



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
جامعة قسنطينة I
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم بيولوجيا الحيوان

N° d'ordre 29/DS/2013
N° de série 03/BA/2013



مقدمة لنيل شهادة دكتورا العلوم في بيولوجيا و فسيولوجيا خلية الحيوان

من طرف عمراني أمال

العنوان

دور فيتامين E، C والمستخلص البوتانولي لنباتي *Rhantherium*

Chrysanthemum fontanesii و *suaveolens* في الوقاية من التسمم

المعرض بدواء Sodium Valproate لدى الفئران الحوامل

دراسة *In vitro* و *In vivo*

أعضاء اللجنة

رئيسة	جامعة قسنطينة	أستاذة	أمداح سعاد
مشرفة	جامعة قسنطينة	أستاذة	زعمة جميلة
ممتحن	جامعة قسنطينة	أستاذ	بن عياش سمير
ممتحنة	جامعة سطيف	أستاذة	بوريش حمادة
ممتحن	جامعة باتنة	أستاذ	يحي مولود
ممتحن	جامعة جيجل	أستاذ محاضر	كبيش محمد

2013

تشكرات

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

أتقدم بأسمى عبارات الامتنان و العرفان لأستاذتي الفاضلة المشرفة على هذه الرسالة **زخمة جميلة** أستاذة بجامعة قسنطينة 1 على توجيهاتها القيمة و التشجيع على المواصلة رغم المحن و على توفيرها لي كل الإمكانيات و الوسائل.

كما أتقدم بخالص شكري و تقديري للأستاذ Saverio Bettuzzi و الأستاذة Federica Rizzi بجامعة بارما ايطاليا على كل المساعدات، التوجيهات و النصائح الثرية القيمة و على توفير كل الإمكانيات و الوسائل لإتمام هذا البحث.

أتقدم بكل معاني الشكر و العرفان إلى الأساتذة الكرام:

- الأستاذين الفاضلين **بن محياش سمير و بن محياش فضيلة** أستاذان بمعهد الكيمياء جامعة قسنطينة 1 علي توفيرهما كل الإمكانيات من مواد كيميائية و مستخلصات نباتية و حتى جزينات نقية مستخلصة من النباتات.

- الأستاذة الكريمة **أمجاد سعاد** أستاذة بجامعة قسنطينة 1 التي تفضلت بترؤس لجنة المناقشة و إثراء الأطروحة بنصائحها القيمة و الهادفة و الشاملة.

- الأستاذين الفاضلين **بن محياش سمير** أستاذ بمعهد الكيمياء و الأستاذة **بوريش حمامة** أستاذة بجامعة فرحات عباس سطيف على تكريمهما مناقشة الأطروحة و إثرائها بخبراتهم العلمية و مكتسباتهم الثرية و القيمة.

-الأستاذين الفاضلين **يعني مولود** أستاذ بجامعة باتنة و الأستاذ **كبيش محمد** أستاذ محاضر بجامعة جيجل على قبولهما مناقشة الأطروحة و إثرائها بالمزيد من خبراتهم العلمية و الميدانية.

و أشكر كذلك كل الأصدقاء الذين مدوا لي يد المساعدة من قريب أو من بعيد.



قائمة المختصرات

AST	Aspartate Transaminase (GOT/ Glutamate Oxaloacetate Transminase)
ALT	Alanine Transaminase (GPT/ Glutamate Pyruvate Transminase)
ASA	Acetyl Salicylic Acid
CAT	Catalase
Cf	<i>Chrysanthemum fontanesii</i>
DTNB	5-5'-dithiobis2-nitrobenzoique
DPPH	2, 2-diphenylpicrylhydrazyl
EAC	Ehrlich Ascites Carcinoma
Grx	Glutaredoxine
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione disulfide
HNE	4-hydroxynonenal
HClO	Hypochlorous acid
HOO•	Hydroperoxyl radical
H ₂ O ₂	Hydrogene Peroxide
LOOH	Lipid hydroperoxide
MDA	Malondialdehyde
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MBC	Minimum Bactericidal Concentration
MPT	Mitochondrial Permeability Transition
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NBT	Nitro blue Tetrazolium
NO	Nitric oxide
NOS	NOsynthase
OH•	Hydroxyl Radical
O ₂ ⁻	Superoxide anion radical
ONOO ⁻	Peroxynitrite
PBS	Phosphate Buffer Solution

PC3	Human Prostate Cancer cell
PNT1a	Prostate Normal Tissue immortalized
ROS	Reactive oxygen species
RO [•]	Alkoxy radical
ROO [•]	Peroxy radical
ROOH	Organic peroxide (Organic Hydroperoxyde)
Rs	<i>Rhantherium suaveolens</i>
SOD	Superoxide dismutase
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TBA	Thiobarbituric acid
TBS	Tris-Buffered-Saline
TCA	Trichloroacetic Acid
TCCD	2, 3, 7, 8-TetraChloroDibenzo-p-Dioxin
TNB	Thionitrobenzoique
Trx	Thioredoxine
UI	Unit International
Vit C	Vitamin C
Vit E	Vitamin E
VPA	Valproic Acid
WST-1	Water-Soluble Tetrazolium Salt

الفهرس

1المقدمة
	الفصل الأول الدراسة النظرية
3Valproic Acid –I
31- الخصائص الكيميائية و الصيدلانية لدواء VPA
42- امتصاص و ميتابوليزم دواء VPA
63- التأثيرات الجانبية لدواء VPA
84- دراسة العلاقة بين التوتر التأكسدي و التسمم المحرض بدواء VPA
15II- التوتر التأكسدي
151- الجذور الحرة_
151-1- أنواع الجذور الحرة أو الأشكال النشطة للأكسجين
151-1-1- anion superoxyde O_2^-
161-1-2- فوق اكسيد الهيدروجين H_2O_2
161-1-3- الجذر الهيدروكسيلي OH
161-1-4- الأكسجين المفرد O
171-1-5- جذور الألكوكسيل $RO\cdot$ و البيروكسيل $ROO\cdot$
171-1-6- أكسيد النتروجين $NO\cdot$
171-2- آليات تشكل الجذور الحرة في العضوية
181-2-1- آليات إنزيمية
191-2-2- آليات لانزيمية
191-3- مؤشرات التوتر التأكسدي
191-3-1- على مستوى الليبيدات
201-3-2- على مستوى ADN
201-3-3- على مستوى البروتينات
212- مضادات الأكسدة
221-2- مضادات الأكسدة الإنزيمية

22 (SOD) Superoxide Dismutase-1-1-2
22 Catalase -2-1-2
23(GPx) Glutathion Peroxidase -3-1-2
24Glutathione Reductase_ -4-1-2
24 Glutathion – S – transferase-5-1-2
24 مضادات الأكسدة اللانزيمية 2-2-2
24 الجلوتاثيون 1-2-2
24 مضادات الأكسدة المعدنية 2-2-2
24 فيتامين A 3-2-2
25 فيتامين E 4-2-2
26 فيتامين C 5-2-2
28 الفلافونويدات 6-2-2

الفصل الثاني

32 I-المواد و الطرق المستخدمة
321-المستخلصات النباتية
322-حيوانات التجربة
323- طريقة الحصول على المستخلص البوتانولي
354-تزاوج الحيوانات
355- معاملة الحيوانات
366- تشريح الحيوانات وأخذ العينات
367- طريقة الحصول على المعلق النسيجي
368- طريقة الحصول على السيتوزول
369- المعايرة
361-9. تقدير تركيز MDA
372-9. تقدير تركيز GSH
383-9. تقدير النشاط الانزيمي ل GPx
394-9. تقدير النشاط الانزيمي ل Catalase
395-9. تقدير النشاط الانزيمي ل ALT وAST

406-9. تقدير تركيز الكولسترول.....
407-9. تقدير تركيز الجليسيريدات الثلاثية.....
418-9. تقدير تركيز اليوريا.....
419-9. تقدير تركيز الكرياتينين.....
4110-9. تقدير تركيز الجلوكوز.....
4111-9. تقدير البروتين.....
4210- تشيف وصبغ الأجنة.....
4211- الدراسة النسيجية.....
4312- الدراسة الإحصائية.....

II النتائج.....

441- تأثير المعاملات المختلفة على حصيد التكاثر
441-1- وزن الفئران الحوامل.....
442-1- وزن الحمل.....
453-1- وزن الجنين.....
464-1- وزن المشيمة.....
465-1- التشوهات الجنينية.....
461-5-1- إدمصاص الأجنة.....
482-5-1- التشوهات الخارجية.....
503-5-1- التشوهات الهيكلية.....
552- تأثير المعاملات المختلفة على تركيز MDA.....
551-2- على مستوى أنسجة الفأر.....
562-2- على مستوى أنسجة الجنين والمشيمة.....
563- تأثير المعاملات المختلفة على تركيز GSH.....
574- تأثير المعاملات المختلفة على نشاط إنزيم GPx.....
585- تأثير المعاملات المختلفة على نشاط إنزيم Catalase.....
596- تأثير المعاملات المختلفة على نشاط إنزيمي ALT وAST.....
597- تأثير المعاملات المختلفة على تركيز الجلوكوز.....

60 8- تأثير المعاملات المختلفة على تركيز الكولسترول و الجلسيريدات الثلاثية.....
61 9- تأثير المعاملات المختلفة على تركيز الكرياتينين و اليوريا.....
62 10- الدراسة النسيجية.....
62 10-1- على مستوى الكبد.....
62 10-2- على مستوى الكلى.....
71 III- المناقشة.....
82 الاستنتاج.....

الفصل الثالث الاختبارات خارج العضوية

84 1- المقدمة.....
87 2- الطرق و الوسائل.....
87 1-2- تقدير المركبات الفينولية الكلية.....
87 1-2- تقدير الفلافونويدات الكلية.....
87 1-2- اختبار النشاط القانص لجذر DPPH.....
88 2-3- اختبار النشاط القانص لجذر OH.....
88 2-4- اختبار الأوكسدة الفوقية للبيدات.....
89 2-5- اختبار النشاط المثبت للغشاء Membrane stabilizing activity.....
89 2-5-1- الانحلال الدموي المحرض بالحرارة.....
89 2-5-2- الانحلال الدموي المحرض بالمحلول منخفض التوتر.....
89 2-5-3- الانحلال الدموي المحرض بالماء الأكسجيني.....
90 2-6- دراسة النشاط المضاد للبكتيريا.....
90 2-6-1- السلالات البكتيرية.....
90 2-6-2- تحديد نشاط المستخلص بطريقة الانتشار.....
90 2-6-3- تحديد نشاط المستخلص بطريقة التخفيف.....
91 2-7- دراسة تأثير المستخلصات النباتية على الخلايا السرطانية.....
91 2-7-1- تأثير المستخلصات النباتية على خلايا PNT1a.....
91 2-7-2- دراسة تأثير المستخلصات النباتية على خلايا PC3.....

91 دراسة تأثير المستخلص النباتي على خلايا EAC 2-7-3
92 3- النتائج و المناقشة
92 1-3- المركبات الفينولية و الفلافونويدات الكلية
93 2-3- النشاط القانص لجذر DPPH
96 3-3- النشاط القانص لجذر OH
97 4-3- النشاط المثبط للأكسدة الفوقية للبيدات
98 5-3- النشاط المثبط لانحلال كريات الدم الحمراء
100 6-3- النشاط المضاد للبكتيريا
101 7-3- تأثير المستخلصات النباتية على الخلايا السرطانية
104 استنتاج
105 استنتاج عام
106 المراجع
 الملحق

المقدمة

نتيجة التقدم التكنولوجي في كل المجالات عامة و في علم الصيدلة خاصة تمكن الإنسان من التغلب و القضاء على العديد من الأمراض. غير انه لا يخلو أي دواء من تأثيرات ثانوية و مضاعفات غير مرغوب فيها (Bagheri et al., 2000; Russmann and Lauterburg, 2002). حيث اهتمت الأبحاث الحديثة في ميدان علم السموم و خاصة علم التسمم الجزيئي بفهم و تفسير الآليات التي تؤثر بها تلك المواد الصيدلانية على العضوية وبالضبط على الخلية. من جهة ثانية فان ظهور ما يسمى بالجذور الحرة قد أعاد في الحسبان تفسير ميكانيزم العديد من الأمراض (Valko et al., 2007)، التسمم ب xenobiotic (Kappus and Sies, 1981; Fromenty, 2010; Coquerel and Lemaire-Hurtel, 2012) والآليات الفسيولوجية و الاستقلابية (Bergendi et al., 1999; Kehrer et al., 2010).

فالأدوية عند دخولها إلى الجسم لا يقتصر تأثيرها على الخلايا المصابة أو العضو العليل، بل تؤثر على الأعضاء السليمة و المصابة في أن واحد. و يؤدي هذا التأثير إلى تراكم تلك المواد الصيدلانية وكذلك نواتج استقلابها داخل الجسم مما يسبب اضطرابات في المسارات الاستقلابية (Trush et al., 1982).

حيث يعتبر التسمم بالأدوية من بين الأسباب المؤدية إلى الموت سواء عند الأطفال أو البالغين، و من بين الأدوية التي يؤدي تناولها خلال فترات طويلة و بجرعات عالية إلى حدوث التسمم نجد دواء Valproic Acide (VPA) المضاد للتشنج فبالرغم من فعاليته في علاج الشقيقة و الصرع إلا أنه يظهر أعراض ثانوية وتعقيدات غير مرغوب فيها تشمل عدة أجهزة و أعضاء من بينها الجهاز العصبي، الكبد (Cotarlu and Zaldman, 1988; Stephens and Levy, 1992; Lheureux et al., 2005) الكلى (Raza et al., 1997; Aktas et al., 2010)، الدم و الجنين (Ornoy, 2009).

لقد أجريت العديد من الدراسات المختلفة على نماذج حيوانية متنوعة و كذا المزارع الخلوية والمستنباتات الجنينية داخل *in vivo* و خارج العضوية *in vitro* و ذلك لفهم و تفسير الآليات المسؤولة عن هذه الأعراض و الوقاية منها. غير أن تلك الأخيرة لا يزال يخيم عليها الكثير من الغموض بالرغم من اقتراح الباحثين العديد من الفرضيات أهمها التوتر التأكسدي و ذلك من خلال استنزاف الإنزيمات المضادة للأكسدة (Vidya and Subramanian, 2006) و إنتاج وسائط جذرية (Tong et al, 2003; Na et al., 2003; Tabatabaei and Abott, 1999; Raza et al., 1997) ذات قدرة عالية على الارتباط بالبروتينات و الأحماض النووية مما يعيق وظائفها

(Kawai and Arinze, 2006; Marchion et al., 2005).

و باعتبار الكبد العضو المستهدف من قبل تلك المادة الصيدلانية، إذ يعتبر العضو الذي تحدث فيه جل التحولات الحيوية الخاصة بالأدوية المضادة للصرع، لذا فهو من أكثر الأعضاء تضررا من سمية دواء VPA الناتج عن التوتر التأكسدي و المسبب للموت المبرمج للخلايا (apoptosis) الكبدية، الموت الموضعي للخلايا (necrosis) (Tong et al, 2005)، تشحم كبدي (steatosis) (Natarajan et al., 2006)، Cholestasis، Cirrhosis (Stephens and Levy, 1992) و كذا أضرار على مستوى الأحماض النووية و خاصة DNA (Schulpis et al., 2006).

أما بالنسبة للجنين فيعتبر إنتاج الأشكال النشطة للأوكسجين ميكانيكيا أساسيا لتفسير التسمم الجنيني و التشوهات الجنينية لعدم نضج نظام الدفاع المضاد للأكسدة خلال مراحل التطور الجنيني (Yoshioka et al., 1982; Al-Gubory et al., 2010).

و الجدير بالذكر فان مضادات الأكسدة الغذائية يمكن أن تلعب دورا أساسيا في التخفيف من سمية دواء VPA، حيث بينت أبحاث (Jurina-romet et al., 1996) دور فيتامين E و فيتامين C في الوقاية من التسمم الخلوي المحرض بدواء VPA و الناتج عن تثبيط إنزيم GSH كما بين (Aldeeb et al., 2000) دور فيتامين E في التقليل من التسمم الجنيني المحرض بدواء VPA عند الفئران. تعتبر المركبات الفينولية المستخلصة من النباتات الطبية كالفلافونويدات السبيل الأنجع للتقليل من السمية الدوائية. وهذا ما أثبتته نتائج دراسات حديثة تناولت التأثير الوقائي لمستخلصات النباتات الطبية ضد التسمم المحرض بالأدوية المضادة للصرع. حيث بين (Raza et al., 2006) دور thymoquinone المكون الأساسي للزيت الطيار (volatile oil) لنبات *Nigella species* في الوقاية من التسمم الكبدي المحرض بدواء VPA. كما بين (Hamza and Amin, 2007) دور مستخلص نبات *Apium graraveolens* الحاوي على مادة apigenin بتركيز كبير في الوقاية من تسمم الخصيتين المحرض بدواء VPA عند الجرذان.

و لهذا تهدف هذه الدراسة التجريبية على الفئران الحوامل من سلالة *Swiss albinos* إلى تقييم النشاط البيولوجي للمستخلص البيتانولي لنباتي *Chrysanthemum fontanesii* و *Rhantherium suaveolens* و محاولة الحد أو التخفيف من مظاهر التسمم الناتج من تناول دواء VPA. بمعنى محاولة التعرف على إمكانية إستعمال هذين المستخلصين لوقاية و حماية العضوية من التسمم المحدث من جراء تناول دواء VPA. و بالتالي التأكد من دوره المضاد للتأكسد و مقارنة مدى نجاعته في ذلك بنجاعة فيتامين E و فيتامين C.

Valproic Acid –I

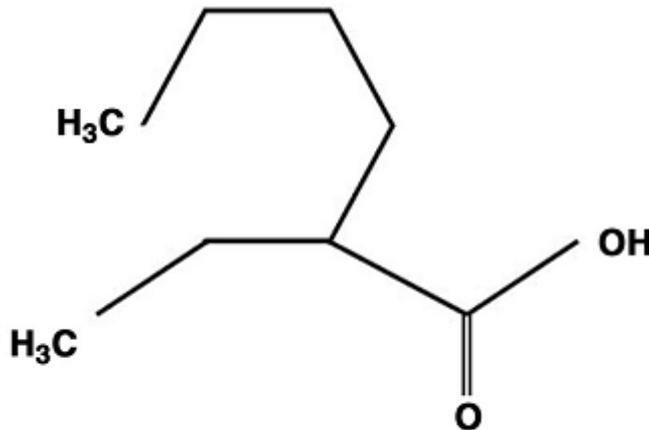
1- الخصائص الكيميائية و الصيدلانية لدواء VPA

دواء Valproic Acid (VPA) هو مركب كيميائي بسيط شبيه بالأحماض الدهنية داخلية المنشأ، يتكون من 8 ذرات كربون اسمه الكيميائي (2-propylvaleric acid, 2-propylpentanoic acid) مشتق من valeric acid المستخلص طبيعياً من نبات *Valeriana officinalis* (صورة 1) يستعمل كمضاد للتشنج و كدواء لاستقرار المزاج وفي علاج الصرع (Chateauvieux et al., 2010).



صورة 1. نبات *Valeriana officinalis* (<http://fr.wikipedia.org>)

اكتشفت القدرة العلاجية لدواء VPA سنة 1962 من طرف Carraz كمادة قابلة للذوبان في المحاليل العضوية و مضادة للصرع (Meunier et al., 1963 ; Thomes and Alixis, 2000). استعمل لعلاج الصرع لأول مرة في فرنسا سنة 1967 و في أمريكا سنة 1978 (Lagace et al., 2004) و يأخذ الصيغة الكيميائية التالية:

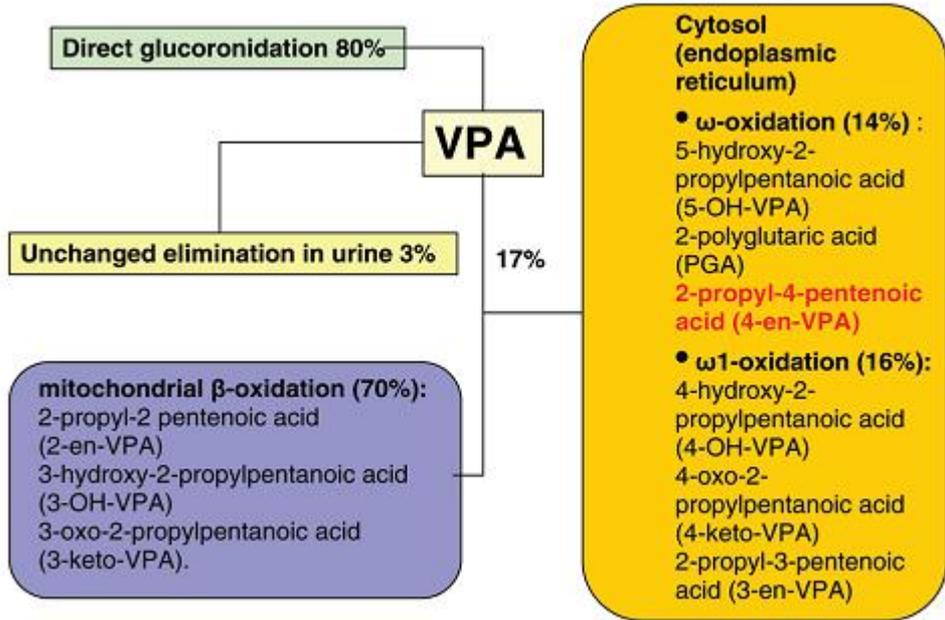


شكل 1. الصيغة الكيميائية لدواء Valproic acid (VPA) (Lheureux et al., 2005)

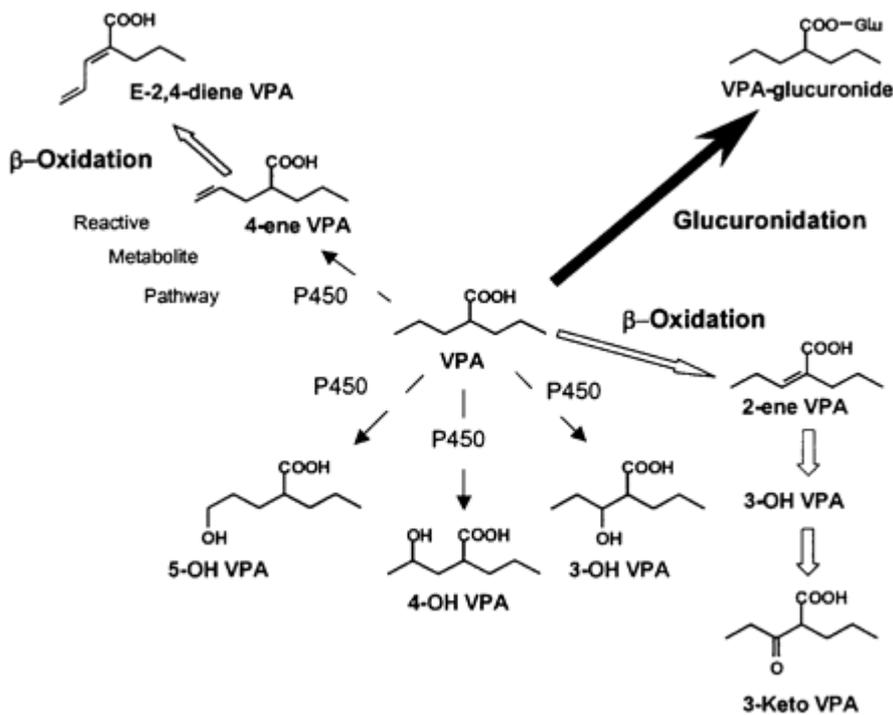
2- امتصاص و ميتابوليزم دواء VPA

يتمتص دواء VPA بشكل كلي وسريع، قمة امتصاص دواء VPA (1-3) ساعات، يتأثر امتصاصه بعدة متغيرات، حيث يؤخر تناوله مع الغذاء عملية الامتصاص إلى 8 ساعات. يتراوح نصف العمر عند الإنسان ما بين 9 و18 ساعة، 0.8 ساعة عند الفئران و2.5 ساعة عند الجرذان. و قد يرجع هذا الاختلاف في نصف العمر إلى الاختلاف في نسبة ترويجه والتي ترجع بدورها إلى نسبة VPA المرتبطة بالبروتينات البلازمية إذ يرتبط ال VPA بالبروتينات بنسبة عالية 70% - 95% عند الإنسان، أما عند الفئران فيرتبط ب 12% فقط (Loscher, 1978). عند ارتفاع التركيز البلازمي ل VPA تنتشعب مواقع الارتباط بالبروتينات و نلاحظ ارتفاع النسبة الحرة للدواء، تترجم هذه الظاهرة ارتفاع نجاعة الدواء وأيضا ارتفاع في تأثيراته غير المرغوب فيها وترتفع نسبة طرحه، تؤثر العديد من العوامل على الارتباط بالبروتينات و ارتفاع الجزء الحر و من أهمها: الحمل، العوز الكلوي (يرفع النسبة الحرة إلى الضعف)، السكري، التقدم في السن (Potter and Ketter, 1993; Mc Evoy, 1997).

يستقلب ال VPA داخل الكبد بنسبة 96% عن طريق β -oxidation و Glucuronidation (شكل 2)، يطرح بنسبة 3-4% في البول في شكله الأصلي دون استقلاب (Silva et al., 2008)، بعض نواتج أيض دواء VPA نشطة و سامة مثل 4-en-VPA و 2,4-en-VPA، تنتج نواتج الأيض السامة عن طريق Cytochrome P450 الذي يؤدي إلى الاضطراب الكبدي. يطرح ال VPA عن طريق الكلى بنسبة 96% في صورة نواتج أيض و كما يطرح عن طريق البراز (Potter and Ketter, 1993 ; Mc Evoy, 1997).



(Lheureux et al., 2005) A



(Chang and Abbott, 2006) B

شكل 2. طرق التحول الحيوي لدواء VPA (A و B)

3- التأثيرات الجانبية لدواء Valproic Acid

3-1- على الكبد

يمكن أن يتسبب تناول دواء VPA في قصور كبدي قاتل (أي يتسبب في نخر أو تشحم كبدي و إتلاف الخلايا الكبدية) كما تظهر زيادة مؤقتة في الإنزيمات الكبدية خلال الأشهر القليلة الأولى من تناول الدوائي بنسبة (20 - 40) % (Cotarlu and Zaldman, 1988; Stephens and Levy, 1992)

3-2- على الجهاز العصبي المركزي

* الإصابة بالنعاس بنسبة 1,4 % (Schmitt et al., 2009)

* ارتعاش اليدين بنسبة 10 %

* عدم القدرة على التحكم في الحركات العضلية الإرادية مع غياب التنسيق فيما بينها (Ataxia)

* التهيج، الأرق، و هي نادرة الحدوث (Davis et al., 1994).

3-3- على الدم

* إمداد وقت تخثر الدم للأسباب التالية: يمنع تجمع الصفائح الدموية، يقلل من الصفائح الدموية (Thrombocytopenia)، يخل بوظيفة الصفائح الدموية (platelet dysfunction) وذلك لأن دواء VPA يشبه في تركيبه الأحماض الدهنية الغشائية و بالتالي يمكنه أن يدخل في تركيب غشاء الصفائح الدموية. و يحرض العوز في العامل XIII و انخفاض في مستوى Fibrinogen.

* فقر الدم (Aplastic anemia) الناتج عن تسمم نقي العظام و المتميز بنقص الخلايا الدموية البيضاء

(Leucopenia)، نقص في الصفائح الدموية، نقص في عدد كريات الدم الحمراء (Handoko et al., 2006)

* نقص في خلايا المكروفاج بنسبة 40 % (Hsu et al., 2009).

3-4- على الجلد

* الإصابة بطفح جلدي

* سقوط الشعر و تغير لونه و تركيبه و الصلع بنسبة (2.6 % إلى 12 %)

(Baba et al., 2003; Korkmazer et al., 2006) و الذي يرجع إلى تحريض دواء VPA انخفاض مستوى

الزنك و نشاط إنزيم biotinidase (Yilmaza et al., 2009).

3-5- على الجنين

نلاحظ ظهور تشوهات خلقية لدى الجنين عند حوالي 7.6% من الحوامل اللواتي يتناولن دواء VPA الذي يعبر المشيمة (Chang et al., 1998) و يتسبب في ما يسمى (Fetal Valproate Syndrome) يتميز هذا الأخير بتشوهات من نوع anencephaly، spina bifida، تشوهات هيكلية، تشوه الوجه و الرقبة، تشوه الأطراف و تأخر في النمو داخل الرحم (Clayton-Smith and Donnai, 1995)، كما يحرض تشوهات

قلبية (Lacaz, 2012) و شق الحنك (Robert and Guibaud, 1982). ويعتبر عامل مشوه لحيوانات التجارب خاصة القوارض إذ يحرض خلل في غلق الأنبوب العصبي عند إعطائه للجرذان في اليوم الثاني عشر من الحمل (Kim et al., 2011). أما عند الفئران فيتسبب في موت و إدمصاص الأجنة، تأخر في نمو الأجنة، تشوهات على مستوى الأنبوب العصبي (spina bifida, exencephaly)، تشوهات هيكلية، فتح العين، palate تشوهات قلبية (Elmazar, 1988; Nau, 1991; Ehlers et al., 1992; Nau, 1994 ; Finnel et al., 1997 ; Aldeeb et al., 2000)

يرجع التأثير المشوه لهذا الدواء إلى تحريضه العوز في الميثيونين، تثبيط ميتابوليزم الفولات، تثبيط إضافة مجاميع الميثيل لـ DNA (Alonso-Aperte et al., 1999; Ubeda martin, 1998) و homocysteine، زيادة مستوى الأحماض الأمينية الكبريتية وردع نظام GSH في دم الأم (Hishida and Nau, 1998)، كما يحرض أيضا التوتر التأكسدي حيث أن مخ الجنين أكثر الأعضاء تأثرا (Ornoy, 2009). بين Menegola et al., 1996 بأن الفئران الحوامل أكثر حساسية للتسمم بـ VPA مقارنة بالجرذان الحوامل ويظهر هذا من خلال نسبة التشوهات الجنينية الملاحظة خاصة على مستوى الأنبوب العصبي (exencephaly) حيث لم يلاحظ هذا النوع من التشوهات لدى أجنة الجرذان.

3-6 - على الخصوبة

يحرض دواء VPA تسمم الخصيتين إذ يقلل من وزن الخصيتين و وزن epididymes (Isojarvi et al., 2004; Roste et al., 2003; Nishimura et al., 2000) و يقلل عدد و حيوية الحيوانات المنوية (Hamza and Amin, 2007; Cansu et al., 2011).

3-7 - على البنكرياس

يؤدي تناول دواء VPA إلى تسمم البنكرياس (Neuman et al., 2001) و رفع تركيز الأنسولين (Rauchenzauner et al., 2008)

3-8 - على الوزن

يمكن أن يتسبب استهلاك دواء VPA في زيادة الوزن بنسبة 16 % (Wirrell, 2003; Grosso et al., 2009; Levy et al., 2002; Zaccara and Tramacere, 2011).

4- دراسة العلاقة بين التوتر التأكسدي و التسمم المحرض بدواء VPA

يستعمل دواء Valproic Acid في علاج التشنج و الصرع، وبالرغم من كفاءته في علاج هذه الاضطرابات إلا أنه يتميز بأعراض غير مرغوب فيها كالتسمم الجنيني، تسمم الدم، التسمم الكبدى... الخ. لا تزال الآلية التي من خلالها يحرض دواء VPA التسمم غير واضحة بالرغم من افتراض الباحثين للعديد منها من أهمها إنتاج الأشكال النشطة للأكسجين

(Tabatabaei and Abbott, 1999; Klee et al., 2000; Tong et al., 2003; Schulpis et al., 2006)، حيث أن التعرض للVPA يؤدي إلى ارتفاع نسبة الجذور الحرة الوسيطة و ذلك كنتيجة للتحويل الحيوي لدواء VPA و الخلل في توازن GSH و/أو العوامل المساعدة للأنظمة المضادة للأكسدة. يقترن دواء VPA أولاً مع حمض Glucuronic ويتنافس أيضاً مع الأحماض الدهنية الداخلية على β oxidation داخل المصورات الحيوية و البيروكسيزومات، تهدم نسبة قليلة من VPA عن طريق السيتوكروم P450 مؤدية إلى إنتاج وسائط نشطة. تتدخل العديد من نواتج أيض VPA في التسمم الكبدى المحرض بدواء VPA و من أهمها: VPA 4-ene (Tong et al., 2003) و ناتج أيضه VPA E-2.4-diene عن طريق β oxidation (Kiang et al., 2011; Surendradoss et al., 2012).

بينت إحدى الدراسات أن دواء VPA يحرض نوعين من التسمم الكبدى:

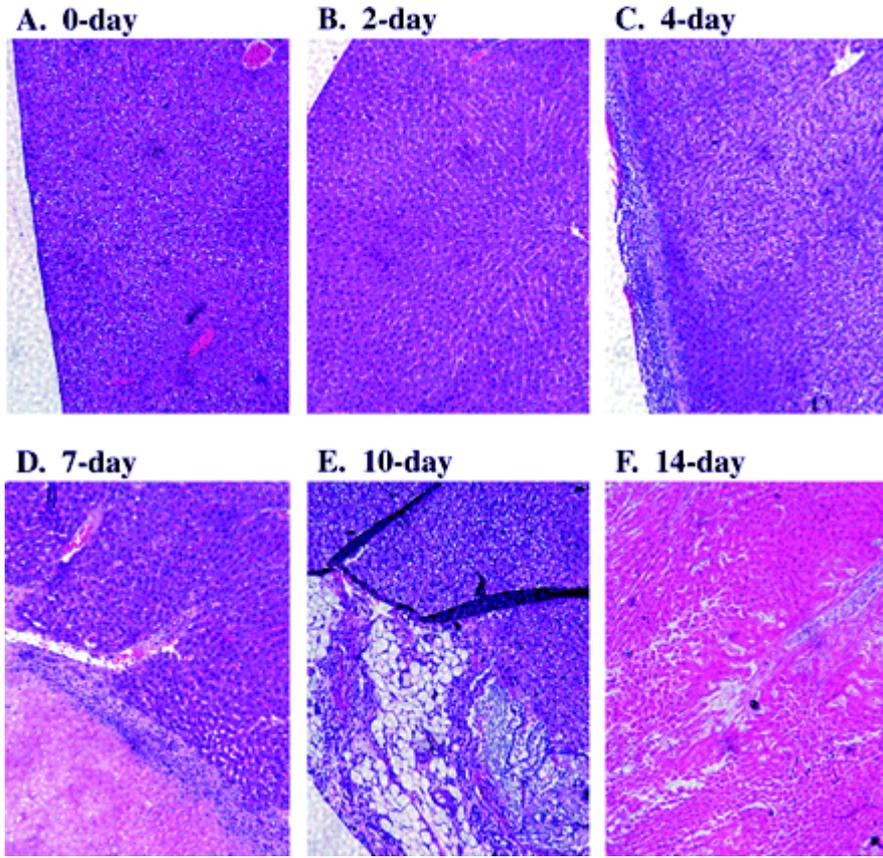
الأول يعتمد على الجرعة المتناولة حيث نلاحظ تغيرات في مستوى إنزيمات الكبد في المصل و انخفاض في مستوى Fibrinogen و albumin البلازميين و التي يمكن تصحيحها بإيقاف تناول الVPA. أما النوع الثاني من التسمم الكبدى الناتج عن تناول VPA فنادر الحدوث لكن غالباً ما يكون قاتل و يتميز بتشمم الكبد (Microvesicular Steatosis) التي يمكن أن تترافق أحياناً بالموت الموضعي للخلايا (Necrosis) (El-Mowafy et al., 2011). يمكن ملاحظة هذان النوعان من التسمم عند الأطفال أقل من سنتين و الذين يتناولون العديد من مضادات الصرع و يعانون من العديد من المشاكل الصحية بالإضافة إلى الصرع الحاد (Tong et al., 2005; Dreifuss et al., 1987).

درس (Natarajan et al., 2006) دور التوتر التأكسدي في بيروكسيزومات و ميكروزومات الكبد كميكانيزم لتشحم الكبد (Microvesicular Steatosis) المحرض عند الجرذان بدواء VPA بجرعة 700 ملغ/كغ وتوصل إلى أن التوتر التأكسدي يلعب دور في التشحم الكبدى الذي تم إثباته عن طريق الدراسة النسيجية و المرافق بخلل في وظيفة و بنية المصورات الحيوية الكبدية، يظهر الخلل في الليبيدات إذ ينخفض كل من Phosphatidyl-choline و Ethanolamine و يرتفع كل من lysophosphatidyl choline و Ethanolamine، تظهر كذلك زيادة في الجليسيريدات الثلاثية، كما لاحظ ارتفاع الأكسدة الفوقية للبيدات داخل البيروكسيزومات و الميكروزومات لدى الجرذان التي تعاني من التشحم. توحى هذه النتائج بأن دواء

VPA يضعف β -oxidation داخل المصورات الحيوية و يحرض التوتر التأكسدي في البيروكسيزوم و الميكروزوم خلال التشحم الكبدي .

وقد تم دراسة تأثير دواء الـ VPA على تركيز 15-F2t-Isoprostane الكبدي و البلازمي من طرف (Tong et al., 2003)، أي قياس أحد مؤشرات التوتر التأكسدي و كذا تأثير السيتوكروم P₄₅₀ الذي يتوسط التحولات الحيوية للـ VPA على مستوى 15 - F2t - Isop عند الجرذان، فلوحظ ارتفاع نسبة 15 - F2t - Isop البلازمي بـ 2.5 مرة عند الجرذان المعاملة بـ VPA بجرعة 500 ملغ/كلغ في زمن أقصاه نصف ساعة. كما لوحظ ارتفاع تركيز 15 - F2t - Isop في البلازما و الكبد بنسبة (3-5) مرات على التوالي في حالة المعاملة الأولية بـ Phénobarbital بتركيز 80 ملغ/كلغ لمدة 4 أيام للجرذان المعاملة بـ VPA. يرافق هذا ارتفاع تركيز دواء VPA و مستوى نواتج أيضه الناتجة عن تدخل السيتوكروم P₄₅₀ في كل من الكبد و البلازما. للإشارة فأن الزيادة الملحوظة في مستوى 15 - F2t - Isop البلازمي في المجموعات المعاملة بـ VPA لا تنخفض عند المعاملة الأولية بـ SKF-525A بتركيز (80 mg/kg) أو بواسطة 1-Aminobenzotriazole بتركيز 100 ملغ/كلغ للذئبان يثبطان ميتابوليزم VPA عن طريق P₄₅₀، من خلال هذه المعطيات يتبين أن دواء VPA يعمل على زيادة نسبة 15 - F2t - Isop على المستوى الكبدي و البلازمي، و هذا التأثير يمكن أن يحفز بـ Phenobarbital بآلية لا يتدخل فيها أولاً تتضمن التحول الحيوي للـ VPA عن طريق P₄₅₀.

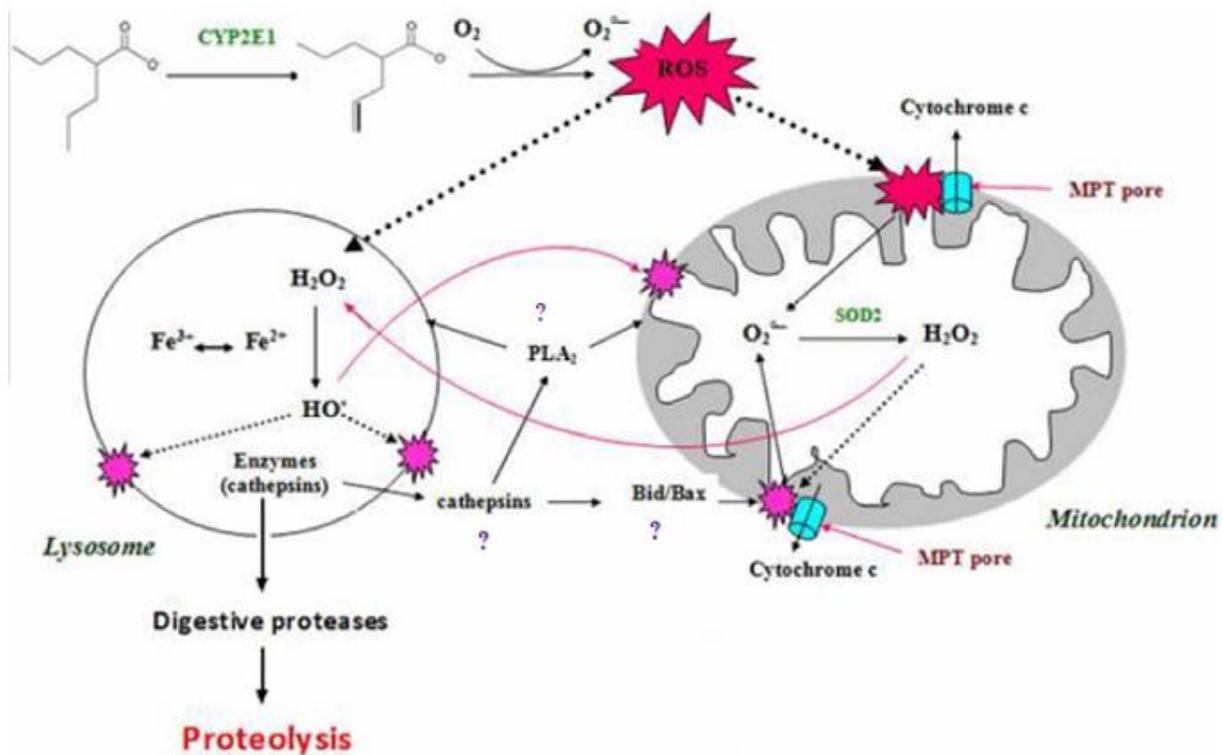
بالإضافة إلى ذلك بين (Tong et al., 2005) أن معاملة الجرذان بدواء الـ VPA بجرعة 500 ملغ/كلغ لمدة يومان، أربعة أيام، سبعة أيام، عشرة أيام و أربعة عشرة يوم تسبب في ارتفاع مؤشرات التوتر التأكسدي المتمثلة في 15 - F2t - Isop، TBARs، lipid hydroperoxides (LPO) و S-glutathione .transferase (GST) حيث لاحظ ارتفاع تركيز كل من 15-F2t-IsoP و GST ابتداء من اليوم الثاني من المعاملة بدواء الـ VPA و ارتفاع تركيز كل من LPO و TBARs في اليوم السابع و الرابع عشر على التوالي. وتوصل إلى أن التوتر التأكسدي يسبق التسمم الكبدي المتمثل في الموت المبرمج للخلايا و التشحم الكبدي الذي تم إثباته عن طريق الدراسة النسيجية (شكل 3) حيث لاحظ التشحم الكبدي والموت المبرمج للخلايا ابتداء من اليوم الرابع بنسبة 25% و 50% على التوالي.



شكل 3. التلف الكبدي المحرض بدواء VPA (500 mg/kg) عن طريق الحقن تحت الصفاق (Tong et al., 2005)

كما بين (Pourahmad et al., 2012) أن معاملة الخلايا الكبدية للجرذان (*in vitro*) بدواء الـ VPA يحرض انحلال الخلايا الكبدية و إنتاج الأشكال النشطة للأكسجين و أقترح على الأقل 3 مصادر داخل خلوية مختلفة تتدخل في إنتاج الأشكال النشطة للأكسجين بواسطة الـ VPA و مسؤولة عن التسمم الناتج و هي تنشيط CYP2E1، سلسلة نقل الإلكترونات على مستوى المصورات الحيوية و تفاعل Haber-Weiss في الليزوزوم. كما بين بأن تسمم الخلايا الكبدية ناتج عن الخلل الوظيفي لغشاء المصورات الحيوية و الذي يمكن تقاديه بمضادات الأكسدة كفيتامين E، مما يدل على أن الخلل على مستوى غشاء المصورات الحيوية حدث كنتيجة لتوليد الأشكال النشطة للأكسجين. يرجع الخلل في غشاء المصورات الحيوية الى فتح ثغور MTP و الانخفاض الحاد في ATP الميتوكوندري، حيث أن أي خلل في إنتاج هذا الأخير يولد حموضة الوسط الداخل خلوي (acidosis) و خلل أسموزي (osmotic injury). يتسبب هذا الأخير في انحلال الغشاء البلازمي. كذلك يمكن لدواء VPA في أن يتسبب في تلف الغشاء الليزوزومات، حيث يرفع من هشاشة غشائها كنتيجة لإنتاج الأشكال النشطة للأكسجين داخل الخلية مثل H_2O_2 الناتج عن نشاط نواتج استقلاب CYP_{450} . يمكن لـ H_2O_2 بسهولة اختراق الغشاء الليزوزومي و يتفاعل مع Fe^{+2}/Fe^{+3} الليزوزومي (Fenton type reaction)، ليشكل جذر الهيدروكسيل الذي يتسبب في عدم استقرار الغشاء الليزوزومي و

تحرير إنزيمات cathepsins (إنزيمات هاضمة محللة للبروتينات)، التي تستهدف مباشرة المصورات الحيوية أو تؤثر بطريقة غير مباشرة عن طريق تنشيط الإنزيمات الحالة phospholipase A2 (PLA2) أو بروتينات Bid أو Bax (Proapoptotic protein) لفتح ثغور MTP و تحرير cytochrome c و الإخلال بوظيفة الغشاء الداخلي للميتوكوندري. يحرض تحرير cytochrome c التوتر التأكسدي عن طريق الرفع من نفاذية H_2O_2 الميتوكوندري الى داخل الليزوزومات و إنتاج الكثير من جذور الهيدروكسيل على مستوى هذا الأخير (شكل 4). كذلك بين Pourahmad et al., 2012 بأن المعاملة بمثبطات الإنزيمات المحللة للبروتينات الليزوزومية leupeptin و popstatin تحمي الخلية الكبدية من التسمم المحرض بدواء VPA و الانحلال البروتيني. نستنتج من خلال هذه الدراسة بأن دواء الـ VPA يتسبب في هشاشة غشاء ليوزومات الخلية الكبدية عن طريق إنتاج الأشكال النشطة للأوكسجين و تحريض الأوكسدة الفوقية للبيدات مما يساهم في موت الخلية.



شكل 4. الآلية المقترحة للتسمم الكبدية المحرض بدواء VPA (Pourahmad et al., 2012)

بينت العديد من الدراسات أن الاستعمال طويل الأمد لمضادات الصرع يرفع من إنتاج الجذور الحرة و يتسبب في التلف التأكسدي على مستوى الخلايا العصبية لذلك فإن العلاج بمضادات الأكسدة التي تعبر من الدم إلى المخ يكون مفيدا (Schulpis et al., 2006).

حيث بين (Chaudhary and Parvez, 2012) في دراسة أجراها (*in vitro*) على مخيخ و خلايا قشرة دماغ الجرذان أن دواء VPA يحرض التسمم العصبي من خلال التوتر التأكسدي حيث يرفع نشاط xanthine oxidase و يخفض نشاط الانزيمات المضادة للأكسدة Glutathione reductase و GPx، GST، و SOD و الكاتالاز.

بالإضافة إلى التسمم الكبدى، تسمم الخلايا العصبية و التسمم الخلوي يحرض دواء VPA سرطان الدم (Leukemia) عن طريق التنشيط المزمن للـ Histone Deacetylase مما يتسبب في ارتخاء بنية الكروماتين، الأمر الذي يرفع قابلية الـ DNA للتلف وحساسية الخلايا للإشعاع (Coyle et al., 2006).

تعتبر مضادات الأكسدة الإنزيمية مثل: Catalase, GSH, SOD و مضادات الأكسدة غير الإنزيمية كالفيتامينات و المعادن النادرة كالسليوم و بعض المركبات الفينولية كالفلافونويدات السبيل الأنجع للتقليل من السمية الدوائية.

