رقم الترتيب
رقم التسلسل

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الشهيد حمه لخضر الوادي

كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم البيولوجيا

مذكرة تخرج

لنيل شهادة ماستر أكاديمي

ميدان: علوم طبيعة وحياة

شعبة :علوم البيولوجيا

تخصص: بيولوجيا وتثمين النبات

الموضوع

التقدير الكمي لعديدات الفينول و الفلافونويد ودراسة النشاطية البيولوجية لمستخلصات نبات الغبيثاء *Bassia muricata* L

إعداد:

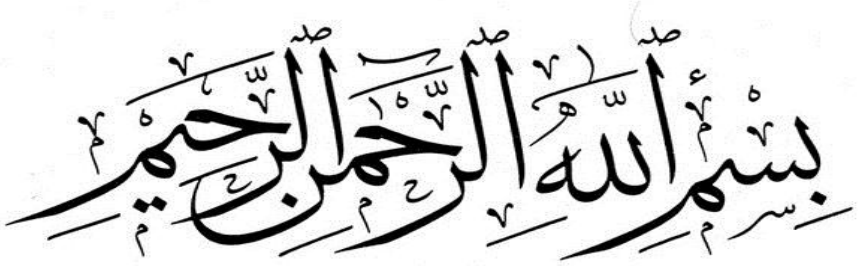
اللبي الزهرة

دردوري سارة

نوقشت يوم.../..../2016 من طرف لجنة المناقشة:

خالد خراز	أستاذ مساعد قسم أ	رئيسا	جامعة الوادي
أحمد الخليفة شمسه	أستاذ مساعد قسم أ	مؤطرا	جامعة الوادي
منيرة قادري	أستاذة مساعدة قسم أ	ممتحنة	جامعة الوادي

الموسم الجامعي 2016/2015


بسم الله الرحمن الرحيم

شكر وتقدير

اولا اشكر الله عز وجل الذي سدد خطانا وانار لنا درب العلم و المعرفة وأعاننا ووفقنا على أداء هذا العمل

أتقدم بأسمى عبارات الامتنان و العرفان الى كل من ساعدنا من قريب أو بعيد على إنجاز هذا العمل و أخص بالذكر الاستاذ الفاضل شمسه أحمد الخليفة على توجيهاته القيمة و التشجيع على المواصلة والنصائح الثرية القيمة و على توفيره لنا كل الإمكانيات والوسائل لإتمام هذا العمل

كما نشكر الأستاذ الفاضل خالد خراز و الأستاذة الفاضلة منيرة قادري على التوجيهات التي قدموها لنا لإثراء هذا البحث

كما أتقدم بكل معاني الشكر الى

الوالدين الكريمين على تشجيعهما ومساندتهما

اخواتي اخوتي

والاصدقاء

الفهرس

شكرو تقدير **الفهرس** **قائمة المختصرات** **الملخص** **المقدمة**	
الجزء النظري	
الفصل الأول : الاجهاد التأكسدي ـ مضادات الاكسدة	**الصفحة**
I. الاجهاد التأكسدي	03
1- الأكسدة	03
2- الاجهاد التأكسدي	03
3- الجذور الحرة	03
4- أنواع الجذور الحرة	03
4-1- التقسيم على أساس الاستقرار	03
4-1-1- الجذور النشطة (الغير مستقرة)	03
4-1-2- الجذور المستقرة (الصامدة)	03
4-2- التقسيم على أساس النوع	03
4-2-1- الجذور الحرة الأوكسيجينية	03
4-2-1-1- أيون السوبير أكسيد ($O_2^{\bullet -}$) Superoxide anion	04
4-2-1-2- فوق أكسيد الهيدروجين H_2O_2	04
4-2-1-3- جذور الهيدروكسيل $OH^{\bullet}$	04
4-2-3- الجذور النتروجينية	05
4-2-4- الجذور الحرة الدهنية	05
4-2-5- السموم الحرة	05
5- مصادر الجذور الحرة	05
5-1- مصادر داخلية	05
5-2- مصادر خارجية	06
5-1-1- الأغشية الميتوكندرية	06
5-1-2- انزيم NADPH oxidase	06
5-1-3- انزيم Xanthine oxidase	06
5-1-4- انزيم NOS (Nitric oxide synthase)	06
5-1-5- انزيم LOX (Lipoxygnase)	06
6- أسباب زيادة الجذور الحرة	07
7- مصير الجذور الحرة	07
8- تأثير الاجهاد التأكسدي على المستوى الداخلي	07
8-1- أكسدة ADN	07
8-2- أكسدة البروتينات	08
8-3- أكسدة الليبيدات	08
8-3-1- مرحلة البداية	08

8-3-2- مرحلة الانتشار	08
8-3-3- مرحلة النهاية	09
9- الاجهاد التأكسدي و علاقته بالأمراض	09
II. مضادات الاكسدة	11
1- تعريف مضادات الاكسدة	11
2 ـ تصنيف مضادات الاكسدة	12
2-1 الانظمة الدفاعية الانزيمية	12
2-2 الانظمة الدفاعية غير الانزيمية	14
2-2-1- الطبيعية	14
2-2-2- الصناعية	16
الفصل الثاني: النبات المدروس	
1 ـ دراسة العائلة Chenopodiaceae (Salsolaceae)	18
2- الوصف النباتي لـ *B. muricata* L	18
3- التصنيف النباتي لـ *B. muricata* L	19
4 ـ الانتشار الجغرافي للنوع	19
5 ـ الدراسات السابقة للنوع	20
الجزء التطبيقي	
الفصل الأول: المواد و طرق البحث	
1- المادة النباتية المدروسة *B. muricata* L	23
2- عملية تحضير المستخلصات	23
2-1- طريقة الاستخلاص	23
3- عملية فصل المركبات	24
4- التقدير الكمي لعديدات الفينول والفلافونويدات	28
5- دراسة الفعالية المضادة للأكسدة: باستعمال اختبار جذر DPPH	29
6- دراسة الفعالية المضادة للأحياء الدقيقة	31
الفصل الثاني: تحليل و مناقشة النتائج	
1- التقدير الكمي لعديدات الفينول	35
2- التقدير الكمي للفلافونويدات	35
3- دراسة النشاطية المضادة للأكسدة : باستعمال اختبار الجذر الحر DPPH	36
4 ـ دراسة الارتباط الخطي بين عديدات الفينول – النشاط المضاد للاكسدة والفلافونويدات – النشاط المضاد للاكسدة	39
5- دراسة النشاطية المضادة للاحياء الدقيقة	40
المناقشة	44
الخلاصة	47
قائمة المراجع	48
الملحق	62

فهرس الجداول

الرقم	عنوان الجدول	الصفحة
01	العوامل المؤكسدة و العوامل المضادة للأكسدة	11
02	المحاليل و الأدوات المستعملة	23
03	المردود (%) لمستخلصات نبات *B. muricata* L	26
04	الأدوات و المحاليل المستعملة	28
05	الأدوات و المحاليل المستعملة	29
06	كمية عديدات الفينول لمستخلصات نبات *B. muricata* L	35
07	كمية الفلافونويدات لمستخلصات نبات *B. muricata* L	35
08	النشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات المدروسة و Vit C	36
09	قيم IC_{50} للمستخلصات المدروسة و حمض الأسكوربيك	38
10	الأقطار التثبيطية بـ (mm) للسلالات البكتيرية	40

فهرس الاشكال

الرقم	عنوان الشكل	الصفحة
01	مرحلة الانتشار	09
02	مرحلة النهاية	09
03	التركيب الكيميائي للفيتامين C	15
04	التركيب الكيميائي للفيتامين E	15
05	التركيب الكيميائي لـBHT	16
06	التركيب الكيميائي لـ BHA	17
07	رسم تخطيطي لنبات *B.muricata* L	18
08	صورة حقيقية لنبات *B. muricata* L	19
09	الانتشار الجغرافي لـ *B. muricata* L على مستوى قارة افريقيا	20
10	التركيب الكيميائي للجذر الحر DPPH	30
11	المضاد الحيوي P	35
12	MTالمضاد الحيوي	35
13	المضاد الحيوي AMx	35
14	المنحنى القياسي للنشاطية المضادة للأكسدة لكبح الجذر الحر DPPH لمستخلص Ethanol	37
15	المنحنى القياسي للنشاطية المضادة للأكسدة لكبح الجذر الحر DPPH لمستخلص Acetat d'ethyl	37
16	المنحنى القياسي للنشاطية المضادة للأكسدة لكبح الجذر الحر DPPH لمستخلص n-Butanol	38
17	منحنى الارتباط بين عديدات الفينول والنشاط المضاد للأكسدة	39
18	منحنى الارتباط بين الفلافونويدات والنشاط المضاد للأكسدة	39
19	الأقطار التثبيطية للسلالات البكتيرية المختبرة لمستخلصات نبات B. muricata L	40
20	تأثير المستخلصات المدروسة لنبات *B. muricata* L على الأنواع البكتيرية المختبرة	43

فهرس المخططات

الرقم	عنوان المخطط	الصفحة
01	آلية التخلص من جذر $O_2^{\bullet -}$ بواسطة الانزيمات المضادة للأكسدة	13
02	خطوات عمل تحضير مستخلصات النبات المدروس	27

%	Percentage
µg	Microgramme
AA%	Absorbation Activité
BHA	Buthyl hydroxyl anizole
BHT	Buthyl hydroxyl toluéne
CAT	Catalase
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
GPx	Glutathion peroxidase
GR	Glutathion reductase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
IC_{50}	Inibitation concentration 50%
LOX	Lipoxygnase
Mg	Milligramme
Ml	Millilitre
Mm	Millimètre
NADPH	Nicotinamide adenine dinucliotide phosphate
NOS	Nitric oxide synthase
ROS	Reactive oxygen species
SOD	Superoxide dismutase
Trx	Thioredoxine
Trxr	Thioredoxine
Vit C	Vitamine C

المنخص

الملخص

- يـهدف هذا العمـل الى دراسة النشـاطية المضـادة للأكسدة واليكتيريا وايضـا التقدير الكمي للفينولات والفلافونويدات لدى مـستخلصـات (Ethanol ,n-butanol ,Acetat d'ethyl) لنباتL *Bassia muricata* المحضرة بطريقة النقع، حيث بينت النتائج وجود كميات مختلفة من عديدات الفينول و الفلافونويدات.

- تم تطبيق طريقة Singleton and Rossi للتقدير الكمي لعديدات الفينول حيث اظهر مستخلص n-Butanol اعلى نسبة من عديدات الفينول وتقدر بـ 199.80 µg EAG / mg مقـارنة مع المستخلصـين Acetat ethyle و Ethanol المقدرة بـ 18.22 µg EAG / mg 46.55 µg EAG / mg على التوالي. في حين تم تطبيق طريقة $AlCl_3$ لتقدير الفلافونويدات حيث أظهر مستخلص n-Butanol باحتوائه على أعلى كمية من الفلافونويدات المقدرة بـ 39.21 µg EQ / mg.

- من خلال تقدير النشاطية المضادة للأكسدة باستعمال اختبار جذر DPPH فقد اظهر المستخلص n-Butanol يملك قدرة ازاحية اكبر في كسح الجذر الحر DPPH المقدرة بـ IC_{50}: 50.57 µg / ml.

- تم استعمال طريقة الانتشار بالأقراص في دراسة النشاطية المضادة للأحياء الدقيقة فقد كان مستخلص n-Butanol من أكثر المستخلصات نشاط ضد السلالات الموجبة والسالبة غرام.

الكلمات المفتاحية:

Bassia muricata L، عديدات الفينول، الفلافونويدات، النشاطية المضادة للأكسدة، نشاطية الأحياء الدقيقة، الجذور الحرة.

ABSTRATCT

This study examined the polyphenol and flavonoid contents with antioxidant activity by measuring the radical 2,2 diphenyl-1-picylhydrazyl scavenging activity and antibacterial activity by using disc diffusion method. The total phenol content amongst the extracts were significantly higher in butanol extract (199.80 ± 0.55 µg GAE mg^{-1}) and decreased in the following order: butanol extract > ethanol extract > ethyl acetate extract. Antioxidant activity was also highest for butanol extract ($p<0.05$). Antioxidant activity was generally found to increase with total phenol content (TFC) and total flavonoid content (TFC). *Bassia muricata* extracts have shown significantly antibacterial activity against various gram positive and negative bacteria. The higher antibacterial activity have shown with butanol extract.

Keywords: Antibacterial, Antioxidant activity, Total Phenolic Content, Radical scavenging potential.

Résumé

Cette étude pour but d’examiné le polyphenol et le contenu flavonoïde antioxydant ayant une activité en mesurant l'activité du piégeage 2,2- diphényl-1-picylhydrazyl radicalaire et une activité antibactérienne en utilisant la méthode de diffusion sur disque. La teneur totale en phénol parmi les extraits étaient significativement plus élevés dans l'extrait de butanol (199,80 ± 0,55 pg GAE mg-1) et a diminué dans l'ordre suivant: extrait de butanol> extrait d'éthanol> extrait d'acétate d'éthyle. activité anti-oxydante a aussi été la plus élevée pour l'extrait de butanol ($p < 0,05$). L'activité antioxydante a augmenteé avec la teneur totale en phénol (TFC) andtotal contenu flavonoïde (TFC). Les extraits de *Bassia* ont montré une activité significative antibactérienne contre diverses bactéries Gram positives et négatives. L'activité antibactérienne la plus élevée a que l'extrait de butanol.

Mots-clés: activité antibactérienne, antioxydante, contenu total Phénolique, le potentiel de piégeage radical.

مقدمة

مقدمة

تعتبر النباتات الطبية مصدرا أساسيا لصحة الانسان و لا تزال العديد من الثقافات التقليدية تثمن الوصفات الطبية النباتية وأهميتها الوقائية والعلاجية ومنافعها الأخرى. والنباتات الطبية هي المصدر الرئيسي للعقاقير النباتية التي تدخل في تحضير الأدوية على شكل خلاصات أو مواد فعالة أو مواد خام لإنتاج بعض المركبات الكيميائية (العابد إ.، 2009).

عرف الانسان الحديث أضرار لم تكن معروفة أو منتشرة من قبل، بل دخل عصر الأمراض المزمنة و يرجع ذلك الى التقدم الرهيب في الكيمياء العضوية (بن عاشورة ص.، 2007) حيث لوحظ انخفاض في الإصابة بمجموعة من هذه الأمراض عند تناول الأطعمة و المشروبات الغنية بالمركبات الفينولية خاصة الفلافونويدات مثل أمراض القلب و السرطان ...الخ، يمكن للفلافونويدات أن تمنع الإصابات الناتجة عن الجذور الحرة و ذلك بإزاحتها أو تثبيط الانزيمات المسؤولة عن تشكيلها (جرموني م.، 2009).

تؤثر مضادات الأكسدة من خلال تثبيط الانزيمات المتدخلة في الأكسدة و/أو إزاحة الجذور الحرة و ذلك بتحفيز الأنظمة الانزيمية المضادة للأكسدة مؤدية الى التخفيض من الأضرار الناتجة (بن سلامة ع.،2011) .

يعرف النبات الطبي على أنه النبات الذي يحتوي في عضو أو أكثر من أعضائه المختلفة على مادة كيميائية فعالة واحدة أو أكثر بتراكيز منخفضة أو مرتفعة ، ولها القدرة الفيزيولوجية على معالجة مرض معين أو على الأقل تقلل من أعراض الإصابة بهذا المرض إذا أعطيت للمريض في صورتها النقية أو في صورة عشب نباتي طازج أو مجفف (العابد إ.، 2009) .

تعتبر الجزائر من البلدان الغنية بالنباتات الطبية نظرا لمساحاتها الواسع ومناخاتها المختلفة وهذا ما يؤدي الى التنوع الكبير في الغطاء النباتي ،ولذلك تم استعمال في هذه الدراسة نبات *Bassia muricata* L ،الذي ينتمي الى جنس *Bassia* والعائلة Chenopodiacea، ينتشر في المناطق الصحراوية ويستخدم هذا النوع في الطب الشعبي كعلاج لأمراض الكلى والروماتيزم وانخفاض ضغط الدم (Kamel M.,2001) وقد اشارت بعض الدراسات الكيميائية الى ان هذا النبات يحتوي على التربينات والصابونيات (حليس ي.، 2005).

تهدف هذه الدراسة الى استخلاص المواد الفعالة لنبات *Bassia muricata* L و تستعمل في كل من:

* تقدير المحتوى الكمي لعديدات الفينول و الفلافونويدات.
* دراسة النشاطية المضادة للأكسدة باستعمال اختبار جذر DPPH$^{\bullet}$.
* دراسة النشاطية المضادة للأحياء الدقيقة.

حيث تم تقسيم هذا العمل الى جزئين:

جزء نظري يتضمن فصلين:

- الفصل الأول: يدرس الاجهاد التأكسدي و مضادات الأكسدة.
- الفصل الثاني: يدرس النوع النباتي المدروس.

جزء تطبيقي يتضمن فصلين:

- الفصل الأول: مواد و طرق البحث : و قد تم في هذا الفصل التطرق الى أهم المواد المستعملة في هذه الدراسة و أيضا التجارب العملية التي تم اجراؤها.
- الفصل الثاني: النتائج و المناقشة: حيث تم عرض النتائج المتحصل عليها بعد اجراء التجارب الخاصة لهذه الدراسة و أيضا مناقشة هذه النتائج و مقارنتها بالدراسات السابقة.

الجزء النظري

الفصل الاول

الاجهاد التأكسدي

مضادات الاكسدة

I.الاجهاد التأكسدي

1 ـ الاكسدة

و هي عملية فقدان للإلكترونات من قبل الذرات، الجزيئات و الأيونات ينتج عنها زيادة في الشحنة الموجبة أو نقصان في الشحنة السالبة (Tunez et al., 2011).

2- الاجهاد التأكسدي

يعرف بأنه تغيرات خلوية ونسيجية تسببها جزيئات مؤكسدة وهو ناتج من حدوث اختلال في التوازن بين مضادات الاكسدة ومولدات الضد (ابن الشيخ ع.،2001)، هذا الاختلال يعود الى عدة أسباب منها: الإنتاج المفرط الداخلي لمولدات الأكسدة ذات الأصل الالتهابي أو نتيجة نقص غذائي لمضادات الأكسدة أو التعرض لعدة عوامل محيطية مثل (التبغ، الكحول، الأشعة γ المبيدات الحشرية ...الخ (جرموني م.،2009) .

3 ـ الجذور الحرة

هي عبارة عن أنواع كيميائية (ذرات، جزيئات) تحتوي على الكترون أو أكثر حر في مداره الخارجي حيث تعمل الالكترونات الحرة على جعل هذه الأنواع غير مستقرة وأكثر نشاطية ومن بين هذه المركبات: ذرة الهيدروجين ، أوكسيد النتريك، جزيئات مشتقة من الأكسجين، أيونات المعادن الانتقالية (Jacques B et Ander R.,2008).

4 ـ أنواع الجذور الحرة

4-1- التقسيم على أساس الاستقرار

4-1-1- الجذور النشطة (الغير مستقرة)

هي الجذور التي تتميز بـ: أعمار قصيرة (بيكوثانية) و أوزان جزيئية صغيرة من أمثلتها:

$CL^{\bullet}$, $H^{\bullet}$, $F^{\bullet}$, $NO^{\bullet-}$, $HO^{\bullet}$, $I^{\bullet-}{}_2$, $CH^{\bullet 3}$

4-1-2- الجذور المستقرة (الصامدة)

وهي الجذور التي تتميز بـ: أعمار طويلة (بالثانية) ومن أشهرها: جذر ثنائي فينيلل بكريل هيدرازيل ($DPPH^{\bullet}$) (مصطفى ب.،2008) .

4-2- التقسيم على أساس النوع

4-2-1- الجذور الحرة الأوكسيجينية

يوجد نوعين من الجذور الحرة الأوكسيجينية النشطة ROS وهي

الأنواع الجذرية والأنواع الغير جذرية.

- تعتبر الأنواع الجذرية القادرة على تشكل في الخلية، يمكن أن نميز بعض المركبات الجذرية التي تلعب دور خاص في الفيزيولوجيا وتسمى بـ : الجذور الأولية.

