 18**(12):1907-1916.

191. **Galati G, Chan T, Wu B, O'Brien PJ**. Glutathione-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species by the Peroxidase-Catalyzed Redox Cycling of Flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.* 1999 **;** 12(6) : 521-525.

192. **Awad HM, Boersma MG, Boeren S, van der Woude H, van Zanden J, van Bladeren PJ, Vervoort J, Rietjens IMCM**. Identification of o-quinone/quinone methide metabolites of quercetin in a cellular in vitro system. *FEBS Lett.* 2002**;** 520(1-3): 30-34.

193. **Awad HM, Boersma MG, Boeren S, Van Bladeren PJ, Vervoort J, Rietjens IMCM.** The Regioselectivity of Glutathione Adduct Formation with Flavonoid Quinone/Quinone Methides Is pH-Dependent. *Chem. Res. Toxicol.* 2002 **;** 15(3) : 343-351.

194. **Awad HM, Boersma MG, Boeren S, Van Bladeren PJ, Vervoort J, Rietjens IMCM.** Quenching of Quercetin Quinone/Quinone Methides by Different Thiolate Scavengers: Stability and Reversibility of Conjugate Formation. *Chem. Res. Toxicol.* 2003 **;** 16(7) : 822-831.

195. **Borbulevych OY, Jankun J, Selman SH, Skrzypczak-Jankun E**. Lipoxygenase interactions with natural flavonoid, quercetin, reveal a complex with protocatechuic acid in its X-ray structure at 2.1 A resolution. *Proteins*. 2004**;** 54(1): 13-19.

196. **Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S.** The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med*. 1994 ; 16: 845-850.

197. **Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van-Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D**. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod*. 1998 ; 61: 71-76.

198. **Landolfi R, Mower RL, Steiner M**. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. *Biochem Pharmacol*. 1984 ; 33:1525-1530.

199. **Morris CJ, Earl JR, Trenam CW, Blake DR**. Reactive oxygen species and iron--a dangerous partnership in inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. **1995**, 27: 109-122.

200. **Brown J E, Khodr H, Hider RC, Rice-Evans C**. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu2+ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem. J*. 1998; 330 : 1173-1178.

201. **Van Acker SABE, van den Berg DJ, Tromp MNJL, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJF, Bast A**. Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.* 1996; 20: 331-342.

202. **Davis BD**. Advanced in enzymology. 1955; 16:227.

203. **Richtre G**. Métabolisme des végétaux (physiologie et biochimie). *Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne*. 1993.

204. **Grise bach**. In chemistry and biochemistry of plant pigments. *T.W. Godd Win Editeur Academic Press, New York*. 1965.

205. **Harborne JB**. Comparative biochemistry of the flavonoids. *Editeur Academic press London*. 1967.

206. **Havsteen BH**. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*. 2002; 96: 67– 202.

207. **Obermeier MT, White RE, Yang CS.** Effects of bioflavonoids on hepatic P450 activities. *Pharm. Res.*1995; 25(6): 575-84.

208. **Spedding G, Ratty A, Middleton E. J**. Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. *Antivir. Res.* 1989; 12(2) : 99-110.

209. **Ono K, Nakane H, Fukushima M, Chermann JC, Barre-Sinoussi F**. Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *Eur. J. Biochem.* 1990; 190(3): 469-76.

210. **Ono K, Nakane H**. Mechanisms of inhibition of various cellular DNA and RNA polymerases by several flavonoids. *J. Biochem.* 1990; 108(4) : 609-13.

211. **Mahmood N, Pizza C, Aquino R, De Tommasi N, Piacente S, Colman S, Burke A, Hay A J**. Inhibition of HIV infection by flavanoids. *Antivir. Res.* 1993; 46(7): 1257-71.

212. **Ohemeng K A, Schwender C F, Fu K P, Barrett J F**. DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1993; 3(2): 225-30.

213. **Sato M, Tsuchiya H, Takase I, Kureshiro H, Tanigaki S, Iinuma M**. Antibacterial activity of flavanone isolated from Sophora exigua against methicillin-resistant Staphylococcus aureus and its combination with antibiotics. *Phytother. Res.* 1995; 9(7): 509-12.