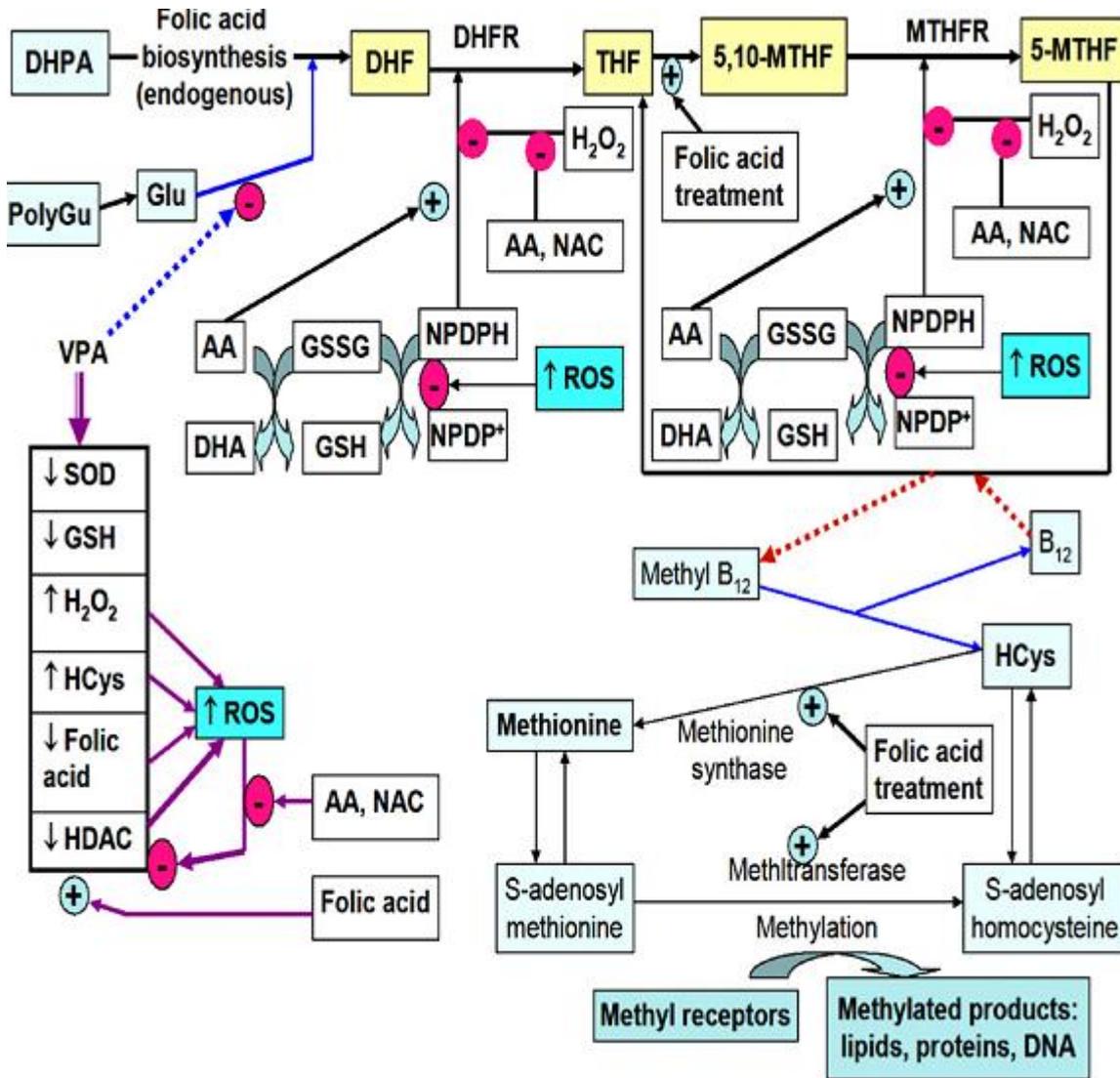
تدعم نتائج أبحاث (Tabatabaei and Abbott, 1999) الفرضيات المقترحة من قبل و التي مفادها أن التسمم الخلوي المحرض *In vitro* بنواتج أيض VPA يحدث كنتيجة لتشكل H_2O_2 داخل الميكروزوم و الذي يمكن أن يعبر الغشاء الخلوي و يتفاعل مع الحديد الداخل خلوي لإنتاج جذور الهيدروكسيل النشطة. كما بين أن إضافة Catalase إلى الوسط يؤدي إلى الوقاية من التسمم الخلوي المحرض بـ VPA، أما إضافة مخلبات الحديد مثل: Deferoxamine الغير نفوذ عبر الغشاء الخلوي فلا يؤثر على التسمم غير أن إضافة Phenanthroline كمخلب و الذي يعبر الغشاء الخلوي بسهولة بتركيز ضعيف، فيظهر حماية كبيرة من التسمم الخلوي المحرض بـ VPA .

بين (Vidya and Subramanian, 2006) أن معاملة الجرذان بدواء VPA بجرعة 300 ملغ/كغ عن طريق الفم لمدة 8 أسابيع يؤدي إلى ارتفاع مستوى الليبيدات (كولسترول، الجليسيريدات الثلاثية، الفوسفوليبيدات و الأحماض الدهنية الحرة) و مستوى TBARs و hydroperoxydes وانخفاض مستوى مضادات الأكسدة الإنزيمية Catalase، GPx، SOD و GSH في كل من الكبد و المخ و أن إعطاء α -ketoglutarate المضاد للأكسدة يقي من التأثير السام لدواء VPA حيث يساهم في أيض الدهون و يثبط إنتاج الجذور الحرة و يمنع التلف الناتج عن الأكسدة الفوقية لليبيدات. و يعتبر α -ketoglutarate كطليعة لـ glutamine الذي يتشكل منه الـ GSH الذي يعتبر أساسا لعمل GPx (Cynober, 1999).

كما بين (Abdel-Wahab and Metwally, 2011) دور مستخلص نبات *Ginkgo biloba* (25 و 50 ملغ/كغ) في الوقاية من التوتر التأكسدي الناتج عن معاملة الفئران بدواء VPA (200ملغ/كغ) حيث يقلل من الأوكسدة الفوقية للبيدات و من تركيز 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine و ترفع من مستوى GSH ونشاط GPx في المخ .

بينت العديد من الدراسات تحريض دواء VPA للتسمم الجنيني و التشوهات الجنينية وتم اقتراح العديد من الآليات من أهمها العوز في حمض الفوليك، ارتفاع تركيز Homocysteine و التوتر التأكسدي. وفي هذا الإطار بين (Hsieh et al., 2012) أن معاملة أجنة الدجاج بدواء VPA بجرعة 30ملي مول يتسبب في ظهور التشوهات الجنينية عند 66.7% من الأجنة و موت 22.2% و يتزامن ذلك مع انخفاض نشاط SOD، مستوى GSH و نشاط histone deacetylase (HDAC) و ارتفاع تركيز Homocysteine و H_2O_2 . كما بين بأن معاملة أجنة الدجاج ب ascorbic acid ، folic acid أو N-acetylcysteine يقي من التسمم و التشوهات الجنينية المحرصة بدواء VPA و تقلل من التوتر التأكسدي (شكل 5).

بالإضافة إلى ما سبق ذكره يحرض دواء VPA تسمم الخصيتين إذ يقلل من وزن الخصيتين و وزن epididymes و يقلل عدد و حيوية الحيوانات المنوية و يتزامن ذلك مع ارتفاع تركيز malondialdehyde و انخفاض نشاط إنزيم SOD و أن المعاملة بمستخلص نبات *Apium graveolens* يقي من التأثيرات السامة لدواء VPA (Hamza and Amin , 2007; Wahba, 2011).



شكل 5. الآليات المقترحة للتسمم الجنيني المحرض بدواء VPA: الدور الوقائي لمضادات الأكسدة folic acid و (N-acetylcysteine ،ascorbic acid) (Hsieh et al., 2012)

II- التوتّر التأكسدي

يعرف التوتّر التأكسدي باختلال التوازن ما بين الأليات التي تؤدي إلى إنتاج الجذور الحرة (prooxidant) والميكانيزمات التي تعمل على التخلص منها أو ما تسمى بمضادات الأكسدة (antioxidant). وقد يرجع ذلك الإختلال إما إلى تنشيط الأليات الأولى أو إلى تثبيط الميكانيزمات الثانية أو الإثنين معا. وتؤدي كل تلك الحالات إلى تراكم الجذور الحرة و التي تتميز بقدرة عالية على إتلاف الأنسجة (Halliwell, 1997).

1- الجذور الحرة

تنتج الجذور الحرة في العضوية باستمرار في المصورات الحيوية، كرات الدم البيضاء، و خلال تدخل ميكانيزمات إزالة السمية إثر التعرض لبعض المواد السامة أو الإشعاع، ونظرا لنشاطها الكبير فهي تهاجم المكونات الخلوية متسببة في أضرار خطيرة يمكن أن تؤدي إلى الموت الخلوي، حيث أن مهاجماتها للفسفوليبيدات الغشائية يخل بنشاط الغشاء الخلوي، كما أن إتلافها للبروتينات يخل بالوظائف الإنزيمية، بالإضافة إلى ذلك للجذور الحرة القدرة على تغيير طبيعة DNA مما يؤثر على بناء البروتينات، و تنبيه الإنقسام غير المراقب للخلايا المميز للسرطان (Dodet, 1991; Valko et al., 2006).

يعرف الجذر الحر على أنه عبارة عن ذرة أو جزيئة حيادية أو مشحونة تحوى في مدارها الخارجي إلكترون غير متزاوج، (Kerkeni, 1998; Valko et al., 2006) وهي مواد غير مستقرة تتفاعل مع جزيئات أكثر ثباتا لتزويج إلكترونها، وذلك باكتساب إلكترون (تتصرف كمؤكسد) أو تتخلى عن إلكترون (تتصرف كمرجع). يؤدي هذا التفاعل إلى تكوين جذور جديدة، وهذا ما يفسر قدرة جذر واحد على إتلاف الخلية (Dodet, 1991).

1-1- أنواع الجذور الحرة أو الأشكال النشطة للأكسجين:

نميز الأشكال النشطة للأكسجين و هي جزيئات صغيرة الحجم لا تحتوى على ذرات الكربون مثل O_2^- ، NO^\cdot ، OH^\cdot ، و المشتقات الأكسجينية للأحماض الدهنية غير المشبعة مثل RO^\cdot و ROO^\cdot إضافة إلى بعض مشتقات الأكسجين غير الجذرية مثل: H_2O_2 ، Singlet oxygen و hypochlorite anion (^-OCl) (Held, 2012).

1-1-1 Superoxide anion O_2^-

عبارة عن جذر أحادي مشحون سلبا، ينتج من الإختزال أحادي التكافوء للأكسجين الجزيئي الذي يكتسب إلكترون أثناء تفاعل يتطلب طاقة.



يحدث هذا التفاعل في وجود إنزيم NADPH oxidase خلال البلعمة أو نشاط cytochrom oxidase الميتوكوندري خلال عملية التنفس الخلوي أو إنزيم xanthine oxidase (Ischemia - reperfusion) أو cytochrom P₄₅₀ الكبدي الذي يتدخل في ميتابوليزم بعض الجزئيات الغريبة، يعتبر أنيون فوق الأكسيد قليل التفاعل، ينتشر بسهولة في الجسم، يتفاعل في وجود SOD مع H⁺ معطياً بيروكسيد الهيدروجين (H₂O₂) و O₂ (Dodet, 1991; Valko et al., 2006; 2007).

2-1-1- بيروكسيد الهيدروجين H₂O₂

يتكون ثانويًا من تفاعل dismutation لأنيون فوق الأكسيد، لا يعتبر جذر حر لكنه كثير التفاعل وله قدرة عالية على الأكسدة، يتحلل في وجود Fe²⁺ حسب تفاعل Fenton، يعطي OH⁻ و الجذر الهيدروكسيلي OH[•] شديد السمية.



ينتج H₂O₂ أيضا من الإختزال المضاعف للأكسجين بفضل عدد كبير من إنزيمات dehydrogenase مثل: Acyl Co A deshydrogenase، NADH deshydrogenase، xanthine oxidase، urinase، mono-amine-oxydase (Clavel et al., 1985).

3-1-1- الجذر الهيدروكسيلي OH[•]

ينتج ابتداءً من H₂O₂ حسب تفاعل Haber-Weiss:



يعتبر الجذر الهيدروكسيلي أكثر تفاعلاً من جذر فوق الأكسيد بألاف المرات، حيث يحرض إنتاج جذور جديدة وذلك بنزع ذرة هيدروجين أو بنقل إلكترونه الفردي (Clavel et al., 1985; Dodet, 1991). يتشكل في الخلية من نشاط xanthine oxidase أو إنزيمات نظام نقل الإلكترونات في الميكروزوم (Clavel et al., 1985; Valko et al., 2006).

4-1-1- الأكسجين المفرد O₁

عبارة عن الشكل المهيج (المنبه) للأكسجين الجزيئي إذ ينتج خاصة عن التنشيط الفوتوكيميائي للأكسجين، بكمية قليلة مقارنة بالجذور السابقة الذكر، يتصرف كجذر حر.

5-1-1- جذور الألكوكسيل RO· و البيروكسيل ROO·

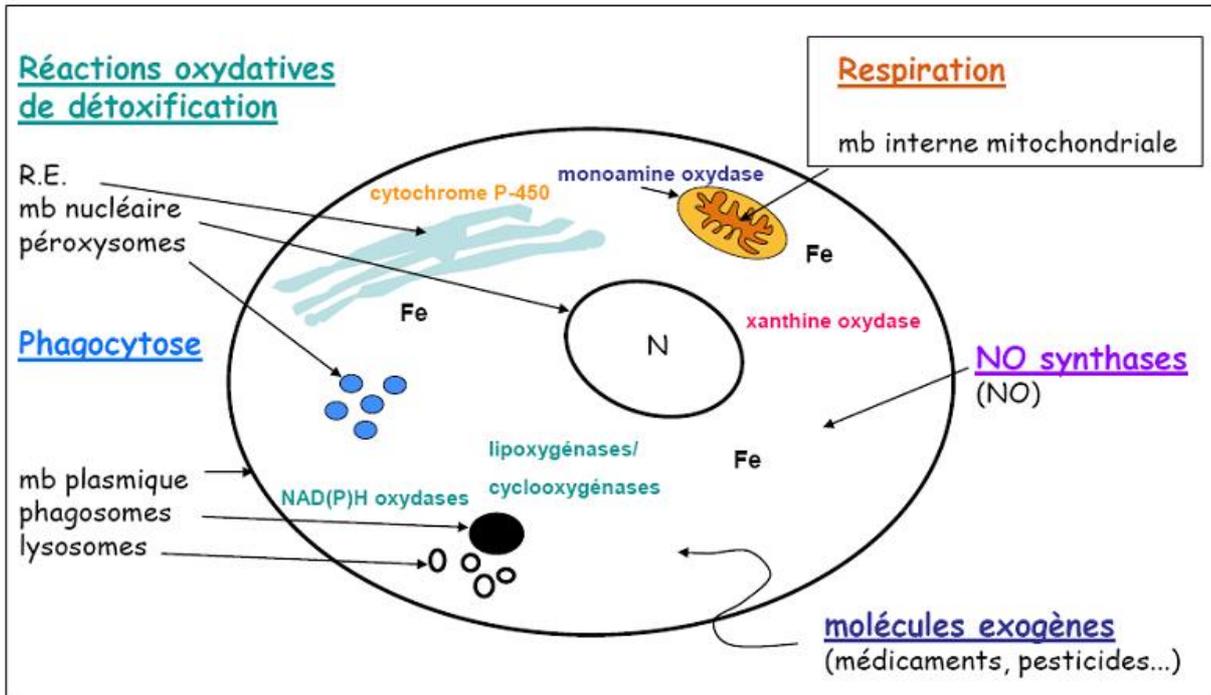
تتشكل من أكسدة الأحماض الدهنية غير المشبعة بواسطة أنيون فوق الأوكسيد، الجذر الهيدروكسيلي و الأوكسجين المفرد (Clavel et al., 1985; Dodet, 1991; Valko et al., 2006).

6-1-1- أكسيد النتروجين NO· (Nitric oxide)

ينتج في الخلايا الطلائية المبطنة للأوعية و العصبونات و البالعات الكبيرة، يشتق من الحمض الأميني arginine في وجود No synthase، و هو عبارة عن غاز يلعب دور فزيولوجي أساسي، لكن تواجده بكثرة يمكن أن يكون ساما، يتفاعل مع أنيون فوق الأوكسيد مولدا ONOO· (peroxynitrite). يمكن لهذا الأخير إتلاف البروتينات و يحلها إلى مركبين سامين وهما الجذر الهيدروكسيلي و ثاني أكسيد الأزوت NO₂ (Favier, 1998; Kerkeni, 1998; Valko et al., 2006) كما يهاجم tyrosine و يحوله إلى 3-nitrotyrosine، يلاحظ هذا الأخير في العديد من الأمراض كالإلتهابات و داء النقرس (Halliwell, 1997).

2-1- آليات تشكل الجذور الحرة في العضوية

تنتج الجذور الحرة في العضوية عن طريق آليتين: إنزيمية و لا إنزيمية (شكل 6).



شكل 6. مصادر الأشكال النشطة للأوكسجين في العضوية

(Sekli-Belaidi, 2011).

1-2-1 - آليات إنزيمية

A - إختزال أحادي الإلكترونات للأكسجين الجزيئي في الميتوكوندري

يختزل أكثر من 95 % من الأكسجين المستهلك خلال الميتابوليزم الخلوي العادي، إلى ماء في السلسلة التنفسية الميتوكوندرية، حسب عملية رباعية التكافؤ يتوسطها انزيم cytochrom oxidase، إذ يؤمن نقل 4 إلكترونات على جزئية الأكسجين التي تختزل إلى ماء.



بالمقابل يتم فقد 2 إلى 5 % من الإلكترونات التي تتفاعل مع الأكسجين وتختزله تبعاً لسلسلة وحيدة الإلكترونات مؤدية إلى تكوين جذر فوق الأكسيد، حيث تمثل السلسلة التنفسية المنطقة الأساسية لإنتاج O_2^- خلال ischemia و العمل الفزيائي (Kerkeni, 1998).

B - تنشيط NADPH oxidase

تستهلك البالعات الكبيرة وكريات الدم البيضاء متعددة النوى المتعادلة (المنبهة بالأنترلوكين و الأندوتوكسين) كمية كبيرة من الأكسجين، الذي يتحول بأكمله تقريباً إلى جذر فوق الأكسيد O_2^- وذلك بتدخل إنزيم NADPH oxidase الذي يتوضع على الغشاء البلازمي (Held, 2010)، ويتحول جذر فوق الأكسيد المتشكل في وجود SOD إلى بيروكسيد الهيدروجين وبعدها إلى جذر الهيدروكسيل، كما يتحول بيروكسيد الهيدروجين في وجود myeloperoxidase (إنزيم تحرره كريات الدم البيضاء متعددة النوى المتعادلة في الوسط الخارج خلوي) إلى hypochlorous acid (HClO) (مبيد بكتيري قوي)، يتفاعل هذا الأخير مع جزيئات الوسط التي تملك وظائف أمينية أو مع أيون الأمونيوم مشكلاً مركبات chloroamines. (Kerkeni, 1998)



كما ينتج الأكسجين المفرد من تفاعل hypochlorous acid مع بيروكسيد الهيدروجين كالاتي



و بالتالي يتشكل خلال البلعمة نسبة مرتفعة من الجذور الحرة الأكسجينية (جذر فوق الأكسيد O_2^- ، جذر الهيدروكسيل OH، بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 و الأكسجين المفرد ${}^1\text{O}_2$)

C - تنشيط Xanthine oxidase

يعمل هذا الإنزيم على تحويل hypoxanthine، في وجود الأكسجين إلى حمض اليوريا و جذر فوق الأكسيد، تحوي الأنسجة في الحالة العادية كمية قليلة من هذا الإنزيم، ولكن خلال ischemia يهدم ATP إلى hypoxanthine و يتحول xanthine dehydrogenase إلى xanthine oxidase بتدخل انزيم protease المنشط بارتفاع الكالسيوم المتأين في الوسط الداخل الخلوي (Kerkeni, 1998).

1-2-2- آليات لانزيمية

A- الأكسدة الذاتية للعديد من الجزئيات الداخل خلوية

مثل الهيموغلوبين المؤكسج، الجلوتاثيون، حمض الأسكوربيك و الكاتيوكولامينات كالأدرينالين. (Kerkeni, 1998)

B- تفاعل Fenton

يتحول الأكسجين في وجود معادن الانتقال (الحديد، النحاس ...) إلى جذر هيدروكسيلي و يعتبر الحديدوز أهم كاتيون مسؤول عن تشكل جذور الهيدروكسيل و حدوث فوق الأكسدة الليبيدية. (Kerkeni, 1998)

C- العوامل ذات المصدر الخارجي

- الإشعاعات الأيونية: تعتبر مصادر للجذور الحرة ومثالها أشعة X و القدرة على قطع جزيئة ماء إلى جذرين، كذلك الأشعة فوق البنفسجية القادرة على إنتاج أنيون فوق الأكسيد والأكسجين المفرد (Favier, 1998;).

- الأدوية مثل Doxorubicin (Rade and Borut, 2008)، Carbamazepine، Phenobarbital،

(Aycicek and Iscan, 2007)، Valproic Acid (Sangeetha and Mahadeva, 2011)،

pentylene tetrazole (Pahuja et al., 2013).... الخ.

- بعض المواد السامة مثل CCl₄ (Singh et al., 2009)، ملوثات البيئة كالمبيدات (Agrawal and

Sharma, 2010) و دخان السجائر (Valavanidis et al., 2009; Zhang et al., 2006).

1-3- مؤشرات التوتر التأكسدي

1-3-1- على مستوى الليبيدات

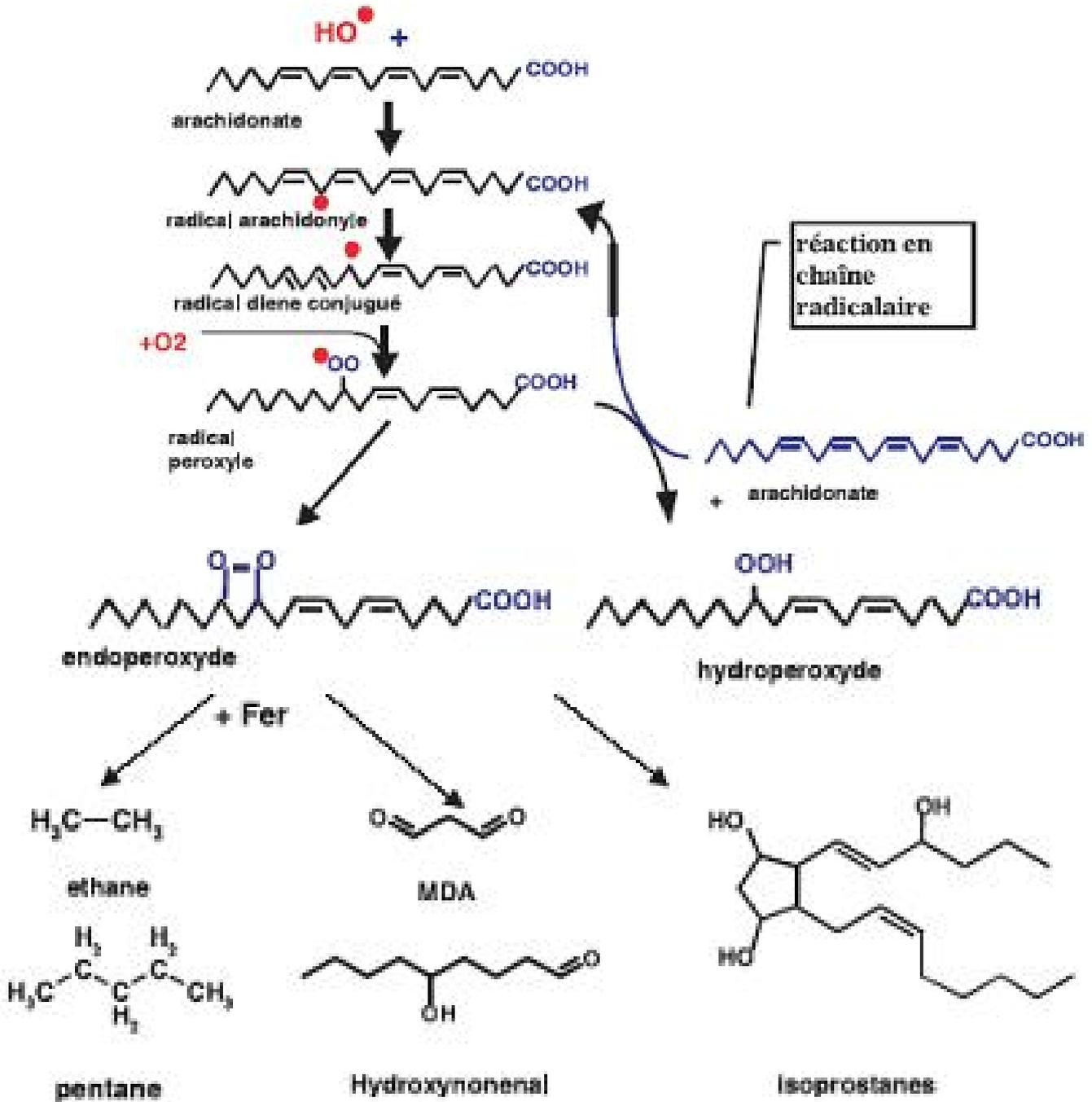
تقاس أكسدة الليبيدات بتقدير MDA الناتج من الأكسدة الفوقية لليبيدات، بالتفاعل مع حمض Thiobarbituric (TBARs assay) و F2-isoprostane (و خاصة 8-epi-prostaglandin) الذي يتشكل بطريقة لا إنزيمية (أكسدة الجذور الحرة لليبيدات المحتوية على arachidonyl)، كما يمكن تقدير نواتج أخرى لفوق الأكسدة الليبيدية مثل 4-hydroxynonenal (Carr and Frei, 1999; Therond, 2006) (شكل 7)

2-3-1- على مستوى DNA

من أهم مؤشرات التوتر التأكسدي لـ DNA نذكر 8-oxoguanine الذي ينتج عن هجوم جذر الهيدروكسيل، أو peroxy-nitrite أو الأوكسجين المفرد على الجوانين في الموقع C-8 (Therond, 2006).

3-3-1- على مستوى البروتينات

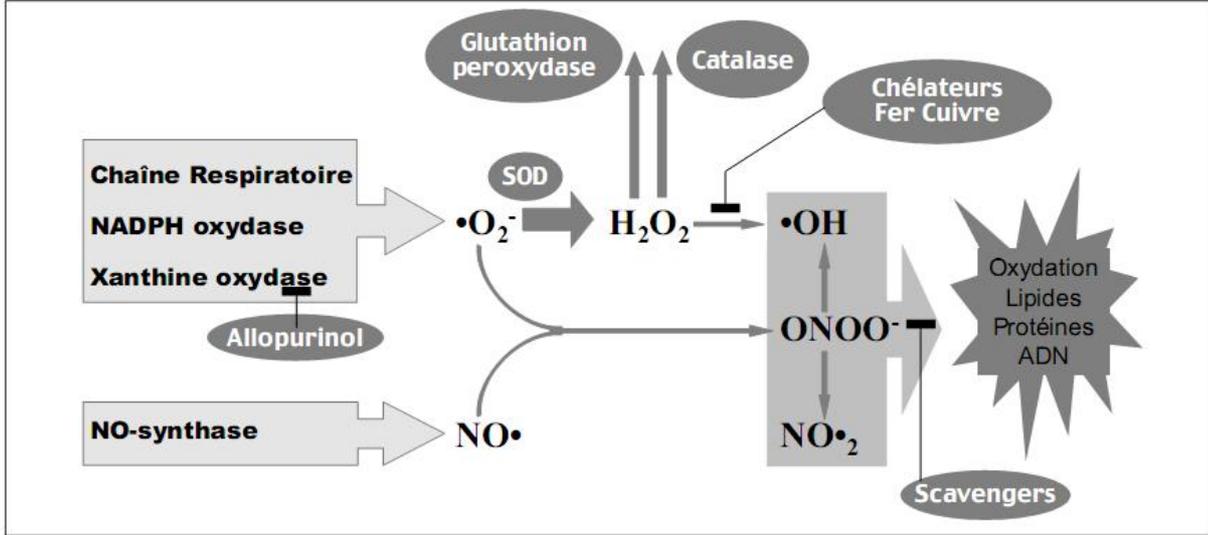
تقدر الأوكسدة البروتينية بتحديد مجاميع الكربونيل، الأحماض الأمينية المؤكسدة و الجلطة السابقة لأنها للمنتجات النهائية (nitrotyrosines).



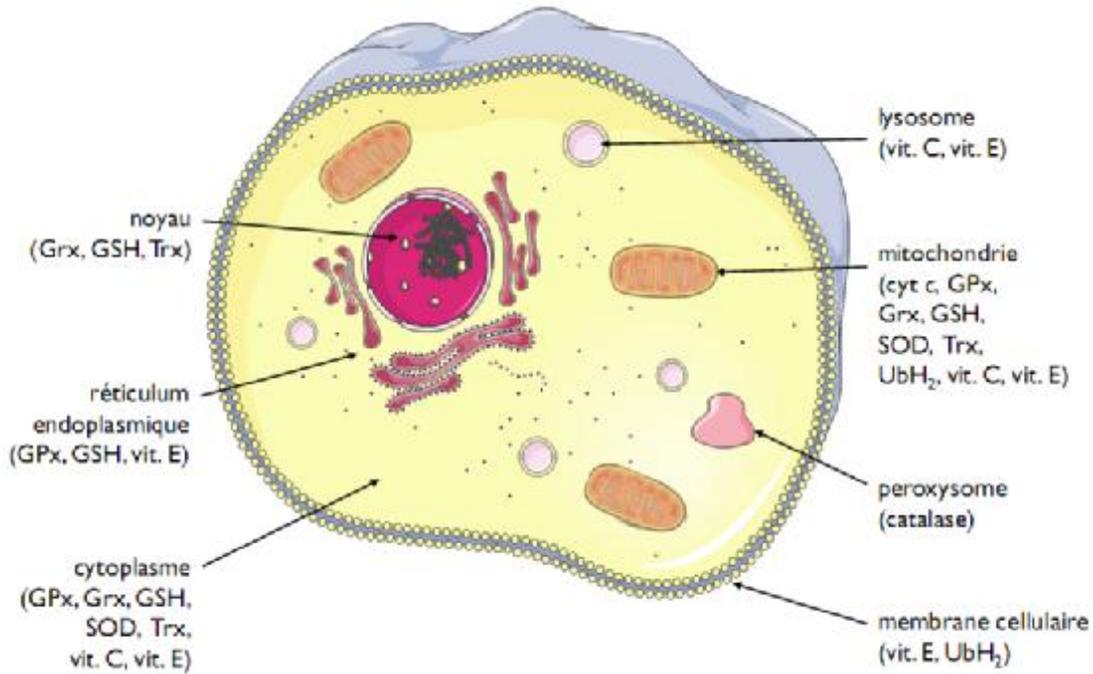
شكل 7. النواتج النهائية للأوكسدة الفوقية للبيدات (Favier, 2003)

2- مضادات الأوكسدة

تملك الكائنات الهوائية أنظمة دفاعية مضادة للأوكسدة، تهاجم الأشكال النشطة للأوكسجين و تقلل من آثارها على الجسم (شكل 8). تتواجد مضادات الأوكسدة في الغشاء الخلوي، السيتوزول و في معظم العضيات (شكل 9).



شكل 8. تصدي مضادات الأوكسدة للأشكال النشطة للأوكسجين (Fontaine et al., 2002)



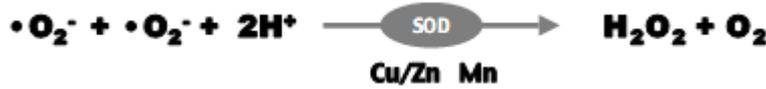
شكل 9. أماكن تواجد مضادات الأوكسدة على مستوى الخلية (Lacraz, 2009)

Trx: thioredoxine; Grx: glutaredoxine

2-1-1- مضادات الأكسدة الإنزيمية

(SOD) Superoxide Dismutase-1-1-2

عبارة عن بروتين معدني يتواجد في كل العضيات الحيوانية و النباتية وفي الكائنات الدنيئة الهوائية (Dodet, 1991; Favier, 1998). يحفز هذا الإنزيم تحويل جذر فوق الأكسيد O_2^- إلى H_2O_2 . يحدث هذا التفاعل تلقائيا، ولا يحتاج إلى طاقة أو إلى عامل مساعد (Valko et al., 2007).



يعتبر SOD أول خط دفاع مضاد للأضرار الناتجة عن الجذور الحرة، حيث يمنع تشكل جذر الهيدروكسيل إنطلاقا من أنيون فوق الأكسيد (Matès and Sanddiez-jimenez, 1999; Valko et al., 2007) تم التعرف على العديد من أشكال SOD حسب الاختلاف في العامل المساعد المعدني:

- **Mn-SOD** يخلق في الميتوكوندريا ويعمل على حمايتها.
- **Cu -Zn- SOD** يلاحظ بوضوح في خلايا eucaryotes مثل النباتات، الحيوانات، الخمائر وفي procaryotes مثل البكتيريا (Madhavi et al., 1996) يتواجد في السيتوبلازم، الفراغ بين الغشائي، الميتوكوندريا و في الكريات الحمراء (Favier, 1998; Favier, 2003).
- **Ec-SOD** عبارة عن جليكو بروتين يحتوي على ذرتي نحاس ووزنك، يتواجد هذا الإنزيم في السوائل البيولوجية (البلازما، اللف، السائل المفصلي)، لكن أغلب الكمية موجودة على مستوى الأنسجة. يتواجد إنزيم Ec-SOD بثلاث أشكال (A, B, C)، تختلف عن بعضها من حيث جاذبيتها لglycosaminoglycans ويمثل الشكل C أغلب الكمية مقارنة بالأشكال الأخرى، يفرز هذا الأخير من طرف اللييفة العضلية و الخلايا الدبقية حيث يرتبط بالاعشبية الخلوية و الفراغات بين الخلوية، إذن فدورها حماية الخلايا و البروتينات الدعامية (Dodet, 1991).

Catalase -2-1-2

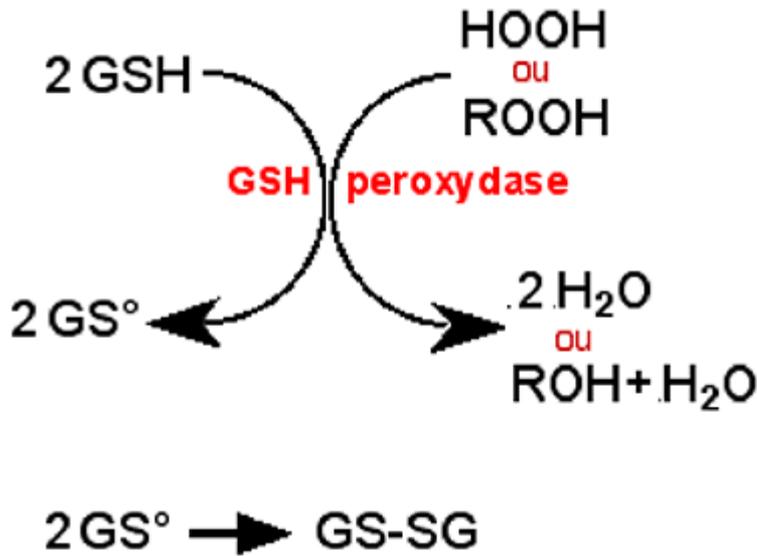
يتواجد الكاتالاز في كريات الدم الحمراء و الكبد (peroxysomes) (Favier, 1998). يلعب دور مهم في الوقاية من المستويات العالية للتوتر التأكسدي. فهو يحمي الخلايا من H_2O_2 (Matés and Sandez-Jiménez, 1999).

يعمل الكاتالاز على التخلص من جزيئي بيروكسيد الأوكسيجين في شكل جزيئي ماء و جزيئة أوكسيجين (Clavel et al., 1985) حسب المعادلة التالية:



(GPx) Glutathione Peroxidase -3-1-2

عبارة عن إنزيم يحوي selenium في شكل selenocysteine، يتواجد هذا الإنزيم في سيتوزول و ميتوكوندريا أغلبية أنسجة الثدييات (Avissar et al., 1989; Valko et al., 2006). يعمل على إزالة سمية كل من بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) و البيروكسيد العضوي (ROOH) كالاتي



تتطلب إزالة سمية البيروكسيد العضوي تدخل انزيم PLA2 (phospholipase) الذي يعمل على تحرير بيروكسيد الأحماض الدهنية للأغشية الخلوية باماهة الوظيفة esters للفوسفوليبيدات الغشائية مما يؤدي إلى تحرير البيروكسيد في السيتوزول عندئذ يتدخل إنزيم GPx (Milane, 2004) تحتوي معظم الأنسجة الحيوانية على كل من GPx و Catalase اللذان يعملان على التخلص من H_2O_2 ، حيث يعمل catalase على إزالة H_2O_2 المنتج في البيروكسيزومات، بينما يعمل GPx على إزالة H_2O_2 المنتج في الميتوكوندريا أو الشبكة الأندوبلازمية أو السيتوزول. (Deshpande et al., 1996)

Glutathione Reductase_4-1-2

يتحول GSSG إلى GSH في وجود إنزيم glutathione reductase كالتالي:



Glutathione – S – transferase-5-1-2

يتدخل هذا الإنزيم في ميتابوليزم المركبات الغريبة في الكبد ليعطي أحماض mercapturique التي تطرح خارج الجسم، تتمثل الخطوة الأولى لإزالة السمية في ربط هذه المركبات مع GSH، ثم يطرح الجلوتاثيون المقترن في العصارة الصفراوية مما يؤدي إلى التقليل من تركيز GSH الكبدي (Deshpande et al., 1996)

2-2- مضادات الأكسدة غير الإنزيمية

1-2-2- الجلوتاثيون

عبارة عن ثلاثي ببتيدي بسيط (Glu-Cys-Gly)، شكله المختزل يسمى GSH و شكله المؤكسد يسمى GSSG. يعتبر GSH كقنص لجذور الهيدروكسيل و الأكسجين المفرد و منشط للإنزيمات المثبطة بتعرضها لتراكيز عالية من الأكسجين، و ذلك بإرجاع الروابط ثنائية الكبريت للإنزيم. يتفاعل GSH بسرعة مع جذر الهيدروكسيل ويتأكسد بواسطة H_2O_2 في وجود أيونات المعادن الانتقالية مثل النحاس والحديد كما يحفز إنزيم GPx أكسدة GSH إلى GSSG في وجود H_2O_2 كالتالي (Deshpande et al., 1996)

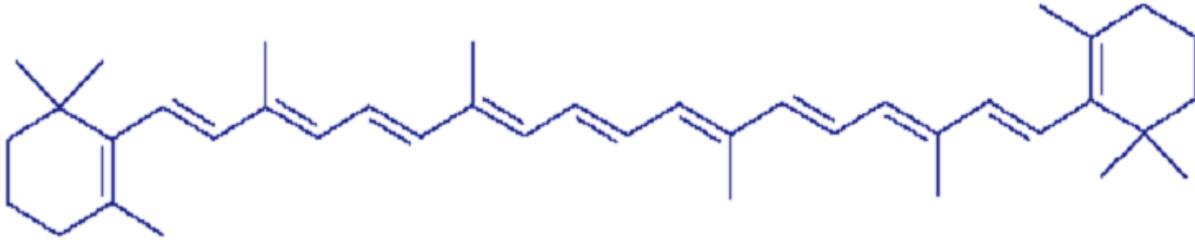


2-2-2- مضادات الأكسدة المعدنية

يكن دور كل من النحاس، الزنك، الحديد، السيلينيوم كمضادات للأكسدة من خلال دورهم كعوامل مرافقة للإنزيمات المضادة للأكسدة مثل SOD، Catalase و GPx (Deshpande et al., 1996).

3-2-2- فيتامين A

عبارة عن فيتامين قابل للذوبان في الدهن، يوجد في الأغذية ذات المصدر الحيواني كالحليب و مشتقاته، كبد الأسماك وخاصة القرش، البيض كما يوجد في صورة carotenoids (طليعة فيتامين A) في الخضر و الفواكه (شكل 10).



شكل 10. الصيغة الكيميائية لطليعة فيتامين A (β -carotene) (Gardèse- Albert et al., 2003)

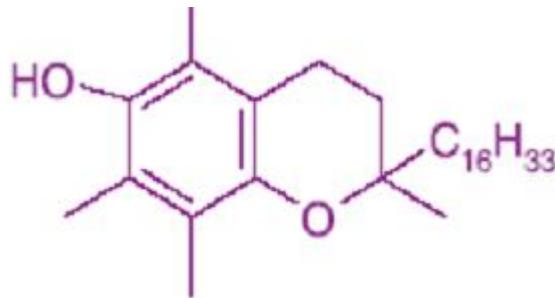
بينت الدراسات *in vivo* و *in vitro* دور طلائع فيتامين A كقنصات للجذور الحرة، حيث يظهر β -carotene حماية خاصة للأغشية الليبديية ضد الأكسدة الفوقية للبيدات، كما يمنع أكسدة LDL و يحمي الليدات الكبدية من الأكسدة المحرصة بجذر trichloromethyl، أيضا يعمل على توقيف تفاعلات السلسلة من خلال إقتناصه للجذور الحرة و تفاعله مع جذور البيروكسيل مشكلا جذر carotenoids.



(Deshpande et al., 1996)

4-2-2 - فيتامين E

فيتامين E مصطلح عام وشامل يطلق على 4 مواد قابلة للذوبان في الدهن تسمى tocopherols (α ، β ، δ ، γ) ويعتبر α -tocopherol (شكل 11) أهم مركبات tocopherol إنتشارا في الطبيعة و أكثرها أهمية لتمتعه بنشاط بيولوجي مرتفع، تتواجد مركبات tocopherol بتركيز مختلفة في الأغذية النباتية والحيوانية وأهم مصادرها الطبيعية نذكر الزيوت النباتية (Bermond, 1997).



شكل 11. الصيغة الكيميائية لفيتامين E (α -tocopherol) (Gardèse-Albert et al., 2003)

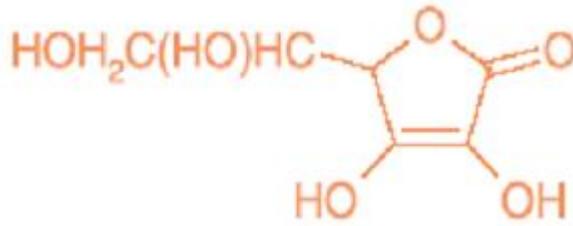
تعتمد الوظيفة المضادة للأكسدة لفيتامين E على قدرته على إقتناص الجذور الحرة مثل الأوكسجين المفرد، فوق الأوكسيد والبيروكسيد (Packer, 1991; Magnin, 1992)، وبالتالي إخماد نشاط الجذور الحرة

على مستوى الأغشية في مرحلتها الإبتدائية، وهذا على عكس GPx الذي يقضي على الأكسدة الفوقية بعد إتلافها للأغشية، بالإضافة إلى هذا يتميز بنشاطه المضاد للجذور الليبيدية alcoxyl وجذور hydroperoxy (Bermond, 1997).

يساهم tocopherol في تشكيل فوسفوليبيدات الغشاء مما يؤمن المرونة الوظيفية للأغشية و هي مستقلة عن نشاطه المضاد للأكسدة (Packer, 1991; Magnin, 1992).

2-2-5 - فيتامين C

يعتبر فيتامين C من المركبات القابلة للذوبان في الماء، ذو تركيب مشابه للكربوهيدرات سداسية الكربون (شكل 12)



شكل 12. الصيغة الكيميائية لفيتامين C (ascorbic acid) (Gardèse-Albert et al., 2003)

يتواجد فيتامين C في 3 أشكال: صورة مختزلة حمض الأسكوربيك، صورة مؤكسدة حمض dehydroascorbic (DHA)، وصورة وسيطة غير ثابتة و قابلة للتفاعل تسمى الجذر الحر أسكوربيل. للشكل المؤكسد و المختزل نفس الوظيفة الفيتامينية (Rougereau, 1997). يعتبر الجرد من أهم الحيوانات التي تقوم ببناء حمض الأسكوربيك إنطلاقاً من الجلوكوز (Hacizevki, 2009)، وتتم عملية البناء على مستوى الشبكة الأندوبلازمية في الكبد والكلى.

فيتامين C من العناصر الصغرى التي يحتاجها الجسم لأداء وظائفه العادية، إذ يسبب نقصه داء الحفر الذي يمكن أن نتفاده بتناول 10 ملغ فيتامين C في اليوم على الأقل من أهم مصادره الفواكه، الحمضيات و الخضر الطازجة، نذكر على سبيل المثال: البرتقال، الليمون، الفراولة، الطماطم ... الخ. يعتبر فيتامين C من أهم مضادات الأكسدة القابلة للذوبان في الماء، داخل السوائل البيولوجية وبين الخلايا (Carr and Frie, 1999) القادرة على التداخل مع الغشاء البلازمي بإعطائه إلكترون لجذر tocopheroxyl (شكل 9) (May, 1999). كما يعمل على إفتتاص الأشكال النشطة للأكسجين (جذور الهيدروكسيل، الأكسجين المفرد، جذر فوق الأوكسيد وجذور hydroperoxy و HClO Hypochlorous) و أشكال النتروجين خاصة pesoxynitrite، ثاني أكسيد النتروجين و جذور nitroxide

(Carr and Frei, 1999; Halliwell, 1994; Pilardeau, 1995)

كما يعمل فيتامين C على رسكلة glutathion، urate، β -carotene إنطلاقاً من جذور glutathyl، جذور urate و β -carotene radical cations على التوالي.

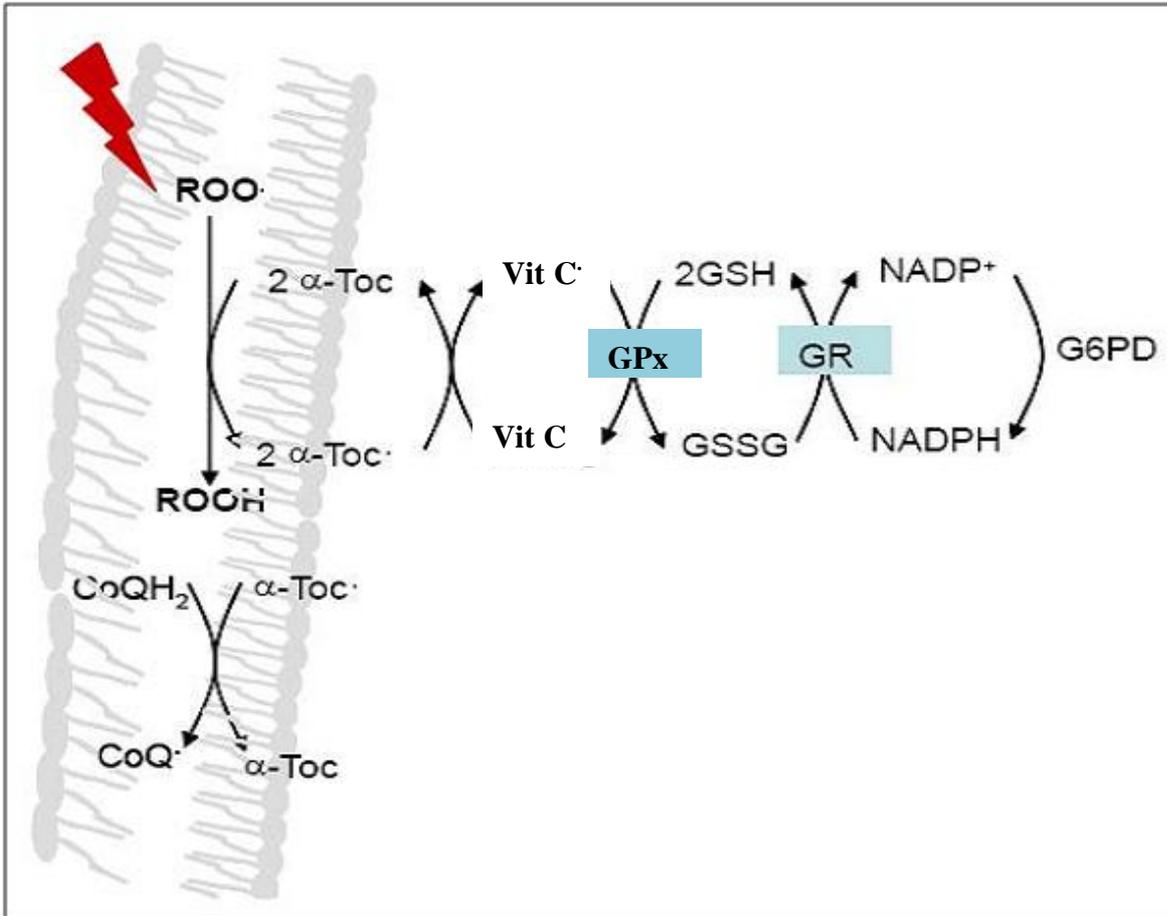
أهم الخواص التي تجعل من فيتامين C مضاد أكسدة فعال هي: قلة تفاعل جذر الأسكوربيل المتشكل خلال إقتناص الأشكال النشطة للأكسيجين أو أشكال النتروجين. إذ يتحول جذر الأسكوربيل بسرعة إلى أسكورات أو DHAA عن طريق عملية تسمى dismutase المعتمدة على NADH في وجود

الجلوتاتيون أو الإنزيمات المعتمدة على الجلوتاتيون: Glutathion dehydrogenase، Glutaredoxin،

Dehydroascorbate oxidoreductase و thioredoxin reductase (Selenoenzyme) المعتمد على NADPH

(Carr and Frei, 1999)

- يحافظ فيتامين C على الصورة المختزلة للإنزيمات المحتوية على مجاميع thiols.