- تتشكل الجذور الثانوية عند تفاعل الجذور الأولية مع الجزيئات الخلوية حيث تشتق الجذور الأولية من الأوكسيجين بواسطة التفاعلات الالكترونية وذلك من خلال إضافة الكترون الى الأوكسيجين الذي يؤدي الى تشكيل أيون السوبر أكسيد superoxide($O_2^{\bullet -}$) الذي يكون أقل نشاطا والأكثر خطورة بالنسبة للطلائع الجذرية الأخرى (بوبلوطة ح.، 2009) .

- يتحول أيون السوبر أكسيد superoxide ($O_2^{\bullet -}$) عن طريق دسمته (Dismitation) الى بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) الذي لا يعتبر جذرا حرا لكنه جد نشط حيث يتدخل في تخليق جذر الهيدروكسيل ($OH^{\bullet}$) (Favier A., 2003) وهذا الأخير المسؤول عن السمية الخلوية (Bierl C et al., 2006) .

ومن بين الأنواع الأوكسيجينية النشطة وأهمها:

4-2-1-1- أيون السوبير أكسيد ($O_2^{\bullet -}$) Superoxide anion

- عبارة عن جذر أحادي مشحون سلبا، ينتج من الاختزال الأحادي لجزيئة الأوكسيجين الذي يكسب الكترون أثناء تفاعل يتطلب طاقة(Kohen R et Nyska A., 2002) وفقا للمعادلة التالية:

$$O2 + e - \longrightarrow (O_2^{\bullet -})$$

4-2-1-2- فوق أكسيد الهيدروجين H_2O_2

- يعتبر من الأنواع الأوكسيجينية الأكثر سمية لأن غياب شحنة عليه يجعله قابل للمرور في الأغشية البيولوجية، حيث ينتج H_2O_2 عن عملية الدسمته لأيون Superoxide ($O_2^{\bullet -}$) بواسطة انزيم SOD (Kohen R et Nyska A., 2002)، وفقا للمعادلة التالية:

$$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

4-2-1-3- جذور الهيدروكسيل $OH^{\bullet}$

يتكون جذر الهيدروكسيل $OH^{\bullet}$ من H_2O_2 في تفاعل غير انزيمي يتم تحفيزه بأيون الحديد (Fe^{+2}) ويسمى هذا التفاعل : بتفاعل Fenton (حوة إ.،2013)، وفقا للمعادلة التالية:

$$H_2O_2 + Fe^{+2} \longrightarrow OH^{\bullet} + OH^{-} + F_2^{+3}$$

4-2-3- الجذور النتروجينية

تشمل:أكسيد النتريك، ثنائي أكسيد النتروجين، بيروكسيد النيتروجين الهيدروجيني و بيروكسيد النتريت وهو الأكثر خطورة (حوة إ.،2013) .

4-2-4- الجذور الحرة الدهنية

تعتبر الدهون الأكثر عرضة من غيرها للتأكسد بجذور الأوكسيجين و النتروجين خاصة الدهون المشبعة و هي الأطول عمرا لذا تعتبر خطيرة (ريدة أ.،1999) .

4-2-5- السموم الحرة

و هي معظم المواد السامة و المسرطنات الكيميائية (حوة إ.،2013) .

5- مصادر الجذور الحرة

تنتج الجذور الأوكسيجينية النشطة (ROS) عبر العديد من الآليات الموجودة داخل الخلية حيث تكون هذه الأخيرة مستهدفة من طرف (ROS) والجذور سواء كانت مرتبطة بالعوامل داخلية أو خارجية المنشأ (Lairon D., 2004) والتي يمكن أن نذكر منها:

5-1- مصادر داخلية

5-1-1- الأغشية الميتوكندرية

- تنتج ROS عبر الميتابوليزم الخلوي على مستوى الميتوكندري وحوالي 90% من الأوكسيجين المستهلك خلال عملية التنفس الخلوي يرجع الى ماء بينما 5% المتبقية تتحول الى ROS (Bacher LB.,2004) .

- تتكون أغشية الميتوكندري من مجموعة من النواقل التي تعمل على ارجاع O_2 لإنتاج $O_2^{\bullet -}$ من بينها انزيمات:

Ubiquinon cyct C Reductase

(Niviere V and fontecave M., 1994) NADPH dehydrogenase

كما تقوم الميتوكندري بإنتاج فوق أكسيد الهيدروجين H_2O_2 عن طريق دسمته لأيون أيون السوبير أكسيد $O_2^{\bullet -}$، كما ينتج جذر الهيدروكسيل $OH^{\bullet}$ في الميتوكندري (Freman B and James D., 1982)

5-1-2- انزيم NADPH oxidase

- يتواجد هذا الانزيم على مستوى الغشاء البلازمي، تم اكتشافه على مستوى الخلايا البالعة له دور أساسي في استعمال الأوكسيجين لإنتاج كميات عالية من $O_2^{\bullet -}$

(Gutteridge J., 1993 ; Marczak J and pitrowski W., 2000) وفق المعادلة التالية:

$$NADPH^+ + 2O_2 \longrightarrow NADP^+ + H^+ + 2O_2^{\bullet -}$$

حيث أن انتاج جذر فوق الأكسيد ($O_2^{\bullet -}$) هو أصل تخليق بعض المركبات مثل بيروكسيد الهيدروجين الذي يلعب دور في تخريب الأنسجة (بن ربيعي م .، 2008).

5-1-3- انزيم Xanthine oxidase

عبارة عن انزيم ذائب له دور في انتاج ROS من خلال استعمال الأوكسيجين كمستقبل للإلكترونيات لإنتاج ($O_2^{\bullet -}$) (Mckelvey et al., 1988 ; Parks D., 1988) .

5-1-4- انزيم NOS (Nitric oxide synthase)

ينتج هذا الانزيم جذر NO^- في العديد من الخلايا حيث يتشكل هذا الجذر بكميات قليلة من طرف انزيم E-NOS، أما في حالة تنشيط انزيم I-NOS الذي يحفز انتاج كميات عالية من NO^- والذي يتأكسد بسرعة لينتج باقي أنواع RNS (Coleman J., 2010) .

5-1-5- انزيم LOX (Lipoxygnase)

يمثل هذا الانزيم مصدرا آخر للجذور الحرة في جدران الأوعية الدموية (Koshiishi I., 2009)، حيث يتدخل الانزيم 5-Lox في أكسدة الأحماض الدهنية غير المشبعة لإعطاء مشتقات هيدروبيروكسيد التي تعتبر سامة بالنسبة للخلايا، كما يتدخل في انتاج أنواع أوكسيجينية الأخرى عند تنشيط اللمفاويات البائية LB في المزارع الخلوية (Werz O et al., 2000).

5-2- مصادر خارجية

- يتعرض الجسم لمختلف العوامل الخارجية التي يمكن أن تؤدي الى تكوين الجذور الحرة، حيث تتسبب الأشعة الفوق البنفسجية،(Palvou et al., 2009) وتحت الحمراء والأشعة X، γ وبعض العقاقير مثل المضادات الحيوية: مضادات السرطان (Sellal A., 2008) في انتاج $O_2^{\bullet -}$ ، $H^{\bullet}$ ، كما تؤدي أكسدة الأدوية والكحولات على مستوى الكبد الى زيادة انتاج الجذور الحرة (Mari M et al., 2010) .

- تدخل عدة سموم المنتشرة في الغذاء والمحيط (التبغ، المبيدات، الإضافات الغذائية...الخ) في انتاج الجذور الحرة عبر تنشيط الانزيمات(Abdallahi M et al., 2004) .

- تعتبر المعادن السامة مثل: الحديد (Fe) والكروم (Cr) والنحاس (Cu) وVanadium (V) محفزات قوية لتفاعلات الأكسدة وانتاج الجذور الحرة(Koivula M et al., 2011).

- تعتبر المخدرات مثل الكوكايين أن تسبب أضرار تأكسدية على مستوى الجلد و ذلك بتنشيط الانزيم NOS (Portugal- cohen et al., 2010)

6- أسباب زيادة الجذور الحرة

- يزيد تشكل الجذور الحرة بازدياد سرعة الاستقلاب كما يحدث في حالة التوتر والشدة.

- يزيد بزيادة عوامل التلوث البيئي المختلفة التي يتم تحطيمها في الجسم لتتحول الى جذور حرة. (Soares j et al ., 1997)

- استهلاك كميات كبيرة من الأوكسجين وزيادة الاجهاد خلال التمارين الرياضية العنيفة من انتاجها.

- التدخين وجميع أنواعه وكذلك أشعة الشمس والأشعة X من انتاج الجذور الحرة.

- كثرة استهلاك الدهون والسكريات (Redb N et al., 2005)

7- مصير الجذور الحرة

- ان الجذور الحرة بعد أن تأخذ حاجتها من الالكترونات فإنها اما أن تطرح بشكل مباشر من الجسم وهذا أحسن ما يكون، أو تلتهمها الكريات البيضاء كأجسام غريبة وهذا أيضا سليم، أو ان ترتص في بعض المستقبلات الخلوية على شكل قفل ومفتاح معطلة بذلك وظيفة هذا المستقبل في أن يتصرف على الجزء الخاص به وهذا أخطر ما يكون وكمثال على ذلك ارتصاص الجذور الحرة على المستقبل الخلوي الخاص بجزيء الأنسولين مما يمنع هذا الأخير من ادخال جزء السكر الى داخل الخلية فيصبح المريض لا يستجيب حتى للأنسولين البشري (Tseng T et al., 1997).

- أما بالنسبة للآلية الطبيعية، يتخلص الانسان من الجذور الحرة المتشكلة أن الكريات البيضاء تستعمل هذه الجذور لقتل بعض الجراثيم والفيروسات، كما أن الكبد يستعملها ليزيل سمية بعض الكيماويات (برحال جـ .، 2004 ؛ رسلان ب.، 2010).

8- تأثير الاجهاد التأكسدي على المستوى الداخلي

8-1- أكسدة ADN

تؤدي أكسدة الجذور الحرة المختلفة على مستوى ADN الى تشكل 4 أنواع من الأضرار حسب (Halliwell P., 2000; Singal P et al., 1988):

- تغيرات على مستوى القواعد الآزوتية.

- تغيرات على مستوى المواقع غير القاعدية.

- تشكيل جسور بين ADN والبروتين.

- كسر على مستوى السلاسل (الأحادية و المزدوجة). والتي تعتبر مصدرا للعديد من الأضرار التي تصيب القواعد مثل: نذكر 8-oxoguanine الذي ينتج عن هجوم جذر الهيدروكسيل peroxynitiete أوالأكسجين المفرد على guanine في الموقع C-8 (Therond P., 2006) وتؤدي هذه الأضرار الى الخطأ في القراءة خلال عملية الاستنساخ (بوبلوطة ح .، 2009) .

8-2- أكسدة البروتينات

- يمكن أن تتأكسد البروتينات كل من الأحماض الأمنية وذلك بواسطة الأنواع الأكسيجينية النشطة، من بينها: الأحماض الأمينية الكبريتية (سيستيين والميثيونين) والعطرية (الثيروزين والثيريبثوفان) الأكثر حساسية (Singal P et al., 1988). تؤدي أكسدة الأحماض الأمينية الى تشكيل مجموعات الهيدروكسيل والكربونيل على البروتينات (عمراني أ.، 2013) لكن يمكن أن تؤدي الى ظهور تغيرات بنائية جد مهمة مثل: التشابك داخل الجزيئات أو بينها. وقد تؤدي هذه تغيرات في طبيعة البروتينات ومن ثمة تحويل في وظيفتها مؤديا في ذلك الى حدوث أمراض المناعة الذاتية (حوة إ.، 2013) .

8- 3- أكسدة الليبيدات

- يخص الاجهاد التأكسدي على كل المكونات الخلوية، لكن تعد اللبيدات الأكثر مساسا بهذه الظاهرة. حيث تتأثر فوق اكسدة الليبيدات للأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة أو المؤشرة للأغشية الخلوية مثل: أسترات الكوليسترول، الفوسفولبيدات، الجليسيريدات الثلاثية (Meziti A.,2009) .

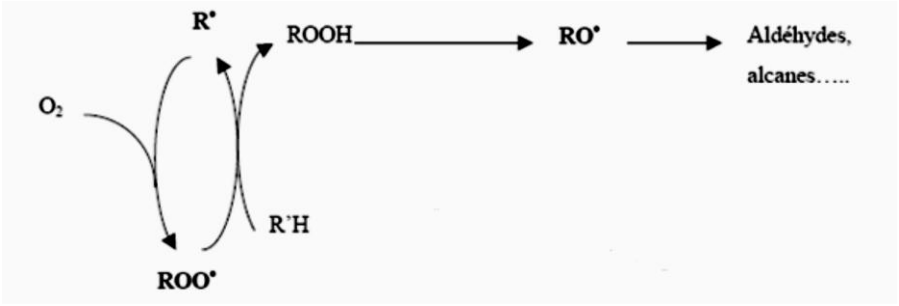
- تبدأ الأكسدة الليبيدية بعدة مراحل:

8 - 3 -1 مرحلة البداية

تستلزم هجوم الأنواع النشطة (الهيدروكسيل، البيروكسيل و الأكسيجين الأحادي) التي تؤدي الى نزع ذرة الهيدروجين من الحمض الدهني المتعدد غير المشبع (LH) (Meagher E et al.,2002)

8 - 3- 2 مرحلة الانتشار

يقوم الحمض الدهني المتعدد غير المشبع (LH) الى تشكيل جذر Pantandienyl حيث عند إضافة الاكسجين O_2 الى هذا الأخير يؤدي الى إعطاء جذر البيروكسيل$^{\bullet}$ROO، يتفاعل هذا الجذر مع حمض دهني آخر يشكل الهيدروبيروكسيد (ROOH) (Favier A., 2003).



الشكل(01):مرحلة الانتشار(Favier ., 2003).

8- 3- 3 مرحلة النهاية

تؤدي هذه المرحلة الى تكوين مركبات مستقرة ناتجة عن ارتباط جذرين، ($R^{\bullet}$) بجذر اخر($ROO^{\bullet}$)، مؤديا الى ابطال مفعول الجذور الحرة (Badouarad C., 2006).

$$ROO^{\bullet} + R^{\bullet} \longrightarrow ROOR$$

$$ROO^{\bullet} + ROO^{\bullet} \longrightarrow ROOR + O_2^{\bullet}$$

الشكل(02): مرحلة النهاية (Favier ., 2003).

9- الاجهاد التأكسدي و علاقته بالأمراض

1- تؤدي الأكسدة الفوقية للدهون الى انتاج جذور حرة لها شراهة تكسبها عمرا أطول و انتشارا أوسع مسببتا في ذلك خلايا سرطانية (Pincemail J et al., 1999).

2- تسبب الجذور الحرة أمراض القلب والأوعية الدموية التي معظمها تؤدي الى تصلب الشرايين، الذبحة القلبية، السكتة الدماغية والجلطة حيث أكدت عدة دراسات عن زيادة معدل الوفيات وهذا راجع الى الاضطراب في النظام الغذائي(Pincemail J et al., 1999)

3- هناك عدة نظريات أثبتت تأثير الجذور الحرة على الخلايا والأنسجة التي تضعف من وظائفها مما يؤدي الى ظهور الشيخوخة وهي المرحلة التي تقل فيها مقدرة الفرد على تجديد خلاياه و ذلك من خلال حدوث تغيرات عديدة لخلايا وأنسجة الجسم مثل: ظهور اللون الأبيض للشعر، انكماش خلايا الجلد وبطء عملية التمثيل الغذائي للأطعمة وغيرها.

4- ينتج عن تدخين السجائر أو الشيشة الجذور الحرة والمواد المحثة للتشوهات الجنينية و المواد المسببة للسرطان (Martinez et al., 2010) .

5- تعتبر أمراض تعتيم عدسة العين من المشاكل الصحية الرئيسية في العالم، تملك عدسة العين نظاما دفاعيا يحميها من التخريب التأكسدي، حيث تعمل مضادات الأكسدة على تثبيط الجذور الحرة الضارة وكذلك الانزيمات المحللة للبروتينات من خلال التقاط البروتينات المحطمة من العدسة. لذلك فإن البروتينات المتأكسدة قد تتراكم، وكلما تقدم الانسان في العمر أصبحت الأنظمة الدفاعية أقل فاعلية ويصبح تخريب بروتينات العدسة غير قابل للعلاج (Nduk A et al., 2010) .

6- السكري (Kashihara N et al., 2010).

7- الحساسية (Li et al., 2010).

8- التهاب المفاصل (Syrkina O et al., 2008).

9- ارتفاع ضغط الدم (Touyz R et schiffrin E., 2004).

10- الزهايمر و أمراض الجهاز العصبي(Jenner P et al., 1996 ; Zafrilla et al., 2007)

11- أمراض الجهاز المناعي (Lesgads J et al., 2002).

II. مضادات الاكسدة

1ـ تعريف مضادات الاكسدة

تعتبر مضادات الاكسدة نظاما دفاعيا ضد الضغط التي تسببه ذرات الاكسجين الشاردة ،وهي مجموعة من العناصر والمركبات الكيميائية، العضوية من ضمنها إنزيمات، فيتامينات، معادن، احماض آمنية (Souley A et Amadou B.,2004) التي لها القدرة على منع أو إبطاء عملية الاكسدة عن طريق ازالة الجذور الحرة أو ان تصلح الضرر الناتج عنها أو تمنع تكوينها بهدف حماية المركبات الاخرى من الاكسجين (Bossoki I.,2003). وعلى الرغم من وجود مضادات الاكسدة داخل الكائن الحي لتغطي معظم حاجيات جسم الانسان من خطوة الجذور الحرة الا انها غير كافية ولذلك فإننا نحتاج الى كميات اضافية لحماية الجسم وتقوية الجهاز المناعي وترميم الانسجة والخلايا وذلك بتناول مجموعة كبيرة من الاطعمة الغنية بمضادات الاكسدة من بينها : الاغذية البحرية، الخضر والفواكه الطازجة وبعض المكسرات ....إلخ(سعاد م.،2010)، اذ تحتوي الخضر والفواكه على كميات وفيرة من الفيتامينات حيث تعطي هذه الاخيرة إلكترونات دون ان تتحول الى جذور حرة ومن بين مضادات الاكسدة الاخرى الموجودة في الاطعمة (Natrol) المتواجد في العنب، β-carotane الذي يتواجد في كثير من الاغذية مثل: الجزر، كما يعتبر Lycopéne مضاد للأكسدة شديد الفعالية الموجود في الطماطم، اضافة الى السيلينيوم المتواجد في الاغذية مثل القمح والارز، أما بالنسبة للمركبات الفلافونويدية فتعد من عائلة مضادات الاكسدة التي لها تأثير جيد مضاد للسرطان مثل : Cathine المتوفر في نبتة الشاي الاخضر وQuercétine المتوفر في الخضر ذات اللون الاصفر كما هوالموضح في الجدول (01)

(Janzen E.,1984)، ومع ذلك صنفت مضادات الاكسدة الى مجموعتين هما : مضادات الاكسدة الانزيمية و مضادات الاكسدة الغير انزيمية .

الجدول (01) : العوامل المؤكسدة و العوامل المضادة للأكسدة

العوامل المؤكسدة	العوامل المضادة للاكسدة
-الالتهابات -التدخين -التمارين الرياضية العنيفة -الملوثات البيئية -الإشعاع -العوامل المسرطنة	-فيتامين E - فيتامين C -الكاروتينيدات -الفلافنويدات -الجلوتاثيون -إنزيم فوق أكسيد ديسميوتيز -إنزيم الكتالاز

2 ـ تصنيف مضادات الاكسدة

1-2 الانظمة الدفاعية الانزيمية

تلعب هذه الانظمة دورا هاما في الخلية وهي حمايتها من الاجهاد التأكسدي وتنقسم هذه المجموعة الى عدة انواع من اهمها: (Keita R.,2002)

ـ سوبر أكسيد ديسموتاز Superoxide dismutase SOD

يعتبر هذا الانزيم من أهم الانزيمات الفاعلة كمضاد للأكسدة، فهو يقوم بتقصير مدة حياة الايون Superoxide ($O_2^{\bullet -}$) (Vouldouki S et al.,2004) حيث يمثل هذا الايون جذرا حرا ويشكل خلال الاستقلاب العادي للخلية وكذلك استقلاب المواد الغير احائية مثل الادوية (Lioche V and Fridovich.,2000؛ قندولي ش.،2009) ان انزيمات SOD عبارة على بروتينات معدنية تحفز التحول المزدوج Dismutatiom للايونات فوق الاكسيد($O_2^{\bullet -}$) الى بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 وأكسجين (O_2) (Serrano et Klann.,2004) حسب التفاعل التالي:

$$O_2^{\bullet -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

يتواجد في كل من العضيات الحيوانية والنباتية والكائنات الدنيا الهوائية مثل: الخمائر، كما يعتبر من الانزيمات التي تدخل في تحليل النواتج السامة للميتابوليزم الخلوي (Fukai Tet al.,2001).