214. **Mila I, Scalbert A**. Tannin antimicrobial properties through iron deprivation: a new hypothesis. *International Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance.* 1994; 381(2): 749-755**.**

215. **Hollman PCH, Katan MB.** Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Arch. Toxicol.suppl.* 1998; 25:237-239.

216. **Manach C, Regerat F, Texier O, Agullo G, Demigne C, Remesy C**. Bioavailability, Metabolism and physiological impact of 4- oxo-Flavonoids. *Nutrition Research*. 1996; 16(3): 517-544.

217. **Milde J, Elsttner EF, Grabmann J**. Synergistic inhibition of Low-density lipoprotein oxidation by rutin, terpinene, and ascorbic acid. *Phytomedicine.* 2004; 11: 105-113.

218. **Hollman PCH, De Vries JHM, van Leeuwen SD, Mengelers MJB, Hatan MB**. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in health ileostomy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr*. 1995; 62: 1276-1280.

219. **Hollman PCH, Bijsman MN, Van- Gameren V, Gnossen EP, De Vries JHM, Hatan MB.** The suguar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoids glycosides in man. *Free radic Res*.1999; 31: 569-573.

220. **Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L.** Polyphenols: Sources and Bioavailability. *Amj Chin Nutr*. 2004; 79(5): 727-747.

221. **Day AJ, Dupont MS, Ridley S, Rhodes MTC, Morgan MRA, Williamson G.** Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beter glucosidase activity. *FERS Lett*. 1998; 436: 71-75.

222. **Manach C, Morand C, Demigne C, Texier O, Regerat F, Remesy C.** Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FERS Lett.* 1997; 409: 12-16.

223. **Williams RL, Spencer JP, Rice-Evans C**. Flavonoids: Antioxidants or signaling molecules. *Free Radic Biol Med*. 2004; 36(7): 838-849.

224. **Nijveldt RJ, Nood EV, EC van Hoorn D, Boelens PG, Norren KV, Leeuwen PAV**. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* 2001; 74:418–25.

225**. Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F**. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Review. *Life Sci*. 1999 ; 65: 337-53.

226. **Landolfi R, Mower RL, Steiner M**. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. *Biochem Pharmacol*. 1984 ; 33:1525-1530.

227. **Lin CM, Chen CS, Chen CT, Liang YC, Lin JK**. Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002 ; 294(1) :167-172.

228 **Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ**. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structur-activity relationships. *Nutrition Biochemistry.* 2002; 13: 572-584.

229. **Le Marchand L**. Cancer preventive effects of flavonoids-a review. *Biomed Pharmacother*. 2002; 56 : 296–301.

230**. Gaussen H**, Leroy HF. Précis de botanique (Végétaux supérieures), 2ème édition, 1982 : 412.

231. **Quezel P, Santa S**. Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques et méridionales, tomeII. *CNRS, Paris*, 1963 : 860.

232. **Boutiti A**. Etude Phytochimique de l'espèce Globularia alypum. Thése de Magister de *l'université de Mentouri de constantine, Algérie*. 2006 ; 30-54.

233. **Khlifi S, El Hachimi Y, Khalil A, Es-Safi N, El Abbouyi A**. In vitro antioxidant effect of Globularia alypum hydromethanolic extract. *Indian J Pharmacol*. 2005; 37(4): 227-231.

234. **Elbetieha A, Oran SA, Alkofahi A, Darmani H, Raies AM**. Fetotoxic potentials of *Globularia arabica* and *Globularia alypum* (Globulariaceae) in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000 ; 72 : 215-219.

235. **Es-Safi N, Kollmann A, Khlifi S, Ducrot PH**. Antioxidative effect of compounds isolated from Globularia alypum L. structure–activity relationship. *LWT*. 2007; 40: 1246–1252.

236. **Es-Safi N, Khlifi S, Kollmann A, Kerhoas L, El Abbouyi A, Ducrot PH**. Iridoid glucosides from the aerial parts of Globularia alypum L. (Globulariaceae). *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2006; 54(1):85-8.

237**. Sanchez JV**, Anales soc. *Espan. Fis quim*. 1933 ; 31 : 361-3.

238. **Bernard P, Lallemand MM, Blansard G**. plantes médicinales et phytothérapie. 1974 ; 8(3) : 174-179.

239. **Chaudhuri RK, Sticher O**, **winker T**. *Tetrahedron Lett*. 1979. 34: 3149-3152.