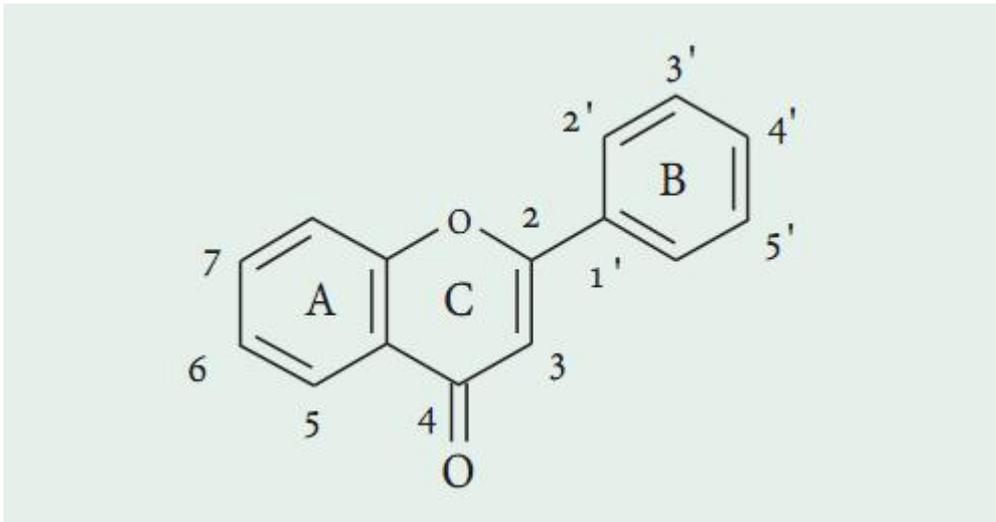
شكل 13. دور فيتامين C في تجديد فيتامين E و إخماد الأكسدة الفائقة للبيدات بالتعاون مع GSH و

مضادات الأكسدة الأنزيمية (Sekli-Belaidi, 2011)

2-2-6 - الفلافونويدات

عبارة عن مجموعة من متعددات الفينول تختلف عن بعضها في بنيتها الكيميائية وخصائصها، توجد طبيعياً في الفواكه والخضار، الأزهار، الحبوب، كما تعتبر جزءاً من الغذاء الكامل للإنسان، إذ تلعب أدواراً بيولوجية هامة نذكر من بينها دورها المضاد للبكتيريا، للفيروسات (Havsteen, 2002)، للإلتهاب، للحساسية وكذلك دورها الواقي والمرخي للأوعية الدموية، بالإضافة إلى قدرتها على تثبيط الأكسدة الفوقية والنشاط الإنزيمي المتضمن لكل من cyclo-oxygenase و lipoxygenase (Cook and Samman, 1996). كما تقي من بعض الأمراض المزمنة كالسرطان، الأمراض الوعائية القلبية و داء السكري (Pandey and Rizvi, 2009).

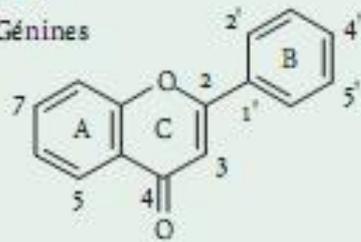
تم التعرف على حوالي 4000 من المركبات الفلافونويدية في النباتات الوعائية، يختلف نوع وكمية الفلافونويدات باختلاف نمو ونضج النبات والظروف البيئية المحيطة به، إذ تقوم النباتات بإنتاج هذه المواد للوقاية من الطفيليات والعناصر الممرضة والأشعة فوق البنفسجية، بالإضافة إلى ذلك فهي تساهم في نقل حبوب الطلع من خلال إرشادها للحشرات إلى مصدرها الغذائي، كما أنها المسؤولة عن إعطاء اللون في النبات وذلك لتكوينها للصبغات النباتية (Bruneton, 1993; Cook and Sammon, 1996). تتميز جميع الفلافونويدات بمصدر بناء حيوي مشترك، تشتق من benzo- γ -pyrone (شكل 14) (Kanadaswami et al., 2005) وتصنف إلى عدة أنواع (شكل 15):



شكل 14. بنية phenyl benzo- γ -pyrone (Di Carlo et al., 1999)

Flavones

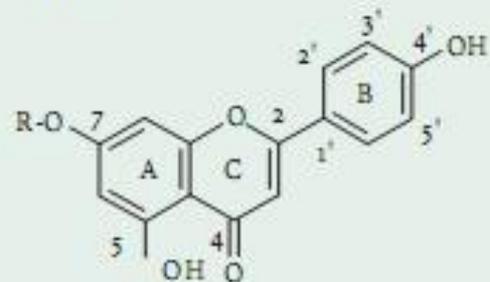
Génines



5 6 7 4'

Apigénine	OH	-	OH	OH
Lutéoline	OH	-	OH	-

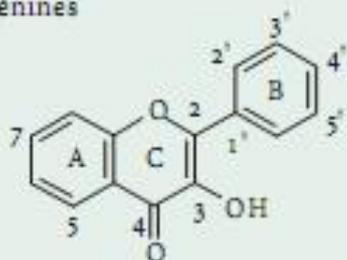
Hétérosides



R = néohespéridoside (Glc-Rha) :
Apigénine-7-néohespéridoside

Flavonols

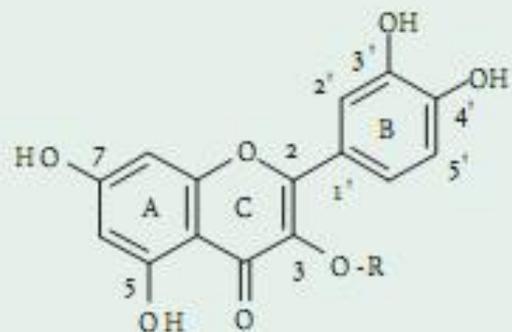
Génines



5 7 3' 4' 5'

Quercétine	OH	OH	OH	OH	-
Kaempférol	OH	OH	-	OH	-
Myricétine	OH	OH	OH	OH	OH

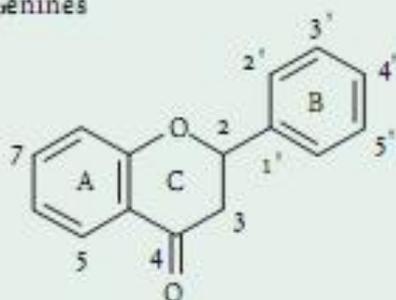
Hétérosides



R = rhamnose : Quercitrósido

Flavanones

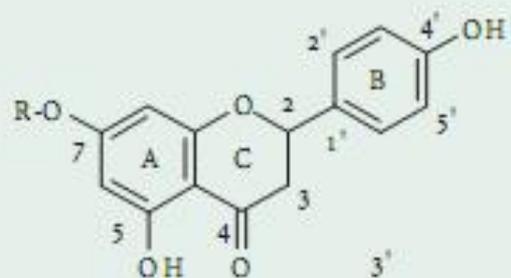
Génines



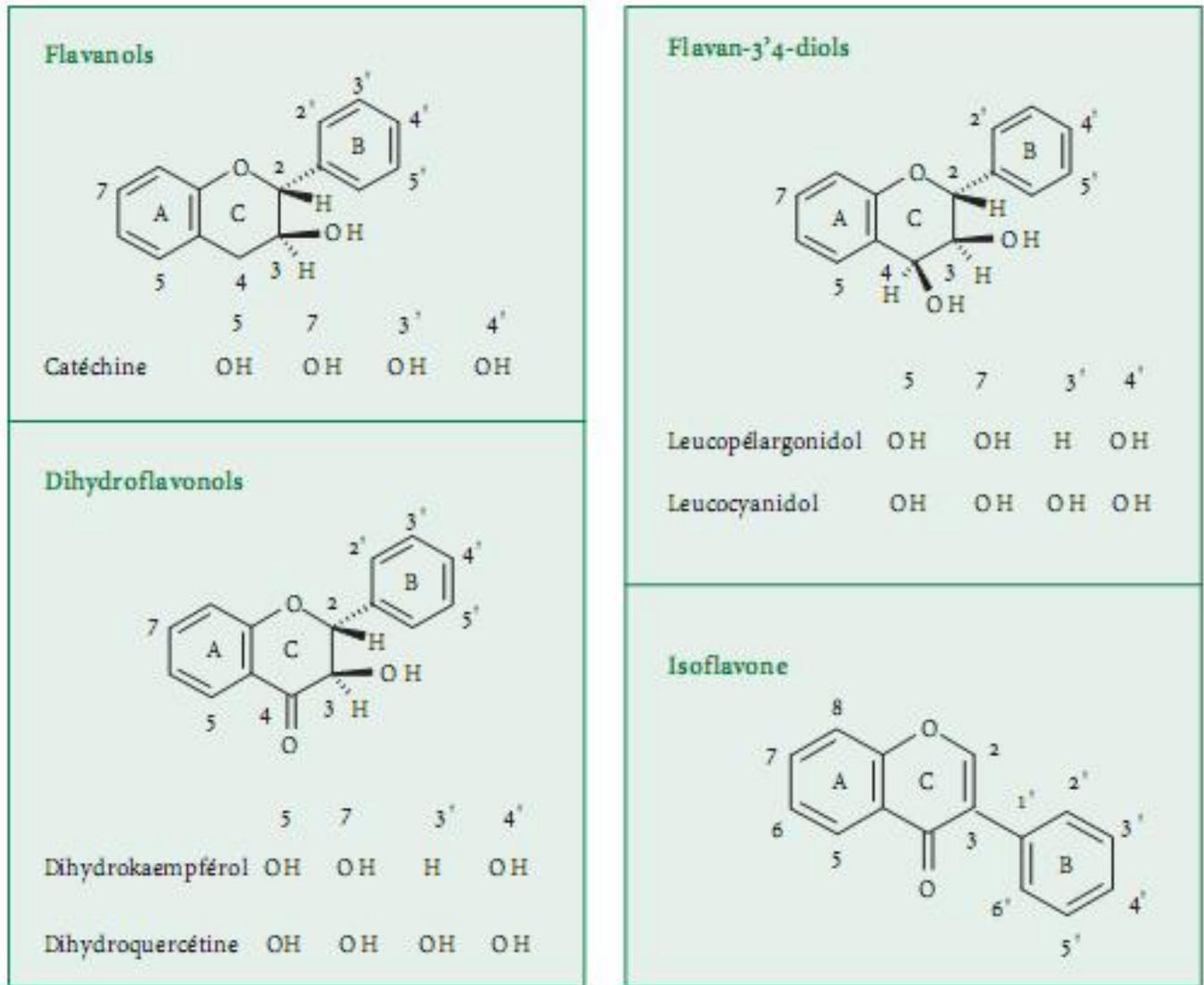
5 7 4'

Naringénine	OH	OH	OH
-------------	----	----	----

Hétérosides



R = néohespéridoside : Naringénine



شكل 15. البنية الكيميائية لمختلف أنواع الفلافونويدات (Ghedira, 2005)

A - الدور البيولوجي للفلافونويدات

• الفلافونويدات مضادة للأكسدة

تنشط الفلافونويدات الأكسدة الفوقية للبيدات في المرحلة الإبتدائية بإقتناصها لجذور الهيدروسكيل وذلك لقدرتها على التداخل مع الطبقة ثنائية اللبيد للغشاء الخلوي (Saja et al., 1995)، كما تنهي سلسلة تفاعلات الجذور الحرة وذلك بإعطائها ذرات الهيدروجين لجذور البيروكسي مشكلة بذلك جذر الفلانويد (Foti et al., 1996; Cook and Sammon, 1996).

بالإضافة إلى خصائصها المضادة للأكسدة تعمل بعض الفلافونويدات كعوامل مخالبة للمعادن metal-chelating، وبالتالي تنشط تفاعل fenton الذي يعتبر مصدر مهم لإنتاج الجذور الأوكسجينية النشطة

(Puppo, 1992; Cook and Sammon, 1996; Urquiaga and Leighton, 2000).

• الفلافونويدات والنفاذية الشعرية

تعمل الفلافونويدات على التقليل من نفاذية و هشاشة الشعيرات الدموية، إذ أنها ضرورية للبنية الطبيعية و الوظيفية للشعيرات الدموية، و كمثال عن دورها في التقليل من النفاذية الشعرية نذكر دورها في تأخر إنتشار الصبغات مثل trypan blue التي تخترق طبيعيا الشعيرات الدموية (Bruneton, 1993).

• الفلافونويدات و السرطان

تلعب الفلافونويدات دور في تثبيط تطور السرطان، حيث تعمل على تنظيم التكاثر الخلوي من خلال تثبيطها لطرق التنبه الداخلي خلوي، كما تعمل على تحريض الموت المبرمج للخلايا السرطانية (Johnson, 1999)، حيث بين Zhao et al., 1999 دور فلافونويد silymarin المضاد للأكسدة في تثبيط الورم في المرحلة الإبتدائية على مستوى الدماغ، الجلد، البروستات و الثدي.

B- استعمال الفلافونويدات في التداوي

تستعمل الفلافونويدات الموجودة في السوق في الحالات التالية:

- علاج الأعراض الناتجة عن العوز الوعائي اللمفاوي (veinolympatique insuffisance)، ثقل الأرجل، التشنج، الألم، خروج السوائل من الشعيرات (edema).
- علاج الإضطرابات الناجمة عن هشاشة الشعيرات الدموية على مستوى الجلد و على مستوى المخاط و علاج الأعراض الوظيفية المرتبطة بنوبة البواسير.
- علاج الإضطرابات المرتبطة بالدوران الشبكي
- وقاية الكبد (Bruneton, 1993).
- تستعمل الفلافونويدات في حالات الحساسية، داء السكري، حيث أن الهدف من استعمالها كعلاج هو قدرتها على إختزال مجال النزيف الشعيري، كما تستعمل في علاج الإنتانات التنفسية وذلك برفعها للمقاومة الشعرية.
- علاج الأمراض الشريانية (داء الدوالي)
- تستعمل الأشكال المركزة للفلافونويدات مثل propolis (مادة صمغية تأخذها النحلة من النباتات و تستعملها كغذاء لخلية النحل) في معالجة العديد من الأمراض كالإلتهاب، الحساسية، السرطان، الإنتانات الفيروسية، لسع النحل، القرحة المعدية و الصداع (Cook and Sammon, 1996).

المواد و الطرق المستخدمة

1- المستخلصات النباتية

استعمل في هذا الجزء من البحث المستخلص البيتانولي لنبات *Chrysanthemum fontanesii* و *Rhantherium suaveolens* (العرفج)، قطفت النباتين (صورة 2 و3) من منطقة بجاية (ماي 2003) و ورقة (أفريل 2003) على التوالي. و قد تم اختيارهما لانتمائهما للعائلة المركبة والمعروفة بغناها بالمواد الطبيعية النشطة بيولوجيا مثل الفلافونويدات و Lactone sesquiterpene. تم تصنيف النباتين من طرف الأستاذ كعباش جامعة فرحات عباس سطيف الجزائر.

2- حيوانات التجربة

استخدمت في الدراسة التجريبية الفئران البيضاء من سلالة *Swiss albinos*، والتي تم الحصول عليها من مستودع تربية الحيوانات بمعهد باستور بالجزائر العاصمة. تمت رعايتها وتربيتها ومزاوجتها في مستودع الحيوانات بمعهد علوم الطبيعة و الحياة لجامعة قسنطينة، وهذا لغرض الحصول على نسل جديد متجانس من حيث العمر. قدم لها الغذاء ال محضر من طرف الديوان الوطني لتغذية الأنعام بقصر البخاري (ONAB)، الماء طبيعي والاضاءة طبيعية.

3- طريقة الحصول على المستخلص البوتانولي

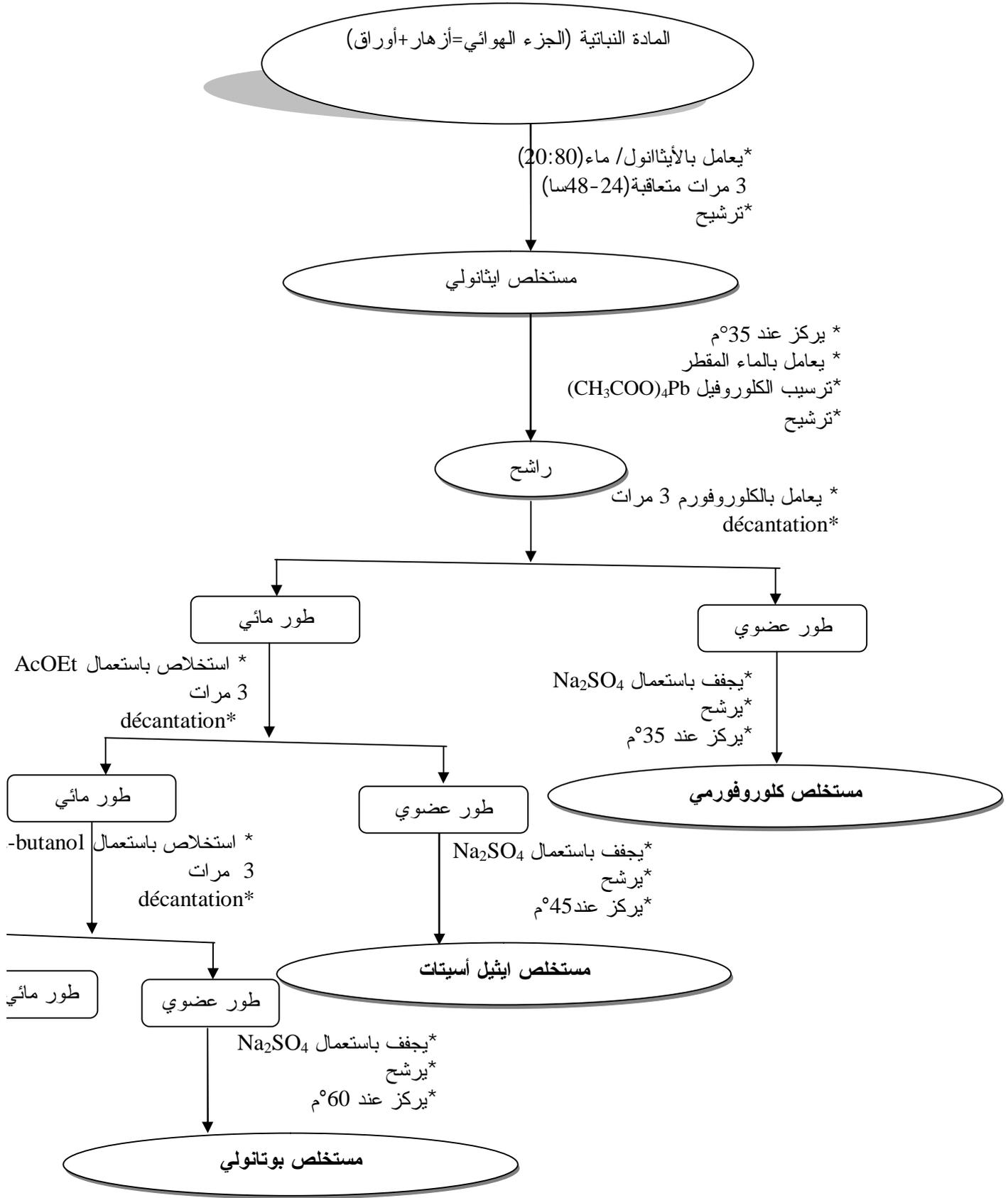
تمت عملية الاستخلاص حسب المخطط التالي



صورة 2. نبات *Chrysanthemum fontanesii*



صورة 3. نبات *Rhantherium suaveolens*



شكل 16. مخطط إستخلاص الفلافونيدات من نبات *Chrysanthemum fontanesii* و *Rhantherium suaveolens*

4- تزاوج الحيوانات

عندما بلغت إناث الفئران من 8 إلى 10 أسابيع وأصبحت تزن ما بين (29,5-35غ) قمنا بتزويجها مع ذكور بالغة من نفس النوع، يتم ذلك كل مساء بوضع ذكر واحد مع أنثى واحدة وذلك بعد تحديد الدورة (Esterus) وفي الصباح يكشف عن وجود سداة بيضاء في الفتحة المهبلية أو بالتأكد من وجود بقايا الحيوانات المنوية في السحبة المهبلية للفأرة ونعتبر ذلك اليوم هو اليوم 0 من الحمل (Fox et al., 2006). ثم تم توزيع الفئران الحوامل إلى 10 مجموعات بحيث يحتوي كل قفص على 8 فئران معلمة بمعلمات ذات ألوان مختلفة، توزن الفئران كل يوم حتى اليوم 18 من الحمل.

5- معاملة الحيوانات

تمت معاملة الفئران بمواد مختلفة بحقنها عن طريق الفم Gavage من اليوم 6 إلى اليوم 17 من الحمل حيث قسمت الحيوانات إلى مجموعات كالآتي:

المجموعة 1: الحيوانات الضابطة (شواهد)

المجموعة 2: معاملة بدواء VPA بجرعة 400 ملغ/كلغ من وزن الحيوان

المجموعة 3: معاملة بالمستخلص البيتانولي لنبات *Chrysanthemum fontanesii* (1) بجرعة 200 ملغ/كلغ من وزن الحيوان

المجموعة 4: معاملة بالمستخلص (1) ودواء VPA (200 و 400 ملغ/كلغ من وزن الحيوان) علي التوالي.

المجموعة 5: معاملة بالمستخلص البيتانولي لنبات *Rhantherium suaveolens* (2) بجرعة 200 ملغ/كلغ من وزن الحيوان

المجموعة 6: معاملة بالمستخلص (2) ودواء VPA بجرعة (200 و 400 ملغ/كلغ من وزن الحيوان) علي التوالي.

المجموعة 7: معاملة بفيتامين E بجرعة 100 ملغ/كلغ من وزن الحيوان.

المجموعة 8: معاملة بفيتامين E ودواء VPA بنفس الجرعتين المذكورتين أعلاه.

المجموعة 9: معاملة بفيتامين C بجرعة 8.3 ملغ/كلغ من وزن الحيوان.

المجموعة 10: معاملة بفيتامين C ودواء VPA بجرعة (8.3 و 400 ملغ/كلغ من وزن الحيوان) علي التوالي.

6- تشريح الحيوانات وأخذ العينات

في اليوم 18 من الحمل ثم تشريح الحيوانات بعد تخديرها باستعمال الكلوروفورم. بعد ذلك تنزع الوحدة الجنينية بأكملها و تغسل بالماء الفزيولوجي وتنشف بمنشفات ورقية، توزن ويقطع غشاء الكيس الجنيني ثم يحسب عدد الأجنة وتقطع الحبال السرية بعدها. تنشف جميع الأجنة إضافة إلى المشيمة حيث تقوم بوزن كل واحد على حدى كما تقوم بنزع جميع أعضاء الأم، غسلها بـ NaCl وتنشيفها ثم وزنها. تقسم الأجنة الى 3 مجموعات:

المجموعة الأولى: تحفظ في الايثانول 95° لصبغها فيما بعد.

المجموعة الثانية: توضع في محلول KCl (1,15%) البارد لقياس تركيز MDA

المجموعة الثالثة: ينزع منها الكبد يوزن ثم يوضع في KCl لقياس تركيز MDA

7- طريقة الحصول على المعلق النسيجي

بعد نزع الكبد، المخ، الكليتين، الجنين، كبد الجنين، المشيمة، نقوم بسحق كل عضو على حدى باستعمال جهاز السحق في وجود محلول KCl البارد (1,15%) بحيث نتحصل على 10% أو 20% مسحوق النسيج، نقوم بعملية الطرد المركزي بهدف الحصول على المعلق النسيجي لتقدير مستوى MDA، GSH ونشاط إنزيم GPx.

8- طريقة الحصول على السيتوزول

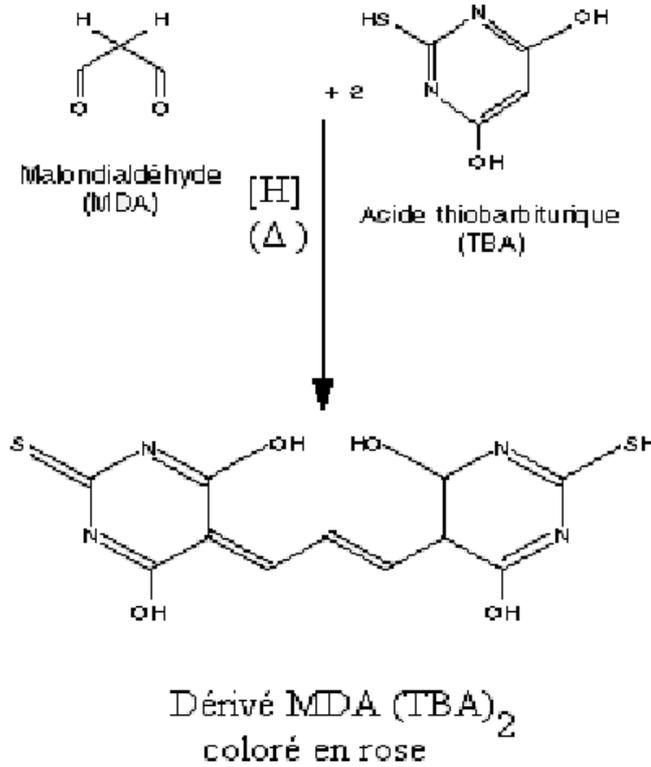
نقوم بسحق الكبد، المخ، الكليتين كل على حدى باستعمال جهاز السحق في وجود محلول KCl المتلج (1,15%)، نقوم بعملية الطرد المركزي عند درجة 4°م للحصول على السيتوزول لتقدير نشاط إنزيم الكاتالاز.

9- المعايرة

9-1- تقدير تركيز MDA

تمت معايرة MDA باستعمال إختبار Thiobarbituric Acid Reaction substracts (TBARS) حسب طريقة (Uchiyama and Mihara, 1978)

المبدأ: يعتمد إختبار (TBARS) على التفاعل اللوني لـ Thiobarbituric acid مع malondialdehyde (الذي يعتبر من أهم النواتج الثانوية لأكسدة البيدات) في وسط حامضي (PH= 2-3) (Janero, 1990)



شكل 17. مبدأ معايرة malondialdehyde

طريقة العمل

نضع 0,5 ملل من معلق النسيج في أنابيب زجاجية ونضيف لها 3ملل من حمض الفوسفوريك 1% و 1مل من محلول TBA (0.67%). يوضع المزيج لمدة 45 دقيقة في حمام مائي على درجة الغليان. بعد التبريد نضيف 4ملل من n-butanol نرج بقوة ثم نقوم بعملية الطرد المركزي. نقرأ الكثافة الضوئية للجزء الطافي عند موجة طولها 535 نانومتر

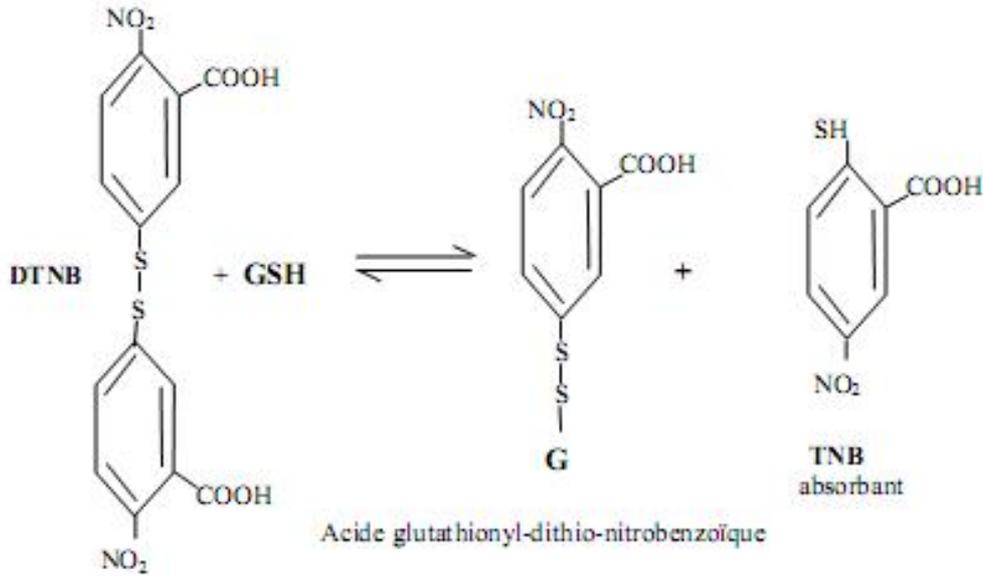
يستعمل 1,1,3,3-tetraethoxypropane كمعيار بعد امأهته إلى Malondialdehyde، نتبع نفس الخطوات السابقة بإستعمال 0.5 ملل من محلول MDA بالإضافة إلى ذلك تحضر أنبوبة البلانك بنفس الطريقة بوضع 0.5ملل ماء مقطر بدلا من محلول MDA أو معلق النسيج.

2-9. تقدير مستوى GSH

تم تقدير مستوى GSH بالاعتماد على الطريقة اللونية لـ Ellman (1959).

المبدأ:

يعتمد تقدير GSH على أكسدته بواسطة حمض (DTNB) 5, 5'-Dithiobis 2-nitrobenzoïque محض وذلك حمض thionitrobenzoïque (TNB) الذي يمتص على طول موجة 412 نانومتر حسب التفاعل التالي



شكل 18. مبدأ معايرة GSH

طريقة العمل

بعد ترسيب البروتينات باستعمال محلول TCA 10% ، يؤخذ 200 ميكرو لتر من الجزء الطافي ويضاف إليها 1.8 ملل من محلول الفوسفات المنظم (tampon phosphate 0,1 M, pH 8) و 1 مل من محلول DTNB (0,01 M). بعد ذلك تقرأ الكثافة الضوئية بعد 5 دقائق من التفاعل عند موجة طولها 412 نانومتر. يستعمل GSH كمعيار.

3-9 . تقدير النشاط الإنزيمي ل GPx

لتقدير النشاط الإنزيمي ل GPx استعملنا طريقة Flohe et Gunzler (1984) التي تعتمد على اختزال الماء الأكسجيني (H_2O_2) في وجود الجلوتاثيون المختزل (GSH) الذي يتحول إلى (GSSH) في وجود GPx حسب التفاعل التالي



طريقة العمل

يحضن 0.2 ملل من معلق النسيج و 0.4 ملل من GSH(0.1mM) و 0.2 ملل من محلول TBS (Tris) في حمام مائي على درجة 25°م لمدة 5 دقائق. يضاف 0.2 ملل من الماء الأسيجيني (H₂O₂ 1.3mM) و بعد 10 دقائق، يضاف 1 ملل من (1% TCA، يوضع المزيج في الثلج لمدة 30د، بعد إجراء عملية الطرد المركزي، يؤخذ 0.48 ملل من السائل الطافي و يضاف له 2.2 ملل من محلول TBS و 0.32 ملل من محلول (1 mM) DTNB و بعد 5 دقائق من التفاعل تقرأ الكثافة الضوئية عند موجة طولها 412 نانومتر.

4-9 . تقدير النشاط الإنزيمي ل Catalase

لتقدير النشاط الإنزيمي ل Catalase استعملنا طريقة (1985) Clairborne, التي تعتمد على اختفاء الماء الأسيجيني (H₂O₂) في وجود المصدر الإنزيمي حسب التفاعل التالي

Catalase



طريقة العمل

نمزج 1.95 ملل من محلول الفوسفات المنظم (KH₂PO₄, 0.05 M, pH 7) مع 1 ملل من H₂O₂ (0.019 M) المحضر حديثاً و 0.05 ملل من المصدر الإنزيمي (السيروزول). نقرأ الامتصاص على طول موجة 240 نانومتر خلال الدقيقة الأولى و الثانية.

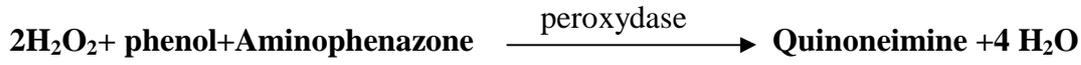
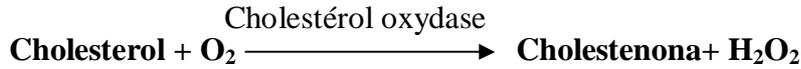
5-9 . تقدير النشاط الإنزيمي ل ALT وAST

تمت معايرة النشاط الإنزيمي لكل من AST (GOT) و ALT (GPT) (المعلمين الحيويين للوظيفة الكبدية) حسب طريقة (1978) Bergmeyer et al.



9-6. تقدير تركيز الكولسترول

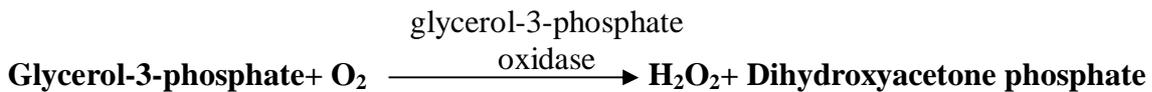
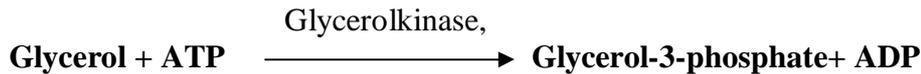
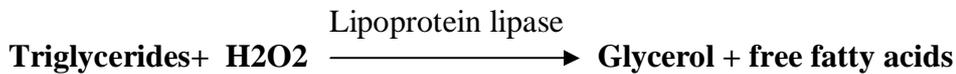
أتبعت الطريقة الأنزيمية ل (Naito, 1984) التي تعتمد على تحويل أسترات الكولسترول إلى كولسترول حر ثم أكسدته لإعطاء فوق أكسيد الأوكسيجين الذي يتفاعل مع phenol و 4-Aminophenazone في وجود إنزيم peroxydase ليعطي مركب لونه وردي تتناسب شدته مع تركيز الكولسترول في العينة عند طول موجة 505 نانومتر حسب المعادلات التالية



9-7. تقدير تركيز الجليسيريدات الثلاثية

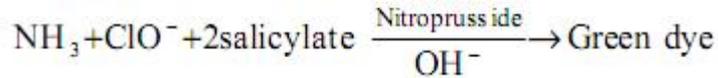
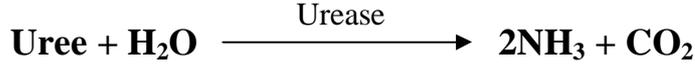
أتبعت الطريقة الأنزيمية اللونية ل (Fossati and Principe, 1982)

تتم امأهة الجليسيريدات الثلاثية إلى جليسرول و أحماض دهنية حرة بتأثير إنزيم Lipoprotein lipase. يتحول الجليسرول الى جليسرول 3 فوسفات و ADP بواسطة إنزيم Glycerolkinase. و في الخطوة الثالثة يتأكسد جليسرول 3 فوسفات في وجود الأوكسيجين تحت تأثير إنزيم glycerol-3-phosphate oxidase إلى مركب ثنائي هيدروكسي أسيتون فوسفات و ماء أوكسجيني. هذا الأخير تحت تأثير إنزيم peroxidase وفي وجود p-chlorophenol و 4- Aminophenazone يتحول الى ماء و Quinone الوردية اللون، تتناسب شدته مع تركيز الجليسيريدات الثلاثية في العينة عند طول موجة 505 نانومتر حسب المعادلات التالية



9-8. تقدير تركيز اليوريا

قدرت اليوريا باستعمال طريقة (Balleterl et al, 1961)، إذ يحرق المصل المعامل بإنزيم Urease الكاربونات و الأمونيوم. تتفاعل أيونات الأمونيوم الناتجة مع Salicylate و Hypochlorite de sodium مشكلة معقد ملون بالأخضر تقرأ كثافته الضوئية عند طول موجة 590 نانومتر وفق المعادلات التالية



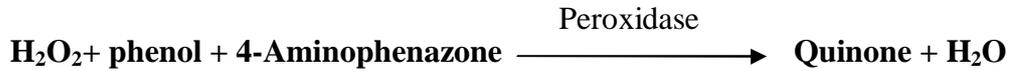
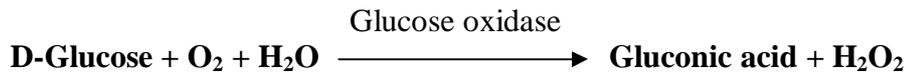
9-9. تقدير تركيز الكرياتينين

اعتمدنا في معايرة الكرياتينين على طريقة Spierto et al. (1979) التي يستعمل فيها حمض البكريك في الوسط القلوي حيث يتفاعل مع الكرياتينين مشكلا معقد ملون تقرأ كثافته الضوئية عند 510 نانومتر.

9-10. تقدير تركيز الجلوكوز

اعتمدنا في معايرة الجلوكوز على طريقة Kaplan et al. (1984)

يؤكسد إنزيم Glucose oxidase الجلوكوز إلى حمض Gluconic مع تكوين الماء الأكسجيني، يعمل إنزيم البيروكسيداز (peroxidase) على تنشيط أكسدة 4-Aminophenazone الموجود في محلول المعايرة في وجود الماء الأكسجيني لتكوين مركب Quinone أحمر اللون، تتناسب شدته مع تركيز الجلوكوز في العينة عند طول موجة 505 نانومتر حسب المعادلات التالية



• تمت معايرة AST و ALT، الجلوكوز، الكلسترول، الجلوسيريدات الثلاثية، اليوريا و الكرياتينين في مخبر الكيمياء الحيوية مستشفى الخروب قسنطينة.

9-11 - تقدير البروتين: تمت معايرته باستعمال طريقة (Lowry et al., 1951).

10- تشيف وصبغ الأجنة

تم استعمال طريقتين لتشيف و صبغ الأجنة المحفوظة

10-1- طريقة Dawson

يمكن تلخيصها في الخطوات التالية:

- 1- تثبت الأجنة في كحول الإيثانول.
- 2- توضع الأجنة في محلول KOH (1 %).
- 3- تغمر الأجنة في محلول مخفف من أحمر الأليزارين (0.1 غ صبغة الأليزارين + 1000 ملل من KOH تركيزه 1 %) ثم تترك حتى تتلون العظام باللون المرغوب فيه.
- 4- توضع الأجنة في محلول ميل Mills Solution.
- 5- تمرر الأجنة المشففة و الملونة عبر تراكيز متزايدة من الجليسرين ثم تحفظ في الجليسرين النقي.

10-2- طريقة Leod

- 1- تثبت الأجنة في الإيثانول 95 % .
- 2- توضع الأجنة في acetone .
- 3- توضع في المحلول الصبغي المحضر حديثا في 37 °م و المتكون من:
 - حجم من 3 % Alcian blue .
 - حجم من 1 % Alizarin reds .
 - حجم من حمض الأسيتيك
- 4- 17 حجم من الإيثانول.
- 4- تغسل بالماء المقطر .
- 5- تجرى عملية التشيف في محلول KOH (1%).
- 6- نشطف بواسطة الجليسرين المخفف بالمحلول المائي لـ KOH (1%).
- 7- تحفظ في الجليسرين النقي.

11- الدراسة النسيجية

تتضمن ملاحظة مجهرية لمقاطع رفيعة لكبد و كلى الفئران الحوامل. لهذا الغرض تم أخذ عينات (قطع) من الكبد و الكلى، ووضعها في الفورمول (10% formol) لحفظها، بعدها يزرع منها الماء وتطمر في البرافين وتم قطعها باستعمال microtome للحصول على مقاطع رفيعة سمكها 5 ميكرون، توضع على

شرائح و تلوّن بصبغة Hématoxyline-éosine. (حيث يلون Hématoxyline الأنوية أما L'éosine فيلون سيتوزول الخلايا)

تمت الدراسة النسيجية في مخبر Anatomie Pathologique مستشفى الخروب قسنطينة.

12- الدراسة الإحصائية

تم تحليل النتائج إحصائياً بإتباع طريقة التباين ANOVA، و مقارنة متوسطات المعاملات بإستعمال إختبار Newman-Keuls و إختبار Student، بالإضافة إلى دراسة الارتباط بين مختلف المتغيرات (المؤشرات) و ذلك بالاعتماد على برامج إحصائية SPSS و STATITCF.

*الرموز الإحصائية

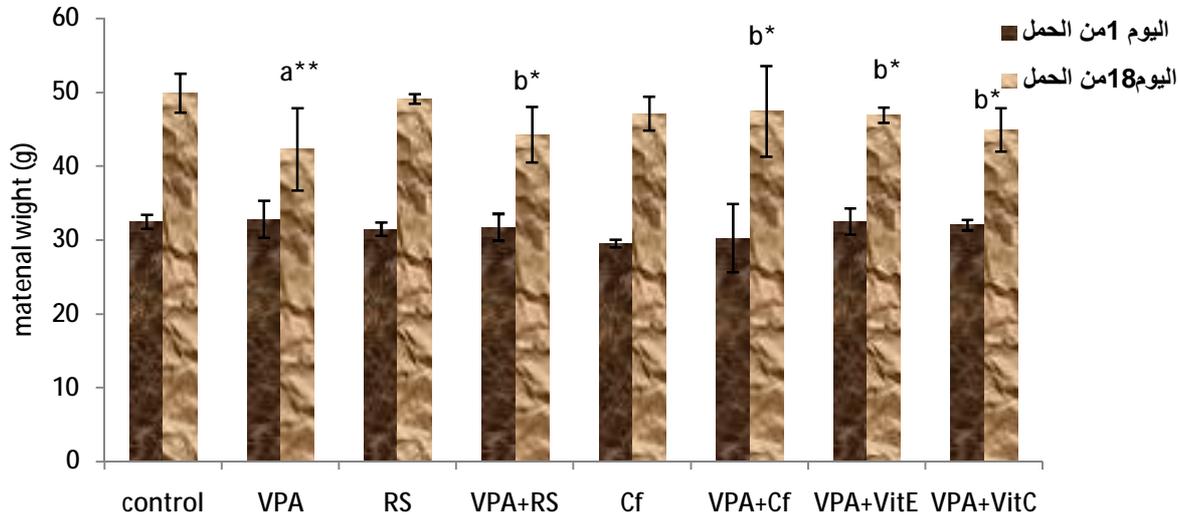
- a : فرق معنوي بين الفئران الشاهد وبقية المعاملات
b : فرق معنوي بين الفئران المعاملة بدواء و بقية المعاملات
p≤0.05 :*
p≤0.01 :**
p≤0.001 :***

III- النتائج

1- تأثير المعاملات المختلفة على حسيلا الكاثر

1-1- وزن الفئران الحوامل

أدت معاملة الفئران بدواء VPA بجرعة 400 مغ/كغ إلى إنخفاض معنوي في وزن الحيوانات الحوامل خلال فترة الحمل ($P \leq 0.01$) خاصة في الأسبوع الأخير مقارنة بالحيوانات الشاهد (شكل 19). غير أن تزويد الفئران بفيتامين E (100مغ/كغ)، فيتامين C (8.3مغ/كغ) و المستخلص البيتانولي لنباتي *Chrysanthemum fontanesii* (Cf) و *Rhantherium suaveolens* (Rs) نتج عنها إرتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) في وزن الفئران المعاملة بدواء VPA خلال الأسبوع الأخير للحمل (شكل 19).



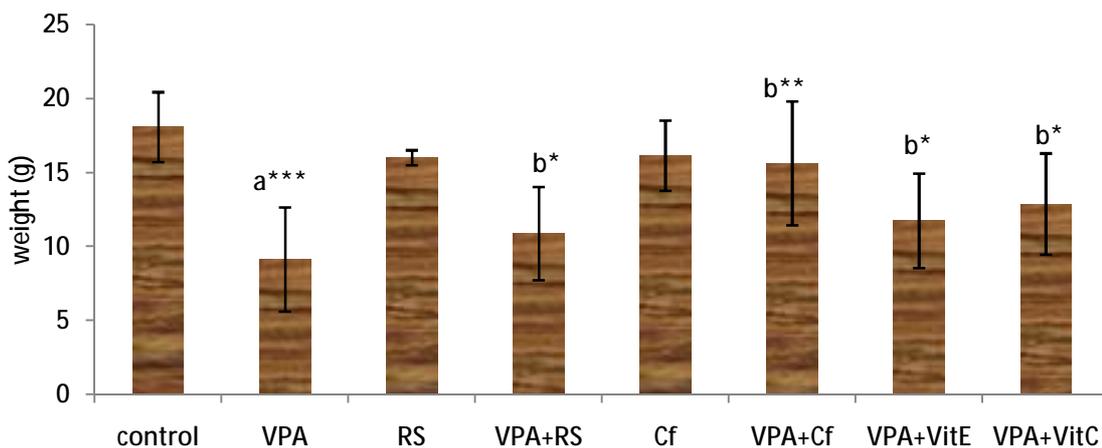
شكل 19. تأثير دواء VPA، فيتامين E، فيتامين C و المستخلص البيتانولي لنبات

C. fontanesii و *R. suaveolens* على وزن الفئران الحوامل

a: فرق معنوي بين الفئران الشاهد وبقية المعاملات، b: فرق معنوي بين الفئران المعاملة بدواء VPA و بقية المعاملات
* $p \leq 0.05$: *، $p \leq 0.01$: **، $p \leq 0.001$: ***

1-2- وزن الحمل

نلاحظ إنخفاض معنوي ($P \leq 0.001$) في معدل وزن الأرحام الحوامل للفئران المعاملة بدواء VPA مقارنة بأرحام الفئران الشواهد (شكل 20)، بالمقابل نلاحظ إرتفاع معنوي في وزن أرحام الفئران المعاملة بفيتامين E و دواء VPA ($P \leq 0.05$)، فيتامين C و دواء VPA ($P \leq 0.05$)، دواء VPA و المستخلص البيتانولي لنبات Cf ($P \leq 0.01$) و Rs ($P \leq 0.05$) مقارنة مع وزن أرحام الفئران المعاملة بدواء VPA.