ـ انزيمات الكاتلاز Catalase CAT

يوجد هذا الانزيم في خلايا النسجية الراقية كالدم، نخاع العظام، الاغشية المخاطية، الكبد والكلى (Yu B.,1994 ; Januel C.,2003) كما ان هذه الاجسام غنية بإنزيم آخر هو Oxidase حيث يعمل هذا الاخير على تكوينH_2O_2 ، يقوم Catalase بتكسيره وتحويله الى اكسجين وماء (Day B.,2009) حسب التفاعل التالي:

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

لانزيم الكاتلاز نشاط Peroxydase فهو يمكن ان يستخدم جزيئات H2O2 كركيزة مانحة للالكترونات وجزيئات H_2O_2 اخرى كمؤكسد أو مستقبل للإلكترون (Ryter S and Tyrrell R .,2000) .

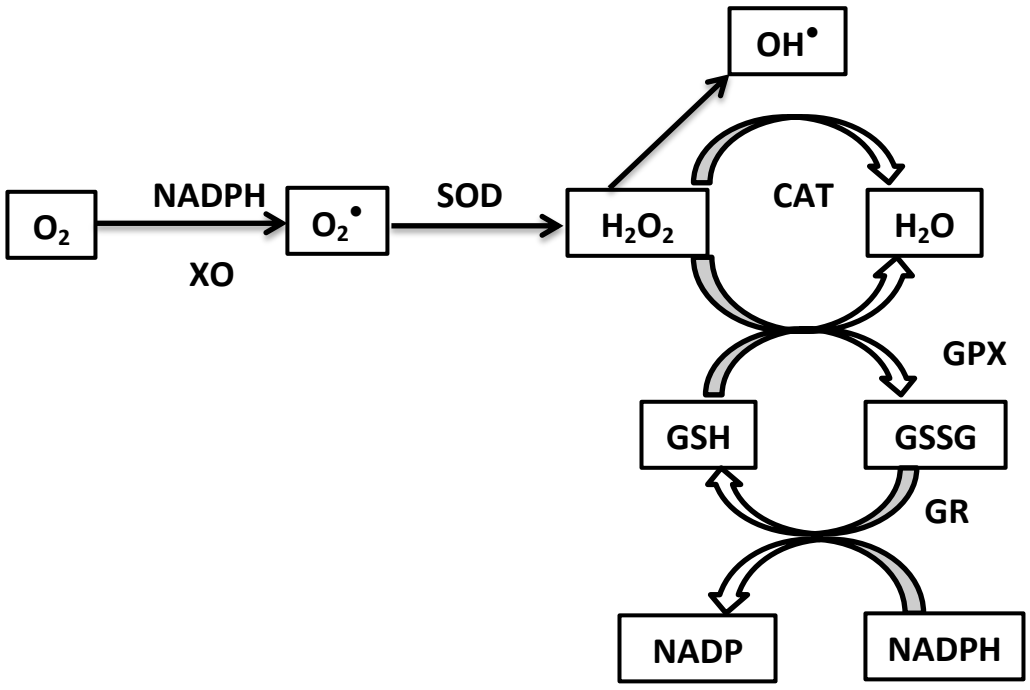
- انزيم Glutathion peroxidase و Glutathion reductase

يتواجد كل من Glutathion peroxidase (GPX) وGlutathion reductase(GR) في الميتوكوندري والسيتوزول، ويعتبران من اهم الانظمة الانزيمية المضادة للاكسدة وذلك من خلال تحفيز تكسير H_2O_2 و البيروكسيدات الليبيدية (Bierl C et al.,2007) الناتجة عن اكسدة الكولسترول والاحماض الدهنية (Herbette et al.,2007) وفقا للتفاعل التالي:

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

$$LOO\bullet + 2GSH \longrightarrow LOH + H_2O + GSSG$$

يقوم انزيم (GR) بإعادة تجديد GSH (γ-glutamul-cysteinyl-glycine) انطلاقا من GSSG ويتطلب هذا التفاعل عامل مساعد هو NADH (Shilina N.,2009) كما هو موضح في الشكل التالي:



المخطط (01): آلية التخلص من جذر $O_2^{\bullet-}$ بواسطة الانزيمات المضادة للأكسدة

- انزيم Thioredoxine reductase (Trxr) و Thioredoxine(Trx)

يعتبرThioredoxine من الانزيمات المنشطة لمضادات الاكسدة كالبروتينات الذي يلعب دورا في تنظيم الجهاز المناعي (Hattori I et al .,2003). يؤكسد Thioredoxine ويرجع بواسطة Thioredoxine reductase هذا الاخير عبارة على انزيم يملك مجموعة Sélénocysteine في موقعه النشط كما يتدخل في هدم فوق الاكاسيد الليبيدية و بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) وفي تحويل جذر Ascarbyl الى حمض الاسكوربيك (سعاد م .،2010) .

2-2 الانظمة الدفاعية غير الانزيمية

ـ على عكس مضادات الاكسدة الانزيمية ، معظم هذه المركبات لا تنتج من طرف العضوية وقد يكون مصدرها من الاغذية مثل : الفيتامينات (Vit E ,Vit C) و Glutathio .....الخ (Kanthikeyan J and Rami P.,2003) التي تلعب دورا في حماية الخلية من التلف الناتج عن الجذور الحرة(Meydain M.,2004)، كما يمكن ان تكون داخلية المنشأ مثلCoenzyme Q10

(Bodzek P and Wielkoszynki T.,2003)، غالبا ما تتميز مضادات الاكسدة الغير الانزيمية بأوزان جزيئية منخفضة (Yin M and Chan K.,2007) ومن اهمها :

2-2-1- الطبيعية

ـ الفيتامينات

هي مركبات حاوية على الكربون التي يحتاجها الجسم في الاستقلاب لكن لا تصنع في الجسم ،يتم الحصول عليها من مصادر خارجية مثل الطعام، الماء او التناول عن طريق الفم أو الحقن الا ان هناك بعض الاستثناءات في هذا التعريف المشتملة على فيتامين D الذي يصنع في الجسم الى درجة محدودة(صخري ل.،2010) ومن اهم الفيتامينات نذكر منها :

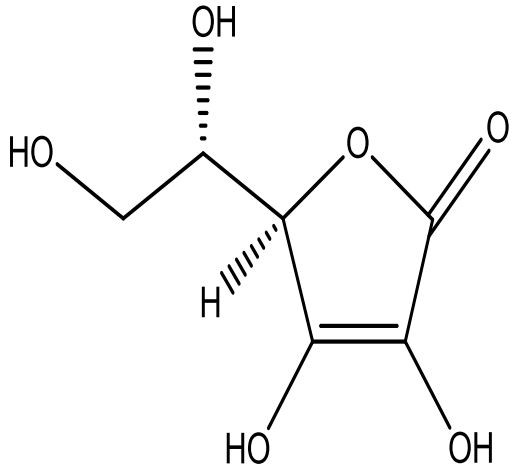
فيتامين C

يسمى كذلك بحمض الاسكوربيك وهو مضاد للأكسدة قابل الذوبان في الماء والوسط الحامضي (المريقي أ.،2005)، ويعتبر من العناصر الصغرى التي يحتاجها الجسم لأداء وظائفه ومن اهم مصادره الفواكه، الحمضيات والخضر الطازجة مثل: الليمون، البرتقال، الطماطم والفراولة اذ يلعب دورا هاما في الحفاظ على الصحة العامة ومقاومة الامراض وتقوية الاغشية الخلوية وابطال فعل السموم والجذور الحرة (Carr A and Frie B .,1999) كما يؤدي نقصه الى تشوه الاسنان وسقوطها وتصلب الشرايين .

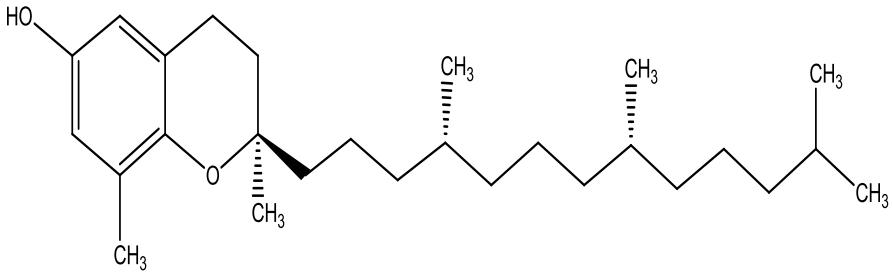
فيتامين E

يعتبر فيتامين E من اكثر مضادات الاكسدة ذوبانية في الدهون وتعرف مركباته بـ Tocopherols ومن اهمها α-Tocopherol الذي يلعب دورا في حماية الاغشية من التلف التأكسدي وبالتالي يمنع

الكولسترول من الالتصاق بجدران الشرايين حيث ان هذا الفيتامين يقوم باقتناص البيروكسيدية في الاغشية الخلوية ويطلق عليه بـ "كاسح الجذور" ومن اهم مصادره الطبيعية : الزيوت النباتية (Bermond P.,1997 ; Magnin P.,1992)



الشكل (03): التركيب الكيميائي لـ فيتامينC



الشكل (04): التركيب الكيميائي لـ فيتامين E

ـ الجلوتاثيون Glutathion

عبارة على ثلاثي البيبتيد بسيط (Glutamique –cysteine –glucine) شكله المختزل يسمى (GSH) وشكله المؤكسد (GSSG)، يتدخل (GSH) بصفة قوية في ازالة سمية الانواع الاوكسيجينية النشطة (Dringen R .,2000) كما يتفاعل بسرعة مع جذر الهيدروكسيل $OH^{\bullet}$ ويتأكسد بواسطة H_2O_2 في وجود ايونات المعادن مثل:النحاس، الحديد حيث يقوم ايضا بتحفيز Glutathion peroxidase بأكسدة (GSSG) و(GSH) في وجود H_2O_2 (Deshpande S et al.,1996) حسب التفاعل التالي :

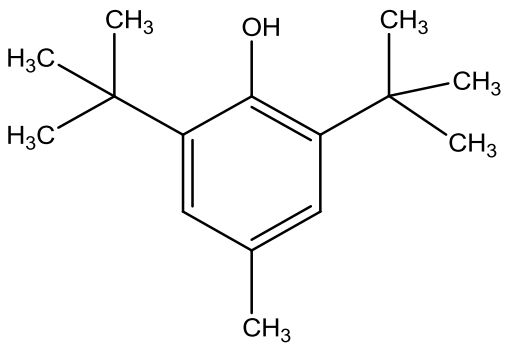
$$H_2O_2 + 2GSH \longrightarrow H_2O + GSSG$$

2-2-2- صناعية

ان مضادات الاكسدة التي تتكون طبيعيا داخل جسم الانسان غير كافية مما ادى الى تصنيع مجموعة من المركبات التي تعمل كمضادات للأكسدة اطلق عليها: مضادات الاكسدة الصناعية والتي تضاف الى الاطعمة لمنع اكسدة مكوناتها ومن اهم هذه المركبات (محب ط.،2010)

ـ المركب Buthyl hydroxyl toluéne (BHT)

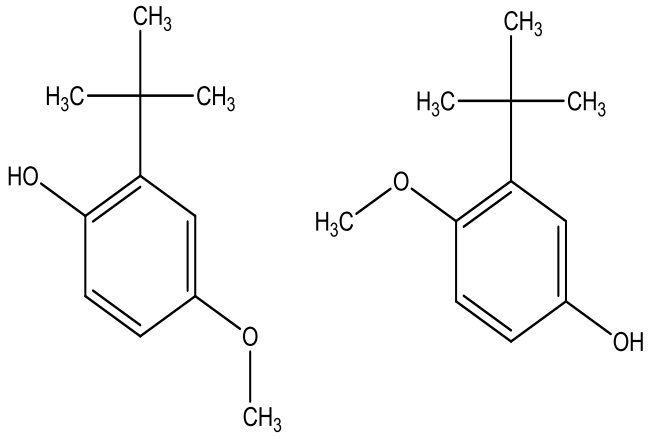
يعتبر من مضادات الاكسدة الصناعية، ذو لون ابيض وهو مادة متبلورة، عديم الرائحة، لا يذوب في الماء لكنه يذوب في المذيبات العضوية والدهون (فرحات س .،2013).



الشكل(05): التركيب الكيميائي لـ BHT

ـ المركب Buthyl hydroxyl anizole (BHA)

لا يوجد هذا المركب في الطبيعة لكنه يصنع بطريقة butylation للمركب Paramethoxyphenol، يذوب ولـ BHA صيغتين ولكليهما رائحة الفينول ومن اهم خواص هذين المركبين هو قدرتهما كمواد مضادة للأكسدة في الغذاء اثناء التسخين :كالقلي (فرحات س .،2013) .



الشكل(06): التركيب الكيميائي لـ BHA

الفصل الثاني

النبات المدروس

Bassia muricata L

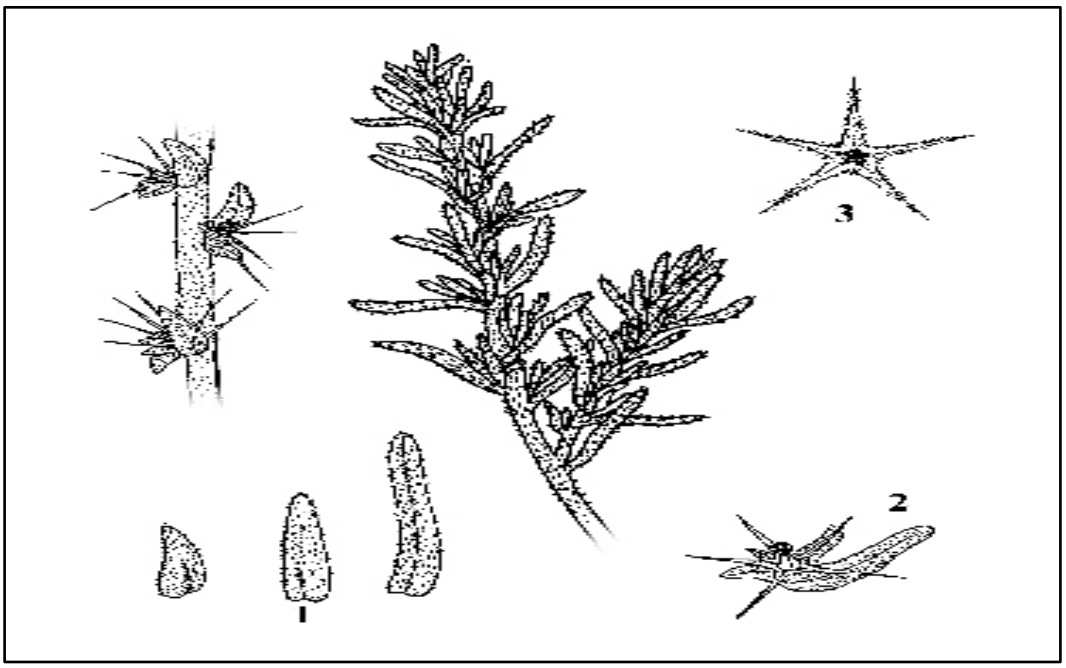
1 ـ دراسة العائلة السرمقية Chenopodiaceae (Salsolaceae)

- تكون النباتات في هذه العائلة عشبية كثيفة، أوراقها مسطحة واسعة النصل ذو اللون الأخضر الداكن ملحومة لبعضها البعض في كل زوج، الأزهار دائما صغيرة غير واضحة (Bouzghaia B., 2009)، عندما تبلغ الأزهار تتحول أغلفتها الى أشواك صغيرة حادة (حليس ي.، 2005)، حيث تكون غير ملحومة مكونة من 3 في كل محور، يتكون غلاف الزهرة من 5 أجزاء، عادة ما تكون أقل 5 (مختلفة الأعداد)، المبيض يحتوي على خلية واحدة تحتوي على البيوض ويعلو عليه بشكل عام اثنين من المياسم الناضجة حيث يتحول المبيض الى جدران رقيقة التي تظهر الخطوط العريضة للبذور.

2- الوصف النباتي لـ *Bassia muricata* L

- هو عبارة على عشب رملي (Kamel M et al., 2001) حولي، كثير التفرع يكسوه شعيرات ناعمة كثيفة، الساق رقيقة قاسية وشبه متخشبة وغالبا ما تكون الساق محجوبة بواسطة الأوراق الكثيفة (حليس ي.،2005) أوراقها لاطئة خطية ضيقة بيضاوية الشكل عرضها يتراوح بين (10- 20ملم)، طولها بين (1.5- 2ملم)(Turki Z et al., 2006)

- ويستخدم هذا النوع في الطب الشعبي لعلاج أمراض الكلى والروماتيزم وعلاج انخفاض ضغط الدم الكبير والانخفاض في تعداد كريات الدم البيضاء وأظهرت بعض المراجع أن أنواع قليلة من *Bassia* احتوائها على الصابونين والتربينات (Kamel M., 2001).



الشكل (07): رسم تخطيطي لنبات *B. muricata* L (حليس ي.،2005)

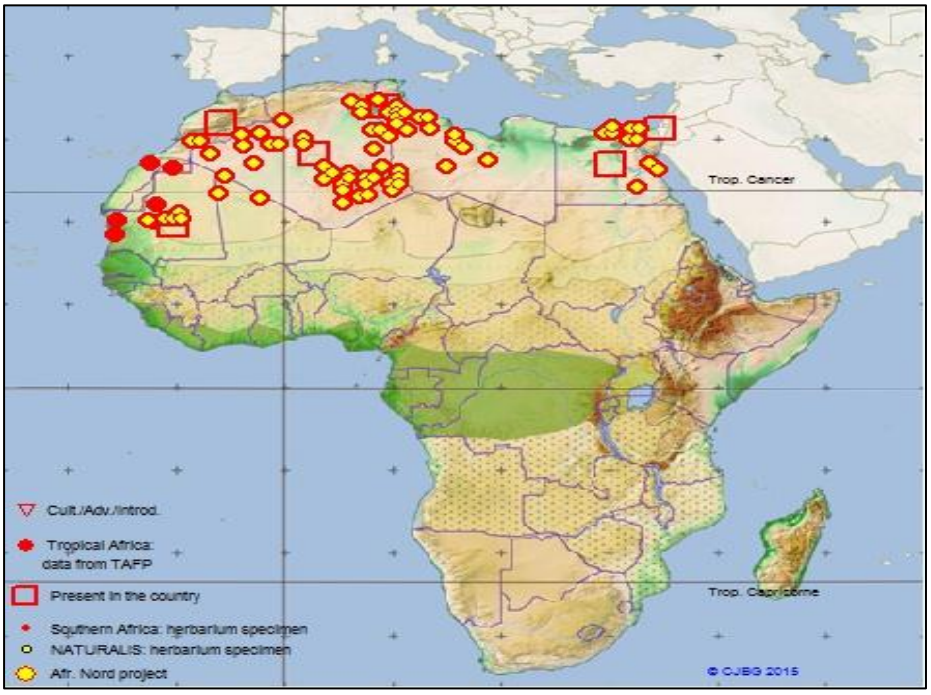
3- التصنيف النباتي لـ *B. muricata* L (Bouzghaia B., 2008).

