الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة قسنطينة 1
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم علم الحيوان

رقم الترتيب:.....

رقم التسلسل:.....

أطروحة
قدمت لنيل دكتوراه في العلوم
تخصص بيولوجيا وفيزيولوجيا الخلية الحيوانية

العنوان

تقييم الأثر الوقائي و/أوالتعديلي للمنتجات الطبيعية النشطة بيولوجيا اثر الإصابة النفرونية المحرضة بالزئبق *in vitro* و*in vivo*

تاريخ المناقشة

تقديم: نادية دكدوك

أعضاء لجنة المناقشة

أستاذ التعليم العالي زهية مرايحي	رئيسة	جامعة قسنطينة 1
أستاذ التعليم العالي سعاد أمداح	مقررة	جامعة قسنطينة 1
أستاذ التعليم العالي رتيبة مكيو	ممتحنة	جامعة قسنطينة 1
أستاذ التعليم العالي ليلى حم بابا	ممتحنة	جامعة باتنة 2
أستاذ التعليم العالي مولود يحي	ممتحنا	جامعة باتنة 2
أستاذ التعليم العالي صليحة دحامنة	ممتحنة	جامعة فرحات عباس سطيف2

2016 -2015

التشكرات

نحمد الله عز وعلا حمدا كثيرا على نعمة طلب العلم ولا نحيط بشيء من علمه عز وجل إلا بما شاء وسعت رحمته كل شيء. ومن لايشكر الناس لايشكر الله.

أسمى معاني الشكر والاحترام أوجهها إلى الأستاذة النبيهة البروفسور **سعاد أمداح** التي قبلت الإشراف على بحث هذه الأطروحة ، وعلى كل المجهودات المبذولة ،والمخلصة ،والنصائح القيمة التي قدمتها لي خلال مراحل انجاز هذا البحث المتواضع. كما أتوجه بشكري الجزيل إلى الأستاذ الفاضل البروفسور **أحمد مناد** على توجيهاته القيمة ،ومساعداته الفعالة أثناء مراحل انجاز هذه الدراسة.

الشكر الجزيل أقدمه إلى الأساتذة الفضلاء البروفسور **نون زياتينا دي طوماسي** ، والبروفسور **لودجي مليلا** على المجهودات المبذولة والمخلصة ، والنصائح القيمة التي قدماها لي خلال مراحل انجاز الدراسات الكيميائية و البيولوجية لهذا البحث الذي كان بمثابة شراكة جزائرية إيطالية علمية ناجحة.

كما أتقدم بشكري الجزيل إلى فريق العمل الإيطالي البروفسور **ايمنولا كورسين** ، والبروفسور **لوريلا سيفرينو**، والمهندس المخبري **نيكولا مال فرونطي** ، والدكتور **أنطونيوفسالو** ، والدكتور **دال بياز** والدكتورة **دانيلا روسو** ، و **فرعون اماكولاطا** ، والدكتورة **فالانتينا.**

وأيضا أوجه شكري الكبير للأستاذة الخبيرة ،الفاضلة البروفسور **زهية مرايحي** من جامعة قسنطينة1 التي قبلت ترأس لجنة المناقشة. والأساتذة الفضلاء الذين قبلوا مناقشة هذا البحث البروفسور **رتيبة مكيو** من جامعة قسنطينة1 ، والبروفسور **ليلى حم بابا** ،والبروفسور **مولود يحي** من جامعة باتنة 2، والبروفسور **صليحة دحامنة** من جامعة فرحات عباس سطيف 2 .

كما أتوجه بشكري الخالص إلى الأساتذة الفضلاء البروفسور **وليدة راشد** ،والبروفسور **رتيبة مكيو** ، و البروفسور **فضيلة بن عياش**، والبروفسور **سمير بن عياش** ، والبروفسور **نورالدين قاسم شاوش**، والبروفسور **محمد المنصف بن شيكو** ، والبروفسور **مسعود العايب**، والبروفسور**نصر الدين زيدون** ، والبروفسور **الطاهر بن دايخة** ، والبروفسور **خيرالدين** ، والأستاذ **حسين بلة عباسي** ،والأستاذ **خالف شبي** ، والأستاذ **مراد بوكرو** ،والأستاذ **نصر الدين كوال** وفريق العمل بمصلحة التشريح السريري بعيادة الكلى بقسنطينة **هؤلاء كلهم جميعا** قدموا لي يد العون المادي والمعنوي والنصح الفاضل .

حفظكم الله وسدد خطاكم

وأجزل لكم عز وعلا العطاء.

الإهداء

أهدي ثمرة جهدي

إلى المرأة الفاضلة ، وسليمة القلب ،والمخلصة ،والمحسنة

..... أمي الحبيبة

و إلى الإنسان الفاضل ،والطيب ،والجيد ،والكريم ،والمخلص

.....أبي الحبيب

و إلى إخوتي وأخواتي حفظهم الله

و إلى الغائبة الحاضرة معنا

أختي الحبيبة التي اشتاق إليها دومااا

.....الحبيبة حنان رحمها الله

و إلى

كل طيب ،صاحب

..... الكلمة

.....الطيبة

.....وقوله

..... بارك الله فيك

الفهرس

I- المقدمة 1

II- عرض المراجع

1. الإصابة النفرونية والإجهاد التأكسدي المحرض بالزئبق..... 4

1.1. مركبات الزئبق والإجهاد التأكسدي..... 4

1.1.1. مركبات الزئبق..... 4

2.1.1. أيض الزئبق..... 4

1.2.1.1. الامتصاص..... 4

2.2.1.1. التوزيع البلازمي والنسيجي للزئبق..... 5

3.2.1.1. الاحتباس النسيجي للزئبق..... 6

4.2.1.1. طرح الزئبق..... 6

3.1.1. آليات الإجهاد التأكسدي الكلوي المحرض بالزئبق..... 6

1.3.1.1. تفاعل ما فوق الأكسدة اللبيدية بالأغشية 6

2.3.1.1.الإجهاد التأكسدي إثر ارتباط الزئبق بالمركبات الضامة لمجاميع التيول..... 8

3.3.1.1.الإجهاد التأكسدي بالميتوكندرية..... 9

4.3.1.1. الإجهاد التأكسدي المتواسط بتفاعلات الالتهاب..... 11

2. المنتجات النباتية والوقاية النفرونية من أثر الزئبق..... 13

3 . نبات *Olea europaea* L. (*Oleaceae*)..... 15

1.3. المحتوى الفينولي بأوراق وزيتون وزيت *Olea europaea* L..... 17

2.3. صيدلانية المركبات الفينولية لشجرة الزيتون 17

1.2.3. الامتصاص..... 17

2.2.3. التحول الحيوي للمركبات الفينولية لشجرة الزيتون..... 19

3.2.3. الإطراح..... 19

3.3. الأثرالوقائي النفروني للمنتجات الفينولية لنبات *Olea europaea* L..... 20

III- الدراسات الكيميائية

1. طرق ومواد العمل..... 23

1.1. المادة النباتية L *Olea europaea* 23
2.1. التصنيف النباتي 23
3.1. ثمار الزيتون 24
1.3.1. الاستخلاص 24
2.3.1. الفصل باستعمال HPLC / DAD 25
3.3.1. المحتوى الكلي للمركبات متعددة الفينولات بثمار الزيتون 25
4.3.1. محتوى tanin 25
4.1. أوراق الزيتون 25
1.4.1. الاستخلاص 25
2.4.1. الفصل باستعمال هلام Sephadex 26
3.4.1. الفصل باستعمال HPLC التحضيرية 28
4.4.1.الفصل باستعمال HPLC التحليلية 29
5.4.1. المحتوى الفينولي الكلي 29
2. النتائج 29
1.2. مستخلصات الزيتون 29
1.1.2. تحاليل HPLC/ DAD 29
2.1.2. المحتوى الكلي للمركبات متعددة الفينول 31
3.1.2. محتوى tannin 31
2.2. مستخلصات أوراق الزيتون 33
1.2.2. التعيين البنيوي للمركب النقي (C1) 33
3.2.2. تحاليل HPLC-RP 37
4.2.2. المحتوى الفينولي 39
3. المناقشة 39
4.الخلاصة 40
IV- الدراسات *in vitro*
1. طرق ومواد العمل 42
1.1. دراسة النشاط الوقائي *in vitro* بمستخلصات الزيتون 42
1.1.1. نشاط أسر جذر DPPH 42
2.1.1. الكفاءة الاختزالية (FRAP) 42

3.1.1. تثبيط تفاعل ما فوق الأكسدة الليبيدية..... 42
2.1. دراسة النشاط الوقائي *in vitro* بمستخلص أوراق الزيتونChemlal..... 43
1.2.1. اختبار النشاط الملتقط لجذر $OH^{\cdot}$..... 43
2.2.1. اختبار النشاط الممخلب لأيون Fe^{2+}..... 43
3.2.1. اختبار النشاط المضاد للالتهاب..... 43
3.1. الدراسة الإحصائية..... 44
2. النتائج..... 44
1.2. دراسة النشاط الوقائي *in vitro* بمستخلصات الزيتون..... 44
1.1.2. نشاط أسرالجذري DPPH..... 44
2.1.2. الكفاءة الاختزالية (FRAP) 44
3.1.2. تثبيط تفاعل ما فوق الأكسدة الليبيدية..... 45
2.2. دراسة النشاط الوقائي *in vitro* بمستخلص أوراق الزيتون Chemlal..... 46
1.2.2. اختبار النشاط الآسر لجذر $OH^{\cdot}$..... 46
2.2.2. اختبار النشاط الممخلب لأيونات Fe^{2+} 47
3.2.2. اختبار النشاط المضاد للالتهاب..... 48
3. المناقشة..... 48
4.الخلاصة..... 51
V-الدراسات *in vivo*
1. طرق ومواد العمل..... 52
1.1. حيوانات التجربة..... 52
2.1. المعايرات البيوكيميائية..... 52
1.2.1. معايرة مؤشرات السمية الكلوية..... 52
2.2.1. معايرة مؤشرات الإجهاد التأكسدي..... 52
3.2.1. معايرة نظام Glutathion..... 53
4.2.1. معايرة مؤشرات الالتهاب..... 53
3.1. الدراسة النسيجية..... 54
4.1. الدراسة الإحصائية..... 54
2. النتائج..... 54
1.2. المعايرات البيوكيميائية..... 54

1.1.2. معايرة مؤشرات السمية الكلوية..... 54
2.1.2. معايرات مؤشرات الإجهاد التأكسدي 55
3.1.2. معايرات مؤشرات نظام Glutathion 57
4.1.2. مؤشرات النشاط الالتهابي..... 58
2.2. الدراسة النسيجية..... 60
3. المناقشة..... 61
4. الخلاصة..... 67
VI-الخلاصة..... 69
VII-**الملخص**..... 72
VIII-المراجع..... 75

المختصرات

-ALA Alpha lipoic acid

-βCB βCarotene bleaching

-BHT Butyated hydroxytoluene

-BSA Bovine serum albumin

-$(CH_3)_2Hg$ Dimethyl mercury

-$C_2H_5Hg^+$ Ethyl mercury cation

-CAT Catalase

-CDNB 1-chloro-2,4-dinitrobenzene

-Ce_2SO_4/H_2SO_4 Cerium sulphate in /sulphiric acid

-CH_3Hg^+ Methyl mercury cation

-DMPS Dimaval – Unithiol- Sodium 2,3 - dimercapto propane sulfate

-DHLA Dihydro lipoic acid

-DPPH Radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

-DTNB 5.5′ –Dithiobis(2-nitro benzoic acid)

-EDTA Ethylene diamine tetra acetic acid

-ENos Endothelial nitric oxide synthase

-FRAP Ferric Reducing Antioxidant Power

-GAE Galic acid equivalent

-GLC Glutamate Cysteine Ligase

-GPx Glutathion peroxidase

-GR Glutathion reductase

-GSH Glutathion

-GST Glutathion S-transferase

-GTP Guanosine tri phosphate

-H_2O_2 Hydrogen Peroxide

-HCl Chlorure d'hydrogène

-Hep Human hepatoma

-Hg^0 Elemental mercury

-Hg^{2+} Inorganic mercury cation

-$HgCl_2$ Mercury chloride

-$HO^{\cdot}_2$ Hydroperoxyl

-HO-1 Heme Oxygenase-1

-HOCl Hypochlorous acid

-HPLC-DAD Hight performance liquid chromatography DiodeArray Detector

-HPLC-RP Hight performance liquid chromatography –Reverse phase

-HT Hydroxytyrosol

-IC_{50} Inhibitor concentration of 50%

-ICAM-1 Intracellular adhesion molecule-1

-INos Inducible Nitric oxide

- Ip Intra peritoneal

-KLF-4 Kruppel – like Factor 4

-LDH Lactate dehydrogenase

-LDL Low density lipoprotein

-LLC-PK1 Epilhelial cell line porcine kidney

-LPS Lipopoly saccharide

-$LOO^{\cdot}$ Lipid peroxyl

-MDA Malondialdehyde

-MeHg Methyl mercury

-MPO Myeloperoxidase

-MT Metallothioneins

-NADPH Nicotinamide- adenine dinucleotide phosphate

-NBT Nitro blue tetrazolium

-NF-κβ Nuclear factor- kappa beta

-NMR Nuclear magnetic resonance

-NO_2 Nitrogen dioxide

- Nox NADPH Oxidase

-3-NO_2 -Tyr Nitrotyrosine

-NQO1 Quinone oxidoreductase1

-NrF2 Transcription nuclear factor erythroid Related 2

-$O_2^{\cdot -}$ Superoxide

-$^{\cdot}OH$ Hydroxyl radical

-$ONOO^-$ Peroxynitrite

-ROS Reactive oxygen species

-RNA Ribonucleic acid

-RNS Reactive nitrogen species

-SGLT1 Sodium dependent glucose transporter

-SH Thiol

-SOD Superoxide dismutase

-TBA Thiobarbeturic acid

-TLC Tin layer chromatography

-TE Trolox equivalent

-TAE Tannic acid equivalent

-THP-1 Human Promyelocytic cell line

-TNF Tumor nicrosis factor

-TPTZ Tripyridyl triazine

١- المقدمة

I.المقدمة

تعتبر الكلى أهم موقع يستهدف من طرف المعادن الثقيلة كأملاح الزئبق ، والتي تحدث اضطرابا في وظيفة الإرتشاح الكبي ، وعملية إعادة الامتصاص ، والإفراز. كيميائيا ، فإن الزئبق يملك خاصية الطليعة المؤكسدة المولدة للإجهاد التأكسدي وذلك وفق آليات عدة أهمها التفاعل النشط مع مجاميع التيول (Şener *et al* ,2007) . حيث تشكل أيونات Hg^{2+} و MeHg روابط تكافئية مع مركب الجلوتاتيونGSH وبقايا السيستئين البروتيني (Zalups and Lash ,1996) ، مما يؤدي إلى ظهور أثر سمي وتلف تأكسدي. وقد اقترح تفاعل مافوق الأكسدة اللبيدية كآلية لحدوث سمية بيولوجية بوجود كلوريد الزئبق (Mahboob *et al* .,2001 ; Huang *et al* .,1996) . وتعتبر سلسلة النقل الإليكتروني بالميتوكندرية أهم موقع لتشكيل المؤكسدات النشطة منها جذر مافوق الأوكسيد $O_2^{\cdot -}$ وبيروكسيد الهيدروجين H_2O_2. حيث أكد (Lund *et al* ., 1993) أن ارتفاع تشكيل H_2O_2 يرافقه زيادة في تفاعل ما فوق الأكسدة اللبيدية للدهون الميتوكندرية إثر التعرض لمركب كلوريد الزئبق وذلك *in vivo*. وتتدخل تفاعلات الالتهاب الحاد في تضخيم الإجهاد التأكسدي النفروني اثر التعرض للزئبق. إذ تؤمن السيتوكينات المفرزة من موقع الإصابة جذب البالعات الكبيرة ، وكريات الدم البيضاء منها المتعادلة والتي تعمل على إفراز إنزيم myeloperoxidase (MPO) فينتج كم إضافي من الجذور الأوكسيجينية التفاعلية (ROS)منها جذور HOCl والجذور النتروجينية التفاعلية (RNS) منها ONOO التي تعكس حدوث استجابة التهابية حادة عند موقع الإصابة (Şener *et al* . , 2007).

وللحد من الآثار السمية للزئبق استعمل عدد من المواد الوقائية التي لها القدرة على ضبط مسار تفاعلات الإجهاد التأكسدي النفروني المضربالوظائف الحيوية للكلى (Rooney , 2007). فالكثير من الدراسات أقرت الدور الصيدلاني لبعض العوامل الممخلبة منها dimaval – unithiol- sodium 2,3 - dimercapto propane sulfate (DMPS) (Georg *et al* ., 2004) و alpha lipoic acid (ALA) (Gregus *et al* .,1992) ، وكذا الزنك المحفز على بناء جزيئات الإقتران بالزئبق كالميتالوتيونين (Goyer *et al.,* 1995) . أما السلينيوم يمنع الالتقاط الكلوي للزئبق وذلك بتدخل بروتينات selenoprotein-P البلازمية (Sasakura and Suzuki ,1998). كما تضمن الألياف الغذائية التقاط الزئبق مثل نخالة القمح (Ou *et al* ., 1999). ونظرا للآثار الجانبية كخفض مستوى النحاس و الزنك بالخلية الذي يتسبب فيه استعمال بعض ممخلبات المعادن مثل الزئبق (Risher and Amler,2005)، فقد أضحى البحث عن بدائل طبيعية ضروريا (El-Shenawy and Hassan ,2008)، لذا انصب الاهتمام على المستخلصات الطبيعية وذلك لتعزيز النظام الوقائي المضاد للأكسدة و الحد من سمية الزئبق. فاستعمال مستخلص طحلب *Spirulina fusiform*الضام للسيلنيوم، ومركب phycocyanin سمح بتراجع مظاهرالإجهاد التأكسدي والفعل السمي الحاد للزئبق على مستوى الكلى (Sharma *et al* ., 2007). وبالمثل ضمنت فلافونيدات مستخلص أوراق *Ocinum sanctum* دورا تثبيطيا قويا ضد جذور الهيدروكسيل OH· المتشكلة إثر التعرض للزئبق (Sharma *et al* ., 2005). كما حفظت اللجنينات منها مركبSchisandrin B المنتقى من فاكهة *Schisandra chinensis* دورا معززا لمحتوى

الجلوتاتيون الكلوي (Stacchiotti *et al* .,2009) . ومن خلال الدراسات التي أحصيناها فقد لوحظ أن العديد من النباتات والتي تملك أثرا وقائيا ضد ارتفاع الضغط الدموي (Jemai *et al* . ,2008) ، والسرطان (Bouallagui *et al* . , 2011) ، والأمراض الالتهابية كالتهاب المفاصل ,.Alarcon De la lastra *et al*) (2001 ، والأثر المضاد للأكسدة (Cioffi *et al* .,2009) ، وكذا الوقاية من الإصابة النفرونية المتواسطة بالأنواع الأوكسيجينية المحرضة بمختلف المؤكسدات كالحديد (Deiana *et al* ., 2007). ومن بين هذه النباتات منها تلك المنتشرة بحوض البحر الأبيض المتوسط كنبات L.*Olea europaea* والتي تضم ذخيرة قيمة من المركبات الفينولية منها مركبoleuropein أكثرمركبات عائلة secoiridoids انتشارا بأوراق الزيتون، و مركب hydroxytyrosol ، و مركب tyrosol (Vissers *et al* ., 2004). ويبقى التوثيق المرجعي ناذرا فيما يخص بحوث دراسة الأثرالوقائي لمستخلصات L.*Olea europaea* المضاد للسمية النفرونية الحادة المحرضة بالمعادن الثقيلة كالزئبق ، وبالمثل بالنسبة لبحوث دراسة مقارنة الأثرالمضاد للأكسدة مابين مستخلصات L *Olea europaea.* ذات الأصول الجغرافية المختلفة. ونظرا لتركيز الأبحاث على استعمال المركبات الفينولية النقية المعزولة من مستخلصات منتجات شجرة الزيتون وكشف آليات تأثيرها مثل مركب oleuropein الذي يعتبر ممخلب لأيونات النحاس ، والحديد (Andrikopoulos *et al* .,2002) وآسر جيد لجذر $OH^{\cdot}$ (Gordon *et al* ., 2001) . أما hydroxytyrosol فهو واق جيد ضد مركب H_2O_2 (Tuck *et al* ., 2001) ، وآسر للجذور الحرة المائية والجذور البروكسيلية الليبيدية الغشائية المركزية الأوكسجين(Soni *et al*.,2006) بالإضافة إلى الأثر المضاد للالتهاب من خلال آلية أسر مركب HOCl (Visioli *et al* ., 1998) الناتج من طرف كريات الدم البيضاء (Aruoma and Halliwell ,1987) . لذا ارتأينا استخدام القطفة الفينولية الكلية لمستخلصات L.*Olea europaea* .

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم الأثر الوقائي و أو التعديلي لمستخلصات L.*Olea europaea* اثر الإصابة النفرونية المحرضة بالزئبق لدى ذكور الفئران اعتمادا على :

- دراسة كيميائية مستخلصات زيتون الأصناف الإيطالية Leccino ، و Ogliarola، و Maiatica، و Frantoio ، و Coratina وصنفان جزائريان Chemlal ، وSigoise و أوراق زيتون Cilento الإيطالية وSigoise وChemlal الجزائرية.

- اختبار النشاط الوقائي *in vitro* بمستخلصات الزيتون وأوراقه و ترشيح أحد مستخلصات L. *Olea europaea* لدراسة الأثر الوقائي من الإصابة النفرونية المحرضة بالزئبق.

- دراسة النشاط الوقائي المضاد للإصابة النفرونية *in vivo* للمستخلص المنتقى من *Olea europaea*.L وذلك بإنجاز الاختبارات التالية :
- اختبار الفعل الوقائي على مؤشرات السمية الكلوية المحرضة بالزئبق
- اختبار الفعل الوقائي على مؤشرات الاجهاد التأكسدي الكلوي المحرض بالزئبق
- اختبار الفعل الوقائي على مؤشرات الالتهاب الكلوي المحرض بالزئبق
- تأكيد الفعل الوقائي بالدراسة النسيجية

II- عرض المراجع

1. الإصابة النفرونية والإجهاد التأكسدي المحرض بالزئبق

تعتبر الكلية أهم الأعضاء المتخصصة في طرح المواد السامة من الجسم. تتكون الكلية من منطقة مركزية تعرف بالنخاع ، وأخرى محيطية تسمى بالقشرة. وتشكل النفرونات الوحدات البنائية والوظيفية للكلية (Noël, 2008). تضمن الكلى عمليات متخصصة والمتمثلة في الترشيح ، وإعادة الامتصاص ، والإفراز مما يجعلها عرضة لمستويات مرتفعة من المواد السامة المتسببة في حدوث التلف السمي ، وظهور الإصابة النفرونية ، واضطراب الوظيفة الكلوية . لقد كشفت الدراسات عن عدد من المواد النفرونية السامة منها الأدوية ، والسموم ، والمعادن الثقيلة أهمها الزئبق والذي يستهدف الأنابيب القشرية القريبة من المنطقة المستقيمة (Stacchiotti *et al* ., 2003). كما أوضحت بحوث عدة الآليات المحرضة على الإصابة النفرونية اثر التعرض للزئبق ، أهمها عمليتي الالتهاب والإجهاد التأكسدي (Prozialeck and Edwards,2007) .

1.1. مركبات الزئبق والإجهاد التأكسدي

1.1.1. مركبات الزئبق

تصنف مركبات الزئبق إلى ثلاثة أنواع ، تشمل المركبات المعدنية واللاعضوية وأخرى عضوية (جدول 1).

جدول (1) : مركبات الزئبق

المركب	الخاصية	الاستعمال
- الزئبق العنصري أو المعدني Hg^0 (Clarkson *et al* ., 2003)	- قابلية الذوبان بالدهون - قابلية التبخر	- التطبيقات الصناعية - حشوة علاج الأسنان
- الزئبق اللاعضوي Hg^{2+} (Ozuah , 2000)	-ناتج أيضي لبخار الزئبق Hg^o	- مواد التجميل - المنتجات المنزلية والصناعية
-الزئبق العضوي (Brawnwald *et al*.,2001)	- امتصاص رئوي ، و هضمي ، و جلدي ، و مخي - دموي ،ومشيمي	-اللقاحات

2.1.1. أيض الزئبق

1.2.1.1. الامتصاص

تتحكم خاصية قابلية الذوبان وإمكانية اختراق الطبقة ثنائية اللبيد في عملية امتصاص مختلف صور الزئبق. فقد وجد بأن مركب CH_3HgCl يسهل اختراقه عبرالمجرى المعدي والمعوي وذلك لقابليته للذوبان بالدهون (Rabenstein ,1978)، و يمتص مركب CH_3Hg^+ بنسبة 100% وذلك بعد إدخاله في صورة مركبCH_3HgNO_3 (Aberg *et al* ,1969). بينما يمتص ما يقارب 7% فقط من أيونات الزئبق Hg^{+2} اثر ادخال مركب $HgCl_2$ (Clarkson ,1997). يميثل $HgCl_2$ بكتيريا فيتحول إلى CH_3Hg^+ (Edward and Mc Bride, 1975) وذلك بفضل البكتيريا المعوية *Staphylo cocci* و *E. Coli* (Rowland *et al* .,

(1975. كما أوضح بأن مركب كلوريد الزئبق بإمكانه أن يخترق الأغشية الإصطناعية ثنائية الدهون (Yasutake *et al* ., 1990) .

2.2.1.1. التوزيع البلازمي والنسيجي للزئبق

. التوزيع البلازمي

لقد أوضح أواخر سنوات 1970 أن نسبة 99% من أنواع الزئبق الدوراني البلازمي يوجد بصورة مرتبطة بمجاميع التيول البروتينية ، إذ يحدد هذا الارتباط نقل وتوزيع الزئبق بالأعضاء (Clarkson, 1972) .

تتفاعل كل من أيونات Hg^{+2} و CH_3Hg^+ الممتصة دمويا وذلك بمجاميع التيول (Rabenstein *et al* ,1989) . فيسهل ارتباط الزئبق بالمكونات البلازمية الضامة لهذه المجاميع مشكلة معقدات ذات تنظيم كيميائي خطي مثل $(Cys)_2Hg$ و / أو $(GSH)_2Hg$ (Rabenstein and Am ,1973).

كما تنتج صورة ارتباط أيونات CH_3Hg^+ بالألبومين (Ballatori ,1991 ; Yasutake *et al* .,1990) ذو البنية الثنائية كيميائيا مقارنة بمركب GSH والسيستئين (Rabenstein ,1978). أيضا، فقد وجد بأن مركب CH_3HgCl المدخل عبر المجرى الفمي يشكل معقد ارتباط مابين أيونات CH_3Hg^+ و الألبومين البلازمي (Yasutake *et al* ,1989).

.التوزيع النسيجي

يرتبط التوزيع النسيجي للزئبق بصورته الكيميائية وقابلية الارتباط بالمركبات الضامة للكبريت منها السيستئين ، والجلوتاتيون ، و N- acetylcystein (جدول 2) .

جدول (2) : التوزيع النسيجي للزئبق

التوزيع النسيجي	آلية التوزيع النسيجي
بالكبد	-ارتباط أيونات CH_3Hg^+ مع مركب السيستئين أو الجلوتاتيون يرفع درجة الالتقاط الكبدي لهذه الأيونات(Ballatori ,1991)
بالكلى	- التقاط معقدات الزئبق المرتبط بالسيستئين والتقاط مثيل الزئبق المرتبط بمركب الجلوتاتيون (Richardson and Murphy, 1975) - التقاط ميثيل الزئبق والزئبق اللاعضوي المرتبط بمركب N-acetylcystein (Zalups and Ahmad,2005)

3.2.1.1. الاحتباس النسيجي للزئبق

يتراكم الزئبق العضوي بالجهاز العصبي المركزي (Brawnwald *et al* ., 2001)، و بأنوية الخلايا الكبدية (Bryan *et al* ., 1974). و يحدث الاحتباس المخي لأيونات Hg^{+2} الناتجة عن أكسدة الزئبق العنصري Hg^0 (Optiz *et al* ,. 1996 ; Brawnwald *et al* ., 2001) .

4.2.1.1. طرح الزئبق

تختلف طرق طرح الزئبق باختلاف صوره. إذ يطرح الزئبق العنصري بالبول ، وبالفضلات ، وبالهواء. بينما يزال الزئبق اللاعضوي ضمن الفضلات وبالبول. كما يطرح مثيل الزئبق بالصفراء ليعاد امتصاصه معويا وفق الدورة المعوية - الكبدية (Clarkson, 2002) . إضافة ، فقد وجد بأن معقدات مثيل الزئبق المرتبطة باGSH تطرح عبر الصفراء (Dutczak and Ballatori ,1994 ;Ballatori ,1991).

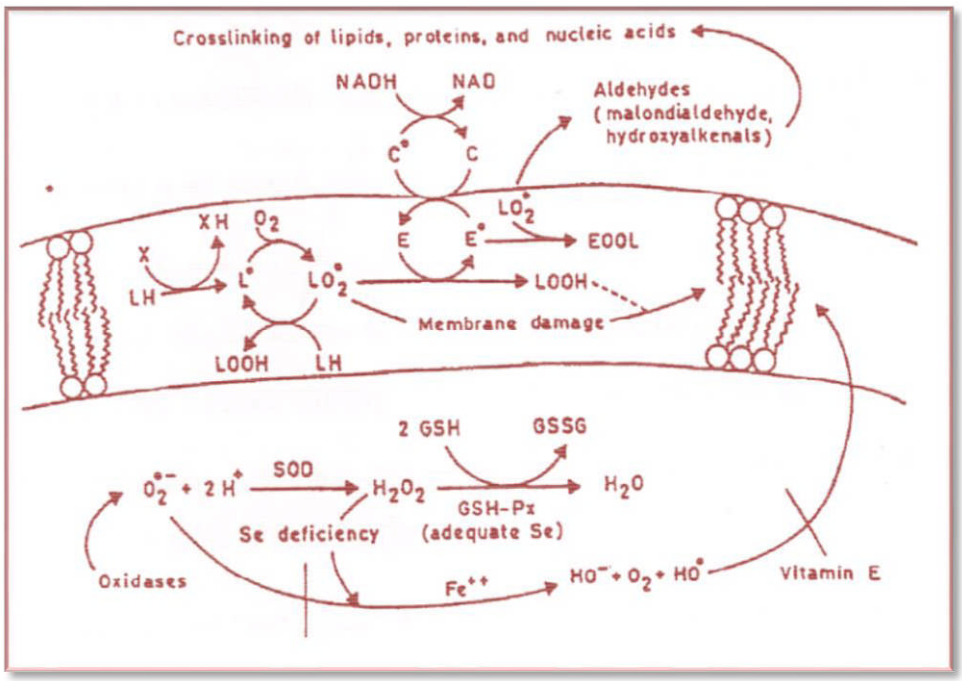
3.1.1. آليات الإجهاد التأكسدي الكلوي المحرض بالزئبق

يحرض الزئبق على ظهور الإجهاد التأكسدي بالكلى وذلك وفق آليات تعتمد على تفاعل ما فوق الأكسدة اللبيدية (Huang *et al* .,1996) ، والارتباط بمجاميع التيول (Lash *et al* .,1998) ، وحدوث اضطراب تأكسدي ميتوكندري (Lund *et al*., 1993) ، وآليات متواسطة بتفاعلات إلتهابية (Şener *et al* .,2007) .

1.3.1.1. تفاعل ما فوق الأكسدة اللبيدية بالأغشية

لقد اقترح تفاعل ما فوق الأكسدة اللبيدية كآلية لحدوث سمية بيولوجية المحرضة بمركب $HgCl_2$. إذ تظهر ما فوق الأكسدة اللبيدية بالكلى لدى الجرذان والفئران اثرإدخال $HgCl_2$ عبر الصفاق ; Huang *et al* ., 1996) Mahboob *et al* ., 2001).

ويعتبر تفاعل ما فوق الأكسدة اللبيدية أهم التفاعلات الكيميائية السامة التي تتطلب الجذور الحرة مركزية الأوكسجين والكربون (Hamilton *et al* ., 1997). إذ تعتبر سلسلة أكسدة الجذور للأحماض الدهنية غير مشبعة منها أحماض oleic ، و linoleic ، و linolenic ، وarachidonic المكونة للطبقة الثنائية اللبيدية كمصادر لوسائط تفاعلية منها جذور $L^{\cdot}$ و$LO^{\cdot}$ و$LOO^{\cdot}$ والتي تؤدي إلى هدم أكسدي للدهون وبالتالي حدوث تلف الأغشية. ووجد بأن المركبات الزئبقية العضوية المحبة للدهون لها القدرة على التداخل مع الجذور الحرة $L^{\cdot}$ و$LO^{\cdot}$ و$LOO^{\cdot}$ (Larock ,1985) ، إذ تتفاعل في شكل طليعة مؤكسدة محفزة بذلك بداية تفاعلات السلسلة لإنتاج $R^{\cdot}$ والناتج النهائي مالون دي ألدهيد (شكل1) (Madhavi *et al* .,1995).



شكل1 : تفاعل الأكسدة اللبيدية بالغشاء الخلوي(Madhavi *et al* .,1995).

إن أكسدة الأوكسجين الجزيئي لحمض oleic acid كمادة (LH) ، ينتج جذور لها أن تتداخل مع جزيئات الأوكسجين الجزيئي فتتشكل الجذور البروكسيلية (Hamilton *et al*.,1997 ; Stohs and Baghi ,1995).

أما الفائض منها يمكن أن يتفاعل مع R Hg X و R_2Hg (Lapert and Lednor, 1976).

$$R\,Hg\,X + LOO^{\bullet} \rightarrow R^{\bullet} + LOO\,Hg\,X$$

$$R_2\,Hg + LOO^{\bullet} \rightarrow R^{\bullet} + LOO\,Hg\,R$$

إن تفاعل التبديل الجذري يسمح بتشكل جذر وسيط مركزي المعدن

$$LOO^{\bullet} + R_2\,Hg \rightarrow [(LOO)R_2\,Hg^{\bullet}] \rightarrow (LOO)\,Hg\,R + R^{\bullet}$$

أما تفكيك الرابطة C-Hg يحفز على تشكل جذور عضوية نشطة $R^{\bullet}$ والتي تساهم مساهمة قوية في مرحلة اختزال $H^{\bullet}$ من جزيئة مادة LH والتي تستهدف تفاعل السلسلة عن طريق إنتاج جذر $L^{\bullet}$ وهو تأثير طليعي مؤكسد، إذ يرتبط تأثيره بطبيعة استقرار أنواع الجذور الحرة المتشكلة $R^{\bullet}$.

إن مركبات R_2Hg و RHgX تستخدم كطليعة مؤكسدة والتي توجه التلف التأكسدي للمركبات الهيدروبيروكسيدية LOO. هذه الأخيرة التي تعتبر أحد مؤشرات حدوث تفاعل ما فوق الأكسدة اللبيدية (Stohs and Baghi ,1995; Hamilton *et al* .,1997).

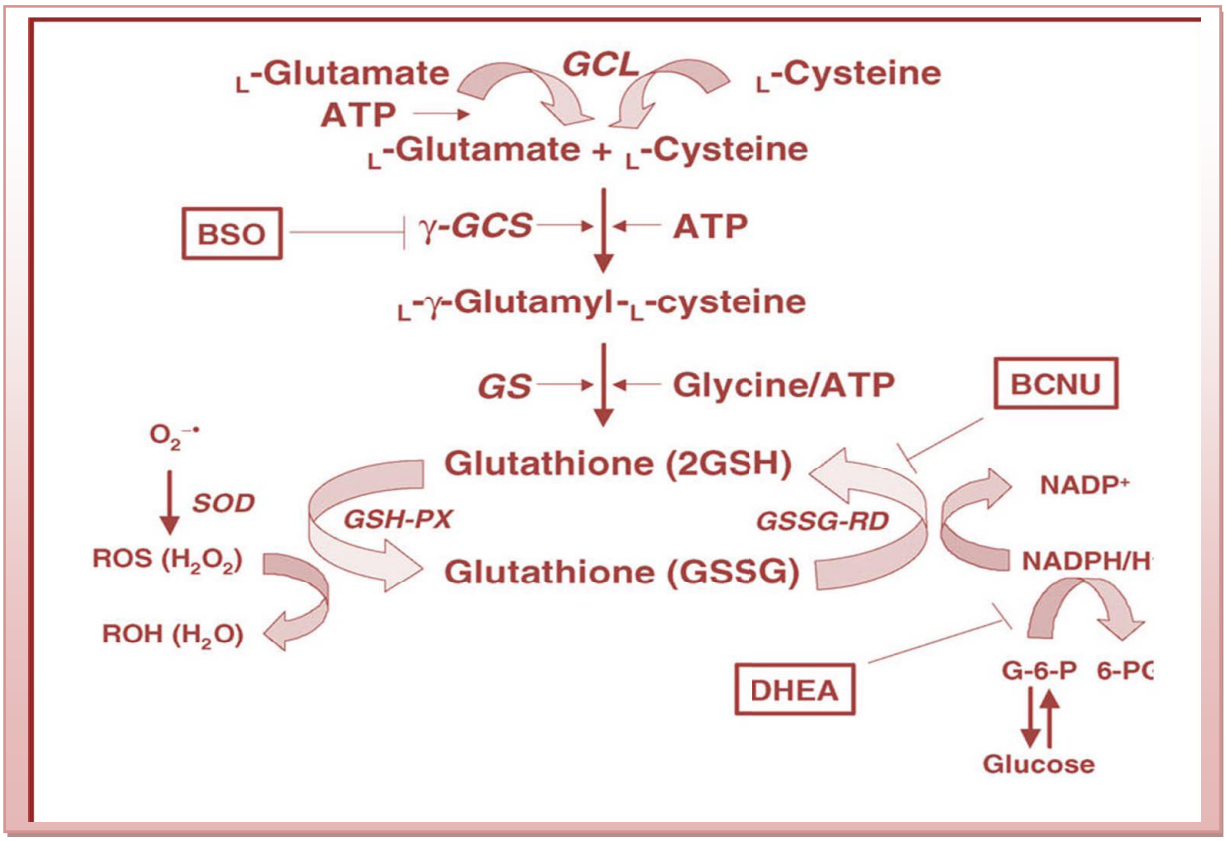
2.3.1.1.الإجهاد التأكسدي إثر ارتباط الزئبق بالمركبات الضامة لمجاميع التيول

تعتبر الكلى أول عضو مستهدف لأملاح الزئبق وذلك بسبب غناها بالتيول. حيث يرتبط الزئبق بالميتالوتيونين وبالجزيئات التيولية منخفضة الوزن (Perottoni *et al*., 2004) .

لقد أكدت الدراسات أن الزئبق يتراكم ضمن معلقات خلوية للأنبوب الملتوي القريب وذلك إثر التعرض لمركب $HgCl_2$ أو لمختلف مركبات الارتباط بمجاميع التيول (Lash *et al* .,1998).

إن المركبات البروتينية أو اللابروتينية الضامة لمجاميع التيول تربط أيونات الزئبق Hg^{2+} وفق ألفة معتبرة. وتشكل هذه المجاميع مواد ارتباط أساسية للزئبق بالأوساط الخلوية (Zalups and Lash ,1994). إن المحتوى الخلوي للتيول خاصة للجلوتاتيون، يمكن أن يغير الالتقاط الداخل خلوي ، والتراكم الخلوي ، وكذا سمية Hg^{2+} وذلك ضمن الأنبوب الملتوي القريب (Zalups and Lash ,1997; Berndt *et al* .,1985).

إن تعرض الجرذان إلى أيونات Hg^{2+} يحدث تغير بمحتوى GSH الخلوي، فالتراكيز المتزايدة منه تخفض من محتوى GSH وذلك بالقشرة وبالمنطقة النخاعية الخارجية. إضافة إلى ذلك ، فقد وجد بأن مختلف الإنزيمات المرتبطة با GSH الكلوي تزداد أنشطتها وأيضا ترتفع التراكيز الداخل كلوية منه إثر تعرض الجرذان لأيونات Hg^{2+} (Lash and Zalups ,1996). فال GSH يعتبر جزئية ضرورية في الدفاع الخلوي ضد المركبات السامة النشطة كيميائيا أو الإجهاد التأكسدي (شكل 2) (Hayes and McLellah,1999) ، إذ يؤدي الانخفاض المعنوي في مستوياته إلى إختزال فعالية النظام الدفاعي للإنزيمات المضادة للأكسدة وذلك إثر المعاملة بالزئبق Hg(II) (Şener *et al* .,2007). وقد أكدت دراسات (Zalups and Lash ,1994) حدوث الإجهاد التأكسدي وتفاعل ما فوق الأكسدة اللبيدية إثر إصابة المحتوى التيولي الداخل خلوي المحرضة بالزئبق اللاعضوي .