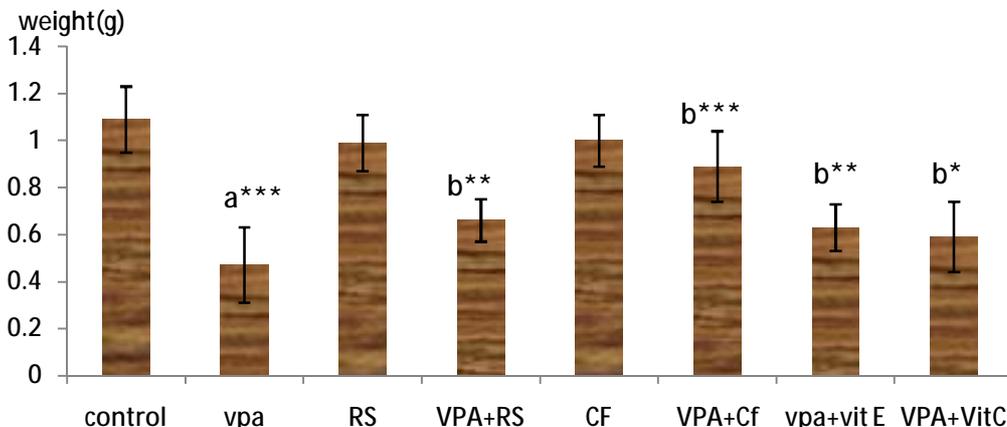
شكل 20 : تأثير دواء VPA، فيتامين E، فيتامين C و المستخلص البوتانولي لنبات

R. suaveolens و *C. fontanesii* على وزن الرحم

a: فرق معنوي بين الفئران الشاهد وبقية المعاملات، b: فرق معنوي بين الفئران المعاملة بدواء VPA و بقية المعاملات
 $p \leq 0.001$:*** $p \leq 0.01$:**, $p \leq 0.05$: *

3-1- وزن الجنين

تميزت أجنة الفئران المعاملة بدواء VPA بتباينها من حيث النمو و الوزن، إذ نلاحظ انخفاض وزنها مقارنة بأجنة الفئران الشاهد ($P \leq 0.001$)، حيث بلغ متوسط وزن أجنة الفئران المعاملة بدواء VPA 0.48 غ في حين بلغ 1.07 غ عند أجنة الشواهد (شكل 21).



شكل 21. تأثير دواء VPA، فيتامين E، فيتامين C و المستخلص البيتانولي لنبات

R. Suaveolens و *C. fontanesii* على وزن الجنين

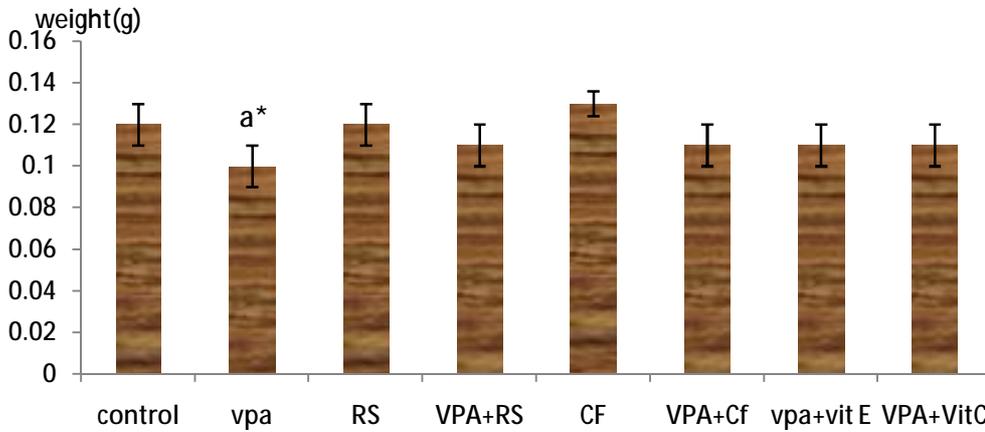
a: فرق معنوي بين الفئران الشاهد وبقية المعاملات، b: فرق معنوي بين الفئران المعاملة بدواء VPA و بقية المعاملات
 $p \leq 0.001$:*** $p \leq 0.01$:**, $p \leq 0.05$: *

بالمقابل لم يؤثر فيتامين E، C و المستخلص البيتانولي كل على حدى على وزن الجنين مقارنة بالشواهد، في حين نتج عن معاملة الفئران بدواء VPA و المستخلص البيتانولي لنبات *Cf* ارتفاع معنوي ($P \leq 0.001$) في وزن الأجنة مقارنة بأجنة الفئران المعاملة بدواء VPA، كذلك لوحظ ارتفاع معنوي في وزن أجنة الفئران المعاملة بدواء VPA و فيتامين E، دواء VPA و المستخلص البيتانولي لنبات *Rs*

($P \leq 0.01$) مقارنة بأجنة الفئران المعاملة بدواء VPA. كما سجل ارتفاعا معنويا ($P \leq 0.05$) في وزن أجنة الفئران المعاملة بدواء VPA و فيتامين C مقارنة بأجنة الفئران المعاملة بدواء VPA فقط (شكل 21).

1-4- وزن المشيمة

أدت معاملة الفئران الحوامل بدواء VPA بجرعة 400مغ/كغ إلى تأخر في نمو المشيمة، و يظهر ذلك جليا من خلال الإنخفاض المعنوي ($P \leq 0.05$) في وزن مشيمة أجنة الفئران، حيث بلغ 0.098 غ مقابل 0.12 غ عند الشواهد (شكل 22). بالمقابل لم يؤثر كل من فيتامين E، C و المستخلصات البيتانولية كل على حدى على وزن المشيمة مقارنة بالشواهد، إضافة إلى ذلك لم تقي هذه المواد من إنخفاض وزن المشيمة المحرض بدواء VPA (شكل 22).



شكل 22. تأثير دواء VPA، فيتامين E، فيتامين C و المستخلص البيتانولي لنبات *R. Suaveolens* و *C. fontanesii* على وزن المشيمة

a: فرق معنوي بين الفئران الشاهد وبقية المعاملات، b: فرق معنوي بين الفئران المعاملة بدواء VPA و بقية المعاملات
* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$

1-5- التشوهات الجنينية

1-5-1- إدمصاص الأجنة

نلاحظ إرتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) في نسبة الأجنة الميتة أو المدمصة (صورة 4) التي لم يكتمل نموها في حمل الفئران المعاملة بدواء VPA. حيث بلغت 38.05% مقابل 6.77% لدى الفئران الشاهد (جدول 1). كما نلاحظ إنخفاض معنوي ($P \leq 0.05$) في نسبة إدمصاص الأجنة في حمل الفئران المعاملة بدواء VPA و فيتامين E، دواء VPA و المستخلص البيتانولي لنبات *Cf* و *Rs* مقارنة بحمل الفئران المعاملة بدواء VPA. بينما كان الإنخفاض غير معنوي في حمل الفئران المعاملة بدواء VPA و فيتامين C مقارنة بالفئران المعاملة بدواء VPA (جدول 1).



صورة 4. ادمصاص كلي لأجنة فأرة حامل معاملة بدواء VPA 5 x

جدول 1. تأثير مختلف المعاملات على الأجنة

% التشوهات الهيكلية	% لفتح جفن العين	% Exencephaly Cleft palate	% لموت و ادمصاص الأجنة	شواهد
O	O	O	4.28±6.77	
a*** 24.13 ±79.55	a*** 23.14 ±63.10	a** 16 ±37.33	a* 23.47±38.05	دواء VPA (400 ملغ/كلغ)
O	O	O	3.77±6.39	المستخلص البيتانولي لنبات Cf (200 ملغ/كلغ)
b** 12.63±27.61	b** 4.58±24.4	b* 6.74±14.67	b*a* 4.56±13.07	VPA + المستخلص البيتانولي لنبات Cf
O	O	O	3,93±6,87	المستخلص البيتانولي لنبات Rs (200 ملغ/كلغ)
b** 13,60±37,25	b** 8,51±28,26	b* 3,74±19,00	b*a** 3,47±19,3	VPA + المستخلص البيتانولي لنبات Rs
O	O	O	3.77±6.68	فيتامين E (100 ملغ/كلغ)
b** 6.88±34.48	b** 4.47±25.53	b* 6.13±18.04	a*b* 7.73±14.33	VPA + فيتامين E
O	O	O	3.17±5.43	فيتامين C (8.3 ملغ/كلغ)
b** 14.40±35.33	b** 10.20±28.27	b* 4.85±19.28	a**b° 8.33±17.87	VPA + فيتامين C

a: فرق معنوي بين أجنة الفئران الشاهد وبقية المعاملات

b: فرق معنوي بين أجنة الفئران المعاملة بدواء و بقية المعاملات

* : p≤0.05 ** : p≤0.01 *** : p≤0.001

1-5-2-التشوهات الخارجية

لم يسجل ظهور التشوهات الجنينية لدى أجنة الفئران الشاهد (صورة5) و الفئران المعاملة بفيتامين E (صورة6)، فيتامينC (صورة7) والمستخلص البيتانولي لنباتتي *Cf* و *Rs* (صورة8 و 9)، بينما كانت نسبتها مرتفعة لدى أجنة الفئران المعاملة بدواء VPA والتي تجلت في تأخر في النمو، *exencephaly*، و *cleft palate* و بروز اللسان(صورة10) بنسبة 37.33 %، فتح جفن العين بنسبة 63.10 % (صورة11)، و هذه الفروق معنوية عند $P \leq 0.01$.



صورة5. جنين شاهد 5 x



صورة6. جنين معاملة بفيتامينE
5 x



صورة7. جنين معاملة
بفيتامين C 5 x



صورة8. جنين معاملة بالمستخلص
البيتانولي لنبات *Rs* 5 x



صورة9. جنين معاملة بالمستخلص
البيتانولي لنبات *Cf* 5 x



صورة 10. جنين مشوه لفأرة معاملة بدواء VPA يعاني من Exencephaly و cleft palate 5 x



صورة 11. أجنة مشوهة و متأخرة النمو لفأرة معاملة بدواء VPA 5 x



صورة 12. أجنة مشوهة و متأخرة النمو لفأرة معاملة بدواء VPA تتميز بفتح جفن العين 5 x

والجدر بالذكر أن كل من فيتامين E، فيتامين C و المستخلص البيتانولي لنباتي *Cf* و *Rs* تقلل جزئياً من التشوهات الجنينية المحرصة بدواء VPA ولا تمنع حدوثها، و يتجلى ذلك من خلال التشوهات الجنينية الملاحظة لدى أجنة الفئران المعاملة بدواء VPA و فيتامين E، دواء VPA و فيتامين C، دواء VPA و المستخلصين البيتانوليين (جدول 1)، حيث يقلل فيتامين E من التشوهات الجنينية المتضمنة لـ *exencephaly* و بروز اللسان بنسبة 51.75%، فتح جفن العين بنسبة 56.57%، بينما يقلل فيتامين C من هذه التشوهات بنسبة 48.37% ($P \leq 0.05$)، 55.19% ($P \leq 0.01$) مقارنة بأجنة الفئران المعاملة بدواء VPA. كما أدت المعاملة بالمستخلص البيتانولي لنباتي *Cf* و *Rs* إلي نقص معنوي في نسبة ظهور التشوهات الجنينية المتضمنة لـ *exencephaly* بنسبة 60.70% و 49.20% ($P \leq 0.05$) على التوالي، فتح جفن العين بنسبة 61.33% و 55.21% ($P \leq 0.01$) على التوالي مقارنة بأجنة الفئران المعاملة بدواء VPA (جدول 1).

1-5-3- التشوهات الهيكلية

تم الكشف عن التشوهات الهيكلية بعد أن تم تشييف الأجنة و تلوينها بأحمر الأليزارين، كما تم الكشف عن التأخر في النمو من خلال إنخفاض وزن الأجنة و التأخر في التعظم الذي تم الكشف عليه بتلوين الأجنة بصبغة alcian blue التي تستعمل لصبغ العظام، و لقد إتضح لنا بأن نمو أجنة الفئران الشواهد كان طبيعياً (صورة 13، 20) و كذلك الأمر بالنسبة لأجنة الفئران المعاملة بفيتامين E (صورة 14، 21)، فيتامين C (صورة 15، 22) و المستخلص البيتانولي لنباتي *Cf* و *Rs* (صورة 16، 23 و 17، 24). في حين بدت التشوهات الهيكلية و التأخر في النمو جلياً لدى أجنة الفئران المعاملة بدواء VPA. خصوصاً على مستوى الأضلاع، الفقارات و الجمجمة، تتمثل تشوهات الأضلاع في إعوجاجها (صورة 19)، في حين تنحصر العيوب الفقرية في تقوس العمود الفقري *ciphosis* و *Scoliosis* (صورة 19)، و التأخر في التعظم (تلون العمود الفقري باللون الأزرق المميز لصبغة alcian blue) (صورة 25)، أما تشوه الرأس فيقتصر على غياب قبة الجمجمة (صورة 18).



صورة 13. جنين شاهد
5 x (Alizarin red S)



صورة 14. جنين معاملة بفيتامين E
5 x (Alizarin red S)



صورة 15. جنين معاملة
بفيتامين C
5 x (Alizarin red S)



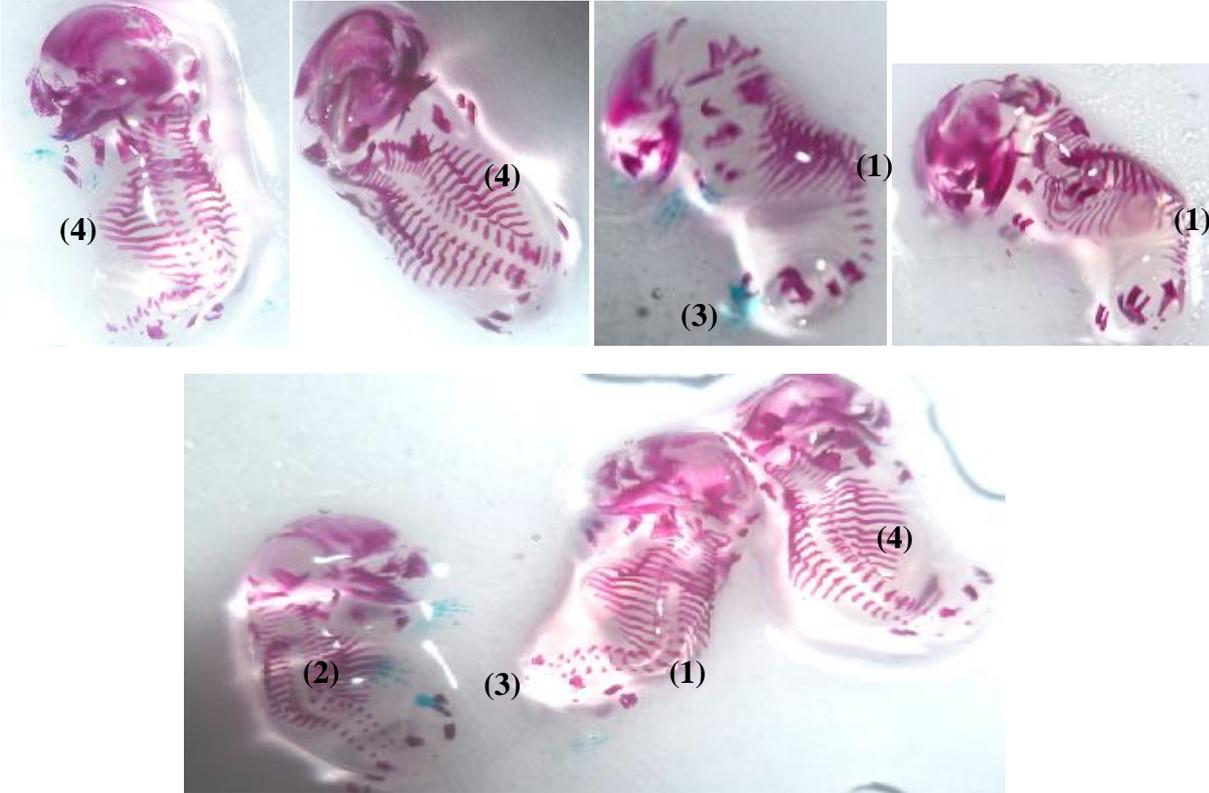
صورة 17. جنين معاملة بالمستخلص
البيتانولي لنبات *Rs*
5 x (Alizarin red S)



صورة 16. جنين معاملة بالمستخلص
البيتانولي لنبات *Cf*
5 x (Alizarin red S)



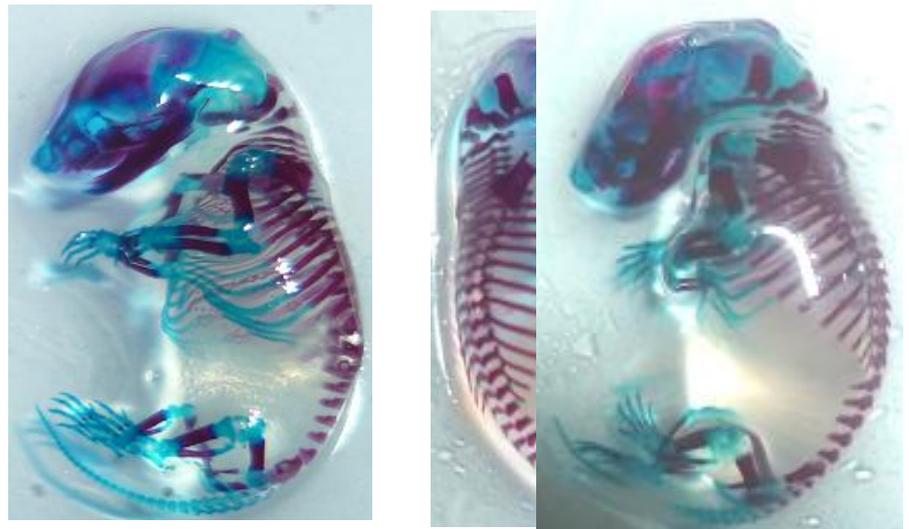
صورة 18. جنين مشوه لفأرة معاملة بدواء VPA يعاني من غياب فقارات الذيل و غياب قبة الجمجمة (Alizarin red S) 5 x



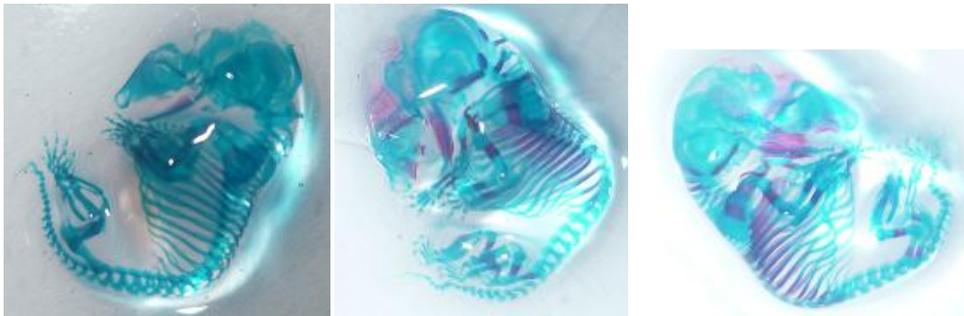
صورة 19. أجنة مشوهة لفأرة معاملة بدواء VPA تعاني من تشوهات من نوع Ciphosis (1); Scoliosis (2), inhibition of ossification (3) and malformed ribs (curved) (4) 5 x (Alizarin red S)



صورة 21. جنين معاملة بفيتامين E
صورة 20. أجنة شاهد (Alizarin red S and Alcian blue) 5 x

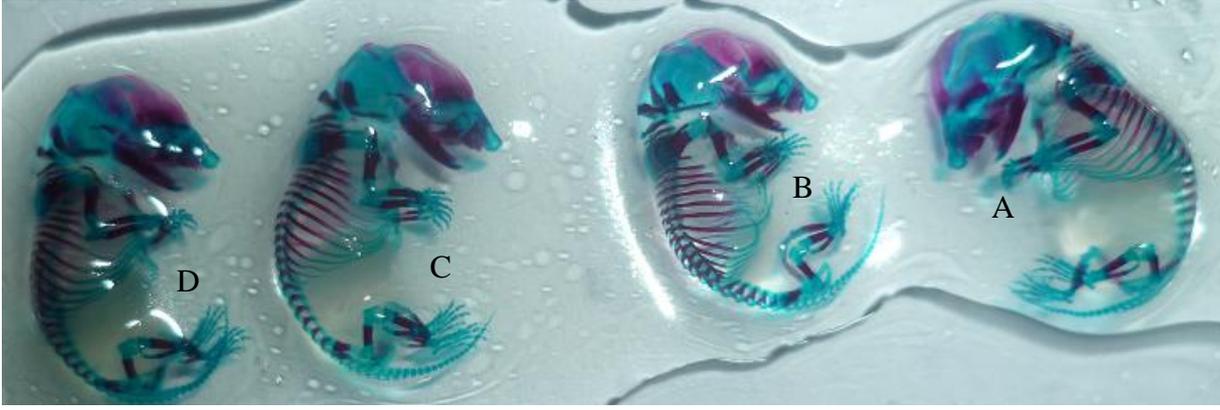


صورة 22. جنين معاملة بفيتامين C
صورة 23. جنين معاملة بالمستخلص البيتانولي لنبات Cf
صورة 24. جنين معاملة بالمستخلص البيتانولي لنبات Rs
(Alizarin red S and Alcian blue) 5 x (Alizarin red S and Alcian blue) 5 x



من تشوهات من نوع Ciphosis
5 x (Alizarin red S)

الإحصائية بأن فيتامين E، فيتامين C و المستخلص البيتانولي لنباتي *Cf* و *Rs* تقلل جزئياً من التشوهات الهيكلية المحرصة بدواء VPA ولا تمنعها (صورة 26)، و يتجلى ذلك من خلال الجدول 1، حيث يقلل فيتامين E من التشوهات الهيكلية بنسبة 56.67% ($P \leq 0.01$)، بينما يقلل فيتامين C من هذه التشوهات بنسبة 55.56% ($P \leq 0.01$) مقارنة بأجنة الفئران المعاملة بدواء VPA، في حين يقلل المستخلص البيتانولي لنباتي *Cf* و *Rs* معنوياً من نسبة ظهور التشوهات الهيكلية بنسبة 65.31% و 50% ($P \leq 0.01$) على التوالي مقارنة بأجنة الفئران المعاملة بدواء VPA .

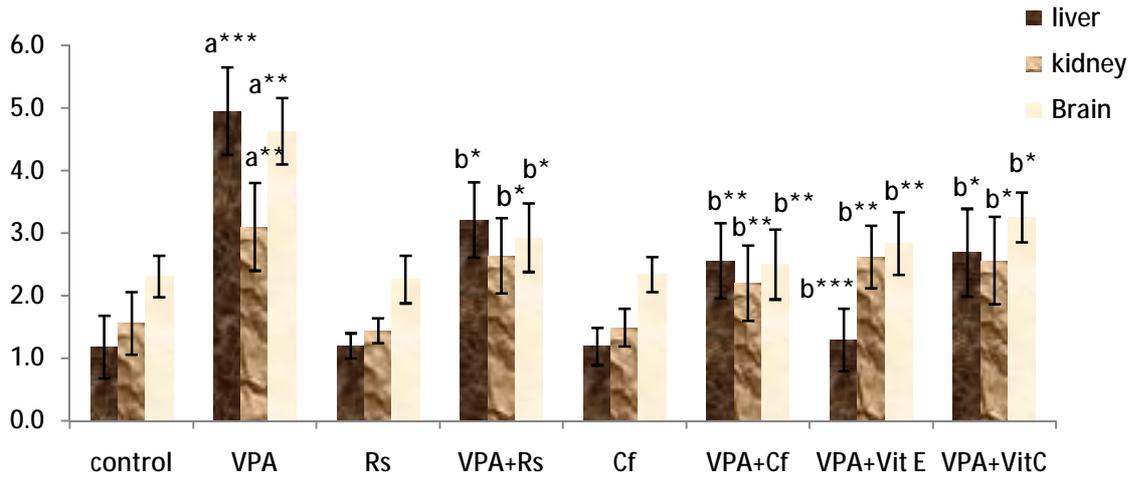


صورة 26. أجنة فئران معاملة بفيتامين E و بدواء VPA (A)، بفيتامين C و بدواء VPA (B)، بالمستخلص الفينولي لنبات *Cf* و بدواء VPA (C)، بالمستخلص البيتانولي لنبات *Rs* و بدواء VPA (D) تعاني من تأخر في النمو و التعظم (Alizarin red S and Alcian blue)

2- تأثير المعاملات المختلفة على تركيز MDA

1-2- على مستوى أنسجة الفأر

لوحظ إرتفاع معنوي في تركيز MDA على مستوى كل من كبد ($P \leq 0.001$)، مخ ($P \leq 0.01$) و كلى ($P \leq 0.01$) الفئران المعاملة بدواء VPA مقارنة بالشواهد (شكل 23).



شكل 23. تأثير دواء VPA، فيتامين E، فيتامين C و المستخلص البيتانولي لنباتي

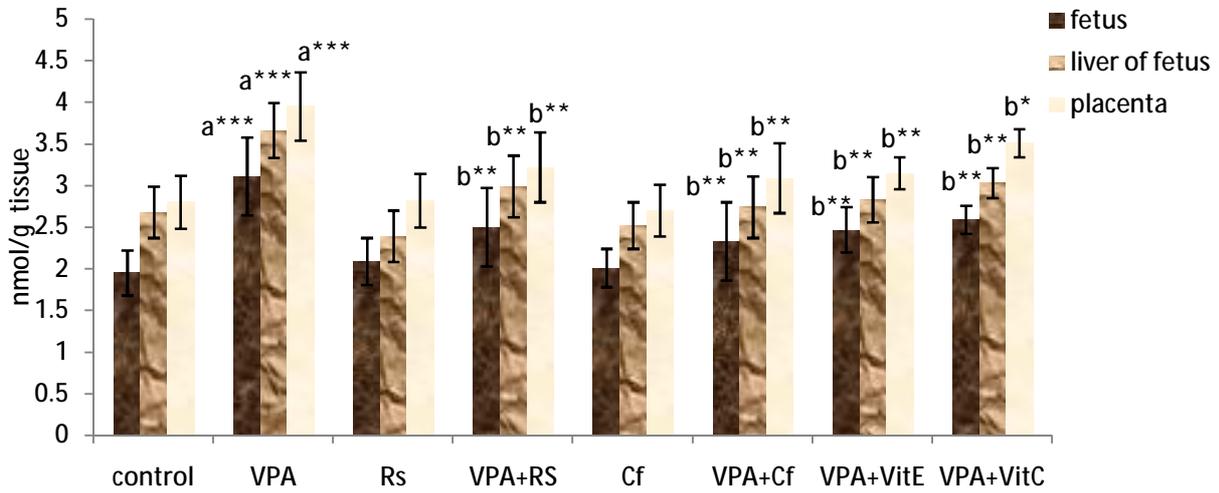
R. Suaveolens و *C. fontanesii* على تركيز MDA في أنسجة الفئران الحوامل

a: فرق معنوي بين الفئران الشاهد وبقية المعاملات، b: فرق معنوي بين الفئران المعاملة بدواء VPA و بقية المعاملات
* $p \leq 0.05$: **، $p \leq 0.01$:*** $p \leq 0.001$:

غير أن المعاملة بفيتامين E، C و المستخلص البيتانولي لنباتي *Cf* و *Rs* كل على حدى لم تؤثر على تركيز MDA في أنسجة الفئران الحوامل مقارنة بالشواهد، و قد ظهر جليا الدور الوقائي للمستخلص البيتانولي لنباتي *Cf* و *Rs*، فيتامين E و C، حيث أدت المعاملة بالمستخلص البيتانولي لنبات *Cf* و الفيتامين E إلى انخفاض معنوي في تركيز MDA على مستوى كبد، كلية و مخ الفئران المعاملة بدواء VPA عند ($P \leq 0.01$)، أما المعاملة بالفيتامين C و المستخلص البيتانولي لنبات *Rs* فأدت إلى نقص معنوي من تركيز MDA على مستوى الكبد، الكلية و المخ عند ($P \leq 0.05$) لدى الفئران المعاملة بدواء VPA (شكل 23).

2-2 - على مستوى أنسجة الجنين والمشيمة

يحرص دواء VPA إرتفاع معنوي ($P \leq 0.001$) في تركيز MDA على مستوى أنسجة الجنين، كبد الجنين، و مشيمة الفئران المعاملة بدواء VPA مقارنة بالفئران الشواهد (شكل 24). بينما لم يلاحظ هذا الارتفاع عند الفئران المعاملة بالمستخلصين البيتانوليين، فيتامين E و فيتامين C، في حين تعمل هذه المواد على التخفيض من تركيز MDA في أنسجة جنين، كبد جنين ومشيمة الفئران المعاملة بدواء VPA، حيث قلل فيتامين E، المستخلص البيتانولي لنبات *Cf* و *Rs* معنويا من تركيز MDA لدى الجنين، كبد ومشيمة الجنين عند ($P \leq 0.01$) (شكل 24). بينما قلل فيتامين C معنويا من تركيز MDA على مستوى الجنين، كبد و مشيمة الجنين عند ($P \leq 0.01$) ($P \leq 0.01$) ($P \leq 0.05$) على التوالي لدى الفئران المعاملة بدواء VPA.

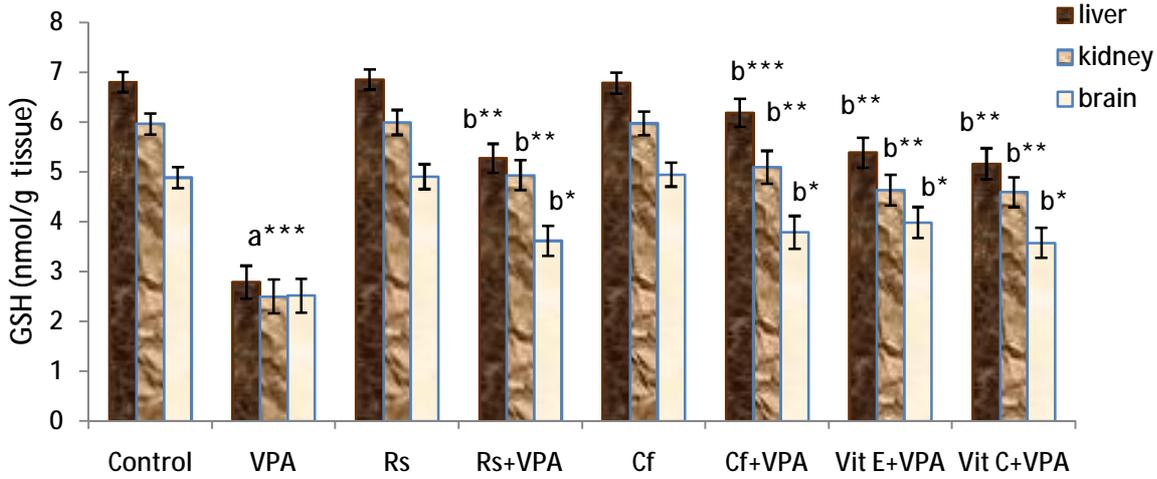


شكل 24. تأثير دواء VPA، فيتامين E، فيتامين C و المستخلص البيتانولي لنباتي *R. Suaveolens* و *C. fontanesii* على تركيز MDA في أنسجة الجنين والمشيمة

a: فرق معنوي بين الفئران الشاهد وبقية المعاملات، b: فرق معنوي بين الفئران المعاملة بدواء VPA و بقية المعاملات
 $p \leq 0.001$:*** $p \leq 0.01$:**، $p \leq 0.05$:*

3- تأثير المعاملات المختلفة على تركيز GSH

يوضح الشكل 25 إنخفاض معنوي ($P \leq 0.001$) في مستوى GSH في كل من كبد، مخ و كلى الفئران المعاملة بدواء VPA مقارنة بالشواهد، غير أن المعاملة بفيتامين E، C و المستخلص البيتانولي لنبات *Cf* و *Rs* لم تؤثر على مستوى GSH في أنسجة الفئران الحوامل مقارنة بالشواهد.



شكل 25. تأثير دواء VPA، فيتامين E، فيتامين C و المستخلص البيتانولي لنباتي

R. Suaveolens و *C. fontanesii* على مستوى GSH في أنسجة الفئران الحوامل

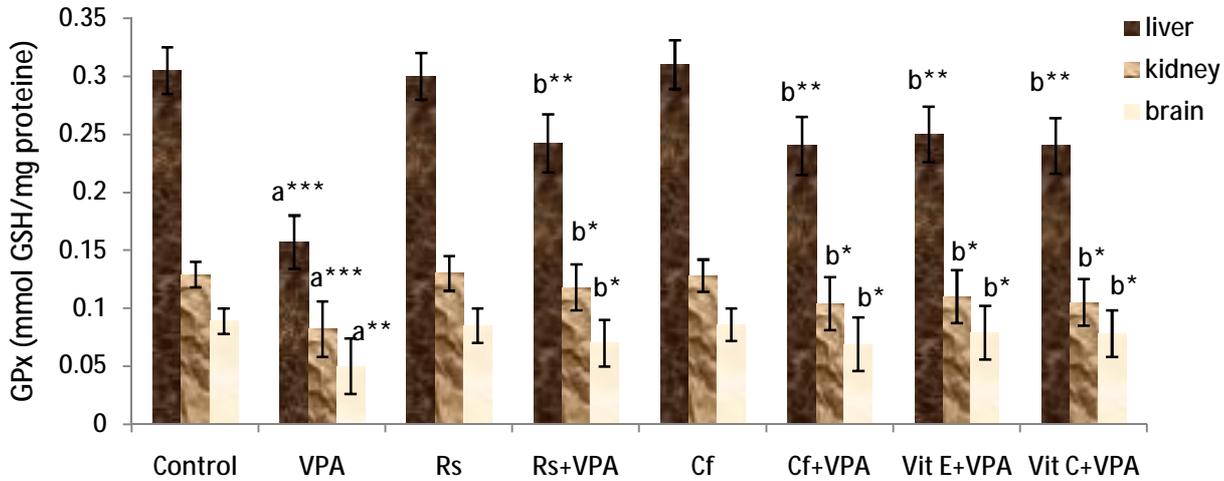
a: فرق معنوي بين الفئران الشاهد وبقية المعاملات، b: فرق معنوي بين الفئران المعاملة بدواء VPA و بقية المعاملات
 $p \leq 0.001$:*** $p \leq 0.01$:**، $p \leq 0.05$:*

أدت المعاملة بالمستخلص البيتانولي لنبات *Cf* إلى ارتفاع معنوي في مستوى GSH كبد ($P \leq 0.001$)، كلية ($P \leq 0.01$) ومخ ($P \leq 0.05$) الفئران المعاملة بدواء VPA، أما المستخلص البيتانولي لنبات *Rs*، فيتامين E و C فقد أديا قدرة على الرفع المعنوي من مستوى GSH الكبد، الكلية والمخ عند ($P \leq 0.01$) ($P \leq 0.01$)، ($P \leq 0.05$) على التوالي لدى الفئران المعاملة بدواء VPA.

4- تأثير المعاملات المختلفة على نشاط إنزيم GPx

أدت معاملة الفئران الحوامل بدواء VPA بجرعة 400مغ/كغ إلى الانخفاض المعنوي في نشاط إنزيم GPx الكبد ($P \leq 0.001$)، المخ ($P \leq 0.001$) و الكلى ($P \leq 0.01$) مقارنة بالشواهد، غير أن المعاملة بفيتامين E، C و المستخلصين البيتانوليين لم تؤثر على نشاط إنزيم GPx أنسجة الفئران الحوامل مقارنة بالشواهد (شكل 26).

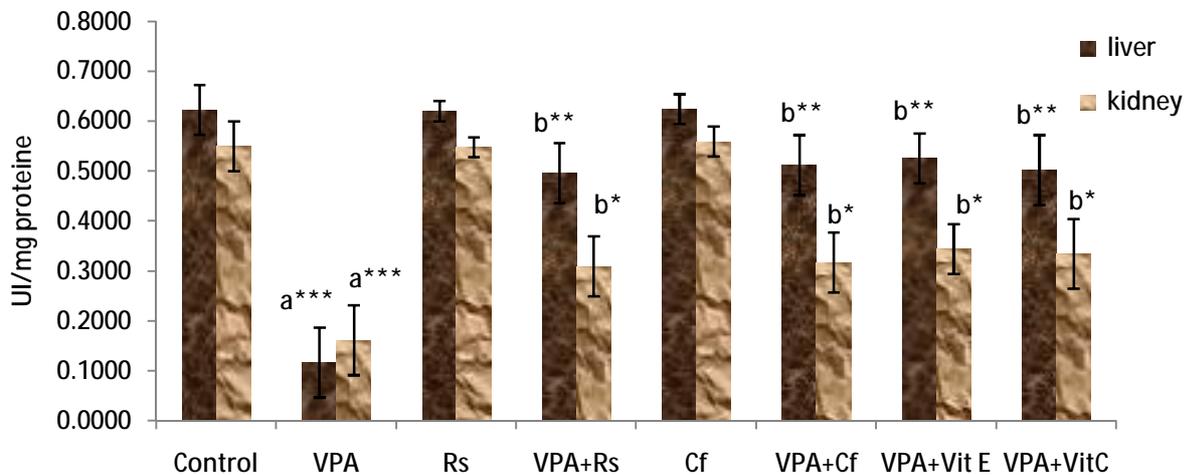
غير أن المعاملة بالمستخلص البيتانولي لنباتي *Cf* و *Rs*، فيتامين E و C فأدت إلى ارتفاع معنوي في نشاط إنزيم GPx على مستوى كبد ($P \leq 0.01$)، كلية ($P \leq 0.05$)، ومخ ($P \leq 0.05$) الفئران المعاملة بدواء VPA (شكل 26).



شكل 26. تأثير دواء VPA، فيتامين E، فيتامين C و المستخلص البيتانولي لنباتي *R. Suaveolens* و *C. fontanesii* على نشاط إنزيم GPx في أنسجة الفئران الحوامل
 a فرق معنوي بين الفئران الشاهد وبقية المعاملات، b: فرق معنوي بين الفئران المعاملة بدواء VPA و بقية المعاملات
 $p \leq 0.001$:*** $p \leq 0.01$:** ، $p \leq 0.05$: *

5- تأثير المعاملات المختلفة على نشاط إنزيم Catalase

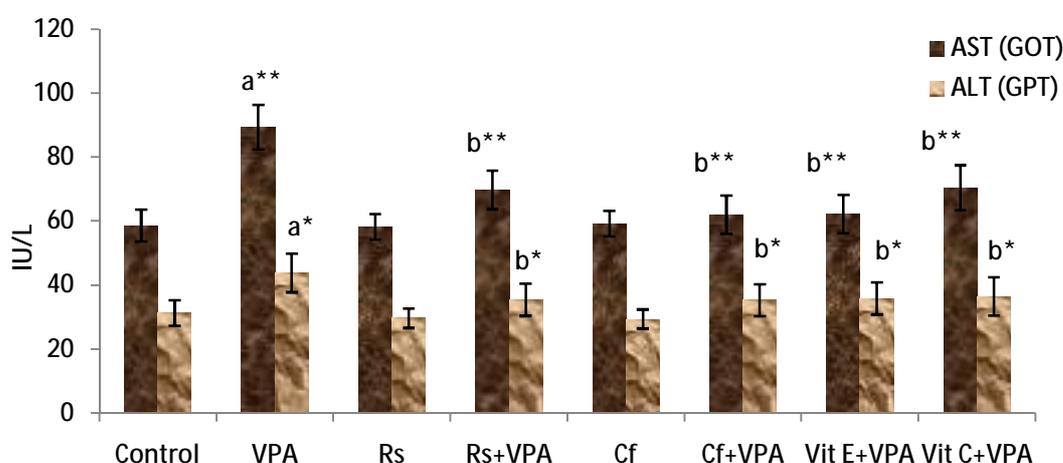
حرض دواء VPA انخفاض معنوي في نشاط إنزيم Catalase على مستوى كل من الكبد والكلية ($P \leq 0.001$) مقارنة بالشواهد، ولم يؤثر كل من فيتامين E، C و المستخلصين البيتانوليين لنبات *Rs* و *Cf* على نشاط إنزيم Catalase أنسجة الفئران الحوامل مقارنة بالشواهد (شكل 27). بالمقابل أدت المعاملة بالمستخلص البيتانولي لنباتي *Rs* و *Cf*، فيتامين E و C إلى ارتفاع معنوي في نشاط إنزيم Catalase كبد ($P \leq 0.01$) و كلية ($P \leq 0.05$) الفئران المعاملة بدواء VPA .



شكل 27. تأثير دواء VPA، فيتامين E، فيتامين C و المستخلص البيتانولي لنباتي *R. Suaveolens* و *C. fontanesii* على نشاط إنزيم Catalase في أنسجة الفئران الحوامل
 a: فرق معنوي بين الفئران الشاهد وبقية المعاملات، b: فرق معنوي بين الفئران المعاملة بدواء VPA و بقية المعاملات
 $p \leq 0.001$:*** $p \leq 0.01$:** ، $p \leq 0.05$: *

6- تأثير المعاملات المختلفة على نشاط إنزيمي AST و ALT

يوضح الشكل 28 تأثير دواء VPA على الوظيفة الكبدية حيث لوحظ ارتفاع معنوي في تركيز كل من إنزيم AST ($p < 0.01$) و ALT ($p < 0.05$) في المصل مقارنة بالشواهد. غير أن المعاملة بفيتامين E، C و المستخلصين البيتانوليين كل على حدى لم تؤثر معنويا على تركيز هذين الإنزيمين في مصل الفئران الحوامل مقارنة بالشواهد، وعلى العكس من ذلك فالفئران المعاملة بدواء VPA والمستخلص البيتانولي لنباتي *Cf* و *Rs*، فيتامين E و C أظهرت انخفاض معنوي في تركيز كل من إنزيم ALT ($p < 0.01$) و AST ($p < 0.05$) في المصل.



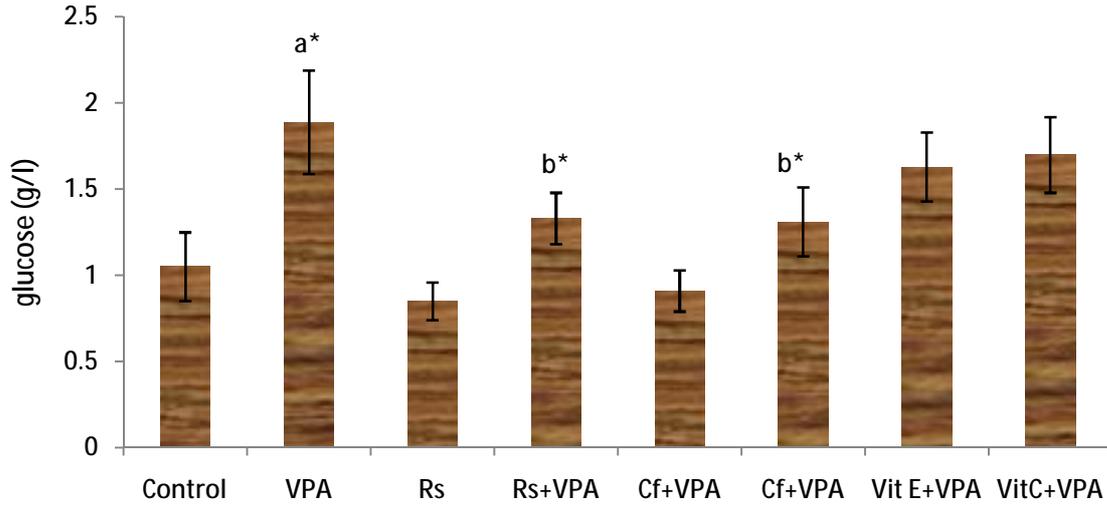
شكل 28: تأثير دواء VPA، فيتامين E، فيتامين C و المستخلص البيتانولي لنباتي

R. Suaveolens و *C. fontanesii* على نشاط إنزيمي AST و ALT.

a: فرق معنوي بين الفئران الشاهد وبقية المعاملات، b: فرق معنوي بين الفئران المعاملة بدواء VPA و بقية المعاملات
* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$

7- تأثير المعاملات المختلفة على تركيز الجلوكوز

أدت معاملة الفئران الحوامل بدواء VPA بجرعة 400مغ/كغ إلى ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) في تركيز الجلوكوز في مصل الفئران المعاملة بدواء VPA مقارنة بالشواهد (شكل 29). غير أن المعاملة بفيتامين E، C و المستخلصين البيتانوليين لنباتي *Cf* و *Rs* لم تؤثر معنويا على تركيز الجلوكوز في مصل الفئران الحوامل مقارنة بالشواهد، و قد ظهر جليا الدور الوقائي للمستخلصين البيتانوليين حيث نتج عن المعاملة بالمستخلص البيتانولي لنباتي *Cf* و *Rs* إنخفاض معنوي في تركيز الجلوكوز عند ($P \leq 0.05$). أما فيتامين E و C فلم يبديا قدرة على التخفيض المعنوي من تركيز الجلوكوز في مصل الفئران المعاملة بدواء VPA.

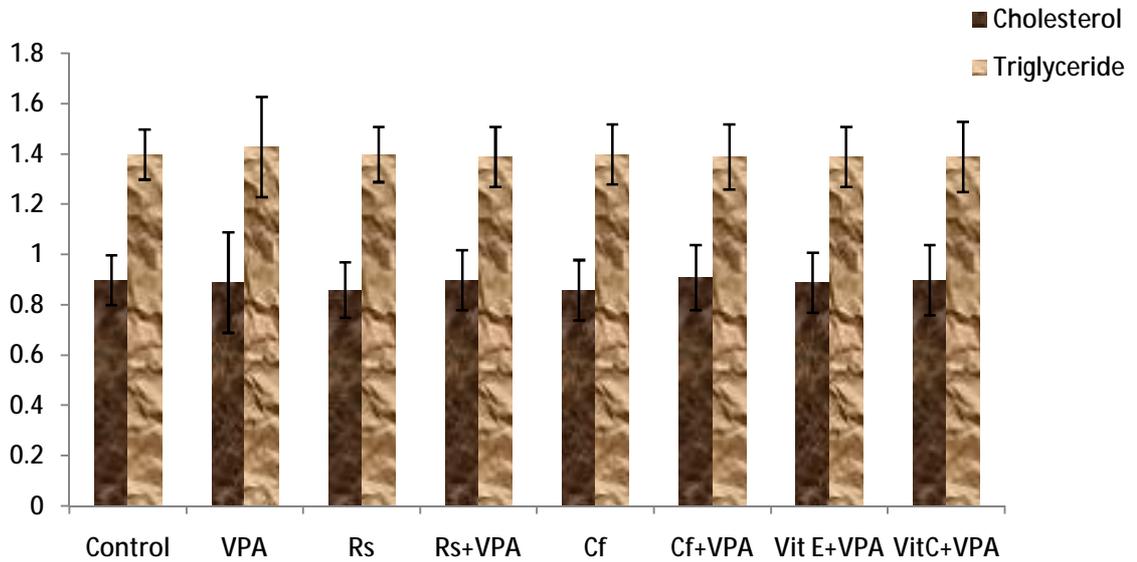


شكل 29. تأثير دواء VPA، فيتامين E، فيتامين C و المستخلص البيتانولي لنباتي *R. Suaveolens* و *C. fontanesii* على تركيز الجلوكوز

a: فرق معنوي بين الفئران الشاهد وبقية المعاملات، b: فرق معنوي بين الفئران المعاملة بدواء VPA و بقية المعاملات
 $p \leq 0.001$:*** $p \leq 0.01$:**, $p \leq 0.05$: *

8- تأثير المعاملات المختلفة على تركيز الكوليسترول و الجلسريدات الثلاثية

لم تؤثر المعاملات المختلفة (دواء VPA، فيتامين E، C و المستخلصات البيتانولية) معنويا على تركيز الكوليسترول و الجلسريدات في مصل الفئران الحوامل مقارنة بالشواهد (شكل 30).