المملكة	Plant
تحت المملكة	Tracheobionta
الشعبة	Spermatophyta
الفصيلة	Magnoliophyta
الصف	Magnoliopsida
تحت الصف	Caryophyllidae
الرتبة	Caryophllales
العائلة	Chenopodiaceae
الجنس	*Bassia*
النوع	*Bassia muricata L*

الشكل(08): صورة حقيقية لنباتL *B. muricata*

4 ـ الانتشار الجغرافي للعائلة

- تشمل هذه العائلة تقريبا 100 جنس و1000 نوع، حيث تنمو هذه النباتات البرية بشكل رئيسي في المناخات الجافة أو الشبه جافة، البحر الأبيض المتوسط، الصحراء، الشرق الأوسط، السهول والصحاري في آسيا الوسطى وجنوب افريقيا وأستراليا. (Bouzghaia B., 2008)

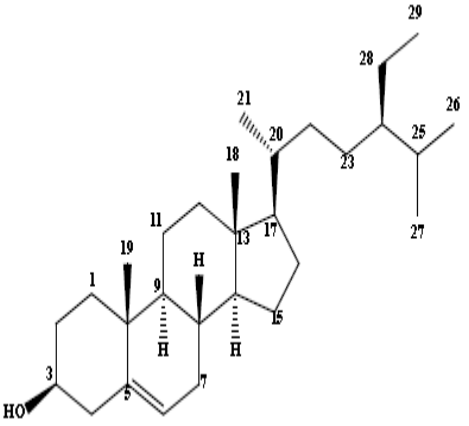


الشكل(09): الانتشار الجغرافي لـ L *B. muricata* على مستوى قارة افريقيا(Turkoglua A.,2007)

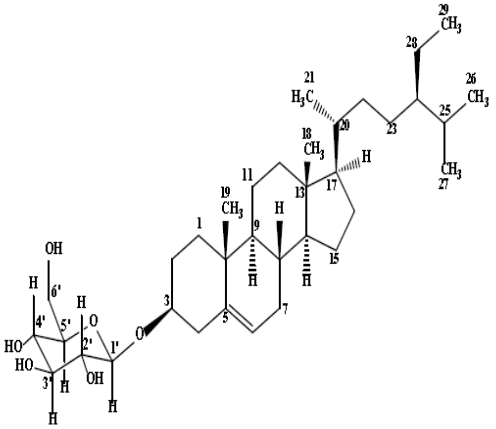
5 ـ الدراسات السابقة للنوع

ـ يعتبر نبات L *B. muricata* من النباتات الشائعة في منطقة سوف وهومن النباتات التي تقصدها الحيوانات، وتعتبر الدراسات المخبرية لهذا النوع قليلة جدا ومن اهم الدراسات المتعلق بهذا النبات: قامت Bouzghaia (2009) بدراسة فيتوكيميائية للمستخلص الكلوروفورمي والبوتانولي للجزء الهوائي على نبتة L *B.muricata* حيث تم عزل 3 مركبات عضوية من الايض الثانوي منها :اثنان من الستيرويدات (Daucostérol،β-sitostérol) وفلافونويد

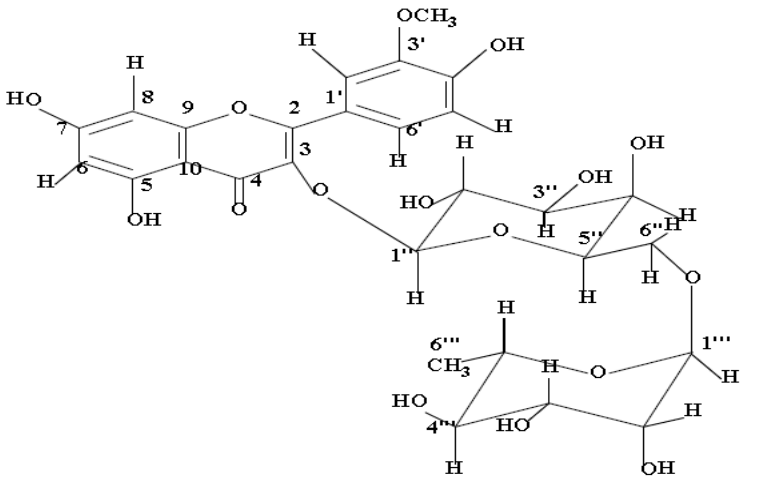
l’isorhamnétine-3-O-[O-α-Lrhamnopyranosyl-(1-6)-β-D-galactopyranoside]



التركيب الكيميائي لـ β-sitostérol

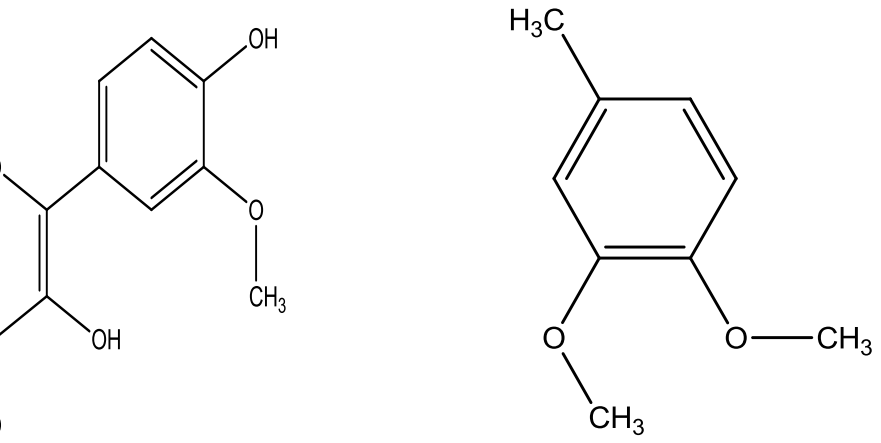


التركيب الكيميائي لـDaucostérol

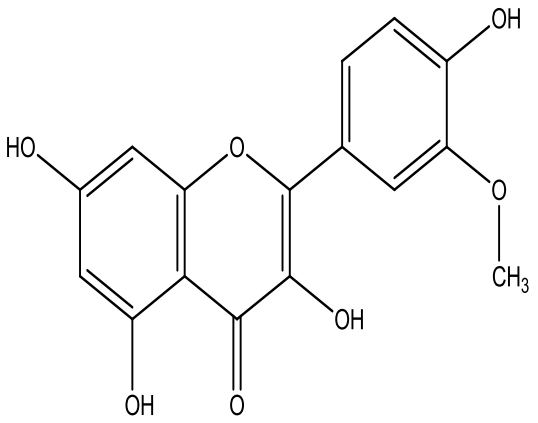


التركيب الكيميائي l'isorhamnétine-3-O-[O-α-L rhamnopyranosyl-(1 6)-β-D-galactopyranoside]

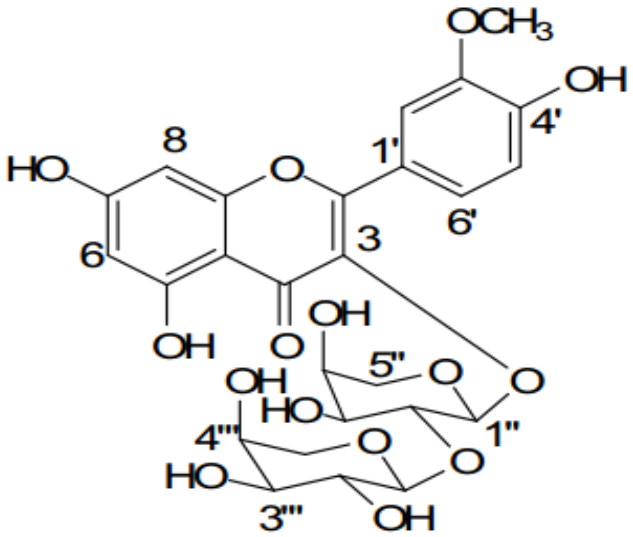
ـ وفي دراسة اخرى اجراها Chaker K وآخرون (2013) لنبات *B. muricata* L ، حيث تم عزل 3 مركبات فلافونويدية و هي : 3,4-dimethoxytoluene ، 3′-methylquercetin و 3-O-[α-L-arabinopyranosyl-(1→2)-L-α-arabinopyranosyl)]-3′-methylquercetin بحيث وجد ان هذه المركبات لها نشاطية مضادة للأكسدة الا ان المركب 3′-methylquercetin يملك اعلى نشاط مضاد للأكسدة مقارنة بالمركبين الاخرين .



التركيب الكيميائي 3,4-dimethoxytoluene



التركيب الكيميائي3′-methylquercetin



التركيب الكيميائي-3′-[3-O-[α-L-arabinopyranosyl-(1→2)-L-α-arabinopyranosyl)]-methylquercetin

الجزء العملي

الفصل الاول

المواد وطرق البحث

1- المادة النباتية المدروسة *Bassia muricata* L

- تم جمع الجزء الهوائي لنبات *B. muricata* L يوم 29 ماي 2015 خلال فترة الازهار ببلدية الطريفاوي (33°25'0"N, 6°55'0"E) (ارتفاعها على مستوى سطح البحر 77m) الواقعة ضمن منطقة وادي سوف، حيث توضع العينات داخل أكياس مع الأخذ بعين الاعتبار عدم تعرض النبات الى أشعة الشمس، ثم توزع على قطعة قماش بيضاء في درجة حرارة الغرفة مع التقليب يوميا.

- بعد عملية التجفيف نقوم بطحن المادة النباتية الجافة بواسطة آلة طحن كهربائي مع غربلة المسحوق مرتين و حفظ هذا الأخير في أكياس بلاستيكية.

2- عملية تحضير المستخلصات

الجدول (02): المحاليل و الأدوات المستعملة

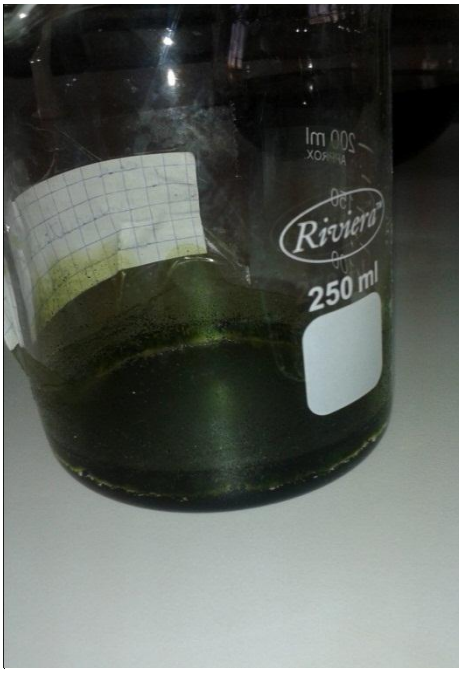
الأدوات	المحاليل	الأجهزة
- حوجلة - بيشر - قمع - أوراق ترشيح - ملعقة مخبرية - قارورات زجاجية - Micropipette	- Ethanol - Acetat d'Ethyl - n- Butanole - Eau distilie	- ميزان حساس - جهاز تسخين - جهاز التبخر الدوراني Rotavapor

2-1- طريقة الاستخلاص

- الاستخلاص بالايثانول

- توضع المادة النباتية المسحوقة بكمية متساوية و التي تقدر بـ 14.6g في كل حوجلة ثم نضيف لها الايثانول الى غاية غمس المادة النباتية كلها و تترك لمدة 24 ساعة.

- بعد 24 ساعة من النقع نقوم بترشيح الخليط باستعمال ورق ترشيح للحصول على مستخلص ايثانولي، ثم يوضع هذا الأخير في حوجلة لجهاز Rotavaporعلى درجة حرارة 45° الى غاية تبخر كمية الايثانول الموجودة في المستخلص، يوضع هذا المزيج في بيشر بدرجة حرارة الغرفة للحصول على مستخلص ايثانولي خام(Markham KR., 1982; Bruneton J., 1999).



المستخلص الإيثانولي الخام

جهاز Rotavapor

3- عملية فصل المركبات

3-1- اذابة المستخلص الايثانولي الخام

تتم اذابة المستخلص الايثانولي الخام بإضافة 200ml من الماء المقطر الساخن يستخدم جهاز التسخين للحصول على مزيج متجانس ثم يرشح من جديد بورق الترشيح، بعد عملية الترشيح نقوم بعملية فصل المركبات باستعمال المحاليل التالية:

*** إضافة Acetat d Ethyl**

إضافة 100ml من Acetat d Ethyl للمستخلص الايثانولي ثم وضعه في Ampoul و رجها لمدة 5 دقائق ثم تثبت على حامل لمدة 10 دقائق، حيث لوحظت طبقتين :

- طبقة عضوية: تحتوي على Acetat d Ethyl و المركبات القابلة للذوبان فيه.
- طبقة مائية: تحتوي على المستخلص الايثانولي المذاب في الماء المقطر.

توضع الطبقة العضوية في حوجلة لجهاز Rotavapor عند درجة حرارة 40° .

*** إضافة n-Butanol**

إضافة 100ml من n-Butanol للمستخلص الايثانولي ثم وضعه في Ampoul و رجها لمدة 5 دقائق ثم تثبت على حامل لمدة 10 دقائق، حيث لوحظت طبقتين:

- طبقة عضوية: تحتوي على n-Butanol و المركبات القابلة للذوبان فيه.

- طبقة مائية: تحتوي على مستخلص ايثانولي المذاب في الماء المقطر.

توضع الطبقة في حوجلة لجهاز Rotavapor عند درجة حرارة 70° ثم تجفف هذه المستخلصات المتحصل عليها عند إضافة هذه المذيبات في درجة حرارة الغرفة الى غاية الحصول على المستخلصات خامة.

بعد اضافة Acetat d'Ethyl

بعد اضافة n-Butanol

وكان مردود الاستخلاص المتحصل عليه لكل مذيب حسب القانون التالي:

$$R= \frac{M_f}{M_1} \times 100$$

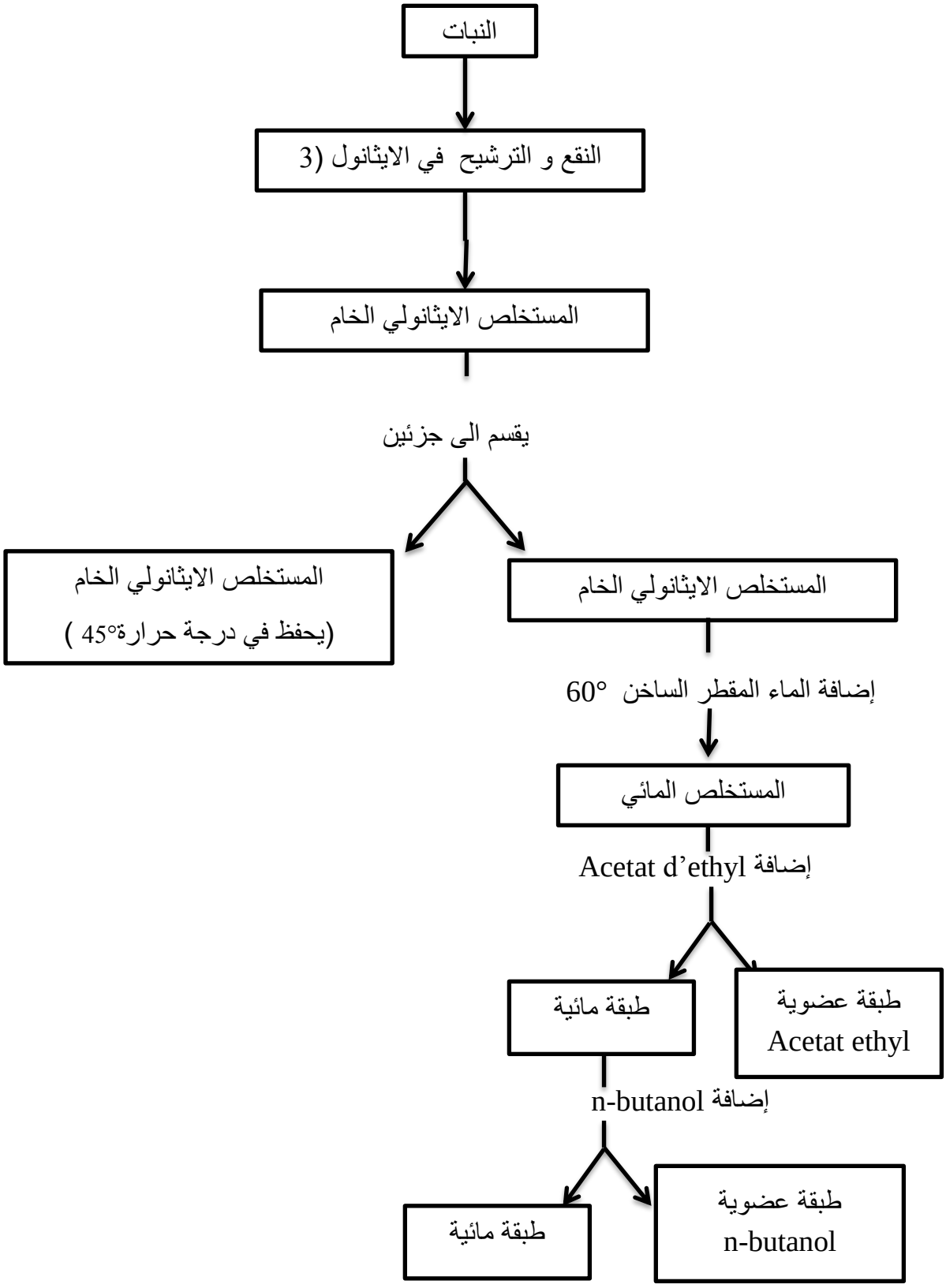
M_f : الكتلة النهائية للمستخلص الخام

M_1 : الكتلة الابتدائية للمادة النباتية الجافة

الجدول (03): المردود (%) لمستخلصات نبتة *B. muricata* L

كتلة المادة النباتية الجافة	المذيبات	كتلة الناتج الخام (g)	المردود (%)
14.6 g	Ethanol	2.1916	15.01
	n-Butanol	0.085	1.18
	Acetat d’ethyle	0.084	0.581

المخطط (02): خطوات عمل تحضير مستخلصات النبات المدروس.



4- التقدير الكمي لعديدات الفينول والفلافونويدات

4 - 1 - تقدير الفينولات الكلية

من خلال التقدير الكمي للمركبات الفينولية استعمالنا المحاليل الكيميائية، الادوات والاجهزة المبينة في الجدول التالي :

الجدول(04): الادوات والمحاليل المستعملة

	المحاليل	الادوات	الاجهزة
التقدير الكمي للفينولات الكلية	Eau distillé Acide gallique Folin-ciocalteur10% Carbonate de soduime 2-7% Ethanol	Balance Les extaits de plante Micropipette Bécher Tube à essais Support de Tube à essais Spatule Les cuves	Spectrophotometre

طريقة العمل

تقدير تركيز عديدات الفينول حسب Singleton et al (1999) باعتماد الطريقة التي تستعمل كاشف Folin-Ciocalteu وتلخص الطريقة فيما يلي:

في أنبوب اختبار نضع 125µl من المستخلص النباتي (Ethanol ,n-butanol Acetat d'Ethyl)، 500µl ماء مقطر، 125µl من Folin-ciocalteur يرج الخليط جيدا وبعد 3 دقائق يتم إضافة 1250µl من كربونات الصوديوم ويرج ثانية. يترك الخليط في الظلام وفي درجة حرارة المخبر لمدة 2 ساعة وتقرا الامتصاصية على طول الموجة 760 nm في جهاز التحليل الطيفي (Slinkard K et al.,1977).

4 - 2- تقدير الفلافونويدات

من خلال التقدير الكمي للفلافونويدات تم استعمال المحاليل الكيميائية، والادوات المبينة في الجدول التالي

الجدول(05): الادوات والمحاليل المستعملة

	المحاليل	الادوات	الاجهزة
التقدير الكمي للفلافونويدات	Methanol Eau distillé Aluminum nitrate 10% Acetat potassum Qurcétine	Balance Les extaits de plante Micropipette Bécher Tube à essais Support de Tube à essais Spatule Les cuve	Spectrophotometre

طريقة العمل

قدرت الفلافونويدات الكلية للمستخلصات النباتية بطريقة $AlCl_3$، في أنبوب اختبار نضع250µl من المستخلص النباتي (Ethanol ,n-butanol , Acetat d'Ethyl)،µl 2250 من Methanol ،µl 100 من Aluminum nitrate يترك الخليط في الظلام وفي درجة حرارة المخبر لمدة 40 دقيقة وتقرا الامتصاصية على طول الموجة 415nm في جهاز التحليل الطيفي

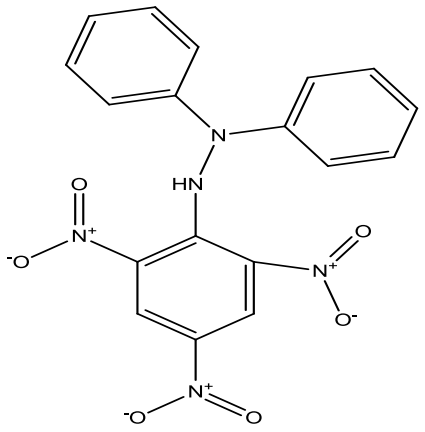
(Markham KR., 1982; Bruneton J., 1999).