240. **Chaudhuri RK., Sticher O., *Helv***. *Chim. Acta*. 1979; **62**: 644-646.

241. **Ben Hassine B, Bui AM, Mighri Z, Cavé A**. Journal de la société chimique de tunisie. 1982 ; 7: 3-10.

242. **Louis S, Danghouth – Kesraoui F, Baghdikian B, Elias R, Boukef K, Blausard.** *Pharmaszie*. 1999; 54(4):309-310.

243. **Bellakhdar J, Claisse R, Fleurentin J, Younos C**. Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia. *Journal of Ethnopharmacology*, 1991; 35:123–143.

244. **Skim F, Kaaya A, Jaouhari TJ, Lazrek HB, Jana M, El Amri H**. Hypoglycaemic activity of *Globularia alypum* leaves in rats. *Fitoterapia*. 1999; 70: 382-389.

245. **Jouad H, Maghrani M, Eddouks M**. Hypoglycaemic effect of Rubus fructicosis L. and Globularia alypum L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 2002 ; 81(3): 351-6.

246. **Caldes G, Prescott B, King JR**. A potential antileukemic substance present in Globularia alypum. *Planta Med*. 1975; 27(1):72-6.

247. **Bello R, Moreno L, Primo-Yúfera E, Esplugues J**. Globularia alypum L. extracts reduced histamine and serotonin contraction in vitro. *Phytother Res*. 2002 Jun; 16(4):389-92.

248. **Markham KR**. Techniques of flavonoids identification. *Academic press, London*. 1982.

249. **Bronner WE, Beecher GR**. Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grape fruits juice concentrates. *J. Chromatogr*. 1995; 705: 247-256.

250. **Edeoga Ho, Okwu DE, Mbaebie BO.** Phytochemical constituents of some nigerian medicinal plants. *Afr.J.Biotecnol*. 2005; 4(7): 685-688.

251. **Price MP, Butler LG.** Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemisty.* 1977; 25: 1268-1273.

252. **Boharun T, Gressier B, Trotin F, Bruner C, Dine T, Vasseur J, Gazin JC, Pinkas M, Luyckx M, Gazin M**. Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from howthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneim Forsh / Drug Res.* 1996; 1-6.

253. **Vanhaelen M, Vanhaelen-Fasté R**. High performance liquid gas and thin layer chromatography of naturally occurring flavonoids, phenolic and related compounds. *Journal of chromatography*. 1980; 187: 255-260.

254. **Chopin J**. Actualité de phytochimie fondamentale. Masson *éd*, 2^{éme}*Serie, Paris,* 1966.

255. **Wagner H**. Bladt S, Zgainski EM. Plant drug analisis. *Springer-Verlag*. 1984: 164.

256. **Ribireau-Gayon**. Les composés phenoliques des vegetaux. *Dunod éd, paris*. 1968.

257. **Loiseleur j**. Techniques de laboratoire. Chimie, physique, Chimie biologique. *Tome I, Fascicule I, Masson et Cie éd*. 1963.

258. **Koleva II, Van Beek TA, Linssen JPH, de Groot A, Evstatieva LN**. Screening of plant Extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*. 2002; 13: 8-17.

259. **Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K.** Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Analytical Biochemistry*. 1979; 95(2): 351-358.

260. **Ellman GL**. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys*. 1959; 82: 70-77.

261. **Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N**. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*. 2005; 97: 654-660.

262. **Hsu C-Y**. Antioxidant activity of extract from polygonum aviculare L. *Biologycal Research*. 2006; 39: 281-288.

263. **Pourmorad F, Hosseinimehr SJ, Shahabimagd N**. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *Afr. j. Biotechnol*. 2006; 5(11): 1142-1145.

264. **Kamoun P, Lavoinne A, de Verneuil H**. Biochimie et biologie moléculaire. *Médecin-sciences Flammarion éds*. 2003: 114-115.

265. **Andreadou I, Sigala F, Iliodromitis EK, Papaefthimion M, Sigalas C, Aligiannis N,Savvari P, Gorgoulis V, Papalabros E, Kremastinos DT**. Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfuly treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *Journal of nuclear and cellular cardiology*. 2007; 42: 549-558.