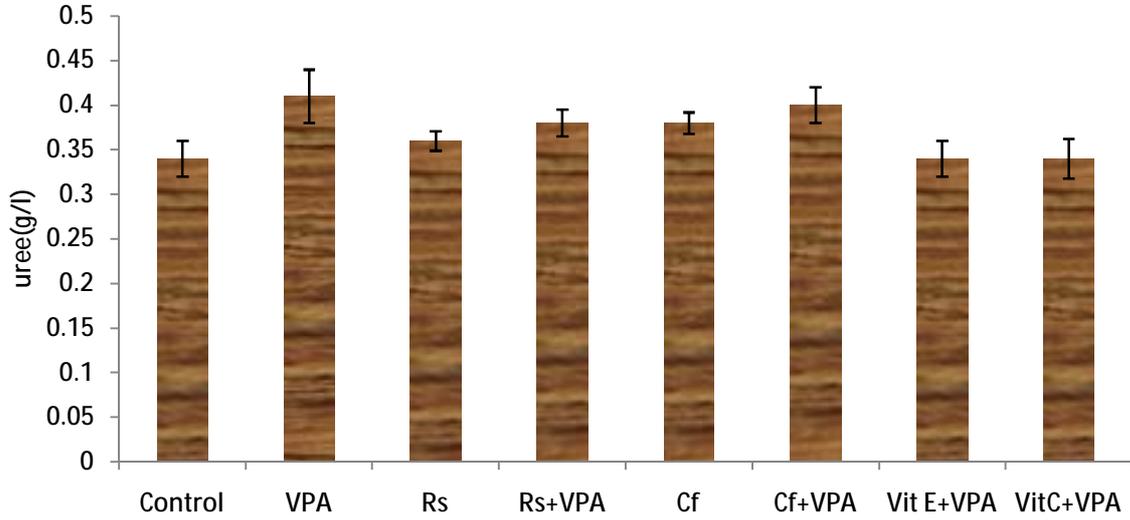


شكل 30. تأثير دواء VPA، فيتامين E، فيتامين C و المستخلص البيتانولي لنباتي *C. fontanesii* و *R. Suaveolens* على تركيز الكوليسترول و الجلسريدات الثلاثية

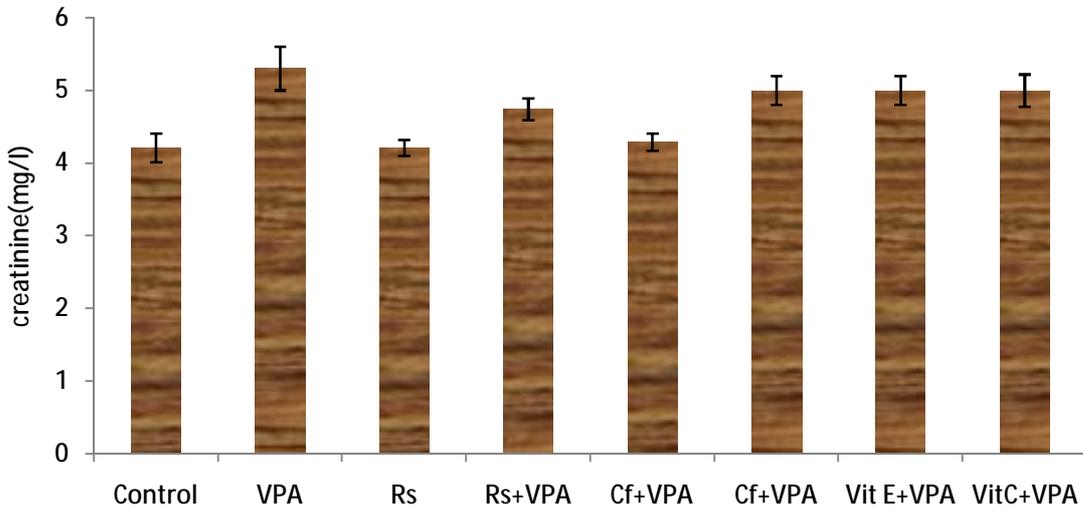
9- تأثير المعاملات المختلفة على تركيز الكرياتينين و اليوريا

يبين الشكلين 31 و 32 عدم تأثير المعاملات المختلفة (دواء VPA، فيتامين E، C و المستخلصين

البيتانولين) معنويا على تركيز الكرياتينين و اليوريا في مصل الفئران الحوامل مقارنة بالشواهد.



شكل 31: تأثير دواء VPA، فيتامين E، فيتامين C و المستخلص البيتانولي لنباتي *R. Suaveolens* و *C. fontanesii* على تركيز اليوريا



شكل 32: تأثير دواء VPA، فيتامين E، فيتامين C و المستخلص البيتانولي لنباتي *R. Suaveolens* و *C. fontanesii* على تركيز الكرياتينين

10- الدراسة النسيجية

10-1- على مستوى الكبد

أدت معاملة الفئران الحوامل بدواء VPA إلى تغيرات مرفولوجية على مستوى الكبد تمثلت في تشحم الكبد (steatosis)، الموت الموضعي للخلايا (necrosis)، بالقرب من المناطق المنخورة نلاحظ كتل من الخلايا المنتفخة (ballooning cell)، تمدد الأوعية الدموية، احتقان وعائي (congestion)، استسقاء موضعي (oedema) و تسلل الخلايا الالتهابية (inflammatory cell infiltrates) (صورة 28)

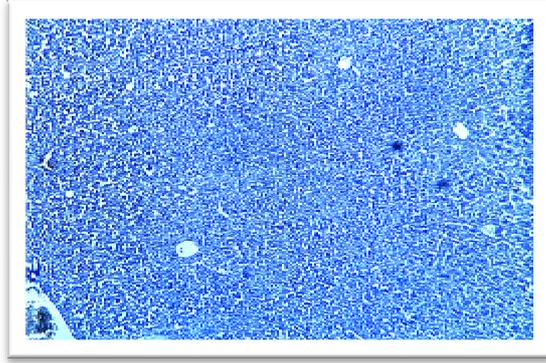
بالمقابل أدت معاملة الفئران بفيتامين C و المستخلص البيتانولي لنباتي Cf و Rs إلى التقليل من التغيرات المرفولوجية المحرصة بدواء VPA حيث نلاحظ غياب كلي للتشم الكبدي، استسقاء موضعي (oedema) و تسلل الخلايا الالتهابية (inflammatory cell infiltrates) مع وجود موت موضعي محلي للخلايا الكبدية (focal necrosis) (صورة 30، 31، 34، جدول 2)

أما عند الحيوانات المعاملة بفيتامين E فنلاحظ غياب كلي للتشم الكبدي، الموت الموضعي للخلايا، تسرب السوائل (oedema) و تسلل الخلايا الالتهابية (inflammatory cell infiltrates) (صورة 32، جدول 2)

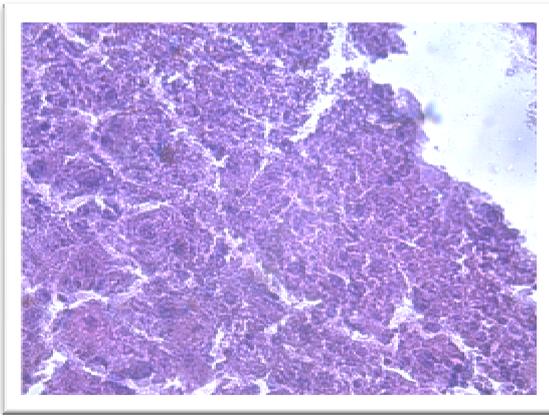
10-2- على مستوى الكلى

أدت معاملة الفئران الحوامل بدواء VPA إلى تغيرات مرفولوجية على مستوى الكلى تمثلت في الموت الموضعي للخلايا (necrosis)، تمدد الأوعية الدموية، استسقاء موضعي (oedema) و تسلل الخلايا الالتهابية (inflammatory cell infiltrates) (صورة 36)

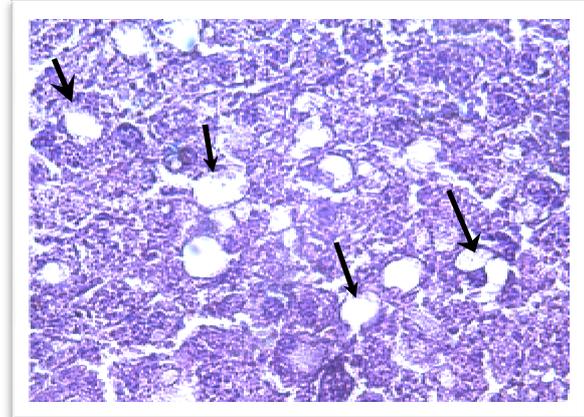
بالمقابل أدت معاملة الفئران بفيتامين E، C و المستخلص البيتانولي لنبات Cf و Rs إلى التقليل من التغيرات المرفولوجية المحرصة بدواء VPA حيث نلاحظ غياب كلي للموت الموضعي للخلايا (necrosis) و انخفاض في نسبة الاستسقاء الموضعي (oedema) و تسلل الخلايا الالتهابية (صورة 38، 40، 41، 42، جدول 3)



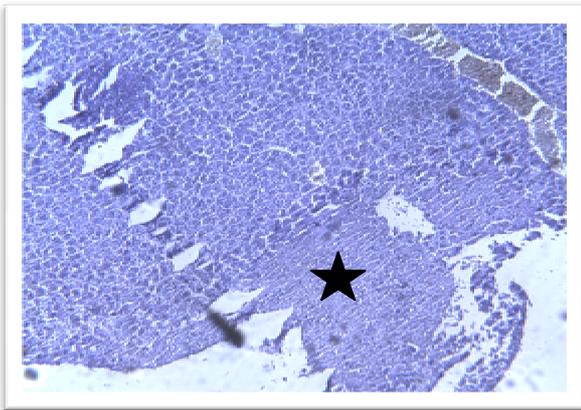
صورة. 27. ملاحظة مجهرية لكبد الفئران الشاهد x 100



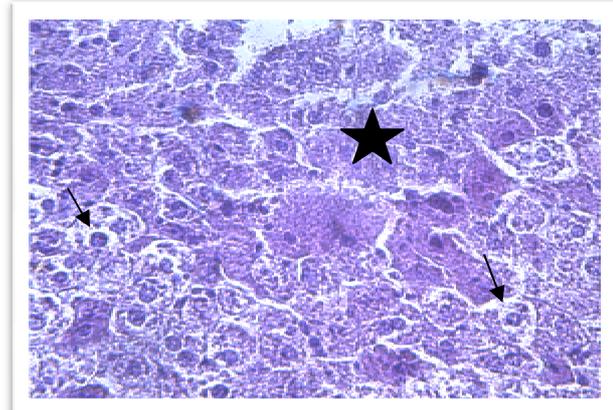
400 x الموت الموضعي للخلايا الكبدية (Necrosis)



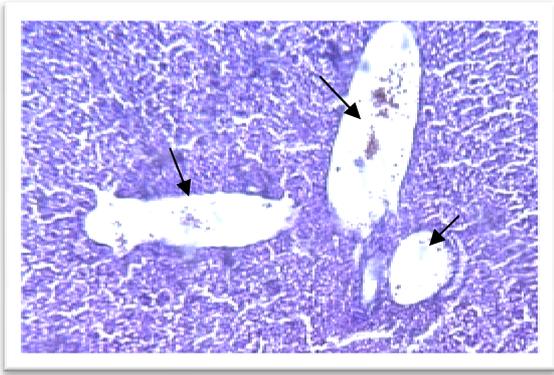
400x تشحم الكبد (Steatosis) 28a



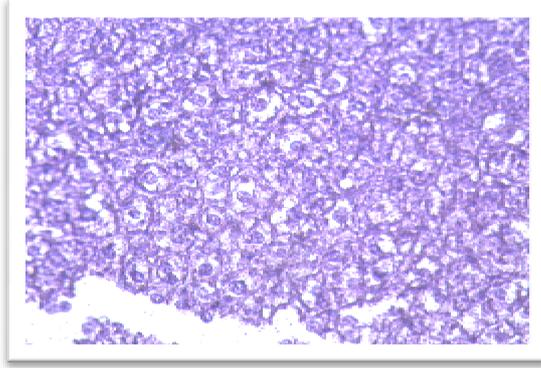
100 x الموت الموضعي للخلايا الكبدية (نجمة) (focal Necrosis) 28 d



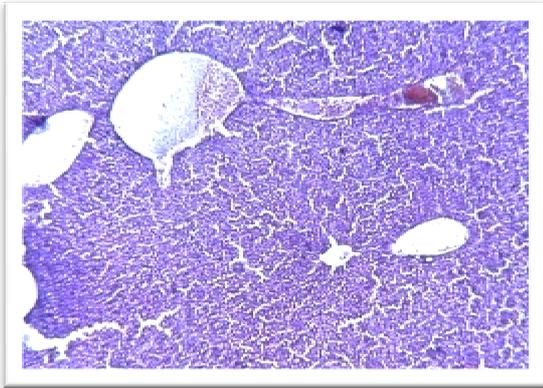
28c الموت الموضعي للخلايا الكبدية (نجمة) و تزويق الخلايا (أسهم) 400 x



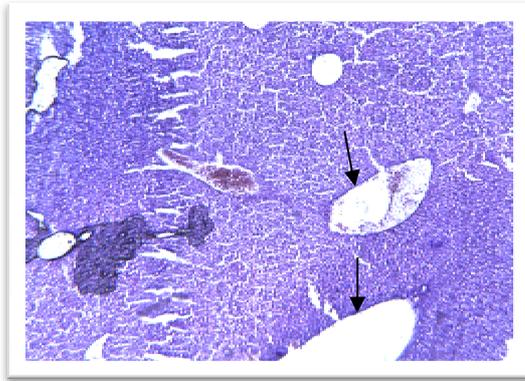
28 f احتقان وعائى (vascular congestion) 100x
(أسهم).



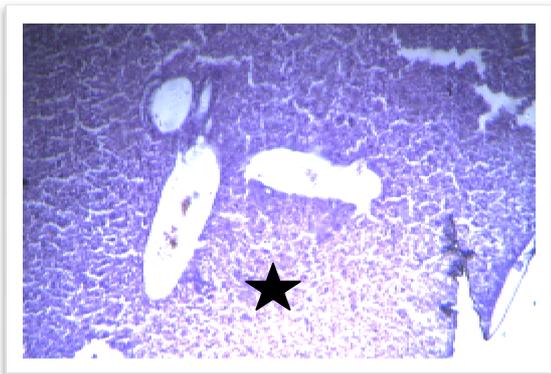
28e انتفاخ الخلايا الكبدية (Balooning cell) 400x



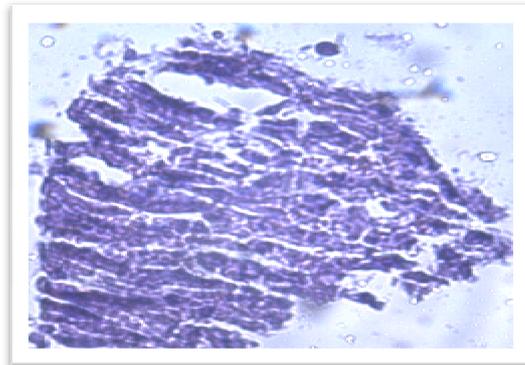
28 h تمدد و احتقان الأوعية 100 x
(أسهم)



28 g تمدد و احتقان الأوعية 100 x
(أسهم)

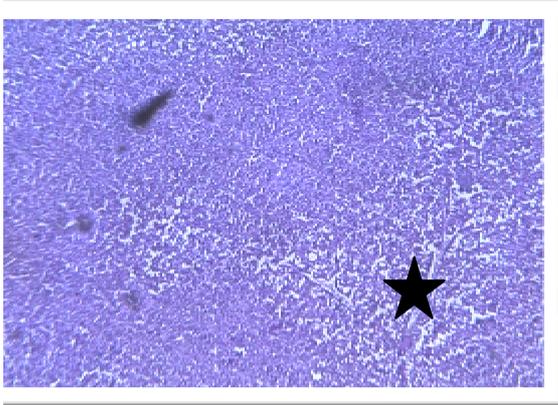


28 J استسقاء موضعي (oedema) و تمدد الأوعية
400 x

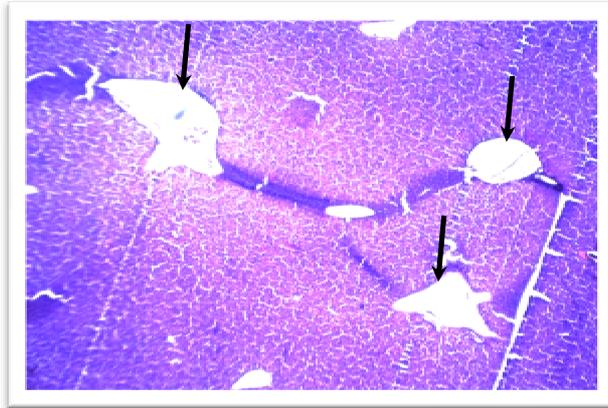


28i تسلل الخلايا الالتهابية 400 x
(Infiltration)

صورة. 28. ملاحظة مجهرية لكبد الفئران المعاملة بدواء VPA
(28a 28b 28c 28d 28e 28f 28g 28h 28i et 28j)

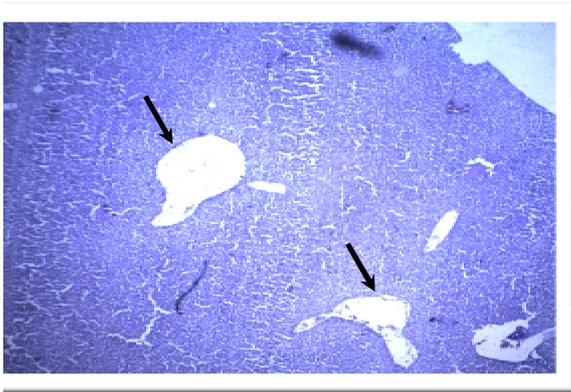


100x (نجمة) 29 a ترويق الخلايا الكبدية

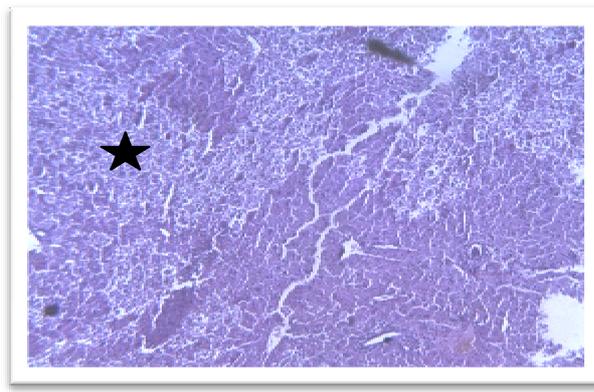


100x (vascular congestion) 29 b احتقان وعائى (أسهم)

صورة 29. ملاحظة مجهرية لكبد الفئران المعاملة بالمستخلص البوتانولي لنبات Rs

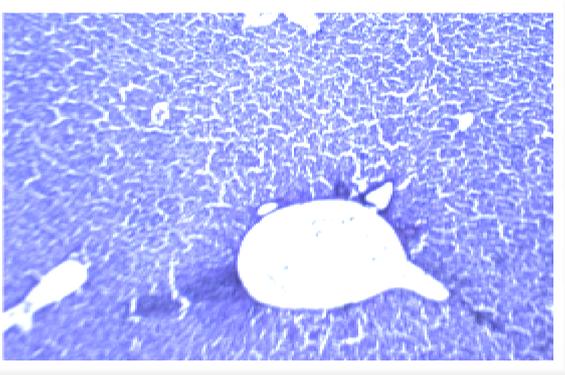


100 x 30 a تمدد و احتقان الأوعية (أسهم)

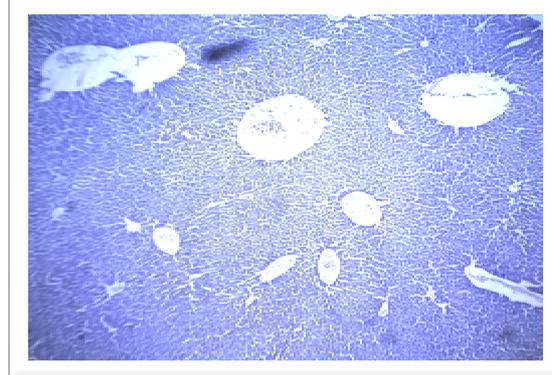


100 x 30b الموت الموضعي للخلايا الكبدية (نجمة) (focal Necrosis)

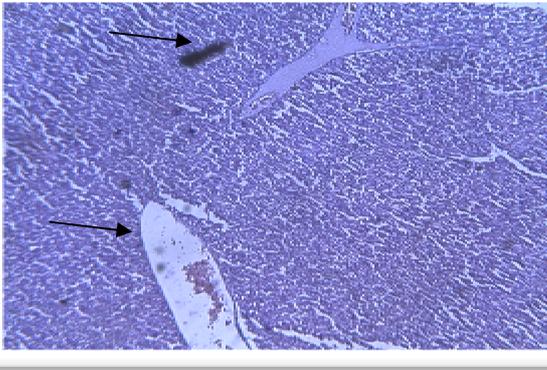
صورة 30. ملاحظة مجهرية لكبد الفئران المعاملة بالمستخلص البوتانولي لنبات Rs و بدواء VPA



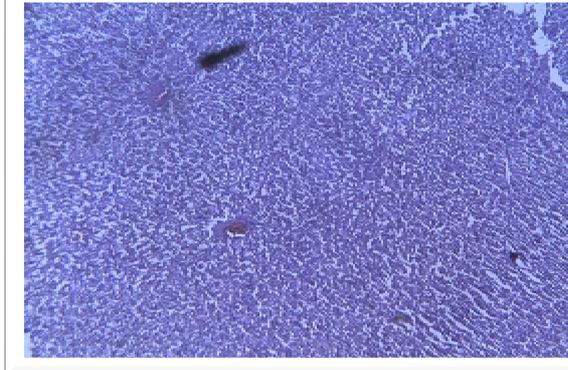
صورة 32. ملاحظة مجهرية لكبد الفئران المعاملة
بفيتامين E و بدواء VPA



صورة 31. ملاحظة مجهرية لكبد الفئران المعاملة
بفيتامين C و بدواء VPA

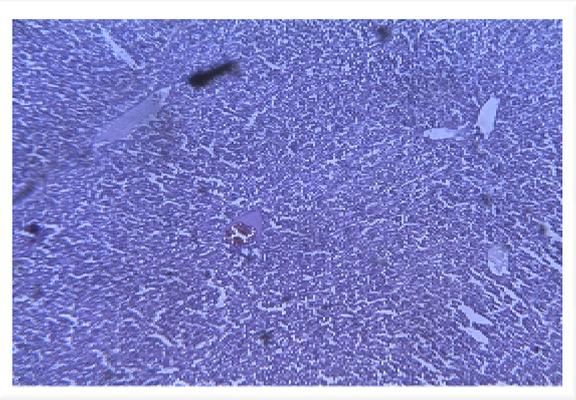


33 a تمدد و احتقان الأوعية 100 x
(Dilatation and vascular congestion)
(أسهم)

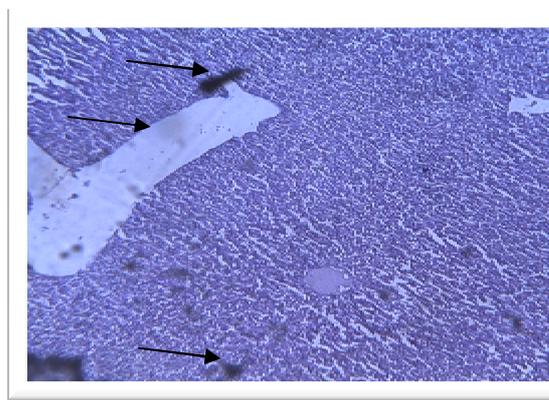


33 b احتقان كبدي (Congestion) و ترويق الخلايا 100 x

صورة 33. ملاحظة مجهرية لكبد الفئران المعاملة بالمستخلص البوتانولي لنبات Cf (33a, 33 b)

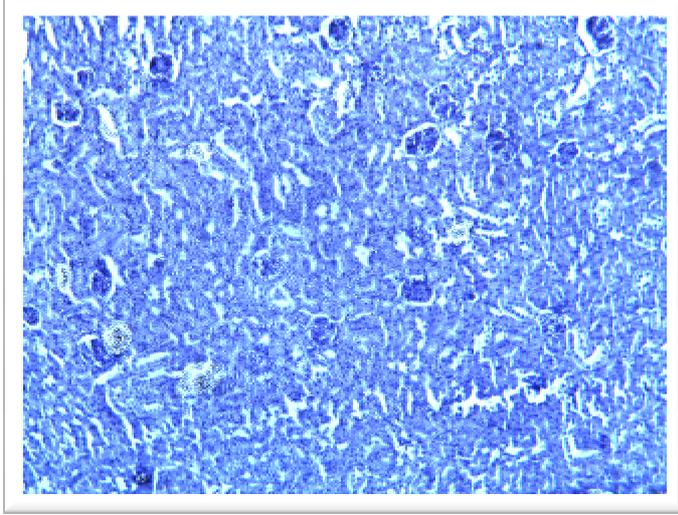


34 a احتقان كبدي (Congestion) و ترويق الخلايا 100 x

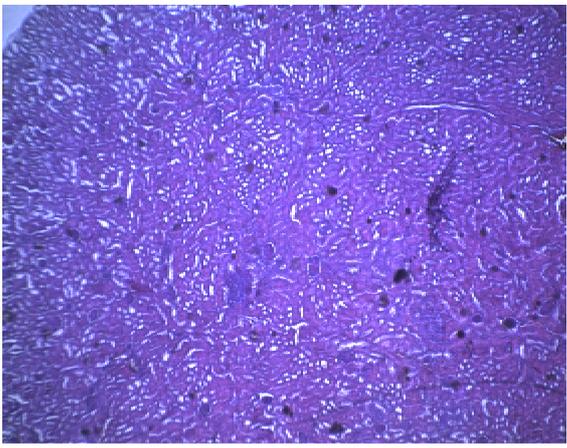


34 b تمدد و احتقان الأوعية 100 x (أسهم)
(congestion and vascular dilatation)

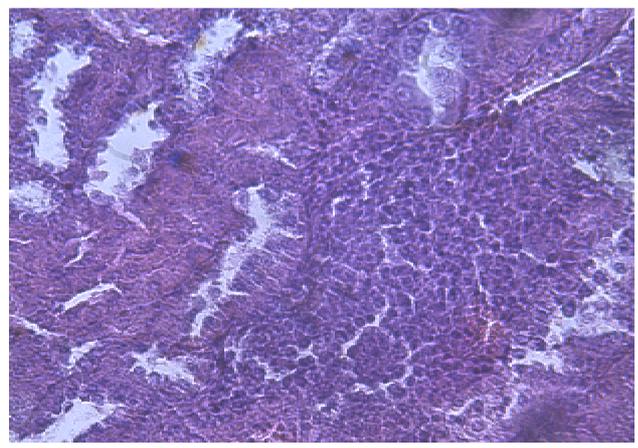
صورة 34. ملاحظة مجهرية لكبد الفئران المعاملة بالمستخلص البوتانولي لنبات Cf و بدواء VPA
(34a, 34 b)



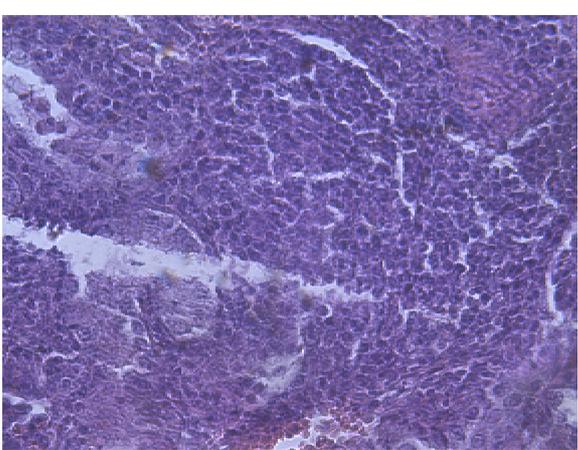
صورة 35. ملاحظة مجهرية لكلى الفئران الشاهد x 100



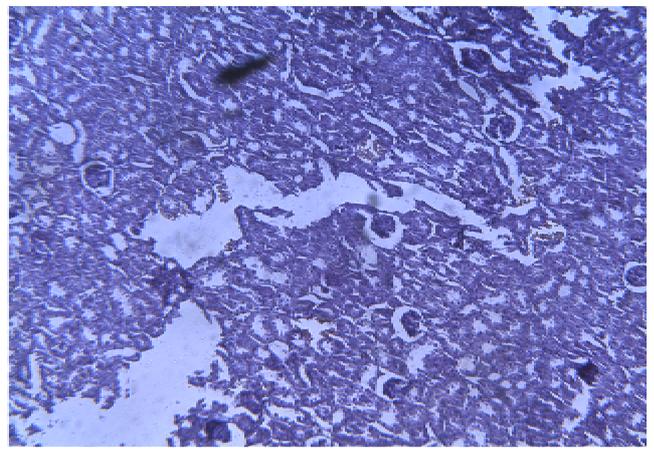
36a احتقان كلوي (Congestion) 100 x



36b الموت الموضعي للخلايا الكلوية، تسلل الخلايا
الالتهابية (Necrosis, infiltration) 400 x

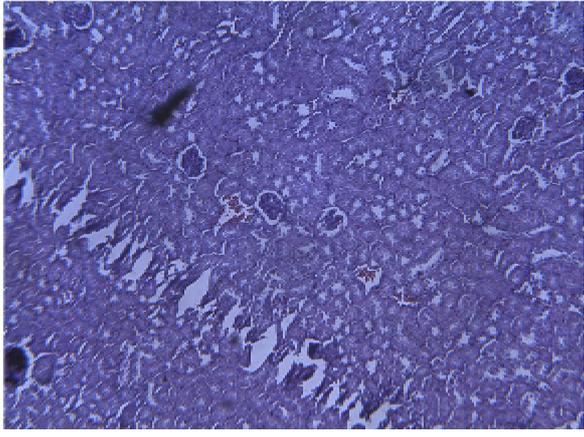


36 d تسلل الخلايا الالتهابية (Infiltration) 100 x

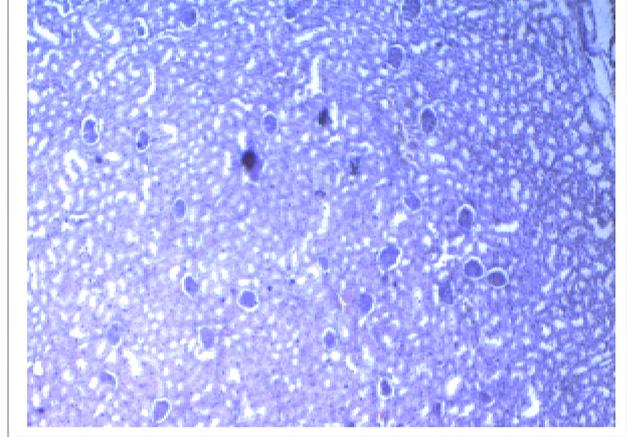


36c استسقاء موضعي (oedema) 100 x

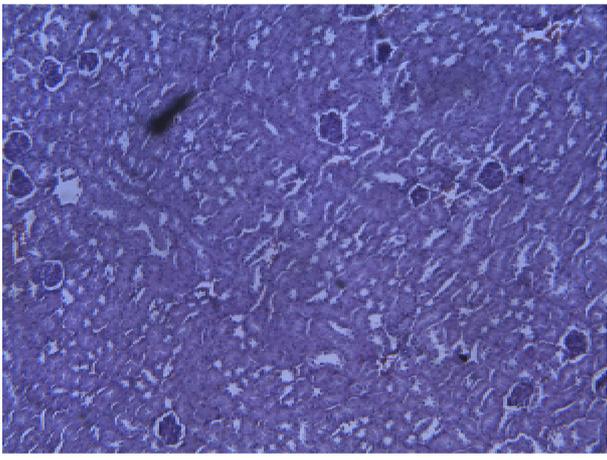
صورة 36. ملاحظة مجهرية لكلى الفئران المعاملة بدواء VPA
(36a 36b 36c 36d).



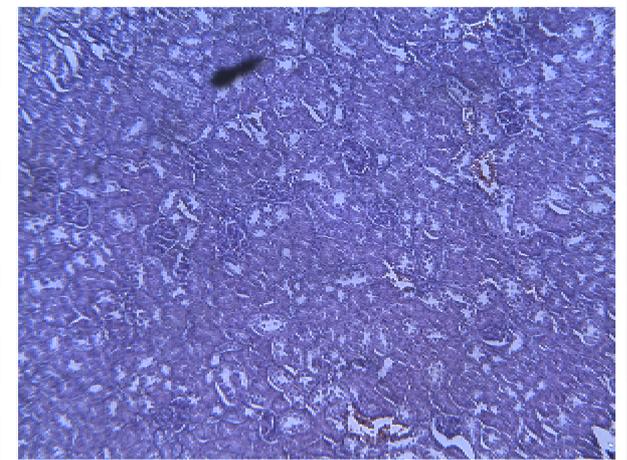
صورة 37. ملاحظة مجهرية لكلى الفئران المعاملة بالمستخلص البوتانولي لنبات Rn 100 x



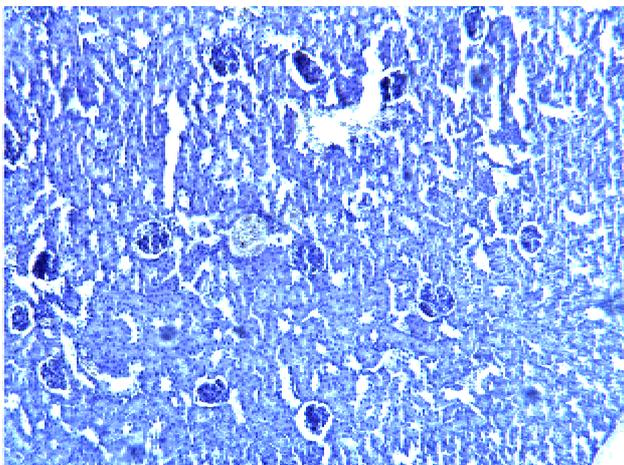
صورة 38. ملاحظة مجهرية لكلى الفئران المعاملة بالمستخلص البوتانولي لنبات Rn و بدواء VPA احتقان كلوي (Congestion) 100 x



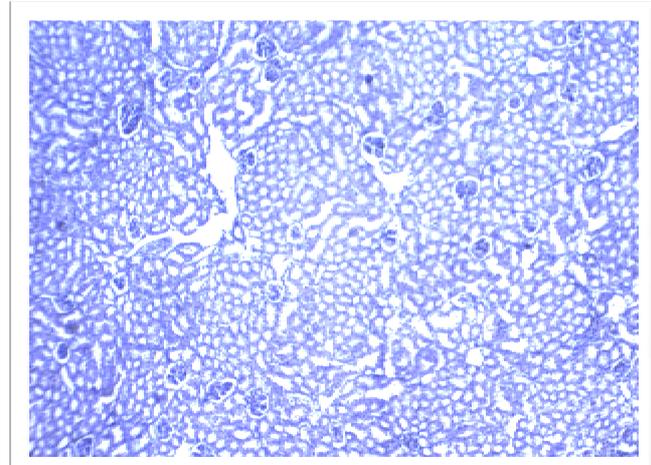
صورة 39. ملاحظة مجهرية لكلى الفئران المعاملة بالمستخلص البوتانولي لنبات Cf احتقان كلوي (Congestion) 100 x



صورة 40. ملاحظة مجهرية لكلى الفئران المعاملة بالمستخلص البوتانولي لنبات Cf و بدواء VPA احتقان وعائي (Congestion) 100 x



صورة 42. ملاحظة مجهرية لكلى الفئران المعاملة بفيتامين E و بدواء VPA احتقان كلوي (Congestion) 100 x



صورة 41. ملاحظة مجهرية لكلى الفئران المعاملة بفيتامين C و بدواء VPA، احتقان كلوي (Congestion) و استسقاء موضعي (oedema) 100 x

جدول 2 الدور الوقائي للمستخلص البيتانولي لنباتي *Chrysanthemum fontanesii* (Cf)،
Rhantherium suaveolens (Rs)، فيتامين E و C اتجاه التسمم الكبدي (التغيرات النسيجية) المحرض
 بدواء VPA .

Vascular Congestion	Vascular Dilatation	Balooning cell (انتفاخ الخلايا الكبدية)	Oedema (استسقاء موضعي)	Infiltration (تسلل الخلايا الالتهابية)	Steatosis (التشمم الكبدي)	Necrosis (الموت الموضعي للخلايا)	% المجموعة
0	0	0	0	0	0	0	شواهد
100	100	20	20	80	80	100	دواء VPA (400 ملغ/كغ)
40	40	0	0	0	0	0	مستخلص نبات Cf (200 ملغ/كغ)
80	80	0	0	10	0	60	Cf + VPA
40	40	0	0	0	0	0	مستخلص نبات Rs (200 ملغ/كغ)
80	80	0	0	20	0	60	Rs+ VPA
0	0	0	0	0	0	0	فيتامين E (100 ملغ/كغ)
40	80	0	0	0	0	0	VPA + فيتامين E
0	0	0	0	0	0	0	فيتامين C (8.3 ملغ/كغ)
80	80	0	10	0	0	65	VPA + فيتامين C

جدول 3 الدور الوقائي للمستخلص البيتانولي لنباتي *Chrysanthemum fontanesii* (Cf)،
فيتامين E و C اتجاه التسمم الكلوي (التغيرات النسيجية) المحرض
Rhantherium suaveolens (Rs)، بدواء VPA .

Vascular congestion	Oedema (استسقاء موضعي)	Infiltration (تسلل الخلايا الالتهابية)	Necrosis (الموت الموضعي للخلايا)	% المجموعة
0	0	0	0	شواهد
40	40	20	40	دواء VPA (400 ملغ/كغ)
40	0	0	0	المستخلص البيتانولي لنبات Cf (200 ملغ/كغ)
40	20	10	0	Cf + VPA
40	0	0	0	المستخلص البيتانولي لنبات Rs (200 ملغ/كغ)
40	0	10	0	Rs+ VPA
20	0	0	0	فيتامين E (100 ملغ/كغ)
40	0	0	0	VPA + فيتامين E
20	0	0	0	فيتامين C (8.3 ملغ/كغ)
40	20	0	0	VPA + فيتامين C

المناقشة

يستعمل دواء (VPA) في علاج العديد من الاضطرابات كالثقبية والصرع، وبالرغم من كفاية في علاج هذه الأمراض إلا أنه يتميز بأعراض غير مرغوب فيها كالتسمم الكبدى المتميز بالتشمم (Necrosis) (Eadie et al., 1988; Natarajan et al., 2006; Aires et al., 2010) و الموت الموضعي للخلايا (Kiang et al., 2010; Tong et al., 2005) ، التسمم الجنيني، تسمم الدم، و يعتبر الأطفال أقل من سنتين و النساء الحوامل أكثر عرضة للتسمم (Tong et al., 2003) .

أدت المعاملة بدواء VPA إلى تغيرات مرفولوجية على مستوى كبد و كلى الفئران الحوامل و يظهر ذلك جليا من خلال النتائج المحصل عليها في الدراسة النسيجية. حيث نلاحظ تضخم الخلايا الكبدية (cellular ballooning)، الموت الموضعي للخلايا الكبدية والكلى، تشحم الكبد (steatosis)، تسلل الخلايا الالتهابية (inflammatory cell infiltrates)، تمدد الأوعية الدموية، استسقاء موضعي و احتقان. توافق هذه النتائج أعمال (Eadie et al., 1988; El- Gendi et al., 1990; Baran et al., 2004; Khan et al., 2005; El-Mowafy et al., 2011)

في حين أدت المعاملة بفيتامين E إلى وقاية الكليتين و الكبد من التغيرات المرفولوجية الملاحظة عند الفئران الحوامل المعاملة بدواء VPA. حيث نلاحظ غياب كلي للتشمم الكبدى و الموت الموضعي للخلايا الكبدية و الكلى. توافق هذه النتائج أبحاث (Baran et al., 2004; Aktas et al., 2010) كما تبين النتائج دور كل من فيتامين C و المستخلص البيتانولي لنباتي *C. fontanesii* و *R. suaveolens* في التقليل من التغيرات المرفولوجية الملاحظة على مستوى الكليتين و الكبد حيث نلاحظ غياب كلي للتشمم الكبدى، انخفاض حدة الموت الموضعي للخلايا الكبدية و اختفاءه كليا على مستوى الكليتين.

بالإضافة إلى ذلك أدت المعاملة بدواء VPA إلى تغيرات بيوكيميائية على مستوى الكبد تتجلى في الارتفاع المعنوي في الإنزيمات الكبدية (ALT, AST) و تركيز MDA مقارنة بالشواهد. هذا ما يفسر الموت الموضعي للخلايا الكبدية حيث أن انحلال هذه الأخيرة تحت تأثير الأوكسدة الفوقية للبيدات يؤدي إلى تحرير إنزيمات (ALT, AST) في المصل. و نتج عن المعاملة بفيتامين E، فيتامين C و المستخلص البيتانولي لنباتي *C. fontanesii* و *R. suaveolens* انخفاض معنوي في تركيز تلك الإنزيمات مقارنة بإنزيمات الفئران الحوامل المعاملة بدواء VPA توافق هذه النتائج أبحاث (Raza et al., 2006)

لا يزال الميكانيزم الذي من خلاله يحرض دواء VPA التسمم الكبدي غير واضح بالرغم من افتراض إنتاج الأشكال النشطة للأكسجين. وقد يرجع ذلك إلى تأثير دواء VPA على الميكانيزمات الدفاعية للخلايا الكبدية، مما يجعلها أكثر عرضة للتوتر التأكسدي (Klee et al., 2000; Sabayan et al., 2007; Pourahmad et al., 2012) وذلك بعد تحوله إلى مركبات سامة 4-ene-valproate الناتج عن أيض VPA على مستوى ميكروزومات الكبد في وجود cytochrome P450 المعتمد على NADPH (Sadeque et al., 1997; Kiang et al., 2010) و (E)-2.4-diene VPA (Tang and Abbott, 1996; Surendradoss et al., 2012) التي ترتبط بال GSH (Tang et al., 1996) و N-acetylcysteine الكبديين (Gopaul et al., 2000) عن طريق تفاعل الإضافة Michael addition (Tang and Abbott, 1996)، ثم تطرح في العصارة الصفراوية، الأمر الذي يسبب العوز في مستوى مضادات الأكسدة (Kassahan et al., 1991; Gupta et al., 2004; Vidya and Subramanian, 2006) و هذا ما تشبهه النتائج المحصل عليها، حيث لاحظنا انخفاض معنوي في مستوى GSH و نشاط إنزيمي الكاتالاز و GPx، و هذا ما يفسر النتائج المحصل عليها فيما يخص إرتفاع تركيز MDA في أنسجة كبد الحوامل المعاملة بدواء VPA. تتطابق هذه النتائج مع أعمال (Siddique et al., 1999 و Sokmen et al., 2012) للذان بينا بأن دواء VPA يحرض العوز في ال GSH و يرفع الأكسدة الفوقية للبيدات في كبد الفئران و الجرذان على التوالي، كما بين (Tong et al., 2003) أن التعرض للVPA يؤدي إلى ارتفاع نسبة الجذور الحرة الوسيطة و ذلك كنتيجة للتحويل الحيوي لدواء VPA و الخلل في توازن GSH و/أو العوامل المساعدة للأنظمة المضادة للأكسدة. كما بينت نتائج أبحاث (Liu et al., 1998 ; Yuksel et al., 2001) بأن دواء VPA يحرض إرتفاع مستوى الأكسدة الفوقية للبيدات و انخفاض نشاط GSH على مستوى كريات الدم الحمراء و بلازما الأطفال المصابين بالصرع و الخاضعين للعلاج بدواء VPA. كذلك يعزز دواء VPA ترويق السيلينيوم، النحاس و الزنك مؤديا إلى نقص بناء الإنزيمات القناصة للجذور الحرة و يقلل من نشاط Glutathion reductase و GPx.

بالمقابل بينت أعمال (Verotti et al., 2002) عدم تأثر المستوى البلازمي للنحاس، الزنك و إنزيمي GPx و CuZnSOD لدى الأطفال المصروعين المعاملين بدواء VPA لمدة سنة كاملة. هذا ما يدعو إلى إفتراض إحتمال تدخل عوامل أخرى في رفع تركيز الأكسدة الفوقية للبيدات. خاصة بعد إكتشاف دور دواء VPA و مشتقاته في تحفيز تكاثر البيروكسيروم من خلال تنشيط المستقبل delta (المنبه لتكاثر البيروكسيروم) (Lampen et al., 1999; Werling et al., 2000)، حيث تعتبر العقاقير المنشطة لتكاثر البيروكسيروم أحد أهم العوامل المحرصة لإنتاج الجذور الحرة (Deshpande et al., 1996).

درس (Natarajan et al., 2006) دور التوتر التأكسدي في بيروكسيزومات و ميكروزومات الكبد كميكانيزم لتشحم الكبد (Microvesicular Steatsis) عند الجرذان المعاملة بـ 700 ملغ /كغ من دواء VPA وتوصل إلى أن التوتر التأكسدي يلعب دور في التشحم الكبدي، و المرافق بخلل في وظيفة و بنية المصورات الحيوية الكبدية .

كما دعمت نتائج أبحاث (Tabatabaei and Abott, 1999) الفرضيات المقترحة من قبل و التي مفادها أن التسمم الخلوي المحرض *In vitro* بنواتج أيض VPA يحدث كنتيجة لتشكّل H_2O_2 داخل الميكروزوم و الذي يمكن أن يعبر الغشاء الخلوي و يتفاعل مع الحديد الداخل خلوي لإنتاج جذور الهيدروكسيل النشطة. و بين أن إضافة Catalase إلى الوسط يؤدي إلى الوقاية من التسمم الخلوي المحرض بـ VPA.

تعتبر مضادات الأكسدة الإنزيمية مثل Catalase, GSH, SOD و مضادات الأكسدة غير الأنزيمية كالفيتامينات و المعادن النادرة كالسليوم و بعض المركبات الفينولية المستخلصة من النباتات الطبية كالفلافونويدات السبيل الأنجع للتقليل من السمية الدوائية.

تبين النتائج دور كل من فيتامين E و C في الوقاية من تأثير دواء VPA على الكبد، حيث منعا تماما التشحم الكبدي و الموت الموضعي للخلايا، وقللا من تركيز الإنزيمات الكبدية (ALT, AST) و تركيز MDA (شكل 23، 28). كما أدت المعاملة بهذين الفيتامينين إلى الزيادة المعنوية في مستوى الـ GSH و نشاط إنزيمي الكاتالاز و GPx مقارنة بالفئران المعاملة بدواء VPA. و يعزى الانخفاض في تركيز الإنزيمات الكبدية (ALT, AST) في مصل الفئران المعاملة بدواء VPA و فيتامين E أو C إلى دور هذه المواد كمضادات أكسدة فعالة في الوقاية من الأكسدة الفوقية للبيدات وتحفيزها لنشاط الإنزيمات القانصة للجذور الحرة و الذي تجلى من خلال النتائج المحصل عليها (الانخفاض المعنوي في تركيز MDA و الرفع المعنوي نشاط إنزيمي الكاتالاز و GPx) مما يحفظ بنية الغشاء الحيوي للخلية الكبدية من التلف و التسمم المحرض بدواء VPA.

تدعم هذه النتائج نتائج أبحاث (Jurina-romet et al., 1996) التي تبين دور فيتامين E و C في الوقاية من التسمم الخلوي المحرض بدواء VPA و الناتج عن تثبيط إنزيم GSH، إذ يعتبر فيتامين E أول مثبط طبيعي للإنحلال الخلوي المحرض بـ xenobiotics المستتزة لـ GSH الخلوي (Hishinuma and Nakamura, 1988). كما بينت أعمال (Baran et al., 2004) دور فيتامين E في الوقاية من التأثيرات السامة لدواء VPA على أنسجة كبد الجرذان الحوامل.