5- دراسة الفعالية المضادة للأكسدة باستعمال اختبار جذر DPPH

5-1- مبدأ عمل جذر DPPH

جذر DPPH هو اختصار لـ ثنائي فينيل بكريل هيدرازيل وهو مادة صلبة ذو اللون البنفسجي المسود، يعطي لونا برتقالي مصفر عند استقراره، يبقى هذا الجذر مستقر لعدة أيام وذلك لوجود الحلقات الأروماتية التي تحمل أشكال رنينية متعددة وهذا يعني عدم تمركز الالكترونات بموقع واحد

(Blois MS.,1958 ;Özturk M et al.,2011)



الشكل(10): التركيب الكيميائي للجذر الحرDPPH

5- 2- اختبار تثبيط الجذر الحر DPPH

يعتمد هذا الاختبار على تثبيط الجذور الحرة $DPPH^{\bullet}$ وذلك اعتمادا على قابلية إعطاء المستخلصات لذرة الهيدروجين حيث يمكن تتبع عملية ارجاع $DPPH^{\bullet}$ لونيا باستعمال جهاز الطيف اللوني وذلك بقياس مقدار الانخفاض في الامتصاصية هذا الانخفاض يمكننا من معرفة قدرة المستخلصات من تثبيط الجذور (Dziri S et al., 2012)

5 - 3- تحضير محلول DPPH

تم تحضير محلول DPPH ذو التركيز (0.4 Mmol/ml) و ذلك بإذابة 4 mg من DPPH في ml 100 من ميثانول.

5 - 4 - تحضير التراكيز

لتحضير المستخلص الأصلي تم أخذ 4mg من المستخلصات المدروسة وذلك بإذابته في 2ml من DMSO للحصول على تركيز2mg /ml و انطلاقا من هذا التركيز تم تحضير بقية التراكيز المخففة بإضافة الميثانول بالعلاقة التالية $C_1V_1=C_2V_2$ ، و كانت التراكيز كالتالي:

2mg/ml, 1mg/ml, 0.5mg/ml, 0.25mg/ml, 0.125mg/ml, 0.0625mg/ml

0.03125mg/ml

5 - 5 طريقة العمل

لأجل تحديد نسبة تثبيط الجذر الحر$DPPH^{\bullet}$ نستعمل حمض الأسكوربيك (Vitamine C) باستعمال التراكيز التالية (µg/ml): 400، 200، 100، 50، 25، 12.5، 5.26 وذلك لغرض المقارنة الإيجابية ، في خلية ضوئية سعتها 1ml يتم أخذ من كل تركيز µl 200 ويضاف اليه µl 800 من محلول DPPH ذو التركيز (1mmol) وذلك بمعدل 3 تكرارات من كل تركيز، باستعمال الشاهد المرجعي

(200 µl من DMSO و يضاف اليه 800 µl من DPPH) وذلك بمعدل3 تكرارات، وتحضن العينات في الظلام لمدة 30 دقيقة، بعد نصف ساعة تم وضع الميثانول في خلية قياس خاصة بجهاز Spectrophtpmetreعلى طول الموجة 517nm ومن ثم ضبط الجهاز على الصفر، ثم تقرأ العينات على نفس طول الموجة.

يتم حساب نسبة تثبيط الجذر الحر$^{\bullet}$DPPH للتراكيز المختلفة للمستخلصات المدروسة وفقا للمعادلة التالية:

$$AA\% = \frac{A_{\circ} - A_i}{A_{\circ}} \times 100$$

A_0 :امتصاصية الشاهد

A_I :امتصاصية العينة المدروسة

5 - 6- تحديد مقدارIC_{50} المثبطة لجذرDPPH

يعرف مقدارIC_{50} على انه تركيز المستخلص اللازم لتثبيط 50% من جذر$^{\bullet}$DPPH والذي يحسب من خلال المعادلة الخطية لمنحنيات تغير نسبة التثبيط (%) بدلالة تراكيز المستخلصات المدروسة (Dziri et al.,2012)(AKtumsek A et al.,2011; Ramesh D et al .,2015) .

6- دراسة الفعالية المضادة للأحياء الدقيقة

- تم استعمال 9 أنواع من البكتيريا في هذه الدراسة وهي:

الرمز	الاسم العلمي
Se	*Serratia marcescen*
Ba	*Bacillus anthracis*
St	*Staphylococcus epidermidis*
Ec	*Esherichia Coli*
Sa	*Salmonella enterica*
En	*Enterococcus faecalis*
Mic	*Micrococcus luteus*
Vi	*Vibrio cholerae*
Ps	*Pseudomonas aerogenosa*

6 -1 عموميات حول الانواع البكتيرية المختبرة

Salmonella enterica

تنتمي الى العائلة Enterobacreriaceae و هي بكتيريا عصوية صغيرة، سالبة الغرام، لاهوائية، تنمو في الاوساط العادية، عموما تسبب هذه البكتيريا التهابات وفي بعض الاحيان مسؤولة على امراض خطيرة مثل حمى التيفويد، كما تسبب ايضا امراض للجهاز الهضمي (Fedreghi M., 2005).

Pseudomonas aerogenos

تنتمي الى العائلة Enterobacreriaceae وهي بكتيريا من نوع سالبة الغرام، تملك سوط او عدة اسواط للحركة عادة ما تكون قطبية، هوائية، تتواجد في التربة والماء وهي عامل ممرض لكل من الانسان، الحيوان والنبات (Singlenton P., 2004) يسبب هذا النوع التهابات في المجاري البولية وايضا على مستوى الجهاز الهضمي (Hidron A et al., 2008) .

Escherichia coli

تنتمي الى العائلة Enterobacreriaceae وهي بكتيريا عصوية، سالبة الغرام، ذات الابعاد من (1-3µm)، معظمها ليست ممرضة ،تتواجد عادة في امعاء الثديات بما في ذلك الانسان، يمكن ان تتسبب في عدة امراض منها : التهابات معوية، التهابات الاعضاء التناسلية وايضا تسبب التهاب السحايا لدى الاطفال حدثي الولاد(Silivia M., 2003 ; Singlenton P., 2004)

Staphylococcus epidermidis

تنتمي الى العائلة Micrococcaceae وهي نوع موجبة الغرام، كروية الشكل قطرها يتراوح بين (0.5 - 2.5 µm)، عديمة الحركة، لاهوائية، تسبب هذه البكتيريا للإنسان التهابات جلدية، تسمم دموي والتهابات قيحية على مستوى الجلد والمخاط اما بالنسبة للحيوانات خاصة الثديات والطيور التهابات على مستوى الجلد (Fedreghi M., 2005).

Bacillus anthracis

وهي بكتيريا نوع موجبة الغرام ذات حجم كبير، يتراوح طولها من (3-5µm) وقطرها (1-2µm) ،حركية ، هوائية أو لاهوائية، تنمو في الاوساط المالحة التي يتراوح فيها تركيز NaCl 0.5 %، درجة الحرارة للنمو (°42-°5) و (PH=4.5-8)، تصيب كل من الانسان و الحيوان مسببة في ذلك اعراض اهمها الاسهال والغثيان (Fedreghi M., 2005).

Enterococcus faecalis

تنتمي الى العائلة Enterobacreriaceae وهي بكتيريا عصوية الشكل، سالبة الغرام، لاهوائية، حركية أو لا حركية، تنمو في الاوساط القاعدية، تتواجد في التربة والماء، متواجدة على شكل طفيليات وفي بعض الاحيان تكون ممرضة أو متعايشة لدى الانسان والحيوان (Fedreghi M., 2005).

Micrococcus luteus

تنتمي هذه البكتيريا الى العائلة micrococcaceae، وهي بكتيريا ذات الغرام الموجب، نادرا ما تكون متحركة، تتواجد على مستوى البشرة للإنسان والحيوان على حد سواء، قطرها يتراوح بين(0.5µm - 3)،درجة الحرارة المثلى لنموها(°37-°25)، عموما تعتبر بكتيريا غير ضارة بحيث تكون متعايشة أو ملوثة للجلد، الاغشية المخاطية وكذلك البلعوم ومع ذلك فإنها يمكن أن تكون مسببة للأمراض الانتهازية لدى بعض المرضى نقص المناعة (Hajek V., 2004) .

Vibrio cholerae

تنتمي هذه البكتيريا الى العائلة Vibrionaceae، وهي بكتيريا ذات الغرام السالب، عصوية الشكل، تملك سوط قطبي واحد، يتراوح طولها (1.4µm- 2.6) وعرضها (5-8µm)،مخيرة (هوائية أو لاهوائية)، درجة الحرارة المثلى للنمو من (°30-°20)، يسبب هذا النوع من البكتيريا العديد من الامراض منها: التهاب المعدة والامعاء، تسمم الدم، كما تسبب ايضا الاسهال الحاد مع القيء الذي يؤدي الى الجفاف الشديد (Laurence M., 2002).

Serratia marcescen

تنتمي هذه البكتيريا الى العائلة Enterobacteriaceae، وهي بكتيريا سالبة الغرام، حركية تتواجد في الماء والتربة، تتسبب هذه البكتيريا التهاب على مستوى الجلد والمسالك البولية، التهاب السحايا، التهاب بطانة القلب، التهاب العظام و النقي (Francine G., 2006).

6- 2- تحضير اوساط الزرع

اولا تعقم منطقة العمل ثم يتم تحضير 30 طبق بتري ونسكب بها وسط الزرع (Miller Hinton) الذي تم اذابته في جهاز التعقيم (Aut-clave) في درجة حرارة °121، بوجود موقد (Bec Benzéne) في طاولة العمل للحصول على وسط معقم وتترك الاطباق لتبرد وتتجمد.

(Chakraborty M and Mitra A., 2008)

6- 3- تحضير المعلق البكتيري

لتحضير معلق بكتيري نقوم بأخذ مستعمرة من كل سلالة بكتيرية بواسطة ماصة باستور معقمة، ثم توضع في انبوب اختبار يحتوي على ماء فيزيولوجي وترج قليلا حتى نتحصل على معلق متجانس(Phaiphan M., et ai 2014).

5 - 3- زراعة البكتيريا

لزراعة البكتيريا نغمس الماسح القطني المعقم في المعلق البكتيري ثم يتم مسحه على كامل اوساط الزرع المحضرة سابقا في اطباق بتري بشكل خطوط متقاربة مع تكرار العملية 3 مرات مع تدوير الطبق بزاوية °60 في كل مرة (Chakraborty M and Mitra A., 2008).

6- 4- وضع الاقراص

- باستعمال طريقة الانتشار بالأقراص (Phaiphan M., et ai 2014) بعد تحضير أوساط الزرع: يتم تحديد 4 أجزاء في كل طبق بتري حيث خصصت 3 أجزاء للمستخلصات المحضرة ذو التركيز2mg/lm. تم استعمال اقراص محضرة من ورق Wath main معقمة وبواسطة Micropipette نضع في كل قرص تقريبا 20µl من كل المستخلص ، في حين خصص الجزء الرابع للمضادات الحيوية (P ,AMx , MT) أما الجزء الخامس خصص لـ DMSO بحيث يوضع في مركز الطبق لغرض المقارنة .

- يتم وضع علب بتري بشكل مقلوب في الحاضنة تحت درجة حرارة°37 لمدة 24 ساعة .

- بعد انتهاء مدة الحضن نقوم بإخراج علب بتري لقياس الاقطار التثبيطية بـ (mm) للمستخلصات والمضادات الحيوية والشاهد (Chakraborty and Mitra., 2008).

الرمز	الاسم
P	Penicillin 10mcg/disc
AMX	Amoxycillin 25mcg/disc
MT	Metronidazole 5 mcg/disc

الشكل(11): المضاد الحيوي P

الشكل(12): المضاد الحيوي MT

الشكل(13): المضاد الحيوي AMX

الفصل الثاني

تحليل ومناقشة النتائج

تحليل النتائج

ـ تحليل النتائج

1ـ التقدير الكمي لعديدات الفينول

باستخدام طريقة Singleton and Rossi واستعمال المعادلة الخطية للمنحنى القياسي لحمض الغاليك، يعبر عن المحتوى الكمي لعديدات الفينول للمستخلص الـ Acetat ethyl، Ethanol وn-Butanol بالملغ من حمض الغاليك /غ من المادة النباتية الجافة كما هو موضح في الجدول (06):

الجدول (06): كمية عديدات الفينول لمستخلصات نباتL *B.muricata*

مستخلصات نبات *B.muricata* L	مستخلص Acetat d'ethyl	مستخلص Ethanol	مستخلص n-Butanol
كمية عديدات الفينول	18.22 ± 4.44	46.55 ± 1.66	199.80 ± 0.55

من خلال النتائج المدرجة في الجدول (06) فإن :

أظهرت خلاصة n-Butanol أعلى نسبة من عديدات الفينول والتي قدرت بـ 199.80 µg GAE/mg مقارنة بالمستخلصات Ethanol وAcetat ethyl والمقدرة بـ (46.55µg GAE/mg، 18.22 µg GAE/mg) على التوالي.

2ـ التقدير الكمي للفلافونويدات

تم التقدير الكمي للفلافونويدات باستخدام كاشف $AlCl_3$ واستعمال المعادلة الخطية للمنحنى القياسي للكرستين، حيث يتم التعبير عن النتائج بالملغ مكافئ للكرسيتين في الغرام من المادة النباتية الجافة كما هو موضح في الجدول (07) :

الجدول (07):كمية الفلافونويدات لمستخلصات نباتL *B.muricata*

مستخلصات نبات *B.muricata*	مستخلص Acetat d'ethyl	مستخلص Ethanol	مستخلص n-Butanol
كمية الفلافونويدات	13.62 ± 2.94	31.76 ± 0.49	39.21 ± 5.19

من خلال النتائج المدرجة في الجدول (07) فإن :

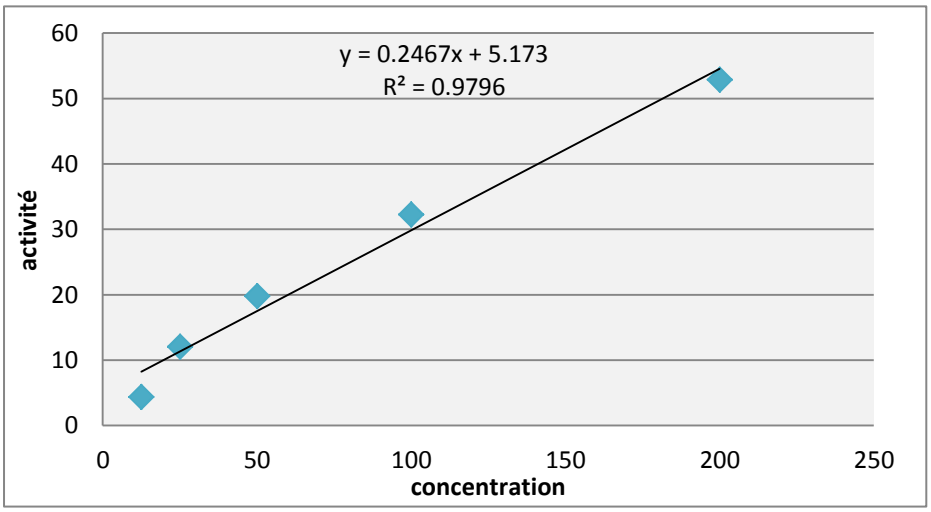
أظهرت خلاصة n-Butanol أعلى نسبة من كمية الفلافونويدات والتي قدرت بـ 39.21 µg QE/mg مقارنة بالمستخلصاتEthanol وAcetat d'ethyl والمقدرة بـ (31.76 µg QE/mg، 13.62µg QE/mg) على التوالي.

3- دراسة النشاطية المضادة للأكسدة باستعمال اختبار الجذر الحر DPPH

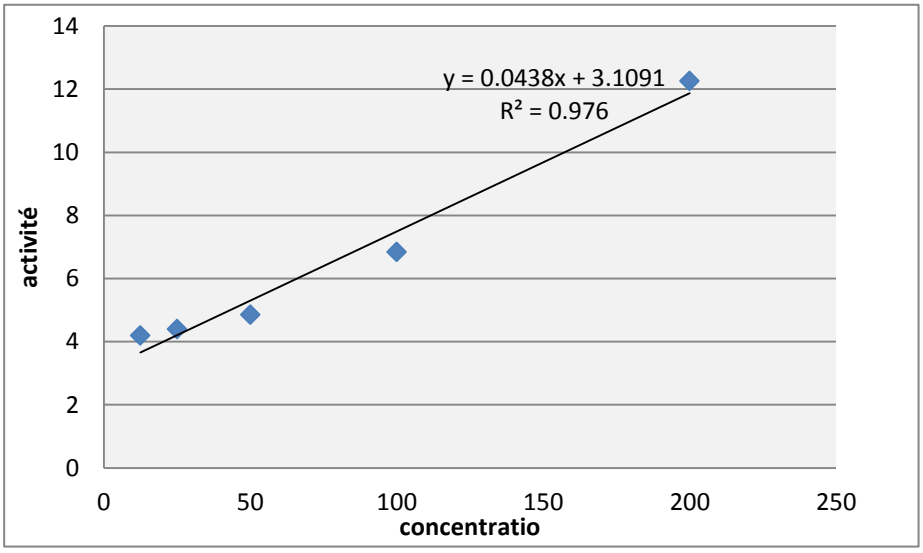
لتحديد نسبة تثبيط مستخلصات نباتL *B.muricata* للجذر الحرDPPH• تم استعمال Acide ascorpique للمقارنة الايجابية، تتم قراءة الامتصاصية وحساب النشاطية المضادة للأكسدة لمختلف التراكيز بالنسبة للمستخلصات المدروسة والموضحة في الجدول (08):

الجدول (08): النشاطية المضادة للأكسدة للمستخلصات المدروسة و Vit C

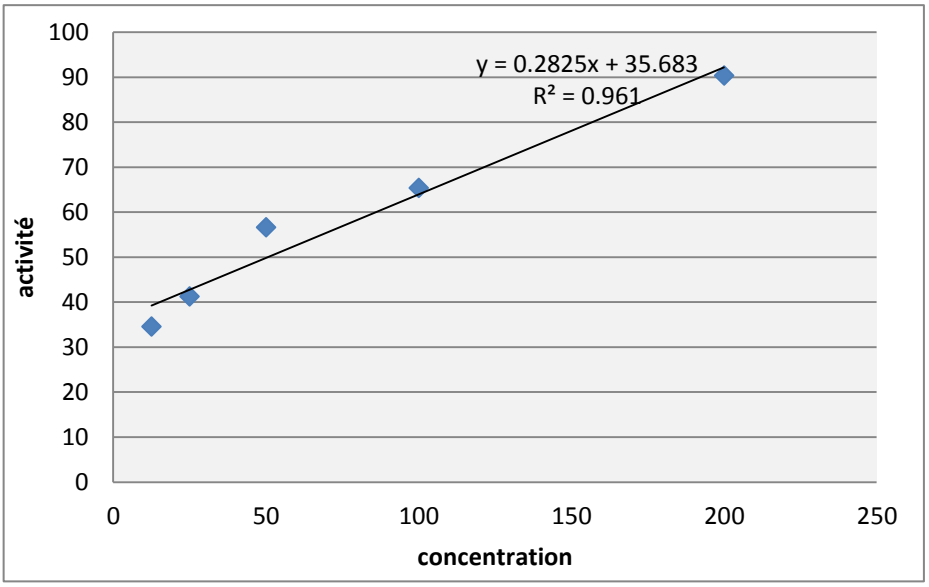
التراكيز µg/ml	AA% Ethanol	AA% n-Butanol	AA% Acetat d'ethyl	Vit C
200	52.86±1.1	90.28±1.15	12.25±0.26	84.6±0.99
100	30.97±2.15	77.36±4.80	5.51±1.98	70.14±0.63
50	19.82±0.94	53.53±12.51	4.85±2.64	47.75±1.10
25	9.87±3.17	41.21±3.83	4.38±1.25	32.82±1.42
12.5	3.08±4.99	4.46±0.24	4.19±2.24	17.89±1.73
IC_{50}	181.79±3.80	50.57±3.56	975.14±61.53	62.23±0.94



الشكل(14):المنحنى القياسي للنشاطية المضادة للأكسدة لكبح الجذر DPPH لمستخلص Ethanol



الشكل(15):المنحنى القياسي للنشاطية المضادة للأكسدة لكبح الجذر DPPH للمستخلص Acetat d'ethyl



الشكل(16):المنحنى القياسي للنشاطية المضادة للأكسدة لكبح الجذر DPPH للمستخلصn-Butanol

من خلال الجدول السابق رقم (08) يتضح ان اكبر نسبة لكسح الجذر الحر DPPH شوهدت عند التركيز 200 µg/ml للمستخلص n-Butanol حيث بلغت 90.28%، في حين سجل الشاهد المرجعي Vit C نسبة 84.6 % عند نفس التركيز، اما مستخلصات Acetat d'ethyl وEthanol فقد أظهرت قيم اقل بكثير حيث كانت 12.25، 52.86 على التوالي. والجدول (09) يلخص قيم IC_{50} للمستخلصات السابقة والمركب المرجعي.