266. **Al-Majed AA. Gado AM, Al-Shabanah, Mansour MA**. Alpha-lipoic acid Ameliorates Myocadial Toxicity induced by doxorubicin. *Pharmacological Research*. 2002; 46: 449-503.

267. **Mohamed HE, El-swefy SE, Hagar HH**. The protective effect of glutathione Administration on adriamycin-induced Acute cardiac toxicity in rats. *Pharmacological Research*. 2000; 42: (2): 115-121.

268. **Deepa PR, Varalakshmi P**. Protective effect of low molecular weight heparin on oxidative injury and cellular abnormalities in adriamycin-induced cardiac and hepatic toxicity. *Chemico-biological interactions*. 2003; 146: 201-210.

269. **Chopra S, Pillai KK, Husain SZ, Giri DK**. Propolis protect against doxorubicin-induced Myocardiopathy in rats. *Experimental and Molecular Phatology*. 1995; 62: 190-198.

270. **Bagchi D, Sen CK, Ray SD, Das DK, Bagchi M, Preuss HG, Vinson JA.** Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutation Research*. 2003; 523–524: 87–97.

271. **Abdel-wahab MH, El-Mahdy MA, Abd-Ellah MF, Helal GK, Khalifa F, Hamada FMA**. Influence of p-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart. *Pharmacological Research*. 2003; 48: 461-465.

272. **Yilmaz S, Atessahin A, Sahna E, Karahan I, Ozer S**. Protective effect of lycopene on adriamycin- induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicology*. 2006; 218: 164-171.

273. **Mohan IK, Kumar KV, Naidu MUR, Khan M, Sundaram C**. Protective effect of CardiPro against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Phytomedicine*. 2006; 13: 222-229.

274. **Flouri F, Arab K, Rossary A, Steghens J-P**. A model of OH-mediatedin vitro lipid peroxidation: application to the evaluation of four antioxidants. *Immunoanalyse et biologie spécialisée*. 2006; 21: 229-233.

275. **Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A**. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*. 2006; 52:4601–4623.

276. **Mullr K, Ziereis K, paper DH**. Aquifolium: protection against enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation. *Planta. Med*. 1998.64: 536-540.

277. **Ratty AK, Das NP.** Effects of flavonoids on non enzymatic lipid peroxidation ; structure-activity relation ship. *oncology*. 1988; 39: 69-79.

278. **Saija A, Scalese M, Lanza, M, Marzullo D, Bonina E, Castelli F**. Flavonoids as antioxidant agent's importence of their interaction with biomembranes. *Free. Radic. Biol. Meb*. 1995; 19:481-486.

279. **Sadzuka Y, Sugiyama T, Shimoi K, Kinae N, Hirota S**. protective effect of flavonoids on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicology Letters*. 1992; 1-7.

280. **Kozluca O, Olcay E, Surucu S, Guran Z, Kulaksiz T, Uskent N.** Prevention of doxorubicin induced cardiotoxicity by catechin. *Cancer Letters*. 1999; 1-6.

281. **Van Acker SABE, Kramer K, Grimbergen JA, Van den Berg DJ, Van derVijgh WJF, Bast A.** Monohydroxyethylrutoside as protector against chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity.*Br j Pharmacol*. 1995; 115: 1260-4.

282. **Van Acker SABE, Boven E, Kuiper K.** Monohydroxyethyl-rutoside, a dose dependent activity of doxorubicin. *Clin Cancer Res*. 1997; 3:1747-54.

283**. Forrest GL, Gonzalez B.** Carbonyl reductase, *Chem. Biol. Interact.* 2000; 129: 21-40.

284. **El Hilaly J, Israili ZH, Lyoussi B**. Acute and chronic toxicological studies of Ajuga iva in experimental animals. *Ethnopharmacology*. 2004; 91:43-50.

285. **Hansen MB, Nielsen SE and Berg K**. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* 1989; 119:203-10.

286. **Ait Mbarek L, Ait Mouse H, Elabbadi N, Bensalah M, Gamouh A, Aboufatima R, Benharref A, Chait A, kamal M, Dalal A, Zyad A.** Anti-tumor properties of blackseed (Nigella sativa L.) extracts. *Brazilian journal of medical and biological Research*. 2007; 40: 839-847.

287. **Kampa M, Nifli AP, Notas G, Castanas E**. Polyphenols and cancer cell growth. Physiology, *Biochemistry and Pharmacology*. 2007.