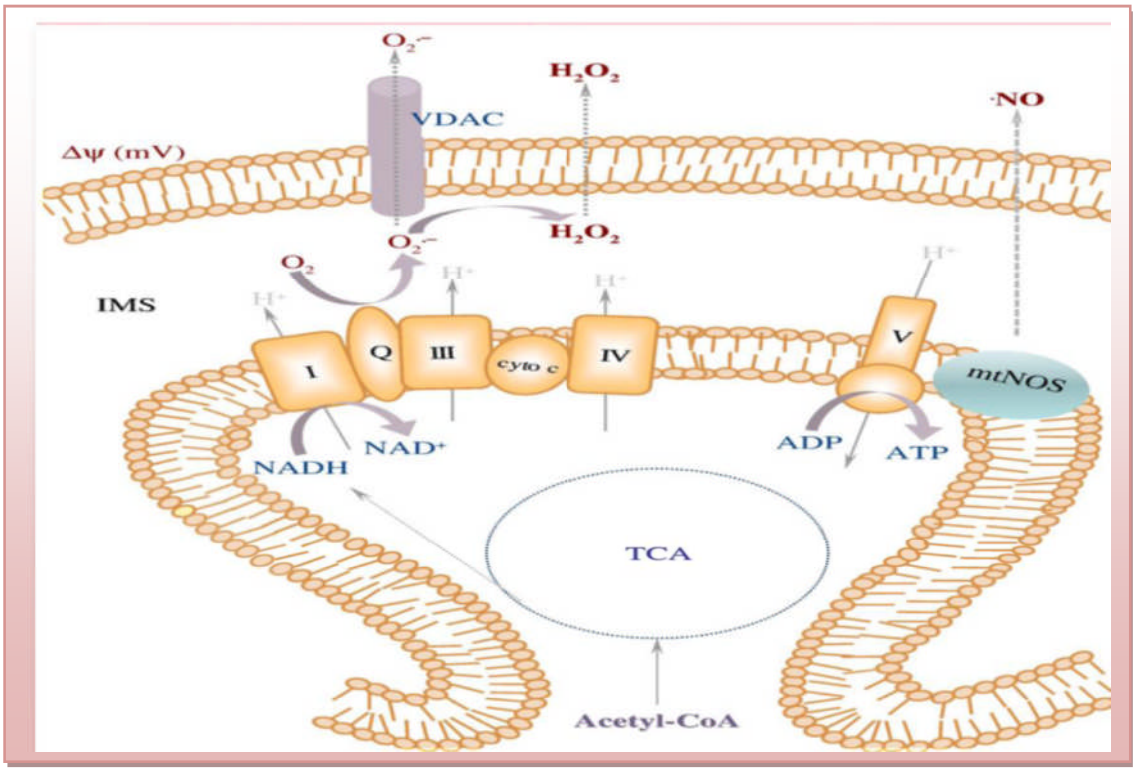


شكل 2 : الدورة الردوكسية والنظام الجلوثاثيوني (Hayes and McLellah,1999)

3.3.1.1.الإجهاد التأكسدي بالميتوكندرية

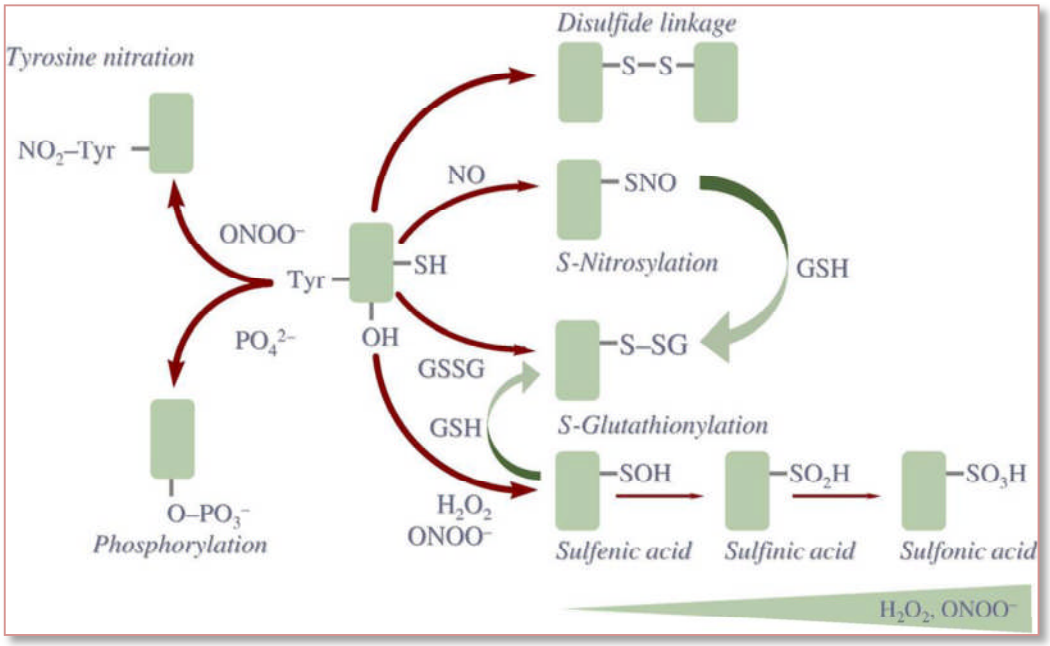
أشار(Farina *et al*, (2013 بأن المنغنيز ، والحديد ، والزئبق كل منها يحرض على الإجهاد التأكسدي خاصة بالميتوكندرية. كما أوضح Lund *et al*., (1993) بأن التأثيرات السامة الأساسية للزئبق Hg(II) تنتج عن الاضطرابات في التكامل البنيوي للأغشية الميتوكندرية الداخلية. أيضا، فإن الإصابة الوظيفية للغشاء الداخلي الميتوكندري المحرضة بالزئبق تنتج اثر انخفاض محتوى الجلوتاتيون الميتوكندري مع ارتفاع تشكيل H_2O_2 وذلك بتدخل سلسلة النقل الإليكتروني (Lund *et al* ., 1991).

و تعتبر سلسلة النقل الإليكتروني الميتوكندري أهم موقع لتوليد المؤكسدات النشطة الخلوية منها $O^{-}2$، و H_2O_2 و جذر أحادي أوكسيد الآزوت NO (شكل3) (Yap *et al* .,2009).



شكل3 : تشكيل المؤكسدات النشطة $O^{\cdot-}_2$ و H_2O_2 و $NO\cdot$ بالميتوكندرية (Yap *et al* .,2009)

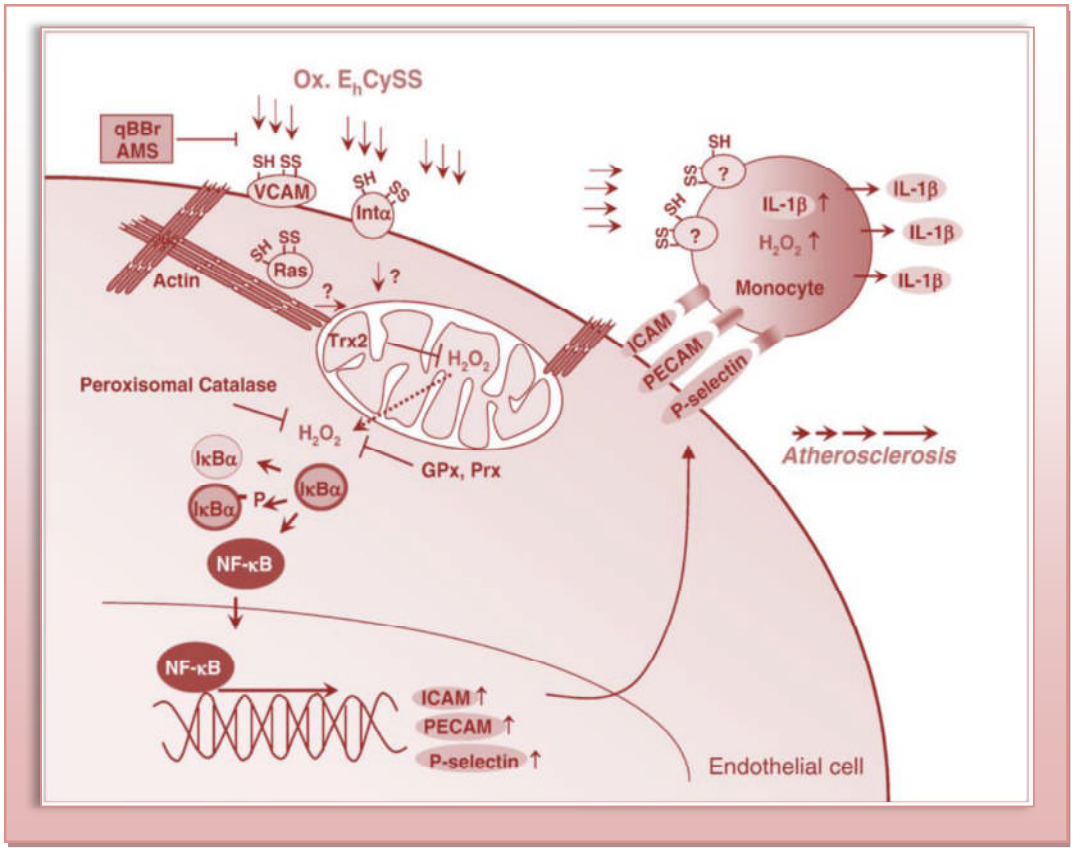
وقد وجد بأن ارتفاع انتاج H_2O_2 و/ أو $ONOO^-$ بالميتوكندرية يمكن أن يؤدي إلى تغير ردوكسي للبروتينات من خلال أكسدة بقايا السيستئين إلى حمض السلفونيك وتشكل روابط ثنائية الكبريت من خلال أكسدة GSH إلى GSSG (شكل 4) (Yap *et al* .,2009).



شكل 4: التغير الردوكسي للبروتينات بتدخل H_2O_2 و/ أو $ONOO^-$ (Yap *et al* .,2009)

4.3.1.1. الإجهاد التأكسدي المتواسط بتفاعلات الالتهاب

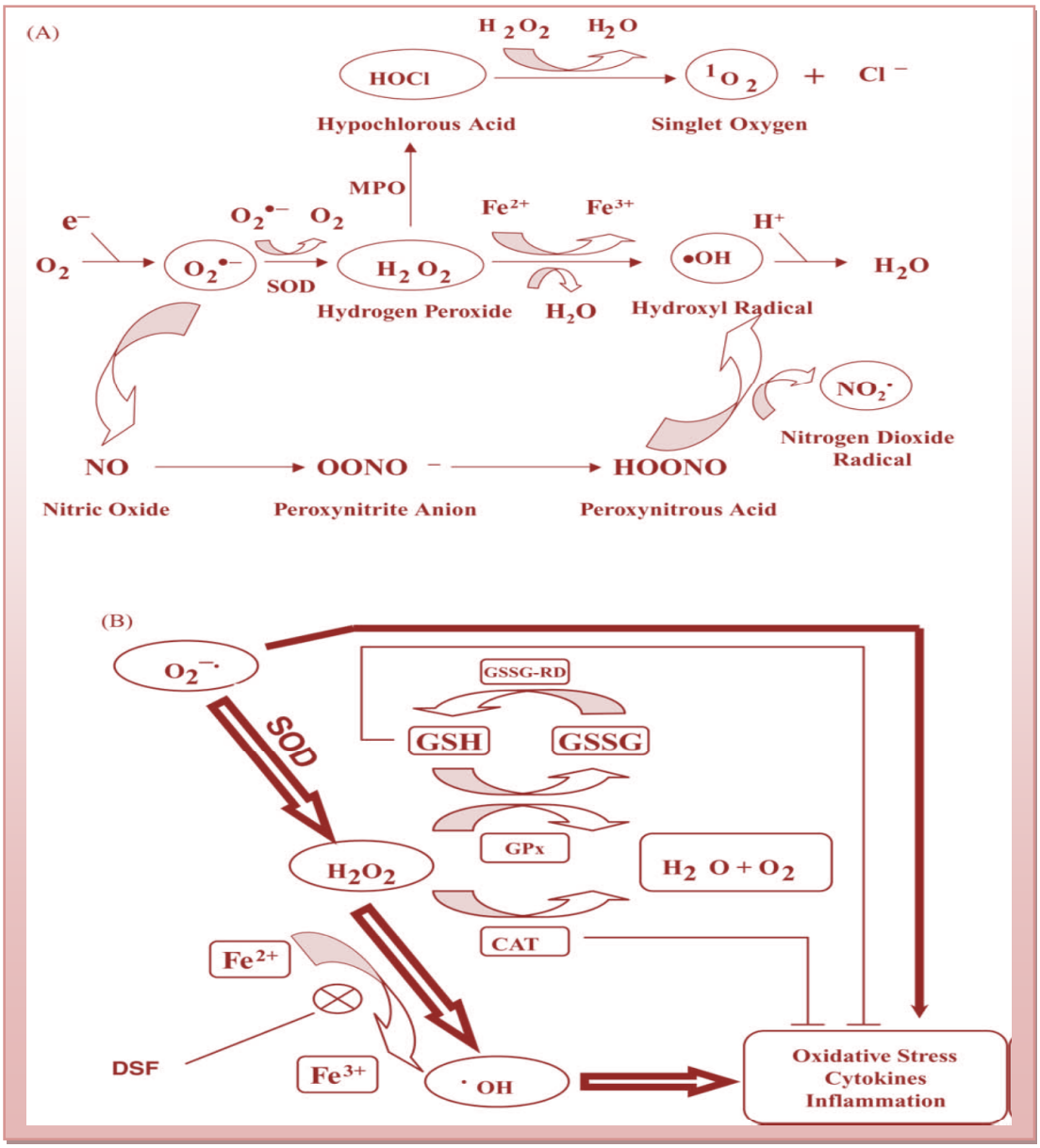
كشفت الأبحاث أن الجزيئات ذات الالتحام الداخل خلوي مثل (ICAM-1) ، و integrins ، و selectins تلعب أدوارا هامة في تنشيط الإستجابات الإلتهابية وذلك بتفعيل بعض كريات الدم البيضاء منها أحادية النواة (شكل 5) (Go and Jones ,2011).



شكل 5: جزيئات الالتحام الداخل الخلوي وتنشيط الاستجابات الالتهابية (Go and Jones ,2011)

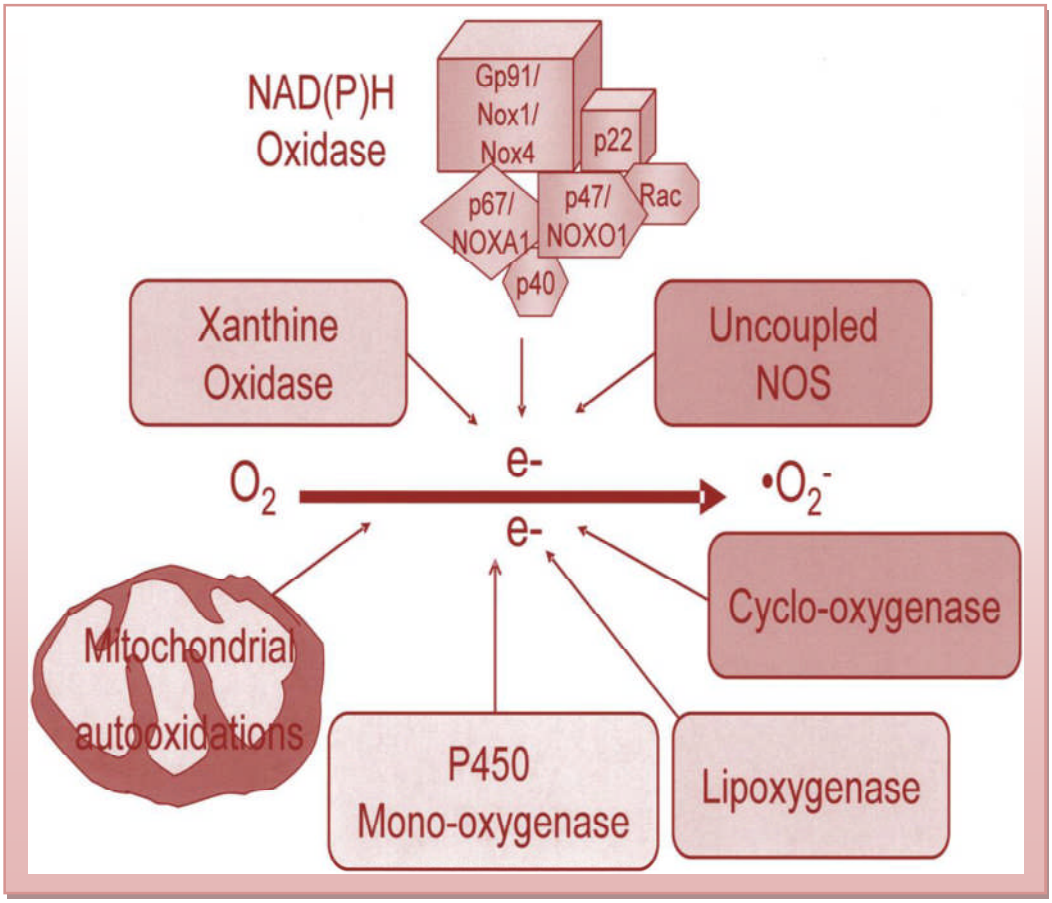
يؤدي التعرض للزئبق إلى اضطراب التعبير الجيني لبروتين Ksp-cadherin (Jiang *et al* .,2004) و كذا انفصال الروابط ما بين الخلايا التي تربط الخلايا النفرونية المتلفة ،مما ينتج عنه إفراز السيتوكينات وبعض الوسائط الالتهابية وجذب كريات الدم البيضاء باتجاه الموقع المتضرر (Prozialeck and Edwards, 2007). وتعتبر ICAM-1 إحدى جزيئات ارتباط كريات الدم البيضاء (Tipping and Timoshanko, 2005) منها المتعادلة ذات النشاط الإلتهابي المرتبط بإفراز إنزيم myeloperoxidase و انتاج ROS منها HOCl وتحويل

H_2O_2 إلى جذور حرة نشطة منها $^{\cdot}OH$ ، وتشكيل RNS كا $ONOO^-$ (شكل 6)(Liddell *et al.*,2004) ذات الأثر التأكسدي ببروتينات و دهون الكلى (Şener *et al* .,2007) .



شكل6 : مصادر الإجهاد التأكسدي والالتهاب وانتاج RNS وROS (Liddell *et al.*,2004)

أيضا تعتبر إنزيمات NAD(P)H oxidase ، وxanthine oxidase أهم المصادر المنتجة لأنيون $\cdot O_2^-$ والذي لايلبث أن يتحول وبسرعة إلى H_2O_2 و O_2 وذلك بتدخل إنزيم SOD (شكل 7) (Tamara *et al* .,2008)، و تشكل HOCl بتدخل إنزيم MPO (Liddell *et al.*,2004).



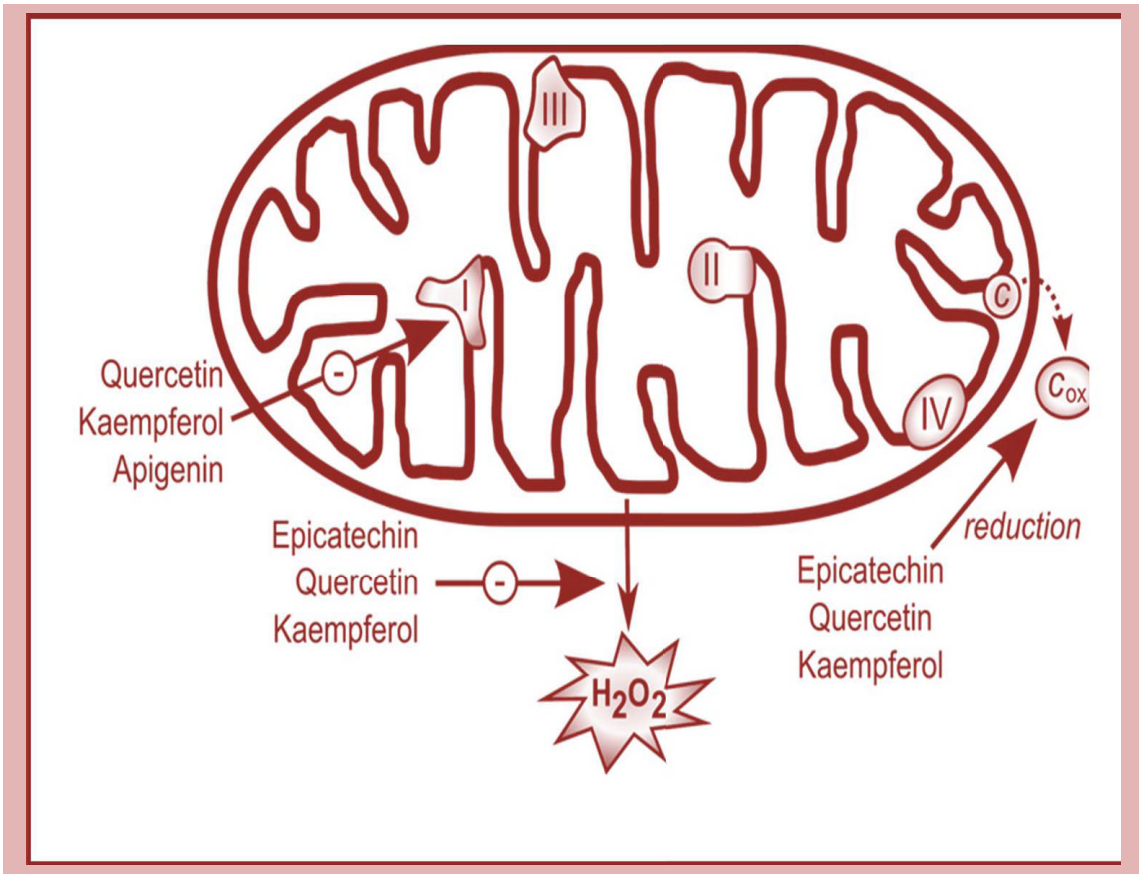
شكل 7 : مصادر انتاج جذر $O_2^{\cdot -}$ (Tamara *et al* .,2008)

2. المنتجات النباتية والوقاية النفرونية من أثر الزئبق

انصب اهتمام الباحثين على دراسة الأثر الوقائي النفروني للمنتجات النباتية وذلك للوقاية من أثر الزئبق، ويعزى ذلك إلى موادها الأيضية النشطة بيولوجيا منها الفيتامينات كفيتامين E ، والفلافونيدات.

إن دراسة Sharma *et al*, (2007) كشفت عن الأثر الوقائي الكلوي المضاد لتفاعل ما فوق الأكسدة اللبيدية لمستخلص طحلب *Spirulina fusiform* وذلك إثر معاملة الفئران بمركب $HgCl_2$. ويعزى الأثر الوقائي لهذا المستخلص إلى غناه بالـ β-carotene والذي له القدرة على التقاط الجذور الحرة المنتجة من طرف الزئبق. إضافة، فقد وجد بأن vitamin E الملتقط لجذرلبيد بيروكسيد $LOO^{\cdot}$ وبعض الجذور الأخرى يساهم في خفض تفاعل ما فوق الأكسدة اللبيدية لأغشية الخلايا. أيضا ، فإن سلينيوم هذا المستخلص يحفز على ضم السلينيوم إلى جزيئات إنزيم GPx وبروتينات أو مركبات مثل selenodiglutathione ، وselenocysteine ، و dimethyl selenide التي لها فعلا وقائيا ضد كل التأثيرات السامة للمعادن الثقيلة. كما ساهم مركب phycocyanin في خفض تفاعل مافوق الأكسدة اللبيدية واختزال السمية النفرونية لدى الفئران.

وفي دراسة أخرى أوضح Sharma *et al* .,(2005) بأن الفلافونيدات orientin و vicenin لمستخلص أوراق نبات *Ocimum sanctum* تملك فعلا تثبيطيا قويا ضد النشاط الجذري لجذر OH· المتشكل اثر التفاعل الفوتوني. بالإضافة إلى التأثير المضاد لتفاعل ما فوق الأكسدة اللبيدية وذلك بكلى الفئران المعاملة بكلوريد الزئبق و مستخلص أوراق *Ocimum*. أيضا ، فقد تبين أن quercetin كمركب فلافونيدي يملك فعلا مضادا لإنتاج H_2O_2 (شكل 8) (Lagoa *et al* .,2011).



شكل 8 : الأثر التثبيطي للفلافونيدات بالميتوكندرية وتثبيط انتاج H_2O_2 (Lagoa *et al* .,2011)

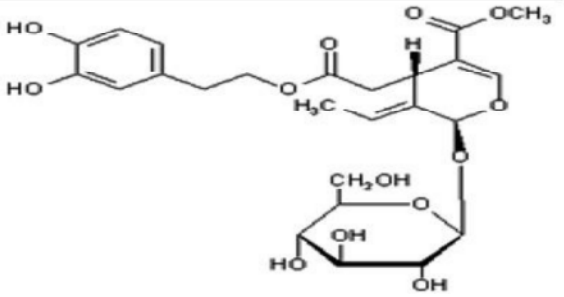
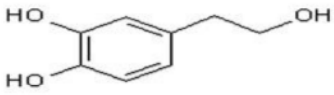
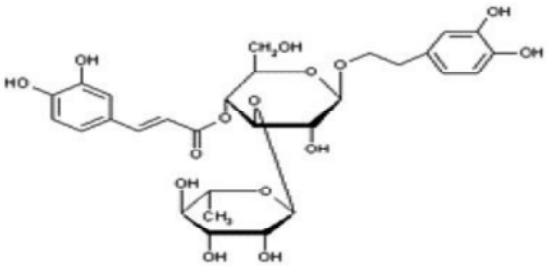
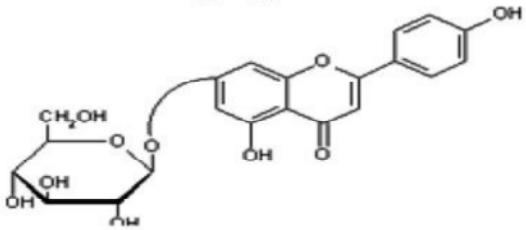
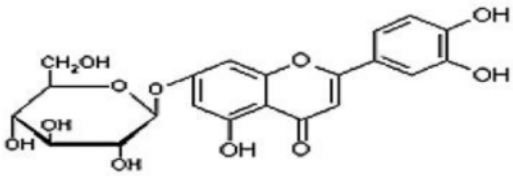
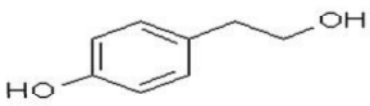
ويعتبر schisandrin B من اللجنينات النشطة المنقاة من ثمار *Schisandra chinensis*، حيث أوضحت الدراسات بأن schisandrin B يملك فعلا وقائيا مضادا للأثر السمي للزئبق المحرض على السمية الكبدية *in vivo* (Stacchiotti *et al* ., 2009). كما يؤمن schisandrin B رفع محتوى GSH المضاد للأكسدة (Chiu *et al*.,2005 ;Chen and Ko,2010). وقد أوضحت دراسة (Stacchiotti *et al* .,2011) أن إدخال مركب schisandrin B يحدد التلف الأنبوبي والميتوكندري المحرض بتركيز 3.5 مغ/كغ من الزئبق عبر الصفاق . كما توصل (Augusti *et al*., 2008) إلى كشف النشاط الوقائي لمركب astaxanthin ، والحماية من التغيرات النسيجية المحرضة بكلوريد الزئبق. حيث ارتفعت أنشطة إنزيمات GPx ، وCatalase،

بينما انخفض نشاط SOD. ويعتمد الأثرالوقائي لمركب astaxanthin على الفعل المضاد لجذور OH· والتلف التأكسدي المحرض بالأوكسجين الأحادي (Wu *et al.*, 2006 ; Bernstein *et al* ., 2001)، إضافة إلى فعله الآسر للأوكسجين النشط ، و تثبيط تفاعل السلسلة الجذرية داخل الغشاء حسب ما أقره (Goto *et al* 2001,.) . أيضا ، فإن ذرات الأوكسجين الأربعة لكل حلقة لمركب astaxanthin يمكن أن تتعامل مع أيونات المعادن مثل Cu II ، و Fe III (Zhao *et al*., 2005). كما يؤمن vitamin E الوقاية من التلف المتواسط بالمعادن منها الحديد ، والنحاس ، والكادميوم وذلك *in vitro* ، و *in vivo* (Valko *et al* .,2005). كما يثبط هذا الفيتامين تفاعل ما فوق الأكسدة اللبيدية لدهون الأغشية وذلك من خلال أسر جذورالبروكسيل اللبيدية القابلة للتحول إلى جذور tocopheroxyl والإرجاع إلى α-tocopherol بالتداخل مع مضادات الأكسدة كفيتامين C (Arita *et al.*, 1998) . كما كشف Agarwal *et al* , (2010) نجاعة الفعل الوقائي لفيتامين E وذلك بعد التعرض إلى الزئبق.

3 . نبات *Olea europaea* .L (*Oleaceae*)

إن *Olea europaea* .L (*Oleaceae*) ، عبارة عن أنواع خاصة من النباتات المنتشرة بحوض البحر الأبيض المتوسط ، وهي تستعمل لإنتاج الزيتون وزيته (Scognamiglio *et al* ., 2012) . وتعتبر شجرة الزيتون من الأشجار المعمرة. تتميز *Olea europaea* .L بأغصان كثيفة، و تأخذ أوراقها المتقابلة شكلا بيضويا وممتدا وتحمل بمعلاق قصير، وهي من الأوراق الدائمة خلال فترة فصل الشتاء. يختلف لون الأوراق، حيث يتميز الوجه العلوي بلون أخضرداكن ، خلافا للوجه السفلي الذي يميزه اللون الأخضر الفاتح الفضي مع وجود عرق وسطي تصدر منه أثلام. وتعتبر أزهار شجرة الزيتون من الأزهار الربيعية ، ذات لون أبيض وتتميز بكأس ، وسداتين ، وتويج يحمل أربع بتلات بيضوية الشكل ومبيض دائري. تجتمع الأزهار في شكل عناقيد صغيرة. أما فاكهة الزيتون فهي تأخذ لون أولي أخضروالذي يتحول إلى لون أسود وذلك خلال مرحلة النضج التام (Girre ., 2001).

إن الخصائص النافعة المرتبطة بزيت الزيتون ترجع إلى غناه بحمض oleic. حاليا ، فإن الكثير من التأثيرات النافعة لزيت الزيتون البكر تعزى إلى مركبات أيضية ثانوية تشتق من مسالك الأيض shikimate ، وأيض phenyl propanoid (Ryan and Robards, 1998)، منها الفينولات الكحولية كمركب hydroxytyrosol ، و tyrosol ، ومركباته الجليكوزيدية و secoiridoids والتي تشمل مركب oleuropein (شكل9) (Granados-Principal *et al* .,2010).

Phenolic compound	Chemical formula
Oleuropein	
Hydroxytyrosol	
Verbascoside	
Apigenin-7-O-glucoside	
Luteolin-7-O-glucoside	
Tyrosol	

شكل9 : مركبات فينولية بنبتة *Olea europaea* .L (*Oleaceae*)

(Granados-Principal *et al* .,2010)

1.3. المحتوى الفينولي بأوراق وزيتون وزيت *Olea europaea* .L

تضم أوراق الزيتون ، وثمار الزيتون وزيته كما ونوعا مختلفا من المركبات الفينولية (جدول 3) .

جدول (3) : المحتوى الفينولي بأوراق وزيتون وزيت *Olea europaea* .L

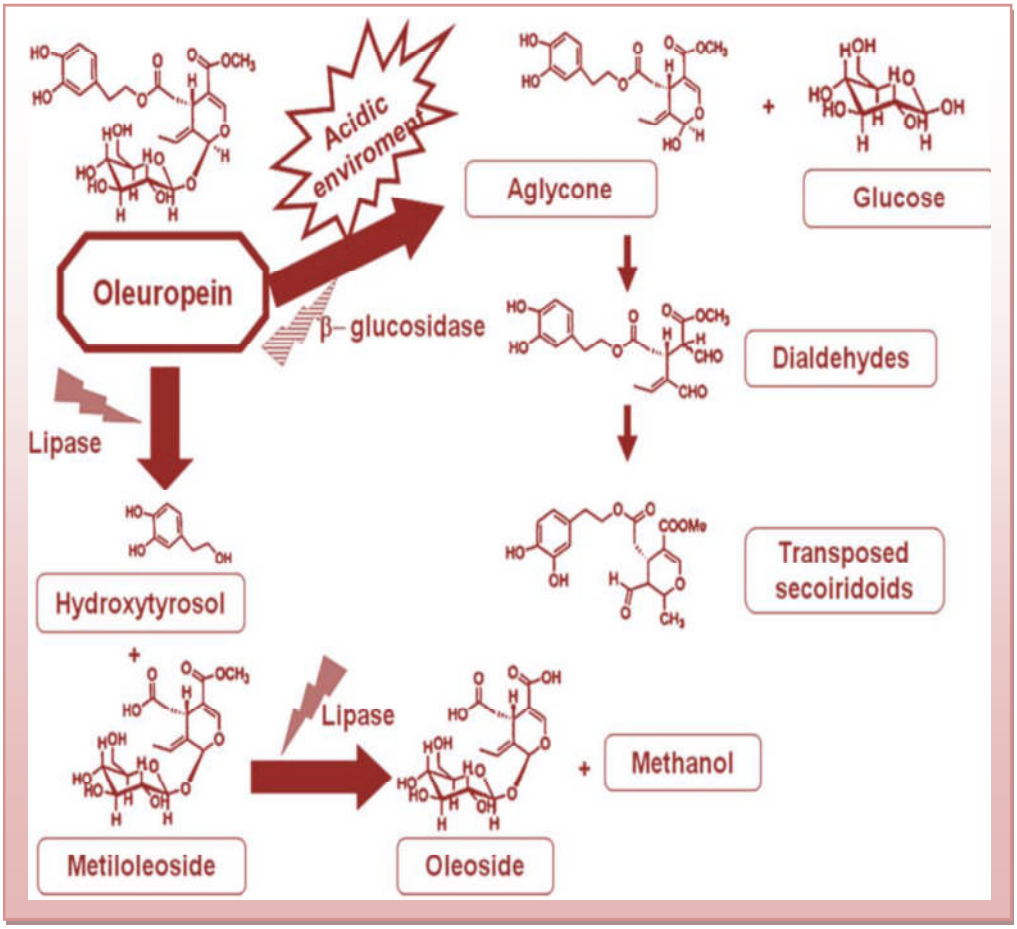
الجزء الحيوي	المركب الفينولي
الأوراق (Bouaziz and Sayadi,2005)	**-مركبات Oleuropeosides** -Verbascosideو Oleuropein - **Flavonol**: rutin - **Flavan-3ols**: Catechin **- مركبات الاستبدال:** Caffeic acid ، و Vanillin ، و Hydroxytyrosol، و Tyrosol
الزيتون (Fki *et al*., 2005)	Rutinو Quercetin 3-O-glucoside ، و Luteolin 7-O-glucoside و Oleuropein ، و Chrysoeriol، و Apigenin، و Lutoelin ، وQuercetin و Hydroxytyrosol
زيت الزيتون (Rios *et al*., 2005)	**-الفينولات البسيطة** تشمل مركبات Hydroxytyrosol ، و tyrosol ، و vanillic acid ، وvanillinو p-coumaric acid ، و Ferulic acid ، و 4Ethyl phenol ، و tyrosol ، وHydroxytyrosol acetate **-الفينولات العديدة** تشمل Flavonoids و Apegeninو Luteolin (Brenes *et al*.,1999) - **Secoiridoids** Oleuropein glucoside **-اللجنينات** +pinoresinol و1-acetoxy pinoresinol+

2.3. صيدلانية المركبات الفينولية لشجرة الزيتون

1.2.3. الامتصاص

أحرز البحث فيما يخص كشف أيض وامتصاص المركبات الفينولية تقدما واضحا في السنوات الأخيرة. فقد طورت طرق حديثة وفعالة لتقييم مستويات المركبات الفينولية السائدة وموادها الأيضية المنتشرة بالبلازما (Tan *et al*., 2003 ; Ruiz – Gutierrez *et al*., 2000) ، أو بالبول (Bazoti *et al*., 2005).

يرتبط امتصاص المركبات الفينولية ارتباطا وثيقا بنوع المركبات الفينولية الحيوية. وتعتبر عملية نزع الجزء السكري للمركبات الفينولية المجلكزة ضرورية جدا حتى يسهل الانتشار المسهل للجزء الفينولي الحيوي مثلما يحدث لمركبoleuropein و ذلك بتدخل إنزيم β-glucosidase النشطة سواء تلك الموجودة ضمن ثمار الزيتون ، أو تلك النشطة بخلايا بطانة المجرى المعدي المعوي. حيث أمكن كشف التحلل المائي لمركب oleuropein عند توفر ظروف معدية (Corona *et al* .,2006). كما يميه oleuropein إلى مركب hydroxytyrosol و metiloleoside بتدخل إنزيمات lipases (Carrera-Gonzàlez *et al* ., 2013) (شكل10).



شكل 10: التحولات الأيضية لمركبoleuropein (Carrera-Gonzàlez *et al* ., 2013)

.آلية امتصاص oleuropein

يؤمن نقل oleuropein بواسطة نواقل الجلوكوز المشابهة لنواقل الصوديوم المرتبط بالجلوكوز (SGLT1) والتي تم الكشف عنها بالخلايا المخاطية للمعي الدقيق ليسمح بنفاذه داخل الخلايا. وباستعمال تقنية التروية الموضعية بالمعي وعند توفر شروط منخفضة التوتر، وجد أن نفاذية oleuropein تزداد معنويا ، ويعزى ذلك إلى فتح الوصلات الموجودة ما بين الخلايا (Edgecombe *et al* ., 2000) .

.آلية امتصاص hydroxytyrosol و tyrosol

حسب ما أوضحته Manna *et al* ,(2000) وباستعمال خلايا ذات الطبقة الأحادية لخلايا من نوع Caco-2 ، فإن دراسات الحركية كشفت بأن hydroxytyrosol يمتص كميا عند مستويات معوية عن طريق آلية الانتشار المسهل ثنائي الاتجاه. وقد أكدت هذه النتائج دراسة Corona *et al* .,(2006) إذ تبين أن كل من hydroxytyrosol و tyrosol يخترقان اللفائفي والصائم وكذا الطبقة الأحادية لخلايا من نوع Caco – 2 وذلك *in vitro*.

2.2.3. التحول الحيوي للمركبات الفينولية لشجرة الزيتون

تعاني المركبات الفينولية الممتصة تفاعلات المثيلة ، والارتباط بحمض الكبريت ، و حمض الجلوكورونيك. إذ تؤثر بعض التغيرات على الخصائص البيولوجية للمواد الأيضية الدورانية مثلما يحدث لبعض الأدوية. ويتحدد الموقع الأيضي الأولي بقيمة الجرعة. فالجرعات الكبيرة يتم تحويلها بداية بالكبد ، بينما تحول الجرعات الصغيرة بمخاطية الأمعاء (Piskula and Terdo , 1998).

تعاني المركبات الفينولية تفاعل الارتباط مع حمض الجلوكورونيك (Miro casas *et al* . , 2003). ولقد كشفت الدراسات *in vitro* عن التحولات الأيضية للمركبات الفينولية وذلك باستعمال الخلايا السرطانية لكبد الإنسان Hep G2 . حيث تبين وجود صور مميثلة وأخرى مرتبطة بحمض الجلوكورونيك للمركب الفينولي hydroxytyrosol وذلك بعد مرور 18 ساعة من التحضين. وينتج عن تحول hydroxytyrosol acetate الصورة الحرة لمركب hydroxytyrosol، و ترتبط كميات منه بحمض جلوكورونيك. و توصلت الدراسة ذاتها إلى كشف أيض ضئيل لمركب tyrosol في شكل فينول مرتبط بحمض جلوكورونيك وذلك بنسبة < 10 % بعد مرور 18 ساعة من التحضين (Mateos *et al* .,2005).

إضافة ، وباستعمال الخلايا المعوية Caco - 2 ، فقد تبين أن مركب hydroxytyrosol يتحول إلى مشتق من نوع $O-$ methylated بتدخل إنزيم cathecol $-O-$ methyl transferase (Manna *et al* .,2000) . كما تم الكشف عن صور ارتباط hydroxytyrosol بحمض الجلوكورونيك وبالـ GSH (Corona *et al* .,2006).