الجدول (09): قيم IC_{50} للمستخلصات المدروسة و حمض الاسكوربيك

مستخلصات نبات *B.muricata*	مستخلص Acetat ethyl	مستخلص Ethanol	مستخلص n-Butanol	حمض الاسكوربيك
قيمة IC_{50} (µg/ml)	975.14±61.53	181.79±3.80	50.57±3.56	62.24±0.9

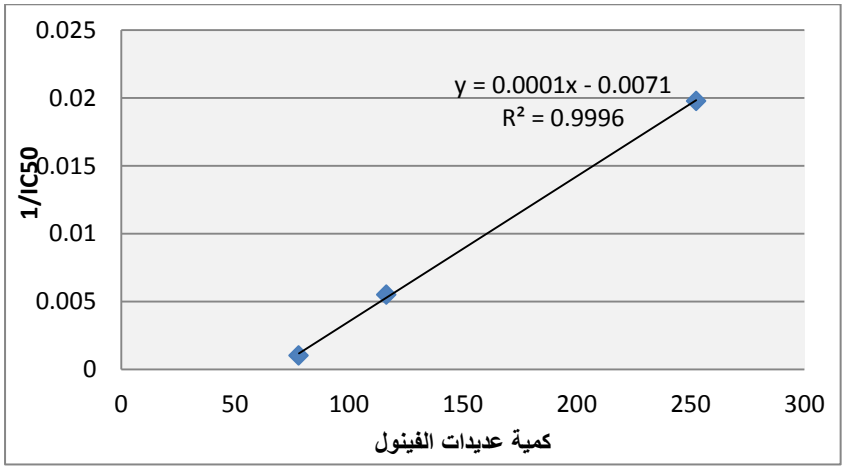
من خلال قيم IC_{50} المثبطة لـ 50% من الجذر الحرDPPH و المدونة في الجدول (09) :

ـ نلاحظ أن المستخلص n-Butanol يملك أكبر قيمة ازاحية للجذر الحر DPPH حيث بلغت 50.57 µg/ml في حين سجلت أقل قيمة ازاحية للجذر الحر DPPH لدى المستخلصين Acetat d'ethyl و Ethanol حيث قدرت بـ 975.14 µg/ml و 181.79 µg/ml على التوالي.

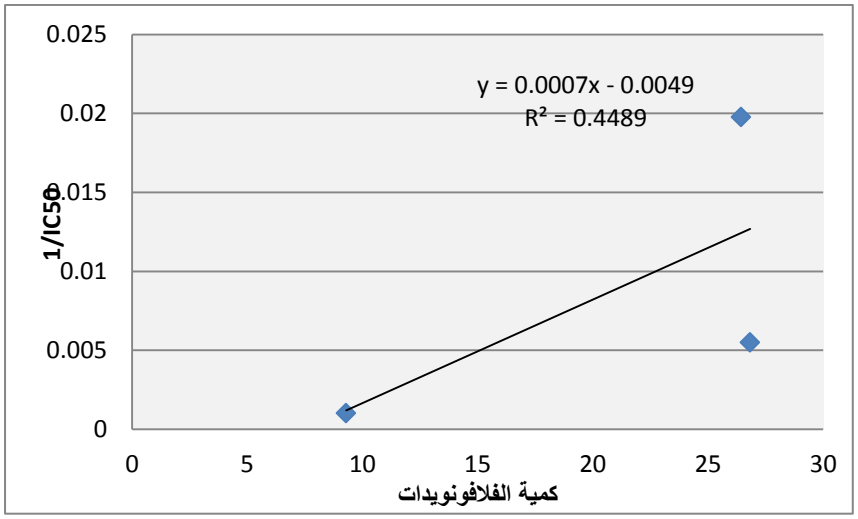
ـ أما بالنسبة لحمض الاسكوربيك الذي أبدى فعالية كبيرة بالنسبة للمستخلصات Acetat d'ethyl و Ethanol حيث قدرت بـ 62.24 µg/ml.

4- دراسة الارتباط الخطي بين عديدات الفينول ـ النشاط المضاد للأكسدة والفلافونويدات ـ النشاط المضاد للأكسدة

تم اجراء 3 تكرارات لكل التجارب و النتائج تم التعبير عليها بالشكل التالي معدل± الانحراف المعياري (Mean±SD). معامل الارتباط الخطي (R^2) بين المحتوى الفينولي و الفلافونويدي من جهة و النشاطية المضادة للأكسدة من جهة أخرى ثم حسابه من المعادلة الخطية ($P<0.05$ عند Person)



الشكل(17): منحنى الارتباط بين عديدات الفينول والنشاط المضاد للأكسدة



الشكل(18):منحنى الارتباط بين الفلافونويدات والنشاط المضاد للأكسدة

من خلال هذا الشكل (17) ارتباط قوي جدا (R^2=0.99) بحيث ان كلما زادت كمية الفينولات زادت قيم IC_{50} .

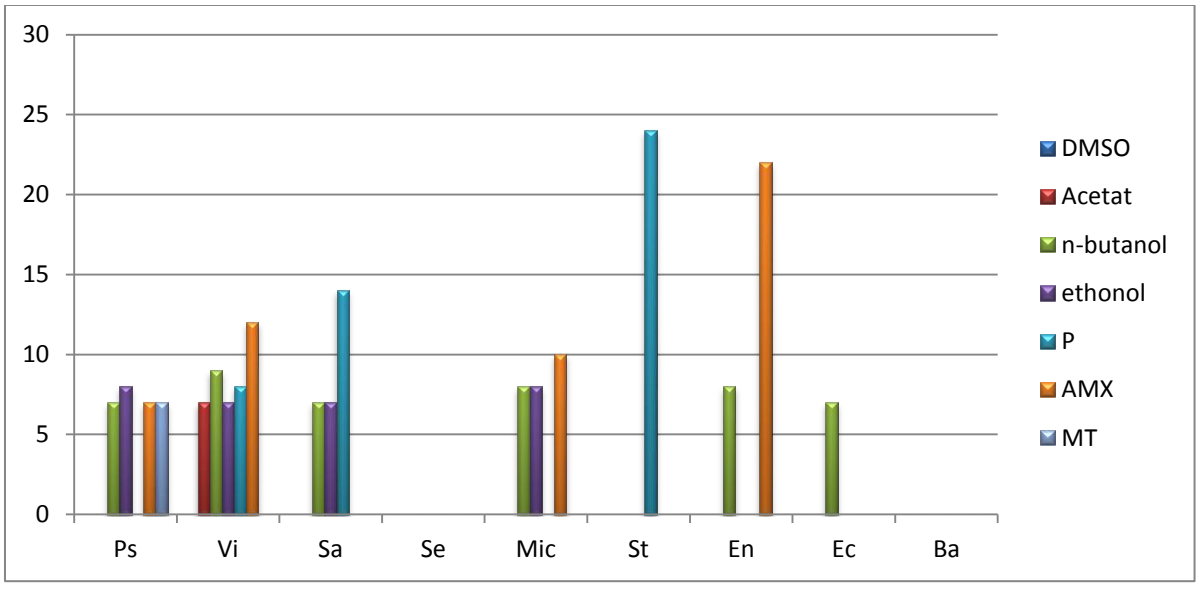
من خلال هذا الشكل (18) ارتباط ضعيف جدا (R^2=0.44) بحيث ان كلما زادت كمية الفلافونويدات زادت قيم IC_{50}

5 ـ دراسة النشاطية المضادة للأحياء الدقيقة

من خلال دراسة النشاطية البيولوجية لمستخلصات نبات *B. muricata* L و بعض المضادات الحيوية لبعض الانواع البكتيرية الممرضة تحصلنا على النتائج المدونة في الجدول (10) :

الجدول (10): الاقطار التثبيطية بـ (mm) للسلالات البكتيرية

	DMSO	Acetat	n-butanol	ethonol	P	AMX	MT
Ps	0	7.5	7	8	0	7	7
Vi	0	7	9	7	8	12	0
Sa	0	8.25	7	7	14	15.5	0
Se	0	0	0	0	0	0	0
Mic	0	9.5	8	8	0	10	0
St	0	0	0	0	24	0	0
En	0	0	8	0	0	22	0
Ec	0	7.5	7	9.5	0	0	0
Ba	0	0	0	0	0	0	0



الشكل (19): الاقطار التثبيطية للسلالات البكتيرية المختبرة لمستخلصات نبات *B.muricata* L

اظهرت السلالات البكتيرية المختبرة مقاومة شديدة بالنسبة للشاهد (DMSO) حيث لم يتم تسجيل أي أقطار تثبيطية له

السلالة البكتيرية *Pseudomonas aerogenos*

أظهرت هذه السلالة البكتيرية حساسية معتبرة بالنسبة لكل من المستخلصات(Acetat d'ethyl، n-Butanol، Ethanol) حيث سجلت أقطار تثبيطيه على التوالي 7.5mm، 7mm، 8mm ، كما أظهرت أيضا هذه السلالة حساسية معتبرة للمضادات الحيوية (P, AMx, MT) حيث سجل اعلى قطر تثبيطي لهذه المضادات بـ 7mm .

السلالة البكتيرية *Vibrio cholerae*

أظهرت هذه السلالة البكتيرية حساسية معتبرة لدى كل من المستخلصات المدروسة والمضادات الحيوية، حيث سجلت أعلى قطر تثبيطي لدى المضادات الحيوية والذي قدر بـ 12 mm وأقل قطر تثبيطي لدى كل من المستخلصين Acetat d'ethyl وEthanol الذي قدر بـ 7mm .

السلالة البكتيرية *Salmonella enterica*

ـ أظهرت هذه السلالة البكتيرية حساسية معتبرة بالنسبة لكل من المستخلصات المدروسة، حيث سجل اعلى قطر تثبيطي لدى مستخلصAcetat d'ethy والذي تقدر بـ 8.25 mm وأقل قطر تثبيطي لدى كل من المستخلصين(Ethanol، n-Butanol) الذي قدر بـ 7mm ، في حين أبدت المضادات الحيوية حساسية جد شديدة مقارنة مع المستخلصات حيث سجلت اعلى قطر تثبيطي لها بـ 15.5 mm .

السلالة البكتيرية *Serratia marcescen* و *Bacillus anthracis*

أظهرت هذه السلالتين مقاومة شديدة لكل من المستخلصات المدروسة و المضادات الحيوية حيث لم يتم تسجيل أي أقطار تثبيطية .

السلالة *Micrococcus luteus*

أظهرت هذه السلالة مقاومة شديدة بالنسبة للمضادين الحيويين (P, MT) حيث لم يتم تسجيل أي أقطار تثبيطية في حين سجل المضاد الحيوي AMx حساسية معتبرة بقطر تثبيطي 10 mm، اما المستخلصات أظهرت حساسية كبيرة مقارنة بالشاهد، حيث سجل أعلى قطر تثبيطي عند مستخلص Acetat d'ethyl والذي قدر بـ 9.5 mm وأقل قطر تثبيطي عند المستخلصين Ethano، n-Butanol الذي قدر بـ 8 mm

السلالة البكتيرية *Staphylococcus epidermidis*

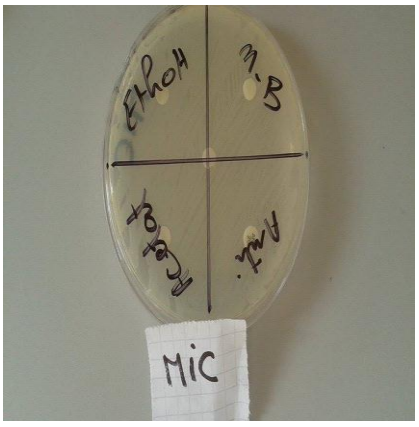
أظهرت هذه السلالة مقاومة شديدة بالنسبة للمستخلصات المدروسة حيث لم يتم تسجيل أي أقطار تثبيطية، أما بالنسبة للمضادات الحيوية أبدت هذه البكتيريا أكبر حساسية حيث بلغ القطر التثبيطي لها 24 mm مقارنة بالسلالات البكتيرية الاخرى .

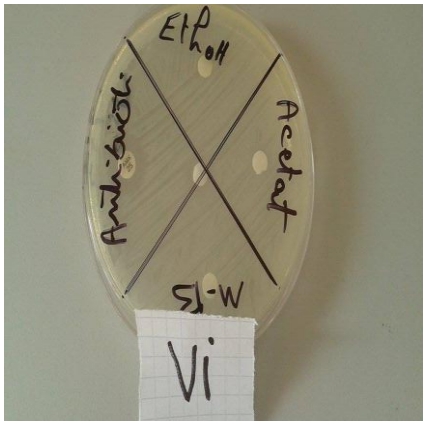
السلالة البكتيرية *Enterococcus faecalis*

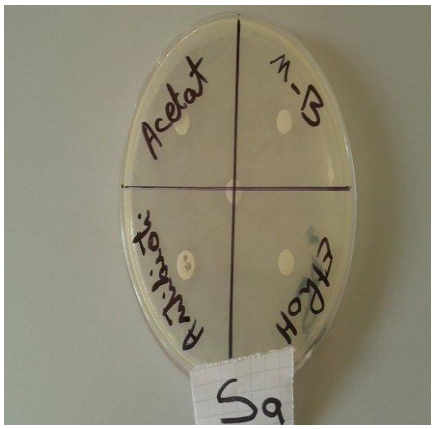
ـ أظهرت هذه السلالة مقاومة شديدة بالنسبة للمستخلصين (Acetat d'ethyl وEthanol) والمضادات الحيوية حيث لم يتم تسجيل أي أقطار تثبيطية ما عدا AMx الذي سجل اعلى قطر تثبيطي 22 mm. وبالنسبة للمستخلص n-Butanol أظهرت حساسية معتبرة بقطر 8mm .

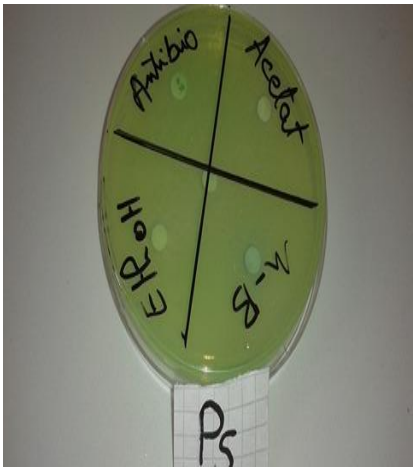
السلالة البكتيرية *Escherichia coli*

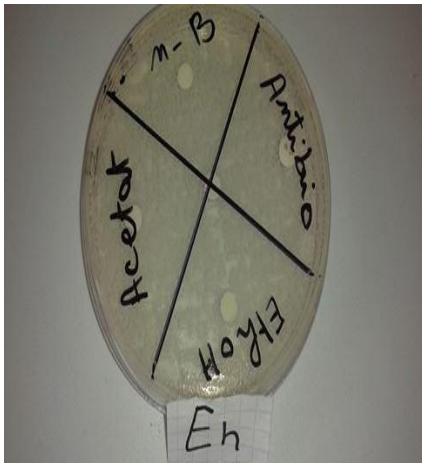
أظهرت هذه السلالة حساسية معتبرة بالنسبة لكل من المستخلصات (n-Butanol، Acetat d'ethyl ، Ethanol) والمضادات الحيوية، التي قدرت أقطارها التثبيطية على التوالي بـ 7mm، 7.5 mm، 9.5 mm، 10 mm

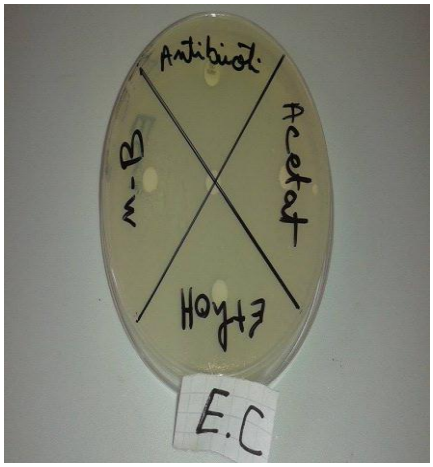


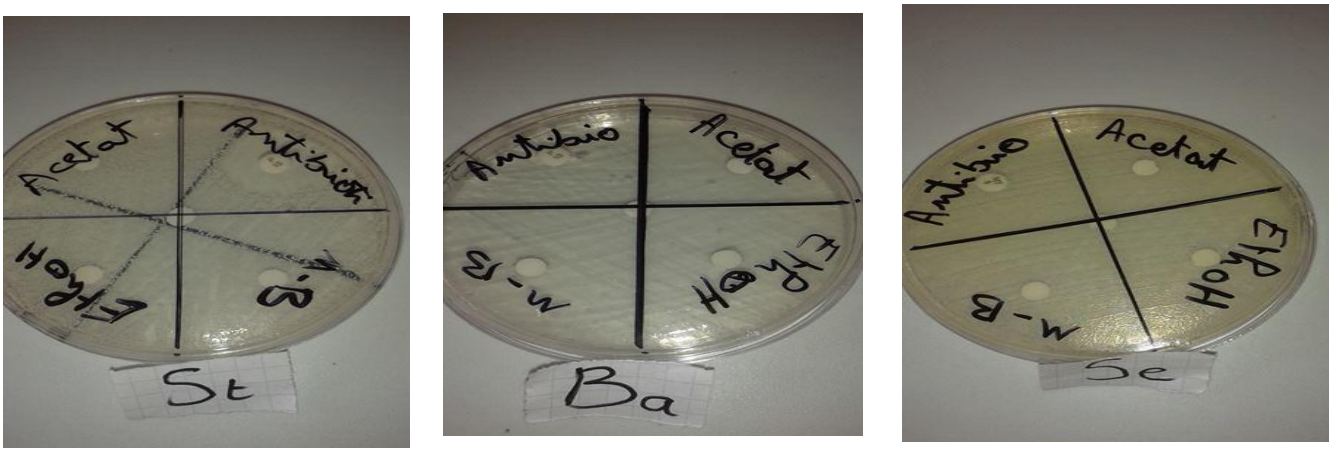












الشكل (20) : تأثير المستخلصات المدروسة لنباتL *B. muricata* على الانواع البكتيرية المختبرة

مناقشة

ـ بينت النتائج المتحصل عليها الخاصة بالاستخلاص ان المذيبات المستعملة للمستخلصين n-Butanol، Acetat d'ethyl تقريبا متساوية من حيث المردود وهذا باستعمال نفس الوزن 14.6g من نبات *B.muricata* L مقارنة بالمستخلص الإيثانولي الذي كان مردوده 15.01%.

ـ تعد الفينولات مركبات نباتية جد هامة بسبب قدرتها الكابحة لاحتواء جزء منها على مجموعة الهيدوركسيل، حيث تساهم هذه المركبات في التأثير المضاد للأكسدة فهي تنتشر بشكل واسع في المنتجات النباتية الثانوية (بوبلوطة ح.،2009)، كما تعتبر قدرة هذه المركبات كمضادات للالتهابات والسرطان (بوديارط .،2008)(Shahidi F et al .,1992) وحدوث الطفرات (Tanaka M et al ,1988.).

ـ تم تطبيق طريقة Singleton and Rossi للتقدير الكمي لعديدات الفينول وذلك باستعمال حمض الغاليك .

ـ بينت النتائج ان مستخلص n-Butanol يحتوي على كمية اكبر من الفينولات المقدرة بـ µg 199.80 GAE/mg ، في حين قدرت المركبات الفينولية للمستخلصين Acetat d'ethyl وEthanol بـ 18.22 µg GAE/mg، 46.55 µg GAE/mg على التوالي، و في دراسة قام بها Bouaziz M et al.,2009 على نباتL *B.muricata* حيث وجد ان كمية الفينولات للمستخلص Acetat d'ethyl اقل من المستخلصات الاخرى .