تعتبر المركبات الفينولية المستخلصة من النباتات الطبية كالفلافونويدات السبيل الأنجع للتقليل من السمية الدوائية. وهذا ما أثبتته نتائج دراسات حديثة تناولت التأثير الوقائي لمستخلصات النباتات الطبية ضد التسمم المحرض بالأدوية المضادة للصرع حيث بين (Raza et al., 2006) دور thymoquinone المكون الأساسي للزيت الطيار لنبات *Nigella species* كمضاد للأكسدة كما أثبت دوره الواقى من التسمم الكبدي المحرض بدواء VPA عند الفئران. بالإضافة إلي ذلك بين (Rani and Chandravadana, 2008) دور الطحالب الزرقاء *Spirulina fusiformis* في الوقاية من التسمم الكبدي و التوتر التأكسدي المحرض بدواء VPA عند الجرذان. كذلك بين (Hamza and Amin, 2007) دور مستخلص جذور نبات *Apium graraveolens* الحاوي على مادة apigenin بتركيز كبير في الوقاية من تسمم الخصيتين المحرض بدواء VPA عند الجرذان، إذ يقلل دواء VPA من وزن الخصيتين و عدد و حيوية الحيوانات المنوية و يتزامن ذلك مع ارتفاع تركيز MDA و انخفاض نشاط إنزيم SOD بالإضافة إلى تلف DNA (Khan et al., 2011). كما بين كل من (Wahba, 2011) الدور الوقائي للزيوت النباتية المستخلصة من *Apium graraveolens* و *Nigella Sativa*. و (Abd-allah and Saad, 2010) دور curcumin و resveratrol في الوقاية من التسمم الكبدي المحرض بدواء VPA.

يحتوي المستخلص البيتانولي لنباتي *R. suaveolens* و *C. fontanesii* على كمية معتبرة من المركبات الفينولية و الفلافونويدات و يظهر ذلك جليا من خلال النتائج المحصل عليها، بالمقابل نتج عن معاملة الفئران الحوامل بالمستخلصين و دواء VPA، إنخفاض معنوي في تركيز الإنزيمات الكبدية (ALT, AST) و تركيز MDA و ارتفاع معنوي في مستوى ال GSH و نشاط إنزيمي الكاتالاز و GPx على مستوى أنسجة الكبد مقارنة بالفئران الحوامل المعاملة بدواء VPA فقط. و هذا ما يدل على أن المركبات الفينولية و الفلافونويدات المكونة للمستخلصين فعالة في تثبيط الأكسدة الفوقية للبيدات. و ذلك من خلال تحفيزها للنظام المضاد للأكسدة (الرفع معنوي في مستوى ال GSH و نشاط إنزيمي الكاتالاز و GPx) و قدرتها على التخلص من الجذور الحرة خاصة H_2O_2 الناتج عن نواتج أيض دواء VPA و بالتالي تملك نشاط مضاد للأكسدة. توافق هذه النتائج أعمال (Kim et al., 2012) التي بين فيها دور مستخلص *Chrysanthemi Flos* (زهرة نبات *Chrysanthemum indicum*) في الوقاية من التوتر التأكسدي في كبد و كلى الفئران المصابة بالسكري المحرض ب streptozotocin.

و لقد بينت الدراسة الكيميائية أن المستخلص البيتانولي لنبات *Chrysanthemum fontanesii* يحتوي على فلافونويدات من نوع فلافونول aglycones (Isokaempféride، Isorhamnetine 3-O-methylether و Quercétine 3-O-methylether) و فلافونول hétérosides مشتقة من quercetine أهمها

(Querciméritrine- 3- methylether و Isorhamnetine 3-β-glucoside (cacticine) بالإضافة إلى مركبات
Sesquiterpenes (Clovane -2-β, 9-α-diol ، Caryolane -1, 9-β- diol)، **أحماض فينولية**
(Acide cinnamoyle ، Acide benzoïque)، **كومارين** (Scopoline) و **Stérol** (β-sitostérol)
(Benaïssa, 2011) و بالتالي يعزى الدور الوقائي للمستخلص البيتانولي لنبات *C. fontanesii* إلى احتوائه
على تشكيلة معتبرة من المركبات الفينولية و الفلافونويدات.

بالإضافة إلى ذلك أدت معاملة الفئران الحوامل بدواء VPA إلى الرفع المعنوي في تركيز الأكسدة
الفوقية للبيدات على مستوى الكليتين و انخفاض معنوي في تركيز مضادات الأكسدة (GSH و نشاط
إنزيمي الكاتالاز و GPx). وهذا ما يتطابق مع نتائج أبحاث (Raza et al., 1997) حيث يحرض دواء VPA
ارتفاع تركيز MDA على مستوى كبد و كلي ذكور الفئران، و يتزامن ذلك مع انخفاض مستوى GSH.
بالمقابل ينخفض مستوى MDA معنويا و يرتفع مستوى GSH و نشاط إنزيمي الكاتالاز و GPx
عند الحيوانات المعاملة بفيتامين E، C (شكل 23، 25، 26، 27). و بالمثل يعمل المستخلص البيتانولي
لنباتي *C. fontanesii* و *R. suaveolens* على انخفاض مستوى MDA في كلي الفئران المعاملة بدواء VPA
(شكل 21) و يحفز نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة كما يرفع من مستوى GSH الكلي.

يعتبر المخ من أكثر الأعضاء إنتاجا للجذور الحرة وذلك لكونه يستعمل 20% من الأكسجين المستهلك من
طرف العضوية (Sokoloff, 1999). و بالتالي ينتج كمية كبيرة من الأشكال النشطة للأكسجين خلال
الأكسدة الفوسفورية. كذلك تحتوي بعض مناطق المخ على كمية كبيرة من الحديد (Gerlach et al., 1994)
الذي يمكن أن يعزز إنتاج الأشكال النشطة للأكسجين. كما أن العديد من النواقل العصبية من أهمها
dopamine، serotonin و norepinephrine تتأكسد ذاتيا من خلال تفاعلها مع الأكسجين منتجة O_2^- و
quinones و semiquinones التي تسبب العوز في GSH و ترتبط مع مجاميع thiol للبروتينات مما يجعلها
أكثر قابلية للأكسدة (Spencer et al., 1998). بالإضافة إلى ذلك غني المخ بالأحماض الدهنية غير المشبعة
(Menon et al., 2012) التي يمكن أن تستعمل كمادة تفاعل للأشكال النشطة للأكسجين
(Halliwell, 1992; Porter, 1984) كما يحتوي على كمية قليلة من مضادات الأكسدة الإنزيمية مقارنة بالكبد
و الكلى (Floyd and Carney, 1992) مما يجعله أكثر عرضة للتوتر التأكسدي (Guest and Grant, 2012).
وهذا ما يتوافق مع النتائج المحصل عليها.

أدت المعاملة بدواء VPA إلى الرفع المعنوي في تركيز الأكسدة الفوقية للبيدات على مستوى مخ الفئران مقارنة بالشواهد ($P \leq 0.01$). و يرجع ذلك إلى انخفاض مستوى الجلوتاثيون و نشاط انزيم GPx على مستوى المخ. تتوافق هذه النتائج مع أعمال (Chaudhary and Parvez, 2012) بالمقابل ينخفض مستوى MDA معنويا في مخ الحيوانات المعاملة بفيتامين E، C (شكل 23). و بالمثل يعمل المستخلص البيتانولي لنباتي *C. fontanesii* و *R. suaveolens* على إنخفاض مستوى MDA و يرفع من مستوى الجلوتاثيون و نشاط انزيم GPx في مخ الفئران المعاملة بدواء VPA (شكل 25، 26)، وهذا ما يوافق نتائج أبحاث (Abdel-Wahab and Metwally, 2011) التي بين من خلالها دور مستخلص نبات *Ginkgo biloba* (بجرعة 25 و 50 ملغ/كغ) في الوقاية من التوتر التأكسدي الناتج عن معاملة الفئران بدواء VPA (200 ملغ/كغ) حيث تقلل من الأكسدة الفوقية للبيدات و من تركيز 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine و ترفع من مستوى GSH و تركيز GPx على مستوى المخ.

بينت العديد من الدراسات بأن دواء VPA يعبر المشيمة

(Kumar et al., 2000; Ushigome et al., 2000)، ليطراكم في دم الجنين متسببا في تسممه، إذ يحرض موت و إدمصاص الأجنة، تأخر في النمو، إضافة إلى التشوهات الجنينية (Rouillet et al., 2013) و يظهر ذلك جليا من خلال النتائج المتحصل عليها، حيث نلاحظ إنخفاض وزن الجنين و صغر حجمه، تأخر في التعظم مقارنة بالأجنة الشواهد (صورة 11، 12، 25)، تشوه الأنبوب العصبي (exencephaly) بنسبة 36 % (صورة 10)، فتح جفن العين (صورة 12)، فتح الفم و بروز اللسان (صورة 10)، تشوهات هيكلية أهمها: ciphosis (صورة 19)، غياب قبة الجمجمة (صورة 18)، تموج عظام الأضلاع (صورة 19)، توافق هذه النتائج ما توصل إليه Elmazar et al., 1988 في دراسة مماثلة. و قد إقترح الباحثين العديد من الميكانيزمات لتفسير تحريض دواء VPA للتشوهات الجنينية أهمها:

أ - تثبيط إضافة مجاميع الميثيل للـ homocysteine مما يتسبب في رفع تركيزه

(Hishida and Nau, 1998; Hsieha et al., 2012). إذ يرتبط إرتفاع مستوى homocysteine بتشوهات على مستوى الأنبوب العصبي. يرجع التأثير السام للـ homocysteine إلى حثه لتخليق بعض المواد السامة مثل H_2O_2 و O_2^- التي تتشكل أثناء الأكسدة الذاتية للـ homocysteine و ذلك في وجود أيونات الإنتقال (Khajuria et al., 2000; Dowell and Lang, 2000)، كذلك يخل باستتساخ و ترجمة الأنزيمات المضادة للأكسدة خاصة GPx و SOD (Huang et al., 2001; Van Mil et al., 2010).

ب - يحرض دواء VPA تكاثر البيروكسيزوم (Lampen et al., 1999).

ج- يخل دواء VPA باستتساخ أو بتعبير الجينات المسؤولة عن تشكل غظاريف الفقارات الجنينية (Basu and Wezeman, 2000; Wu et al., 2012) و الجينات المسؤولة عن تطور الحبل العصبي، حيث يرفع من تعبير P53 و بالتالي يثبط تكاثر الخلايا العصبية (neuroepithelial cell)، كما يحرض الموت المبرمج للخلايا (apoptosis) (Wlodarczyk et al., 1996; Tung and Winn., 2011) و DNA fragmentation (Di Renzo et al., 2010). إضافة إلى ذلك يحرض تمايز الخلايا ذات المنشأ العصبي (Bogic et al., 1998) و الخلايا F9 (Lampen et al., 2001). كذلك يخل دواء VPA بتعبير الجينات خلال المراحل الأولى من تطور الأنبوب العصبي *in vitro* عن طريق إنتاج الأشكال النشطة للأوكسجين (Kawai and Arinze, 2006) و إضافة الكاتالاز يوقف هذا الخلل (Defoort et al., 2005). كذلك بين (Nazarali et al., 2007) بأن دواء VPA يحرض التشوهات الجنينية عند أجنة الفئران بتنشيطه تعبير الجين Hoxa2 و يخل بتوازن الجلوتاثيون (glutathione homeostasis) إذ يرفع نسبة GSSG/GSH (يتم التعبير عن الجينات Hoxa2 في مرحلة بداية هجرة الميزابة العصبية، إذ يلعب دورا مباشرا في هجرة الخلايا العصبية).

بالاعتماد على نتائج العديد من الأبحاث التي تؤكد دور التوتر التأكسدي في التسمم الجنيني و التشوهات المحرصة بالأدوية المضادة للصرع (parman et al., 1998)، و على قدرة دواء VPA على تحريض التوتر التأكسدي في أنسجة حيوانات التجارب (Raza et al., 1997) و المستتبتات الجنينية (Tung and Winn, 2011; Zhang et al., 2010; Na et al., 2003). بالإضافة إلى الدور الوقائي لمضادات الأوكسدة اتجاه التسمم بدواء VPA من أهمها مضادات الأوكسدة الإنزيمية مثل الكاتالاز (Tung and Winn, 2011; Defoort et al., 2005; Giavini and Menegola, 2012) و غير الإنزيمية مثل melatonin (Siddique et al., 1999). تهدف هذه الدراسة إلى تحديد مدى قدرة مضادات الأوكسدة (فيتامين E، C) و المستخلص البيتانولي لنباتي *C. fontanesii* و *R. suaveolens* على التقليل من مظاهر التسمم و التشوه الجنيني المحرض بدواء VPA.

تبين نتائج هذه الدراسة بأن دواء VPA يرفع من نسبة موت و إدمصاص الأجنة، يخفض من وزن الجنين (شكل 21)، كما يحرض التشوهات الجنينية، هذا إضافة إلى رفعه تركيز MDA على مستوى الجنين بأكمله و كبد الأجنة المعاملة بدواء VPA مقارنة بالشواهد (شكل 24) و قد يرجع ذلك إلى غياب أو عدم نضج آليات الدفاع المضادة للأوكسدة لدى الجنين خلال فترة الحمل (Ornoy, 2009) حيث لاحظ Yoshioka et al., 1982 انخفاض في بناء الإنزيمات في أعضاء الأجنة خاصة المضادة للأوكسدة catalase، superoxyde dismutase، glutathione reductase إضافة إلى العوز في فيتامين E.

يتزامن التسمم الجنيني المحرض بدواء VPA مع الارتفاع في الأكسدة الفوقية للبيدات لدى الفئران الحوامل و أجنيتها بمعنى كلما زاد تركيز MDA كلما قل وزن الجنين و ارتفعت نسبة التشوهات الجنينية (exencephaly، فتح جفن العين، تشوهات هيكلية). توافق هذه النتائج أعمال Na et al., 2003 التي تناولت تأثير دواء VPA على تكوين الخلايا القلبية للأجنة المزروعة في وسط يحتوي على تراكيز مختلفة من دواء VPA من اليوم الثامن إلى اليوم الخامس عشر حيث يرفع من إنتاج الأشكال الأوكسجينية النشطة التي تعتبر مسؤولة على تثبيط تمايز الخلايا القلبية للجنين.

كما أوضحت دراسة (Tung and Winn, 2011) أن إعطاء دواء VPA بجرعة 0.60 mM للمستنبات الجنينية (in embryo culture) والموافقة لـ 400 mg/kg *In vivo*، يؤدي إلى انخفاض معنوي في نمو الجنين و ارتفاع نسبة التشوهات الجنينية من نوع neural tube defects ويتزامن ذلك مع ارتفاع نسبة الأشكال الأوكسجينية النشطة و الموت المبرمج للخلايا و أن إضافة إنزيم Catalase إلى الوسط يؤدي إلى التقليل من إنتاج تلك الأخيرة.

يعمل فيتامين E على التقليل من مظاهر التسمم الجنيني المحرض بدواء VPA، و يظهر ذلك جليا من خلال النتائج المحصل عليها. حيث يرفع من وزن الجنين (شكل 21) و يقلل من نسبة ظهور التشوهات الجنينية (جدول 1) و لا يقضي عليها تماما، و يتطابق ذلك مع نتائج الدراسة التي أجريت على الفئران (Aldeeb et al., 2000). كما أوضحت الدراسة التي قام بها كل من (Baran et al., 2005) و (Aluclu et al., 2009) دور فيتامين E في الوقاية من التأثيرات السامة لدواء VPA على أجنة الجرذان الحوامل. بالإضافة إلى ذلك يقلل فيتامين E من تركيز MDA على مستوى أنسجة الجنين، كبد الجنين و المشيمة، وهذا ما تدعمه نتائج أعمال (Hassoun et al., 1997).

درس العديد من الباحثين دور فيتامين E في الوقاية من التوتّر التأكسدي و إنتاج الأشكال النشطة للأكسجين في الأنسجة الجنينية، حيث بين (Viana et al., 1996) دوره في الوقاية من التسمم الجنيني لدى الحيوانات المصابة بالسكري. إذ يقلل من نسبة التشوهات الجنينية كما يرفع من حجم الأجنة ودرجة نضجها، غير أن (Hassoun et al., 1997) بين دوره في الوقاية من التسمم الجنيني المحرض بـ TCDD وذلك من خلال تثبيطه للأكسدة الفوقية للبيدات على مستوى أنسجة الجنين و المشيمة. كما أوضحت دراسة (Aldeeb et al., 2000) أن إعطاء فيتامين E يقلل من التشوهات الجنينية المحرّضة بدواء VPA، كما يقلل من مظاهر التسمم الجنيني. كذلك ذكر (Iwaza, 1990) دور فيتامين E في التقليل من الأكسدة الفوقية للبيدات على مستوى المشيمة، كبد و دماغ الجنين المحرّضة بما يسمى fetal ischemic distress عند الجرذان الحوامل.

يعمل فيتامين C على التقليل من حدة التسمم الجنيني المحرض بدواء VPA، و يظهر ذلك جليا من خلال الزيادة المعنوية في وزن الجنين ($P \leq 0.05$) والإنخفاض المعنوي في نسبة التشوهات الخارجية و الهيكلية إلا أنه لا يقضي عليها تماما (جدول 1). بالإضافة إلى ذلك يقلل من تركيز MDA على مستوى أنسجة و كبد أجنة الفئران المعاملة بدواء VPA. ويتطابق ذلك مع نتائج أبحاث (Zhang et al., 2010) الذي بين دور فيتامين C في الوقاية من التوتر التأكسدي و التشوهات الجنينية المحرصة بدواء VPA لدى الجنين *In Vitro*. كما يظهر فيتامين E تأثير وقائي أكبر من فيتامين C بالنسبة للتسمم الجنيني (موت و إدمصاص الأجنة)، تأخر في نمو الأجنة بالرغم من أن لهما نفس الفعالية في التأثير على ظهور التشوهات الجنينية و الأكسدة الفوقية للبيدات المحرصة بدواء VPA لدى الجنين.

يعمل المستخلص البيتانولي لنبات *R. suaveolens* و *C. fontanesii* على التقليل من تركيز MDA على مستوى أنسجة أجنة الفئران المعاملة بدواء VPA، كما يقلل من نسبة التسمم الجنيني و التشوهات الجنينية، إذ يزيد من وزن الجنين و يقلل من نسبة إدمصاص الأجنة و التشوهات الجنينية. توافق هذه النتائج أبحاث (Escalona-Cardoso et al., 2012) التي بين فيها الدور الوقائي ل *Spirulina (Arthrospira)* اتجاه التوتر التأكسدي و التشوهات الجنينية المحرصة بدواء VPA (600 ملغ/كغ في اليوم الثامن من الحمل عن طريق الحقن تحت الصفاق) عند الفئران الحوامل، حيث أدت المعاملة بـ *Spirulina* بجرعة 125، 250، 500 ملغ/كل من اليوم 0 إلى اليوم الثامن عشر من الحمل إلى الوقاية من التشوهات الجنينية (exencephaly) و رفع نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة (الكاتالاز، SOD و GPx).

بالإضافة إلى ذلك، تؤكد النتائج المحصل عليها بأن دواء VPA يحرض تأخر نمو المشيمة، فالإنخفاض المعنوي ($P \leq 0.05$) في وزنها مقارنة مع مشيمة الشواهد (شكل 22) إثبات لذلك، وهذا ما تدعمه نتائج أبحاث (Khera et al., 1993) الذي بين تأثير دواء VPA على نمو مشيمة الجرذان، بحيث يحرض الموت الموضعي لخلايا *cytotrophoblaste*. زيادة على ذلك، يحرض دواء VPA الأكسدة الفوقية للبيدات على مستوى المشيمة، و يظهر ذلك جليا من خلال الإرتفاع المعنوي ($P \leq 0.001$) في تركيز MDA مقارنة بالشواهد. مما يؤدي إلى إفتراض وجود تداخل بين تأخر نمو المشيمة و إرتفاع تركيز الأكسدة الفوقية للبيدات.

و نظرا للدور الأساسي الذي تلعبه المشيمة في تغذية الجنين (Girard, 1991) فإن أي خلل يصيبها بإمكانه أن يخل بتطور و نمو الجنين. حيث لوحظ وجود إرتباط عكسي بين وزن الجنين و تركيز MDA على مستوى المشيمة، كما لوحظ وجود إرتباط إيجابي بين تركيز MDA على مستوى المشيمة و التسمم

الجيني (إدمصاص الأجنة، exencephaly، فتح جفن العين، التشوهات الهيكلية). إضافة إلى وجود ارتباط سلبي بين وزن المشيمة و التسمم الجيني.

أيضا فالعلاقة بفيتامين E، C و المستخلص البيتانولي لنباتي *C. fontanesii* و *R. suaveolens* لم يكن لها دور وقائي اتجاه سمية VPA على المشيمة، حيث لم تؤدي المعاملات المختلفة إلى زيادة معنوية في وزن المشيمة مقارنة بتلك المعاملة بدواء VPA. و على العكس من ذلك أدت المعاملة السابقة إلى إنخفاض معنوي في تركيز MDA على مستوى مشيمة الفئران المعاملة بدواء VPA. تتناقض هذه النتائج مع نتائج أبحاث (Hassoun et al., 1997) التي بينت دور فيتامين E في الوقاية من التأخر في نمو المشيمة الممرض بـ TCDD وذلك من خلال تثبيطه للأكسدة الفوقية للبيدات على مستوى المشيمة. وهذا ما يؤدي إلى افتراض تدخل عوامل أخرى مسؤولة عن التأخر في نمو المشيمة.

بينت النتائج المحصل عليها بأن دواء VPA يؤثر معنويا على وزن لفئران خلال فترة الحمل، حيث يؤدي إلى إنخفاض في وزن الفئران الحوامل خلال الأسبوعين الأخيرين من الحمل و الذي قد يرجع إلى الإنخفاض المعنوي في وزن حملها مقارنة مع الشواهد و الناتج عن ارتفاع نسبة موت و إدمصاص الأجنة، تأخر نمو الأجنة و إنخفاض وزن مشيمتها، حيث يعمل كل من فيتامين E، C و المستخلص البيتانولي لنبات *C. fontanesii* و *R. suaveolens* على الرفع المعنوي من وزن الفئران المعاملة بدواء VPA ووزن حملها وذلك من خلال قدرة هذه المواد على التقليل من مظاهر التسمم الجيني الممرض بدواء VPA.

تبين نتائج هذه الدراسة بأن دواء VPA يرفع من تركيز الجلوكوز في مصل الفئران الحوامل مقارنة بالشواهد، و باعتبار ارتفاع الجلوكوز من أهم العوامل المشوهة لحيوانات التجارب (Wentzel et al., 1997; Viana et al., 2006) يمكننا افتراض هذا الأخير كآلية لتفسير التشوهات الجينية الناتجة عن المعاملة بدواء VPA. بالمقابل ينخفض مستوى الجلوكوز المصلي معنويا عند الفئران المعاملة بالمستخلص البيتانولي لنباتي *C. fontanesii* و *R. suaveolens* ويدل ذلك على أن المستخلص البيتانولي لهاتين النباتتين يملك نشاط خافض لسكر الدم. توافق هذه النتائج أبحاث (Ouali et al., 2007; Kebieche et al., 2011; Kim et al., 2012) التي أجريت على دور الفلافونويدات و المستخلصات النباتية في تخفيض مستوى سكر الدم و الوقاية من التوتر التأكسدي، التسمم الكبدي، الكلوي و التشوهات الجينية.

بين Ouali et al., 2007 أن hesperidine فلافونويد من نوع glycoside ينتمي الى قسم

Flavanones (3', 5, 7-trihydroxy-4-methoxy- flavanone) المعروف بالعديد من الخصائص الإكلينيكية (مضاد للالتهاب، مضاد للحساسية، مضاد للفيروسات، للبكتيريا و السرطان) يقي من التوتر التأكسدي ويتصدى لظهور التشوهات الجنينية لدى الجرذان الحوامل المصابة بالسكري من خلال تحفيز نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة و قدرته على تخفيض نسبة السكر في الدم.

كما أوضح (Kim et al., 2012) دور المستخلص الميثانولي لأزهار نبات *Chrysanthemum indicum* Linn (Chrysanthemi Flos) المستعملة في الطب الصيني لمعالجة التسمم) في الوقاية من التلف التأكسدي الناتج عن الجذور الحرة على مستوى كبد و كلى الفئران المصابة بالسكري المحرض ب streptozotocin إذ يتصدى لارتفاع الأكسدة الفوقية للبيدات و يخفض تركيز إنزيمات (AST، ALT و ALP). كما يحفز نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة SOD، CAT، GPx و يرفع مستوى GSH و فيتامين C و يثبط انشطار DNA (DNA fragmentation) المحرض ب streptozotocin. و هذا يبين أن المستخلص الميثانولي لأزهار نبات *Chrysanthemum indicum* يحتوي على مواد مضادة للأكسدة فعالة في وقاية الكبد و الكلى من التوتر التأكسدي لدى الفئران المصابة بالسكري.

إستنتاج

يؤثر دواء VPA على الفئران الحوامل مسببا تسمم أعضائها و أجنتها، حيثلا يزال يخيم الكثير من الغموض على آلية حدوث هذا التسمم، بالرغم من تأكيد نتائج الدراسات الحديثة التي تمحورت حول هذا الموضوع على الدور الكبير الذي يلعبه التوتر التأكسدي في تحريض التسمم و التشوهات الجنينية. و التي يمكن التقليل من حدتها بتناول مضادات الأكسدة. و هذا ما أكدته نتائج دراستنا لإمكانية تدخل الجذور الحرة في التسمم المحرض بدواء VPA لدى الفئران الحوامل و مدى نجاعة فيتامين E، C و المستخلص البتانولي لنباتي *Rhantherium suaveolens* و *Chrysanthemum fontanesii* في التقليل من مظاهر التسمم و التشوه الجنيني. و قد خلصت هذه الدراسة إلى ما يلي:

تم التأكد في هذه الدراسة من التأثير السام لدواء VPA لدى الفئران الحوامل، حيث حرض هذا الدواء عند الجرعة 400مغ/كغ عن طريق الفم تسمم على مستوى الكبد، الكليتين، المخ و الجنين. و يظهر ذلك جليا من خلال الدراسة النسيجية للكبد و الكلى و التشوهات الجنينية الملاحظة لدى الفئران الحوامل المعاملة بدواء VPA.

تشير نتائج الدراسة البيوكيميائية و الإنزيمية إلى حدوث خلل في العمليات الاستقلابية و يتضح ذلك الأثر من خلال الانخفاض المعنوي في مستوى GSH و نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة GPx، catalase. و سبب هذا الأخير هو تنشيط الآليات المسؤولة عن إنتاج الجذور الحرة و تثبيط النظام المضاد للأكسدة.

إذ يحرض دواء الصرع المستعمل تلقا حادا على مستوى أعضاء و أجنة الفئران، ناتجا عن إنتاج الجذور الحرة. مما يؤدي إلى التوتر التأكسدي المسئول عن الأكسدة الفوقية للبيدات و تلف البنية الغشائية. كما تتحرر إنزيمات AST و ALT من الخلايا الكبدية، كنتيجة لانحلالها و تلف أغشيتها اثر تعرضها للأكسدة الفوقية للبيدات.

بالإضافة إلي ذلك يحرض دواء VPA التشوهات الجنينية عند الفئران الحوامل. و يتزامن ذلك مع ارتفاع تركيز الأكسدة الفوقية للبيدات، على مستوى أنسجة الأم والجنين، و تنشيط النظام المضاد للأكسدة لدى الفئران الحوامل، إضافة إلى ارتفاع تركيز الجلوكوز في الدم.

يلعب كل من فيتامين E و C دور وقائي ضد التوتر التأكسدي الناتج في الخلية الكبدية، الكلوية، العصبية و الجنينية اثر تعرضها لدواء VPA، بواسطة قدرتها على اقتناص الجذور الحرة و تحفيزها للنظام المضاد للأكسدة من خلال الزيادة في مستوى GSH و نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة GPx، catalase.

بينت الدراسة النسيجية للكبد و الكلى بأن أعضاء الفئران المعاملة بفيتامين E ، C و المستخلص

البيتانولي لنباتي *C. fontanesii* و *R. suaveolens* تظهر في حالة أحسن من تلك المعاملة بدواء VPA حيث يبدي فيتامين E تأثير وقائي أفضل من بقية المعاملات إذ نلاحظ غياب كلي للتشمم الكبدي و للموت الموضعي للخلايا على مستوى الكبد و الكلى.

تظهر هذه الدراسة جليا بأن المستخلص الفينولي لنباتي *C. fontanesii* و *R. suaveolens* جد غني بالفلافونويدات. حيث أبدت تلك الأخيرة نشاط بيولوجي فعال إذ قللت من نسبة التغيرات المرفولوجية الكبدية و الكلوية و التشوهات الجنينية. كما سجلت زيادة في وزن الجنين و انخفاض في تركيز الأوكسدة الفوقية للبيدات على مستوى أنسجة الأم و الجنين و حفزت النظام المضاد للأوكسدة، و هذا يدل على أن الفلافونويدات المكونة للمستخلص الفينولي مضادات أكسدة فعالة.

تؤدي المعاملة بدواء VPA إلي زيادة تركيز الجلوكوز في مصل الفئران الحوامل. إذ يعتبر من أهم العوامل المشوهة لحيوانات التجارب. بالمقابل ينخفض مستوى الجلوكوز المصلي معنويا عند الفئران المعاملة بالمستخلص البيتانولي لنباتي *C. fontanesii* و *R. suaveolens* و يدل ذلك على أن المستخلص البيتانولي لهاتين النباتتين يملك نشاط خافض لسكر الدم.

أبدى المستخلص البيتانولي لنباتي *C. fontanesii* و *R. suaveolens* نفس الفعالية التي أبداها كل من

فيتامين E و فيتامين C في التقليل من التوتر التأكسدي و التشوهات الجنينية المحرصة بدواء VPA.

كخلاصة لذلك نستطيع القول بأن للتوتر التأكسدي دور كبير في التسمم و التشوهات الجنينية

المحرصة بدواء VPA لدى الفئران الحوامل، كما أن تناول مضادات الأوكسدة الطبيعية يقي من التسمم و يقلل جزئيا من تطور التشوهات الجنينية، لذلك ينصح النساء الحوامل المصابات بالصرع و الخاضعات للعلاج بدواء VPA بتناول غذاء غني بمضادات الأوكسدة الموجودة بكثرة في الخضار و الفواكه.

الاختبارات خارج العضوية *In Vitro* Tests

1 - المقدمة

تستعمل المواد الطبيعية المستخرجة من النبات كثيرا في صناعة الأدوية، ميدان التجميل و الصناعة الغذائية. من أهم هذه المواد المعقدة نذكر النواتج الأيضية الثانوية، حيث نجد نسبة كبيرة من الأدوية ذات مصدر نباتي، خاصة مع اكتشاف المواد الفعالة في النباتات المستعملة في الطب التقليدي، وذلك بفضل المبادئ الكيميائية و النباتية المتداولة في علم الصيدلة، حيث تستعمل الجزيئات النشطة كمادة أولية في البناء النصفى للدواء (Farnsworth et al., 1986). ومن أهمها عديدات الفينول (الفلافونويدات) المستعملة كثيرا في العلاج، بحيث أنها واقية للأوعية الدموية، مضادة للالتهاب، مثبطات إنزيمية، مضادة للأكسدة والجذور الحرة، مضادة للسرطان، مضادة للمكروبات.... إلخ.

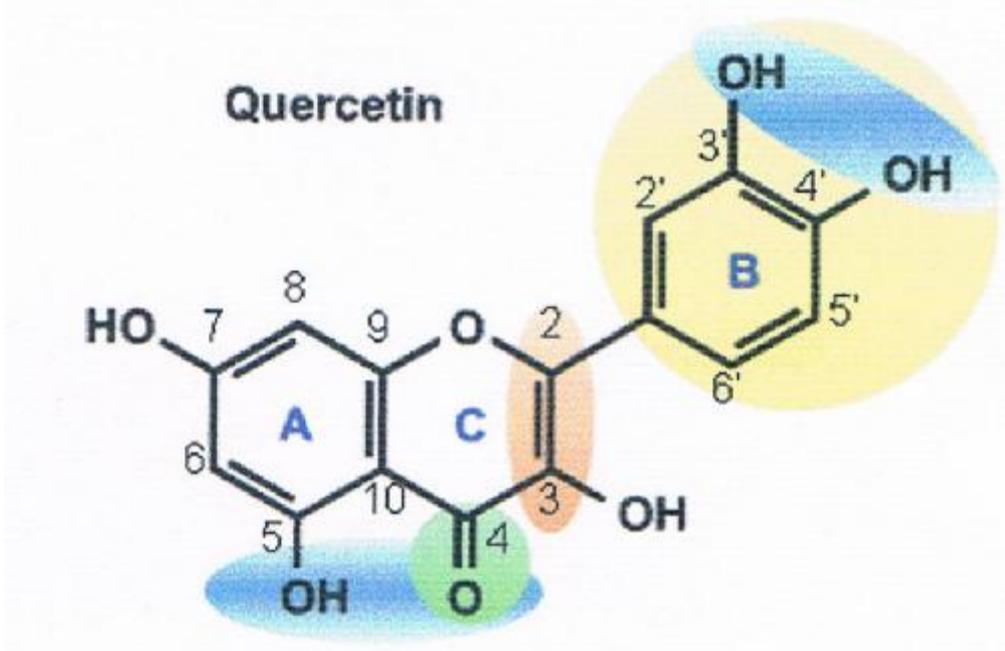
و الجدير بالذكر أن الجذور الحرة تتشكل باستمرار في العضوية بمختلف الآليات الفسيولوجية سواء كانت إنزيمية خاصة على مستوى المصورات الحيوية، كرات الدم البيضاء أو للإنزيمية (Dodet, 1991). حيث أنها ضرورية للعضوية بجرعات معقولة لكونها تساهم في مراقبة انتقال الإشارات الخلوية، تكاثر وتمايز الخلايا، تقلص الأوعية الدموية (Al-Gubory et al., 2010). غير أن الإنتاج الفائض وتراكم تلك الجذور يؤدي إلى تطور العديد من الأمراض خاصة السرطان، مرض القلب، الشيخوخة، عتمة العين، السكري، التسمم الكبدى، الالتهاب و التسمم الجيني (Lushchak and Gospodaryov, 2012). إذ تتميز الجذور بقدرة عالية على إتلاف الأنسجة من خلال مهاجمتها للمكونات الخلوية، إذ يؤدي مهاجمتها للبروتينات إلى حدوث تكتلات غير عادية. كما أن مهاجمتها للفوسفوليبيدات يخل بالوظيفة الغشائية من خلال تحريضها للأكسدة الفوقية للبيدات (Kuka et al., 2012). أيضا تهاجم الجذور الحرة جزيئة الDNA مؤثرة بذلك على وظيفة الجينات. (Dizdaroglu et al., 2002).

تحدث الأكسدة الفوقية للبيدات على مستوى الأغشية الحيوية للخلية في شكل تفاعلات متسلسلة، إذ تعرض الجذور الحرة المشتقة من الأوكسجين تفاعلات جذرية على مستوى فوسفوليبيدات الأغشية الخلوية. حيث يبحث كل جذر في بيئته على إلكترون ليكمل مداره الخارجى، يجده على جزيئة مجاورة، مخلقا بذلك جذر حر جديد و الذي سيبحث بدوره على إلكترون لإتمام مداره الخارجى. هكذا تحدث سلسلة التفاعلات داخل الغشاء (Clavel et al., 1985).

تنشط الفلافونويدات سلسلة التفاعلات في مرحلة البدء بواسطة اقتناصها لجذر الهيدروكسيل (Puppo, 1992)، فتعمل على إنهاء تفاعل السلسلة الجذرية بمنح ذرة هيدروجين لجذر peroxy و يتكون بذلك جذر فلافونويدي. يستمر هذا الأخير في التفاعل مع الجذور الحرة حتى نهاية سلسلة الانتشار و ذلك

لقدرتها على التداخل مع الطبقة الفوسفوليبيدية المزدوجة للغشاء الخلوي (Saja et al., 1995). كما تعمل بعض الفلافونويدات على مخلبه المعادن و تثبط تفاعل fenton الذي يعتبر مصدر أساسي لإنتاج الأشكال الأوكسجينية النشطة (Puppo, 1992).

تعتمد الوظيفة المضادة للأكسدة للفلافونويدات على بنيتها الكيميائية، فوجود مجموعة الهيدروكسيل في الوضعية (3-OH) من الحلقة C تمنح الفلافونويد قدرة كبيرة على تثبيط الأكسدة الفوقية للبيدات. كما تؤدي درجة الرابطة المزدوجة ما بين الكربون 2 و 3 في الحلقة C إلى خفض النشاط المضاد للأكسدة (Van Acker et al., 1996). ولقد أثبتت الدراسات أن مجموعة الكربونيل في الموقع C₄ في الحلقة C ضروري للنشاط المضاد للأكسدة. كذلك يزداد نشاط الفلافونويدات القانص لجذور الهيدروكسيل بارتفاع عدد مجاميع الهيدروكسيل في الحلقة B خاصة في الموقع C₃. إذ تساهم مجاميع الهيدروكسيل في الموقع C₅، C₇ للحلقة A و C₃' و C₄' و C₅' للحلقة B و الموقع C₃ للحلقة C في تثبيط الأكسدة الفوقية للبيدات. أيضا فوجود مجموعة catechol في الحلقة B ضروري للوظيفة القانصة (شكل 33).



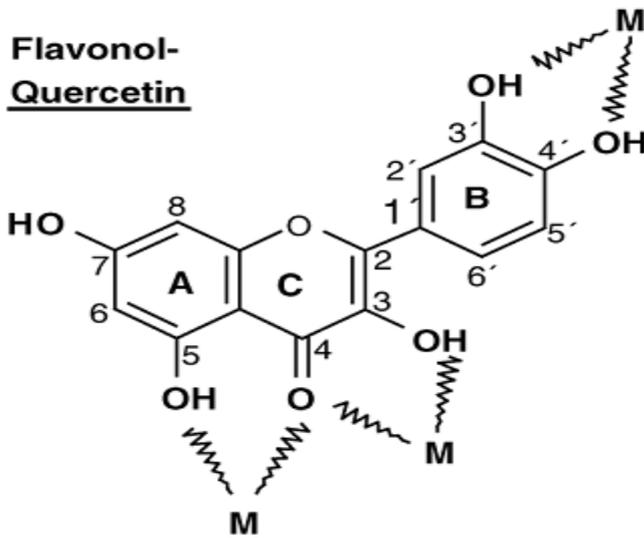
شكل 33. العناصر الأساسية للوظيفة المضادة للأكسدة للفلافونويدات

(Van Acker et al., 1996)

على العكس من ذلك يقلل وجود السكر من القدرة المضادة للأكسدة لمجاميع الهيدروكسيل المتجاورة، وهذا ما يفسر فعالية الفلافونويدات aglycones في تثبيط MDA مقارنة بتلك المحتوية على (In Vitro) glucosides. بالرغم من ذلك تتحول الفلافونويدات الجليكوزيدية مثل quercitrin و rutin إلى مركبات aglycone على مستوى الأمعاء عند الإنسان بفضل المستعمرات البكتيرية مما يكسبها قدرة

مضادة للأكسدة (Cook and Samman, 1996). كما قد يقلل أو يثبط وجود مجاميع methoxyl النشاط المضاد للأكسدة للفلافونويدات (Cao et al., 1997; Cook and Samman, 1996).

تشكل الفلافونويدات المحتوية على مجموعة كاربونيل في الموقع C4 و مجموعة الهيدروكسيل في الموقع C3 ما يسمى بـ chelates مع أيونات الحديد (شكل 34). فقدرة الفلافونويدات على مخلبه أيونات المعادن يساهم في وظائفها المضادة للأكسدة وذلك بمنع تشكل الجذور الحرة في نظام fenton. علاوة على ذلك تحتفظ الفلافونويدات بنشاطها القانص للجذور الحرة بعد تشكيلها معقدات مع أيونات الحديد، و بالتالي يعتبر تشكيل metal ion chelates أحد الميكانيزمات المضادة للأكسدة للفلافونويدات (Van Acker et al., 1996; Cook and Samman, 1996).



شكل 34. المناطق المسئولة عن مخلبة أيونات المعادن لدى الفلافونويدات (M) (Valko et al., 2006).

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم النشاط البيولوجي لمختلف مستخلصات نباتي *Chrysanthemum fontanesii* و *Rhantherium suaveolens* (*In Vitro*) وذلك من خلال دراسة دورها المضاد للأكسدة (اقتناص جذور DPPH، جذور OH[•] و تثبيط الأكسدة الفوقية للبيدات)، بالإضافة إلى دراسة النشاط المضاد للبكتيريا، المضاد للسرطان و المثبت للغشاء للمستخلص البيتانولي لنبات *Chrysanthemum fontanesii*.

2- المواد و الطرق المستعملة

2-1- تقدير المركبات الفينولية الكلية

تم تقدير محتوى المركبات الفينولية الكلية في مختلف المستخلصات لنباتي *C. fontanesii* و *R. suaveolens* باستعمال Folin-Ciocalteus reagent حسب طريقة (Singleton et al., 1999). يضاف 20µl من مختلف المستخلصات (البتانولية و ايثيل أسيتات) للنباتين إلى 100 µl من Folin-Ciocalteus reagent و 1580µl من الماء المقطر، بعد 3 دقائق يضاف 300µl من كربونات الصوديوم (Na₂CO₃). يترك الخليط لمدة 2 ساعة في درجة حرارة الغرفة. ثم تقرأ الكثافة الضوئية على طول موجة 765 نانومتر. يستعمل حمض الجاليك (gallic acid) كمعيار، إذ يحضر المنحنى القياسي باستعمال 0، 50، 100، 150، 200، 250، 500 ملغ/ملل حمض الجاليك المذاب في الميثانول والماء بنسبة (10:90). يحدد تركيز المركبات الفينولية الكلية في مختلف المستخلصات بالميكروغرام لحمض الجاليك المكافئ ل 1مغ من المستخلص بإتباع المعادلة المحصل عليها من المنحنى القياسي لحمض الجاليك.

2-2- تقدير الفلافونويدات الكلية

تم تقدير كمية الفلافونويدات الكلية في مختلف المستخلصات لنباتي *C. fontanesii* و *R. suaveolens* حسب طريقة (Ordonez et al., 2006). يضاف 0.5 ملل من مختلف المستخلصات (البتانولية و ايثيل أسيتات) للنباتين إلى 0.5 ملل من AICl₃ (2%) المذاب في الميثانول. يترك الخليط لمدة ساعة في درجة حرارة الغرفة. ثم تقرأ الكثافة الضوئية على طول موجة 420 نانومتر. يستعمل Quercetin كمعيار، إذ يحضر المنحنى القياسي باستعمال 0، 1، 5، 10، 15، 20، 25، 30 ميكروغرام/ملل من Quercetin المذاب في الميثانول.

2-3- اختبار النشاط القانص لجذر DPPH

يعتبر اختبار DPPH من بين الطرق الممتازة و المستعملة للكشف عن النشاط القانص للجذور الحرة لأي مركب مضاد للأكسدة. لهذا الغرض يضاف العديد من التراكيز من مختلف المستخلصات النباتية (البيتانولية و ايثيل أسيتات) للنباتين والمذابة في الميثانول (1، 2.5، 5، 10، 15، 20، 30، 40، 50، 75ميكروغرام/ملل) إلى 3 ملل DPPH (0.004 %) المذاب في الميثانول (Braca et al., 2001). تحضن لمدة 30 دقيقة في الظلام و في درجة حرارة الغرفة. تقرأ الكثافة الضوئية على طول موجة 517 نانومتر.

يعبر عن النشاط المضاد للأكسدة لكل مستخلص بقيمة IC₅₀ و هي تركيز المادة القادرة على تثبيط 50 % من جذر DPPH و يتم حسابها باستعمال برنامج Excel و تطبيق المعادلة الخطية. يستعمل فيتامين C

كمعيار. و يعبر كذلك عن النشاط المضاد للأكسدة لكل مستخلص بقيمة (I%) و هي النسبة المئوية لتثبيط جذر DPPH باستعمال تراكيز مختلفة من المستخلصات النباتية.

2-4- اختبار النشاط القانص لجذر الهيدروكسيل

تم تقدير النشاط القانص لجذر الهيدروكسيل بالاعتماد على طريقة (Wang et al., 2008) مع بعض التعديلات. تم إنتاج جذر OH[·] من تفاعل FeSO₄ مع H₂O₂ و يكشف عنه بتفاعله مع sodium salicylate. يحتوي خليط التفاعل على 0.5 ملل (8 mM) FeSO₄، 0.8 ملل (6 mM) H₂O₂، 0.5 ملل ماء مقطر، التراكيز المختلفة من المستخلصات النباتية أو فيتامين C و 0.2 ملل (20 mM) sodium salicylate. يحضن الخليط لمدة ساعة في درجة حرارة 37°م. تقرأ الكثافة الضوئية لمعقد hydroxylated salicylate عند 562 نانومتر. تحسب النسبة المئوية للنشاط القانص حسب المعادلة التالية

$$\text{Scavenging rate} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$$

A₁ الكثافة الضوئية للشاهد

A₂ الكثافة الضوئية للعينة

A₀ الكثافة الضوئية في غياب sodium salicylate

2-5- اختبار الأكسدة الفوقية للبيدات (lipid peroxidation)

يتم تحديد تثبيط الأكسدة الفوقية للبيدات بتقدير تركيز (MDA) الناتج عن الأكسدة الفوقية للبيدات انطلاقاً من مح البيض المتفاعل مع حمض thiobarbituric وذلك حسب طريقة (Banerjee et al., 2005). يحضر معلق صفار البيض (10%) باستعمال محلول PBS البارد (PH 7.4)، يعرض المعلق للطررد المركزي. ثم يحضن 0.5 ملل من السائل الطافي مع 0.1 ملل من المستخلصات النباتية بتركيز 0.1، 0.2، 0.3، 0.4، 0.5 ملغ/ملل في وجود 50µl من محلول FeSO₄ (0.07 M) لمدة ساعة في درجة حرارة 37°م. ثم بعد ذلك يضاف 1 ملل من (TCA, 20%) و 1.5 ملل من (TBA, 1%). يوضع الخليط في حمام مائي على درجة الغليان لمدة 15د، ثم تجرى عملية الطرد المركزي، وتقرأ الكثافة الضوئية على طول موجة قدرها 532 نانومتر.

2-6- اختبار النشاط المثبت للغشاء Membrane stabilizing activity

2-6-1- تحضير معلق كريات الدم الحمراء

يؤخذ الدم من الوريد البابي للجرذان في وجود héparine لمنع التجلط، يغسل الدم 3 مرات باستعمال محلول ملحي 0.9% ثم يحسب حجم الراسب لتحضير معلق 40% في محلول PBS متساوي التوتر (PH7.4).

2-6-2- الانحلال الدموي المحرض بالحرارة

نضع 5ملل من محلول ملحي متساوي التوتر في أنابيب اختبار تحتوي على 50، 100، 200مكروغرام/مل من المستخلص البيتانولي لنبات *C. fontanesii* يضاف إليها 30 ميكرو لتر من معلق كريات الدم الحمراء. تحضن الأنابيب في حمام مائي 54° م وتحفظ أنابيب أخرى في حمام ثلجي، بعدها تعرض الأنابيب للطرد المركزي ثم تقرأ الكثافة الضوئية على طول موجة 540 نانومتر. استعمل حمض acetyl salicylic (ASA) (200مكروغرام/مل) كشاهد.

2-6-3- الانحلال الدموي المحرض بالمحلول منخفض التوتر

يوضع 5ملل من محلول ملحي منخفض التوتر في أنابيب اختبار تحتوي على 50، 100، 200مكروغرام/مل من المستخلص البيتانولي لنبات *C. fontanesii* يضاف 30 ميكرو لتر من معلق كريات الدم الحمراء. تحضن الأنابيب في حرارة الغرفة، بعدها تعرض الأنابيب للطرد المركزي. تقرأ الكثافة الضوئية على طول موجة 540 نانومتر. استعمل حمض acetyl salicylic (200مكروغرام/مل) كشاهد.