3.2.3. الإطراح

إن مختلف دراسات الحركية الصيدلانية المقدرة لنواتج أيض الفينولات أمكن توضيحها من خلال نماذج حيوانية. إذ تمكن (2003) , Del Boccio *et al* من قياس التراكيز البلازمية لمركب oleuropein وhydroxytyrosol لدى جرذان غذيت بجرعة أحادية من oleuropein. حيث كشف عن وجود oleuropein بالبلازما وقد بلغ مستويات قصوى 200 نانوغرام/مل في حدود 2 ساعة مع ظهور كميات ضئيلة من hydroxytyrosol. يطرح كل من oleuropein وhydroxytyrosol بالبول في صور مرتبطة بحمض الجلوكورونيك (Del Boccio , 2003). و سجل طرح بولي وبنسبة 90 % من hydroxytyrosol المشع (^{14}C) المدخل لدى الجرذان بعد مرور 5 سا من حقنه، بينما طرح ما يقارب 5 % من المركب الفينولي بالفضلات وبالمجرى المعدي المعوي. كما يطرح hydroxytyrosol كلويا في صورته الأصلية أو في شكل مواد أيضية مرتبطة بحمض الجلوكورونيك ، وsulfate conjugate ، و homovanillic acid ، و homovanillic alcohol ، و3,4 – dinydroxypheny aceticacid و 3,4 – dihydroxy – phenyl acetaldehyde. و يطرح tyrosol في صورة أصلية وأخرى مرتبطة (Tuck and Hayball , 2002).

و تتشابه النواتج المطروحة لدى الإنسان والحيوان حسب ماأوضحه (De la Torre Carbot *et al*.,2006). إذ من الممكن إيجاد كل من hydroxytyrosol monoglucuronide ، و hydroxytyrosol mono sulfate ، وtyrosol glucuronide ، وtyrosol sulfate ،وhomovanilicacid sulfate بالـ LDL ومركبات مرتبطة بحمض الجلوكورونيك وذلك ضمن البول (De la torre carbot *et al* . ,2006) . كما كشف عن طرح بولي لمركبات hydroxytyrosol و، أو homovanilic alcohol بتدخل إنزيم aldehyde alcohol dehydrognase وذلك بعد مرور 24 ساعة من تناول أفراد متطوعة وسليمة لزيت الزيتون البكر (D'angelo *et al* .,2001). وقد وجد أن ما يقارب 98% من hydroxytyrosol يبدو منتشرا بالبلازما ، وبالبول وذلك في صورة مرتبطة خاصة بحمض الجلوكورونيك ، مما يؤكد التحول الكبدي والانتقال الأيضي الأولي لمركب hydroxytyrosol الممتص من المعي إلى الكبد (Miro-Casas *et al* .,2003). وقد قدر Vissers *et al*, (2004) أن التراكيز البلازمية لمركب hydroxytyrosol تصل 0.06 مكرومول/ ل وذلك اثر استهلاك 50 غ من زيت الزيتون كل يوم الذي يضم 2 مغ من hydroxytyrosol.

3.3. الأثرالوقائي النفروني للمنتجات الفينولية لنبات *Olea europaea* .L

يعتبر تقدير الجرعات الآمنة للمركبات الفينولية أو مستخلصات نبات *Olea europaea* .L خطوة ضرورية لمعرفة تأثيرها على مختلف الوظائف الحيوية خاصة الكلوية . فحسب نتائج Farag *et al*,(2006)، اتضح أن ادخال محتوى فينولى يساوي 215 ppm بالعصير المائي الخام لأوراق الزيتون من نوع Kronaku عبر الأنبوب المعدي قد سمح بتأمين الحفاظ على الوظيفة الكلوية ، وكذا البنى النسيجية. كما كشفت الأبحاث الحديثة عن الأثر الوقائي المضاد للإصابة النفرونية المحرضة بمختلف المواد الكيميائية وذلك باستعمال مختلف المنتجات الفينولية لنبات *Olea europaea* .L بنماذج الإختبار *in vivo* أو*in vitro* . فحسب دراسة Mahmoudi *et al*., (2015) ، أمنت مستخلصات أوراق الزيتون Chemlali الغنية بمركب oleuropein، أوتلك الغنية بمركب hydroxytyrosol دورا مضادا للأكسدة حيث عدل نشاط إنزيم catalase ،و مستوى MDA بالكلى لدى جرذان مرضعة والمعاملة بمركب bisphenol A والذي كشف عنه بالبلاستيك الصلب ، وبأغلفة الأغذية ، والأوعية الحافظة للمشروبات. ويتميز هذا المركب بقدرة التأثير في مسارات مماثلة لتلك الخاصة بهرمون الأستروجين وهرمونات أخرى .

وبالمثل ، فقد أدى الإدخال المسبق لجرعات تتراوح مابين 5-25 مغ/كغ من وزن الجسم من مركبات زيت الزيتون إلى الوقاية من تفاعل الأكسدة مافوق اللبيدية ، والحفاظ على محتوى α-tocopherol الداخلي وذلك بأغشية كلى الجرذان المحقونة بمركب ferric nitrolo acetate الذي يضم 15 مغ من الحديد /كغ من وزن الجسم (Deiana *et al* ., 2007).

وكشفت دراسة Deiana *et al,* (2008) عن القدرة الوقائية المضادة لتفاعل مافوق الأكسدة اللبيدية للمركب الفينولي hydroxytyrosol ، وناتجه الأيضي homovanilic alcohol وذلك على مستوى الأحماض الدهنية غير مشبعة ، والكولسترول بأغشية خلايا مخاطية كلى الخنزير LLC-PK1 المعاملة بمركب H_2O_2 . وبالمثل ،

أدى استعمال hydroxytyrosol glucuronides إلى حدوث أثر وقائي فعال مضاد للتلف التأكسدي مقارنة بمركب hydroxytyrosol ، حيث ثبط تشكل كل من hydroperoxides و 7- ketocholesterol، والأحماض الدهنية من نوع hydroperoxides اثر معاملة مزارع خلايا LLC-PK1 بمركب H_2O_2 Deiana *et al* ., 2011).

بالإضافة ، فإن منتجات L. *Olea europaea* تملك قدرات وقائية أخرى ، منها الأثر المضاد لأكسدة LDL ، و الأثر المضاد للتراص الصفائحي ، و الأثر المضاد للميكروبات ، والأثر المضاد للسرطان ، وأيضا الأثر المضاد للالتهاب (جدول 4) .

جدول (4) : الأثر الوقائي لمنتجات *Olea europaea* .L

نوع الأثر الوقائي	النشاط الوقائي للمستخلص / المركبات الفينولية لشجرة الزيتون
الأثر المضاد لأكسدة LDL	- يضاد hydroxytyrosol فعل أكسدة LDL وذلك داخل intima الشريان (Soni *et al*., 2006)
الأثر المضاد للتراص الصفائحي	- يخفض hydroxytyrosol بناء B_2 thromboxane ضمن نموذج البلازما الغنية بالصفائح وذلك *in vitro* (Petroni *et al*.,1997) - يثبط hydroxytyrosol انتقائيا إنتاج eicosanoid و بتدخل إنزيمات -5و -12 lipooxygenase لكريات الدم البيضاء (Visioli *et al*, 2005) - يثبط hydroxytyrosol بناء E_2 prostaglandin بتثبيط لا مباشر للإنزيمات المنشطة لإنزيم nitric oxide synthase و2- cyclooxygenase بالفئران من نوع J774 من (Maiuri *et al*., 2005)
الأثر المضاد للميكروبات	- يضاد hydroxytyrosol فعل العوامل المعدية للمجاري التنفسية ، و المعدية المعوية مثل *vibroparahaemolyticus*، *Vibrio cholerae*، *Salamonelle typhi*، *Haemophilus influenzae*، *Staphylococais aureus* (Bisignano *et al*., 1999) - يضاد زيت الزيتون ، ومستخلصات أوراق الزيتون نشاط للميكروبات بكتيريا *Escherichia coli*، و *Candida albicans* ، و *kluyreromyces marxianus*، و *Clostridium perfringens* ، و *Streptococcus mutans* و *Shigella sonnei* و *Salmonella enterica* (Medina *et al* .,2006)
الأثر المضاد للسرطان	- يثبط hydroxytyrosol نمو ،و التكاثر الخلوي ،و الموت الخلوي ضمن خلايا HL60 (promyelocytic leukemia) ،وخلايا HT29 (colon adenocarcinoma)(Della Ragione *et al*, 2000) - يثبط lydroxytyrosol التكاثر الخلوي ويوقف طور G1 للدورة الخلوية HL 60 (Fabiani *et al*., 2002)
الأثر المضاد للالتهاب	- كبح النشاط الإنزيمي لإنزيم MPO(Visioli *et al* . , 2002) بتدخل المركبات hydroxytyrosol و oleuropein

III- الدراسات الكيميائية

1. طرق ومواد العمل

1.1. المادة النباتية *Olea europaea* L

جلبت خمسة أصناف من ثمار الزيتون الناضج *Olea europaea* L المزروعة بإيطاليا Coratina ، وFrantoio ، وLeccino ، و Matiatica ، و Ogliarala وصنفان من الجزائر Chemlal و Sigoise سنة 2012. قطفت ثمار الزيتون يدويا خلال مرحلة الجني لإنتاج الزيت. حيث تم انتقاء الثمار السليمة من التلف الفيزيائي وعديمة الإصابة بأي نوع من الإنتان الميكروبي. جمدت الثمار في سائل الآزوت وذلك لتثبيط الأنشطة الإنزيمية واستعمل جهاز التجفيف لإزالة الماء منها. بالنسبة للأوراق، تم قطف عشوائي لأوراق شجرة الزيتون *Olea europaea* من صنف Chemlal وصنف Sigoise من منطقة واد سوف بالجنوب الشرقي للجزائر وصنف Cilento من إيطاليا سنة 2011. جففت الأوراق هوائيا بعيدا عن الأشعة الضوئية ، ثم سحقت واستعملت للحصول على المستخلص الميثانولي(شكل11).

2.1. التصنيف النباتي (Quezel and Santa ,1963)

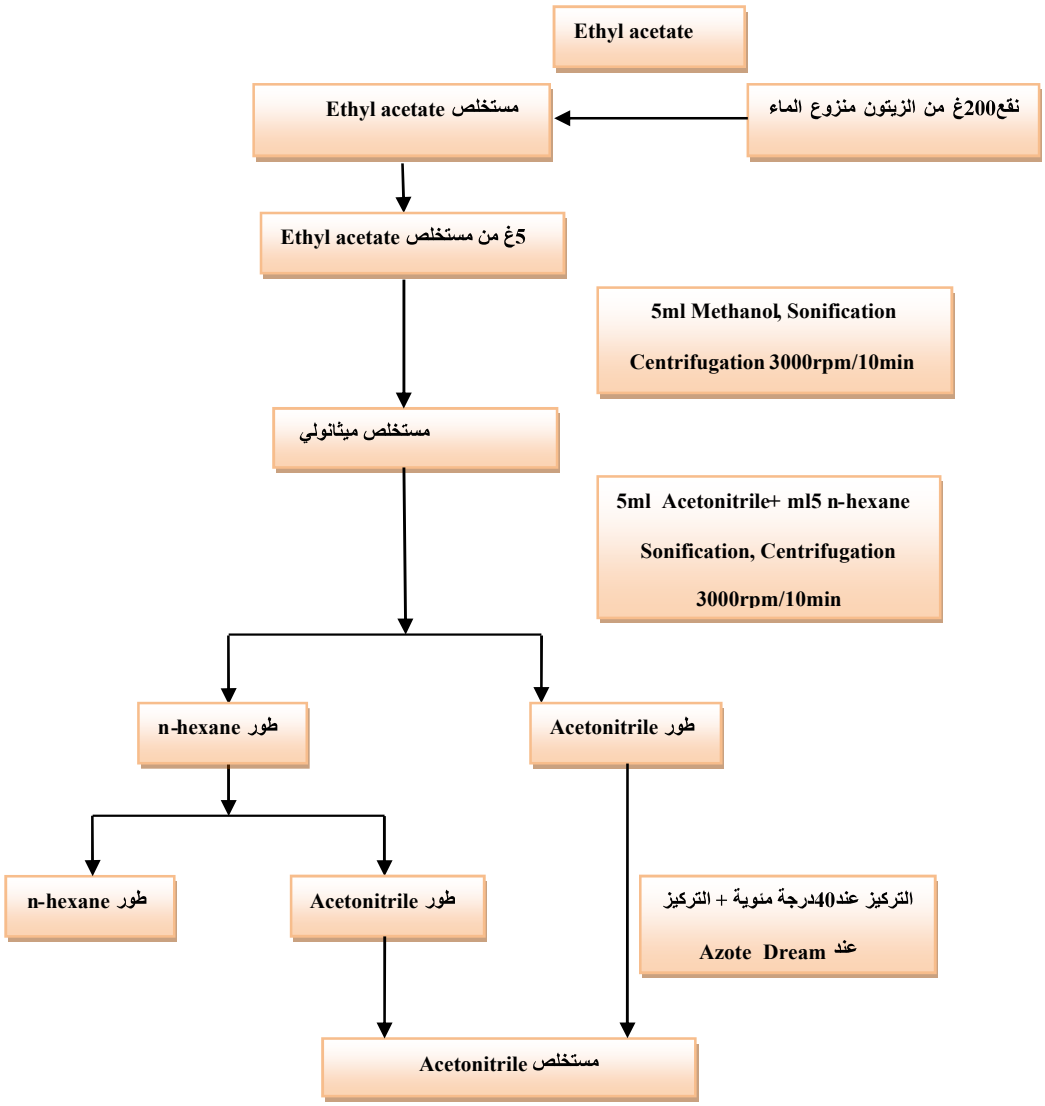
Embranchement	Spermatophyte
Sous embranchement	Angiosperme
Classe	Dicotylédones
Famille	Oléacées
Genre	*Olea*(L)
Espèce	*Olea europaea* L

شكل11 : أوراق الزيتون وفاكهة الزيتون *Olea europaea* L

3.1. ثمارالزيتون

1.3.1. الاستخلاص

جففت ثمار الزيتون الناضج باستعمال جهاز lyophilisateur ،ثم نقعت كمية 200 غرام من الزيتون منزوع الماء في محلول ethyl acetate لكل صنف من الأصناف المنتقاة . كررت العملية 3 مرات ثم جففت المستخلصات المحصل عليها بمجفف. أخذ 5غ من مستخلص ethyl acetate وأضيف 5مل من الميثانول ورج المزيج صوتيا ثم طرد مركزيا بسرعة 3000 rpm مدة 10دقائق. جزءت مستخلصات الميثانول المحصل عليها باستعمال *n* hexane / acetonitrile (شكل 12). ولتعريف وتحديد كمية أغلبية المركبات الفينولية بزيتون أصناف *Olea europaea* المنتقاة، استعمل RP-HPLC المرفق بكاشف DAD وحدد زمن الاحتباس باستعمال المحاليل القياسية. واعتمادا على منحنيات المعايرة ، أمكن حساب القيم الكمية للمركبات الفينولية.



شكل 12: تحضير مستخلص ethyl acetate و Acetonitrile للزيتون (Cioffi *et al*.,2010)

2.3.1. الفصل باستعمال HPLC / DAD

حللت مستخلصات acetonitrile المحصل عليها عن طريق Agilent RP Agilent1200series HPLC (Technologies, paloAlto,CA,USA) والمجهزة بمضخة ثنائية (G-1312A) مع وجود ملتقط أتوماتيكي للعينات (G1329A) ،و كاشف 1315 (DAD) ، وعمود OnYX monolithic(50x2 m m C18, phenomenex , Italy). تمثل المملص المتحرك في مذابين أحدهما عبارة عن الماء المحمض (A) (Millipore, Bedford, MA, USA) مع 0.1% TFA أما الآخر عبارة عن الميثانول (B) . حيث استعمل B % 0 عند 1 دقيقة ، B %30-0 عند 6.7 دقيقة ،و B % 70-30 عند 13.7 دقيقة ، و B % 90-70 عند 14.5 دقيقة ، و B % 90 عند 19.7دقيقة. أذيبت الكسور في الماء وحقن حجم 50 مكرولترفي جهاز HPLC . تكرر العملية ثلاث مرات لكل مستخلص على حدى. وقدرت نسبة تدفق التيار بحجم 0.6 مل/د وسجل الكروماتوغرام عند 278 nm .

3.3.1. المحتوى الكلي للمركبات متعددة الفينولات بثمارالزيتون

أمكن تحديد المحتوى الفينولي باستعمال كاشف Folin-Ciocalteu حسب Condelli *et al.,* (2015) ، إذ أضيف 75 مكرولتر من العينة المميهة إلى 425 مكرولتر من الماء المقطر، و 500 مكرولتر من كاشف Folin-Ciocalteu، و 500 مكرولتر من محلول كربونات الصوديوم (10% w/v). رج المزيج ووضع في وسط مظلم مدة 60 دقيقة. قرأ التفاعل عند 723 نانومتر واستعملgallic acid كمرجع قياسي. عبرعن النتائج كمغ من gallic acid مكافئ / غ من المستخلص.

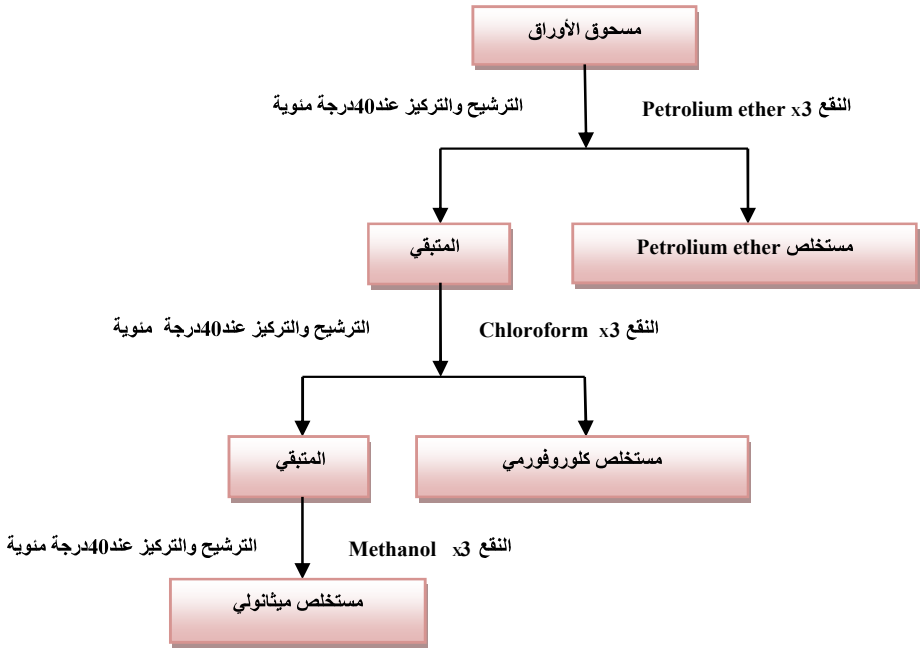
4.3.1. محتوى Tanin

استعمل اختبار ترسيب البروتين لتقدير المحتوى الكلي من tanin بالزيتون (McArt *et al* .,2006) . رسبت المستخلصات باستعمال BSA ثم طردت مركزيا. أذيبت الرواسب في 1 مل من مزيج SDS (1%)- Triethanolamine (5%). أضيف 250 مكرولتر من كاشف ferric chloride ثم مزجت المحاليل. بعد مرور 30 دقيقة ، قرأ التفاعل عند 510 نانومتر. وعبرعن النتائج كمغ من tannic acid مكافئ / غ من المستخلص.

4.1. أوراق الزيتون

1.4.1. الاستخلاص

نقعت كمية 180 غرام ، و288 غرام و230 غرام من مسحوق أوراق الزيتون لأنواع Cilento ، و Sigoise ، وChemlal على الترتيب . تم الاستخلاص في المذيبات ذات القطبية المتزايدة ابتداء بالبترول إيثر، والكلوروفورم ، والميثانول على الترتيب. كررت عملية النقع ثلاث مرات وذلك بتجديد المذيب بحجم (3× 2لتر) (شكل13).



شكل13 : تحضير المستخلص الميثانولي لأوراق الزيتون (Cioffi *et al*.,2010)

حصل على ثلاث مستخلصات ذات مردود متباين وهي : مستخلص بتروليوم إيثري (E_E)، ومستخلص كلوروفورمي (Ec) ، ومستخلص ميثانولي (E_M) (جدول 5).

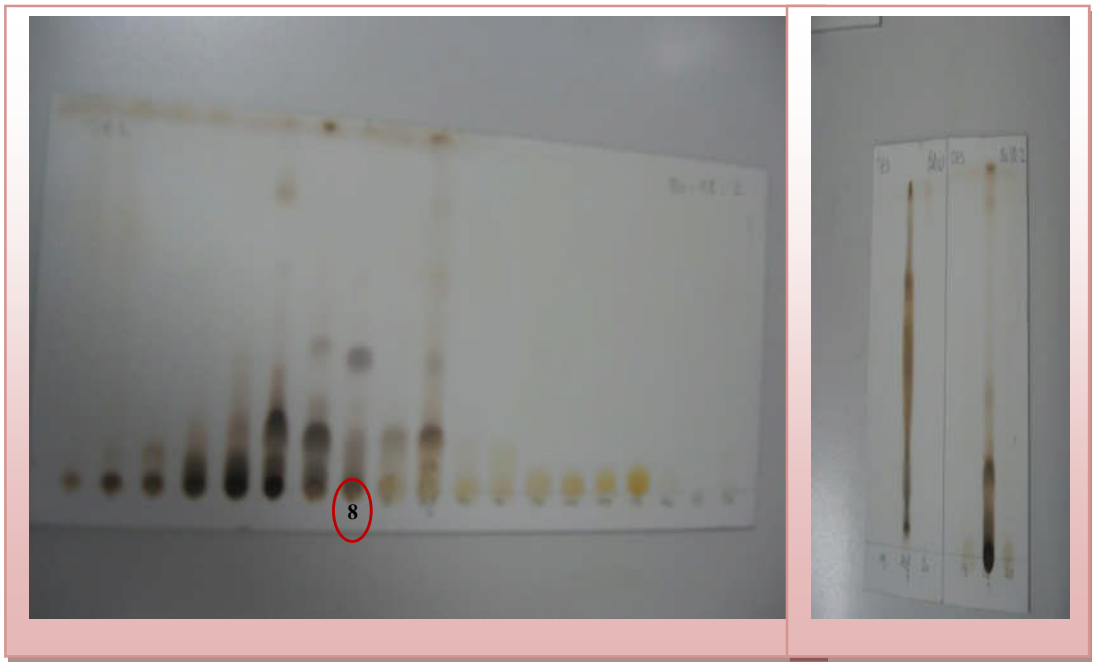
جدول (5) : مردود المستخلصات (%)

Chemlal	Sigoise	Cilento	المستخلص(%) /الأوراق
1.98	1.39	1.74	E_E
14.28	5.94	29.40	Ec
21.14	15.83	16.93	E_M

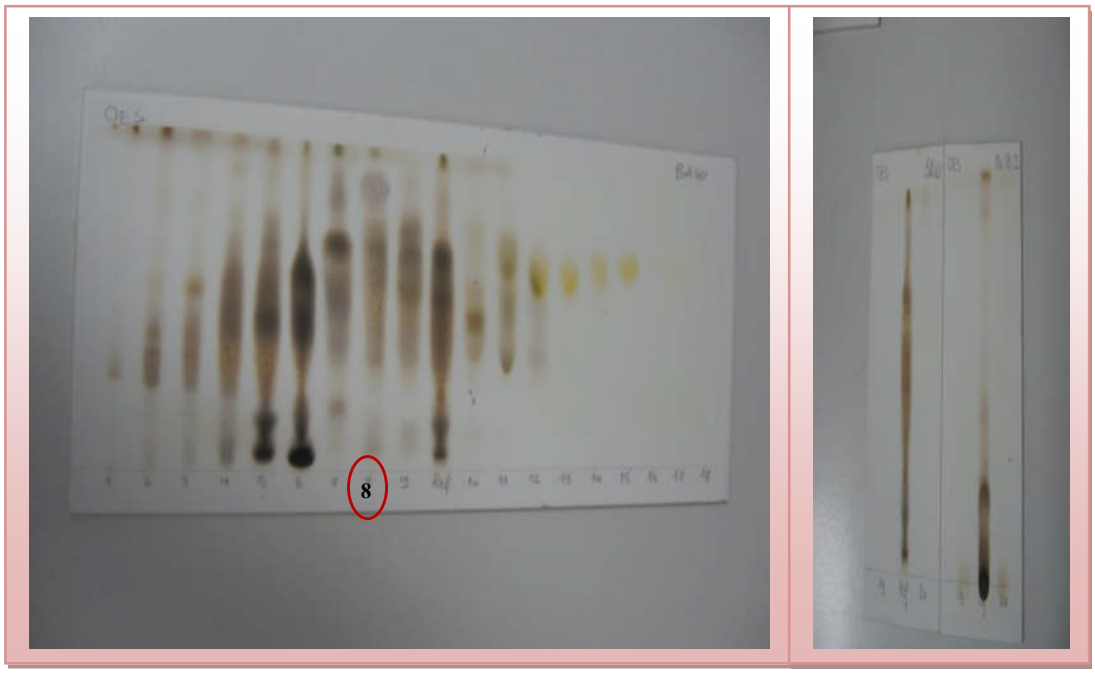
2.4.1. الفصل باستعمال هلام Sephadex

لفصل نواتج الأيض الثانوي الموجودة بالمستخلص الميثانولي لأوراق Sigoise و Chemlal تم إذابة 2.5 غرام من المستخلص ضمن 10 مل من الميثانول ، ثم طرد الخليط مركزيا بسرعة 3000 rpm لمدة 10 دقائق. استعمل لهذا الغرض عمود (3 cm x 100 cm) من هلام Sephadex (LH-20) (25-100 pm, chemicals P1) كدعامة ثابتة باستعمال عمود متصل بمضخة نبضية (pharmacia fine chemicals (Pharmacia Fine. استعمل الميثانول كطور مملص. وكان تدفق المملص بمقدار 1 مل/دقيقة. أمكن فصل 62 و89 كسرا بالنسبة للمستخلص الميثانولي لأوراق Sigoise وChemlal على الترتيب، حيث تم تحليلها باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية على صفائح مكسوة بهلام (gel 60 Silice F254)، بينما كان المملص مشكل من جملتين تمثلت الأولى(n Butamol / H_2O /acid acetique (60 : 25: 15 والثانية (80 : 18 : 2) $CHCl_3$ / MeOH / H_2O. بعد عملية التمليص، رشت الصفائح بكاشف Ce_2SO_4/H_2SO_4 ثم

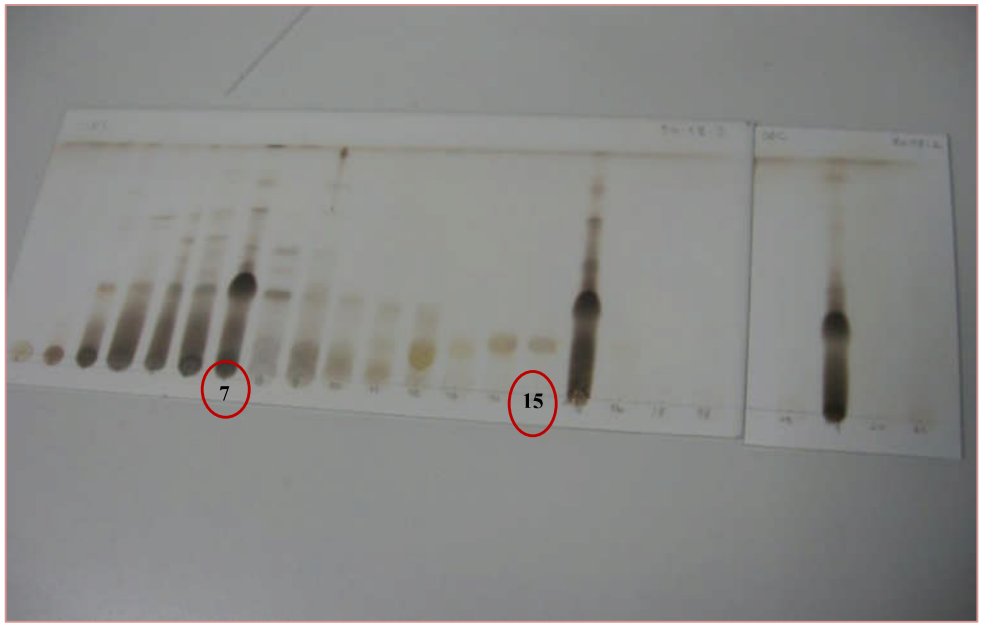
سخنت عند 100° م ولمدة 15 دقيقة حيث ظهرت المركبات بألوان مختلفة. أمكن الحصول على 62 كسرا من مستخلص Sigoise ثم جمعت الكسور المتماثلة فتحصلنا على 19 كسرا واتضح أن الكسر 8 ذا أهمية ،الذي قدرت كميته بمقدار (77.6مغ) (شكل14) و(شكل 15). بينما تم الحصول على 89 كسرا من مستخلص Chemlal و جمعت الكسور المتماثلة إلى 20 كسرا. واتضح أن الكسر 7 ذا أهمية وكانت كتلته 1064.2 مغ. أما الكسر 15 (C1)(8.5 مغ) اتضح أنه مركب نقي خضع لدراسة بنيته الكيميائية باستعمال الرنين المغناطيسي النووي ومطيافية الفوق بنفسجية (شكل16) و(شكل 17).



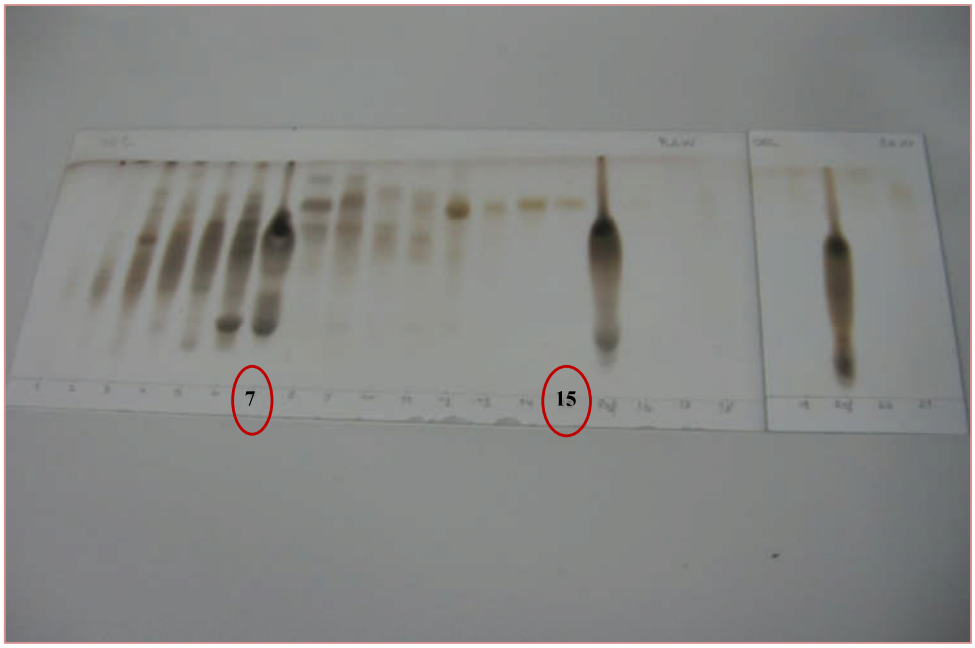
شكل14 : كسورمستخلص Sigoise بطور التمليص($CHCl_3$-MeOH-H_2O (80 :18 :2



شكل 15 : كسورمستخلص Sigoise بطور التمليص (*n* Butanol-H_2O-acid acetique(60:25:15



شكل16 : كسورمستخلص Chemlal بطور التمليص(2: 18: 80) $CHCl_3$-MeOH-H_2O



شكل 17 : كسورمستخلص Chemlal بطور التمليص (60:25:15) *n* Butanol-H_2O-acid acetique

3.4.1. الفصل باستعمال HPLC التحضيرية

استعمل جهاز Shimadzu RID-10A المتكون من مضخة (Shimadzu LC-20AT promenence وحاقن U6K وكاشف ذو مؤشر انكسار Shimadzu RID-10Aو عمود(30cm x 7.8 mm) Water C- 18p Bondapack. لفصل الكسر8 المقدر بكمية 77.6 مغ والمفصول من مستخلص Sigoise ، استعمل مملص يتكون من الميثانول والماء بنسبة 30 % حيث حصل على 13 كسرا واتضح أن الكسر 5 (S1) نقيا وتم

التعرف عليه باستعمال المرجع. أما بالنسبة للكسر7 والذي قدر بكمية 1064.2 مغ الناتج من مستخلص Chemlal ،فقد جزأ مبدئيا بمزيج مكون من 5مل من البتانول و5مل من الماء ثم طرد الخليط مركزيا وبسرعة rpm3000 لإزالة السكريات. فصل الطورين البتانولي والمائي عن بعضهما البعض ثم جففا عند درجة حرارة 40^0م . كررت التجزئة مرارا. وللتأكد من الزوال التام للسكريات استخدم مملص ذو جملتين تمثلت الأولى في $CHCl_3$ / MeOH / H_2O (80 : 18 : 2) والثانية *n* Butamol / H_2O /acid acetique (60 : 25: 15) وقدر الكسر 7 منزوع السكر بكمية 601.15 مغ. وقد تطلب فصل كل كسر على حدى حقن حجم 100مكرولتر بتركيز 10 مغ/ 100 مكرولتر من الميثانول مع استخدام مملص يتكون من مزيج من الماء والميثانول بنسبة 40%. أمكن الحصول على 18 كسرا ، حيث بدا الكسر 12 (C2) نقيا وتم التعرف عليه باستعمال المرجع.

4.4.1. الفصل باستعمال HPLC التحليلية

حللت المركبات (C2) و(S1) و المستخلصات الميثانولية لأوراق الزيتون وذلك عن طريق HPLC RP (Agilent1200series Agilent Technologies, paloAlto,CA,USA) والمجهزة بمضخة ثنائية(G-1312A) binary و Auto sampler(G1329A) و Diode − Array 1315 (DAD) detectot وعمود OnYX monolithic(50x2 m m C18, phenomenex , Italy). ويتمثل الطور المتحرك في مذابين ، Acidified milli Q Water (Millipore, Bedford, MA, USA) مع (A) 0.1 TFA% والميثانول (B) . حيث استعمل 0% B عند 1 دقيقة ، 0-30% B عند 6.7 دقيقة ، و B % 30-70 عند 13.7 دقيقة ، و 70-90 % B عند 14.5 دقيقة ، و 90 % B عند 19.7دقيقة . تذاب العينات ضمن الماء ويحقن حجم 50 مكرولتر . تكرر العملية ثلاث مرات لكل مستخلص على حدى. وقدرت نسبة تدفق التيار بحجم 0.6 مل/د. وسجل الكروماتوغرام عند 278 nm.

5.4.1. المحتوى الفينولي الكلي

أمكن تحديد المحتوى الفينولي الكلي لمستخلص أوراق الزيتون Chemlal وذلك باستعمال كاشف Folin-Ciolteu وعبر عنه بكمية مغ Gallic acid مكافئ / غ من المستخلص (Singleton *et al* .,1999).

2. النتائج

1.2. مستخلصات الزيتون

1.1.2. تحاليل HPLC/ DAD

بعد تحليل مستخلصات ثمار الزيتون بتقنية HPLC/RP المرفقة بكاشف DAD. تم التعرف على بنية 14 مركب فينولي وذلك بمقارنة زمن احتباسها مع تلك الخاصة بالمحاليل القياسية تم تكميم هذه المركبات اعتمادا على منحنيات المعايرة. وقد صنفت المركبات المعرفة إلى خمسة مجاميع (جدول 6) .

جدول (6) : مجاميع المركبات الفينولية المعرفة بثمار الزيتون الأصناف المنتقاة

المجموعة	المركب الفينولي
الأحماض الفينولية	p-hydroxy benzoic acid ، وVanillic acid ، و Caffeic acid ، وGallic acid ، وSyringic acid ، و p-Coumaric acid ، وFerulic acid ،و Sinapic acid
الفلافونيدات	Luteolin ، وChrysoeriol
الفينولات الكحولية	Hydroxytyrosol ، و Tyrosol
Secoiridoids	Oleuropein
Caffoyl glycoside phenylethanoid	Verbascoside

بالنسبة لنتائج التقدير الكمي للمركبات الفينولية ، أوضحت النتائج أن gallic acid شكل أكثر الأحماض الفينولية انتشارا بالمستخلصات بمتوسط قدر بقيمة 707.12 مغ/كغ ، وبأكبر كمية 1440.91 ±20.01 مغ/كغ ضمن مستخلص Sigoise ، ليتبع بنوع Frantoio بكمية 1349.75±29.31 مغ/كغ وصنف Leccino بكتلة1097.51±11.52 مغ/كغ. بينما احتوى صنف Chemlal كمية ضئيلة من gallic acid قدرت بقيمة 13.42 ± 2.41مغ/كغ من المستخلص.

قدر مركب luteolin بمتوسط 831.89 مغ/كغ ، ومركب oleuropein بمتوسط 893.77 مغ/كغ. وقد دلت النتائج على أن صنف Leccino يتوفر على محتوى كبير من luteolin قدرت كميته بمقدار2828.86 ± 107.24 مغ/كغ ، بينما تميز صنف Frantoio بوجود كميات معتبرة من محتوى oleuropein كتلته 2562.63 ± 46.88 مغ/كغ . أما مركب hydroxytyrosol، فقد شكل أكثر المركبات الفينولية وجودا وبكميات مرتفعة في جميع مستخلصات ثمار الزيتون وبمتوسط 2152.81 مغ/كغ باستثناء صنف Sigoise الذي ضم كمية 245.23 ± 25.81 مغ/كغ .

و سجلت آثارمن المركبات الفينولية vanillic acid بصنف Leccino، وp-hydroxybenzoic acid بكل من Chemlal ، وCoratina. كما لوحظ بأن كل من gallic acid ، وhydroxytyrosol ، وluteolin ، وoleuropein وكذا verbascoside قد شكلت المركبات الأكثر وجودا بأغلبية المستخلصات.

2.1.2. المحتوى الكلي للمركبات متعددة الفينول

أوضحت النتائج اختلاف في المحتوى الكلي للمركبات متعددة الفينول ما بين أصناف الزيتون. إذ يتراوح المحتوى الفينولي الكلي ما بين 147.13 ± 6.94 و 290.21 ± 13.21 مغ GAE / غ من المستخلص وذلك في كل من صنف Sigoise ، وصنف Coratina على الترتيب . كما كشف عن محتوى كبير بصنف Chemlal قدر بكمية 272.83 ± 9.84 مغ GAE / غ من المستخلص.

3.1.2. محتوى tannin

تراوح محتوى tannin ما بين 20.08 ± 3.12 و 86.86 ± 8.74 مغ TAE / غ من المستخلص. وقد كشف بصنف Leccino عن أكبر كمية من محتوى tannin كتلته 86.9 ± 8.7مغ TAE / غ من المستخلص.أما صنف Chemlal قدرت كمية 81.3 ± 10.6 مغ TAE /غ من المستخلص. بينما سجلت كمية منخفضة من tannin بصنف Sigoise (20.08±3.12 مغ TAE /غ) من المستخلص.(الجدول7) يضم المحتوى الكلي للمركبات متعددة الفينول وtannin والتقدير الكمي للمركبات المعرفة بمستخلص ثمار زيتون أصناف *Olea europaea*(Dekdouk *et al* .,2015). وقد عبر عن نتائج التقدير الكمي للمركبات الفينولية بمغ لكل Standard / كغ من المستخلص الجاف وقدر المحتوى الكلي لعديدات الفنيول ومحتوى tannin بمغ من gallic acid أو من tannic acid مكافئ / غ من المستخلص.