ـ تعتبر الفلافونويدات واحدة من أهم المركبات الاكثر تنوعا (Sanni C.,1952)، فهي من اهم المركبات الفينولية الطبيعية (Dufresn C., 2001) والتي تملك مجال واسع من الانشطة الكيميائية والبيولوجية بما في ذلك الخصائص الكانسة للجذور الحرة والمثبطة لنمو البكتيريا (Delgado M.,2008) .

ـ بينت العديد من الدراسات فعالية المستخلصات الخام المحتوية على الفلافونويدات تملك القدرة على التفاعل كمادة مضادة للأكسدة ،حيث تقوم بكبح الاكسجين الاحادي ($O_2^{\bullet-}$) ولكن على الرغم من ان الفلافونويدات تتفاعل بسرعة مع الانواع الاكسجينية النشطة فإن تفاعلها حيوي يعتمد على النموذج البيولوجي للخلايا والانسجة (Merghem R.,2004).

ـ تم تطبيق طريقة $AlCl_3$ لتقدير الفلافونويدات باستعمال الكرستين حسب Bahorun وآخرون .،2003

ـ بينت النتائج ان التقدير الكمي للفلافونويدات ان مستخلص n-Butanol يحتوي على كمية اكبر من الفلافونويدات والمقدرة بـ 39.21 µg QE/mg يليها مستخلص Ethanol المقدرة بـ µg QE/mg

31.76، في حين قدرت كمية الفلافونويدات للمستخلص Acetat d'ethyl أقل بكثير من المستخلصين السابقين. وهذا راجع الى ان الـ n-Butanol لديه القدرة الاكبر لإذابة الفلافونويدات المتواجدة في نبات*B.muricata* L .

- تتسبب الجذور الحرة و الانواع الأوكسيجينية النشطة مثل أيون السوبر أكسيد ($O_2^{\bullet-}$)، بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) .الخ في ظهور الاجهاد التأكسدي يؤدي الى عدم التوازن بين مولدات الاكسدة /مضادات الاكسدة مسببا في ذلك تلف الخلايا وتضرر الانسجة(Yuan J and Yankner B., 2000)

ـ ان الهدف الرئيسي من هذه الدراسة المجرات هو التأكد و التحقق من القدرة المضادة للتأكسد لكل من المستخلصات (Ethanol، n-Butanol، Acetat d'ethyl) لنبات*B.muricata* L على الجذور الحرة المسببة للأمراض عن طريق اجراء اختبار خارج الكائن الحي *in vitro* والمتمثلة في اختبار $DPPH^{\bullet}$ وذلك بقياس النشاط المضاد للتأكسد لكل مستخلص على حدى بالمقارنة مع نشاط جزيئات مضادة للأكسدة معروفة بقدرتها التثبيطية لجذر $DPPH^{\bullet}$ مثل حمض الاسكوربيك .

ـ وقد استعملت كثيرا قدرة ازاحة جذر $DPPH^{\bullet}$ في عدة دراسات، وهو عبارة عن جذر حر عضوي جد ثابت لونه بنفسجي غامق الذي يعطي امتصاصية عظمى في المجال الموجيnm 512 - 520 (Mosquera O and al., 2007)، ولتحديد خاصية ازاحة لمستخلص نبات*B.muricata* L من خلال زوال اللون البنفسجي المميز لجذر $DPPH^{\bullet}$ وتحوله الى اللون الاصفر نتيجة ارجاعه الى مركب مستقر . (Brand-Williams W.,1995)

ـ بينت النتائج المتحصل عليها في دراسة النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات المدروسة، وجود علاقة طردية بين محتوى المستخلصات من المركبات الفينولية والفلافونويدية والتأثير الإزاحي على جذر $DPPH^{\bullet}$، فقد أظهر مستخلص n-Butanol الذي يحوي كمية أكبر من عديدات الفينول يملك أعلى تأثير إزاحي لجذرDPPH وهذه النتائج تتوافق مع ما توصل اليه Dudonne وآخرون .،2009 حيث وجد أن 97 % من هذه المستخلصات تملك فعل ازاحي اتجاه جذر $DPPH^{\bullet}$ يتناسب مع محتواها الفينولي. كما تتوافق هذه النتائج مع ما توصل اليه Wu وآخرون 2010 في دراسة التأثير المضاد للأكسدة لمختلف مستخلصات *Gernium sibiricum* حيث وجد ان مستخلص Acetat d'ethyl الاغنى بالفلافونويدات يملك اكبر تأثير ازاحي على جذر $DPPH^{\bullet}$، أما بالنسبة لمستخلصات نبات *B.muricata* L وجدنا ان مستخلصn-Butanol يحتوي على كمية كبيرة من الفلافونويدات و التي تقدر بـ 39.21±5.19 حيث تتناسب طرديا مع التأثير الازاحي اتجاه جذر $DPPH^{\bullet}$، فقد بين العديد من الباحثين ان القدرة الازاحية للمركبات الفلافونويدية والفينولية على جذر $DPPH^{\bullet}$ لها علاقة كبيرة بالبنية الكيميائية، حيث أظهر Zhang وآخرون 2010 في دراسة التأثير الازاحي لـ 31 فلافونويد على جذر

DPPH• أن عدد مجموعات الهيدروكسيل وتموضعها لها دور كبير في التأثير الازاحي، أما بالنسبة للفلافونويدات فإن وجود سكر أو المثيل يرفع من الفعل الازاحي .

ـ تطرق العديد من الباحثين في الآونة الأخيرة إلى دراسة قدرة النباتات الغنية بالمركبات الفينولية على الوقاية من الميكروبات (Chakraborty and Mitra ., 2008) ولهذا الغرض تمت القيام بدراسة لمستخلصات نبات*B.muricata* ضد بعض السلالات البكتيرية المختبرة، حيث بينت نتائج اختبار الانتشار بالاقراص ان الفعل المضاد للبكتيريا للمستخلصات الثلاث على السلالات البكتيرية المختارة لهذه الدراسة كانت متباينة من حيث فعل المستخلص و قدرة السلالة على مقاومة أو وجود حساسية اتجاه المستخلصات. حيث لوحظ ان تأثير المستخلص Ethanol على الاجناس *B. anthracis*، *M.luteus*، *S.epidermidis* والتي تعتبر بكتيريا من نوع موجبة الغرام كانت مختلفة من حيث مساحة قطر التثبيط مقارنة بالسلالة *S. marcescen* التي تعتبر من نوع سالبة الغرام، كما لوحظ ان تأثير المستخلصات على السلالات الباقية والتي تعتبر من نوع سالبة الغرام كانت مختلفة من حيث مساحة القطر التثبيطي، لذا سجلت أدنى قطر تثبيطي 7mm وأكبر قطر تثبيطي 9.5 mm .

ـ و قد وجد ان مستخلص n-Butanol لنباتL *B.muricata* والذي اختبر فيه النشاط المضاد للبكتيريا كان من أكثر المستخلصات نشاطا ضد السلالات الموجبة و السالبة الغرام مقارنة بالمستخلصين (Acetat d'ethyl وEthanol) وهذا راجع لكون المستخلص n-Butanol يحتوي على نسبة عالية من عديدات الفينول والفلافونويدات وهذه المركبات هي التي تعطي النشاط العالي في التثبيط (Ramarethinam S.,2004)

ـ يمكن ان يعود الاختلاف في النشاط المضاد للبكتيريا الى نوعية و كمية المركبات المستخلصة وذلك باختلاف طرق الاستخلاص والمذيبات المستعملة (Ivana K .,2011) .

ـ كما يفسر تأثير النشاطية المضادة للبكتيريا بامتصاص الاغشية الخلوية للبكتيريا للمركبات الفينولية وتفاعلها مع الانزيمات الفعالة والعناصر المعدنية في الجدران الخلوية (Dhaouadi K et al.,2010)

ـ ان الاختلاف في الحساسية بين السلالات البكتيرية الموجبة والسالبة الغرام يعود الى الاختلاف في البنية وتركيبة وطبيعة جدار الخلية البكتيرية (Lambert P .,2012) .

الخلاصة

الخلاصة

ـ ان الاهتمام بمضادات الاكسدة في تزايد مستمر، كما زاد الاهتمام اكثر بمضادات الاكسدة الطبيعية المتواجدة في النباتات وذلك لفعاليتها، توفرها وقلة تأثيراتها الجانبية. يعود التأثير المضاد للأكسدة للمواد الطبيعية النباتية اساسا الى محتواها من عديدات الفينول خاصة الفلافونويدات.

ـ تهدف هذه الدراسة الى النشاطية البيولوجية لمستخلصات نبات *B. muricata* L للتأكد والتحقق من القدرة المضادة للأكسدة للنبات المدروس على الجذور الحرة المسببة للعديد من الامراض.

ـ بعد القيام بعملية استخلاص المواد الفعالة من النبات وذلك باستعمال المذيبات n-Butanol ، Acetat d'ethyl ، Ethanol، تمكنا من خلال ذلك تقدير مردود المستخلصات حيث كانت كمية الكتلة الجافة المتحصل عليها في كل من المستخلصين n-Butanol ، Acetat d'ethyl متفاوتة، في حين كان مردود المستخلص Ethanol معتبر و الذي قدر بـ 15.01% .

ـ تم استعمال اختبار اقتناص الجذر الحر DPPH في دراسة النشاطية المضادة للأكسدة ، حيث اظهر هذا الاختبار ان مستخلصات نبات*B.muricata* L تملك نشاطية بنسب متفاوتة فقد اظهر المستخلص n-Butanol اعلى نشاطية (IC_{50} = 50.57 µg/ml) في حين اظهر المستخلصين Acetat d'ethyl ، Ethanol اقل تاثير ازاحي على جذر DPPH (975.14 µg/ml، 181.79 µg/ml IC_{50}) على التوالي وهذا ما يتناسب مع المحتوى الفلافونويدات المتواجدة بهذه المستخلصات، بحيث اظهر العديد من الباحثين التناسب الطردي بين النشاطية الازاحية للجذور الحرة والمحتوى الفينولي للمستخلصات (Dudonne et al.,2009)

ـ اما بالنسبة لدراسة النشاطية المضادة للأحياء الدقيقة وذلك باستعمال طريقة الانتشار بالأقراص حيث اظهرت النتائج المتحصل عليها ان مستخلص n-Butanol لنبات*B. muricata* L له فعالية بيولوجية معتبرة اتجاه بعض الانواع البكتيرية الموجبة والسالبة الغرام المختبرة وهذا ما يؤدي الى تعزيز الدور العلاجي الذي تبديه مثل هذه المستخلصات التي يمكن ان تشابه الفعل الذي يحدثه المضاد الحيوي .

قائمة

المراجع

المراجع العربية

1- ابن الشيخ ع .، 2008 ـ التأثير الضد الميكروبي و الضد التأكسدي لمادة البروبوليس. مذكرة تخرج لنيل شهادة الماجستير، جامعة فرحات عباس، سطيف، 86 ص .

2- العابد إ.،2009 - دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا والمضادة للأكسدة لمستخلص القلويدات الخام لنبات الضمران *Traganum nudatum*. مذكرة لنيل شهادة الماجستير،جامعة قاصدي مرباح ، ورقلة 106 ص .

3- برحال ج.، 2004 ـ فصل و تحديد منتوجات الايض الثانوي الفلافونيدي لبعض نباتات العائلة الريزيدية. مذكرة لنيل شهادة الدكتوراه، جامعة منتوري قسنطينة، 200 ص .

4- بن ربيعي م.، 2008- دراسات بيوكيميائية على بعض المؤشرات البيولوجية عند مرضى السكري / غير المعتمدين على الانسولين وعلاقتها بالتوزيع الجغرافي في الشرق الجزائري. مذكرة لنيل شهادة الدكتوراه، جامعة منتوري قسنطينة، الجزائر، 217ص .

5- بن سلامة ع .،2011 النشاطات المضادة للأكسدة والمثبطة للإنزيم المؤكسد للكزنثين لمستخلصات أوراق *Hertia cheirifolia* L .مذكرة لنيل شهادة الماجستير، جامعة فرحات عباس ،سطيف، 90 ص

6- بن عاشورة ص.، 2007- الفعالية المضادة للأكسدة الزيوت الطيارة و المركبات الفينولية لـ *Deverra scoparia*، مذكرة لنيل شهادة الماجستير، جامعة ورقلة، ص83.

7- بوبلوطة ح.، 2009- النشاطية المضادة للتأكسد وامكانية وقاية المستخلصين الميثانوليين لنبتتي *Matricaria pubescens* و*Centaurea incan* على السمية الكبدية. مذكرة لنيل شهادة الماجستير، جامعة منتوري، قسنطينة، 194 ص.

8- بوديار ط.، 2008- فصل وتحديد نواتج الايض الثانوي و دراسة الفعالية المضادة للاكسدة لنبتة *Euphorbia gugoniana*. مذكرة لنيل شهادة الماجستير، جامعة منتوري قسنطينة، 128ص .

9- جرموني م.، 2009- النشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات نبتة الخياطة *Teucrium polium*. مذكرة لنيل شهادة الماجستير، جامعة فرحات عباس، سطيف، 95 ص .

10 ـ حليس ي .،2005 ـ الموسوعة النباتية لمنطقة سوف ،ط 1 ، مطبعة الوليد ، ولاية الوادي ، الجزائر ،ص 252 .

11- حوة إ.، 2013- دراسة الفعالية البيولوجية لبعض نباتات العائلة الشفوية و الفعالية ضد الاكسدة. مذكرة لنيل شهادة الماجستير، جامعة منتوري، قسنطينة، 71 ص .

12- رسلان ب.، 2010- الجذور الحرة وأثرها المدمر على خلايا البدن و دور العسل و عكبر النحل كمضادات أكسدة، 12 ـ 37 ص .

13- ريدة أ.، 1999- الجذور الحرة، جملة مضادات المؤكسدات وداء التهاب المفاصل الرثياني. مجلة جامعة دمشق، المجلد(5) العدد(2) .

14- سعاد م.، 2010- دراسة بعض التأثيرات البيولوجية لمستخلص نبات الشاي الاخضر *Camellia sinensis* على النشاط المضاد للأكسدة و النشاط المضاد للبكتيريا. مذكرة لنيل شهادة الماجستير، جامعة منتوري، قسنطينة، 118 ص .

15- صخري ل.، 2010- دروس في الكيمياء الحيوية. ديوان المطبوعات الجامعية، الجزء الثاني،157 -165 ص .

13- عمر ل.، 2010- دراسة بعض الخصائص البيوكيميائية لنبات الشيح *Artemisia herba asso*. مذكرة لنيل شهادة الماجستير، جامعة فرحات عباس، سطيف،90 ص .

16-عمراني أ.، 2013- دور الفيتامين E وC والمستخلص البوتاني لنباتي *Rhantherium suaveolens* و *Chysanthemum fantanesu* في الوقاية من التسمم المحرض بدواء Soduim valproate لدى الفئران الحوامل دراسة *in vivo* و *in vitro*. مذكرة لنيل شهادة الدكتوراه، جامعة منتوري قسنطينة، ص149 .

17- فرحات س.،2013- دراسة مقارنة فعالية المواد المضادة للأكسدة للبروبوليس لمناطق مختلفة في الجزائر حسب الخريطة المناخية بالطرق الكيميائية و الكهروكيميائية. مذكرة لنيل شهادة الماستر اكاديمي، جامعة الوادي، الجزائر،50ص .

18- قندولي ش.، 2009- دراسة تأثير النشاط المضاد للسكري و التأكسدي للألوين Aloin في جرذان مصابة بالسكري المحرض بـ streptozotocin. مذكرة لنيل شهادة الماجستير، جامعة منتوري، قسنطينة، 97 ص .

19- محب طه ص.، بدون سنة- فيسيولوجيا الاجهاد. كلية الزراعة، جامعة المنصورة.

20- مصطفى ب.،2008- دراسة فيتو كيميائية لليبيدات والفينولات في بعض أنواع التمر المحلي. مذكرة لنيل شهادة الماجستير، جامعة قاصدي مرباح، ورقلة، 59 ص .

المراجع الاجنبية

- Abdollahi M et al., 2004- pesticide and oxidative stress, Med sci ,141-147p.

-Aktumsek A, Zengin G, Guler GO, Cakmak YS, Duran A, Food and Chemical Toxicology, 2011, 49(11), 2914-2920.

-Backer L., 2004- new concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology, 461-470p.

-Badourd C., 2006-les lésions des acides nucléiques détection par HPLC.SM/SM dans le milieux biologiques humains et intérêt comme biomarqueurs du stress oxydant et de l'inflammation. Mémoire doctorat, université Joseph-grenoble ,228p.

-Bahorun T., 2003- Substances Naturelles Activities: La flore mouricienne, une source d'approvisionnement potentielle. 1-11.

-Bermond P., 1997- Les vitamine E therapeutic. 8(4), p: 25-202-10.

-Bierl C et al., 2006- The antioxidant hypothesis in: antioxidants cardiovascular disease, p:87-101.

-Bodzek P and Wielkoszynki T., 2003- Evaluation of vitamin C and E concentration. some non-enzymatic indicators of antioxidant protective barrier in pregnant women, p: 508-514 .

-Bossoki I., 2003- Etude des activites biologies de fagara zanthoxy loides lan . Mémoire doctorat ,127p.

-Bouaziz .M.et al .,2009- Polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts of some wild plants collected from the south of Tunisia , African Journal of Biotechnology Vol. 8 (24), pp. 7017-7027.

- Bouzghaia B.,2009- Etude phytochimique de la plant *Bassia muricata* diplôme de magister, université El Haj Lakhdar , BATNA,P :113 .

-Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C., 1995- Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmitel –Wissenschauft und Technologie, 28, p: 25-30.

-Bruneton J., 1999- Pharmacognosie, phytochimie et plantesmédicinales. La Voisier TEC et DOC, Paris. 5ème édition. p.250-270.

C

- Carr A et Feri B., 1999- Toward a new recommande dietary allawanance for vitamin C based on antioxidant and health effects in human the American of clinical nutrition, p: 1086 -1107 .

- Coleman J., 2010- Nitric oxide in immunity and inflammation int,p: 1397-1406

- Chakraborty M and Mitra A.,2008-The antioxidant and antimicrobial properties of the methanolic extract from Cocos nucifera mesocarp. Food Chem; 107: 994–999.

D

-Day B., 2009- Gatalase and glutathione peroxidase mimics, biochem pharmacol 77: 285-296 .

-Delgado M ;Haza A ; Arranz H., 2008-.Dietary polyphenels protect against Nitrosamine Benzopyrene induced DNA damage in human hepatoma cells Eue J Nutr Val 30,pp 328-33.

-Deshpande S et al., 1996- Notional and health aspects of food. food antioxidant marcel dekker INC, p: 361-469.

-Dhaoudi K et al., 2010- Cell viability effects and antioxidant and antimicrobial activities of Tunisian date syrup (Rub El Tamer) polyphenolic extract .J. Agric .food chem .59: 402-406.

-Dringen R., 2000- Metabolism and function of glutathione in brain progress in neurobiology, p: 649-671.

-Dudonne S and al., 2009- Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J Agric Food Chem*. **57**: p 1768-1774.

-Dufresne, C. J.; Farnworth, E. R., 2001- A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *J. Nutr. Biochem.* 2001, *12*, pp 404-421.

-Dziri S et al., 2012- Phenolic constituent, antioxidant and antimicrobial activities of rosy garlic (Allium roseum var. odoratissimum). Journal of Functional Foods.4 P:423-432.

F

-Favier A., 2003- Les stress oxydant :intérêt conceptuel et,expérimental dans la compréhension des mécanisme des maladies et potentiel thérapeutique, Mécanisme biochimique,108-115p.

-Fedreghi M., 2005- Bacteriologie alimentaire. Ed economica, paris, p:276.

-Francine G., 2006- The gens serratia, chapter 3, p :26.

-Freeman B and James D., 1982- Biologie of disease : free radicals an tissu in jury, 47-412p.

-Fukai T et al., 2011- Superoxide dismutase: role in redox signaling vascular function and disease, 1583-1606 p .

- Gutteridge J., 1993- free radicals in disease processes : acomplication of cause and consequence, 141-158p.

-Hajek V and al., 2004- identification staphylococcus specis micrococcus specis and rothia specis, public health england, 3, P :8-32.