2-6-4- تثبيط الانحلال الدموي المحرض بالماء الأكسجيني (H₂O₂)

تم تقدير النشاط المثبط للانحلال الدموي حسب طريقة (Miki et al., 1987). يؤخذ دم الجرذان من الوريد البابي في وجود héparine لمنع التجلط، يغسل الدم 5 مرات باستعمال محلول PBS متساوي التوتر (PH7.4). يحضر معلق كريات الدم الحمراء 0.5% في محلول PBS. يوضع 1ملل من معلق كريات الدم الحمراء 0.5% في أنابيب اختبار و يضاف لها تراكيز مختلفة من المستخلصات النباتية (0.02، 0.04، 0.06، 0.08، 0.1، 0.2 ملل) توضع الأنابيب في حمام مائي 37° م. ثم يضاف 0.5ملل من H₂O₂(50mM) إلى المزيج و تحضن في حمام مائي 37° م. بعد ذلك يضاف 4 ملل من محلول PBS، تتبع بالطرد المركزي. تقرأ الكثافة الضوئية على طول موجة 415 نانومتر. استعمل فيتامين C كشاهد ايجابي.

2-7- دراسة النشاط المضاد للبكتيريا

2-7-1- السلالات البكتيرية

تم الحصول على السلالات البكتيرية من مخبر علم الأحياء الدقيقة من المستشفى الجامعي ابن باديس بقسنطينة و تمثلت في *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Bacillus amyloquafeciens*، *Pseudomonas sp*، *Proteus vulgaris*.

2-7-2- تحديد نشاط المستخلص بطريقة الانتشار (الأقراص)

تعقم أقراص من ورق Watman رقم 1 قطرها 5 ملم ثم يشبع كل قرص ب 0.1 ملل من المستخلص البيتانولي لنبات *C. fontanesii* وذلك بطريقة الحقن والتجفيف المتتاليين (مع الاحتفاظ بطريقة التجفيف الأقل حرارة). نستعمل 3 مكررات من الأقراص في كل طبق.

تحضر أطباق بتري في ظروف تعقيم جيدة، تسكب فيها البيئات المناسبة، عندما تجمد نزرع فيها بكتيريا فنية بطريقة دقيقة على أن لا نترك فراغات فيما بينها. توضع 3 أقراص في كل طبق مع ترك مسافة بين كل قرصين متجاورين تقدر ب 30ملم، و بين القرص و حافة الطبق تكون حوالي 15 ملم. توضع الأطباق بشكل مقلوب لمدة 30 د في درجة حرارة الغرفة لانتشار المادة في الأجار المغذي، ثم تحضن الأطباق على 37°م إلا طبق *Bacillus* فيحضن على 30°م وتتم القراءة بعد 18 إلى 24 ساعة . (Chakraborty and Mitra, 2008)

2-7-3- تحديد نشاط المستخلص بطريقة التخفيف

توضع تراكيز متزايدة من المستخلص البيتانولي لنبات *C. fontanesii* 0.25، 0.5، 1، 2، 4، 8 ملغ/ملل في سلسلة من الأنابيب المعقمة تحتوي على نفس الحجم من المرق المغذي (Mueller-Hinton Agar) و على كمية موحدة من اللقاح تقدر ب 10⁶ بكتيريا/ملل، تحضن الأنابيب في درجة 37° لمدة 24 سا ثم نقوم بعملية القراءة.

أقل تركيز من المستخلص لا يظهر فيه نمو للبكتيريا يمكن اعتباره أقل تركيز مثبط للنمو (MIC). الأنابيب التي لم يظهر فيها نمو يمكن رؤيتها بالعين المجردة، تزرع على سطح أجار مغذي بعدها تحضن على 37° لمدة 24 سا، ثم تتم القراءة، حيث أن أقل تركيز من المستخلص لا يسمح بنمو عدد يساوي أو أقل من 0.01 % من البكتيريا يعتبر كأقل تركيز قاتل (MBC).

8-2- دراسة تأثير المستخلصات النباتية على الخلايا السرطانية

1-8-2 - تأثير المستخلصات النباتية على خلايا PNT1a

تحضر خلايا PNT1a (prostate normal tissue immortalized) بتركيز 10^3 خلية/مل في وجود البيئة المغذية RPMI-1640 المحتوية على 1% مضاد حيوي (penicillin-streptomycin cocktail)، توزع الخلايا في أطباق التسمية ذات 96 بئر بمعدل 200 ميكرو لتر من المعلق الخلوي في كل بئر، يحتوي كل بئر على التراكيز التالية من المستخلص النباتي 0.1 نانوغرام، 1 نانوغرام، 10 نانوغرام، 100 نانوغرام، 1 μg ، 10 μg ، 100 μg ، 500 μg و 1 ملغ على التوالي . و يكرر كل تركيز 3 مرات بحيث تترك مجموعة بدون معاملة وتعتبر كشاهد ومجموعة أخرى يضاف إليها 2 μl من DMSO، توضع في الحضانة لمدة 24 سا. بعد التحضين تستبدل بيئة التسمية بأخرى تحتوي على 10% WST1 وتترك لمدة ساعة في الحضانة 37°م ثم تقرأ الكثافة الضوئية على طول موجة 450 نانومتر.

2-8-2 - دراسة تأثير المستخلصات النباتية على خلايا PC3

تتبع نفس الخطوات السابقة مع استعمال بيئة التسمية الخاصة بخلايا PC3

(Human prostate cancer cell) وهي DMEM.

2-8-3 - دراسة تأثير المستخلص النباتي على خلايا EAC

توضع الخلايا السرطانية (EAC) Ehrlich Ascites Carcinoma في أنابيب معقمة بتركيز 2.5×10^5 خلية سرطانية لكل 2مل من المحلول المنظم الملحي phosphate buffer saline، ثم يضاف 0.1 مل من المستخلص البيتانولي لنبات *C. fontanesii*، تحضن الأنابيب لمدة ساعتين على درجة حرارة 37°م ثم تختبر حيوية الخلايا باستعمال طريقة trypan blue dye exclusion. تصبغ الخلايا بـ trypan blue (0.4% مذاب في محلول ملحي)، الخلايا التي لا تتفقد إليها الصبغة تعتبر حية أما الخلايا التي تتفقد إليها فهي ميتة بحيث تحسب الخلايا الحية و الميتة ومن ذلك تحسب النسبة المئوية للتنشيط

(Sheeja et al., 1997).

3- النتائج و المناقشة

3-1- المركبات الفينولية و الفلافونويدات الكلية

تعتبر من أهم المكونات النباتية لقدرتها القانصة للجذور الحرة و التي ترجع إلى مجاميع الهيدروكسيل التي تمتلكها (Rice-Evan et al., 1995). لقد تم تقدير كمية المركبات الفينولية و الفلافونويدات الكلية للمستخلصات النباتية (جدول 4) باستعمال معادلة مستتبطة من المنحنى القياسي لحمض الجاليك و Quercetin على التوالي.

يحتوي المستخلص البيتانولي لنباتي *C. fontanesii* و *R. suaveolens* على كمية كبيرة من المركبات الفينولية قدرت ب $349 \mu\text{g}$ و $323 \mu\text{g}$ من حمض الجاليك المكافيء/ملغ مستخلص علي الترتيب. في حين قدرت تلك المركبات في مستخلص ايثيل أسيتات للنباتين ب $502 \mu\text{g}$ و $240 \mu\text{g}$ من حمض الجاليك المكافيء/ملغ مستخلص علي التوالي. جدول (4).

يحتوي مستخلص ايثيل أسيتات لنبات *C. fontanesii* على كمية كبيرة من الفلافونويدات الكلية قدرت ب 214.8 ميكروغرام/ملغ مقارنة مع المستخلص البيتانولي لنفس النبتة 117.20 ميكروغرام/ملغ. أيضا يحتوي المستخلص البيتانولي لنبات *R. suaveolens* على كمية كبيرة من الفلافونويدات قدرت ب 300 ميكروغرام/ملغ مقارنة مع المستخلص ايثيل أسيتات لنفس النبتة الذي يحتوي على 54.14 ميكروغرام/ملغ. جدول (4).

جدول 4. محتوى الفينولات و الفلافونويدات الكلية لمختلف المستخلصات النباتية (متوسط 3 مكررات)

النبات	محتوى الفينولات الكلية (gallic acid equivalents) ($\mu\text{g}/\text{mg}$ plant material)	محتوى الفلافونويدات الكلية (quercetine equivalents) ($\mu\text{g}/\text{mg}$ plant material)
مستخلص ايثيل أسيتات لنبات <i>Chrysanthemum fontanesii</i>	502	214.8
المستخلص البوتانولي لنبات <i>Chrysanthemum fontanesii</i>	349	117.20
مستخلص ايثيل أسيتات لنبات <i>Rhantherium suaveolens</i>	240	54.14
المستخلص البوتانولي لنبات <i>Rhantherium suaveolens</i>	323	300

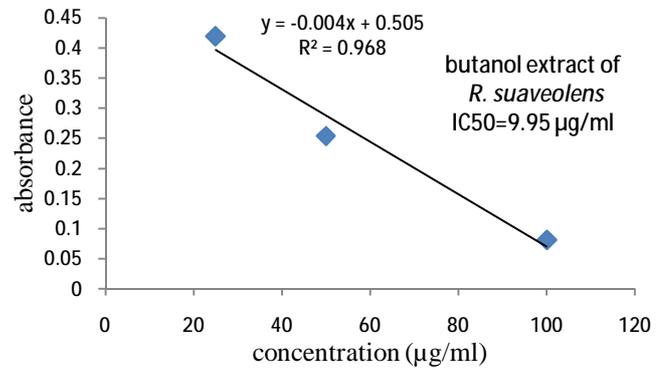
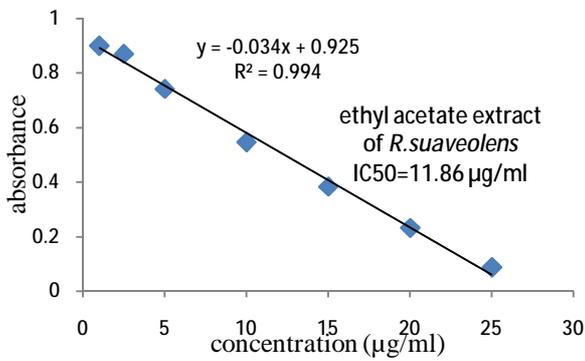
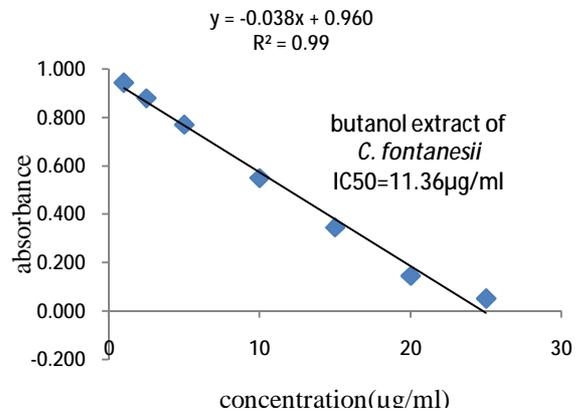
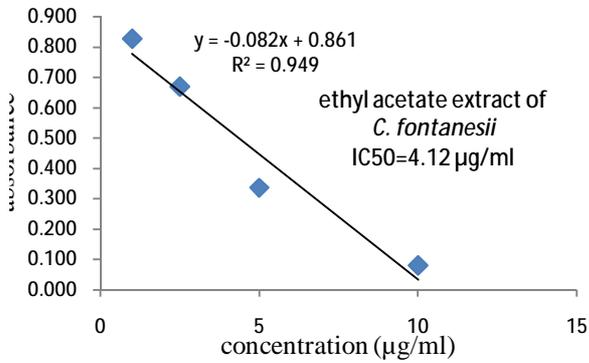
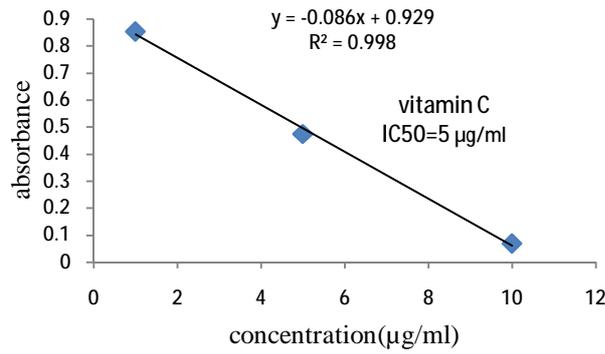
3-2- النشاط القانص لجذر DPPH

يستعمل جذر DPPH لتقييم النشاط المضاد للأكسدة، ويرجع دور مضادات الأكسدة في اقتناص جذر DPPH إلى قدرتها على إعطاء جزيئه هيدروجين. (Baumann et al., 1979; Naik et al., 2003)، إذ يعتبر DPPH جذر حر قادر على قبول إلكترون أو ذرة هيدروجين ليصبح جزيئه مستقرة. وقد تم تحديد القدرة على اختزال جذر DPPH بقياس الانخفاض في الامتصاص (الكثافة الضوئية) على طول موجة 517 نانومتر . و يمكن ملاحظة ذلك بالعين المجردة أثر تحول اللون البنفسجي إلى الأصفر .

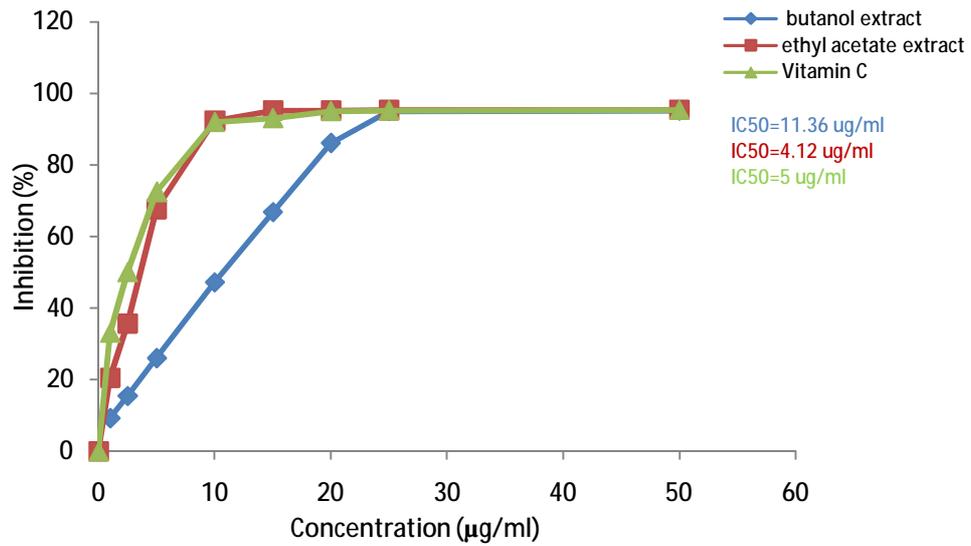
أظهرت مختلف مستخلصات النباتية قدرة على إعطاء الهيدروجين معتمدة على التركيز كما هو موضح في الشكل (35)، حيث أبدى فيتامين C قدرة عالية على اقتناص جذر DPPH ($IC_{50} = 5 \mu g/ml$). كما لوحظ أن مختلف مستخلصات نباتي *C. fontanesii* و *R. suaveolens* لها قدرة كبيرة على اقتناص جذر DPPH، حيث قدرت قيم IC_{50} للمستخلص البيتانولي و إيثيل أسيتات لأزهار نبات *C. fontanesii* ب $11.68 \mu g/ml$ و $4.12 \mu g/ml$ علي الترتيب. أما بالنسبة لنبات *R. suaveolens* ، فقد قدرت قيم IC_{50} للمستخلصين البيتانولي و إيثيل أسيتات ب $11.68 \mu g/ml$ و $9.95 \mu g/ml$ على التوالي.

يوضح الشكلان (36) و (37) ارتفاع معنوي في النسبة المئوية لنتيبيط جذر DPPH و الذي يرجع إلى قدرة مختلف مستخلصات النباتين على اقتناص هذا الأخير مقارنة بفيتامين C الذي أستعمل كشاهد. عند التركيز $20 \mu g/ml$ ، سجل التأثير القانص لفيتامين C ومختلف مستخلصات نباتي *C. fontanesii* (مستخلص إيثيل أسيتات و المستخلص البيتانولي) و *R. suaveolens* (مستخلص إيثيل أسيتات و المستخلص البيتانولي) 95% ، 95% ، 86.15% ، 80.60% و 77.6% على التوالي.

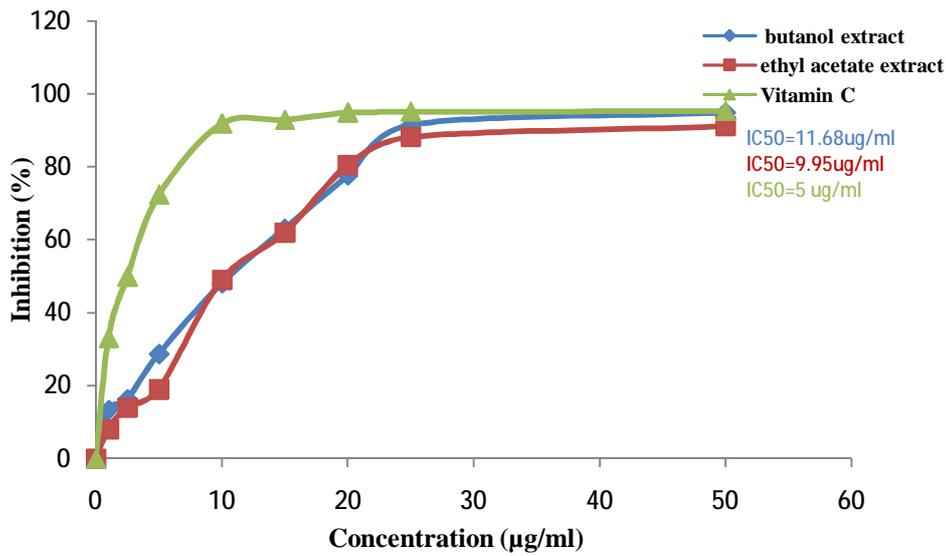
تبين النتائج بوضوح أن مختلف مستخلصات النباتين لها تأثير واضح على اقتناص الجذور الحرة إذ يزداد النشاط القانص بزيادة التركيز. يرتبط هذا النشاط باحتواء هذه المستخلصات على المركبات الفينولية القانصة للجذور الحرة مثل الفلافونويدات و الأحماض الفينولية .



شكل 35. النشاط القانص للجذور الحرة (DPPH) لمختلف مستخلصات نبات *Chrysanthemum* و *Rhantherium suaveolens*، *fontanesii* و حمض الأسكوربيك عند تراكيز مختلفة (قيم IC₅₀) (متوسط 3 مكررات)



شكل 36. النشاط القانص لجذر DPPH لنبات *Chrysanthemum fontanesii* و فيتامين C

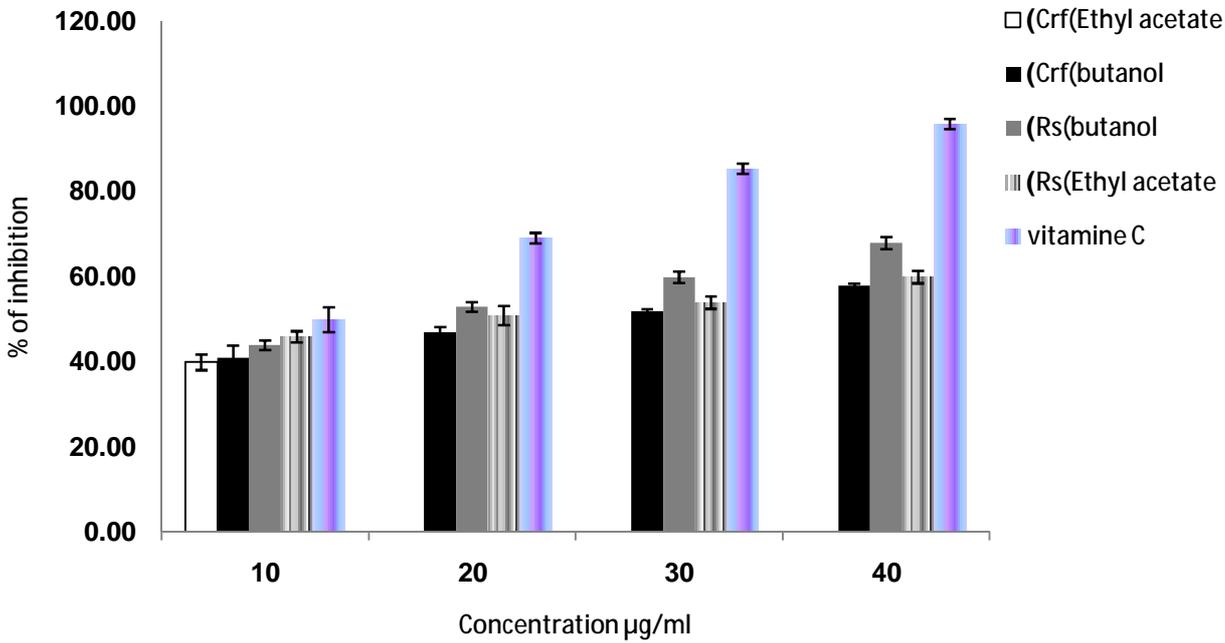


شكل 37. النشاط القانص لجذر DPPH لنبات *Rhantherium suaveolens* و فيتامين C (متوسط 3 مكررات)

3-3- النشاط القانص لجذر الهيدروكسيل

لهذا الجذر قدرة عالية على التفاعل، إذ يمكنه بسهولة اختراق الأغشية الخلوية في مواقع نوعية و يتفاعل مع معظم الجزيئات الحيوية خاصة السكريات، الأحماض الأمينية، الليبيدات و النيكليوتيدات مما يسبب أضرار نسيجية و الموت الخلوي (Yanga et al., 2008). يتم إنتاج جذر الهيدروكسيل بطرق مختلفة في العضوية من أهمها تفاعل Fenton حيث تعمل معادن الانتقال كمواد مؤكسدة (prooxidant) في وجود H_2O_2 و Superoxide (Stohs and Bagchi, 1995, Wang et al., 2008).

عموما يرجع النشاط القانص للمواد الفينولية إلى قدرة مجاميع الهيدروكسيل التي تمتلكها على إعطاء الهيدروجين. تعتبر المستخلصات النباتية المختبرة معطي جيد للالكترونات مما سرع تحويل H_2O_2 إلى H_2O . يوضح الشكل (38) قدرة العينات المختبرة على اقتناص أيونات الحديد (ferrous ions) مما يوحي بأنها تقلل من تركيز المعدن في تفاعل Fenton. يرتبط التأثير المضاد للأكسدة للعديد من المود الفينولية المثبطة لتشكيل جذر الهيدروكسيل و الأكسدة الفوقية لليبيدات بخصائصها القانصة للحديد (Mathew and Abraham, 2006; Cao and Ikeda, 2009).



شكل 38. النشاط المثبط لتشكيل جذر الهيدروكسيل لكل من فيتامين C و مختلف مستخلصات نباتي *Rhantherium suaveolens*, *Chrysanthemum fontanesii* (متوسط 3 مكررات)

3-4 - النشاط المثبط للأكسدة الفوقية للبيدات

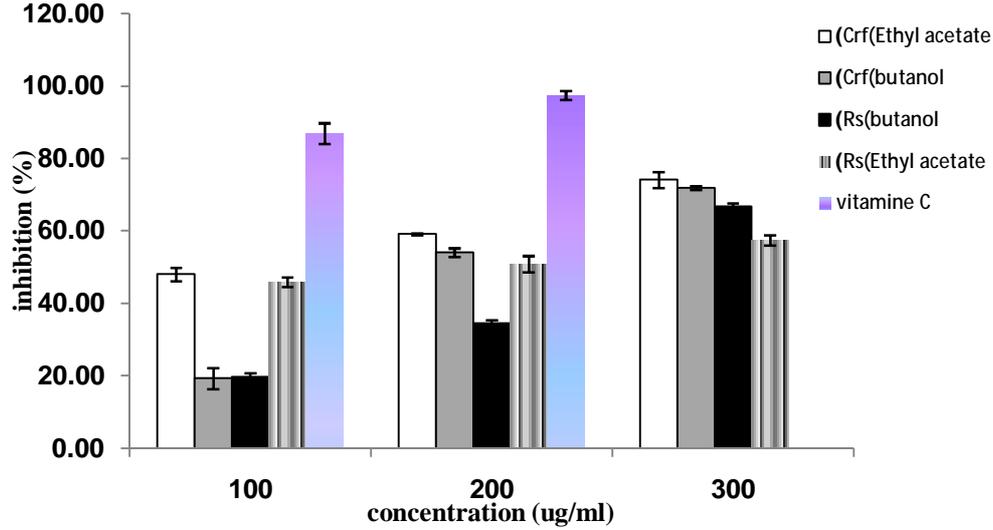
ينتج عن الأكسدة الفوقية للبيدات في الأنظمة البيولوجية العديد من المركبات من أهمها MDA الذي يعتبر من أهم أسباب تلف الغشاء الخلوي و الخلية (Yoshikawa et al., 1997). لهذا الغرض تم تقييم قدرة مختلف مستخلصات نبات *C. fontanesii* و *R. suaveolens* على تثبيط الأكسدة الفوقية للبيدات غير الإنزيمية في معلق صفار البيض المحرض ب $FeSO_4$. كما موضح في الجدول (5).

جدول 5. قيم IC_{50} (متوسط 3 مكررات)

العينة	اقتناص جذر DPPH (IC_{50} value) ($\mu g/ml$)	اقتناص جذر OH^{\cdot} (IC_{50} value) ($\mu g/ml$)	الوقاية من الأكسدة الفوقية للبيدات (IC_{50} value) ($\mu g/ml$)
مستخلص ايثيل أسيتات لنبات <i>C. fontanesii</i>	4.12		122.05
المستخلص البيتانولي لنبات <i>C. fontanesii</i>	11.36	29.45	171.34
مستخلص ايثيل أسيتات لنبات <i>R. suaveolens</i>	11.68	19.33	200
المستخلص البيتانولي لنبات <i>R. suaveolens</i>	9.95	22.15	185.91
فيتامين C	5	10.53	20

تزداد قدرة المستخلصات النباتية على تثبيط الأكسدة الفوقية للبيدات بزيادة التركيز (شكل 39) إذ تقدر النسبة المئوية لتثبيط الأكسدة الفوقية للبيدات عند التركيز 0.3 ملغ/مل لمختلف مستخلصات نبات *C. fontanesii* (مستخلص ايثيل أسيتات و المستخلص البيتانولي) و *R. suaveolens* (مستخلص ايثيل أسيتات و المستخلص البيتانولي) ب 74.16%، 71.93%، 53.75% و 66.73% على التوالي، أما بالنسبة لفيتامين C فقد بلغت 97.5%.

يعتبر انخفاض الأكسدة الفوقية للبيدات بواسطة المستخلصات النباتية نتيجة لقدرتها على تثبيط و اقتناص الجذور الحرة الناتجة عن $FeSO_4$.



شكل 39. تثبيط الأوكسدة الفوقية للبيدات بمختلف مستخلصات نبات *Chrysanthemum fontanesii* و *Rhantherium suaveolens* (متوسط 3 مكررات)

3-5- النشاط المثبط لانحلال كريات الدم الحمراء

3-5-1- تثبيط الانحلال الدموي المحرض بالمحلول منخفض التوتر و الحرارة

اهتم الباحثون بدراسة دور المستخلصات النباتية في المحافظة على ثبات غشاء كريات الدم الحمراء اثر تعرضه للحرارة أو الوسط منخفض التوتر، لتفسير آلية النشاط المضاد للالتهاب لهذه المستخلصات (Oyedapo et al., 1997). إذ يشبه غشائها كثيرا غشاء الليزوزومات، وبالتالي يمكن دراسة تأثير العقاقير الغنية بمتعددات الفينول على ثبات غشاء كريات الدم الحمراء و تطبيقه على غشاء الليزوزومات (Olugbenga et al., 2005; Oyedapo et al., 2004; Sadique et al., 1989; Kumar and Sadique, 1987) خاصة وأن الفلافونويدات تؤمن ثبات غشاء الليزوزومات *In Vivo* و *In Vitro*

لدى حيوانات التجارب (Sadique et al., 1989; Middleton, 1996).

أبدى المستخلص البيتانولي لنبات *C. fontanesii* عند التركيزين 0.1 و 0.2 ملغ/ملل وقاية معتبرة من انحلال كريات الدم الحمراء المحرض بالحرارة و المحلول منخفض التوتر مقارنة مع acetyl (ASA) salicylic acid (0.2 ملغ/ملل) (جدول 6) حيث بلغت نسب تثبيط انحلال كريات الدم الحمراء المحرض بالمحلول منخفض التوتر، عند التركيزين المذكورين أعلاه 52.59% و 59.9% على التوالي، في حين كانت نتيجة تثبيط ASA 51.56%. أما نسب تثبيط انحلال كريات الدم الحمراء المحرض بالحرارة و ASA فقد بلغت 21.84% و 27.36% و 26.16% على التوالي.

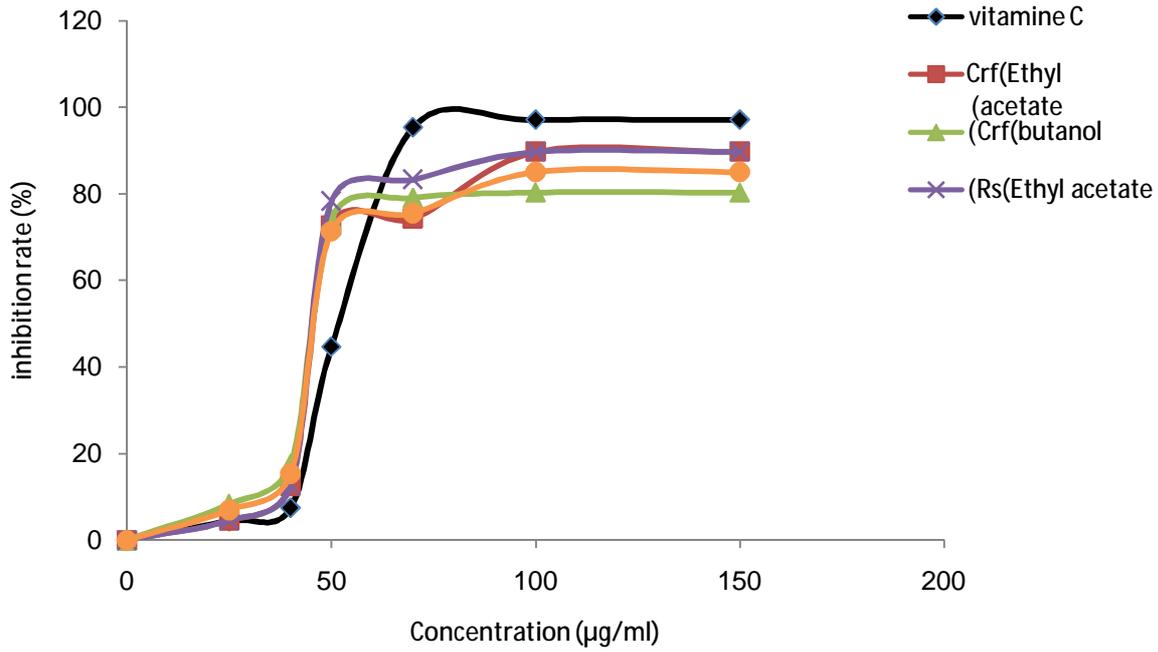
جدول 6. تأثير المستخلص البوتانولي لنبات *C. fontanesii* على انحلال غشاء كريات الدم الحمراء المعرض بالحرارة والمحلول منخفض التوتر (متوسط 3 مكررات)

العينة	التركيز g/mlu	النسبة المئوية لتثبيط الانحلال الدموي	محلول منخفض التوتر
الشاهد	-	الحرارة	-
المستخلص البيتانولي لنبات	100	*1.15±21.84	0.53±52.59
<i>Chrysanthemum fontanesii</i>	200	0.84±27.36	*0.08±59.9
ASA	200	1.72±26.16	1.35±51.56

تبين النتائج بان المستخلص البيتانولي لنبات *C. fontanesii* جد فعال في حماية غشاء كريات الدم الحمراء ، وذلك من خلال قدرته على تثبيط انحلال كريات الدم الحمراء المعرض بالحرارة و المحلول منخفض التوتر مقارنة مع المعيار ASA. حيث يملك المستخلص نشاط مثبثا للغشاء. و قد يرجع ذلك إلى احتواء المستخلص على كمية كبيرة من المركبات الفينولية، خاصة الفلافونويدات التي قد تحدث خلل في تدفق أيونات الكالسيوم على مستوى كريات الدم الحمراء، مما يحافظ على حجم الخلية وعدم تشوهها (Shind et al., 1999). أو إلى زيادة نسبة سطح الغشاء وبالتالي امتداده و ذلك بتداخله مع البروتينات الغشائية (Abe et al., 1991). كذلك تمارس الفلافونويدات نشاطها المثبت للغشاء من خلال تخللها المنطقة الكارهة للماء في الغشاء بحيث تغير ترتيب الليبيدات (Arora et al., 2000).

3-5-2- تثبيط الانحلال الدموي المعرض بالماء الأكسجيني (H₂O₂)

تبين النتائج المدونة في الشكل (40) دور فيتامين C و مختلف مستخلصات نباتي *C. fontanesii* و *R. suaveolens* في تثبيط الانحلال الدموي المعرض بالماء الأكسجيني، إذ يعتمد هذا التثبيط على التركيز، فيثبط بكفاءة الانحلال الدموي عند التركيز 0.05 مغ/مل و تصل نسبة التثبيط إلى أقصاها عند التركيز 0.1 مغ/مل و تقدر ب 89.72%، 80.30% بالنسبة لمستخلص ايثيل أسيتات و المستخلص البيتانولي لنبات *C. fontanesii* على التوالي بينما قدرت ب 89.72%، 85.01% بالنسبة لمستخلص ايثيل أسيتات و المستخلص البيتانولي لنبات *R. suaveolens*. أما بالنسبة لفيتامين C فقد بلغت 97.12%. تبين هذه النتائج أن مختلف مستخلصات *C. fontanesii* و *R. suaveolens* باختراقها الطبقة الليبيدية المزدوجة تقلل من تركيز الجذور الحرة و تمارس نشاطها المضاد للأكسدة في الأغشية الحيوية (Saija et al., 1995).



شكل 40. تثبيط الانحلال الدموي المحرض بالماء الأوكسجيني بمختلف مستخلصات نباتي *Chrysanthemum fontanesii* و *Rhantherium suaveolens* (متوسط 3 مكررات)

3-6 - النشاط المضاد للبكتيريا

تطرق العديد من الباحثين في الآونة الأخيرة إلى دراسة قدرة النباتات الغنية بالمركبات الفينولية على الوقاية من الميكروبات (Chakraborty and Mitra, 2008; Pereira et al., 2007; Sousa et al., 2006)، لهذا الغرض قمنا بدراسة دور المستخلص البينانولي لنبات *C. fontanesii* ضد السلالات البكتيرية *Proteus vulgaris*، *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Bacillus amyloquafeciens* و *Pseudomonas sp*. أبدت هذه السلالات حساسية مختلفة اتجاه المستخلص البوتانولي لنبات *C. fontanesii*. حيث بينت نتائج اختبار *disc diffusion* أن البكتيريا الموجبة الغرام أكثر حساسية للمستخلص النباتي مقارنة بالبكتيريا السالبة الغرام (جدول 7). إذ بلغت منطقة تثبيط *S. aureus* عند التركيز 0.1 ملغ/قرص 11 ملم وهي أكبر من المناطق التثبيطية للسلالات الأخرى. توافق هذه النتائج أعمال (Oliveira et al., 2008) عموماً فالبكتيريا السالبة الغرام أكثر مقاومة لعديدات الفينول مقارنة بالبكتيريا الموجبة الغرام وذلك لاختلاف تركيب الجدار الخلوي (Negi et al., 2003).

يوضح الجدول (7) نتائج أقل تركيز مثبط لنمو البكتيريا MIC و أقل تركيز قاتل للبكتيريا MBC بالنسبة ل *S. aureus* و *P. vulgaris*. حيث أن *S. aureus* أكثر حساسية من *P. vulgaris*. إذ بلغ أقل تركيز مثبط لنمو البكتيريا بالنسبة ل *S. aureus* ب 2ملغ/مل. هذه النتيجة جد مهمة وذلك لأن هذا الأخير يمكنه إنتاج مختلف أنواع enterotoxins المسببة لالتهاب الجهاز الهضمي الناتج عن التسمم الغذائي (Oliveira et

(al., 2008; Bhunia, 2008). تعتبر المواد الطبيعية كالفلافونويدات مضادة للميكروبات حيث يعمل quercetin و المركبات المشابهة على تثبيط إنزيم DNA gyrase (Cushnie and Lamb, 2005).

جدول 7. النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلص البيتانولي لنبات *Chrysanthemum fontanisia* (متوسط 3 مكررات)

MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	قطر منطقة التثبيط (ملم) g/disc)μ(100	البكتيريا
4	2	11	Staphylococcus aureus
-	-	7	Bacillus amyloquafeciens
-	-	6	Escherichia coli
-	-	0	Pseudomonas sp
8	4	6	Proteus vulgaris

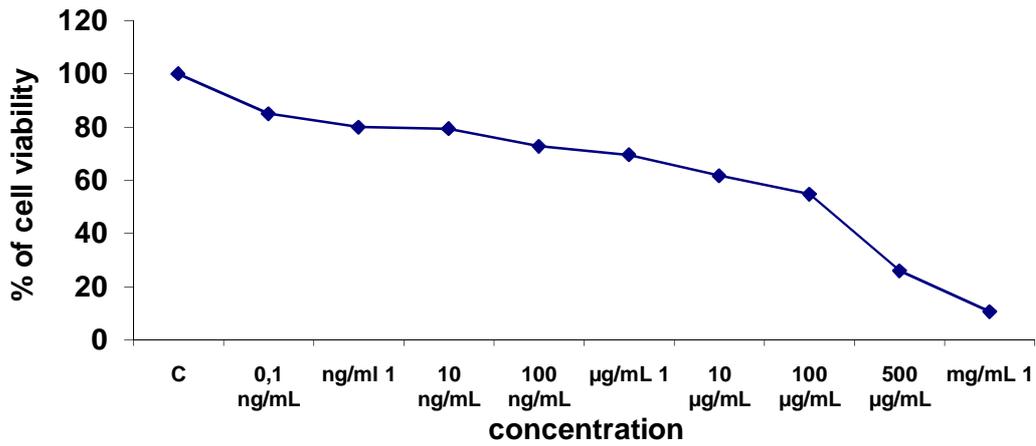
بينت الدراسة الكيميائية احتواء المستخلص البيتانولي لنبات *C. fontanisia* على فلافونويدات من نوع فلافونون aglycones (Isorhamnetine 3-O-methylether ، Isokaempféride) و (Quercétine 3-O- methylether و فلافونون hétérosides مشتقة من quercetine أهمها Isorhamnetine 3-β-glucoside و (cacticine) و Querciméritrine- 3- methylether بالإضافة إلى مركبات Sesquiterpenes (Caryolane -1,) (Acide cinnamoyle ، Acide benzoïque) ، أحماض فينولية (Clovane -2-β, 9-α-diol ، 9-β- diol كومارين (Scopoline) و (Stérol (β-sitostérol) (Benaissa, 2011) و بالتالي يعزى النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلص البيتانولي لنبات *C. fontanisia* إلى احتوائه على تشكيلة معتبرة من الفلافونويدات (Cushnie and Lamb, 2005) و المركبات الفينولية وخاصة Acide benzoïque (Ajaiyeoba et al., 2003) و (Nascimento et al., 2000; Friedman et al., 2003) β-sitostérol).

7-3- تأثير المستخلصات النباتية على الخلايا السرطانية

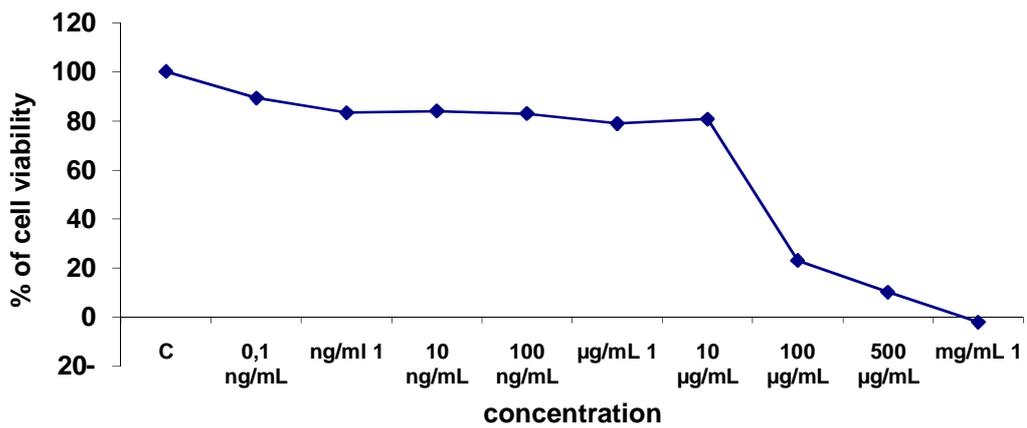
لدراسة نشاط المستخلص البوتانولي لنبات *Chrysanthemum fontanisia* المضاد للسرطان اعتمدنا على السلالات الخلوية التالية: خلايا PC3، خلايا PNT1a و خلايا EAC

7-3-1- تأثير المستخلص البيتانولي لنبات *C. fontanisia* على خلايا PC3 و PNT1a

يوضح الشكلان (41) و (42) نشاط المستخلص البيتانولي لنبات *C. fontanisia* المضاد للخلايا السرطانية PC3 و لخلايا PNT1a. حيث أبدى هذا المستخلص تثبيط نمو الخلايا السرطانية فقط عند أعلى تركيز (100 μg/ml ، 500 μg/ml و 1 mg/m)، حيث بلغت نسبة تثبيط نمو خلايا PNT1a و الخلايا السرطانية PC3 عند التركيز 100 μg/ml 80 % و 50% على التوالي.



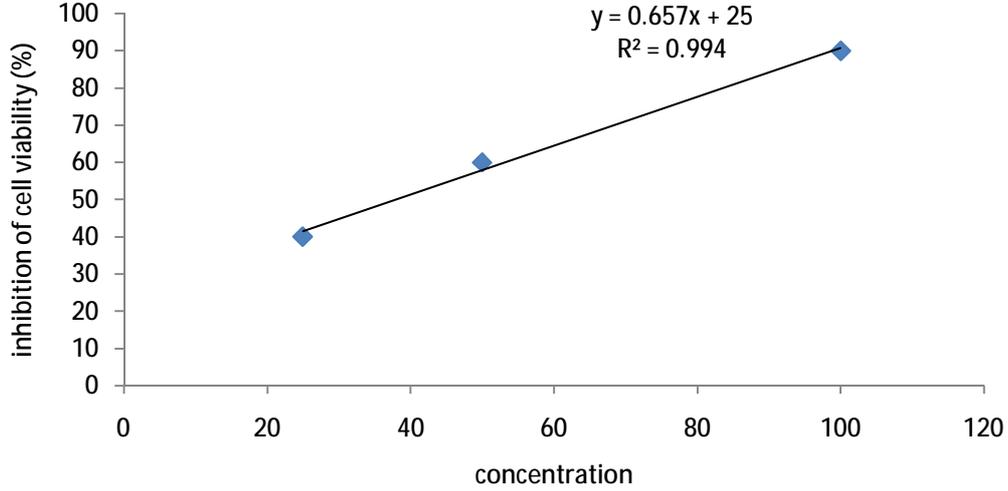
شكل 41. تأثير المستخلص البيتانولي لنبات *Chrysanthemum fontanesii* على خلايا PC3 (Human Prostate Cancer PC3 cell)



شكل 42. تأثير المستخلص البيتانولي لنبات *Chrysanthemum fontanesii* على خلايا PNT1a (Prostate Normal Tissue immortalized)

2-7-3- تأثير المستخلص البيتانولي لنبات *Chrysanthemum fontanesii* على خلايا EAC

أعطت الاختبارات على الخلايا السرطانية EAC بالمستخلص البيتانولي لنبات *C. fontanesii* نتيجة ايجابية حيث بلغت النسبة المئوية لتثبيط حيوية الخلايا السرطانية ب 90 %، 60 % و 40% عند التراكيز 100، 50 و 25 ميكرو لتر/ملي على التوالي (شكل 43) و هذا ما يؤكد دوره المضاد للسرطان.



شكل 43. تأثير المستخلص البوتانولي لنبات *Chrysanthemum fontanesii* على خلايا EAC

يمكن تفسير آلية عمل الفينولات على تثبيط نمو الخلايا السرطانية (النشاط المضاد للسرطان) بقدرتها على إحداث خلل في الانقسام الخلوي الميتوزي. إذ أنها تقلل من نسبة البروتينات الخلوية ومن تشكل المستعمرات الخلوية أثناء تكاثر الخلايا السرطانية (Gawron and Kruk, 1992). و قد اقترح الباحثون العديد من الآليات لعمل الفلافونويدات على الوقاية من السرطان من أهمها عملها المضاد لتكاثر الخلايا، نشاطها المضاد للأكسدة، تغييرها للإشارة الخلوية وتحريض الموت المبرمج للخلايا (Lee et al., 2004).

و الجدير بالذكر أن النشاط المضاد للسرطان يرتبط بكمية ونوع المركبات الفينولية الموجودة في المستخلصات النباتية. إذ يساهم وجود مجموعة 4-carbonyl لدى الفلافونويد في نشاطه المضاد للسرطان. كذلك فإن وجود الرابطة المزدوجة في الموقعين 2 و 3 للفلافونويد (2,3-double bond) مرتبط بتلف الصورة الحيوية و موت الخلايا السرطانية (Plochmann, 2007; Bravo, 1998). و لقد بينت الدراسة الكيميائية بأن المستخلص البيتانولي لنبات *C. fontanesii* يحتوي على β -sitosterol (Jayaprakasha et al., 2007) و على Isokaempferide المتميزان بقدرتهما على تثبيط نمو الخلايا السرطانية. (Costa-Lotufu et al., 2003; Touilet et al., 2009; Moghaddam et al., 2012)

4- الاستنتاج

تبين النتائج بأن مختلف مستخلصات نباتي *Rhantherium* و *Chrysanthemum fontanesii* تحتوي على كمية كبيرة و متنوعة من المركبات الفينولية، والتي يمكن أن تقتنص بكفاءة الجذور الحرة. و يرجع ذلك إلى قدرتها على إعطاء الهيدروجين، و ذلك من خلال اقتنص جذور DPPH و جذور الهيدروكسيل و تثبيط الأكسدة الفوقية للبيدات. تملك جميع المستخلصات النباتية المدروسة نشاطا مضادا للأكسدة معتمدا على التركيز. و ترجع قدرة المستخلصات على تأخير الأكسدة الفوقية للبيدات إلى قدرة مركباتها الفينولية على اقتنص الأشكال الأكسجينية النشطة.

أبدت السلالات البكتيرية *Escherichia*، *Staphylococcus aureus*، *Bacillus amyloquafeciens*، *Pseudomonas sp*، *Proteus vulgaris*، *coli* حساسية مختلفة اتجاه المستخلص البوتانولي لنبات *Chrysanthemum fontanesii*. حيث أن البكتيريا الموجبة الغرام أكثر حساسية للمستخلص النباتي مقارنة بالبكتيريا السالبة الغرام.