جدول (7): المحتوى الكلي للفينولات العديدة والتانين والتقدير الكمي للمركبات المعرفة بمستخلص ثمار زيتون *Olea europaea* (Dekdouk *et al* .,2015)

	Chemlal	coratina	Frantoio	Leccino	Maiatica	Ogliarola	Sigoise
TPC*	272,83 ± 9,84	290,21 ± 13,21	223,81 ± 16,18	22492 ± 9,26	182,35 ± 7,54	226,89 ± 6,63	147,13 ± 6,94
TTC**	81,28 ± 10,69	52,92 ± 4,32	63,95 ± 5,36	86,86 ± 8,74	66,27 ± 6,45	57,51 ± 5,54	20,08 ± 3,12
mg de gallic acid/Kg of dried extract	13,42 ± 2,41	191,63 ± 12,01	1349,75 ± 29,31	1097,51 ± 11,52	528,24 ± 33,22	328,35 ± 16,21	1440,91 ± 20,01
p-Hydroxybenzoic ***	nd	nd	309,36 ± 44,12	66,43 ± 19,74	308,87 ± 2,34	116,42 ± 13,11	3,22 ± 0,87
Vanillic acid***	34,84 ± 7,74	134,66 ± 10,41	203,46 ± 9,14	nd	493,94 ± 14,77	37,53 ± 14,75	200,93 ± 6,41
Cafeic acid***	8,72 ± 0,74	80,65 ± 2,93	142,17 ± 4,47	129,32 ± 1,42	96,46 ± 8,36	83,42 ± 5,74	29,64 ± 0,77
Syringic acid***	6,64 ± 0,62	32,84 ± 1,93	81,65 ± 0,33	63,24 ± 0,89	120,68 ± 1,47	39,12 ± 0,15	13,64 ± 1,81
p-Coumaric acid***	17,65 ± 1,61	6,57 ± 0,28	35,74 ± 0,64	21,95 ± 0,84	19,33 ± 0,55	28,74 ± 2,08	66,37 ± 1,11
Ferulic acid***	103,09 ± 1,97	37,78 ± 1,56	35,22 ± 2,27	31,75 ± 1,84	156,54 ± 2,91	31,36 ± 1,76	63,38 ± 0,82
Sinapic acid***	23,46 ± 0,33	30,64 ± 4,16	25,95 ± 2,58	24,22 ±0,12	44,67 ± 3,47	31,85 ± 0,65	26,34 ± 0,97
Tyrosol***	100,21 ± 1,03	134,75 ± 18,87	200,84 ± 75,12	194,13 ± 27,24	17,96 ± 7,39	115,74 ± 14,91	34,34 ± 3,62
Hydroxytyrosol***	2024,63 ± 26,01	1927,57 ± 104,37	2338,45 ± 82,11	1876,23 ± 123,01	3683,44 ± 364,27	2974,14 ± 23,72	245,23 ± 25,81
Verbascoside***	21,37 ± 0,64	319,78 ± 7,51	693,77 ± 13,66	643,09 ± 18,47	718,68 ± 9,74	335,34 ± 4,16	52,72 ± 0,95
Oleuropein***	109,86 ± 3,68	126,92 ± 13,84	2562,63 ± 46,88	1074,28 ± 47,85	1361,47 ± 71,71	804,56 ± 52,43	216,70 ± 12,34
Luteolin***	201,70 ± 1,55	221,74 ± 6,48	585,64 ± 44,72	2828,86 ± 107,24	513,24 ± 77,64	1362,51 ± 35,67	109,54 ± 1,22
Chrysoeriol***	21,73 ± 0,71	11,68 ± 0,56	135,57 ± 4,13	303,14 ± 7,21	549,25 ± 14,94	158,74 ± 3,87	36,37 ± 0,56

متوسط ثلاثة قيم± الانحراف المعياري (p<0,05) TPC المحتوى الكلي للفينولات العديدة :TPC ،المحتوى الكلي للتانين: TTC ، (*) مغ galic acid/ مكافئ /غ من المستخلص ، (**) مغ tannic acidمكافئ/ غ من المستخلص ، (***) مغ من المركب /كغ من المستخلص

2.2. مستخلصات أوراق الزيتون

1.2.2. التعيين البنيوي للمركب النقي (C1)

التعليل

****مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون**

تم الحصول على هذا المركب بشكل مسحوق أصفر قابل للذوبان في الميثانول وأعطى لونا بنفسجيا مسودا تحت أشعة وود λmax=365 نانومتر، مما يدل على أنه ذو هيكل فلافونيدي من نوع فلافون أو فلافونول مستبدل في الموقع 3. بينت دراسة طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون1(شكل18، طيف1) المسجل في الميثانول المدوثر لهذا المركب وجود إشارات في المجال (6-7.5ppm) والمميزة لهيكل الفلافونيد إذ يمكن توزيعها كمايلي :

- إشارة أحادية بتكامل 1H عند الإزاحة الكيميائية δ=6.46 ppm يمكن ارفاقها للبروتون H3 من الهيكل الفلافونيدي مؤكدة أن المركب من نوع فلافون (H-3) .

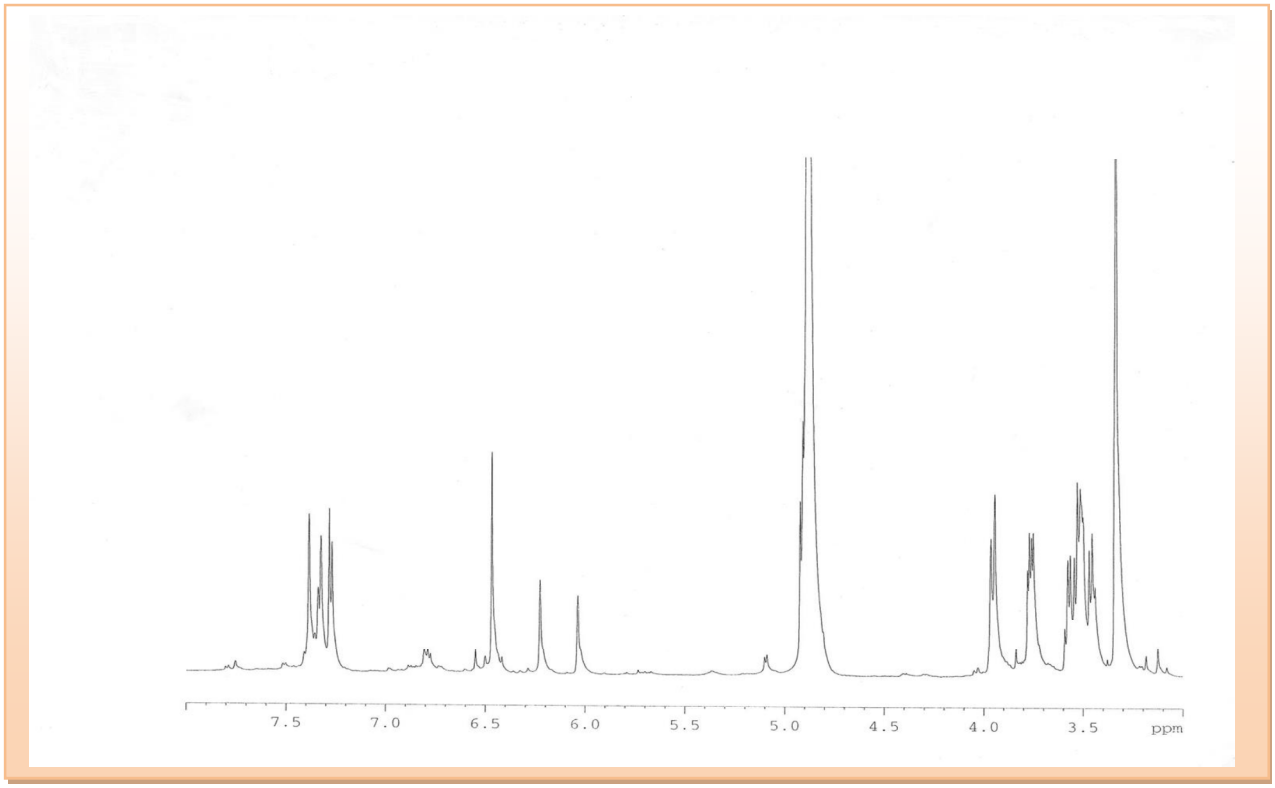
- إشارة أحادية عريضة بتكامل 1H عند الإزاحة الكيميائية δ=6.23 ppm يمكن ارفاقها للبروتون H8 من الحلقة A.

- إشارة أحادية عريضة بتكامل 1H عند الإزاحة الكيميائية δ=6.04 ppm يمكن ارفاقها للبروتون H6 من الحلقة A . كلا الإشارتين تؤكد على أن الحلقةA ثنائية الاستبدال في الموقعين 5 و7 .

- إشارة أحادية عريضة بتكامل 1H عند الإزاحة الكيميائية δ=7.40 ppm يمكن ارفاقها للبروتون H2` من الحلقة B.

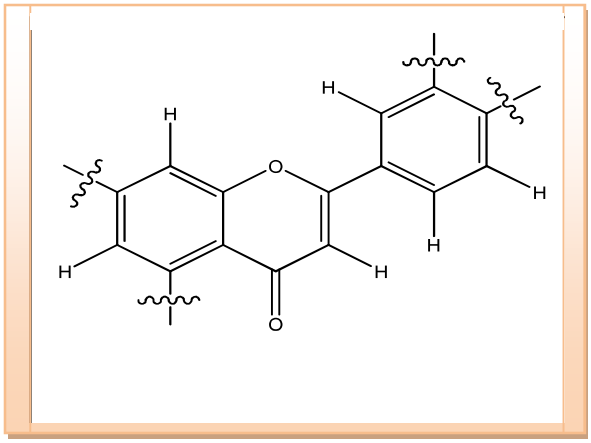
- إشارة ثنائية عريضة ($J=8H_z$) بتكامل 1H عند الإزاحة الكيميائية δ=7.35 ppm يمكن ارفاقها للبروتون H 6` من الحلقة B.

- إشارة ثنائية ($J=8H_z$) بتكامل 1H عند الازاحة الكيميائية δ=7.28 ppm يمكن ارفاقها للبروتون H-5`من الحلقة B .



شكل 18 : طيف1 (RMN-^{1}H) في الميثانول المدوثر MeOD-d_4 (Hz) ،δ_H(ppm) ،

تؤكد هذه الإشارات أن الحلقة ثنائية الاستبدال وذلك بالموضعين `3 و4̀. إن كل هذه المعطيات تسمح باقتراح هيكل luteolin لهذا المركب الفلافونيدي ويمكن كتابة الصيغة الكيميائية المبدئية التالية (شكل 19) :



شكل 19: هيكل مركب luteolin

كما بين فحص آخر لهذا الطيف إشارة إضافية عبارة عن إشارات متعددة في المجال δ= (4.00-3.40) ppm تدل على وجود وحدة سكر في الجزيئة وإشارة أخرى بشكل ثنائية (J= 7.5 Hz) عندδ= 4.91 ppm يمكن ارفاقها للبروتون الأنوميري "H_1 لوحدة السكر والتي لايمكن أن تكون إلا جلوكوز أو جلاكتوز نظرا لقيمتي الانزياح الكيميائي وكذا قيمة ثابت التزاوج.

****مطيافية امتصاص الأشعة الفوق البنفسجية**

اللون الاسشتعاعي البنفسجي تحت ضوء Wood وكذا طيف امتصاص الأشعة فوق البنفسجية المسجل بالميثانول الذي يبين العصابة I عند λ_{max} = 336 nm يدلان على كون المركب ذو هيكل فلافون. بمقارنة الطيف بعد اضافة NaOH مع طيف MeOH نجد أنّ العصابة I تعرضت لإزاحة باتوكرومية$\Delta\lambda$ = 69 nm مع زيادة في الشدة الضوئية مما يدل على وجود OH حر بالموقع ´4 . كما يلاحظ عدم ظهور عصابة جديدة في المجال(320-335nm) مشيرا إلى عدم وجود OH حر بالموقع C-7، ويؤكد هذا مقارنة الطيف المشبع بـ NaOAc بطيف MeOH لم تسجل أي إزاحة بالعصابة II .

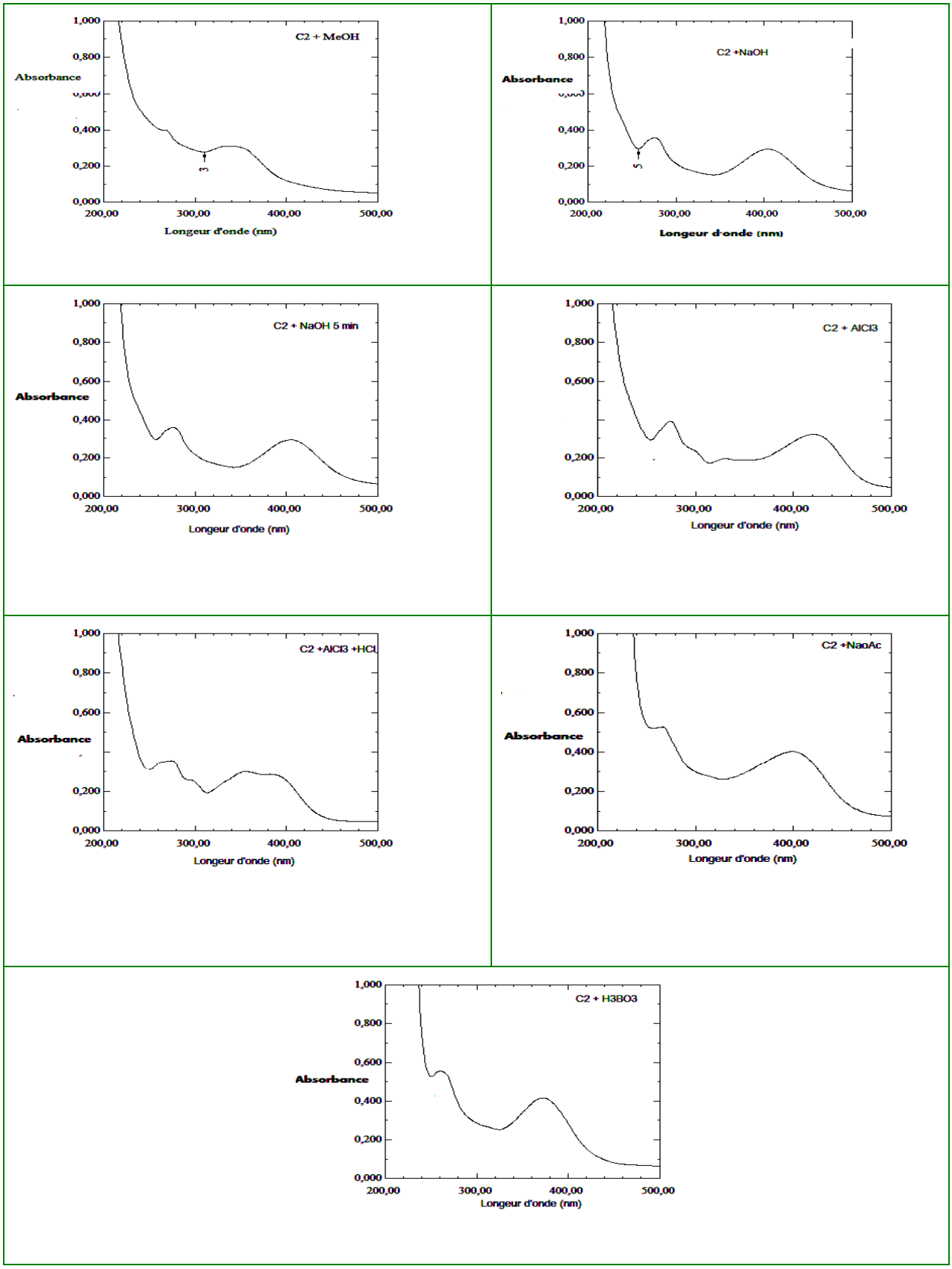
باجراء مقارنة بين الطيف بعد إضافة $AlCl_3$ وطيفMeOH فإننا نجد أنّ هناك إزاحة باتوكرومية للعصابة I ($\Delta\lambda$ = 87 nm). وبإضافةHCl إلى نفس العينة نجد أنّ هناك إزاحة هيبسوكرومية عند مقارنة طيف ($AICI_3$ + HCl) بـ$AlCl_3$ ($\Delta\lambda$ =-38 nm) مما يدل على كون المركب يتمتع بنظام أرثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B أي dihydroxy ´4 ,´3.

وأما مقارنة طيف ($AICI_3$ + HCl) بطيف MeOH فتظهر إزاحة باتوكرومية للعصابة I مقدارها 49 nm تدل على وجود مجموعة OH حر عند الموقع C-5 وعدم وجود مجموعة أكسيجينية في الموقع 6. ومن خلال مجموع هذه المعطيات يظهر أنّ السكر لن يتوضع إلاّ على الموقع7 (شكل 20،طيف 2).

كل هذه المعطيات مدونة في (جدول رقم 8) و(الشكل 20) يبين سلسلة مطيافية امتصاص الأشعة الفوق البنفسجية – المرئية للمركب C1

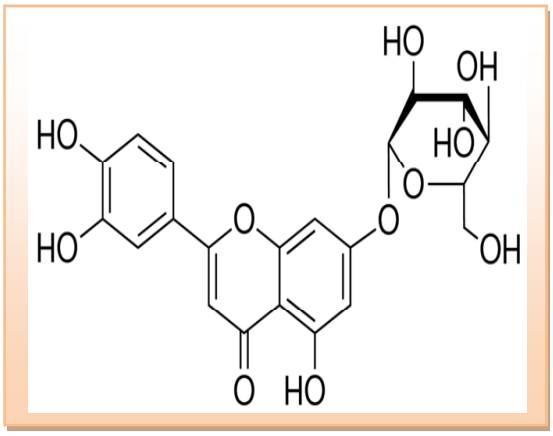
جدول (8): امتصاص الأشعة الفوق البنفسجية

الكواشف	الطول الموجي nm		
	عصابة II	نتوءات أخرى	عصابة I
MeOH	267		336
NaOH	275		405
$AICI_3$	275	330 - 291	423
HCl /$AICI_3$	275	355 - 296	385
NaOAc	267		400
H_3BO3 / NaOAc	260		370



شكل 20:طيف 2، مطيافية امتصاص الأشعة الفوق البنفسجية للمركب C1

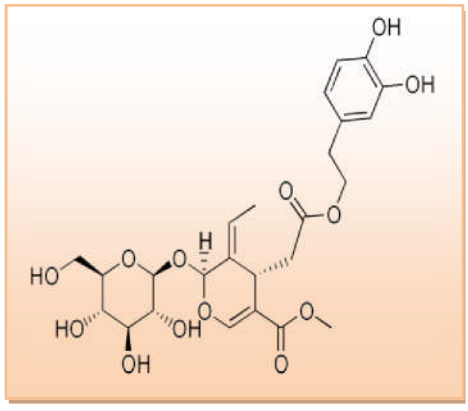
أما طبيعة السكر فقد تمّ تأكيدها بالحلمهة الحامضية التي سمحت بفصل السكر من الأجليكون والتأكد من طبيعته باستعمال الكروماتوغرافيا وبالاستعانة بعينات شاهدة. وقد بينت هذه التقنية أنّ السكر عبارة عن جلوكوز انطلاقا من مقارنة R_f سكر هذا المركب مع R_f الشاهد؛ بالتالي تكون صيغة المركب (C1) المقترحة (شكل 21) والدالة على luteolin المجلكزكالتالي:



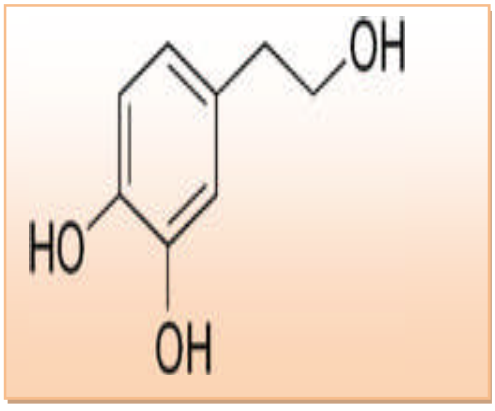
شكل 21 : بنية مركب الـ luteoline المجلكز

3.2.2. تحاليل HPLC-RP

اعتمد تعريف المركبات الفينولية (C2) ،و(S1) وتلك الخاصة بمستخلصات الأوراق على مقارنة زمن احتباس المحلول القياسي لمركب hydroxytyrosol والمحلول القياسي لمركب oleuropein اللذان اعتبرا كمرجع. تماثل زمن احتباس مركب oleuropein (t_R =9.1 د) مع زمن احتباس المركب (C2) ،مما يؤكد أن هذا الأخير عبارة عن مركب oleuropein (شكل22). و تساوى زمن احتباس مركبhydroxytyrosol (t_R =0.7 د) مع زمن احتباس المركب (S1)، مما يؤكد أن هذا الأخير عبارة عن مركبhydroxytyrosol (شكل 23).

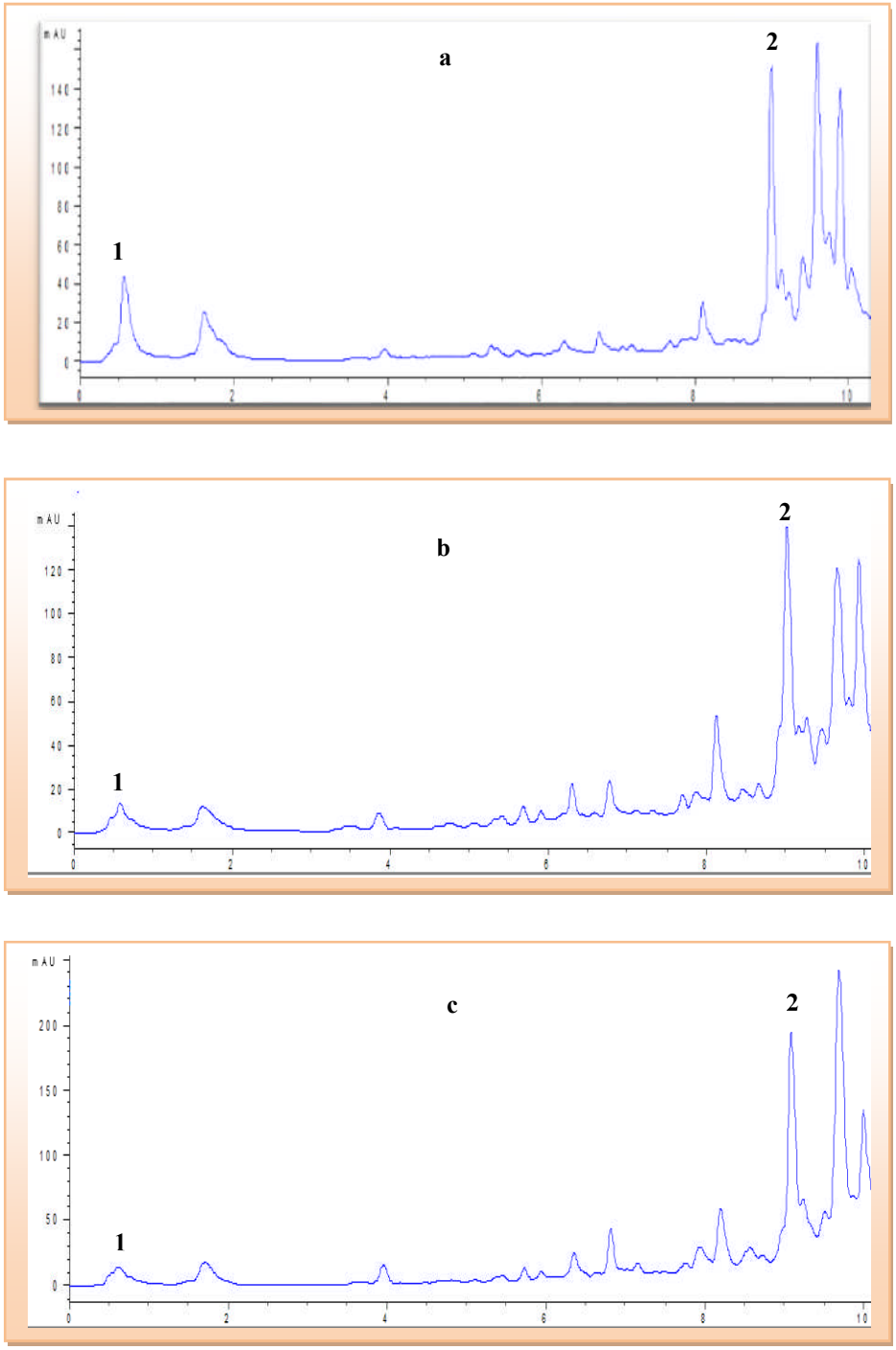


شكل 22: بنية الـ oleuropein



شكل 23: بنية الـ hydroxytyrosol

وتوضح التسجيلات الكروماتوغرافية لتحاليل HPLC قمم عدة ،تتميز بتراكيز مختلفة من المركبات الفينولية من بينها القمة 1 عند t_R =0.7 د ، و القمة 2 عند t_R =9.1 د الدالتان على مركب hydroxytyrosol و oleuropeinعلى الترتيب بمستخلصات أوراق الزيتون (a) Cilento و(b) Sigoise و(c) Chemlal (شكل 24).



شكل24 : HPLC-RP كروماتوغرام مستخلص أوراق الزيتون (a) Cilento و(b) Sigoise و(c) Chemlal، التعريف عند 278nm (1)hydroxytyrosol ، (2)oleuropein

4.2.2. المحتوى الفينولي

حدد المحتوى الفينولي الكلي بالمستخلص الميثانولي لأوراق الزيتون Chemlal باستعمال كاشف Folin-Ciocalteu وقدرت الكمية بقيمة 81 مغ GAE/غ من المستخلص.

3. المناقشة

أجريت الدراسة الكيميائية باستعمال خمسة أصناف من *Olea europaea* L المزروعة بإيطاليا Coratina ، وFrantoio ، وLeccino ، و Matiatica ، و Ogliarala وصنفان مزروعان بالجزائر Chemlal و Sigoise . حللت مستخلصات فاكهة الزيتون باعتماد RP-HPLC المرفقة بكاشف DAD. واعتمادا على زمن احتباس المحاليل القياسية ومنحنيات المعايرة عرف 14 مركب فينولي. صنفت المركبات المعرفة بمستخلصات الزيتون المنتقاة إلى خمسة مجاميع وهي: الأحماض الفينولية التي تضم p-hydroxy benzoic acid ، وvanillic acid ، وcaffeic acid ، وgallic acid ، وsyringic acid ، وp-coumaric acid، و ferulic acid ، وsinapic acid . أما الفلافونيدات فقد شملت مركب chrysoeriol ،وluteolin . بالنسبة للفينولات الكحولية أمكن كشف مركب hydroxytyrosol و tyrosol. وقد ضمت secoiridoids مركب oleuropein.بينما شملت مجموعة Caffoyl glycoside phenylethanoid على مركب verbascoside. و شكل مركب hydroxytyrosol أكثر المركبات الفينولية انتشارا وذلك ضمن جميع مستخلصات فاكهة الزيتون باستثناء صنف Sigoise. وقد يعزى ذلك إلى الإماهة المائية لمركب oleuropein و ذلك بتدخل إنزيم β-glucosidase النشط ضمن ثمار الزيتون الناضجة والتي تضم كميات مرتفعة منه (Briante *et al*., 2002) . وتتفق النتائج المحصل عليها مع تلك المسجلة بالأصناف الإسبانية ، حيث سجل ارتفاع مستوى مركب hydroxytyrosol خلال طور نضج ثمار الزيتون (Aurora *et al* ,2008) . بينما تختلف هذه النتائج مع تلك المسجلة بدراسة (Brahmi *et al* ., 2013 ; Bouaziz *et al* .,2006) حيث كشف عن انخفاض محتوى مركب hydroxytyrosol خلال طور النضج بأنواع chemlali وneb jmel.

كما لوحظ أن كل من gallic acid ، وhydroxytyrosol ، وluteolin ، وoleuropein وكذا verbascoside تشكل المركبات الأكثر انتشارا بأغلبية المستخلصات. فيما يخص تقييم المحتوى الكلي للفينولات العديدة لثمار الزيتون، توضح النتائج اختلافا معتبرا في المحتوى الفينولي ما بين أصناف الزيتون ، وقد يفسر هذا التباين باختلاف الصنف ودرجة النضج مثلما تبين بثمارالزيتون الناضجة ذات المحتوى الفينولي المنخفض مقارنة مع تلك غيرالناضجة وذلك بنوع Chemlali ونوع neb jmel (Brahmi *et al* .,2013). بالنسبة لمحتوى tannin ، كشفت النتائج عن أكبر كمية من محتوى tannin وذلك بصنف Leccino ، وصنف Chemlal ، بينما سجلت كمية منخفضة من tannin بصنف Sigoise . وتختلف هذه النتائج مع تلك المسجلة بدراسة(Brahmi *et al*., 2013) حيث قدرت كميات معتبرة بثمار الزيتون غير الناضجة وذلك بصنف Chemlali وصنف neb jmel . وقد يفسر هذا التباين بعامل دورة نمو الزيتون التي قد تؤثر أيضاعلى مستويات المركبات الفينولية للثمار(Joana *et al* ., 2010).

بالنسبة لأوراق الزيتون Sigoise و Chemlal كشفت الدراسة الكيميائية عن secoiridoids منها oleuropein ،والفينولات الكحولية hydroxytyrosol بالإضافة عرفت الفلافونيدات كمركب luteolin المجلكز النقي بنوع Chemlal مما يدل على وجود تنوع جزيئي بأوراق الزيتون. فالعديد من البحوث حددت كمية ونوعية المركبات الفينولية بأوراق الزيتون مثلما أوضحته دراسة (Bouaziz *et al* .,2005) وذلك بأوراق زيتون Chemlali.وفي دراسات أخرى ، كشفت التحاليل الكمية وجود الفلافونيدات منها -7 luteolin *O*-glucoside ،و luteolin 7-*O*-rutinoside ،و apigenin7-*O*-glycoside ،و rutin ،و luteolin ،و apigenin . وقدرت كميات معتبرة من oleuropein بالأوراق وهذا ماكشف عنه ، (Bouaziz *et al* ,.2005) ،بينما خالفت هذه النتائج تلك المحصل عليها بدراسة (Savournin *et al* .,2001). كما أقر Garcia *et al* .,(2000) تعريف خمسة فلافونات luteolin، و apigenin 7-*O*-glucoside،و diosmetin 7-*O*-glucoside، وdiosmetin وفلافونولات منها rutin ،وflavan-3-ols كمركب catechin من خمسة أصناف لأوراق *Olea europaea* و Villalonga ،و Alfafarenca ،وPicual ،و Cornicarba ،وBlanqueta. وقد يعزى هذا التباين إلى طريقة التجفيف وطرق الاستخلاص وصنف أوراق الزيتون.

4.الخلاصة

أجريت الدراسة الكيميائية باستعمال خمسة أصناف من زيتون *Olea europaea* L المزروعة بإيطاليا Coratina ، وFrantoio ، وLeccino ، و Matiatica ، و Ogliarala وصنفان مزروعان بالجزائر Chemlal و Sigoise .عرف 14 مركب فينولي بمستخلصات الزيتون و صنفت هذه المركبات إلى خمسة مجاميع تضمنت مجموعة الأحماض الفينولية منها p-hydroxy benzoic acid ، وvanillic acid ، و caffeic acid ، وgallic acid ، وsyringic acid ، وp-coumaric acid ، وferulic acid ،و sinapic acid ومجموعة الفلافونيداتchrysoeriol ، وluteolin ،ومجموعة الفينولات الكحولية وhydroxytyrosol وtyrosol ومجموعة secoiridoids والتي شملت oleuropein ، و verbascoside. واتضح أن gallic acid أكثر الأحماض الفينولية انتشارا بمستخلص الصنف الجزائري Sigoise مقارنة بصنف Chemlal الذي تضمن كميات ضئيلة منه . بينما شكل مركب hydroxytyrosol أكثر المركبات الفينولية انتشارا وبكميات مرتفعة بجميع مستخلصات ثمار الزيتون باستثناء صنف Sigoise. و كشف عن محتوى فينولي كلي معتبر بصنف Chemlal. أما بالنسبة لمحتوى tannin فقد كشف عن أكبر كمية بصنفي Leccinoو Chemlal. بالمقابل ، سجلت كمية منخفضة من tannin بصنف Sigoise . بالنسبة لأوراق الزيتون Sigoise وChemlal عرف كل من oleuropein و hydroxytyrosol و مركب luteolin كمركب نقي بصنف Chemlal.

ونخلص من هذه الدراسة بأن ثمار الزيتون الناضجة تضم مركبات فينولية تختلف كما ونوعا كالصنف الجزائري Chemlal الذي تميز بمحتوى فينولي كلي عال، وكم كبير من tannin، وكميات مرتفعة من مركبhydroxytyrosol مقارنة بمثيله الجزائري Sigoise. أيضا فإن أوراق زيتون Chemlal تتميز بمجموع من المركبات الفينولية منها oleuropein.

يرشح هذا التنوع الفينولي المتوفرة عليه مستخلصات الزيتون وأوراق زيتونChemlal اختبارنشاطهما الوقائي *in vitro* من خلال تقييم القدرة الكلية المضادة للأكسدة الذي سيعتمد على انجاز اختبارات الأسرالجذري، والكفاءة الاختزالية، وتثبيط تفاعل ما فوق الأكسدة اللبيدية ،و$OH^{\cdot}$ ،ومخلبة أيون Fe^{2+} ،وكذا النشاط المضاد للالتهاب.

IV - الدراسات *in vitro*

1. طرق ومواد العمل

1.1. دراسة النشاط الوقائي *in vitro* بمستخلصات الزيتون

لم تسبق الإشارة إلى أبحاث تفيد بمعطيات حول اختبار الكفاءة الكلية المضادة للأكسدة ، مما دفعنا إلى انجاز مايلي :

1.1.1. نشاط أسر جذر DPPH

أمكن تحديد قدرة الأسر الجذري باستعمال اختبارأسر DPPH حسب (Millela *et al.*, 2014) مع تعديلات بسيطة. أضيف 300 مكرولتر من العينة المميهة إلى 1200 مكرولتر من محلول DPPH (100 مكرومول). تحدد قدرة المستخلص على أسر الجذر DPPH عند 515 نانومتر وذلك بعد مرور 30 دقيقة من التحضين ضمن وسط مظلم. واستعمل Trolox كقياسي. عبر عن النتائج بمغ من Trolox مكافئ (TE) لكل غرام من المستخلص الجاف.

2.1.1. الكفاءة الاختزالية (FRAP)

حددت الكفاءة الاختزالية للحديديديك باستعمال اختبار FRAP طريقة (Russo *et al*, 2015). يحضر كاشف FRAP قبل التجربة وذلك بمزج 300 mM من منظم pH 3.6 Acetate ضمن الماء المقطر ، 20 mM من $FeCl_3 6H_2O$ ضمن الماء المقطر و10 mM من (TPTZ) ضمن 40 mM من HCl وذلك بنسبة 10 : 1: 1. أضيف 150 مكرولتر من العينة المميهة إلى1350 مكرولتر من FRAP . حضن المزيج بوسط مظلم عند درجة حرارة 37 ° م وذلك مدة 40د. يحدد إرجاع معقد الحديديك منخفض اللون tripyridyl triazine -Fe^{3+} إلى معقد Ferrous ذو اللون الأزرق tripyridyl triazine -Fe^{2+} من خلال التفاعل المضاد للأكسدة المعطي للإلكترون عند 593 نانومتر. واستعمل Trolox كقياسي ويعبر عن قيم FRAP بمغ Trolox مكافئ (mg TE) لكل غ من المستخلص الجاف.

3.1.1. تثبيط تفاعل ما فوق الأكسدة اللبيدية

استعمل اختبار تبييض الكاروتين (βCB) وذلك لتحديد قدرة المستخلصات على الوقاية من تفاعل ما فوق الأكسدة اللبيدية (Padula *et al* .,2013). حضر محلول يتكون من β-carotene/linoleic acid وذلك بإذابة 0.2 مغ منβ-carotene ضمن 0.2 مل من الكلوروفورم و 20 مغ من linoleic acid و20 Tween (200 مغ). بخر الكلوروفورم وأضيف 50 مل من الماء المقطر المشبع بالأوكسجين ، ثم مزج المستحلب الناتج بعناية. وضع 9.5 مل منه بأنابيب اختبار الضامة لحجم 0.5 مل من العينة. واستعمل الميثانول كمحلول شاهد ، بينما استعمل BHT كقياسي موجب . حضنت العينات مدة 3 ساعات عند درجة حرارة 50 ° م . وقرأ التفاعل عند 470 نانومتر وذلك بمرور 30 د ، و180 د . وعبر عن النتائج كنسبة تثبيط زوال لون β-carotene.

وتحسب (AA%)=(AB-carotene after 180 min/Ainitial B-carotene)x100

ولتحديد علاقة الترابط ما بين المركبات الفينولية والنشاط المضاد للأكسدة ، أمكن حساب معامل Pearson.

2.1. دراسة النشاط الوقائي *in vitro* بمستخلص أوراق الزيتون Chemlal

1.2.1. اختبار النشاط الملتقط لجذر $^{\cdot}OH$

تتشكل جذور $^{\cdot}OH$ اثر التفاعل مابين $FeSO_4$ و H_2O_2. يمكن الكشف عن $^{\cdot}OH$ وذلك بإضافة مجاميع $^{\cdot}OH$ إلى حمض salicylate. أضيف 175 مكرولتر من H_2O_2(6mM) إلى 250 مكرولتر من $FeSO_4$ (1.5mM) و300 مكرولتر من صوديوم salicylate (20mM) وتراكيز مختلفة من المستخلص. تم قياس امتصاص معقد salicylate المرتبط بـ$^{\cdot}OH$ عند طول موجي 562 نانومتر. كرر الاختبار ثلاث مرات و قدرت قدرة التقاط $^{\cdot}OH$ من المنحنى التثبيطيLog-Dose. واستعمل acid ascorbic كشاهد إيجابي (Smirnoff and Cumbes,1989) .

2.2.1. اختبار النشاط الممخلب لأيون Fe^{2+}

أضيف 15 مكرولتر من $FeCl_2$ (2 mM) إلى 150 مكرولتر من تراكيز مختلفة من المستخلصات و605 مكرولتر من الماء المقطر. رج المزيج جيدا وترك ضمن درجة حرارة الغرفة مدة 30 دقيقة. أضيف 30 مكرولتر من ferrozine (5mM ضمن الميثانول). وقدر امتصاص نشاط معقد Fe^{2+} -ferrozine عند طول موجي 562 نانومتر. قدر النشاط الملتقط لأيونFe^{2+} من المنحنى التثبيطي Log-Dose. واستعمل EDTA كشاهد إيجابي (Hus *et al* ., 2006).

3.2.1. اختبار النشاط المضاد للالتهاب

***المزارع الخلوية**

استعملت الخلايا اللمفاوية THP-1 المميهة إلى 10^6 خلايا/مل ضمن RPMI 1640 الضام -2Mml glutamine، و streptomycine 0.1mg/ml، و penicillin 100IU/ml ،و β–mercaptoitanol 50µM، مزجت بالمصل الجنيني للعجل المسخن غير نشط 10%، وحضنت عند درجة حرارة 37°م ضمن حاضن ذو $5\%CO_2$. ولتقدير إفراز TNF-α ، زرعت $0.5x10^6$cells ضمن أنابيب عديدة البروبيلن ومعقمة. حضنت الخلايا بإضافة أو دون إضافة المستخلص الميثانولي لأوراقChemlal.

*** إنتاج Cytokine**

أمكن قياس cytokine بالطافي منزوع الخلايا. حفظت العينات عند-20°م. قدر TNF-α باستعمال شطيرة نوعيةELISA KIT. (Endogen,Rock,Ford ,IL ,USA) و عبر عن النتائج با pg/ml .

*** تقدير نشاط إنزيم LDH**

يشكل LDH مؤشر ضروري يكشف عن تكامل الغشاء الخلوي وكذا حيوية الخلية. أمكن قياس إنزيم LDH المتسرب من الخلايا المتلفة وذلك باستعمال الطافي منزوع الخلايا و KIT (Sigma). عبر عن النتائج با % .

3.1. الدراسة الإحصائية

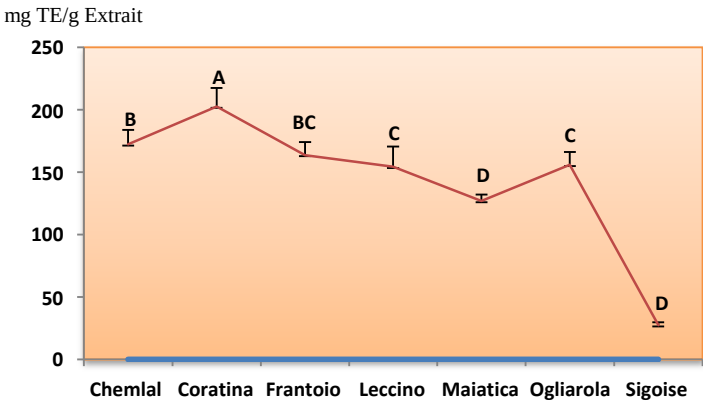
لدراسة معنوية الأثر الوقائي لمستخلصات الزيتون ، عبرعن نتائج متوسط ثلاث تكرارات ± الانحراف. ولتحديد الترابطات تم تحديد Pearson Coefficient واعتبرت قيم $P \leq 0.05$ معنوية إحصائيا و أنجزت التحاليل الإحصائية باستعمال (Graph Pad Prism 5 soft ware Sandiego, CA, USA) . أما دراسة معنوية الأثر الوقائي لمستخلصات أوراق الزيتون *in vitro* عبرعن النتائج متوسط ثلاث تكرارات ± الانحراف واعتمد اختبار Dunnett's multiple Comparaison test واعتبر الأثر الالتهابي معنويا عند $P \leq 0.05$ أو $P \leq 0.01$. عبر عن النتائج بمتوسط الانحراف المعياري .