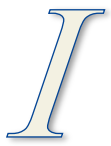
-Halliwell B., 2000- Oxidative stress markers in humaine disease : application to diabetes and to evalution of the effect of antioxidant in antioxidant in diabetes management, 33-52p.

-Hattori I, Nakamura H, Masutai H,. 2003- Thiroedoxin-dependent redox aregulation – implication in aging and neurological diseases. Critical review of oxidative stress and aging. Vol II RG Cutler and H Rodriguez Eds. World Scientific pp 87 – 101 .

-Herbette et al., 2007- Seleno- indespendent gluthione peroxidase, more than simple antioxidant scavenger, p:2163-2180.

-Hidron A et al., 2008- National healthcare safety network team and participating national healthcare safety network facilities. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the national healthcare safety network at the centers for disease control and prevention. Infect control hosp epidemiol.29: 996-1011.

inhibition of hoxa2 and mintains glutathione homeostasis in mouse embryos in culture. Cell



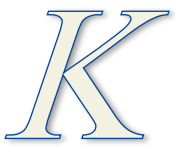
-Ivana K et al., 2011- Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of methanolic extracts of the *Artemisia* sp . recovered by different extraction technique . Biotechnology and bioengineering chinese journal of chemical engineering .19 (3) p:504-511.

-Jacques B et Ander R., 2008- Biochimie métabolique(cours et QCM), Ellipses édition markting S.A, paris,257p.

-Januel C., 2003- stress oxydant au niveau des plaquette sangunes humaines pours le contexte on peroxydas. Mémoire doctorat, universite lyon, p 41-50.

-Janzen E., 1984- Spin trapping, method, enzymol, 188-198p .

-Jenner P et al., 1996- Oxidant stress and the pathogenesis of Parkinson's disease ,161-170p .



-Kamel M., 2001-Acylated flavonoid glycosides from Bassia muricata. Phytochemistry, Egypt, 57, p : 1259 – 1262.

-Kanthikeyan J and Rami P., 2003- Enzymatic and non-enzymatic antioxidant in selected piper species indain, p:135-140.

-Kashihara N et al., 2010- Oxidant stress in diabetic nephropathy, 56-69 P.

-Keita R., 2002- Etude de l'activite antifongique et antioxydant de 14 plante utilisées dans le traitement traditionnel des infection sexuellement transmissible. Mémoire doctorat, Bamako, p 107.

-Kohen R et Nyska A.,2002- oxydative stress phénomène, antioxidants, redox reaction and méthods for théine quantification toxicologic pathology,Vol(30) :620-650 p .

-Koivula M et al., 2011- Metal pollution indirectly increases oxidative stress in great tit nestlings, 370-362p .

-Koshiishi I., 2009- Lipide derived radicals in lipoxygenase reaction seikagalu,81:793-797p .

L

-Lairon D., 2004- Biodisponibilite et effets biologie des antioxydant de nature poly phénolique :association méditterameinne de phytothérapique et plantes médicinales, 1-7p .

-Lambert P., 2002- Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in gram - positive bacteria and mycobacteria . *Jornal of applied microbiology* .92:46-54.

-Laurence M., 2002- Les vibrions pathogènes pour l'homme : le risque associe sur milieu marin en France, direction de l'environnement et de a ménagement littoral, département microbiologie et phycotoxines, France, p :47.

-Lesgrds J et al., 2002- Le stress oxydatif et ses implications myalgies international suppément scientifique (marseille, Françe). vol (2), p: 1631-1641) .

-Li et al., 2010- Role of oxidative stress induced by diesel exhaust particles in airway inflammation, allergy and asthma, 300-305p.

-Lioche V and Fridovich., 2000- Copper and zincontaining superoxide de dismutase canects superoxide reductase and superoxide oxidase ,p:38482-38485.

M

-Magnin P.,1992- Les vitamines presse. universitaire de France, p:73-104.

-Mari M et al., 2010- Redox control of liver function in health and disease,1295-1331p.

-Markham KR., 1982- Technics of flavonoids identification. Academic Press (London); Chap.1 et 2: 1-113

-Martinez et al., 2010- Oxidative stress in cancer associated fibroblast drives tumor. stroma co-evalution : a new parading for un derstanding tumar metabolism, the field effect and genomic instability in cancer cells, 256-276p .

-Mckelvey et al.,1988- mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kindney ,753-760p .

-Meagher E et al., 2002- indices of lipide peroxidation in vivo: strenghs and limitation, 1745-50p.

-Merghem R, Jay N, Burn N, Voirin B., 2004- "Quantitative analysis and HPLC isolation and identification of procyanidins from Vicia faba L". Phytochemistry Analysis 15, pp 95-99.

-Meydain M., 2004- Vitamin emodulation of cardiovascular disease annual new academy of science, p: 271-279.

-Meziti A., 2009- Activite antioxydante des extraits des grains de *Nigella sativa L* etude in vitro et in vivo. Mémoire magister, université El-Haj Lakhdar, Batna,105p.

-Mosquera O and al., 2007-Antioxidant activity of twenty five plants from Colombian biodiversity. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 102:631–634.

N

-Nduk A et al., 2010- Comporative antioxidant phytochemical and proximate analysis of aquesus and methanolic extrat of vemonia amygadalin and talinum triangulane, Pakistan, 259-264p.

-Niviere V and Fontecave M.,1994- biological sources of reduced oxygen species in training in free radical methodologies: protection, domage, rapair, 1-16 p .

O

Öztürk M, Kolak U, Topçu G, Öksüz S, Choudhary MI, *Food Chem.*, **2011**, 126(1), 31-38.

P

-Palvou et al., 2009- in vivo data on the influence of tobacco smoke and UV light on murine skin toxical and health, 25:231-239 .

-Parks D et al.,1988- conversion of xanthine déshydrogénase to oxydase in rat intestine, 768-774 p.

-Pincemail J et al., 1999-Espéces oxygnées activées antioxydants et cancer,vaisseaux cœur poumons. Vol (4) p:6-11.

-Pitrowski W and Marczak J., 2000- cellular sources of oxidant in the lung, 369-385p .

- Phaiphan A, Baharin BS, Tan CP, Abdul Rahman R, Ganesan P, Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2014, 6(4), 655-662

-Portugal-cohen M et al., 2010- Cocaine induces oxidative damage to skin via xanthine oxidase and nitric oxide synthase, 105-112 p.

-Ramarethinam S, Rajalakshmi N., 2004- "Caffeine in tea plants [Camellia sinensis (L) O. Kuntze]: In situ lowering by Bacillus licheniformis (Weigmann) chester". Indian Journal of Experimental Biology 42, pp 575-580.

- Ramesh D, Ramesh D , Prashith Kekuda TR, Onkarappa R, Vinayaka KS , Raghavendra L , Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2015, 7(1), 105-110.

-Redb N et al., 2005- Stress oxidative cérébral: Les astrocytes sont –ils vulnérable aux faible concentration intracellulaire de glantamate ? implication sur la survie neronale, 502-509p.

-Rice-Evans C., Miller N., Bolwell P., Bramley P., Pridham J., 2001- The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22, p: 375-383.

-Ryter S and Tyrrell R., 2000- The theme synthesis and degradation dangles .

-Sanni C,Sauvin H.L., 1952-Les Couleurs des fleurs et des fruits ,Anthocyannes et flavones. Editeurs du museum,Paris ,pp 1952-220.

-Sellal A.,2008- Activite antioxydante et anti-inflamatoire de extraits aqueux et ethanolique du gingembre. Mémoire magister, université Ferhat Abbas, setif, 77p .

-Serrano et Klann., 2004- Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. ageing research reviews. Vol (3), p: 341-443.

- Shahidi F, Janitha P, Wanasundara P, Critical reviews in food science & nutrition, 1992, 32(1), 67-103.

- Shaker K., Al Jubiri S., El-Hady FA., Al-Sehemi A., 2013- *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, p:23231-236.

-Shilina N., 2009- Mechanisms of the antioxidant defense in children. vol (78), p:11-17.

-Silvia M., 2003- Escherichia coli O157:H7 la bacteria que dispar el HACCP en la indu stria de la carne, Enfasis Alimentos.17, P :40-42.

-Singal P et al.,1988- Ferr radical in health and disease, biochem, 121-122p .

-Singleton P., 2004- Bactériologie pour la médicine la biologie et le biotechnologie, Ed dunod, paris, p 542.

-Slinkard k., Singleton VL., 1977- *American Journal of Enology and Viticulture*, , 28(1), 49-55.

-Soares J et al., 1997- Antioxydant activites of some extracts of *Thumus zygis* .469-478p.

-Souley B.,2004- Etude de la phytochimie et des activites biologique de *Combretum glutiosum perr*. Mémoire doctorat, 141p.

-Syrakina O et al., 2008- Oxidant stress mediates inflammation apoptosis in ventilator-induced lung injury. 33-40p.

T

- Tanaka M, Chiu WK, Nagashima Y, Taguchi T, NIPPON SUISAN GAKKAISHI, 1988, 54(8), 1409-1414.

-Therond P., 2006- Dommage creés aux biomolécule (lipide, protienne , AND) par le stress oxydants annales pharmaceutique française 64: p383-389.

-Touyz R., et Schinffrin E., 2004- Reactive species in vascular biology: implication in hyper tenting,7-96p.

-Tseng T et al., 1997- Protective effect of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa L* against oxidative stress in rat primary hepatocytes,1159-1164p .

-Turki Z et al., 2006- important role of oxidative stress biomarkers in nhuntington's disease, 2-6p.

-Turkoglua A et al., 2007- Antioxidant and antimicrobial activites of *Laetiporus sulphureus* (Bull) Murrill. Food chemistry, Vol 101, p: 267 – 273.

V

-Vouldouki S et al., 2004- antioxidant and anti-inflammatory properties of a *Cucumismelo LC* extract rich in super – oxide dismutase activity, 67-75p.

W

-Werz O et al., 2000- Reactive oxygen species released from granulocytes stimulate 5-lipoxygenase activity in a B-lymphocytic cell line biochem, 1263-1269p .

Y

-Yin M and chan K., 2007- Non enzymatic antioxydatif and antiglycative effects of oleanolic acide and ursolic acide, p: 7177-7181.

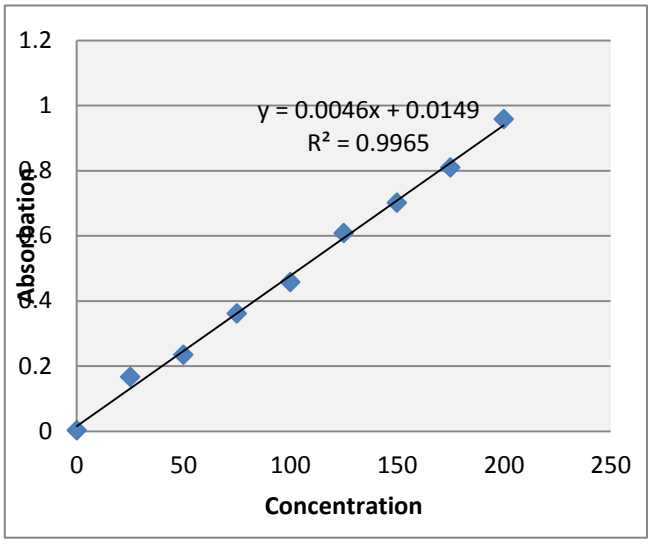
-Yu B.,1994- Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Vol (1), p: 139-162.

-Yuan J and Yankner B., 2000- Apoptosis in the nervous system. Nature. 407 : 802-809.

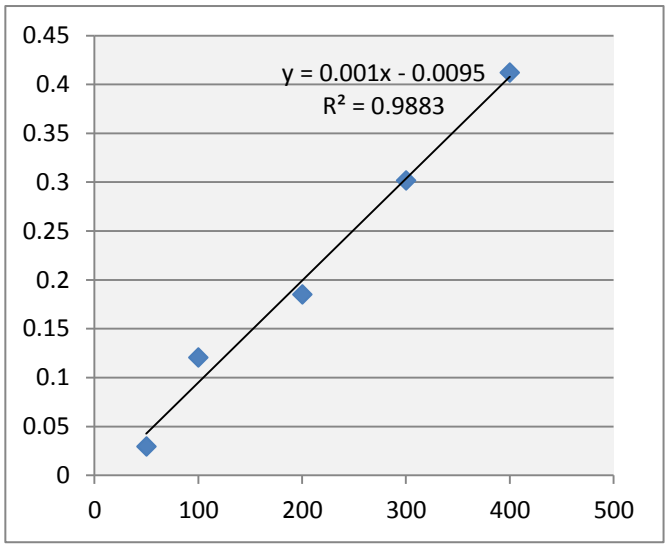
-Yung S., Yao J., Jyh S., 2003- Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leaves Journal of Agricultural Food Chemistry, 5(7), p: 1864–1873.

-Zafrilla et al., 2007- Stress oxydatif dans différente stades de la maladie d'Alzheimer et déclin cognitif. (14) p :131-137 .

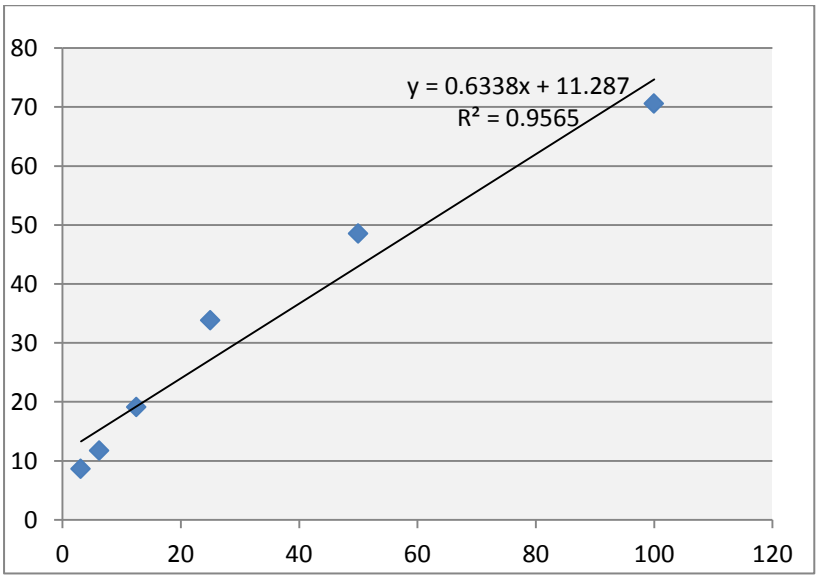
-Zhang B., Wang X., Nazarali A., 2010- Ascorbic acid reverses valproic acid-induced.



الشكل(01):المنحنى القياسي للكرستين

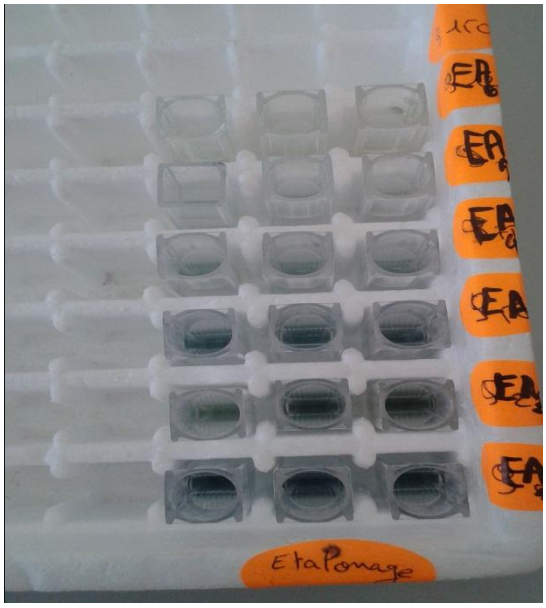


الشكل(02):المنحنى القياسي لحمض الغاليك

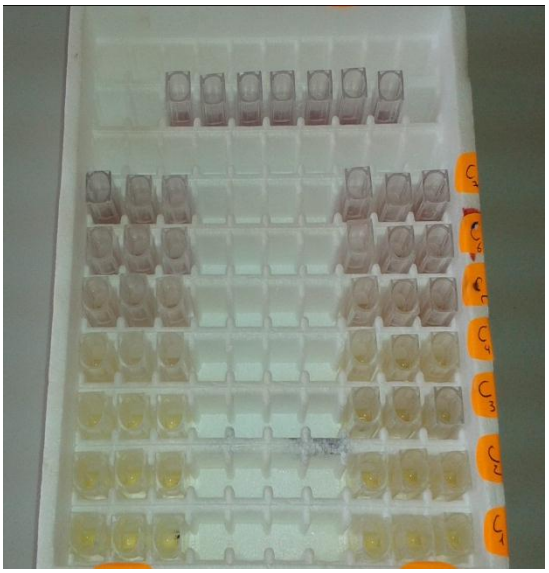


الشكل(03):المنحنى القياسي لحمض الاسكوربيك

جهاز التحليل الطيفي



شاهد متعددات الفينول



المستخلص بعد اضافة DPPH

شاهد الفلافونويدات

الجدول (09): الامتصاصية و النشاطية المضادة للأكسدة للمستخلص Acetat ethyl و Vit C

التراكيز µg/ml	A1	A2	A3	AA1	AA2	AA3	AA %	Vit C	الشاهد
400	0.611	0.6	0.605	19.156	20.709	-	19.98±0.72	87.14±1.14	0.762
200	0.662	0.666	-	12.516	11.987	-	12.25±0.26	84.6±0.99	0.746
100	0.7	0.73	-	7.494	3.530	-	5.51±1.98	70.14±0.63	0.749
50	0.74	0.7	-	2.208	7.494	-	4.85±2.64	47.75±1.10	0.752
25	0.733	0.714	0.765	3.133	5.644	-	4.38±1.25	32.82±1.42	0.724
12 .5	0.742	0.708	0.735	1.944	6.437	-	4.19±2.24	17.89±1.73	0.747
5.26	0.754	0 .708	0.749	0.358	6.437	-	3.39±3.03	10.43±1.98	0.817
IC_{50}	-	-	-	304 .5	304.5	-	975 .14±61.5	62.23±0.94	-

الجدول (08) : الامتصاصية و النشاطية المضادة للأكسدة لمستخلص Ethanol وVit C

التراكيز µg/ml	A1	A2	A3	AA1	AA2	AA3	AA %	Vit C	الشاهد
400	0.44	0.281	0.351	-	62.865	53.615	58.24±4.62	87.14±1.14	0.762
200	0.368	0.354	0.348	51.368	53.218	54.011	52.86±1.10	84.6±0.99	0.746
100	0.542	0.523	0.502	28.374	30.885	33.660	30.97±2.15	70.14±0.63	0.749
50	0.597	0.609	0.614	21.106	19.520	18.859	19.82±0.94	47.75±1.10	0.752
25	0.7	0.698	0.648	7.494	7.759	14.366	9.87±3.17	32.82±1.42	0.724
12 .5	0.763	0.68	0.757	-	10.137	-	3.08±4.99	17.89±1.73	0.747
5.26	0.713	0.741	0.744	-	2.076	1.680	1.87±0.19	10.43±1.89	0.817
IC_{50}	-	-	-	122.3	122.3	122.3	181.79±3.8	62.231±0.94	-

الجدول(10):الامتصاصية و النشاطية المضادة للأكسدة للمستخلص N- Butanol و Vit C

التراكيز µg/ml	A1	A2	A3	AA_1	AA_2	AA_3	AA %	Vit C	الشاهد
400	0.08	0.083	0.086	75.965	75.064	74.163	75.06±0.73	87.14±1.14	0.328
200	0.034	0.036	0.027	89.785	89.184	91.888	90.28±1.15	84.6±0.99	0.341
100	0.057	0.096	0.073	82.875	71.158	78.068	77.36±4.80	70.14±0.63	0.282
50	0.156	0.205	0.103	53.133	38.412	69.055	53.53±12.51	47.75±1.10	0.344
25	0.179	0.21	0.198	46.223	36.909	40.515	41.21±3.83	32.82±1.42	0.335
12 .5	0.317	0.318	0.319	4.763	4.463	4.163	4.46±0.24	17.89±1.73	0.351
5.26	0.318	0 .346	0.467	4.463	-	-	4.46±0	10.43±1.89	0.349
IC 50	-	-	-	43.010	43.010	43.010	50.57±3.6	62.231±0.9	-

الطالبتين:

اللبي الزهرة

دردوري سارة