288. **Kaneshiro T, Suzui1 M, Takamatsu R, Murakami A, Ohigashi H, Fujino T, Yoshimi1 N.** Growth Inhibitory Activities of Crude Extracts Obtained from Herbal Plants in the Ryukyu Islands on Several Human Colon Carcinoma Cell Lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2005; 353- 358.

289. **Beltz LA, Bayer DK, Moss AL, Simet IM.** Mechanisms of cancer prevention by green and black tea polyphenols. *Anticancer Agents Med Chem*. 2006; 6:389–406.

291. **Kampa M, Nifli AP, Notas G, Castanas E.** Polyphenols and cancer cell growth. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* . 2007; 159:79 –113.

290. **Mans RAD, da Rocha AB, Schwartsmann G**. Anti-Cancer Drug Discovery and Development in Brazil: Targeted Plant Collection as a Rational Strategy to Acquire Candidate Anti-Cancer Compounds. *The Oncologist.* 2000; 5:185-198.

292. **Saetung A, Itharat A, Dechsukum C, Wattanapiromsakul C, Keawpradub N, Ratanasuwan P**. Cytotoxic activity of Thai medicinal plants for cancer treatment. *Songklanakarin J. Sci. Technol*. 2005; 27: 469- 478.

293. **Kassi E, Papoutsi Z , Pratsinis H, Aligiannis N, Manoussakis M, P. Moutsatsou.** Ursolic acid, a naturally occurring triterpenoid, demonstrates anticancer activity on human prostate cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2007, 133:493–500.

294. **Hogan SF, Krishnegowda NK, Mikhailova M, Kahlenberg MS**. Flavonoid, Silibinin, Inhibits Proliferation and Promotes Cell-Cycle Arrest of Human Colon Cancer. *Surgical Research*. 2007 ; 143 : 58–65.

295. **Susanti D, Sirat H M, Ahmad F, Ali R M, Aimi N, Kitajima M**. Antioxidant and cytotoxic flavonoids from the flowers of *Melastoma malabathricum L*. *Food Chemistry.* 2007, 103. 710–716.

الملخصات

الملخص

الدوكسوروبيسين هو أحد المضادات الحيوية من طائفة الأنتراسيكلينات يستخدم في العلاج الكيماوي لأنواع عديدة من السرطان, ومع ذلك فان استخدامه مازال محدودا بسبب سميته القلبية المرتبطة بالجرعة. ويعتقد بأن الجذور الحرة هي العامل الرئيسي في سمية هذا الدواء. تهدف هذه الدراسة إلى تقصي تأثير المستخلص البيتانولي للأجزاء الهوائية لنبتة التسلغا *Globularia alypum* والتي تشتهر في الطب الشعبي بعدة منافع كاستعمالها في معالجة الأمراض القلبية الوعائية وأمراض الكلى, ضد السمية القلبية المستحدثة بـــ DOXO في الجرذان.

بينت الدراسة الكيميائية التحليلية المنجزة على المستخلص البيتانولي لهذه النبتة من خلال اختبارات الكشف, معايرة الفلافونويدات و متعدد الفينولات, طيف امتصاص الأشعة UV في الوسط الميثانولي وكذا تقنية الكروماتوغرافيا التحليلية (PC وTLC); الطبيعة الفينولية للمستخلص (103.81 ± 3.65 مغ مكافئ لحمض القاليك/غ مستخلص), احتوائه على الفلافونويدات (21.55 ± 1.51 مغ مكافئ للكرستين/غ وزن جاف) من صنف الفلافونولات و الفلافونات السكرية وكذا احتوائه الجد محتمل على فلافونويدات مميثلة وكومارينات. أظهرت الدراسات الخارج خلوية الخاصية المضادة للأكسدة

(الأسرة للجذور الحرة) لهذا المستخلص وظهر هذا جليا من خلال إرجاعه للجذر الحر المستقر DPPH° حيث قدر التركيز المثبط لـــ 50 % (IC50) بـــ 0.021 مغ/مل.