2. النتائج

1.2. دراسة النشاط الوقائي *in vitro* بمستخلصات الزيتون

1.1.2. نشاط أسرجذر DPPH

إن قدرة أسر الجذرحددت من خلال اختبار DPPH. إذ تعتمد الطريقة على إرجاع محلول DPPH الميثانولي عند 515 نانومتر وذلك بوجود مضاد أكسدة معطي للهيدروجين والمؤدي إلى تشكيل صورة لا جذرية DPPH-H . كشفت النتائج عن نشاط آسر للجذر معنوي ($P<0.05$) بالنسبة لصنف Coratina بقيمة 202.62 ± 14.85 ، ليتبع بتأثير بالغ لصنف Chemlal حيث سجلت قيمة172.41 ± 11.42 مغ TE /غ من المستخلص. بالمقابل ، فإن صنف Sigoise أظهر نشاطا إرجاعيا منخفضا اتجاه الجذر قدربقيمة 27.40 ± 2.31 مغ TE /غ (شكل 25) .

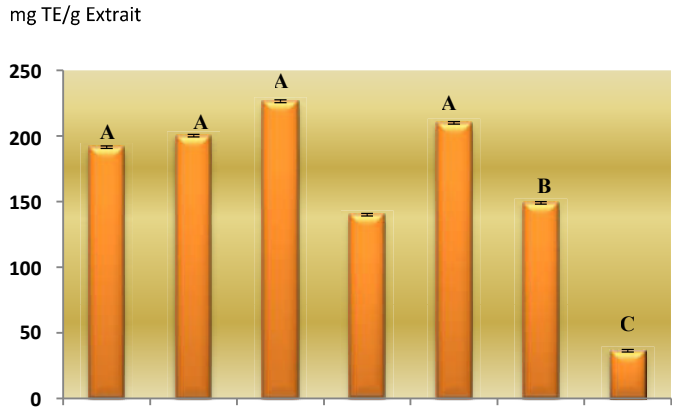


شكل 25: نشاط الأسر الجذري (مغ TE /غ من المستخلص) متوسط n=3
(التباين الإحصائي مابين الأصناف ، $P<0.05$:D,C,B,A)

2.1.2. الكفاءة الاختزالية (FRAP)

حددت قدرة مستخلصات ثمار *Olea europaea* على إرجاع أيونات Fe^{3+} وذلك بانجاز اختبار الكفاءة الاختزالية. حيث دلت النتائج أن صنف Frantoio يتميز بقدرة إرجاعية كبيرة ($P<0.05$) قدرت بقيمة 226.77 ± 20.19مغ TE /غ من المستخلص. وخلافا لذلك ، فإن صنف Sigoise أظهر قدرة إرجاعية

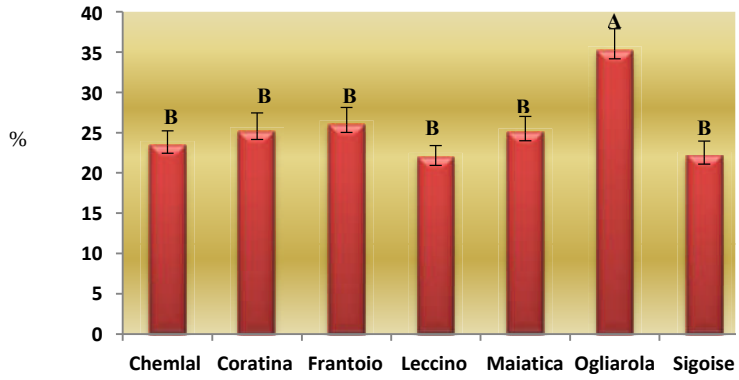
منخفضة (P<0.05) قدرت بقيمة 36.3 ± 4.4 مغ TE /غ من المستخلص. بينما كشفت أصناف Coratina ، و Chemlal ، وMaiatica عن قدرة إرجاعية مرتفعة (P<0.05) قدرت بقيمة 200.29 ± 13.25 مغ / TE غ وقيمة 191.48 ± 8.96 مغ / TE غ ، وقيمة 210.09 ± 24.91 مغ/TE غ من المستخلصات على الترتيب (شكل26) .



شكل26 : القدرة الإرجاعية FRAP (مغ TE /غ من المستخلص) متوسط n=3
(A,B,C, : التباين الإحصائي مابين الأصناف ، P<0.05)

3.1.2. تثبيط تفاعل ما فوق الأكسدة الليبيدية

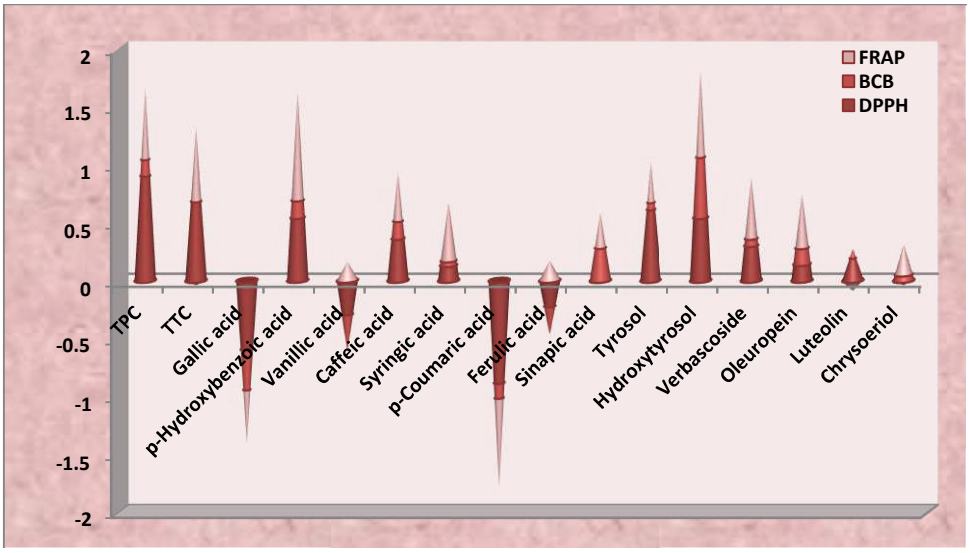
أوضحت النتائج تباين النشاط التثبيطي لتفاعل ما فوق الأكسدة الليبيدية لمختلف المستخلصات. تراوحت نسبة التثبيط ما بين 21.95± 1.45 % إلى 35.18 ± 2.71 %. وقد سجلت أكبر قيمة بصنف Ogliarola عند تركيز نهائي قدر بقيمة 0.1 مغ/مل (شكل 27) .



شكل27: تثبيط تفاعل ما فوق الأكسدة الليبيدية (0.1مغ/مل) متوسط n=3
(A,B : التباين الإحصائي مابين الأصناف ، P<0.05)

و لوحظ ترابط إيجابي كبير ما بين المحتوى الفينولي الكلي وقدرة التقاط جذر DPPH (r=0.91). كما سجل ترابط إيجابي لكنه منخفض وذلك ما بين المحتوى الفينولي والقدرة الإرجاعية (r=0.61).

أما بالنسبة لمحتوى tannin، فقد سجل ترابط متماثل لنشاط التقاط جذر DPPH (r=0.68) والقدرة الإرجاعية (r= 0.63). بينما لم يسجل ترابط ما بين تثبيط تفاعل ما فوق الأكسدة اللبيدية ومحتوى كل من tannin وكذا المحتوى الفينولي (شكل 28).



شكل 28: معامل الترابط Pearson مابين قيم الأنشطة المضادة للأكسدة وكمية المركبات الفينولية

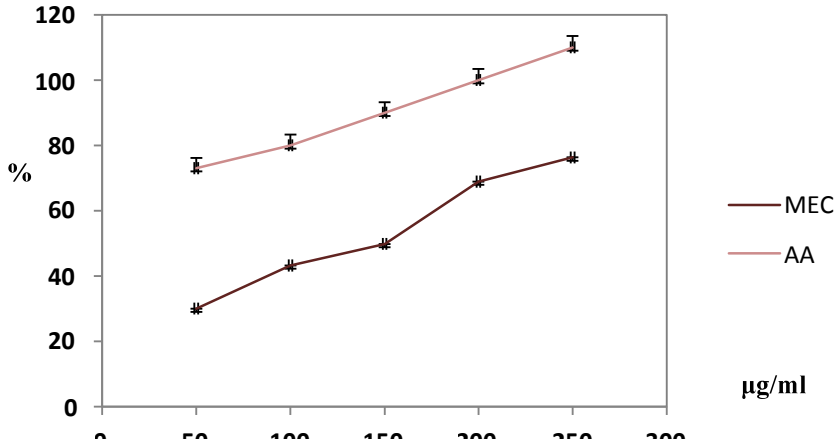
أيضا، تم بهذه الدراسة حساب ترابط Pearson للتعرف على المساهمة الفردية لكل مركب على حدى في تحقيق النشاط المضاد للأكسدة. حيث وجد أن المركب p-hydroxy benzoic acid ، ومركب verbascoside قد ساهم كل منهما في تحقيق القدرة الإرجاعية بقيمة r=0.93 و r=0.52 على الترتيب.

ويبدو أن مركب tyrosol قد شارك في قدرة الالتقاط الجذري (r=0.61). بينما اتضح أن hydroxytyrosol يعتبر المركب الوحيد المساهم في الالتقاط الجذري (r=0.54) والقدرة الإرجاعية (r=0.74) وتثبيط تفاعل ما فوق الأكسدة اللبيدية (r=0.52) .

2.2. دراسة النشاط الوقائي *in vitro* بمستخلص أوراق الزيتون Chemlal

1.2.2. اختبار النشاط الآسر لجذر OH·

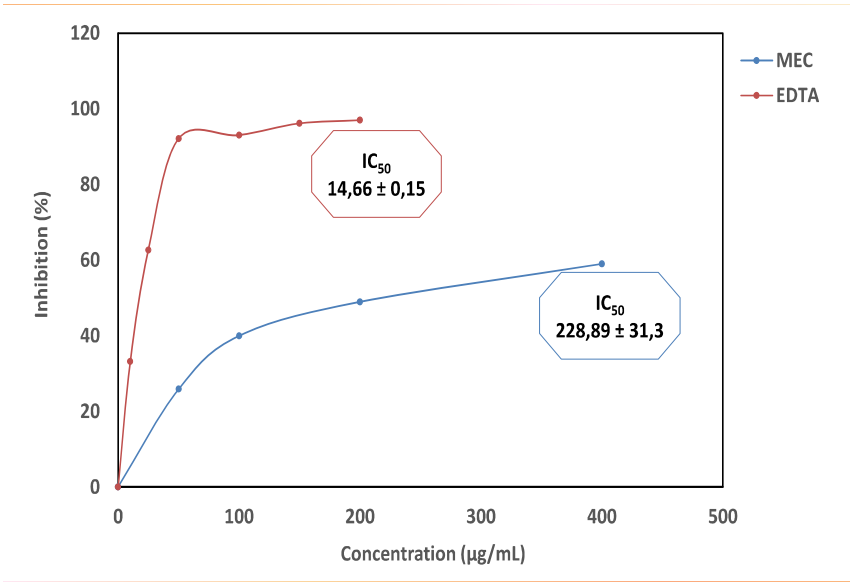
أوضحت النتائج قدرة أسر مستخلص أوراق زيتون Chemlal لجذرOH· بنسبة 30%عند تركيز50 مكروغرام/مل ،ونسبة43 % عند تركيز100مكروغرام/مل، ونسبة 49.8%عند تركيز 150مكروغرام/مل ونسبة 68.9%عند تركيز 200مكروغرام/مل ، ونسبة 76.3%عند تركيز250 مكروغرام/مل . وقدر IC_{50} مستخلص الأوراق بقيمة208.33± 8.53 و قدرتIC_{50} حمض الأسكوربيك بقيمة 83.33 ± 6.25 (شكل 29).



شكل29 : اختبار النشاط الآسر لجذر ·OH (المتوسط ± الانحراف المعياري n=3 ، P<0.01)
(**AA**): حمض الأسكوربيك، (MEC) : مستخلص الأوراق

2.2.2. اختبار النشاط الممخلب لأيونات Fe^{2+}

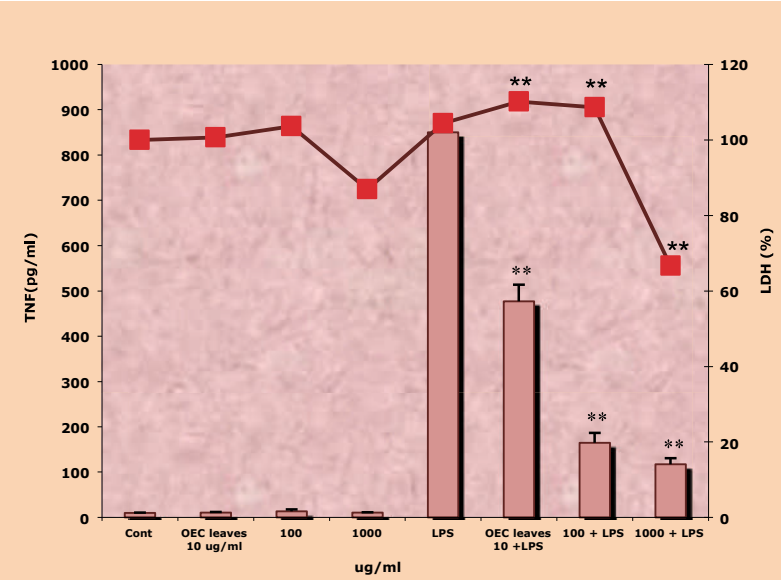
أبدت النتائج نشاطا ممخلبا لأيونات Fe^{2+} قدرت بنسبة25 % عند تركيز50مكروغرام/مل، ونسبة 39%عند تركيز 100مكروغرام/مل ونسبة 48%عند تركيز 200مكروغرام/مل ، ونسبة 59%عند تركيز400 مكروغرام/مل . وقدر IC_{50} مستخلص الأوراق بقيمة 228.89 ±31.3 ، أماالـ EDTA فقد قدرت IC_{50} بقيمة 14.66 ± 6.25 (شكل 30).



شكل30: اختبار النشاط الممخلب لأيون Fe^{2+} (المتوسط ± الانحراف المعياري n=3 ، P<0.01)
(MEC) : مستخلص الأوراق

3.2.2. اختبار النشاط المضاد للالتهاب

قدرت حيوية الخلايا وذلك بتقدير نسبة تسرب إنزيم LDH من خلايا THP-1 المتلفة بوجود أو غياب الLPS وتراكيز متزايدة من المستخلص الميثانولي لأوراق زيتون Chemlal. يعتبر LDH مؤشر جيد يعبر عن التكامل الغشائي وحيوية الخلايا. أوضحت النتائج انخفاض معنوي ($P<0.01$) في مستوى LDH خاصة عند التركيز1000µg /ml بنسبة 66.7% المرافق لانخفاض معنوي ($P<0.01$) في تركيز TNF-α وذلك بنسب 56.13% ، و19.3% ، و 13.78% عند التراكيز10 ، و100 ، و 1000µg /ml على الترتيب مقارنة بالمزارع الخلوية التي عوملت بمركب LPS فقط. مما يؤكد فعالية المستخلص في تحسين والحفاظ على ثبات التكامل الغشائي وكذا ضمان حيوية الخلايا وتعديل النشاط الالتهابي (شكل 31).



شكل 31: نشاط إنزيم LDH وتركيز TNF-α (المتوسط ± الانحراف المعياري n=3، $P<0.01$)

3. المناقشة

لدراسة الأثر الوقائي *in vitro* لمستخلصات الزيتون ، قدرت القدرة الكلية المضادة للأكسدة وذلك من خلال تقديرنشاط الأسرالجذري ، والكفاءة الاختزالية ، و تثبيط تفاعل ما فوق الأكسدة اللبيدية. بينت النتائج أن صنف Coratina المتبوع بصنف Chemlal كل منهما يملك نشاطا مرتفعا آسر لجذرDPPH. ولوحظ ترابط إيجابي كبير ما بين المحتوى الفينولي الكلي وقدرة أسر هذا الجذر. مما يسمح بالقول أن النشاط المضاد للأكسدة قد يعزى إلى نشاط مركب فينولي منفرد أوإلى نشاط المجموع الجزيئي بهذه المستخلصات وذلك وفق آليات مختلفة. فقد أوضح *in vitro* ، أن الفلافونيدات تمارس أثرا آسرا مباشرعلى الجذور الحرة وذلك بإعطاء ذرة الهيدروجين محولة الجذر إلى صورة غير نشطة ، حيث يتحول الجذر الحر $R^{\cdot}$ إلى جذر phenoxyl (Pietta,2000). ويعتمد الفعل الآسر للجذور الحرة على البنية ortho-dihydroxy(catechol) للحلقة B وذلك لإزاحة الإليكترون. وكذلك الرابطة المضاعفة 3،2 والارتباط الضروري مع الوظيفة 4-oxo للحلقة C

لإزاحة إليكترون من الحلقة B (Croft , 2006). إضافة إلى مجاميع OH عند الوضعيات 3 و5 تحتاج إلى ربط الهيدروجين بالمجموعة oxo (Croft ,2006 ; Bors *et al* . ,1990). واعتمادا على هذه الآليات ، فإن الفلافونيدات تؤمن فعلا آسرا للجذور الحرة وبكفاءة عالية وذلك ضمن الطور المائي (Rice-Evans *et al* ,1996) . . أما بالنسبة لمحتوى tannin فقد سجل ترابط متماثل لنشاط التقاط جذر DPPH والقدرة الإرجاعية. ويعزى ذلك إلى الأنوية الفينولية. وقد أكد (Uchida *et al* .,1987) أن tannin الكثيفة ذات galloylation تملك فعل آسر لجذر DPPH وأيضا بالنسبة لجذور OH· ، و $O_2^{\cdot -}$ ، وقد وجد أن galloylation بالوضعية 3/ تزيد في قدرة التقاط OH· و $O_2^{\cdot -}$.

تم بهذه الدراسة حساب ترابط Pearson للتعرف على المساهمة الفردية لكل مركب فينولي على حدى في تحقيق النشاط المضاد للأكسدة. حيث وجد أن مركب p-hydroxy benzoic acid ومركب verbascoside كل منهما قد ساهم في تحقيق القدرة الإرجاعية. ورجحت قدرة الأسر الجذري إلى مركب tyrosol. بينما ، اتضح أن hydroxytyrosol يعتبر المركب الوحيد المساهم في الالتقاط الجذري ، والقدرة الإرجاعية ، وتثبيط تفاعل ما فوق الأكسدة اللبيدية. وقد يعزى ذلك إلى تنوع آليات تأثير hydroxytyrosol التي ترتبط بنوع الجذور المستهدفة و مواقع التأثير سواء بوسط مائي أو دهني. حيث أوضحت الدراسات أن مركب hydroxytyrosol يؤمن أسر الجذور الحرة المائية القريبة من الغشاء وتلك البروكسيلية اللبيدية الموجودة ضمن الغشاء. وهو آسر جيد للجذور مركزية الأوكسجين (Soni *et al*. ,2006)

بالإضافة، فقد قيم الأثر الوقائي المضاد للأكسدة وذلك باختبار قدرة مستخلص أوراق زيتون Chemlal على أسر جذر OH· و مخلبة أيونات Fe^{2+} . إذ يعتبر جذر OH· من الجذور التفاعلية مع العديد من الجزيئات الحيوية للخلية منها السكريات ،والأحماض الآمينية ،والنكليوتيدات ،والدهون (Stohs and Bagchi .,1995b). أما أيونات Fe^{2+} فهي تتدخل في النقل الإليكتروني الضروري لنشاط العديد من الإنزيمات ، كما لها القدرة على نقل إليكترون واحد و تحفيز تفاعلات الأكسدة الذاتية (Lloyd *et al* .,1997). أدى استعمال تراكيز متزايدة من المستخلص إلى أسر جذر OH· ،ومخلبة أيونات Fe^{2+} وهذا يدل على أثر مضاد للأكسدة . وقد يرجح هذا الأثر إلى مساهمة المركبات الكيميائية عديدة الفينولات التي يحظى بها هذا المستخلص ذو المحتوى الفنيولي الكلي المقدربكمية 81مغGAE /غ الذي يضم الفلافونيدات كمركب luteolin حسب ما كشفت عنه الدراسة الكيميائية وكذا مركبات secoiridoid منها oleuropein . بالإضافة إلى الكحولات الفينولية منها hydroxytyrosol . ويعتمد أثر الفلافونيدات المضاد للأكسدة على خصائص منها خاصية أسرالأنواع الجذرية من خلال اعطاء هيدروجين/اليكترون من مجموعة الكوتيكول بالحلقة B (Burda and Oleszek,2001) ومخلبة المعادن كالحديد ،والنحاس وذلك بفضل الرابطة المضاعفةC2-C3 المرتبطة مع مجموعة oxo عند الكربون 4. وبالمثل فإن مركب oleuropein له القدرة على أسر جذر OH· وكذا مخلبة أيونات النحاس ، و الحديد (Andrikopoulas *et al* . , 2002).

أيضا، فقد تم تقييم الأثر الوقائي المضاد للالتهاب للمستخلص الميثانولي لأوراق زيتون Chemlal وبتراكيز متزايدة *in vitro* اثر معاملة كريات الدم البيضاء أحادية النواة THP-1 بمركب LPS. أدت معاملة خلايا THP-1 بمركب LPS و تراكيز متزايدة من المستخلص الميثانولي إلى خفض تركيز TNF-α ضمن الوسط مقارنة بالمزارع الخلوية المعاملة باLPS فقط. إن سبب ظهور تراكيز مرتفعة من TNF-α يعود إلى تنشيط خلايا THP-1 بمركب LPS حيث أوضح بأن هذا الأخير يعمل على تنبيه انتاج الأنواع الأوكسيجينية النشطة مثل جذور $O^{\cdot-}_2$ و $OH^{\cdot}$ و $NO^{\cdot}$ التي تعتبر كرسل ثانوية لها أن تكون مسئولة على نقل المعلومة الضرورية لحدوث الاستنساخ الجيني. فالكثير من الأبحاث كشفت بأن H_2O_2 بامكانه أن ينشط عامل الاستنساخ NF-κB (Schreck *et al* .,1991) والذي بدوره ينظم استنساخ عدد من الوسائط الالتهابية منها TNF-α المسئول عن حدوث التفاعلات الالتهابية (Sanlioglu *et al* .,2001) مما يؤدي إلى ارتفاع تركيزه بالوسط . أيضا، فإن أهم المصادر المنتجة للأنواع الأوكسيجينية النشطة كمركب H_2O_2 ترتبط بنشاط معقد NADPH Oxidases لدى البالعات منها كريات الدم البيضاء أحادية النواة (Bokock,1995) حيث يلتقط هذا المعقد المرتبط بالغشاء اليكترونات من NADPH وذلك لإرجاع الأوكسجين الجزيئي O_2 فيتشكل أنيون $O^{\cdot-}_2$. هذا الأخير لا يلبث أن يتحول وبسرعة إلى H_2O_2 و O_2 وذلك بتدخل إنزيم SOD . كما وجد أن LPS له القدرة على تنشيط إنزيم NADPH Oxidase والذي يتداخل مع بروتين Rac المرتبط بمركب GTP . يؤدي ذلك إلى انتاج ROS الإبتدائية والضرورية لإفراز TNF-α (Sanlioglu *et al* .,2001). و قد يعزى تراجع مستوى TNF-α ضمن المزارع الخلوية المعاملة بمركب LPS إلى تثبيط انتاج الجذور الحرة الضرورية لتنشيط عامل استنساخ TNF-α والمتمثل في NF-κB وبالتالي ظهور أثر تعديلي مضاد للالتهاب الناجم عن تدخل المركبات الكيميائية عديدة الفينولات والتي كشفت عنها الدراسة الكيميائية بهذا المستخلص، منها الفلافونيدات كمركب luteolin ،وكذا مركبات secoiridoid منها oleuropein بالإضافة إلى الكحولات الفينولية منها hydroxytyrosol وذلك من خلال السلوك التآزري لمختلف المركبات الفينولية التي يتوفر عليها هذا المستخلص. فالعديد من الدراسات أقرت ظهور أثر تعديلي مضاد للالتهاب وذلك بالتأثير على انتاج $NO^{\cdot}$ اثر معاملة خلايا مخاطية الرئة بأوراق الزيتون (Zaslaver *et al* .,2005) أو من خلال التأثير الفردي لكل مركب فينولي على حدى وهذا ماكشفت عنه الكثير من البحوث.إذ أدى استعمال hydroxytyrosol وtyrosol ضمن مزارع خلايا THP-1 إلى انخفاض مستوى $O^{\cdot-}_2$. هذا الأخير القابل للتحول إلىH_2O_2 فيحدث تنشيط NF-κB. كما أدى استعمال hydroxytyrosol ومركبات فينولية أخرى إلى خفض مستوى ROSو$NO^{\cdot}$ ووقاية GSH وذلك ضمن خلايا THP-1 المعاملة باLPS (Zhang *et al* .,2009). وبالمثل فإن تحضين خلايا THP-1 ضمن مستخلص زيت الزيتون سمح بخفض القدرة الالتهابية لدى كريات الدم البيضاء أحادية النواة وذلك بالتأثير على مستوى الاستنساخ الجيني لبعض الجينات المرتبطة بعامل NF-κB منها جينات TNF-α (Dell'Agli *et al* .,2010) . وحسب ماتوصل إليه(2004) ., O'Dowd *et al* فإن hydroxytyrosol المشتق من زيت الزيتون له القدرة على أسر H_2O_2 دون $O^{\cdot-}_2$ المفرز خلال عملية إفراز ROS.

4.الخلاصة

أجريت هذه الدراسة لاختبار النشاط الوقائي *in vitro* وذلك بتقدير القدرة الكلية المضادة للأكسدة بمستخلصات الزيتون من خلال تقدير نشاط الأسرالجذري، والكفاءة الاختزالية، وتثبيط تفاعل ما فوق الأكسدة اللبيدية. حيث وفركل من صنف Coratina ونوعChemlal نشاط بالغ آسر للجذر. خلافا لصنف Sigoise الذي أظهر نشاطا إرجاعيا منخفضا اتجاه الجذر. كما ضمنت أصناف Frantoio، وCoratina ، و Chemlal ، وMaiatica قدرة إرجاعية كبيرة مقارنة بصنف Sigoise الذي أظهر قدرة إرجاعية منخفضة.

وقد تباين النشاط التثبيطي لتفاعل ما فوق الأكسدة اللبيدية لمختلف المستخلصات ،حيث تميز صنف Ogliarola بقدرة تثبيطية أعظمية. وسمح حساب ترابط Pearson بالتعرف على المساهمة الفردية المضادة للأكسدة لكل مركب فينولي على حدى. فقد أمن مركب p-hydroxy benzoic acid ، ومركبverbascoside قدرة إرجاعية كبيرة. أما مركب tyrosol شارك في قدرة الالتقاط الجذري. وانفرد مركب hydroxytyrosol عن باقي المركبات الفينولية بقدرته الوقائية المتنوعة شملت الالتقاط الجذري ،والارجاع وكذا تثبيط تفاعل ما فوق الأكسدة اللبيدية.

كما انجزت دراسة تقييم النشاط الوقائي *in vitro* لمستخلص أوراق زيتون Chemlal وذلك لاختبار النشاط الملتقط لجذر $OH\cdot$ والنشاط الممخلب لأيون Fe^{2+} ،والنشاط المضاد للالتهاب. حيث حقق المستخلص قدرة التقاط كبيرة لجذر $OH\cdot$ ومخلبة قوية لأيون Fe^{2+}، كما حد من تسرب إنزيم LDH من خلايا THP-1واختزل تركيز TNF-α بوجود LPS ضمن المزارع الخلوية.

ونخلص من هذه الدراسة بأن القدرة الكلية المضادة للأكسدة بمستخلصات ثمارالزيتون تتباين من نوع إلى آخر. ويعزى هذا التباين إلى الاختلاف الكمي والنوعي للمركبات الفينولية الموجودة بمستخلصات ثمار الزيتون الناضج. وقد يعزى هذا الفعل الوقائي سواءا إلى تآزر جزيئي للمركبات الفينولية بالصنف الواحد وهذا ماأمنه الصنف الجزائري Chemlal دون مثيله Sigoise، أو إلى انفراد مركب فينولي في تحقيق الأثر الوقائي ،وهذا ماحققه مركبhydroxytyrosol الذي تميز بقدرة كلية مضادة للأكسدة شملت الالتقاط الجذري، والإرجاع، وكذا تثبيط تفاعل ما فوق الأكسدة اللبيدية. بالإضافة فإن مستخلص أوراق زيتون Chemlal يملك نشاطا مضادا للأكسدة و آخر مضادا للالتهاب *in vitro* . إن هذه الخصائص الوقائية التي ميزت مستخلص زيتون Chemlalالغني بمركب hydroxytyrosol وكذا تلك التي اتصف بها مستخلص أوراق زيتون Chemlal ترشحهما لاختبار النشاط الوقائي *in vivo* المضاد لبعض المؤكسدات أو طلائعها منها الزئبق. إلا أن الدراسة *in vivo* تستقطب مستخلص أوراق زيتون Chemlal.

V - الدراسات *in vivo*

1. طرق ومواد العمل

1.1. حيوانات التجربة

انجزت الدراسة على فئران ذكور Albino جلبت من معهد الصيدلة بكلية الطب لجامعة قسنطينة. عمرالفئران 8 أسابيع ، وتتراوح أوزانها مابين 20-22 غرام. غذيت الفئران بغذاء libitum منتج الديوان الوطني لإنتاج أغذية الأنعام. وزعت الفئران على خمسة أقفاص معدنية بعدد 6 فئران بكل قفص. مجموعة الشاهد عوملت بالمحلول الفيزيولوجي (0.9%NaCl) يوميا مدة 10أيام عبر المجرى الهضمي. المجموعة الثانية تناولت المستخلص الميثانولي لأوراق زيتون Chemlal بجرعة 200مغ/كغ من وزن الجسم وذلك مدة 10أيام. أما المجموعة الثالثة عوملت بالمحلول الفيزيولوجي (0.9%NaCl) يوميا مدة 10أيام وقد حقنت الفئران بكلوريد الزئبق (5مغ/كغ) حقنة واحدة عبر المجرى الصفاقي وذلك باليوم العاشر (Sharma *et al* ,2007). واستقبلت المجموعة الرابعة صوديوم سلينات 0.1 مغ/كغ (Iwata *et al* ., 1973) يوميا عبر الفم ولمدة 10أيام قبل حقن كلوريد الزئبق بجرعة 5مغ/كغ. أما المجموعة الخامسة ، فقد تناولت المستخلص الميثانولي لأوراق زيتون Chemlal بجرعة 200مغ/كغ من وزن الجسم (Kaeidi *et al*., 2011)وذلك مدة 10أيام ، وحقنت بكلوريد الزئبق بجرعة 5مغ/كغ من وزن الجسم حقنة واحدة وذلك باليوم العاشر.

قدرت أوزان الفئران يوميا ، وخضعت لصيام ليلة كاملة قبل التشريح. استقبلت العينات الدموية ضمن أنابيب هيبارينية ، وطردت مركزيا عند 3000 rmp مدة 15دقيقة عند 4° م.

2.1. المعايرات البيوكيميائية

1.2.1. معايرة مؤشرات السمية الكلوية

. اليوريا

اتبعت الطريقة الإنزيمية اللونية باستعمال حمض سليسيليك وإنزيم اليورياز (Fawcett and Scott,1960) وذلك باستعمال sera –pak kitts .

. الكرياتنين

اتبعت طريقة De Jaffe دون إزالة البروتينات (Popper ,1937 ; Seelig and Wust,1969) باستعمال Seurobiokitts.

2.2.1. معايرة مؤشرات الإجهاد التأكسدي

لأجل معايرة (MDA) استعمل المجنس الكلوي المحصل عليه بسحق 1غرام من الجزء القشري للكلية ضمن 3مل من محلول 15%KCL و1% saccharose البارد . بينما قدرت أنشطة CAT، وSOD ، وGSH و GPx ، وGST ، وGR ضمن الطافي المحصل عليه من المجنس الكلوي.

. قياس (MDA)

يعتمد تقدير MDA على القياس اللوني للمركب الناتج إثر التفاعل المعتمد ما بين جزئية MDA ناتج تفاعل الأكسدة الليبيدية بالأغشية مع جزئيتين من TBA وفقا لطريقة (Ohkawa *et al*., 1979). إذ يحدث التفاعل بوسط حمضي عند pH 2-3 ودرجة حرارة 100°م ، قدر اللون عند 350 نانو متر، وعبر عن تركيز MDA بالنانومول من MDA/غ من النسيج.

. معايرة نشاط Catalase (CAT)

أمكن تقدير نشاط إنزيم CAT وفق طريقة (Aebi ,1974). إذ وضع حجم 20 مكرولتر من القطفة السيتولوزية إلى محضن من الكوارتز و ينشط التفاعل بإضافة 500 Mm H_2O_2ضمن وسط pH 7.5 . وقدر معدل تفكك H_2O_2 مطيافيا عند طول موجي 420nm خلال 15 ثانية و 60 ثانية. عبر عن النشاط الإنزيمي H_2O_2 المفكك / دقيقة / مغ بروتين.

. معايرة نشاط Superoxide dismutase(SOD)

اعتمد تقدير نشاط SOD على طريقة (Bauchamp and Fridovich ,1971). يثبط الإنزيم ارجاع مركب (NBT) بواسطة جذر O^{-}_2 و الذي ينتج اثر تفاعل الإرجاع بوجودriboflavin و الأوكسجين.

%التثبيط = OD الشاهد - OD العينة/OD الشاهد x 100

النشاط الإنزيمي= (التثبيط/50) x 100 و ذلك عند 560 نانومتر.

3.2.1. معايرة نظام Glutathion

اعتمد قياس GSH السيتوزولي على كاشف DTNB وفقا لطريقة(Ellman,1959) و عبر عنه بالنانومول / مغ بروتين. وقدر نشاط GPx حسب طريقة (Mohandas *et al*.,1984) و استعمل H_2O_2 كمادة تفاعل وعبرعن النشاط كوحدة/مغ من البروتين. أما نشاط GR ، فقد قدر مطيافيا اثر تحول NADPHإلى$NADP^+$ في وجود GR. واعتبرت الوحدة الإنزيمية كا nmol NADPH oxidized/min/g من النسيج الرطب (Zhu *et al* .,2007). وقدرنشاط GST وفقا لطريقة (Alin *et al*.,1985) وعبر عن النشاط nmol CDNB المرتبط بالGST / دقيقة / مغ بروتين.

4.2.1. معايرة مؤشرات الالتهاب

. تقدير نشاط انزيمLactate dehydrogenase (LDH)

قدر نشاط (LDH) بالكلى وذلك حسب طريقة Kroblewski المذكورة بوصفة Sigma رقم 500 (Wroblewski,1969).

.تقدير نشاط إنزيم MPO

يدل نشاط MPOعلى ارتشاح كريات الدم البيضاء المتعادلة، يحدد نشاطه وذلك بتقدير dianisidine- H_2O_2. غمرت العينات ضمن 1مل من منظم 50mM sodium phosphate الذي يضم 0.5% من(pH6)hexadecyl trimethyl amonium bromide. بردت العينات و طردت مركزيا عند rpm12000 مدة 15 دقيقة عند 4^0م. يميه الطافي ضمن منظم phosphate الذي يضم 0.167 مغ/مل من *o*-dianisidine dihydrochloride و0.0005% من H_2O_2. يكون الامتصاص عند 460نانومتر . وعبر عن النشاط كوحدة MPO/مغ من النسيج . تمثل كل وحدة من MPO كمية الإنزيم المفكك لكمية 1نانومول من H_2O_2/د وذلك عند 25^0 م(Bradley *et al* .,1984).

. تقدير مستوى NO

استخدم كاشف Griess لتقدير NO وذلك بتحديد nitrite بطافي النسيج. مزج 100 مكرولتر من طافي النسيج مع 100 مكرولترمن منظم glycine و200 مكرولتر من كاشف Griess 0.1% N-(1-naphthyl)ethylene diaminedihydrochloride,1%sulfanilamide,2.5%H_3OPO_4). قدر الامتصاص عند545 نانومتر عند درجة حرارة الغرفة وذلك بعد مرور 15د .و قدرتركيز nitrite بالعينة وذلك من المنحنى المرجعي sodium nitrite(Green *et al* .,1982).

3.1. الدراسة النسيجية

ثبتت قطع من القشرة الكلوية بمحلول الفورمالدهيد 10% pH 7.4 ثم غمرت بالبرافين . صبغت المقاطع النسيجية 5 µm بصبغة الهيماتوكسلين و الأيوزين لأجل دراسة بنى النسيج القشري الكلوي مجهريا x 400.

4.1. الدراسة الاحصائية

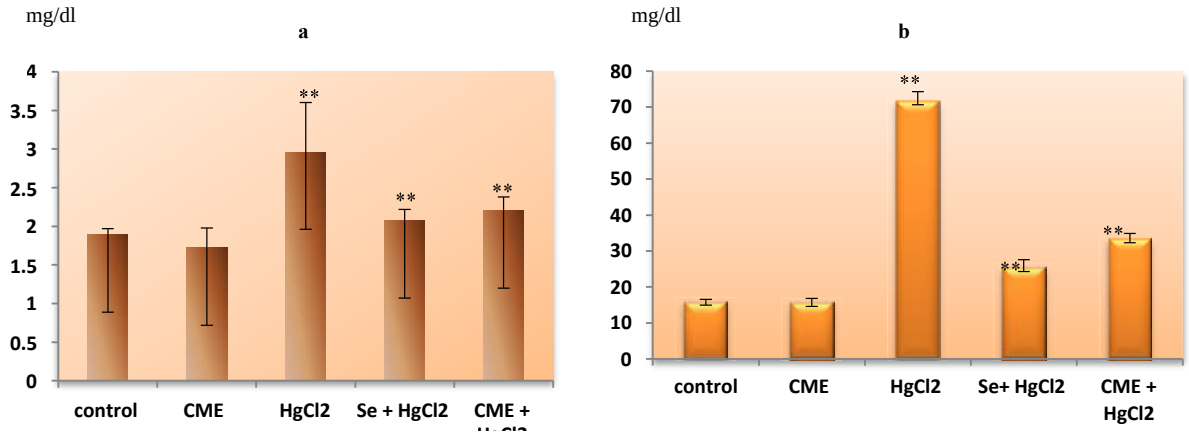
استخدم اختبارتحليل التباين (ANOVA) واعتبر الأثر الوقائي *in vivo* معنويا عند $P<0.05$ و$P<0.01$.

2. النتائج

1.2. المعايرات البيوكيميائية

1.1.2. معايرة مؤشرات السمية الكلوية

سمحت المعاملة بكلوريد الزئبق بجرعة 5مغ/كغ بارتفاع معنوي ($P<0.01$) في مستويات نسبة اليوريا ، والكرياتنين مقارنة بقيم الشاهد. وقد يعزى هذا إلى حدوث خلل وظيفي كلوي. بينما حفز التعاطي المسبق للمستخلص الميثانولي لأوراق الزيتون وحقن السلينيوم إلى خفض معنوي ($P<0.01$) في نسبة اليوريا بنسب 68,82% و83,17% على الترتيب ، وكذا بالنسبة لمستوى الكرياتنين إذ سجلت نسب 71,02% و82,84% على الترتيب (شكل32).

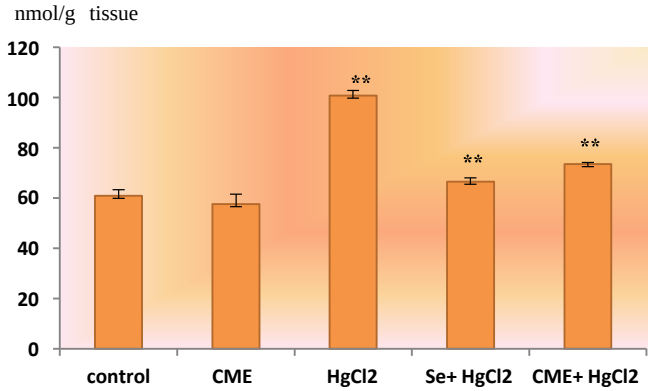


شكل 32: الدور الوقائي للسلنيوم ومستخلص أوراق الزيتون Chemlal على التركيز البلازمي لليوريا(a) والكرياتنين(b) لدى الفئران المحقونة بكلوريد الزئبق (المتوسط ± الانحراف المعياري n=6 **P<0.01)

2.1.2. معايرات مؤشرات الإجهاد التأكسدي

Malondialdehyde.

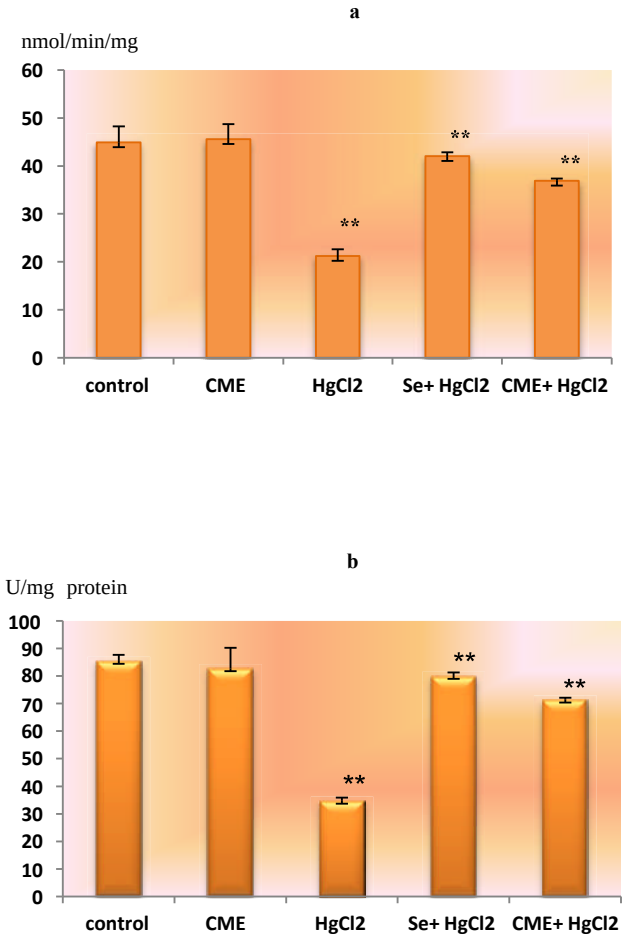
أوضحت النتائج ارتفاع معنوي ($p < 0,01$) في نسبة MDA لدى المجموعة المعاملة بكلوريد الزئبق مقارنة بالمجموعة الشاهد. خلافا لذلك، فإن استعمال كل من السيلنيوم أو المستخلص الميثانولي لأوراق الزيتون أدى إلى تراجع كبير ومعنوي ($p < 0,01$) بنسبة 85.96 %و 68.2 % على الترتيب (شكل 33).



شكل 33 : الدور الوقائي للسلنيوم ومستخلص أوراق الزيتون Chemlal على مستوى MDA لدى الفئران المحقونة بكلوريد الزئبق (المتوسط ± الانحراف المعياري n=6، **P<0.01)

. نشاط إنزيم CAT و نشاط إنزيم SOD

سجل انخفاض كبير ومعنوي ($p < 0,01$) في أنشطة إنزيم CAT و إنزيم SOD لدى الفئران المحقونة بكلوريد الزئبق مقارنة بالمجموعة الشاهد. بينما حفز ادخال السيلنيوم أوالمستخلص الميثانولي لأوراق الزيتون على زيادة ملحوظة ومعنوية ($p < 0,01$) في نشاط إنزيم CAT وذلك بنسب 66,20 % و87,98 %على الترتيب ،وبالمثل بالنسبة لنشاط إنزيم SOD حيث سجلت نسب 89,20% و72,33% على الترتيب (شكل 34).

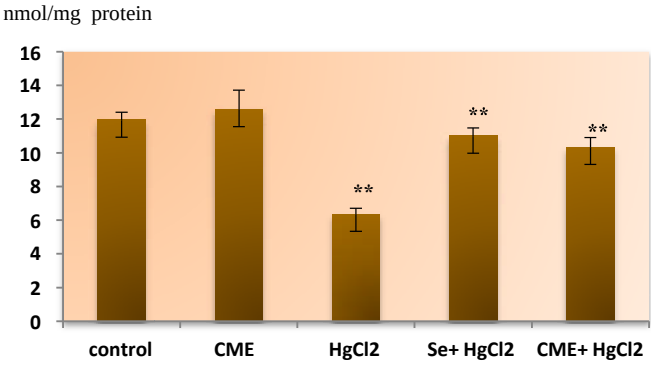


شكل 34 : الدور الوقائي للسلنيوم ومستخلص أوراق الزيتون Chemlalعلى نشاط إنزيم CAT (a)و نشاط إنزيم SOD (b) لدى الفئران المحقونة بكلوريد الزئبق (المتوسط ± الانحراف المعياري n=6، P<0.01**)

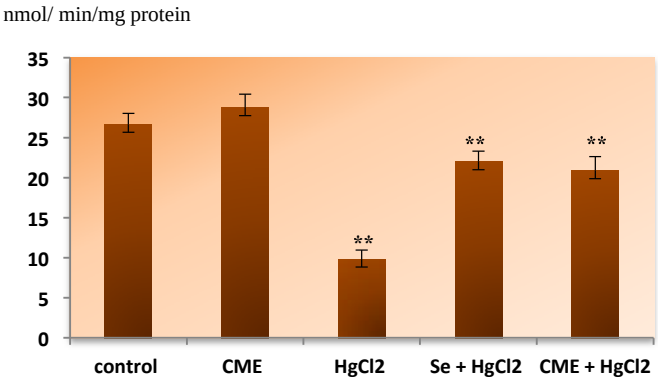
3.1.2. معايرات مؤشرات نظام Glutathion

أدى حقن كلوريد الزئبق بجرعة 5مغ/كغ إلى انخفاض معنوي ($p < 0,01$) في نسبة GSH وفي أنشطة إنزيمات GPx ،وGR ،و GTS بالكلى. بينما سمح استعمال كل من السيلنيوم و مستخلص أوراق الزيتون بارتفاع معنوي ($p < 0,01$) وبالترتيب في محتوى GSH وذلك بنسبة 83,16 %و 70,88% ،وكذا بالنسبة لأنشطة إنزيمات كل من GPx، حيث سجلت نسب 72.24%و 65.60% ، و إنزيم GR بنسب 85.78%و 60.99 %. أما انزيم GTS فقد ارتفع بنسب 80.38%و 55.21% (شكل35).

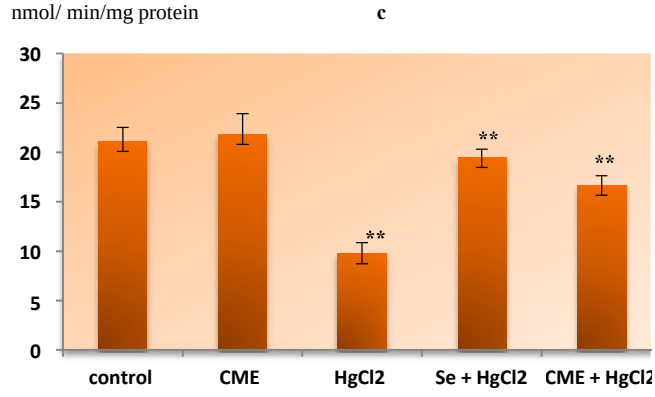
a

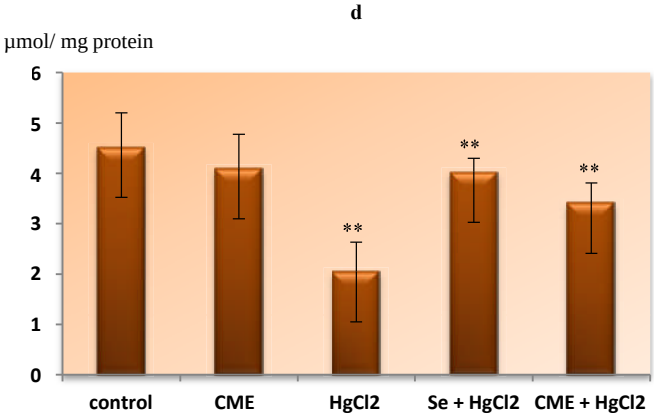


b



c

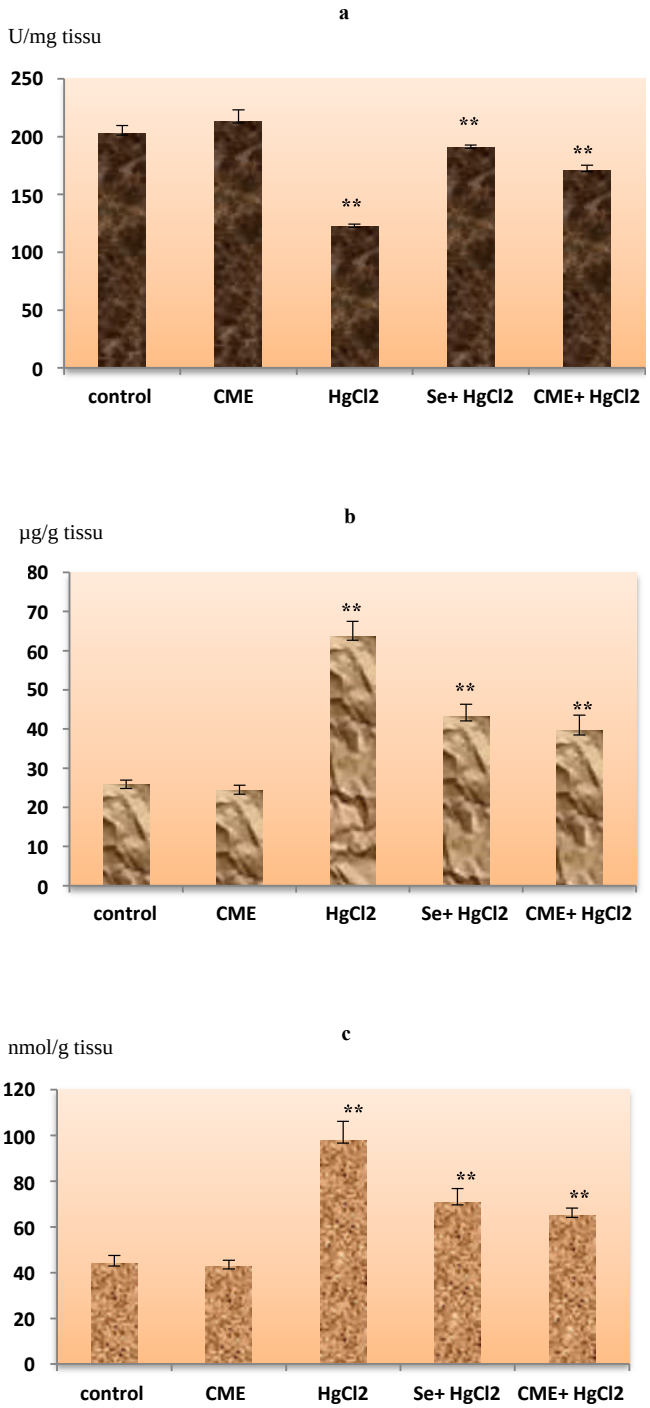




شكل 35 : الدور الوقائي للسلينيوم ومستخلص أوراق الزيتون Chemlalعلى مستوى GSH (a) و GPx (b) و GR (c) و GTS (d) لدى الفئران المحقونة بكلوريد الزئبق (المتوسط ± الانحراف المعياري n=6، (**P<0.01

4.1.2. مؤشرات النشاط الإلتهابي

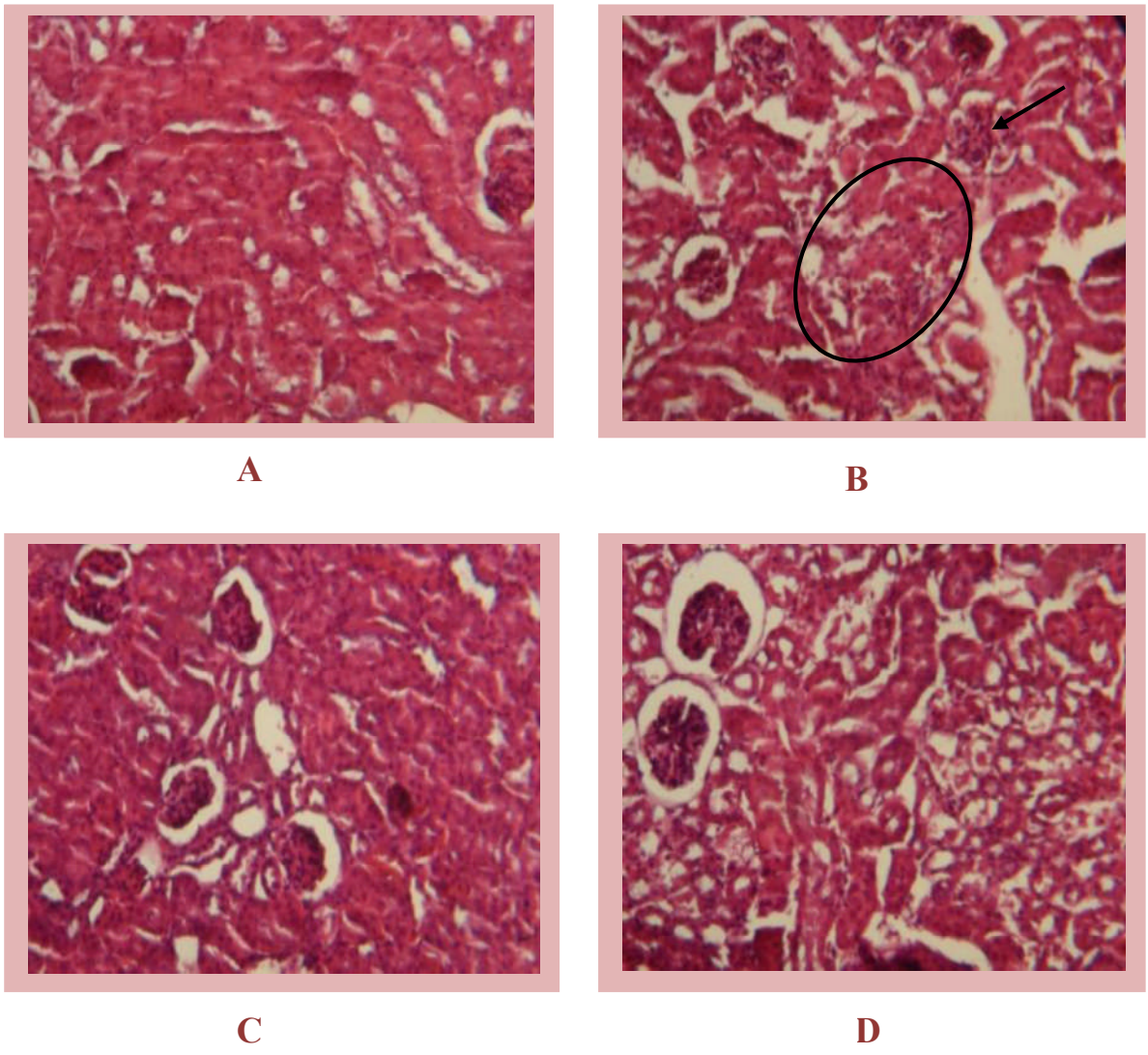
سمحت معاملة الفئران بكلوريد الزئبق وذلك بجرعة 5مغ/كغ بانخفاض معنوي ($p < 0,01$) في نشاط LDH مع ارتفاع معنوي ($p < 0,01$) في نشاط إنزيم MPO ومحتوى NO الكلوي. بينما أدى تعاطي السيلنيوم ومستخلص أوراق الزيتون زيادة في نشاط إنزيم LDH بنسبة 85,60% و 60,25% على الترتيب مع تسجيل انخفاض معنوي ($p < 0,01$) في نشاط إنزيم MPO بنسبة 54.43% و 63.80 % بنسب محتوىNO 50.19 % و 60.46% على الترتيب (شكل36).



شكل 36 : الدور الوقائي للسلينيوم ومستخلص أوراق الزيتون Chemlal على مستوى LDH (a) وMPO (b) و NO(c) لدى الفئران المحقونة بكلوريد الزئبق (المتوسط ± الانحراف المعياري n=6، **P<0.01)

2.2. الدراسة النسيجية

سمح الفحص المجهري x400 بكشف اضطرابات مورفولوجية محددة ذات انتشار واسع وذلك بكلى الفئران المحقونة بحقنة حادة من كلوريد الزئبق 5 مغ/كغ. فقد سجل ضمور برانشيمي كلوي حاد يعكس التلف الكلوي. كما لوحظ انتشار بقايا خلوية خاصة بلمعة الأنابيب الملتوية القريبة والبعيدة. وقد رافقت هذه الاضطرابات البنيوية ارتشاح كريات الدم البيضاء، وذلك بالمساحات الكلوية المتلفة لدى المجموعة المعاملة بكلوريد الزئبق. أما ادخال السلينيوم فقد حافظ على الهندسة الكبيبية وظهور خلايا طلائية منتظمة ببعض الأنابيب كما أمن تعاطي المستخلص الميثانولي لأوراق الزيتون أثر وقائي يؤكده اختزال التلف الملاحظ وبمناطق محدودة (شكل37).



شكل 37: مكروغراف المقاطع الكلوية لدى الفئران المعاملة بكلوريد الزئبق5مغ/كغ والدور الوقائي للسلينيوم ومستخلص أوراق الزيتون Chemlal (هيماتوكسلين وأيوزين x400)

A الشاهد بنى كبيبية وأنبوبية طبيعية بالبرانشيم الكلوي

B المعاملة بكلوريد الزئبق 5مغ/كغ اضطراب البرانشيم الكلوي وفقدان الترتيب البنيوي الأنبوبي (دائري) وتلف حاد بالكبب (←) وتمدد فراغ باون ونكرزة واسعة بالأنبوب القريب

C المعاملة بالسلينيوم وكلوريد الزئبق 5مغ/كغ حافظت المعاملة المسبقة بالسلينيوم على الهندسة الكبيبية وظهور خلايا طلائية منتظمة ببعض الأنابيب

D المعاملة بالمستخلص الميثانولي لأوراق الزيتون وكلوريد الزئبق 5مغ/كغ ظهوراضطراب نسيجي وبدرجات محدودة مع وقاية الأنابيب القريبة و الكبيبات.

3. المناقشة

تعتبر الكلية موقع استهداف لأملاح الزئبق والذي له أن يستهدف الأنابيب القريبة القشرية من المنطقة المستقيمة (Stacchiotti *et al* ., 2003) كونها غنية بمجاميع التيول. إذ تفرض الألفة الكيميائية الموجودة بين هذه المجاميع والزئبق حدوث الارتباط على مستوى بعض البروتينات النوعية بالكلى كالميتالوتيونين ،وكذا الجزيئات التيولية منخفضة الوزن الجزيئي (Perottoni *et al* ., 2004) ، مما يسمح بظهور تفاعلات الإجهاد التأكسدي لاسيما وأن الزئبق يملك خاصية الطليعة المؤكسدة ، فيحدث وأن تتأثر الوظيفة الكلوية وذلك من خلال اختزال كفاءة الارتشاح الكبي ،وإعادة الامتصاص ،والإفراز النفروني مع ظهوراضطراب بنيوي.

بالدراسة الحالية أظهرت الفئران المعاملة بجرعة حادة من الزئبق اضطرابا وظيفيا بالكلى تميز بارتفاع التركيزالبلازمي لليوريا ، والكرياتنين واضطراب النظام الردوكسي من خلال تفاعلات الإجهاد التأكسدي، حيث سجل اختزال كفاءة النظام الجلوتاتيوني وتراجع أنشطة إنزيمات CAT وSOD وزيادة MDA بالكلى. وقد يعزى الاضطراب النفروني الوظيفي إلى اختلال بنية الأغشية النفرونية الناجم عن حدوث تفاعل أكسدة الدهون غير مشبعة والتي تبني الطبقة اللبيدية الثنائية للخلية الكلوية. وقد ترجح هذه الأكسدة إلى انتاج مفرط منROS أخطرها جذر الـ OH·. إن التعرض للزئبق يسمح بظهور مصادرعدة من ROS ، أهمها تلك الناتجة عن أكسدة مجاميع التيول المكونة للجلوتاتيون والذي يعتبر مركب مركزي ضروري لضبط تفاعلات الأكسدة والإرجاع، وتحقيق توازن النظام الردوكسي الداخل خلوي (Hayes and McLellan ,1999).

يؤمن GSH نشاطه المضاد للأكسدة بالتآزرمع إنزيمات نوعية عدة. فإنزيم SOD يرجع جذر البروكسيد إلى H_2O_2 مخفضا بذلك تركيزالـ OH·. ويزداد مستوى نشاط إنزيم SOD بارتفاع محتوى جذور $O^{\cdot-}_2$ اثر التعرض للمركبات المنشطة لتفاعلات الأكسدة والإرجاع. أما إنزيم GPx يضمن تفكيك H_2O_2 بوجود الـ GSH والذي يؤكسد إلى GSSG بارتباط مجموعتين كبريتيتين للحمض الآميني السيستئين فيتشكل جسر ثنائي الكبريت. ويتكامل عمل إنزيم GPx وإنزيم الـ CAT وذلك لتفكيك H_2O_2 بسبب انتشارهما معا ببعض الأنسجة. ويحدث الـ GSH التوازن من خلال تدخله الإيجابي وذلك في رقابة تفاعلات إرجاع المجاميع الكبريتية المؤكسدة (Meister.,1988)،إذ يضمن الـ GSH إعطاء الإلكترون الضروري لتدخل GPx. ويتم ارجاع

الصورة المؤكسدة GSSG وذلك بتدخل إنزيم GR . ويبقى الـ GSH عرضة للكثير من المؤكسدات أو الطلائع المؤكسدة منها الزئبق (Perottoni *et al* ., 2004) ، حيث وجد بأن الزئبق مثبط جيد لمجاميع تيول الـ GSH وبقايا البروتينات. إذ يحدث وأن يرتبط أيون زئبقي وحيد مع جزيئتين من الـ GSH من خلال تشكل روابط تكافئية تفقد هذا المركب التيولي نشاطه (Zalups and Lash ,1996 ; Quig ,1998) . إن الصورة المؤكسدة لمركب الـ GSH تعطل نشاط إنزيم GPx السيتوزولي ، والميتوكندري الضروري لتفكيك H_2O_2 إلى جزيئات ماء. يؤدي هذا العطب إلى ارتفاع تراكيز H_2O_2 مما يسمح بارتفاع مستوى ROS. أيضا يحرض الزئبق على تنشيط سلسلة النقل الإليكتروني الميتوكندري ويختزل الصورة المرجعة لمركب الـ GSH الميتوكندري فيرتفع مستوى ROS منها H_2O_2 (Lund *et al*. , 1991) ،الذي لايلبث أن يتفكك في وجود أيونات الحديديك فينتج جذر الـ$OH^{\cdot}$ والمنشط لتفاعل مافوق الأكسدة اللبيدية فترتفع مستويات مركب MDA أحد مؤشرات الإجهاد التأكسدي بكلى الجرذان (Şener *et al* ., 2007) وبكلى الفئران (Sharma *et al* ., 2007) المعرضة للزئبق. إضافة، فإن ارتفاع مستوى ROS اثر التعرض للزئبق، قد يعزى إلى أثره التثبيطي المباشر على مستوى التعبير الجيني الخلوي للإنزيمات المضادة للأكسدة (Şener *et al* ., 2007).

لقد رافقت تفاعلات الإجهاد التأكسدي النفروني المحرض بجرعة حادة من الزئبق ظهور تفاعلات التهابية بالموقع المتضرر. حيث أبدت الفئران استجابة التهابية تميزت بارتفاع مستوى $NO^{\cdot}$ ،وكذا زيادة نشاط إنزيم MPO وذلك بالنسيج الكلوي وقد ترجح هذه الاستجابة الالتهابية إلى تنشيط إنزيم NOS التحريضي، وكذا تنشيط كريات الدم البيضاء المتعادلة. فقد أوضحت الدراسات أن تحويل L-argenine إلىL-citrulline ينتج عنه كميات كبيرة من $NO^{\cdot}$ (Breno *et al*,2010 ;Jung *et al* ,2010) وخاصة بتدخل إنزيمNOS التحريضي (Boucher *et al* .,1999). ويسمح تفاعل $NO^{\cdot}$ مع O^{-}_{2} بظهور مركب $ONOO^{-}$ وهو مؤكسد قوي يمكن أن يؤدي إلى تغير ردوكسي للبروتينات من خلال نترتة التيروزين ،وأكسدة بقايا السيستئين فينتج حمض السلفونيك (Yap *et al* .,2009). ويعتبر ارتفاع مستوى نشاط MPO النسيجي مؤشرا قويا يكشف عن ارتشاح كريات الدم البيضاء المتعادلة وحدوث تفاعلات الالتهاب الحاد وذلك بوجود الزئبق الذي يتسبب في انفصال جزيئات الربط ما بين الخلايا المكونة لطلائيات النفرون ،فينتج افرازالسيتوكينات وبعض الوسائط الالتهابية التي تجذب كريات الدم البيضاء أحادية النواة باتجاه الموقع المتضرر(Tipping and Timoshanko , 2005 ; Takada *et al* .,1997 ; Kelly and Singer,1993) ،تستجيب هذه الخلايا مفرزة كميات معتبرة من TNF-α وهذا ما أكدته نتائج الدراسة *in vitro* اثر استعمال تراكيز متزايدة من LPS بمزارع THP-1. وقد أخذ بعين الاعتبار تقدير TNF-α، كونه يعتبر أحد سيتوكينات الإلتهاب الأولي خلال تفاعلات الإنتان أو إثر حدوث السمية الحادة المحرضة بالمعادن الثقيلة منها الزئبق اللاعضوي (Şener *et al* 2007) . يساهم TNF-α في تفعيل والجذب الكيميائي لكريات الدم البيضاء المتعادلة، إذ لاتلبث هذه الخلايا بأن تلتصق بطلائية الأوعية الدموية ثم يحدث انسلالها (Carol *et al*.,1997). عندما تبلغ كريات الدم البيضاء

المتعادلة والمنشطة الموقع المتضرر،تلتصق بجزيئات الالتحام خاصة جزيئات P-selectin، وE-selectin و ICAM-1والتي يزداد انتاجها اثر حدوث التلف الكلوي الحاد المحرض بالزئبق (Ghielli *et al* . , 2000)، ثم تتنشط تفاعلات الالتهاب الحادة وذلك بتنشيط إنزيم MPO الداخل حويصلي لكريات الدم البيضاء المتعادلة (Borregaard and Cowland ,1997 ;Klebanoff,1999). إن الافراط في التفاعلات الالتهابية يسمح بتحرير المحتوى الإنزيمي لإنزيم MPO خارج الخلية وارتفاع النشاط النسيجي لهذا الإنزيم (Hoy *et al* ., 2002). يعزز النشاط الالتهابي لإنزيم MPO تفاعلات الإجهاد التأكسدي وذلك من خلال رفع مستوى RNS وROS منها HOCl (Radi *et al* ., 2001) الناتج اثر أكسدة H_2O_2 والكلور (Taurog and Dorris.,1992)،وكذا OH· المتشكل عن تفاعل الـ O^{-}_2 مع HOCl . كما يزداد تركيز RNS وظهور صور منترتة اثر تفاعل HOCl مع $ONOO^-$ (Van Dallen *et al* .,2000) . أيضا، فإن تدخل إنزيمات NAD(P)H oxidase وXanthine oxidase يسمح بحدوث التفاعل مابين HOCl وO^{-}_2 وكذا H_2O_2 فتنتج كميات معتبرة من ROS (Weiss ., 1989) ذات الأثر المؤكسد السمي وذلك على مستوى عدد من الجزيئات الحيوية منها الدهون غير مشبعة ،وكذا أكسدة المراكز الضامة للحديد والكبريت بكلى الجرذان المعاملة بمركب $HgCl_2$ (Şener *et al.,* 2007).

لقد بدى جليا الأثر التأكسدي المصاحب للفعل الالتهابي وذلك بالبنى النسيجية بالمنطقة القشرية لكلى الفئران المعاملة بجرعة حادة من الزئبق 5مغ/كغ ، حيث كشفت الدراسة النسيجية تلف كلوي المصاحب بارتشاح كريات الدم البيضاء ،وتعديل المعايرات البيوكيميائية وارتفاع مستوى MDA وانخفاض نشاط LDH.

إن انخفاض LDH بالكلى يعكس تسربه ، وقد يفسر ذلك بفقد طلائيات الأنبوب الملتوي القريب لحوافها المسننة ذات الزغابات المجهرية وذلك اثر التعرض للزئبق. وقد تعبر هذه الاضطرابات البنيوية عن طور النكرزة المبكر وذلك بالطلائيات الكلوية. حيث تعكس درجة تسرب LDH مستوى السمية الخلوية الناجمة عن تراكم ROS وذلك بعد استنفاذ محتوى الـ GSH الداخل خلوي(Smith *et al* .,1986) . حيث يتسبب ارتباط أيونات الزئبق بمجاميع التيول في انخفاض نسبة GSH/GSSG ، واختزال كفاءة النظام الجلوتاتيوني، وكذا أنشطة الإنزيمات المضادة للأكسدة CAT،وSOD مع ارتفاع انتاج MDA ،أحد مؤشرات تفاعل ما فوق الأكسدة اللبيدية بالأنابيب الكلوية (Sharma *et al* .,2007). كما يسمح ارتفاع مستوى ROS بالسيتوزول بزيادة مستوى الـ OH· ،وتنشيط تفاعل ما فوق الأكسدة اللبيدية بالغشاء الميتوكندري الذي لا يلبث أن يفقد تكامله الغشائي فينجم عن ذلك نكرزة خلوية أو حدوث الموت الخلوي بسبب تنشيط ROS لبروتين caspase3 السيتوزولي اثر التعرض للزئبق (Valko *et al*., 2006). إضافة فإن أكسدة thioredoxin الميتوكندري يزيد من احتمال وقوع الموت الخلوي (Das .,2005)، ويعزى ذلك إلى خفض مستوى تنظيم thioredoxine reductase ، وكذا metallothionein (Hansen *et al* .,2006). ومن الواضح أيضا، أن الزئبق يؤثرعلى بروتينات التوتر الكلوي منها Hsp72 التحريضي الذي يعتبرأحد مثبطات الضرر التأكسدي (Ait Aissa *et al*

(2007,. Guo *et al* ; 2000,. وكذاHsp25 ،أحد البروتينات الواقية للصورة المرجعة لمركب الـ GSH و منظم من منظمات الدورة الردوكسية. حيث يتسبب الزئبق في تغير مواقع Hsp25 وذلك باتجاه الحويصلات السيتوبلازمية وكذا بمواقع مابين نووية ، بدلا من تموقعه بالجهة القمية لطلائيات الأنبوب القريب أين يتداخل Hsp25 مع أكتين البنى الوسيطة وذلك مابين خلية وخلية أخرى ، وكذا مابين مادة الربط والخلية. هذا التغير كفيل بحدوث اهتزاز استقرار الهيكل الخلوي (Stacchiotti *et al*.,2004).

وتزداد درجة السمية الخلوية بالكلى بسبب انتاج كميات إضافية من ROS ،وكذا RNS كنواتج تفاعلات الالتهاب الحاد اثر التعرض للزئبق. إذ تعزز ROS و RNS حدوث نكرزة الأنابيب الملتوية القريبة و زيادة فرص الموت الخلوي وهذا بسبب ارتفاع نشاط MPO وإفراز HOCl وارتفاع نشاط مافوق الأكسدة اللبيدية لدهون الغشاء البلازمي المرتبط باستنفاذ محتوى الـ GSH (Schrauffstatter *et al* .,1990). وينجم عن أكسدة HOCl للصورة المرجعة لـ GSH تشكل سلفوناميد الحلقي (Winterbourn and Brennan.,1997)، فتزداد السمية الخلوية التي يعكسها تسرب LDH (Weiss *et al*.,1982). كما تسمح أكسدة HOCl للأحماض الآمينية بظهورالمركبات الألدهيدية النشطة، بينما يؤدي تنشيط إنزيمات progelatinase و procollagénase إلى حدوث هشاشة الهيكل البروتيني بالأنسجة الواصلة (Peppin and Weiss., 1986). كما تشمل مظاهر السمية الخلوية تفكيك مجاميع N-acetyl التي تدخل في بنية مكونات المادة الأساسية الخارج خلوية منها hyaluronic acid و N-acetyl glucosamine sulfate ،وتفكيك بروتينproteoglycan ، و نترتة التيروزين في وجود ONOO (Katrantzis *et al*.,1991). بينما تؤدي RNS منها NO_2Cl الذي ينتج عن تفاعل HOCl وNO_2 (Golpon *et al* .,2003). وكذا الأنواع المؤكسدة الناجمة عن نشاط MPO إلى تنشيط بروتين caspase3 المحرض على الموت الخلوي (Myzak and carr., 2002). بالإضافة ،فإن تضرر الأوعية الدموية النفرونية قد يرجح إلى إصابة البطانة الوعائية وتأثرها بمؤكسدات نشاط MPO (Mathy-Hartert *et al* .,1995) والذي له أيضا أن يتسبب في موت كريات الدم البيضاء المتعادلة ذاتها وذلك حالة الإفراط في إفرازه بموقع الإصابة (Weiss.,1989).

كشفت العديد من الدراسات عن فعالية عدد من المواد الوقائية للحد من تفاعلات الإجهاد التأكسدي النفروني الناتجة عن ارتفاع مستوى ROS اثر التعرض للزئبق. من بين هذه المواد ، تلك الممخلبة للمعادن كمركب DMPS. إذ يمخلب هذا المركب التيولي عددا من المعادن الثقيلة منها : الزرنيخ ، والرصاص ، و الكادميوم ،والزئبق. وقد أوضح بأن DMPS يرتبط بالزئبق بنسبة 1 :1 (Georg *et al* ., 2004) .وتضمن بعض المركبات ثنائية التيول فعلا مضادا للأكسدة (Gregus *et al* .,1992). بالإضافة ، فإن الألياف الغذائية تؤمن دورا إيجابيا مضادا لسمية الزئبق ، حيث تبين أن نخالة القمح تخفض مستوى الزئبق بمخ الفئران المستهلكة لنسبة 30% منها (Rowland *et al* .,1986) . أيضا، فإن ارتباط السلينيوم البلازمي مع الزئبق اللاعضوي

يسمح بتشكل معقدات اقتران مع selenoprotein-P التي تمنع الالتقاط الكلوي للزئبق. كما يحفز بكتين التفاح الاطراح البولي للزئبق (Sasakura and Suzuki., 1998).

بالدراسة الحالية ، تراجع مستوى MDA وارتفع نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة لدى الفئران المعاملة مسبقا بصوديوم سلينات 0.1مغ/كغ يوميا عبر الفم ولمدة 10أيام قبل حقن كلوريد الزئبق بجرعة 5مغ/كغ. وقد يفسر هذا الأثر الوقائي بتأمين السيلنيوم للصورة المرجعة لإنزيم GPx الذي تضم مواقعه النشطة لتحت وحداته ذرات السيلنيوم في صورة سلينوسيستئين، فيحدث وأن يتفكك H_2O_2 بوجود الـ GSH (Madhavi *et al* ., 1995).

بالإضافة ، فإن ارتباط السيلينيوم البلازمي مع الزئبق اللاعضوي يسمح بتشكل معقدات قابلة للاقتران مع selenoprotein – p مانعة بذلك الالتقاط الكلوي للزئبق (Sasakura and Suzuki ,1998).

وأدت المعالجة المسبقة بالمستخلص الميثانولي لأوراق Chemlal إلى تعديل الوظيفة النفرونية. إذ سجل تراجع في مستويات اليوريا، والكرياتنين بالبلازما. كما أظهرت الفئران استجابة مضادة للأكسدة مؤكدة تراجع تفاعلات الإجهاد التأكسدي المرتبط بانخفاض مستوى ROS بالكلى مع تحسين النظام الجلوتاتيوني. حيث سجل ارتفاع في محتوى GSH الذي صاحبه ارتفاع نشاط إنزيمه المرافق GPx ،مع تعديل أنشطة إنزيمات GR، وCAT وGTS ،وSOD. وقد يعزى هذا الأثر التعديلي أو الوقائي لمستخلص الأوراق إلى فعل مضاد للأكسدة وذلك بتدخل آليات نوعية كآلية مخلبة المعادن كالحديد ، وكذا آلية الأسر الجذري لجذرالـ OH·. وهذا ماأكدته نتائج الدراسات *in vitro* التي أوضحت بأن المستخلص الميثانولي لأوراق Chemlal ممخلب جيد للحديد ،وآسر قوي للـ OH· وذو كفاءة اختزالية عالية وذلك باستعمال تراكيز متزايدة من هذا المستخلص. وقد يرجح هذا الأثر التعديلي المضاد للأكسدة إلى مساهمة المركبات الكيميائية عديدة الفينول التي يحظى بها هذا المستخلص ذو المحتوى الفنيولي الكلي 81مغGAE /غ الذي يضم الفلافونيدات كمركب luteolin المجلكز، وكذا مركبات secoiridoid منها oleuropein بالإضافة إلى الكحولات الفينولية منها hydroxytyrosol حسب ما أدلت به الدراسة الكيميائية. لقد أقرت دراسات عدة بأن الفلافونيدات عبارة عن مضادات أكسدة حيث يرتبط نشاطها المضاد للأكسدة بنظام المجاميع الوظيفية وذلك على مستوى البنية الأساسية. و يضمن العدد الكبير لمجاميع الـ OH نجاعة مضادة للأكسدة *in vitro* (Heim *et al* .,2002). ويعتمد أثر الفلافونيدات المضاد للأكسدة على خصائص منها خاصية أسر الأنواع الجذرية من خلال اعطاء هيدروجين/اليكترون من مجموعة الكوتيكول بالحلقة B وخاصية مخلبة المعادن كالحديد ،والنحاس وذلك بفضل الرابطة المضاعفةC2-C3 المرتبطة مع مجموعة oxo عند الكربون 4. وهذا ماينطبق على luteolin المجلكز كمركب فلافونيدي الذي يحظى بهذه الروابط ضمن بنيته الكيميائية ، مما يؤهله ذلك لأن يكون مضادا للأكسدة اثر التعرض للزئبق وذلك من خلال مخلبة معادن النقل وفق التفاعل الفوتوني وكذا أسر RNS وROS (Odontura *et al* .,2005).

إن خفض مستوى RNS وROS بوجود الفلافونيدات قد يسمح برفع كفاءة النظام المضاد للأكسدة وهذا ماأوضحته دراسة (Nagata *et al* . ,1999) ،حيث سمح استعمالquercetin و catechin بخفض مستوى H_2O_2 وزيادة التعبير الخلوي لإنزيم GPx السيتوزولي وذلك ضمن مزارع خلايا كبدية من نوع BL-9 للجرذ.

كما يضمن غنى الوسط بالفلافونيدات زيادة أنشطة الإنزيمات المضادة للأكسدة منها SOD، و GPx ، وCAT وهذا ما كشف عنه (Kaviarasan *et al* .,2008) بكريات الدم الحمراء لدى جرذان تعرضت لحمية غذائية دهنية . بالإضافة، فإن ارتفاع كفاءة النظام المضاد للأكسدة المسجل بهذه الدراسة قد يعزى إلى مساهمة كل من oleuropein وhydroxytyrosol .