وقد وجد من خلال هذه الدراسة أن المستخلص البيتانولي لنبات *Globularia alypum* يملك نشاطا معتبرا في وقاية القلب من التسمم المحرض بـــ DOXO, فالمعاملة المسبقة للجرذان بجرعة 100 مغ/كغ عن طريق الفم لمدة شهر أدت إلى انخفاض في نشاط الإنزيمات البلازمية الدالة على التسمم القلبي(CPK, LDH,AST), انخفاض في معدلات MDA و صيانة مستويات GSH السيتوزولية للقلب مقارنة بتلك الملاحظة لدى الجرذان المعاملة بـــ DOXO فقط بجرعة 20 مغ/كغ تحت الغشاء البريتوني. وقد تم تدعيم الدراسة البيوكيميائية بدراسة نسيجية لمقاطع في القلب, حيث وجد أن معاملة الجرذان بـــ DOXO فقط تسببت في ظهور تغيرات نسيجية مرضية تجلت بوضوح في مظاهر نكرزة,

ودمة, ارتشاح للخلايا الالتهابية, ظهور النواة بشكل كتلة مكثفة وغيرها من التغيرات, في حين أن المعاملة المسبقة بالمستخلص أدت إلى التحسن في هذه التغيرات النسيجية. نستنتج من ذلك بأن العلاج

بالمستخلص البيتانولي لنبتة *Globularia alypum* يمكن أن يحمي من السمية القلبية الحادة المستحثة بـــ DOXO, وبالتالي قد يكون هذا المستخلص مرشحا مفيدا في العلاج كمرافق لـــ DOXO للحد من الجذور الحرة المسببة للسمية القلبية لهذا الدواء.

أظهر المستخلص المائي لنفس النبات تأثير مضاد لتضاعف كل من الخلايا الورمية البشرية الكبدية Hep G2 والمعوية HCT-116 حيث قدر التركيز المثبط لـــ 50% بـــ 43.82µg/ml و 151.40 µg/ml على الترتيب, في حين أظهر نشاط محفز للخلايا اللمفاوية البشرية الورمية 1301Cells.

Abstract

Anticancer therapy results in acute and chronic toxicity. Doxorubicin is an anthracycline antibiotic, widely used in the chemotherapy of many human cancers. The use of this drug however, continues to be limited by its dose-related cardiotoxicity. Free radicals are hypothesized to be a major factor in the toxicity of doxorubicin.

The aim of this work was to investigate the effect of the aerial parts butanolic extract of *Globularia alypum*, witch is known for their medicinal properties in traditional medicine such as the treatment of cardiovascular and renal diseases, on the acute cardiac toxicity induced by doxorubicin in rats.

The analytical chemical study (identification tests, estimation of flavonoids content and total phenolic compound, The UV absorbance spectrum in the methanolic solution and also the analytical chromatography (PC, TLC) carried out on the butanolic extract of this plant showed the phenolic nature of this extract (103.81 ± 3.65 mg GAE / g dry weight), the presence of flavonoids (21.55 ± 1.51 mg QE / g dry weight) belongs to a group of flavonols and Flavones glycosides and the very probable presence of methyl flavonoids and Coumarins. IN VITRO the extract exhibited a significant antioxidant activity (radical scavenging effect), based on the scavenging activity of the stable free radical DPPH° where the amount of the extract needed for 50% inhibition (IC50) was 0.021 mg/ml.

The results indicate that *Globularia alypum* butanolic extract exhibited significant protection against DOXO induced cardiac toxicity, where the pretreatment with the extract at a dose of 100mg/kg for a month resulted in a decrease in the plasma enzymatic cardiac injury (CPK, LDH and AST), reduction in cardiac cytosolic MDA and maintenance of cardiac cytosolic GSH level as compared to DOXO treated animals at a dose of 20 mg/kg intraperitoneall. The biochemical study were confirmed with histological study; The results showed that doxorubicin alone produced evident histological alterations (edema, areas of necrosis, prominent inflammatory cells, Condensed Nuclei and other alterations) Its concluded that butanolic extract of *Globularia alypum* treatment can protect against acute doxorubicin-induced cardiotoxicity. Thus butanolic fraction of this plant may be a useful candidate in the combination therapy with doxorubicin to limit free-radical-mediated cardiac injury.

The aqueous extract of *Golobularia alypum* showed antiproliferative effect against Human hepatocarcinoma cell line (Hep G2) and Colon carcinoma cells (HCT-116), The IC_{50} were 43.82 µg/ml and 151.4 µg/ ml respectively, while this same extract increase the cell proliferation of 1301 cells (T-lymphocyte cells).