يعتبر oleuropein أستر حمض olenolic مع كحول (hydroxytyrosol) 3.4′ dihydroxyphenyl ethanol ،وهو أكثر مركبات عائلة secoiridoid انتشارا بأوراق الزيتون. بالدراسة الحالية تم اختيار ادخال المستخلص عبر المجرى الهضمي كونه يتوفر على نواقل امتصاص oleuropein المشابهة لنواقل الصوديوم المرتبط بالجلوكوز (SGLT1) (Edgecombe *et al* ., 2000). كما يحظى الأنبوب الهضمي بإنزيمات من نوع glucosidases للمخاطية المعدية وتلك ذات المصدر البكتيري المعوي التي تسمح برفع التركيز البلازميhydroxytyrosol وذلك بعد إماهة oleuropein (Corona *et al* . , 2006). وقد يعزى الأثر المضاد للأكسدة لمركب oleuropein إلى قدرته على مخلبة أيونات المعادن كالنحاس ، و الحديد (Andrikopoulas *et al* . , 2002) وأسر جذر OH· (Gordon *et al*. , 2001). بينما يؤمن مركب hydroxytyrosol أسر H_2O_2 (Tuck *et al* . , 2001) مما ينجم عنه انخفاض تفاعل ما فوق الأكسدة الليبيدية و الحفاظ على تكامل الأغشية البيولوجية من الأثر التأكسدي الناتج عن الجذور الحرة مثلما أوضحته (Deiana *et al* . , 2008) بخلايا مخاطية الأنبوب الكلوي LLC-PK1. كما يكبح hydroxytyrosol تشكل MDA وذلك سواء بالتفاعل المباشر مع الجذور المرتبطة بمركب H_2O_2 أو من خلال التثبيط المباشرله (Deiana *et al* .,2011). وكثيرا مايساهم α-tocopherol كمضاد أكسدة في الحفاظ على استقرارالأغشية الخلوية ، حيث يضمن hydroxytyrosol تجديد البنية النشطة لهذا الفيتامين . (Paiva-Martins *et al* . . . ,2003)

إن استعمال المستخلص الميثانولي لأوراق الزيتون سمح بمقاومة تفاعلات الالتهاب لدى الفئران المعاملة بجرعة حادة من الزئبق، حيث سجل تراجع مستوى NO،وانخفاض نشاط MPO مما يؤكد حدوث الأثر المضاد للالتهاب الحاد. وقد يعزى ذلك إلى اختزال نشاط RNS وخفض نشاط كريات الدم البيضاء المتعادلة المنتجة لإنزيم MPO وذلك وفق آليتن سواء من خلال تثبيط نشاط إنزيم MPO وأسر الجذور الحرة الناتجة عنه وذلك بالموقع المتضرر. وأيضا عن طريق خفض آليات الجذب الكيميائي للكريات الدموية البيضاء المتعادلة. وقد يتحقق هذا من خلال اختزال انتاج وإفرازعدد من السيتوكينات منها TNF-α وهذا ما أكدته نتائج الدراسة *in vitro* اثر استعمال تراكيز متزايدة من المستخلص بمزارع THP-1المعاملة باLPS. وقد يعود سبب مجابهة الاستجابة الالتهابية سواء إلى مساهمة المحتوى الفينولي الكلي للمستخلص، حيث وجد بأن مستخلص أوراق الزيتون قد خفض مستوى TNF-α وذلك بتثبيط التعبيرالجيني لحمض RNA الرسول لسيتوكينات الالتهاب الأولي منها TNF-α (Liu *et al* .,2014) ، أو إلى المساهمة الفردية للمركبات عديدة الفينولات منها الفلافونيدية كمركب luteolinالمجلكز ،وsecoiridoids منها oleuropein،والكحولات الفينولية

كمركبhydroxytyrosol المعرفة بالدراسة الكيميائية. فالعديد من الدراسات أوضحت أثر المركبات الفينولية المضاد للالتهاب والذي يعتمد على أسر جذور $OH^{\cdot}$ ، و$ONOO^{-}$ ، و HOCl المتشكلة خلال نشاط إنزيم MPO ضمن كريات الدم البيضاء المتعادلة عند موقع الالتهاب (Aruoma and Halliwell , 1987) .

كما أثبت فعل الفلافونيدات المضاد للالتهاب (Kim *et al* .,2004) منها luteolin (Hendriks *et al* .,2004) وذلك وفق آليات عدة منها خفض انتاج بعض الإنزيمات منها إنزيمNOS التحريضي، وكذا الحد من انتاج الطلائع الالتهابية السيتوكينية كا TNF-α وذلك بتثبيط نشاط NF-κB (Kim *et al*.,2007) ومنظم استنساخه AP-1(Chen *et al* .,2007) بالإضافة إلى منع استنساخ الجين المشفر لـ NF-κB (Xagorari *et al*., 2001). كما اعتبر بأن luteolin مثبط قوي ، يمنع افرازTNF-α من البالعات الكبيرة. وتعزى تأثيرات luteolin المضادة للأكسدة وتلك المضادة للالتهاب إلى وجود مجاميع ortho-dihydroxy عند الحلقة B ونموذج الاستبدال OH عند الوضعية C-5 للحلقة A (Odontura *et al* .,2005). كما يتدخل oleuropein في خفض RNS وذلك من خلال أسر جذر NO (De La Puerta., 2001). وتعتمد آلية أثر hydroxytyrosol و oleuropein المضاد للالتهاب على تثبيط النشاط الإنزيمي الالتهابي لإنزيم MPO ، فيحدث وأن ينخفض مستوى جذور $OH^{\cdot}$ ،و$ONOO^{-}$ ،و HOCL بكريات الدم البيضاء المنشطة (Visioli *et al* . , 2002). كما يحد hydroxytyrosol من تفاعلات الجذب الكيميائي وذلك بخفض التعبير الجيني لجزيئات الالتحام منها جزيئات الالتحام الوعائي-molecule1 ،وجزيئة الالتصاق مابين خلوي (Carluccio *et al*.,2003) . وقد ثبت بأن hydroxytyrosol يضمن أسر H_2O_2 دون أسر أنيون $O^{\cdot-}_2$ المفرز خلال الاستهلاك التنفسي للأوكسجين وذلك بكريات الدم البيضاء المتعادلة حسب ما أوضحه (O'Dowd *et al* , 2004). وتعزى التأثيرات المضادة للأكسدة وتلك المضادة للالتهاب الحاد بالكلى المؤمنة من طرف oleuropein إلى تميزه ببنية *O*-dihydroxy أو كوتيكول(Benavente-Garcia *et al* ., 2000). أما تلك الناجمة عن تدخل hydroxytyrosol والذي يحظى ببنية ortho-diphenolic قد ترجح إلى التأثير القوي وذلك بتدخل مجموعة الـ OH الثانية الممولة للهيدروجين (Granados-Principal *et al* .,2010). مما يرشح أوراق صنف chemlal لنبتة *Olea europaea* L كبديل وقائي لتعزيز الأنظمة المضادة للأكسدة وتلك المقاومة للاستجابة الالتهابية الحادة اثر التعرض للمؤكسدات منها المعادن الثقيلة .

4. الخلاصة

أجريت هذه الدراسة لتقييم الأثر الوقائي و أو التعديلي لمستخلص أوراق الزيتون اثر الإصابة النفرونية لدى ذكورالفئران المعاملة بكلوريد الزئبق.

أحدث التعرض الحاد لكلوريد الزئبق اضطراب وظيفي بالكلى والذي عكسه ارتفاع التركيزالبلازمي لليوريا ، والكرياتنين وخلل في النظام الردوكسي من خلال تفاعلات الإجهاد التأكسدي، حيث اختزلت كفاءة النظام الجلوتاتيوني وتراجعت أنشطة إنزيمات CAT وSOD وارتفع مستوى MDA بالكلى. ورافقت تفاعلات الإجهاد التأكسدي النفروني المحرض ظهور تفاعلات التهابية محلية بالموقع المتضرر، تميزت بارتفاع

مستوى $NO^{\cdot}$ ،وكذا زيادة نشاط إنزيم MPO بالنسيج الكلوي. و بدى جليا الأثر التأكسدي المصاحب للفعل الالتهابي وذلك بالبنى النسيجية على مستوى المنطقة القشرية لكلى الفئران المعاملة بجرعة حادة من الزئبق 5مغ/كغ ، حيث ضمر البرانشيم الكلوي ضمورا حادا مع ظهورتلف كلوي. وانتشرت بقايا خلوية خاصة بلمعة الأنابيب الملتوية القريبة والبعيدة. ورافقت هذه الاضطرابات البنيوية ارتشاح كريات الدم البيضاء وذلك بالمساحات الكلوية المتلفة لدى المجموعة المعاملة بكلوريد الزئبق. واصطحب هذه التغيرات البنيوية ارتفاع مستوى MDA وانخفاض نشاط LDH. وفرت المعاملة المسبقة بصوديوم سلينات 0.1مغ/كغ يوميا عبر الفم ولمدة 10أيام قبل حقن كلوريد الزئبق بجرعة 5مغ/كغ دورا وقائيا تميز بتراجع مستوى MDA وارتفاع نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة لدى الفئران. وأدى التعاطي المسبق للمستخلص الميثانولي لأوراق Chemlal إلى تعديل الوظيفة النفرونية و تراجع تفاعلات الإجهاد التأكسدي المرتبط بانخفاض مستوى ROS بالكلى مع تحسين النظام الجلوتاتيوني و تعديل أنشطة الإنزيمات المضادة للأكسدة. وقد يعزى هذا الأثر التعديلي أو الوقائي لمستخلص أوراق الزيتون إلى فعل مضاد للأكسدة وذلك بتدخل آليات نوعية كآلية مخلبة المعادن كالحديد ،وكذا آلية الأسر الجذري لجذرال $OH^{\cdot}$.

إن استعمال المستخلص الميثانولي لأوراق الزيتون سمح بمقاومة تفاعلات الالتهاب لدى الفئران المعاملة بجرعة حادة من الزئبق، حيث تراجع مستوى NO،وانخفض نشاط MPO مما يؤكد حدوث الأثر المضاد للالتهاب الحاد. وقد يتحقق هذا من خلال اختزال انتاج وإفرازعدد من السيتوكينات منها TNF-α وهذا ما أكدته نتائج الدراسة *in vitro* اثر استعمال تراكيز متزايدة من المستخلص بمزارع THP-1المعاملة باLPS.

نخلص من هذه الدراسة أن أوراق نبتة *Olea europaea* L التي أبدت تأثيرات مضادة للأكسدة وأخرى مضادة للالتهاب الحاد بالكلى قد يعود مردها إلى الفعل التآزري المرتبط بالتنوع الجزيئي واختلاف البنية الكيميائية للمركبات الفينولية الموجودة بالمستخلص منها مركب luteolin ،وoleuropein ومركبhydroxytyrosol . مما يرشح أوراق نبتة *Olea europaea* L النوع الجزائري Chemlal كبديل وقائي لتعزيزالأنظمة المضادة للأكسدة وتلك المقاومة للاستجابة الالتهابية الحادة بالكلى اثر التعرض للمؤكسدات منها المعادن الثقيلة.

VI- الخلاصة

الخلاصة

إن هدف هذه الدراسة تمثل في تقييم الأثر الوقائي و أو التعديلي للمنتجات الطبيعية النشطة بيولوجيا اتجاه الإصابة النفرونية المحرضة بالزئبق لدى ذكور الفئران. بداية، أجريت الدراسة الكيميائية باستعمال خمسة أصناف من ثمار زيتون *Olea europaea* L المزروعة بإيطاليا Coratina ، وFrantoio ، وLeccino ، و Matiatica ، و Ogliarala وصنفان مزروعان بالجزائر Chemlal و Sigoise. حللت مستخلصات ثمار الزيتون الناضج باعتماد RP-HPLC المرفقة بكاشف DAD. واعتمادا على زمن احتباس المحاليل القياسية ومنحنيات المعايرة عرف 14 مركب فينولي. صنفت هذه المركبات إلى خمسة مجاميع تضمنت مجموعة الأحماض الفينولية التي تضم p-hydroxy benzoic acid ، وvanillic acid ، و caffeic acid ، وgallic acid ، وsyringic acid ، وp-coumaric acid ، وferulic acid ،و sinapic acid ومجموعة الفلافونيداتchrysoeriol ، وluteolin ومجموعة الفينولات الكحولية وhydroxytyrosol و tyrosol ومجموعة secoiridoids منهاoleuropein، و شملت مجموعة Caffoyl glycoside phenylethanoid على مركب verbascoside. واتضح أن gallic acid أكثر الأحماض الفينولية انتشارا بالمستخلصات خاصة بالصنف الجزائري Sigoise مقارنة بصنف Chemlal الذي تضمن كميات ضئيلة منه. وقد قدر مركب hydroxytyrosol بكميات مرتفعة بجميع مستخلصات فاكهة الزيتون باستثناء صنف Sigoise. و كشف عن محتوى فينولي كلي معتبر بصنف Chemlal. أما بالنسبة لمحتوى tannin فقد كشف عن أكبر كمية بصنف Leccino و صنف Chemlal. بالمقابل سجلت كمية منخفضة من tannin بصنف Sigoise. بالنسبة لأوراق الزيتونCilento ،وSigoise ،وChemlal كشف عن وجود secoiridoids منها oleuropein ، والفينولات الكحولية كا hydroxytyrosol و عرف مركب luteolin المجلكز كمركب نقي بنوع Chemlal.

لقد وفركل من صنف Coratina وصنف Chemlal نشاطا كبيرا آسرا للجذر و ضمنت أصناف Frantoio وCoratina ، و Chemlal ، وMaiatica قدرة إرجاعية كبيرة خلافا لصنف Sigoise الذي أظهر نشاطا آسرا منخفضا اتجاه الجذر وقدرة إرجاعية ضعيفة. وقد تباين النشاط التثبيطي لتفاعل ما فوق الأكسدة اللبيدية لمختلف المستخلصات، حيث كان أعظميا بصنف Ogliarola. وانفرد مركب hydroxytyrosol عن باقي المركبات الفينولية بكفاءة عالية مضادة للأكسدة ترتكز على الالتقاط الجذري ، والإرجاع وكذا تثبيط تفاعل ما فوق الأكسدة اللبيدية.

بالنسبة لمستخلص أوراق زيتونChemlal أمن قدرة التقاط كبيرة لجذر OH·، ومخلبة قوية لأيونFe^{2+}. كما حد المستخلص من تسرب إنزيم LDH واختزل تركيز TNF-α بوجودLPS ضمن المزارع الخلويةTHP-1.

إن هذه القدرات الوقائية التي ميزت مستخلص زيتون Chemlal الغني بمركب hydroxytyrosol ،وكذا تلك التي اختص بها مستخلص أوراق زيتون Chemlal رشحت كل منهما لاختبار النشاط الوقائي *in vivo* المضاد

لبعض المؤكسدات أو طلائعها منها الزئبق. واعتمادا على القدرات المضادة للأكسدة التي تميز بها مستخلص أوراق زيتون Chemlal والمتمثلة في التقاط جذر OH·، ومخلبة أيون Fe^{2+} وتلك المضادة للالتهاب انتقي هذا المستخلص لاختبار أثره الوقائي من الإصابة النفرونية لدى ذكور الفئران المعاملة بكلوريد الزئبق.

أدى الادخال المسبق للمستخلص الميثانولي لأوراق زيتون Chemlal إلى تعديل الوظيفة النفرونية وتراجع تفاعلات الإجهاد التأكسدي المرتبط بانخفاض مستوى ROS بالكلى مع تحسين النظام الجلوتاتيوني. وقد يعزى هذا الأثر التعديلي أو الوقائي لمستخلص الأوراق إلى فعل مضاد للأكسدة وذلك بتدخل آليات نوعية كآلية مخلبة المعادن كالحديد، وكذا آلية الأسر الجذري لجذرالOH·. وهذا ماأكدته نتائج الدراسة *in vitro* وقد يرجح الأثر التعديلي المضاد للأكسدة إلى مساهمة المركبات الكيميائية عديدة الفينولات التي يحظى بها هذا المستخلص ذو المحتوى الفنيولي الكلي 81 مغGAE /غ الذي يضم الفلافونيدات كمركب luteolin المجلكز ،وكذا مركبات secoiridoid منها oleuropein بالإضافة إلى الكحولات الفينولية منها hydroxytyrosol حسب ما أدلت به نتائج الدراسة الكيميائية.

إن استعمال المستخلص الميثانولي لأوراق الزيتون سمح بمقاومة تفاعلات الالتهاب لدى الفئران المعاملة بجرعة حادة من الزئبق، حيث تراجع مستوى NO، وانخفض نشاط MPO مما يؤكد حدوث الأثر المضاد للالتهاب الحاد. وقد يعزى ذلك إلى خفض نشاط RNS وخفض نشاط كريات الدم البيضاء المتعادلة المنتجة لإنزيم MPO وذلك وفق آليتن إحداهما تتمثل في تثبيط نشاط إنزيم MPO وأسر الجذور الحرة الناتجة عنه وذلك بالموقع المتضرر،أما الأخرى تكون عن طريق خفض آليات الجذب الكيميائي للكريات الدموية البيضاء المتعادلة. وقد يتحقق هذا الأثر من خلال اختزال انتاج وإفرازعدد من السيتوكينات منها TNF-α وهذا ما أكدته نتائج الدراسة *in vitro* اثر استعمال تراكيز متزايدة من المستخلص بمزارع THP-1 المعاملة باLPS. وقد يعود سبب مجابهة الاستجابة الالتهابية سواءا إلى مساهمة المحتوى الفينولي الكلي للمستخلص، أو إلى المساهمة الفردية للمركبات عديدة الفينولات منها الفلافونيدية كمركب luteolinالمجلكز ،وsecoiridoids منها oleuropein،والكحولات الفينولية كمركبhydroxytyrosol.

نخلص من هذه الدراسة أن ثمار وأوراق نبتة *Olea europaea* L كل منهما أبدى فعلا واقيا أمن صيانة النظام المانع للأكسدة ومجابهة الاستجابة الالتهابية الحادة ، وقد يعزى هذا الأثر إلى انفراد مركب من المركبات الفينولية أوإلى تآزر جزيئي الذي يرتكز أساسا على تنوع البنى الكيميائية لهذه المركبات النشطة. مما يرشح نبتة *Olea europaea* L وخاصة النوع الجزائري Chemlal كبديل وقائي لتعزيز الأنظمة المضادة للأكسدة وتلك المقاومة للاستجابة الالتهابية الحادة بالكلى و أيضا قابلية للاستعمال الطبي وكذا بالحميات الغذائية .

تحفز نتائج هذه الدراسة على :

- دراسة كيميائية كمية ونوعية المركبات الفينولية بأوراق صنف Chemlal
- إيجاد طرق كيميائية انتقائية للحصول على مستخلصات غنية بمركبoleuropein من أوراق صنف Chemlal
- ضرورة اختبار مستخلص أوراق زيتون صنف Chemlal غنية بمركبoleuropein لدراسة آلية الأثر المضاد للالتهاب بنماذج باتولوجية مختلفة *in vitro* و *in vivo* .
- إيجاد طرق كيميائية انتقائية للحصول على مستخلصات غنية بمركبhydroxytyrosol من زيتون صنف Chemlal
- ضرورة اختبار مستخلصات زيتون صنف Chemlal لدراسة آلية الأثر المضاد للالتهاب وأيضا المضاد للأكسدة بنماذج باتولوجية مختلفة *in vitro* و *in vivo* .

VII- الملخص

الملخص

يعنى هذا البحث بدراسة الأثر الوقائي لنبتة *Olea europaea*.L ضد الإصابة النفرونية المحرضة بكلورير الزئبق لدى ذكور فئران من نوع ألبينو ويستار. أنجزت دراسة التركيب الفينولي والأنشطة البيولوجية لمستخلصات الأوراق وزيتون عدد من أصناف *Olea europaea*.L الإيطالية والجزائرية المنتقاة. وقد حدد المحتوى الكلي للفينولات ،وكذا التانينات ،وعرف 14 مركبا فينوليا مختلفا نوعا وكما وذلك بمستخلصات الزيتون . كما أمكن تعريف مركب luteolin المجلكز ،ومركبoleuropein ،وكذا hydroxytyrosol بمستخلص أوراق Chemlal(CLE). أظهرت مستخلصات زيتون (OE) كل من Coratina ،و Chemlal ،ومركب hydroxytyrosol نشاطا قويا مضادا للأكسدة شمل قدرة أسر جذرDPPH ، والقدرة الارجاعية للحديد، ووقاية β-carotene. أما مستخلص(CLE) ،فقد كشف عن قدرات مضادة للأكسدة وأخرى مضادة للالتهاب. بالنسبة للدراسة *in vivo*، فقد ركزت على كشف الأثر الوقائي لمستخلص أوراق الزيتون Chemlal (CLE) المضاد للإجهاد التأكسدي الكلوي الناجم عن كلورير الزئبق .حيث حقنت الفئران بالزئبق 5مغ/كغ من وزن الجسم تحت الصفاق ، و عوملت بمستخلص (CLE) بجرعة 200مغ/كغ من وزن الجسم عبر المجرى الهضمي مدة 10أيام مقابل مركب سلينات الصوديوم المرجعي بجرعة 0.1 مغ/كغ. أدت المعاملة بالزئبق إلى حدوث اضطرابات كلوية وظيفية تميزت بارتفاع مستوى اليوريا والكرياتنين. كما ارتفع مستوى الأكسدة مافوق اللبيدية المرافق لانخفاض في تركيز الجلوتاتيون، واختزال أنشطة الإنزيمات المضادة للأكسدة superoxyde dismutase،و catalase ،و glutathion peroxydase ،وglutathion transferase ،و glutathion réductase. أيضا، أحدثت سمية الزئبق ارتفاع حمض النتريك ،ونشاط myeloperoxidase ،و انخفاض نشاط LDH. إن المعاملة المسبقة بمستخلص(CLE) أمنت وقاية ناجعة تميزت بتقويم الوظيفة الكلوية ، وتعزيزالنظام المضاد للأكسدة، وتعديل التفاعلات الالتهابية. واتضح تقارب الأثر الوقائي مابين مستخلص(CLE) وسلينات الصوديوم. تؤكد هذه النتائج ، أن أوراق الزيتون تتميز بخصائص مضادة للأكسدة وأخرى مضادة للالتهاب وقد يعزى ذلك إلى التآزر الجزيئي للجزيئات النشطة والمتمثلة في مركب luteolin المجلكز، ومركب oleuropein ،وكذا hydroxytyrosol. كخلاصة ، فإن مستخلصات ثمارالزيتون ، وأوراق *Olea europaea*.L قد تكون بدائل وقائية فعالة مضادة للأكسدة و مضادة للالتهاب وقابلة للاستعمال الطبي والاستثمار بالحميات الغذائية.

الكلمات المفتاحية المفتاحية

الإصابة النفرونية، كلورير الزئبق ،*Olea europaea*، ، مستخلصات الزيتون ، مستخلصات أوراق الزيتون ، الفينولات ، Luteolinالمجلكز ، Hydroxytyrosol، Oleuropein ، ،النشاط المضاد للأكسدة ،النشاط المضاد للالتهاب.

Résumé

Cette étude examine l'effet protecteur de l'*Olea europaea* L. contre la néphropathie induite par le chlorure du mercure chez les souris mâle Albinos wistar. La composition phénolique et les activités biologiques des extraits des feuilles et des olives d'*Olea europaea* L. des différentes variétés Algériennes et Italiennes ont été étudiées. Le contenu total des phénols et des tanins a été quantifiés dans les extraits. En outre, 14 différents composés phénoliques ont été identifiés et leurs profils ont montré des différences quantitatives remarquables entre les extraits d'olive analysés (OE). La lutéoline glycosylée, l'hydroxytyrosol et l'oleuropéine sont identifiés dans les feuilles d'oliviers de Chemlal (CLE). Les résultats ont montré que (OE) de Chemlal, entre les variétés Algériennes, et (OE) de Coratina, entre les espèces Italiennes et l'hydroxytyrosol, parmi les composés phénoliques identifiés, se sont révélés être les meilleurs inhibiteurs du DPPH, du blanchissement du carotène, et des bons réducteurs du fer. Bien que le (CLE) ait nettement montré des actions antioxydantes et anti-inflammatoires. L'étude *in vivo* a été conçue pour étudier l'effet protecteur possible de (CLE) contre le stress oxydatif rénal induit par le chlorure de mercure ($HgCl_2$). Des souris Wistar albinos mâles adultes ont été exposés à ($HgCl_2$; 5 mg / kg de poids corporel; ip) et (CLE; 200 mg / kg de poids corporel) pendant 10 jours par rapport à selinate de sodium (0,1 mg / kg) comme référence standard. Le traitement avec du $HgCl_2$ a induit des dysfonctionnements rénaux par l'augmentation de l'urée et de la créatinine. La peroxydation des lipides a été élevée avec une diminution concomitante de glutathion et diverses enzymes antioxydantes, à savoir le superoxyde dismutase, le catalase, le glutathion peroxydase, le glutathion transférase et le glutathion réductase. L'intoxication par $HgCl_2$ a augmenté la production d'oxyde nitrique et de l'activité de la myéloperoxydase et la réduction de LDH. Le prétraitement avec (CLE) a montré une bonne protection comme en témoigne la correction fonctionnelle rénale, avec une amélioration du système antioxydant. Les réactions inflammatoires ont été modulées. L'examen histopathologique des tissus rénaux a prouvé l'effet protecteur de (CLE) contre l'$HgCl_2$. Les résultats obtenus indiquent clairement que la réponse de (CLE) et de selinate de sodium sont comparables dans la plupart des paramètres. Ces résultats ont montré que l'extrait de feuilles d'olivier possédait des actions antioxydantes et anti-inflammatoire qui pourraient être attribuées aux principes bioactifs (lutéoline glycosylée, hydroxytyrosol, oleuropéine) agissant synergiquement. Les résultats suggèrent que les extraits des feuilles et des olives de l'*Olea europaea* peuvent représenter une source naturelle importante avec un potentiel antioxydant et anti-inflammatoire élevé et semblent être applicable à la fois à la santé et à l'alimentation médicale.

Mot Clés

Nephropathie , Chlorure du mercure ,*Olea europaea* L, Extraits des olives, Extraits des feuilles d'olive, Phénols, Lutéoline glycosylée ,Hydroxytyrosol, Oleuropein, Activité antioxydante , Activité anti-inflammatoire.

Abstract

This study investigate the protector effect of *Olea europaea*.L against nephropathy induced by chloride mercury in mouse male Albinos wistar.Phenolic composition and biological activities of olives and leaves extracts from Italian and Algerian *Olea europaea* L. cultivars were studied.Total phenolic and tannin contents were quantified in the extracts. Moreover 14 different phenolic compounds were identified , and their profiles showed remarkable quantitative differences among analysed olive extracts (OE). Glucosylated luteolin ,hydroxytyrosol and oleuropein are identified in the Chemlal olive leaves (CLE). Results showed that (OE)of *Chemlal*, between Algerian cultivars, and (OE) of *Coratina*, among Italian ones , and hydroxytyrosol, among identified phenolic compounds, were found to be the best inhibitors of the DPPH , and Carotene bleaching and a good iron reducers. Although (CLE) markedly provided an antioxidant and antiinflammatory actions. *In vivo* ,the study was designed to investigate the possible protective effect of (CLE) in mercuric chloride ($HgCl_2$) induced renal oxidative stress. Adult male albino Wistar mice were exposed to ($HgCl_2$; 5 mg/kg bwt;ip) and (CLE; 200 mg/kg bwt) for 10 days compared with sodium selinate (0.1 mg/kg) as standard reference. Treatment with $HgCl_2$ induced renal dysfunction by increasing urea , creatinin . Lipid peroxidation was elevated and along with a concomitant decrease in glutathione and various antioxidant enzymes, namely superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase. $HgCl_2$ intoxication increased nitric oxide production and myeloperoxidase and decreased LDH activities . Pretreatment with (CLE) exhibited a good protection as evidenced by the correction of renal functional, amelioration of the antioxidant system . The inflammatory reactions were modulated. Histopathological examination of the kidney tissues proved the protective effect of (CLE) against $HgCl_2$. The obtained results clearly show that, the response of(CLE)and sodium selinate are comparable in most parameters. These findings showed that , the olive leaf extract possessed an antioxidant and an anti-inflammtory actions that could be attributed to the bioactive principles (glucosylated luteolin, hydroxytyrosol, oleuropein) synergistically acted. Results suggest that *Olea europaea* leaves and olives extracts can represent an important natural source with high antioxidant and anti-inflammatory potential and would seem to be applicable in both the health and medical food.

Key words

Nephropathy , Mercury chloride , *Olea europaea,* , Olive extracts, olive leaves extracts , Phenols ,Glucosylated luteolin ,Hydroxytyrosol, Oleuropein, Antioxydant activity, Anti-inflammatory action

VIII- المراجع

المراجع

-**Aberg B., Ekman L., Falk R., Greitz U., Persson G., Snihs J . O. (1969)**. Drug Metabolism. Rev. 23 : 83 in Gailer J. (2007). Arsenic- Selenium and Mercury – Selenium bond in Biology. Coordination Chemistry Reviews 251: 234-254.

-**Aebi H.(1974).** Catalase *in vitro* . Methods in Enzymology .105: 121-126.

-**Agarwal R., Goel S. K., Chandra R., Behari J. R. (2010).** Role of vitamin E in preventing acute mercury toxicity in rat. Environmental Toxicology and Pharmacology . 29 : 70 - 78.

-**Ait Aissa S., Porcher J., Arrigo A.,Lambre C.(2000)**. Activation of the hsp70 promoter by environmental inorganic and organic chemicals : Relationships with cytotoxicity and lipophilicity .Toxicology .145:147-157.

-**Alarcon De la Lastra C., Barranco M.D., Motilva V., Herrerias J.M. (2001).** Mediterranean diet and health: biological importance of olive oil. Current Pharmaceutical Design .7: 933-950.

-**Alin P., Danielson U.H., Mannervik B.(1985).** 4-Hydroxy-2-enals are substrates for glutathione S-Transferase . FEBS Lett .179: 267-270.

-**Andrikopoulos N.K ., Kaliora A.C., Assimopoulou A.N., Papageorgiou V.P. (2002).** Inhibitory activity of minor polyphenolic and non polyphenolic constituents of olive oil against *in vitro* low-density lipoprotein oxidation. J Med Food 5:1-7.

-**Arita. M., Sato. Y., Arai. H., Inoue. K., (1998).** Binding of a tocopheryl quinine , an oxidized form of a tocopherol, to glutathione -S- transferase in the liver and brain of female mice ? Cutan . Ocul . Toxicol . 24: 11- 29.

-**Aruoma O.L ., Halliwell B.(1987).** Action of hypochlorous acid on the antioxidant protective enzymes superoxide dismutase , catalase and glutathione peroxidase . Biochem J. 248 : 973-976.

-**Augusti P. R., Conterato G. M. M., Somacal S., Sobieski R., Spohr P. R., Torres J. V., Charão M. F., Moro A. M., Rocha M. P., Garcia S. C., Emanuelli T. (2008).** Effect of astaxanthin on kidney Function impairment and oxidative stress induced by mercuric choride in rats. Food and chemical Toxicology 46 : 212 – 219.

-**Aurora, G.R., Giuseppe, F., María, D.S.(2008) .** Effect of cultivar and ripening on minorcomponents in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils . Food Res. Int. 41: 433–440.

-**Ballatori N., (1991).** Drug Metabolism. Rev. 23 : 83 in Gailer J. (2007). Arsenic-Seleniun and Mercury – Selenium bond in Biology. Coordination chemistry Reviews . 251: 234- 254.

-**Bazoti F.N., Gikas E., Puel C., Coxam V., Tsarbopoulos A. (2005).** Development of a sensitive and specific solid phase extraction - gaz chromatography - tandem mass spectrometry method for the determination of elenolic acid , hydroxytyrosol , and tyrosol in rat urine .J. Agric .Food Chem . 53: 6213-21.

-**Beauchamp C., Fridovich I.(1971)**. Superoxide dismutase : improved assay and a assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry .44:276-287.

-**Benavente-Garcia O., Castillo J., Lorente J., Ortuno A., Del Rio J.A .(2000)**.Antioxidant activity of phenolics extracted from Olea europaea L. Leaves .Food Chemistry .68:457-462.

-**Berndt W. O., Baggett J. M., Blacker A., Houser M. (1985).** Renal glutathione and mercury uptake by kidney. Fund. Appl. Toxico. l5: 832- 839.

-**Bernstein P. S., Khachik F., Carvalho L. S., Muir G. L., Zhao D. Y., Katz N. B. (2001).** Identification and quantification of carotenoids and thier metabolites in the tissues of the human eye . Exp. Eye Res . 72: 215- 223.

-**Bisignano G., Tomaino A., Lo Cascio R., Crisafi G., Uccella N., Saija A.(1999)**.On the *in vitro* antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol . J Pharm Pharmacol . 51 : 971-974.

-**Bokoch GM. (1995).** Regulation of the phagocyte respiratory burst by small GTP-binding proteins.Trends Cell Biol. 5:109-113.

-**Bors W., Heller W., Michel C., Saran M. (1990).** Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. Methods Enzymol .186:343-355.

-**Bouallagui Z., Han J., Isoda H., Sayadi S. (2011).** Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 Human breast cancer cells. Food and Chemical Toxicology. 49 : 197-184.

-**Bouaziz M., Sayadi S .(2005)**. Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of a Tunisian cultivar olive tree. Eur.J.Lipid Sci.Technol.107:497-504.

-**Bouaziz M., Damak M., Sayadi S. (2006)**. Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of chemlali olive cultivar. Journal de la Soci Chimique de Tunisie .8 : 11–20.

-**Boucher J.L., Moali C., Tenu J.P.(1999)**. Nitric oxide biosynthesis, nitricoxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. Cell Mol Life Sci.55: 1015-1028.

-**Borregaard N., Cowland J.B. (1997)**.Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. Blood. 89: 3503-3521.

-**Bradley P.P., Christensen R.D., Rothstein G. (1984).** Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. Blood. 60:618-622.

-**Brahmi F., Mechri B., Dhibi M., Hammami M. (2013)**.Variations in phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Olea europaea* leaves and fruits extracts collected in two different seasons. Industrial Crops and Products.49: 256-264 .

-**Brawnwald E., Fauci A.S., Kasper D.L., Hauser S.L., Longo D.L., Jameson J.L. (2001) .** Harrison's Principles of Internal Medecine. Mc Graw-HiLL . pp 467- 2602.

-**Briante R ., Patumi M ., Limongelli S., Febbraio F., Vaccaro C., Di Salle A., la Cara F., Nucci R. (2002).** Changes in phenolic and enzymatic activities content during fruit ripening in two Italian cultivars of *Olea europaea* L. Plant Science. 162: 791-798.

-**Brero A ., Ramella R ., Fitou A ., Dati C ., Alloatti G ., Gallo M.P. (2010) .**Neuregulin-1beta1 rapidly modulates nitric oxide synthesis and calcium handling in rat cardiomyocytes. Cardiovasc Res.88:443-452.

-**Bryan S. E. Lambert C. Hardy K. J. Simons S. (1974).** Science 186: 832. in Gailer J. (2007). Arsenic-Seleniun and Mercury - Selenium bond in Biology. Coordination chemistry Reviews 251: 234- 254.

-**Burda S., Oleszek W.(2001).** Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. J Agric Food Chem. 49:2774-9.

-**Carluccio M.A., Siculella L., Ancora M.A., Massaro M., Scoditti E., Storelli C., Visioli F., Distante A., De Caterina R. (2003).**Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation :Antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals .Arterioscler., thromb., Vasc.Biol. 23(4): 622-629.

-**Carol A.F., Timothy M., Wright M.D. (1997).** Cytokines in acute and chronic inflammation. Frontiers in bioscience.2. dI : 2-26.

-**Carrera-Gonzàlez M.p ., Ramírez-Expósito M.J. Ḿayas M.D., Martinez-Marbos J.M .(2013)**.Protective role of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol on cancer .Trends and Food science and Technology. 31(2):1-8.

-**Chen N., Ko K. M. (2010).** Schisandrin B - induced glutathione antioxidant response and cardiopratection are mediated by reactive oxidant species production in rat heart. Biol. Pharm. Bull. 33: 825- 829.

-**Chen C.Y., Peng W.H., Tsai K.D ., Hsu S.L .(2007)**. Luteolin suppresses inflammation - associated gene expression by blocking NF-κappa and AP-1 activation pathway in mouse alveolar macrophages . Life.Sci.81:1602-14.

-**Chiu P., Mak D., Poon M., Ko K. (2005).** Role of Cytochrome P- 450 in schisandrin B- induced antioxidant and heat shock responses in mouse liver. Life Sci .77: 2887- 2895.

-**Cioffi G., Pesca M.S., De Caprariis P., Braca A., Severino L., De Tommasi N. (2010).** Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. Food Chemistry . 121 : 105 - 111.

-**Clarkson T. w. (1997).** Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 34: 369 in Gailer. J. 2007. Arsenic- Selenium and Mercury-Selenium bond in Biology. Coordination Chemistry Reviews 251: 234- 254.

-**Clarkson T. W.(1972).** The pharmacology of mercury compounds. Annu. Rev. Pharmacol .12: 375- 406.

-**Clarkson T.W.(2002).** The three modern Faces of mercury. Environ. Health perspect. 110 (1): 11-23.

-**Clarkson T.W., Magos L., Myers G.J. (2003).** The toxicology of mercury-current exposures and clinical manifestations. N. Engl. J. Med 349 : 1731- 1737.

-**Condelli N., Caruso MC., Galgano F. , Russo D., Milella L., Favati F. (2015)**. Prediction of the antioxidant activity of extra virgin olive oils produced in the Mediterranean area . Food Chemistry .177. 233-239.

-**Corona G., Tzounis X., Assunta Dessi M., Deiana M., Debnam E. S., Visioli F. (2006).** The Fate of olive oil polyphenols in the gastrointestinal tract : Implication of gastric and colonicmicroflora - dependent biotransformation. Free Radic. Res 40: 647 - 58.

-**Croft KD.(2006).**The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids .Ann NYAcadSci. 854:435-442.

-**D'Angelo S., Manna C., Migliardi V., Mazzoni O., Morrica P., Capasso G. (2001).** Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol , a natural antioxidant from olive oil . Drug Metab. Dispos 29: 1492 - 8.

-**Das K.C.(2005).** Thioredoxin and its role in premature new born biology . Antioxidant.Redox.Signal . 7:1740-1743.

-**De la Puerta R., Domingue M.E.M., Ruiz-Guttierrez V., Flavill J.A., Hoult J.R.S.(2001)**.Effect of olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitrergic neurotransmission .Life Sci.69:1213-1222.

-**De la Torre- Carbot K., Jauregui O., Castellote A. L., Lamuela - Raventos R. M., Covas M. I., Casals I. (2006).** Rapid high - performance liquid chromatography - electrospray ionization tandem mass spectrometry method for qualitative and quantitative analysis of virgin olive oil phenolic metabolites in human low- density lipoprateins. J. chromatogr . 1116: 69 - 75.

-**Deiana M., Rosa A., Corona G., Atzeri A., Incani A., Visioli F., Paola Melis M., Assunta Dessi M. (2007).** Protective effect of olive oil minor polar components againts oxidative damage in rats treated with ferric nitrilotriacetate. Food and Chemical Toxicology. 45 : 2434-2440.

-**Deiana M., Incani A., Rosa A., Corona G., Atzeri A., Loru D. (2008).** Protective effect of hydroxytyrosol and its metabolite homovanillic alcohol on H_2O_2 induced lipid peroxidation in renal tubular epithelial cells. Food and Chemical Toxicology . 46 : 2984 -2990.

-**Deiana M., Incani A., Rosa A., Atzeri A., Loru D. Cabboi B., Paola Milis M., Lucas R., Morales C.J ., Assunta Dessi M. (2011).** Hydroxytyrosol glucuronides protect renal tubular epithelial cell against H_2O_2 induced oxidative damage. Chemico-Biological Interactions . 193 : 232-239.

-**Dekdouk N., Malafronte N., Russo D., Faraone I., De Tommasi N., Ameddah S., Severino L., MilellaL.(2015).** Phenolic Compounds from *Olea europaea* L. Possess Antioxidant Activity and Inhibit Carbohydrate Metabolizing Enzymes *In vitro* . Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine .Volume 2015, Article ID 684925, 9 pages.

-**Dell′Agli M., Fagnani R., Galli G.V., Maschi O., Gilardi F., Bellosta S., Crestani M., Bosisio E., De Fabiani E., Caruso D. (2010).** Olive oil phenols modulate the expression of metals proteinase 9 in THP-1 Cells by acting on nuclear Factor κB Signaling . 58 : 2246-2252.

-**Del Boccio P., Di Deo A., De Curtis A., Celli N., Lacaviello L., Rotilio D. (2003).** Liquid Chromatography- tandem mass spectrometry analysis of Oleuropein and its metabolite hydroxyl- tyrosol in rat plasma and urine after oral administration. J. Chromatogr. B analyt. Technol. Biomed. Life sci 785: 47- 56.

-**Della Ragione F., Cucciolla V . , Borriello A .(2000)**. Pyrrolidine dithio carbamate induces apoptosis by a cytochrome c-dependent mechanism . Biochem Biophys Res Commun. 268 : 942-946 .

-**Dutczak W. J., Ballatori N. (1994).** Transport of the glutathione-methylmercury complex across liver canalicular membranes on reduced glutathione carriers. J Biol Chem. 269(13):9746-51

-Edgecombe S. C., Stretch G. L., Hayball P. J. (2000). Oleuropein, an antioxidant polyphenol from olive oil, is poorly absorbed from isolated perfused rat intestine. J. Nutr . 130: 2996- 3002.

-Edwards T., Mc Bride B.C. (1975). 253: 462 in Gailer. J. 2007. Arsenic-Seleniun and Mercury – Selenium bond in Biology. Coordination chemistry Reviews 251: 234- 254.

-Ellman G L. (1959).Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem Biophys. 82:70-77.

-El-Shenawy S., Hassan N.(2008). Comparative evaluation of the protective effect of selenium and garlic against liver and kidney damage induced by mercury chloride in the rat. Pharmacol.Rep.60:199-208.

-Fabiani R., De Bartolomeo A., Rosignoli P.Servili M., Montedoro G.F., Morozzi G. (2002). Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis .Eur J Cancer Prev .11:351-358.

-Farag R., Mahmoud E., Basuny A.M., Ali R F.M .(2006). Influence of crude olive leaf juice on rat liver and kidney functions. International of Food Science and Technology. 41:790-798.

-Farina M., Avila D. S., Da Rocha J. B. T. Aschner M. (2013). Metals, oxidative stress and Neuro degeneration : A focus on iron , manganese and mercury. Neurochemistry International . 62: 575- 594.

-Fawcet J.K., Scott J.E .(1960).13:156.

-Fki I., Bouaziz M., Sahnoun Z., Sayadi S. (2005) . Hypocholesterolemic effects of phenolic-rich extracts of Chemlali olive cultivar in rats fed a cholesterol-rich diet. Bioorganic and Medicinal Chemistry .13: 5362-5370.

-Garcia O.B., Castillo J., Lorente J., Ortuno A., Del Rio J.A. (2000) . Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L.leaves . Food Chem .68:457-462.

-George G.N., Prince R.C., Gailer J., Buttigieg G.A., Denton M.B., Harris H.H., Pickering I.J. (2004). Mercury binding to the chelation therapy agents DMSA and DMPS and the rational design of custom chelators for mercury. Chem . Res. Toxicol . 8:999 -1006.

-Ghielli M., Verstrepen W. A., De Greef K. E., Helbert M. H., Ysebaert D. K., Nouwen E. J. (2000). Antibodies to both ICAM- 1 and LFA - 1 do not Protect the kidney against toxic ($HgCl_2$) injury. Kidney Int .58: 1121 - 1134.

-Girre L. (2001). Les plantes et medicaments , l'origine végétale de nos médicaments. Ed Delachaux et Niestlé ,Paris. p 253.

-Go Y.W., Jones D.P. (2011).Cysteine/Cystine redox signaling in cardiovascular diseas. Free Radical Biology and Medicine.50:495-509.

-Golpon H., Puchner A., Barth P., Wetle T., Wichert P., Feddersen C.(2003). Nitric oxide - dependent vasorelascion and endothelial cell damage caused by mercuric chloride.Toxicology .192:179-188.

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

-Goto S., Kogure K., Abe K., Kimata Y., Kitahama K., Yamashina E., Terada H . (2001). Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. Biochim. Biophys. Acta . 1512: 251- 258.

-Goyer R., Klaassen C.D., Waalkes MP. (1995). Metal toxicology. Academic Press. 35-37.

-Granados- Principal S., Quiles J., Ramirez- Tortosa C. L., Sanchez- Rovira P., Ramirez- Tortosa M. C. (2010). Hydroxytyrosol : From laboratory investigations to future clinical trials. Nutrition Reviews . 68: 191- 206.

-Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. (1982) . Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids. Analytical Biochemistry.126: 131-138.

-Gregus Z., Stein A.F., Varga F., Klaassen C.D. (1992). Effect of lipoic acid on biliary excretion of glutathione and metals. Toxicol . Appl . Pharmacol . 114:88-96.

-Guo S., Wharton W., Moseley P., Shi H.(2007) . Heat shok protein 70 regulates cellular redox status by modulating glutathione related enzyme activities. Cell Stress Chaperones.12:245-254.

-**Hamilton R. J., Kalu C., Prisk E., Padley F. B., Pierce H., (1997).** Food chem 60: 193- 199 in Milleara. E. R. (2006)**.** The role of radical reactions in organomercurials impact on lipid peroxidation. Journal of Inorganic Biochemistry. 100: 905- 915).

-**Hansen J.M., Zhang H., Hones D.P.(2006)**. Differential oxidation of thioredoxin-1,Thioredoxin-2, and glutathione by metal ions . Free . Radic. Biol. Med. 40:138-145.

-**Hayes J . D ., McLellan L . I . (1999)**. Glutathione and glutathione - dependent enzymes represent a co - ordinately regulated defence against oxidative stress. Free Radic. Res. 31: 273–300.

-**Heim K.E., Tagliaferro A.R., Robilya D.J.(2002).** Flavonoid antioxidants : chemistry, metabolism and structure-activity relation ships. J Nutr Biochem . 13:572-584.

-**Hendriks J.J .,Alblas J., Vander Pol S.M., Van Tol E.A .dijstra C.D., De Vries H.E.(2004)**. Flavonoids influence monocytic GTPase activity and are protective in experimental allergic encephalitis .J.Exp.Med.200:1667-72.

-**Hoy A., Leininger-Muller B., Kutter D., Siest G., Visvikis S.(2002)**.Growing significance of myeloperoxidase in non-infectious diseases. Clin. Chem. Lab. Med. 40: 2-8.

-**Huang Y. L., Cheng S. L., Lin T. H. (1996).** Lipid peroxidation in rats administered with mercuric chloride. Biol. Trace Elem. Res 52: 193- 206.

-**Hus B., Coupar I.M ., Ng K .(2006)**. Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm , Hyphaene the baica . Food Chem. 98: 317-328.

-**Iwata H., Okamoto H., Ohsaw Y.(1973)**. Effect of Selenium on methyl mercury poisoning . Res Comm Pathol Pharmacogol . 5: 673-68.

-**Jemai H., Bouaziz M., Fki I., El Feki A., Sayadi S. (2008).** Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. Chemico-biological interactions . 176 : 88-89.

-**Jiang J., Dean D., Burghardt R. C., Parrish A. R. (2004).** Disruption of Cadherin/ catenin expression , Localization, and interactions during $HgCl_2$ - induced nephrotoxicity. Toxicol Sci . 80 : 170- 182.

-**Joana, S.A., Patricia, V., Paula, B.A., Rui, C.M., Rosa, M.S. (2010)**. Phenolic composition of hazelnut leaves influence of cultivar, geographical origin and ripening stage .Sci . Hortic . 126: 306-313.

-**Jung H.J., Yang M.Z., Kwon K.H., Yenari M.A., Choi Y.J., Lee W.T.(2010)**. Endogenous agmatine inhibits cerebral vascular matrix metalloproteinases expression by regulating activating transcription factor 3 and endothelial nitric oxide synthesis. Curr Neurovasc Res . 7: 201-212.

-**Kaeidi A. ,Esmaeili-Mahani S., Sheibani V.Abbasnejad M.(2011)**.Olive (*Olea europaea* L.) Leaf extract attenuates early diabetic neuropathic pain through prevention of high glucose - induced apoptosis :In vitro and in vivo studies. Journal of Ethnopharmacology. 136:188-196.

-**Katrantzis M., Baker M.S., Handley C.J., Lowther D.A. (1991).** The oxidant hypochlorite (OCl), a product of the myeloperoxidase system, degrades articular cartilage proteoglycan aggregate. Free Radic Biol Med. 10:101-9.

-**Kaviarasan K., Kalaiarasi P., Pugalendi V. (2008).** Antioxidant efficacy of flavonoid rich fraction from *spermacoce hispida* in hyperlipidemic rats. J Appl Bio med . 6 : 165-76.

-**Kelley V. R., Singer G. G. (1993).** The antigen presentation function of renal tubular epithelial cells. Exp Nephrol. 1.102-111.

-**Kim H.P., Son ., K.H., Chang H.W., Kang S.S. (2004)**. Anti-inflammatory plant Flavonoids and cellular action machanisms. J. Pharmacol .Sci . 96:229-45.

-**Kim E.K., Know K.B., Song m.Y., Han M.J., Lee J.H., Lee J.H., Ryu D.G., Park B.H., Park J.W.(2007)**. Flavonoids protect against cytokine –induced pancreatic beta-cell damage through suppression of nuclear Factor κappa B activation .Pancreas .35: 1-9.

-**Klebanoff S.J. (1999)**. Myeloperoxidase. Proc. Assoc. Am. Physicians.111:383-389.

-**Lagoa R., Graziani I., Lopez-Sanchez C., Garcia-Martinez V., Gutierrez-Merino C.(2011).**Complex I and cytochrome c are molecular targets of flavonoids that inhibit hydrogen peroxide production by mitochondria. Biochemica et Biophysica Acta .187:1562-1572.

-**Lappert M. F., Lednor P. W. (1976).** Adv. Organomet. Chem 14: 345- 398 in Milleara. E. R. (2006**).** The role of radical reactions in organomercurials impact on lipid peroxidation. Journal of Inorganic Biochemistry .100: 905- 915.

-**Larock R. C. (1985).** Organomercury Compounds in Organic Synthesis Springer – Verlag , Heidelberg in Milleara. E. R. (2006**).** The role of radical reactions in organomercurials impact on lipid peroxidation . Journal of Inorganic Biochemistry. 100: 905- 915.

-**Lash L. H., Zalups R. K. (1996).** Alteration in renal cellular glutathione metabolism after in vivo administration of a subtoxic dose of mercuric chloride. J. Bio chem . Toxicol . 11: 1- 9.

-**Lash L. H., Putt D. A., Zalups . R. K. (1998).** Role of extracellular thiols in uptake and distribution of inorganic mercury in rat renal proximal and distal tubular cells. J. Phormacol. Exp. Ther. 285: 1039- 1050.

-**Liddell J.R., Robinson S.R., Dringen R. (2004)**. Endogenous glutathione and catalase protect cultured rat astrocytes from the iron-mediated toxicity of hydrogen peroxide. Neurosci. Lett. 364 : 164-167.

-**Liu Y. N., Jung J.H ., Park H ., Kim H.S .(2014)**.Olive leaf extract suppresses messenger RNA expression of proinflammatory cytokines and enhances insulin receptor substrate 1 expression in the rats with streptozotocin and high-fat diet-induced diabetes . NUTRITION RESEARCH . 34 :450-457.

-**Lloyd R.V., Hanna P.M., Mason R.P.(1997)**.The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction .Free Radic .Biol .Med.22:885-888

-**Lund B. O., Miller D. M., Woods J. S. (1991).** Mercury - induced H_2O_2 production and lipid peroxidation and lipid oxidation *in vitro* in rat Kidney mitochondria . Biochem. Pharmacol . 42 : 181- 187.

-**Lund. B. O., Miller. D. M., Woods. J. S., (1993).** Studies on Hg (II) - induced H_2O_2 formation and oxidative stress *in vivo* and *in vitro* in rat kidney mitochondria . Biochem . Pharmacol . 45: 2017- 2024.

-**Madhavi D.L., Deshpande S.S., Salunkhe D.K.(1995).** Food antioxidant technological ,toxicological and health perspectives. In lipid oxidation in Biological and Food systems , Food antioxidant and nutritional and health aspects of Food antioxidant. Marcel Dekker. USA ed :1- 471.

-**Mahboob M., Shireen K. F., Atkinson A., Khan A. T. (2001).** Lipid peroxidation and oxidant enzyme activity in different organs of mice exposed to low level of mercury. J. Environ. Sci. Health Part B . 36: 687- 697.

-**Mahmoudi A., Ghorbel H., Bouallagui Z., Marreckchi R., Isoda H. ,Sayadi ,S.(2015)**. Oleuropein and hydroxytyrosol protect from bisphenol A effects in livers and kidneys of lactating mother rats and their pups. Experimental and Toxicology Pathology. 67:413- 425.

-**Maiuri MC., De Stefano D., Di Meglio P.(2005)**. Hydroxytyrosol, a phenolic compound from virgin olive oil prevents macrophage activation . Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 371: 457- 465.

-**Manna C., Galletti P., Maisto G., Cucciolla V., D'Angelo S., Zappia V. (2000).** Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxy- tyrosol in Caco - 2 cells. FEBS Lett . 470 : 341- 4.

-**Mateos R., Goya L., Bravo L ., (2005).** Metabolism of the olive oil phenols hydroxytyrosol , tyrosol and hydroxytyrosol acetate by human hepatoma Hep G2 cells. J. Argric. Food chem . 53: 9897- 9905.

-**Mathy-Hartert M., Deby-Dupont G., Deby C., Jadoul L., Vandenberghe A., Lamy M.(1995)**.Cytotoxicity induced by neutrophil myeloperoxidase towards human endothelial cells : protection by ceftazidime. Mediat. Inflamm. 4: 1-7.

-**McArt S .h ., Spalinger D.E ., Kennish J.M ., Collins W.B.(2006)**. A modified method for determining tannin-protein precipitation capacity using Accelerated solvent extraction (ASE) and microplate gel filtration. Journal of chemical Ecology . 32(6):1367-1377.

-**Medina E., De Castro A ., Romero C., Brenes M. (2006).** Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils : Correlation with antimicrobial activity . J Agric Food Chem. 54: 4954-4961.

-**Meister A.(1988).**Glutathione .J.Biol.Chem.263:17205-17208.

-**Milella L., Bader A ., De Tommasi N., Russo D., Braca A . (2014).**Antioxidant and Free radicals - scavenging activity of constituents from two *Scorzonera* species . Food Chemistry .160:298-304.

-**Miro-Casas E., Cavas M. I., Farre M., Fito M., Ortumo J., Weinbrenner T.(2003).** Hydroxytyrosol disposition in humans. Clin. Chem . 49 : 945- 52.

-**Mohandas J., Marshall J.J ., Duggin G.G., Horvath J.S .,Tiller D.J . (1984).** Low activities of glutathione related enzymes as factors in the genesis of urinary bladder cancer. Cancer . Research . 44:5086-5091.

-**Myzak M.C., Carr A.C.(2002)**. Myeloperoxidase-dependent caspase-3 activation and apoptosis in HL-60 cells : protection by the antioxidants ascorbate and (dihydro)lipoic acid. Redox Report. 7: 47-53.

-**Nagata H., Takekoshi S., Takagi T., Honma T., Watanabe K. (1999).** Antioxidative action of flavonoids , quercetin and catechin , mediated by the activation of glutathione peroxidase. Tokai J Exp Clin Med. 24:1-11.

-**Noël L.H.(2008).** Atlas de pathologie rénale . Paris , Flammarion.

-**Odontuya G., Hoult J.R ., Houghton P.J.(2005)**. Structure-activity relationship for anti-inflammatory effect of luteolin and its derived glycosides . Phytother. Res. 19:782-6.

-**O'Dowd Y., Driss F., Dang P.M., Elbim C., Gougerot-Pocidalo M.A., Pasquier C., El-Benna J. (2004).** Antioxidant effect of hydroxytyrosol , a polyphenol from olive oil: scavenging of hydrogen peroxide but not superoxide anion produced by human neutrophils. Biochem Pharmacol .68 : 2003-2008.

-**Ohkawa N., Onishi N., Yagi., K.(1979).** Assay of lipids peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction.Anal.Biochem. 95:351-358.

-**Optiz H., Schweinsbery F., Grassmann T., Wendt - Gallitelli M. F., Meyermann R. (1996).** Demonstration of mercury in the human brain and other organs 17 years after metallic mercury exposure. Clin. Neur pathol.25:112-117.

-**Ou S., Gao K., Li Y. (1999).** An *in vitro* study of wheat brain binding capacity for Hg, Cd, and Pb. J Agric Food Chem .47:4714-4717.

-**Ozuah P.O., (2000).** Mercury poisoning. Curr. Probl. Pediatr . 30: 91- 99.

-**Padula M .C ., Lepore L., Milella L .(2013).**Cultivar based selection and genetic analysis of straw berry fruits with high levels of health promoting compounds .Food chemistry .140 (4):639-646.

-**Paiva-Martins F., Gordon M.H., Gameiro P. (2003).** Activity and location of olive oil phenolic antioxidants in liposomes. Chem . Phys . Lipids .124:23-36.

-**Peppin G.J., Weiss S.J.(1986).** Activation of endogenous metalloproteinase , gelatinase , by triggered human neutrophils.Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 4322-4326.

-**Perottoni J., Rodrigues O.E.D., Paixao M. W., Zeni G., Lobato L. P., Braga A. L., Rocha J. B. T., Emanuelli T. (2004).** Renal and hepatic ALA-D activity and Selected oxidative stress parameters of rats exposed to inorganic mercury and organo-selenium compounds. Food Chem. Toxicol .42: 17- 28.

-**Petroni A. , Blasevich M., Papini N., Salami M., Sala A., Galli C .(1997**).Inhibition of leukocyte leukotriene B4 production by an olive oil-derived phenol identified by mass-spectrometry .Thromb.Res .87:315-322.

-**Pietta PG. (2000).** Flavonoids as antioxidants. J Nat Prod . 63:1035-1042.

-**Piskula M. K., Terao J. (1998).** Accumulation of (-) epicatechin metabolites in rat plasma after oral adminidtration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. J. Nutr .128: 1172- 8.

-**Popper H.(1937)**.Biochem . 291:354.

-**Prozialeck W.c., Edwards J.R. (2007).** Cell adhesion molecules in chemically - induced renal injury . Pharmacology and Therapeutics .114 :74-93.

-**Quezel P., Santa S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions disertiques méridionaes . Ed de Centre National de la recherche Scientifique .Paris.France.1170p.

-**Quig D. (1998).** Cysteine metabolism and metal toxicity. Altern Med Rev. 3:262-70.

-**Rabenstein D. L., Am J. (1973).** Chem. Soc. 95: 2797 in Gailer J. (2007). Arsenic-Seleniun and Mercury – Selenium bond in Biology. Coordination chemistry Reviews 251: 234-254.

-**Rabenstein D.L. (1978).** Acc. Chem. Res 11: 100 in Gailer J. (2007). Arsenic-Seleniun and Mercury – Selenium bond in Biology. Coordination chemistry Reviews 251: 234- 254.

-**Rabenstein in Dolphin D., Avramovic O., Poulson R., (1989).** Glutathione, chemical, Biochemical, and Medical Aspects, Wiley New York. P 147 in Gailer J. (2007). Arsenic-Seleniun and Mercury – Selenium bond in Biology. Coordination chemistry Reviews . 251: 234- 254.

-**Radi R., Peluffo G., Alvarez M.N., Naviliat M.,Cayota A. (2001)**.Unraveling peroxynitrite formation in biological system. Free Radic. Biol. Med. 30:463–488.

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

-**Richardson R. J., Murphy S. D.(1975).** Effect of glutathione depletion on tissue deposition of methylmercury in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol . 31 : 505- 519.

-**Rios J. J., Gil M. J., Gutierrez - Rosale F. (2005).** Solid - phase extraction gas chromate- graphy - ion trap - mass spectrometry qualitative method for evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil and structural confirmation of oleuropein and Ligstroside aglycons and their oxidation products. J. chromatogr . 1093: 167- 76.

-**Risher J., Amler S.(2005)**. Mercury exposure : Evaluation and intervention :The inappropriate use of chelating agents in the diagnosis and treatment of putative mercury . Neuro Toxicology . 26:691-699.

-**Rooney J.P.K. (2007)**. The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury.Toxicology. 234:145-156.

-**Rowland I. R., Grasso P., Davies M. J. (1975).** Experientia 31: 1064 in Gailer J. (2007). Arsenic-Seleniun and Mercury - Selenium bond in Biology. Coordination chemistry Reviews . 251: 234- 254.

-**Rowland I.R ., Mallett A.K., Flynn J., Hargreaves R.J.(1986).**The effect of various dietary fibres on tissue concentration and chemical form of mercury after methyl mercury exposure in mice . Arch.Toxicol . 59: 94-98.

-**Ruiz - Gutierrez V. Juan M. E., Cert A., Planas J. M. (2000).** Determination of hydroxytyrosol in plasma by HPLC. Anal. Chem . 72: 4458 - 61.

-**Russo D., Malafronte N., Frescura D., Imbrenda G., Faraone I., Milella L., Fernandez E., De Tommasi N.(2015).**Antioxidant activities and quali-quantitative analysis of different *Smallanthus sonchifolius* [(Poepp and E ndl) H.Robinson] landrace extracts .Natural Product Research .29.(17):1673-1677.

-**Ryan D., Robards K. (1998).** Phenolic compounds in olives. Analyst . 123: 31R - 44R.

-**Sanlioglu S.,Williams C.M., Samavati L., Butler NS., Wanf G., McCray PB., Ritchie TC., Hunninghake G.W., Zandi E., Engel-hardt JF .(2001).** Lipopolysaccharide induces oxygen species formation and coordinates tumor nicrosis Factor-α secretion through IKK regulation of NF-Kb. J.Biol.Chem.276: 30188-30198.

-**Sasakura C., Suzuki K.T. (1998).** Biological interation between transition metals (Ag,Cd and Hg), Selenide /Sulfide and selenoprotein P.J.Inorg . Biochem .71:159-162.

-**Savournin C., Baghdikian B., Elias R., Kesraoui D.F., Boukef K., Balansard G. (2001).** Rapid high-performance liquid chromatography analysis for quantitative determination of oleuropein in *Olea europaea* leaves . J Agric Food Chem.49:618-621.

-**Schrauffstatter I.U., Browne K., Harris A., Hyslop P.A., Jackson J.H., Quehenberger O.(1990)**. Mechanisms of hypochlorite injury of target cells. J Clin Invest. 85: 554-62.

-**Schreck R., RieberP., Baeuerle P.A.(1991)**. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-κappa B transcription factor and HIV-1.EMBOJ.10 : 2247-2258.

-**Scognamiglio M., D'Abrosca B., Pacifico S., Fiumano V., De Luca P. F., Monaco P., Fiorentino A. (2012).** Polyphenol characterization and antioxidant evaluation of *Olea europaea* varieties Cultivated in Cilento National Park (Italy). Food Research International 46: 294- 303.

-**Seelig H.P.,Wust H.(1969).** ARZTL.Lab.15:34.

-**Şener G., Sehirli Ö., Tozan A., Velioğlu - Övunç A., Gedik W., Omurtag Z. G. (2007).** *Ginkgo biloba* extract protects against mercury (II) - induced oxidative tissue damage in rats. Food and Chemical Toxicology . 45: 543 - 550.

-**Sharma M. K., Kumar M., Kumar A. (2005).** Protection against mercury - induced renal damage in Swiss albino mice by *Ocimum Sanctum*. Environmental Toxicology and Pharmacology. 19: 161- 167.

-**Sharma M. K., Sharma A., Kumar A., Kumar M. (2007).** Evaluation of protective efficacy of *Spirulina fusiformis* against mercury induced nephrotoxicity in Swiss albino mice. Food and chemical Toxicology . 45: 879 - 887.

-**Singleton VL.,Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M .(1999)**.Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin –Ciocalten reagent.MethodsEnzymol.299:152-178.

-**Smirnoff N., Cumbes Q.J. (1989)**. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes . Phytochemistry. 28:1057-1060.

-**Smith M.A., Acosta D., Brucker J.V.(1986)**. Development of a primary culture system of rat kidney cortical cells to evaluate nephrotoxicity of xenobiotics. Food and Chemical Toxicology. 24:551-556.

-**Soni M. G., Burdock G. A., Christion M. S., Bitler C. M., Crea R. (2006).** Safety assessment of a aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobiol agent in Foods. Food. Chem. Toxicol . 44: 903- 15.

-**Stacchiotti A., Borsani E., Rodella L., Rezzani R., Bianchi R. (2003).** Dose - dependent mercuric chloride tubular injury in rat kidney .Ultrastr. Pathol. 27 : 253-259.

-**Stacchiotti A., Lavazza A ., Rezzani R., Borsani E., Rodella ., L.F.,Bianchi .R.(2004)**. Mercuric chloride-induced alterations in stress protein distribution rat kidney.Histol.Histopathol.19:1209-1218.

-**Stacchiotti A., Livolt G., Lavazza A., Rezzani R., Rodella L. F. (2009).** Schisandrin B stimulates a cytoprotective response in rat liver exposed to mercuric chloride. Food chem. Toxicol 47: 2834 - 2840.

-**Stacchiotti A., Volti L. G., Lavazza A., Schena I., Alea M. F., Rodella L. F., Rezzani R. (2011).** Different role of schisandrin B on mercury induced renal damage *in vivo* and *in vitro*. Toxicology . 286: 48- 57.

-**Stohs S. J., Bagchi D. (1995a).** Free Rad. Biol. Med. 18: 321- 336 in Milleara. E. R. (2006**).** The role of radical reactions in organomercurials impact on lipid peroxidation. Journal of Inorganic Biochemistry 100: 905- 915.

-**Stohs S.J., Bagchi D.(1995b).**Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions. Free Radic . Biol.Med.18:321-336.

-**Takada M., Nadeau K. C., Shaw G. D., Marquette K. A., Tilney N. L. (1997).** The cytokine - adhesion molecule cascade in ischemia / reperfusion injury of the rat kidney inhibition by a soluble P- selection ligand. J. Clin Invest 99 : 2682- 2690.

-**Tamara M., Paravicini TM., Rhian M. Touyz, MD. (2008).** NADPH Oxidases , Reactive Oxygen Species, and Hypertension . Clinical implications and therapeutic possibilities .DIABETES CARE. 31, (2):S170-S180.

-**Tan H. W., Tuck K. L., Stupans I., Hayball P. J. (2003).** Simultaneous Determination of oleuropein and hydroxytyrosol in rat plasma using liquid chromatography with fluorescence detection. J. chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life sci 785 : 187-91.

-**Taurog A., Dorris M.L. (1992)**.Myeloperoxidase-catalyzed iodination and coupling. Arch. Biochem. Biophys. 296 : 239-246.

-**Tipping D. G. Timoshanko J. (2005).** Contributions of intrinsic renal cells to crescentic glomerulonephritis. Nephron Exp Nephrol . 101: 2173- 2178.

-**Tuck K.L., Freeman M.P., Hayball P.J., Stretch G.L., Stupans I. (2001).** The *in vivo* fate of hydroxytyrosol and tyrosol , antioxidant phenolic constituents of olive oil, after intravenous and oral dosing of labeled compounds to rats. J. Nutr.131 : 1993-1996.

-**Tuck K. L., Hayball P. J. (2002).** Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. J. Nutr. Biochem 13: 636- 644.

-**Uchida D., EdamatsuR., Hiramatsu M., Mori A.,Nishioka L.,Niwa M., Ozaki M.(1987).**Condensed tannins scavenge active oxygen free radicals.MED .SciRes .15:831-832.

-**Valko M., Morris H., Cronin M. T. (2005).** Metals , toxicity and oxidative stress. Curr. Med. Chem .12 (10): 1161-1208.

-**Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M.(2006)**. Free radical , metals and antioxidants in oxidative stress - induced cancer.Chem.Biol.Interact.160 :1-40.

-**Van Dalen J., Winterbourn C., Senthilmohan R., Kettle A.J. (2000)**. Nitrite as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase. J. Biol. Chem. 275: 11638-11644.

-**Visioli F., Poli A., Galli C. (2002) .** Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil . Med Res Rev. 22 : 65-75.

-**Visioli F., Bellomo G., Galli S. (1998).** Free radical scavenging properties of olive oil polyphenols. Biochem. Biophys. Res. Commun. 247 : 60-64.

-**Visioli F.,Caruso D., Grande S., et al.(2005)**. Vasoprotective potential of extra virgin olive oil in midly dyslipidemic patients. Eur J.Nutr.44: 121-7.

-**Vissers M. N., Zock P. L., Katan M. B. (2004).** Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans. Eur. J. Clin. Nutr . 58: 955 - 65.

-**Weiss S.J. (1989)**.Tissue destruction by neutrophils. New Engl. J. Med. 320: 365-376.

-**Weiss S.J., Klein R., Slivka A., Wei M. (1982).** Chlorination of taurine by human neutrophils : Evidence for hypochlorous acid generation. J Clin Invest.70:598–607.

-**Winterbourn C.C., Brennan S.O. (1997)**. Characterization of the oxidation products of the reaction between reduced glutathione and hypochlorous acid. Biochem. J. 326 : 87-92.

-**Wroblewski F.(1967).** Sigma technical bulletin n.500.

-**Wu T., Liao J., Hou W., Huang F., Maher T. J., Hu C. (2006).** Astaxanthin protects against oxidative stress and Calcuim - induced porcine lens protein degradation. J. Agric. Food Chem . 54: 2418- 2423.

-**Xagorari A.,Papapetropoulos A., Mauromatis A.,Economou M., Ftsis T., Roussos C.(2001)**. Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. J.Pharmacol.Exp.Ther. 296:181-7.

-**Yap L.P ., Garcia J. V ., Han D., Cadenas E . (2009)**. The energy-redox axis in aging and age-related neurodegeneration Advanced Drug Delivery Reviews .61 :1283-1298.

-**Yasutake A., Hirayama K., Inoue M. (1990).** Arch. Toxicol . 64: 639. in Gailer J. (2007). Arsenic-Seleniun and Mercury - Selenium bond in Biology. Coordination chemistry Reviews . 251: 234- 254.

-**Yasutake A., Kirayama K., Inoue. M. (1989).** Arch. Toxical 63: 479 in Gailer J. (2007). Arsenic-Seleniun and Mercury - Selenium bond in Biology. Coordination chemistry Reviews 251: 234- 254.

-**Zalups R. K., Lash L. H. (1994).** Recent advances in understanding the renal transport and toxicity of mercury. J. Toxicol. Environ. Health . 42: 1- 44.

-**Zalups R.K., Lash L.H. (1996).** Intercation between glutathione and mercury in the kindey liver and blood. In Chang. L.W (Ed), Toxicology of metals. CRC Prees, Boca Raton, FL1 : 145-163.

-**Zalups R. K., Lash L. H. (1997).** Depletion of glutathione in the kidney and the renal disposition of administered inorganic mercury. Drug Metab. Dispos . 25: 516 - 523.

-**Zalups R. K., Ahmad. S. (2005).** Transport of N- acetylcysteine S - Conjugates of methylmercury in Madin- Darby canine kidney cells stably transfected with human isoform of organic anion transporter 1. J. Pharmacol. Exp. Ther 314:1158- 1168.

-**Zaslaver M., Offer S., Kerem Z., Stark AH., Weller JI ., Eliraz A., Madar Z.(2005)**.Natural compounds derived from foods modulate nitric oxide production and oxidative status in epithelial lung cells. Journal of Agricultural and food chemistry. 53: 559-567.

-**Zhang X., Cao J., Jiang L., Zhang L.(2009).** Suppressive effects of hydroxytyrosol on oxidative stress and nuclear Factor-κB activation in THP-1 cells . Biological and pharmaceutical Bulletin .32(4):578-582.

-**Zhao L., Chen F., Zhao G., Wang Z., Liao X., Hu X. (2005).** Isomerization of trans - astaxanthin induced by copper (II) ion in ethanol. J. Agric. Food .Chem . 53: 9620 - 9623.

-**Zhu , Y., Carvey P.M., Ling Z.(2007)**. Altered glutathione homeostasis in animals prenatally exposed to lipopolysaccharide. Neurochem. Int. 50: 671-680.

Evaluation of protector and or modulator effect of natural products biologically active on nephropathy induced by mercury *in vitro* and *in vivo*

Abstract

This study investigate the protector effect of *Olea europaea*.L against nephropathy induced by chloride mercury in mouse male Albinos wistar. Phenolic composition and biological activities of olives and leaves extracts from Italian and Algerian *Olea europaea* L. cultivars were studied.Total phenolic and tannin contents were quantified in the extracts. Moreover 14 different phenolic compounds were identified , and their profiles showed remarkable quantitative differences among analysed olive extracts (OE). Glucosylated luteolin ,hydroxytyrosol and oleuropein are identified in the Chemlal olive leaves (CLE). Results showed that (OE)of *Chemlal,* between Algerian cultivars, and (OE) of *Coratina,* among Italian ones , and hydroxytyrosol, among identified phenolic compounds, were found to be the best inhibitors of the DPPH , and Carotene bleaching and a good iron reducers. Although (CLE) markedly provided an antioxidant and anti-inflammatory actions. *In vivo* ,the study was designed to investigate the possible protective effect of (CLE) in mercuric chloride ($HgCl_2$) induced renal oxidative stress. Adult male albino Wistar mice were exposed to ($HgCl_2$; 5 mg/kg bwt;ip) and (CLE; 200 mg/kg bwt) for 10 days compared with sodium selinate (0.1 mg/kg) as standard reference. Treatment with $HgCl_2$ induced renal dysfunction by increasing urea , creatinin . Lipid peroxidation was elevated and along with a concomitant decrease in glutathione and various antioxidant enzymes, namely superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase. $HgCl_2$ intoxication increased nitric oxide production and myeloperoxidase and decreased LDH activities . Pretreatment with (CLE) exhibited a good protection as evidenced by the correction of renal functional, amelioration of the antioxidant system . The inflammatory reactions were modulated. Histopathological examination of the kidney tissues proved the protective effect of (CLE) against $HgCl_2$. The obtained results clearly show that, the response of(CLE)and sodium selinate are comparable in most parameters. These findings showed that , the olive leaf extract possessed an antioxidant and an anti-inflammtory actions that could be attributed to the bioactive principles (glucosylated luteolin, hydroxytyrosol, oleuropein) synergistically acted .Results suggest that *Olea europaea* leaves and olives extracts can represent an important natural source with high antioxidant and anti-inflammatory potential and would seem to be applicable in both the health and medical food.

Key words

Nephropathy , Mercury chloride , *Olea europaea,* , Olive extracts, Olive leaves extracts, Phenols, Glucosylated luteolin ,Hydroxytyrosol, Oleuropein , Antioxydante activity ,Anti-inflammatory action

Evaluation de l'effet protecteur et ou modulateur des produits naturels biologiquement actifs vis-à-vis de la néphropathie engendrée par le mercure *in vitro* et *in vivo*

Résumé

Cette étude examine l'effet protecteur de l'*Olea europaea* L. contre la néphropathie induite par le chlorure du mercure chez les souris mâle Albinos wistar. La composition phénolique et les activités biologiques des extraits des feuilles et des olives d'*Olea europaea* L. des différentes variétés Algériennes et Italiennes ont été étudiées. Le contenu total des phénols et des tanins a été quantifiés dans les extraits. En outre, 14 différents composés phénoliques ont été identifiés et leurs profils ont montré des différences quantitatives remarquables entre les extraits d'olive analysés (OE).

La lutéoline glycosylée, l'hydroxytyrosol et l'oleuropéine sont identifiés dans les feuilles d'oliviers de Chemlal (CLE). Les résultats ont montré que (OE) de Chemlal, entre les variétés Algériennes, et (OE) de Coratina, entre les espèces Italiennes et l'hydroxytyrosol, parmi les composés phénoliques identifiés, se sont révélés être les meilleurs inhibiteurs du DPPH, du blanchissement du carotène, et des bons réducteurs du fer. Bien que le (CLE) ait nettement montré des actions antioxydantes et anti-inflammatoires. L'étude *in vivo* a été conçue pour étudier l'effet protecteur possible de (CLE) contre le stress oxydatif rénal induit par le chlorure de mercure ($HgCl_2$). Des souris Wistar albinos mâles adultes ont été exposés à ($HgCl_2$; 5 mg / kg de poids corporel; ip) et (CLE; 200 mg / kg de poids corporel) pendant 10 jours par rapport à sélénate de sodium (0,1 mg / kg) comme référence standard. Le traitement avec du $HgCl_2$ a induit des dysfonctionnements rénaux par l'augmentation de l'urée et de la créatinine. La peroxydation des lipides a été élevée avec une diminution concomitante de glutathion et diverses enzymes antioxydantes, à savoir le superoxyde dismutase, le catalase, le glutathion peroxydase, le glutathion transférase et le glutathion réductase. L'intoxication par $HgCl_2$ a augmenté la production d'oxyde nitrique et de l'activité de la myéloperoxydase et la réduction de LDH. Le prétraitement avec (CLE) a montré une bonne protection comme en témoigne la correction fonctionnelle rénale, avec une amélioration du système antioxydant. Les réactions inflammatoires ont été modulées. L'examen histopathologique des tissus rénaux a prouvé l'effet protecteur de (CLE) contre l'$HgCl_2$. Les résultats obtenus indiquent clairement que la réponse de (CLE) et de sélénate de sodium sont comparables dans la plupart des paramètres. Ces résultats ont montré que l'extrait de feuilles d'olivier possédait des actions antioxydantes et anti-inflammatoire qui pourraient être attribuées aux principes bioactifs (lutéoline glycosylée, hydroxytyrosol, oleuropéine) agissant synergiquement. Les résultats suggèrent que les extraits des feuilles et des olives de l'*Olea europaea* peuvent représenter une source naturelle importante avec un potentiel antioxydant et anti-inflammatoire élevé et semblent être applicable à la fois à la santé et à l'alimentation médicale.

Mots clés

Néphropathie , Chlorure du mercure ,*Olea europaea* ,Extraits des olives, Extraits des feuilles d'olive, Phénols, Lutéoline glycosylée , Hydroxytyrosol , Oleuropein, Activité antioxydante , Activité anti-inflammatoire.

الاسم واللقب: نادية دكدوك **المقررة: أستاذ التعليم العالي سعاد أمداح**

تخصص بيولوجيا وفيزيولوجيا الخلية الحيوانية
العنوان

تقييم الأثر الوقائي و/أوالتعديلي للمنتجات الطبيعية النشطة بيولوجيا اثر الإصابة النفرونية المحرضة بالزئبق *in vitro* و*in vivo*

الملخص

يعنى هذا البحث بدراسة الأثر الوقائي لنبتة *Olea europaea*.L ضد الإصابة النفرونية المحرضة بكلورير الزئبق لدى ذكور فئران من نوع ألبينو ويستار. أنجزت دراسة التركيب الفينولي والأنشطة البيولوجية لمستخلصات الأوراق وزيتون عدد من أصناف *Olea europaea*.L الإيطالية والجزائرية المنتقاة. وقد حدد المحتوى الكلي للفينولات ،وكذا التانينات ،وعرف 14 مركبا فينوليا مختلفا نوعا وكما وذلك بمستخلصات الزيتون. كما أمكن تعريف مركب luteolin المجلكز، ومركبoleuropein ،وكذا hydroxytyrosol بمستخلص أوراق Chemlal(CLE). أظهرت مستخلصات زيتون (OE) كل من Coratina ،و Chemlal ،ومركب hydroxytyrosol نشاطا قويا مضادا للأكسدة شمل قدرة أسر جذرDPPH، والقدرة الارجاعية للحديد، ووقاية β-carotene. أما مستخلص(CLE) فقد كشف عن قدرات مضادة للأكسدة وأخرى مضادة للالتهاب. بالنسبة للدراسة *in vivo*، فقد ركزت على كشف الأثر الوقائي لمستخلص أوراق الزيتون Chemlal (CLE) المضاد للإجهاد التأكسدي الكلوي الناجم عن كلورير الزئبق .حيث حقنت الفئران بالزئبق 5مغ/كغ من وزن الجسم تحت الصفاق ، وعوملت بمستخلص (CLE) بجرعة 200مغ/كغ من وزن الجسم عبر المجرى الهضمي مدة 10أيام مقابل مركب سلينات الصوديوم المرجعي بجرعة 0.1 مغ/كغ. أدت المعاملة بالزئبق إلى حدوث اضطرابات كلوية وظيفية تميزت بارتفاع مستوى اليوريا والكرياتنين. كما ارتفع مستوى الأكسدة مافوق اللبيدية المرافق لانخفاض في تركيز الجلوتاتيون، واختزال أنشطة الإنزيمات المضادة للأكسدة superoxyde dismutase ،و catalase،و glutathion peroxydase ،وglutathion transférase ،وglutathion réductase . أيضا، أحدثت سمية الزئبق ارتفاع حمض النتريك ،ونشاط myeloperoxidase ،و انخفاض نشاط LDH. إن المعاملة المسبقة بمستخلص(CLE) أمنت وقاية ناجعة تميزت بتقويم الوظيفة الكلوية ، وتعزيز النظام المضاد للأكسدة، وتعديل التفاعلات الالتهابية. واتضح تقارب الأثر الوقائي مابين مستخلص(CLE) وسلينات الصوديوم. تؤكد هذه النتائج ، أن أوراق الزيتون تتميز بخصائص مضادة للأكسدة وأخرى مضادة للالتهاب وقد يعزى ذلك إلى التآزر الجزيئي للجزيئات النشطة والمتمثلة في مركب luteolin ،ومركب oleuropein ،وكذا hydroxytyrosol. كخلاصة ، فإن مستخلصات ثمارالزيتون ، وأوراق *Olea europaea*.L قد تكون بدائل وقائية فعالة مضادة للأكسدة و مضادة للالتهاب وقابلة للاستعمال الطبي والاستثمار بالحميات الغذائية.

الكلمات المفتاحية المفتاحية

الإصابة النفرونية ، كلورير الزئبق ، *Olea europaea*، مستخلصات الزيتون ، مستخلصات أوراق الزيتون ، الفينولات، Luteolinالمجلكز ، Hydroxytyrosol، Oleuropein ،النشاط المضاد للأكسدة ،النشاط المضاد للالتهاب.