Résumé

La doxorubicine, un antibiotique appartenant à la famille des anthracyclines est responsable de toxicités sévère notamment une cardiotoxicité dose dépendante qui limite l'usage clinique de cette agent chimiothérapeutique.

Tasselgha- Globularia alypum- une plante médicinale utilisé traditionnellement pour le traitement de pathologies cardiovasculaires et rénales. L'objectif de cette étude consiste on l'exploration d'effets cardioprotecteurs présumés de l'extrait butanolique de la partie aérienne de cette plante contre les effets cardiotoxiques de la doxorubicine chez le rat wistar albinos.

L'analyse phytochimique de la fraction butanolique à travers des tests de révélation ; dosage des polyphenoles et des flavonoides ; spectre d'absorption UV dans un milieu méthanolique ; chromatographie analytique (TLC, PC) indique une présence phénolique (103.81±3.65mg EAG/g extrait ; ainsi que de flavonoides (21.55±1.51mg EQ/g poids sec) telle que les flavonols, les flavones glycosylés et très probablement des flavonoides méthylés et des coumarines.

Les tests in vitro réalisés sur le radical stable DPPH° attestent d'un pouvoir antioxydant (capture des radicaux libres) prononcé de l'extrait, ce dernier réduit 50% du DPPH° à une concentration de 0.021mg/ml. D'après cette étude l'extrait présente une action cardioprrtectrice contre les effets nocifs de la doxorubicine : le gavage des animaux par l'extrait – à raison de 100mg/kg durant un mois avant l'administration de la doxorubicine à une seul dose de 20mg/kg par voie intrapéritoniale – a pour conséquences la diminution de l'activité des biomarqueurs sériques de la cardiotoxicité (CPK ,LDH,AST) ; un abaissement des taux de l'MDA ; une préservation du GSH cytosolique au niveau de l'homogénat du cœur comparés à ceux du groupe traité uniquement par la doxorubicine à une seule dose de 20mg/kg par voie intrapéritoniale.

Les coupes histopathologiques appuient les conclusions tirées à partir des tests biochimiques, et c'est ainsi que chez les animaux traités par la doxorubicine seul, on observe : des nécroses, des œdèmes, infiltration de cellules inflammatoires, les noyaux apparaissent comme des masses condensés et bien d'autres changements. Cependant le traitement préalable par l'extrait s'est traduit par une amélioration des coupes des tissus cardiaques.

En conclusion la fraction butanolique de l'extrait hydroalcoolique des partie aériennes de *Globularia alypum* présente des propriétés antioxydants qui pourrait être à l'origine de l'action cardioprotectrice contre la cardiotoxicité de la doxorubicine ce qui suggère une possibilité de prescrire cet extrait comme traite adjuvant lors d'une chimiothérapie par doxorubicine.

L'extrait aqueux de *Globularia alypum* manifeste une action antiproliférative contre les cellules cancéreuses hepatiques et intestinales humaines ; Hep G2 et HCT-116. Ansi ses concentrations inhibitrices IC_{50} sont 43.8 µg/ml et 151.40 µg/ml respectivement. Cependant l'extrait aqueux montre un effet stimulant de la multiplication des lymphocytes (1301 Cells).

اللقب: قـــــارة علـــــي	تاريخ المناقشة: 30 سبتمبر 2009
الاسم: وهيبـــــــة	

العنوان: دراسة تأثير بعض مستخلصات نبات *Globularia alypum L.* على سلالات خلوية ورمية بشرية IN VITRO وإمكانية استعمالها في الوقاية من السمية القلبية الناتجة عن مضاد السرطان Doxorubicin

نوع الشهادة: مذكرة ماجستير

الملخص

الدوكسوروبيسين هو أحد المضادات الحيوية من طائفة الأنتراسيكلينات يستخدم في العلاج الكيماوي لأنواع عديدة من السرطان, ومع ذلك فان استخدامه مازال محدودا بسبب سميته القلبية المرتبطة بالجرعة. ويعتقد بأن الجذور الحرة هي العامل الرئيسي في سمية هذا الدواء. تهدف هذه الدراسة إلى تقصي تأثير المستخلص البيتانولي للأجزاء الهوائية لنبتة التسلغا *Globularia alypum* والتي تشتهر في الطب الشعبي بعدة منافع كاستعمالها في معالجة الأمراض القلبية الوعائية و أمراض الكلى, ضد السمية القلبية المستحدثة بـــDOXO في الجرذان.

بينت الدراسة الكيميائية التحليلية المنجزة على المستخلص البيتانولي لهذه النبتة من خلال اختبارات الكشف, معايرة الفلافونويدات و متعدد الفينولات, طيف امتصاص الأشعة UV في الوسط الميثانولي وكذا تقنية الكروماتوغرافيا التحليلية (TLC ،PC) الطبيعة الفينولية للمستخلص (103.81 ± 3.65 مغ مكافئ لحمض القاليك/غ مستخلص), احتوائه على الفلافونويدات

(21.55 ± 1.51 مغ مكافئ للكرستين/غ مستخلص) من صنف الفلافونولات و الفلافونات السكرية وكذا احتوائه الجد محتمل على فلافونويدات مميثلة وكومارينات. أظهرت الدراسات الخارج خلوية الخاصية المضادة للأكسدة (الأسرة للجذور الحرة) لهذا المستخلص وظهر هذا جليا من خلال إرجاعه للجذر الحر المستقر DPPH° حيث قدر التركيز المثبط لـــ 50 % (IC50 بـــ 0.021 مغ/مل.

يملك نشاطا معتبرا في وقاية القلب من التسمم المحرض *Globularia alypum* وقد وجد من خلال هذه الدراسة أن المستخلص البيتانولي لنبات , فالمعاملة المسبقة للجرذان بجرعة 100مغ/كغ عن طريق الفم لمدة شهر أدت إلى انخفاض في نشاط الإنزيمات البلازمية الدالة على DOXOبـــ السيتوزولية للقلب مقارنة بتلك الملاحظة لدى الجرذان GSH و صيانة مستويات MDA), انخفاض في معدلات CPK, LDH,ASTالتسمم القلبي(فقط بجرعة 20 مغ/كغ تحت الغشاء البريتوني. وقد تم تدعيم الدراسة البيوكيميائية بدراسة نسيجية لمقاطع في القلب, حيث وجد أن DOXOالمعاملة بـــ فقط تسببت في ظهور تغيرات نسيجية مرضية تجلت بوضوح في مظاهر نكرزة, ودمة, ارتشاح للخلايا الالتهابية, ظهور DOXOمعاملة الجرذان بـــ النواة بشكل كتلة مكثفة وغيرها من التغيرات, في حين أن المعاملة المسبقة بالمستخلص أدت إلى التحسن في هذه التغيرات النسيجية. نستنتج من ذلك , وبالتالي قد يكون هذا DOXO يمكن أن يحمي من السمية القلبية الحادة المستحثة بـــ *Globularia alypum*بأن العلاج بالمستخلص البيتانولي لنبتة أظهر MTT للحد من الجذور الحرة المسببة للسمية القلبية لهذا الدواء.باستعمال اختبار DOXOالمستخلص مرشحا مفيدا في العلاج كمرافق لـــ في حين أظهر نشاط محفز HCT-116والمعوية Hep G2المستخلص المائي لنفس النبات تأثير مضاد لتضاعف كل من الخلايا الورمية البشرية الكبدية Cells لتضاعف الخلايا اللمفاوية البشرية الورمية 1301

الكلمات المفتاحية: *Globularia alypum*, الفلافونويدات, الجذور الحرة, الإجهاد التأكسدي, مضادات الأكسدة, Doxorubicin, السمية القلبية, اختبار MTT, السلالات الخلوية الورمية البشرية, المستخلص المائي, الزراعة الخلوية.

مخبر البحث: مخبر بيولوجيا البيئة لكلية علوم الطبيعة والحياة جامعة منتوري- قسنطينة

أعضاء لجنة المناقشة

د. خليفي توهامي فاطمة	رئيسة	أستاذة محاضرة	جامعة منتوري-قسنطينة
د. عبيدلي نصيرة	مقررة	أستاذة محاضرة	جامعة منتوري-قسنطينة
د. لحول مصباح	ممتحن	أستاذ محاضر	جامعة جيجل