كما أن المستخلص البيتانولي لنبات *Chrysanthemum fontanesii* جد فعال في حماية غشاء كريات الدم الحمراء، وذلك من خلال قدرته على تثبيط انحلال كريات الدم الحمراء المحرض بالحرارة، المحلول منخفض التوتر و الماء الأكسجيني مقارنة مع المعيارين ASA و فيتامين C على التوالي. بمعنى أن المستخلص يملك نشاط مثبت للغشاء البلازمي.

أعطت الاختبارات على الخلايا السرطانية EAC، PC3 و خلايا PNT1a بالمستخلص البيتانولي لنبات *Chrysanthemum fontanesii* نتيجة ايجابية. حيث بلغت النسبة المئوية لتثبيط حيوية الخلايا السرطانية عند التركيز 100 ميكرو لتر/ملل ب 90 %، 80 % و 50 % على التوالي و هذا ما يؤكد دوره المضاد للسرطان.

الإستنتاج العام

بينت الدراسة داخل العضوية *In Vivo* بأن للتوتر التأكسدي دور كبير في التسمم و التشوهات الجينية المحرصة بدواء VPA لدى الفئران الحوامل، و ظهر ذلك جليا من خلال الارتفاع المعنوي في مستوى الأوكسدة الفوقية للبيدات و تلف البنية الغشائية و الانخفاض المعنوي في مستوى GSH و نشاط الإنزيمات المضادة للأوكسدة GPx، catalase في أعضاء الفئران الحوامل و أجنحتها. كما أبدت مضادات الأوكسدة الطبيعية كفيتامين E، C و المستخلص البيتانولي لنباتي *C. fontanesii* و *R. suaveolens* دور وقائي ضد التوتر التأكسدي الناتج في الخلية الكبدية، الكلوية، العصبية و الجينية اثر تعرضها لدواء VPA بواسطة قدرتها على اقتناص الجذور الحرة، و تحفيزها للنظام المضاد للأوكسدة من خلال الزيادة المعنوية في مستوى GSH و نشاط الإنزيمات المضادة للأوكسدة GPx، catalase.

كما أوضحت الدراسة خارج العضوية *In Vitro* بأن مختلف مستخلصات نباتي *C. fontanesii* و *R. suaveolens* تحتوي على كمية كبيرة و متنوعة من المركبات الفينولية، و هذا ما يفسر كفاءتها في اقتناص الجذور الحرة. و يرجع ذلك إلى قدرتها على إعطاء الهيدروجين لجذور DPPH، اقتناص جذور الهيدروكسيل و تثبيط الأوكسدة الفوقية للبيدات. إذن فجميع المستخلصات النباتية المدروسة تملك نشاطا مضادا للأوكسدة معتمدا على التركيز.

بالإضافة إلي ذلك أظهرت هذه الدراسة بأن المستخلص البيتانولي لنبات *C. fontanesii* أبدى نشاطا مضادا لبعض أنواع البكتيريا و الخلايا السرطانية عند تراكيز مختلفة. كذلك فهو جد فعال في حماية غشاء كريات الدم الحمراء من الانحلال المحرض بالحرارة، المحلول منخفض التوتر و الماء الأكسجيني.

References

Abd-allah S.S., Saad E.D. (2010). Prevention of sodium valproate-induced hepatotoxicity by curcumin, rosiglitazone and N-acetylcysteine in rats. *Arzneimittel-Forschung*, 60 (11): 647-653.

Abdel-Wahab B.A., Metwally M.E. (2011). Ginkgo biloba enhances the anticonvulsant and neuroprotective effects of sodium valproate against kainic acid induce seizures in mice. *Journal of pharmacology and toxicology*; 6(8): 679-690.

Abe H., Katada M., Oriti M., Nishikibe. (1991). Stabilizing effects of drugs on cell membrane. *J. Pharm. Pharmacol*, 43: 22.

Ajaiyeoba E.O., Onocha P.A., Nwozo S.O., W. Sama. (2003). Antimicrobial and cytotoxicity evaluation of *Buchholzia coriacea* stem bark. *Fitoterapia*, 74 (Issues 7–8): 70

Aires C.C.P., IJlst L., Stet F., Prip-Buus C., Almeida I.T., Duran M., Wanders R. J.A., Silva M.F.B. (2010). Inhibition of hepatic carnitine palmitoyl-transferase I (CPT IA) by valproyl-CoA as a possible mechanism of valproate-induced steatosis. *Biochemical Pharmacology*; 79: 792–799

Agrawal A., Sharma B. (2010). Pesticides induced oxidative stress in mammalian systems Review article. *Int J Biol Med Res*; 1(3): 90-104

Aktas A., Nergiz Y., Akkus M., Nasir Y. (2010). The effects of valproic acid on renal corpuscle of pregnant rats and protective role of folic acid and vitamin E. *African Journal of Biotechnology*, 9(34): 5605-5610.

Al deeb S., Almoutaery K., Archadudin M., Tariq M. (2000). Vitamin E decreases valproic acid induced neural tube defects in mice. *Neurosci Lett*. 292(3):179-82.

Al-Gubory K.H., Fowler P.A., Garrel C. (2010). The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*; 42(10):1634-1650.

Alonso-Apperte E., Ubeda N., Achón M., Pérez-Miguelsanz J., Varela-Moreiras G. (1999). Impaired methionine synthesis and hypomethylation in rats exposed to valproate during gestation. *Neurology*, 52(4):750–756.

Aluclu M.U., Tuncer M C., Guzel A., AlucluM A., Akkus M. (2009). The Effects of Valproic Acid on Sciatic Nerve of Fetal Rats and Protective Effects of Folic Acid and Vitamin E. *Int. J. Morphol*, 27(2): 285-294.

Avissar N., Whitin J.C., Allen P.Z., Wagner D.D., Liegey P., Cohen H. J. (1989). Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. Cell of origin and secretion. *J.Biol. Chem*, 2: 15850-15855.

Arora A., Byrem T.M., Nair M.G., Strasburg G.M. (2000). Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Arch Biochem Biophys*, 373: 102–109.

Aycicek A., Iscan A. (2007). The Effects of Carbamazepine, Valproic Acid and Phenobarbital on the Oxidative and Antioxidative Balance in Epileptic Children. *Eur Neurol*; 57:65–69

Baba M., Karakaş M., Aksungur V.L., et al. (2003).The anticonvulsant hypersensitivity syndrome. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 17(4):399–401.

Bagheri H., Frelezeau f., Montastruc J.L. (2000). Effets indésirables des médicaments administrés par voie locale. *Thérapie*, 55(1): 5-202

Banerjee A., Dasgupta N., De B. (2005). In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chemistry*, 90, 727–733.

Baran Ö.P., Yıldırım A., Akkuş M. (2004). The protective role of folic acid and vitamin E against toxicological effects of valproic acid on liver tissue during period of gestation. *Dicle tıp dergisi*, 31(4): 17-23

Balleter W.G., Bushman C.J., Tidwell P.W. (1961). *Anal. Chem.* 33, 592

Baran Ö., NergizY and Tuncer M .C. (2005). The effects of valproic acid, vitamin E and folic acid on ribs of rat fetuses in the prenatal period. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 188 (Issue 2): 117-125

Basu A., Wezman F.H. (2000). Developmental toxicity of valproic acid during embryonic chick vertebral chondrogenesis. *Spine*, 25(17):2158-64.

Bartlett K. (1977). Sodium valproate and hyperglycemia (letter). *Lancet*; 2: 716

Baumann J., Wurn G., Bruchlausen F.V. (1979). Prostaglandin synthetase inhibiting O₂ radical scavenging properties of some flavonoids and related phenolic compounds. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, 308: R27.

Bhunia A.K. (2008). *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*. Springer, New York, USA, pp. 135–147.

Benaisa W. (2011). Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genre *Chrysanthemum* et *Rhantherium*. Activité biologique. Thèse de Doctorat de l'Université de Mentouri constantine, pp. 222-229.

Bennett G.C., Wlodarczyk B., Calvin J.A., Craig J.C., Finnell R. H. (2000). Valproic acid-induced alterations in growth and neurotrophic factor gene expression in murine embryos. *Repro Toxicol*, 111(4):483-93.

Bergendi L., Beneš L., Ďuračková Z., Ferenčík M. (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences*, 65(Issues): 1865–1874

Bergmeyer H.U., Scheibe P., Wahlefeld A.W. (1978). Methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. *Clin. Chem*: 24,58-73

Bermond P. (1997). Vitamin E. *Therapeutic*, 8 (4).25-202-10.

Braca A., De Tommasi N., Di Bari L., Pizza C., Politi M., Morelli I. (2001). Antioxidant principles from *Bauhinia terapotensis*. *Journal of Natural products*, 64:892-895.

Bravo L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, *Nutrition Reviews*, 56(11): 317–333

Bruneton J. (1993). *Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales*. La Voisier TEC et DOC, Paris. 5^{ème} édition. p.250-270.

Cansu A., Ekinci O., Serdaroglu A., Gulsen S., Ekinci O., Erdogan D., Coskun Z K., Tunc L. (2011). Effects of chronic treatment with valproate and oxcarbazepine on testicular development in rats. *Seizure*, 20: 203–207.

Cao G., Sofic E., Prior RL. (1997). Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 22:749-60.

Cao U., Ikeda I. (2009). Antioxidant activity and antitumor activity (in vitro) of xyloglucan selenious ester and surfated xyloglucan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45: 231–235.

Carr A.C., Frei B. (1999). Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in human. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69(6):1086-1107.

Chang M.S., Stein M.T., Sine D.A., Yeung D.W., Mannino F.L. (1998). Reversible Neonatal Cholestasis Following In Utero Exposure to Valproic Acid. *McGill Journal of Medicine*, 2 (Issue 2)

Chang T.K.H., Abbott F.S. (2006). Oxidative stress as a mechanism of valproic acid-associated hepatotoxicity. *Drug Metab. Rev*, 38: 627–639.

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

Chaudhary S., Parvez S. (2012). An in vitro approach to assess the neurotoxicity of valproic acid-induced oxidative stress in cerebellum and cerebral cortex of young rats. *Neuroscience*; 225 258–268.

Chateauvieux S., Morceau F., Dicato M., Diederich M. (2010) Molecular and Therapeutic Potential and Toxicity of Valproic Acid. *J Biomed Biotechnol*, 2010: 479-364.

Chob G-W., Kanga B. Y., Kim K-S., S. H Kima. (2012). Effects of valproic acid on the expression of trophic factors in human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Neuroscience Letters*; 526 100–105

Clayton-Smith J., Donnai D. (1995). Fetal valproate syndrome. *Journal of Medical Genetics*; 32(9):724–727.

Claiborne A. (1985). Catalase activity. In *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, ed. Greenwald RA, pp. 283–284.

Clavel J.P., Emerit J., Thuillier A. (1985). Lipid peroxydation. et radicaux libres, Role en biologie cellulaire et en pathologie. *Path. Biol*; 33(1):61-69.

- Cook N.C., Samman S. (1996).** Flavonoids-chemistry, metabolism, cardio protective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry*, 7: 66-76.
- Coquerel A., Lemaire-Hurtel A. S. (2012).** Devenir d'un xénobiotique dans l'organisme. *Traité De Toxicologie Médico-judiciaire (2e édition)*, p. 3-49.
- Costa-Lotufoa L. V., Jimenez P.C., Wilkea D. V., Leal L.K.A. M., Cunha G. M.A., Silveira E .R., Canutob K. M., Viana G. S. B., Moraes M. E.A. de Moraes M.O., Pessoa C. (2003).** Antiproliferative Effects of Several Compounds Isolated from *Amburana cearensis*. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, Tübingen, 675-680
- Cotarlu D and Zaldman J.L. (1988).** Valproic Acid and the Liver. *Clin. Chem*, 34(5): 890-897.
- Coyle E.T., Bair K.A.C., Vajpayer N., Mehdi S., Wrigth J. (2006).** Acute leukemia associated with valproic acid treatment: A novel mechanism for leukemogenesis? Expert opinion on drug Metabolism and toxicology, 2(1):71-79.
- Cushnie T.P.T., Lamb A.J. (2005).** Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 26: 343–356.
- Cyober L.A. (1999).** The use of α -ketoglutarate salts in clinical nutrition and metabolic care. *Curr. Opin. Nutr. Metab*, 2:33–37.
- Davis R., Peters D.H., McTavish D. (1994).** Valproic acid. A reappraisal of its pharmacological properties and clinical efficacy in epilepsy. *Drugs*, 47:332–72.
- Dawson A.B. (1926).** A note of the staining of the skeleton of clearing specimen with alizarin red. *Stain Technol*, 1:123-125.
- Defoort E.N., Kim P.M., Winn L.M. (2006).** Valproic Acid Increases Conservative Homologous Recombination Frequency and Reactive Oxygen Species Formation: A Potential Mechanism for Valproic Acid-Induced Neural Tube Defects. *Molecular Pharmacology*, 69:1304-1310.
- Deshpande S.S., Deshpande U.S., Salunkhe D.K. (1996).** Nutritional and health aspects of food. *In Madhavi D.L., Deshpande S.S., Salunkhe D.K. Foods Antioxidants*. Marcel Dekker. INC. P 361-469

Di Renzo F., Broccia M .L., Giavini E., Menegola E. (2010). VPA-related axial skeletal defects and apoptosis: A proposed event cascade. *Reproductive Toxicology*, 29: 106–112.

Dizdaroglu M., Jaruga P., Birincioglu M., Rodriguez H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med*; 32(11):1102-15.

Dodet B. (1991). La chasse aux radicaux libres oxygénés . *Biofutur*, 101: 23-34

Dowell I.F.W., Lang D. (2000). Homocysteine and Endothelial Dysfunction: A Link with Cardiovascular Disease' *Journal of Nutrition*, 130: 369S-372S.

Dreifuss, F. E., Santilli, N., Langer, D. H., Sweeney, K. P., Moline, K. A., and Menander, K. B. (1987). Valproic acid hepatic fatalities: A retrospective review. *Neurology*; 37: 379–385.

Eadie M.J., Hooper W.D and Dickson R.G. (1988). Valproate-associated hepatotoxicity and its biochemical mechanisms. *Med Adverse Drug Exp*, 3(2):85-106.

Ehlers K., Sturje H., Merker H.J., Nau H. (1992). Valproic acid induced spina bifida: a mouse model. *Teratology* ,45(2): 145-54.

El gendi A.Y.I., Atta A.H., Fakry F.M., El-saway A.A.AM and El-saway A.Y.M. (1990). Effect of sodium valproate and ethosuximide on kidney and liver function and certain serum electrolytes in rats. *Bull.Fac. Pharm.Cairo Univ*, 28(2):97-101

Elmazar M.M., Vogel R., Spielmann H. (1988). Amniotic fluid cholinesterase of valproate-induced exencephaly in the mouse: an animal model for prenatal diagnosis of neural tube defects. *Arch Toxicol*, 61(6): 501-3.

Elmazar M.M., Thiel K., Now H. (1992). Effect of supplementation with folic acid, vitamin B6 and vitamin B12 on valproic acid induced teratogenesis in mice. *Fundam Appl Toxicol*, 18(3): 389-94.

Ellman G. L. (1959). Plasma antioxidants. *Arch. Biochemistry and Biophysics*, 82: 70-77

El-Mowafy A.M., Abdel-Dayem M.A., Abdel-Aziz A., El-Azab M.F., S.A. Said. (2011). Eicosapentaenoic acid ablates valproate-induced liver oxidative stress and cellular derangement without altering its clearance rate: Dynamic synergy and therapeutic utility. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1811 460–467

El-Shanbrany O.A., El-Gindi O.D., Melek F.R., Abdel-Khalk S.M., Haggig M.Y. (1997). Biological properties of saponin mixtures of *Fagonia cretica* and *Fagonia mollis*. *Fitoterapia*, LX VIII: 219-222.

Escalona-Cardoso G.N., Paniagua-Castro N., Pérez-Pastén R., Chamorro-Cevallos G. (2012). Spirulina (*Arthrospira*) Protects Against Valproic Acid–Induced Neural Tube Defects in Mice. *Journal of Medicinal Food*; 15(12): 1103-1108

Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., Soejarto D.D., Guo Z. (1986). Place des plantes medicinales dans la therapeutique. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Sant*, 64 (2): 159-175.

Favier A. (1998). Stress oxydant et mecanismes cellulaires ; effets deleteres des radicaux libres et defenses antioxydants .Deuxieme Colloque International. Elements trace, Radicaux libres et pathologie oxydatives. Manashi. Tunisie. 17-18 Avril 1998.

Favier A. (2003). Le stress oxydant Interet conceptuel et experimental dans la comprehension des mecanismes des maladies et potentiel therapeutique. *L'actualite chimique*, 108-115.

Finnel R.H., Wlodarczyk B.C., Craig J.C., Piedrahita J.A., Bennett G.D.(1997) Strain-dependent alterations in the expression of folate pathway genes following teratogenic exposure to valproic acid in a mouse model. *Am J Med Genet*, 70(30):303-11.

Flohé L., Gunzler W.A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 105:114–121.

Floyd R.A., Carney J.M. (1992). Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress *Ann. Neurol*; 32 (Suppl):S22–S27

Foti M., Piattelli M., Tiazana B., Ruberto G. (1996). Flavonoids, coumarins and cinnamic acid as antioxidants in a micellar system – activity relationship. *J. Agric. Food Chem*, 44: 497 –501.

Fontaine E, Barnoud D, Schwebel C, Leverve X. (2002). Place des anti-oxydants dans la nutrition du patient septique. *Réanimation*, 11(Issue 411): 4206

Fossati P, Prencipe L. (1982). Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem*; 28(10):2077-80.

Fox J., Barthold S., Davisson M., Newcomer C., Quimby F., Smith A. (2006). The Mouse in Biomedical Research: Normative Biology, Husbandry, and Models. 2 nd edition. Elsevier

Friedman M., Henika P. R., Mandrell. (2003). Antibacterial Activities of Phenolic Benzaldehydes and Benzoic Acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enteric*. *Journal of Food Protection*, 66(10): 1811–1821.

Fromenty B. (2010). Toxicité mitochondriale et métabolique des médicaments: mécanismes et conséquences au niveau du foie. *Réanimation*, 19(Issue 6): 552–567

Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D. (2003). Espèces Réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? L'actualité chimique, 91-96.

Gawron A., Kruk G. (1992). Cytotoxic effect of xanthotoxol (8-hydroxypsoralen) on TCTC cells in vitro. *Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy*, 44(1):51–57.

Gerard-Monnier D., Erdelmeier I., Regnard K., Moze-Henry N., Yadan J.C., Chaudiere J. (1998). *Chemical Research in Toxicology*, 11: 1176–1183

Gerlach M., Ben-Shachar D., Riederer P., Youdim M.B. (1994). Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *J. Neurochem*; 63: 793–807

Ghedira K. (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 4: 162-169.

Guest J.A., Grant R.S. (2012). Effects of dietary derived antioxidants on the central nervous system. *Int J Nutr Pharmacol Neurol*; 2(3): 185-197

Giavini E., Menegola E. (2012). Biomarkers of teratogenesis: Suggestions from animal studies. *Reproductive Toxicology*; 34: 180–185

Girard J. (1991). Métabolisme et croissance du foetus *In Toornaire M.* *Physiologie de la grossesse*. Masson. P 79-87

Gopaul S.V., Farell K., Abbott F.S. (2000). Identification and characterization of N-acetylcysteine conjugates of valproic acid in humans and animals. *Drug Metab Disp*, 28(7):823-32.

Grosso S., Mostardini R., Piccini B., Balestri P. (2009). Body mass index and serum lipid changes during treatment with valproic acid in children with epilepsy. *Annals of Pharmacotherapy*, 43(1):45–50.

Gupta M., Yogendra K .G, Sarita A., Satinder A., Kamlesh K (2004). A randomized, double-blind, placebo controlled trial of melatonin add-on therapy in epileptic children on valproate monotherapy: effect on glutathione peroxidase and glutathione reductase enzymes. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 58: 542–547

Hacizevki A. (2009). An overview of ascorbic acid biochemistry. *Ac. Pharm, Ankara*, 38 (3): 233-255.

Hamza A A. and Amin A(2007). *Apium graveolens* modulates sodium valproate-induced reproductive toxicity in rats. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 307A (Issue 4): 199 – 206.

Hassoun E.A., Walter A.C., Alshrif N.Z., Stohs S.J. (1997). Modulation of TCDD – induced fetotoxicity and oxidative stress in embryonic and placental tissues of C57BL/6J mice by vitamin E succinate and ellagic acid. *Toxicology*, 124:27-37.

Handoko K.B., Souverein P.C., Vanstaa T.P., et al. (2006). Risk of aplastic anemia in patients using antiepileptic drugs. *Epilepsia*, 47(7):1232–1236.

Halliwell B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system *J. Neurochem*; 59: 1609–1623

Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. 344 (8924): 721–724.

Halliwell B. (1997).Antioxidants and human disease: General Introduction. *Nutrition Reviews*; 55(1): 544 – 552

Havsteen B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*. 96(Issues 2–3): 67–202.

Held P. (2012). An Introduction to Reactive Oxygen Species Measurement of ROS in Cells. *BioTek Instruments, Inc*,

Hishida R., Nau H. (1998). VPA induced neural tube defects in mice: altered metabolism of sulfuramino acids and glutathione. *Teratog Carcinog Mutagen*, 18(2): 49-61.

Hsieha C-L., Wangb H-E., Tsai W- J., Peng C-C., Penge R. Y. (2012). Multiple point action mechanism of valproic acid-teratogenicity alleviated by folic acid, vitamin C, And N-acetylcysteine in chicken embryo model *Toxicology*; 291: 32–42.

Hsu H., Tseng H., Wang S., Wang Y.(2009). Valproic acid-induced agranulocytosis. *International Journal of Gerontology*, 3(2): 137–139.

Hishinuma I., Nakamura T. (1988). Alpha-tocopherol and inhibition of cytolysis in glutathion depleted hepatocytes in primary culture. *J. Nut. Sci. Vitaminol. (tokyo)*, 34(1):11-23.

Huang R.S., Hsu Y., Lin H and Yang F.L. (2001). Folate Depletion and Elevated Plasma Homocysteine Promote Oxidative Stress in Rat Livers. *Journal of Nutrition*, 13:33-38.

Isojarvi J.I., Lofgren E., Juntunen K.S., et al. (2004). Effect of epilepsy and antiepileptic drugs on male reproductive health. *Neurology*, 62: 247–53.

Iwaza H. (1990) Effect of dietary level of vitamin E on protection of fetus against Ischemic distress induced by clamping the uterotubal vessels of pregnant mice. *Acta. Obst. Gynaec .JpN*; 42(5):422-428.

Janero D.R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 9: 515-540.

Jayaprakasha G.K., Mandadi K.K., Poulouse S. M., adegoud Y. J., Gowda G.A. N., Patil B. S. (2007). Inhibition of colon cancer cell growth and antioxidant activity of bioactive compounds from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15(Issue 14): 4923–4932

Joffe R.T. (1993). Valproate in bipolar disorder, the Canadian perspective. *Can J Psychiatry*, 38(S2): S 46-50.

Jhonson L. (1999). Antioxydants et anticancéreux. *Biofuture*, 186 : 14 – 17.

Jurina-Romet M., Abbott F.S., Tang W., Huang H.S., Whitehouse L.W. (1996). Cytotoxicity of unsaturated metabolites of valproic acid and protection by vitamin C and E in glutathione-depleted rat hepatocytes. *Toxicology*, 112 (1): 69-85.

Kaplan L. A. (1984). Glucose. *Clin Chem the C.V. Mosby CO. St Louis. Toronto.*1032-1036 .

Kappus H., Sies H. (1981). Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: Redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia*, 37 (Issue 12): 1233-1241.

Kanadaswami C., Lee L., Lee P.H., Hwang J., Ke F, Huang Y and Lee M. (2005). The Antitumor Activities of Flavonoids. *In vivo*; 19: 895-910

Kassahun K., Farrel K., Abbott F. (1991). Identification and characterization of the glutathion and N-acetylcystein conjugates of (E)-2- propyl-2,4-pentadienoic acid, a toxic metabolite of valproic acid , in rats and humans. *Drug. Meta. Dispos*, 19(2):525-35.

Kawai Y., Arinze I.J. (2006). Valproic acid-induced gene expression through production of reactive oxygene species. *Cancer Research*, 66: 6563-6569.

Ka'hko'nen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J.P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3954–3962.

Kebieche M., Lakroun Z., Mraïhi Z., Soulimani R. (2011). Effet antidiabétogène et cytoprotecteur de l'extrait butanolique de *Ranunculus repens* L. et de la quercétine sur un modèle expérimental de diabète alloxanique. *Phytothérapie*, 9:274-282.

Kehrer J.P., Robertson J.D., Smith C.V. (2010). Free Radicals and Reactive Oxygen Species. *Comprehensive Toxicology*, 1: 277–307

Kerkeni A. (1998). Radicaux libres, systèmes antioxydants et pathologies oxydatives. .Deuxième Colloque International. Eléments trace, Radicaux libres et pathologie oxydatives. Manashi. Tunisie. 17-18 Avril 1998.

Khajuria., Houston D.S. (2000). Induction of monocyte tissue factor expression by homocysteine: a possible mechanism for thrombosis. *Blood*, 96(3): 966-972

Khan S.K., Shakoor K.A., Jan M.A., Khattak A.M., Shah S.H. (2005). Study of histopathologic changes in the liver of albino rats, induced by toxic doses of valproic acid. *Gomal Journal of Medical Sciences*, 3 (1): 15-18.

Khan S., Ahmad T., Parekh C.V., Trivedi P. P., Kushwaha S., Jena G. (2011). Investigation on sodium valproate induced germ cell damage, oxidative stress and genotoxicity in male Swiss mice. *Reproductive Toxicology*; 32: 385– 394

Khera K.S. (1993). Valproic acid – induced placental and teratogenic effects in rats. *Teratology*, 47(1): 1-9.

Kiang T. K. L., Teng X. W., Karagiozov S., Surendraddoss J., Chang T. K. H., Abbott F. S. (2010). Role of Oxidative Metabolism in the Effect of Valproic Acid on Markers of Cell Viability, Necrosis, and Oxidative Stress in Sandwich-Cultured Rat Hepatocytes. *Toxicological sciences*, 118(2): 501–509.

Kiang T.K.L., Teng X.W., Surendraddoss J., Karagiozov S., Abbott F.S., Chang T.K.H. (2011). Glutathione depletion by valproic acid in sandwich-cultured rat hepatocytes: Role of biotransformation and temporal relationship with onset of toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 252(Issue 3): 318–324

Kim K.C., Kim P., Go H.S., Choi C.S., Yang S., Cheong J. H., Shin C.Y., Ko K.H. (2011). The critical period of valproate exposure to induce autistic symptoms in Sprague–Dawley rats. *Toxicology Letters* 201 137–142

Kim J., Ramesh T., Kim S. (2012). Protective effects of Chrysanthemi Flos extract against streptozotocin-induced oxidative damage in diabetic mice. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(4): 622-630.

Klee S., Johanssen S., Ungemach F.R. (2000). Evidence for a trigger function of valproic acid in xenobiotic –induced hepatotoxicity. *Pharmacol. Toxicol*, 87(2):89-95.

Korkmazer N., Vurucu S., Demirkaya E., Unay B., Kul M., Akin R., Gokcay E. (2006). Serum and liver tissue biotinidase enzyme activity in rats which were administrated to valproic acid. *Brain and Development*, 28: 515–520.

Kuka S., Tatarkova Z., Kaplan P. (2012). Oxidative damage to proteins and lipids during ageing. *Acta Medica Martiniana*; 12(1): 5-11.

Kumar P.E., Sadique J. (1987). The biochemical mode of action of Gynamdropsis gynandra in inflammation. *Fitopterapia L VIII*: 379-385.

Kumar S., Wong H., Sam A.Y., Riggs K.W., Abbott F.S., Rurak D.W. (2000). Disposition of valproic acid in maternal, fetal and new born sheep I: placental transfer, plasma protein binding, and clearance. *Drug. Meta.Despos*, 28(7):845-856.

Láz' r L. (2012). The Role of Oxidative Stress in Female Reproduction and Pregnancy. *In*.

Lushchak V. I., Gospodaryov D. V. (2012). Oxidative Stress and Diseases. *InTech*.p 319.

Lagace D.C., O'Brien W.T., Gurvich N., Nachtigal M.W., Klein P.S. (2004). Valproic acid: how it works. Or not. *Clinical Neuroscience Research*, 4 215–225.

Lacraz G. (2009). Relation entre Stress Oxydant et Homéostasie Glucidique au cours du Diabète de Type 2 : Adaptation de la Cellule " Pancréatique. Thèse de doctorat de l'université paris. p33

Lampen A., Siehler S., Ellerberc U., Gotlicher M., Nau H. (1999). New molecular bioassay for the estimation of the teratogenic potency of valproic acid derivatives in vitro: activation of the peroxisomal proliferation- activated receptor (PPAR delta). *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 160(3): 238-49.

Lee J.Y., Hwang W.I., Lim S.T. (2004). Antioxidant and anticancer activities of organic extracts from *Platycodon grandiflorum* A. de Candolle roots. *Journal of Ethnopharmacology*, 93(2-3): 409–41.

Leod M.J. (1980). Differential staining of cartilage and bone in whole mouse fetuses by alcian blue alizarin red S. *Teratology*, 22: 299-300.

Levy R.H., Mattson R.H, Meldrum B.S., Perucca E. (2002). Antiepileptic drugs (5th ed), Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, p. 849

Liu C.S., Wu H.M., Kao S.H., Wei Y.H. (1998). Serum trace elements, glutathion, copper / zinc super oxide dismutase, and lipid peroxidation in epileptic pations with phenytoin or carbamazepine monotherapy. *Clin. Neuropharmacologie*, 21(1):62-4.

Lheureux P.E.R., Penalzoza A., Zahir S., Gris. (2005). Science review: Carnitine in the treatment of valproic acid-induced toxicity – what is the evidence? *Critical Care*, 9:431-440.

Loscher W. (1978). Serum protein binding and pharmacokinetics of valproate in man, dog, rat and mouse. *J Pharmacol Exp Ther*, 204:255–61.

Lowry O.H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randal R.J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry*, 15: 265-275.

Lushchak V. I. , Gospodaryov D. V.(2012). Oxidative Stress and Diseases. *InTech*. pp 610.

Magnin P. (1992). Les vitamines. Presse Universitaires de France. p73-104

Marchion D.C., Bicaku E., Daud A.I, Sullivan D.M., Munster P.N. (2005). Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer Research*, 65:3815-3822.

Mates J.M., Sanddiez-jimenez F. (1999). Antioxydant enzymes and their implication in pathophysiologic processes. *Frontiers in Bioscience*, 4: d 339-345.

Mathew S., Abraham E.T. (2006). In vitro antioxidant activity and scavenging effects of Cinnamomum verum leaf extract assayed by different methodologies. *Food and Chemical Toxicology*, 44 :198–206

May J.M. (1999). Is ascorbic acid an antioxidant for plasma membrane?.*The FASEB Journal*, 13: 995-1006.

Mayachiew P., Devahastin S. (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *LWT*, 41: 1153–1159.

Mc Evoy G.K. (1997). AHFS Drug information. Bethesda: American society of health – system pharmacists: 1663 -8.

Menegola E., Broccia M.L., Nau H., Prati M., Ricolfi R., Giavini E. (1996). Teratogenic effects of sodium valproate in mice and rats at midgestation and at term. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 16(2): 97-108.

Menegola E., Broccia M. L., Di Renzo F., Giavini E. (2002). Comparative study of sodium valproate-induced skeletal malformations using single or double staining methods. *Reproductive Toxicology*, 16: 815–823.

Menon B., Ramalingam K., Kumar R.V. (2012). Oxidative stress in patients with epilepsy is independent of antiepileptic drugs. *Seizure*; 21: 780–784

Meunier H., Carraz G., Meunier Y., Eymard P., Aimard M. (1963). Propriétés pharmacodynamiques de l'acide n-dipropylacétique. *Thérapie*, 18:435–8.

Middleton J.E. (1996). Biological properties of Plant flavonoids: An Overview. *Int. J. Pharmacognosy*, 34: 344-348.

Miki M., Tamia H., Mino M., Yamamoto Y., Niki E. (1987). Free radical chain oxidation of rat red blood cells by molecular oxygen and its inhibition by α -tocopherol. *Archives of Biochemistry Biophysics*, 258: 373–380.

Milane H. (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur. Pp. 13-36.

Moghaddam G., Ebrahimi S. A., Rahbar-Roshandel N., Foroumadi A. (2012). Antiproliferative Activity of Flavonoids: Influence of the Sequential Methoxylation State of the Flavonoid Structure. *Phytother. Res.* 26: 1023–1028

Na L., Wartenberg M., Nau H., Hescheler J., Sauer H. (2003) Anticonvulsant valproic acid inhibits cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells by increasing intracellular levels of reactive oxygen species. *Birth Defects Res A Clin Mol Terato*, 167:174–180

Naik G.H., Priyadarzini K.I., Satav J.G., Banavalikar M.M., Sohoni P.P., Biyani M.K., Mohan H. (2003). Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in ayurvedic medicine. *Phytochemistry*, 63: 97-104.

Naito H. K., (1984). “Cholesterol,” in *Clinical Chemistry: Theory. Analysis and Correlation*, Kaplan L.A. and Pesce A.J. (eds.) (St. Louis, MO: C.V. Mosby Co.).

Nascimento G. G. F., Locatelli J., Freitas P. C., Silva G.L. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31 (4):247-256.

Natarajan S.K., Eapen C.E., Pullimood A.B., Kunissery A. (2006). Oxidative stress in experimental liver microvesicular steatosis: role of mitochondria and peroxisomes. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 21(8):1240-1249.

Nau H., Hauck R. S., Ehlers K. (1991). Valproic acid induced neural tube defects in mice and human: aspect of chirality's, alternative drug development, pharmacokinetics and possible mechanisms. *Pharmacol Toxicol*, 69(5): 310-21.

Nau H. (1994). Valproic acid induced neural tube defects. *Ciba Found Sump*, 181: 144-52.

Nazarali A. J., Zhang B. and Wang X. (2007). Effect of valproic acid on glutathione homeostasis in mouse whole embryo cultures. *Proceedings of the International Conference on Environmental E Management, Engineering, Planning and Economics Skiathos*, June 24-28, 2007, Pages: 61-66

Neuman M.G., Shear N.H., Jacobson-Brown P.M., Katz G.G., Neilson H.K., Malkiewicz I.M. (2001). CYP2E1-mediated modulation of valproic acid-induced hepatocytotoxicity. *Clin Biochem*, 34:211-8.

Nishimura T., Sakai M., Yonezawa H. (2000). Effects of valproic acid on fertility and reproductive organs in male rats. *J Toxicol Sci*, 25: 85-93.

Oliveira I., Sousa A., Morais J.S., Ferreira I.C.F.R., Bento A., Estevinho L., Pereira J.A. (2008). Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of three hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. *Food Chem. Toxicol*, 46: 1801-1807.

Olugbenga M., Fafunso M.A., Makinde J.M. (2005). Membrane stabilizing activity: a possible mechanism of action for the anti-inflammatory property of *Gongronema latifolium* leaves. *Int. J. Biomed, Health Sci*, 1(1): 1-4.

Ornoy A. (2009). Valproic acid in pregnancy: How much are we endangering the embryo and fetus? *Reproductive Toxicology*, 28 : 1-10

Ordenez A. A. L., Gomez J. D., Vattuone M. A., Isla M. I. (2006). Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chemistry*, 99, 452–458.

Ouali K., Trea F., Toumi L., Baira A., Maurel D., Guellati M.-A. (2007). L'hespéridine un antioxydant flavonoïde qui diminue le stress oxydatif et prévient les malformations fœtales au cours du diabète gestationnel expérimental. *Phytothérapie*, 5: 204–209.

Owen R.W., Giacosa A., Hull W.E., Haubner R., Spiegelhalter B., Bartsch H. (2000). The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer*, 36(10): 1235–1247.

Oyedapo O.O., Akindele V.R., Okunfolami K.O. (1997). Effects of the extracts of the *Olax Subscorpiodes* and *Aspila africana* on bovine red blood cells. *Phytotherapy Res*, 11: 305.

Oyedapo O.O., Akinpelu B.A., Orefuwa S.O. (2004). Ant-inflammatory effect of *Theobroma cacao*, root extract. *Trop. Med. Plants*, 5(2): 161-166.

Packer P. (1991). Protective role of vitamin E in biological systems. *AM.J.Clin.Nut.* 53:1050S-5S.

Padmanadhan R., Hamed M.S. (1994). Exencephaly and axial skeletal malformations induced by maternal administration of sodium valproate in the MF1 mouse. *J Cranofac Genet Dev Biol*, 14(3): 192-205.

Pahuja M., Mehla J., Reeta K. H., Tripathi M., Gupta Y. K. (2013). Effect of *Anacyclus pyrethrum* on Pentylentetrazole-Induced Kindling, Spatial Memory, Oxidative Stress and Rho-Kinase II Expression in Mice. *Neurochemical Research*; 38(Issue 3): 547-556.

Pandey K.B., Rizvi S.I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2(5): 270–278.

Parman T., Chen G., Wells P.G. (1998). Free radical intermediates of phenytoin related teratogens. *J Biol. Chem.*, 273(39):25079-25088.

Pereira J.A., Oliveira I., Sousa A., Valento P., Andrade P.B., Ferreira I.C.F.R., Ferreres F., Bento A., Seabra R., Estevinho L. (2007). Walnut (*Juglans regia* L.) leaves phenolic

compounds, antimicrobial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food Chem. Toxicol*, 45: 2287–2295.

Pilardeau P. (1995). *Biochimie et nutrition des activités physique et sportives*. Masson.p 28-370.

Plochmann K., Korte G., Koutsilieris E., et al. (2007). Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 460(1): 1–9.

Pourahmad J., M.R Eskandari., Kaghazi A., Shaki F., J Shahraki., Fard J. K. (2012). A new approach on valproic acid induced hepatotoxicity: Involvement of lysosomal membrane leakiness and cellular proteolysis. *Toxicology in Vitro*; 26: 545–551.

Porter R. (1984).The brain: seat of motor control. Corticospinal neurones in movement performance *Med. J. Aust*; 140: 462–472

Potter W.Z., Ketter T.A. (1993). Pharmacological issues in the treatment of bipolar disorder, focus on mood-stabilizing compounds. *Can J Psychiatry*, 38(suppl.2), S51 – 6.

Puppo A. (1992). Effect of flavonoides on hydroxyl radical formation by fenton type reactin; influence of the iron chelator; 31(1):85-88.

Rade I., Borut S. (2008). Recent Advances in Protection Against Doxorubicin-induced Toxicity. *Technology in cancer research and treatment*; 7(6): 497-516

Rani T.S., Chandravadana Y. (2008). Influence of spirulina fusiformis on the sodium valproate induced hepatotoxicity and oxidative stress. *Pharmacologyonline*, 2: 265-281.

Rauchenzauner M., Laimer M., Luef G., Kaser S., Engl J., Tatarczyk T., Ciardi C., Tschoner A., Lechleitner M., Patsch J., Ebenbichler C.F. (2008). Adiponectin receptor R1 is upregulated by valproic acid but not by topiramate in human hepatoma cell line, HepG2. *Seizure*, 17: 723-726.

Raza M., Al-Bekaire A.M., Ageel A.M., Qureshi S. (1997). Biochemical basis of sodium valproate hepatotoxicity and renal tubular, time dependence of peroxidative injury. *Pharmacol Res*, 35(2): 153-7.

Raza M., Al-shabanah O.A., Al-bekairi A.M., Qureshi S. (2000). Pathomorphological changes in mouse liver and kidney during prolonged valproate administration. *Int J. Tissues React*, 22(1):15-21.

Raza M., Alghasham A., Alorainy M.S., El-Hadiyah T.M. (2006). Beneficial Interaction of Thymoquinone and Sodium Valproate in Experimental Models of Epilepsy: Reduction in Hepatotoxicity of Valproate. *Scientia Pharmaceutica (Sci. Pharm.)*, 74: 159-173.

Rice–Evans C.A., Miller N.j., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridhaml J.B. (1995). The relative antioxidant activity of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22:375-383.

Robert E., Guibaud P. (1982). Maternal valproic acid and congenital neural tube defects [letter]. *Lancet*, 2:937.

Rogiers V., Akrawin M., Vereruyesse H., Phillippes I.R., SHEphard E.A. (1995). Effect of anticonvulsant valproate on the expression of component of cytochrom p-450 mediated monooxygenase system and glutathione-s-transferase. *Eur. J. Biochem.* 231(2): 337-43.

Roste L.S., Tauboll E., Haugen T.B., Bjornenak T., Saetre E.R., Gjerstad L. (2003). Alterations in semen parameters in men with epilepsy treated with valproate or carbamazepine monotherapy. *Eur J Neurol*, 10:501–6.

Rougereau A. (1997). Vitamine C. Thérapeutique, 25-202-F-10

Roullet F. I., Lai J. K.Y., Foster J A. (2013). In utero exposure to valproic acid and autism — A current review of clinical and animal studies. *Neurotoxicology and Teratology*; 36: 47–56.

Rusmann S., Lauterburg B. H. (2002). Lésions hépatiques toxiques Médicamenteuses. *Forum Med Suisse*, 44: 1044-1050.

Sabayan B., Foroughinia F., Chohedry A. (2007). A postulated role of garlic organosulfur compounds in prevention of valproic acid hepatotoxicity. *Medical Hypotheses*, 68(3): 512-514.

Sadeque A.J.M., fisher M.B., korzekwa K.R., Gonzalez F.J., Retie A.E. (1997). Human CYP2C9 and CYP2AC mediate formation of the hepatotoxin 4-ene-valproic acid. *Pharmacol.Exp.Ther*, 283(2): 689-703.

Sadique J., Al-Rqobah W.A., Bugharllth M.E., El-Gindy A.R. (1989). The bioactivity of certain medicinal plants on the stabilization of RBC membrane system. *Fitoterapia*, LX (6): 525-532.

Saija A., Scalese M., Lanza M., Marzullo D., Bonina F., Castelli F.(1995). Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic Biol Med*, (19): 481–486.

Sangeetha N., Mahadeva R. U.S. (2011). Elevated Singlet Oxygen Dependent Tissue Injury As Well As Diminished Activity of Antioxidative Defense Mechanism by Sodium Valproate Clinical Course in Epileptic Children. *Research Journal of Pharmacology and Pharmacodynamics*; 3(6): 307-310.

Schulpis K.H., Lazaropoulou C., Regoutas S., Karikas G.A., Margeli A., Tsakiris S., Papassotiriou I. (2006). Valproic acid monotherapy induces DNA oxidative damage. *Toxicology*, 217(issues 2-3): 228-232.

Schmitt B., Martin F., Critelli H., Molinari L., Jenni O.G. (2009). Effects of valproic acid on sleep in children with epilepsy. *Epilepsia*. 50(8):1860–1867.

Sekli-Belaidi F. (2011). Fonctionnalisation de surfaces d'électrodes par un film de poly (3,4-éthylènedioxythiophène) PEDOT pour l'élaboration de microcapteur spécifique des acides ascorbique et urique: application à l'étude des propriétés antioxydantes du sérum sanguin. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse. p 36-45.

Sheeja K.R., Kuttan G., Kuttan R. (1997). Cytotoxic and antitumour activity of Berberin. *Amala Res Bull*, 17:73-6.

Shinde U.A., Phadke A.S., Nair A.M., Mungantiwar A.A., Dikshit V.J., Saraf V.O. (1999). Membrane stabilizing activity—a possible mechanism of action for the antiinflammatory activity of *Cedrus deodara* wood oil. *Fitoterapia*, 70: 251-257.

Shirpoor A., Minassian S., Salami S., Khadem-Ansari M.H., Ghaderi-Pakdeland F., Yeghiazaryan M. (2009). Vitamin E protects developing rat hippocampus and cerebellum against ethanol-induced oxidative stress and apoptosis. *Food Chemistry*, 113 (Issue 1): 115-120

Singh D, Singh R, Singh P., Gupta R. S.(2009). Effects of Embelin on Lipid Peroxidation and Free Radical Scavenging Activity against Liver Damage in Rats. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 105, 243–248

Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *In: Packer L*, editor. *Methods in enzymol: oxidant and antioxidants (part A)*, 299. San Diego, CA: Academic Pres; p. 152–78.

Silva M.F.B., Aires C.C.P., Luis P.B.M., Ruiter J.P.N., IJlst L., Duran M., Wanders R.J. A., Tavares de Almeida I. (2008). Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: A review. *J Inherit Metab Dis*, 31:205–216

Sokmen B.B., Tunali S., Yanardag R. (2012). Effects of vitamin U (S-methyl methionine sulphonium chloride) on valproic acid induced liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology*; 50: 3562–3566

Sokoloff L. (1999). Energetics of functional activation in neural tissues *Neurochem. Res*;24: 321–329

Sousa A., Ferreira I.C.F.R., Calhella R., Andrade P.B., Valent P., Seabra R., Estevinho L., Bento A., Pereira J.A. (2006). Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives “alcaparra”. *Bioorg. Med. Chem*, 14: 8533–8538.

Spencer J.P.E., Jenner P., Daniel S.E., Lees A.J., Marsden D.C., Halliwell B. (1998). Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson’s disease: possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species. *J Neurochem*; 71:2112–2122.

Spierto F.W., MacNeil M.L., Burtis C.A. (1979). The effect of temperature and wavelength on the measurement of creatinine with the Jaffe procedure. *Clin Biochem*; 12(1):18-21.

Stephens J.R., Levy R.H. (1992). Valproate hepatotoxicity syndrome: hypotheses of pathogenesis. *Pharm Weekbl [Sci]*, 14(3A):118-21.

Stohs S.J., Bagchi D. (1995). Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(2): 321–336.

Surendradoss J., Chang T.K.H., Abbott F. S. (2012). Assessment of the role of in situ generated (E)-2,4-diene-valproic acid in the toxicity of valproic acid and (E)-2-ene-valproic acid in sandwich-cultured rat hepatocytes *Toxicology and Applied Pharmacology*; 264: 413–422

Tabatabaei A.R., Abbott F.S. (1999). Assessing the mechanism of metabolism dependent valproic acid Induced in vitro cytotoxicity. *Chem. Res. Toxicol*, 12(4): 323-330.

Tang W., Abbott F.S. (1996). Bioactivation of a toxic metabolite of valproic acid, (E)-2-propyl-2, 4-pentadienoic acid, via glucuronidation, LC/MS/MS characterisation of the GSH-glucoronide diconjugates. *Chem. Res. Toxicol*, 9(2): 517-26.

Therond P. (2006). Dommages créés aux biomolécules (lipides, protéines, ADN) par le stress oxidant. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 64(Issue 6):383–389

Thomes P., Alexix A. (2000). Epilepsies. 2ème edition, 197-225

Tong V., Chang T.K.H., Chen J., Abbott F.S. (2003). The effect of valproic acid on hepatic and plasma levels of 15-F2t-Isoprostane in rats. *Free radical biology and medicine*, 34(Issue 11): 1435.1446.

Tong V., Teng X.W., C3 TK., Abbott F.S. (2005). Valproic acid I: time of lipid peroxidation biomarkers, liver toxicity, and valproic acid metabolite level in rats. *Toxicol Sc*, 86 (2):427-435.

Touil Y.S., Fellous A., Scherman D., Chabot G.G. (2009). Flavonoid-induced morphological modifications of endothelial cells through microtubule stabilization. *Nutr Cancer*, 61 (3):310-21

Trush M.A., Mimnaugh E.G., Gram T.E. (1982). Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem Pharmacol*, 31(21): 3335-46.

Tung E.W.Y., Winn L. M. (2011). Valproic acid-induced DNA damage increases embryonic p27KIP1 and caspase-3 expression: A mechanism for valproic-acid induced neural tube defects. *Reproductive Toxicology*; 32: 255–260

Tung E.W.Y., Winn L.M. (2011). Valproic acid increases formation of reactive oxygen species and induces apoptosis in postimplantation embryos: a role for oxidative stress in valproic acid-induced neural tube defects. *Molecular Pharmacology*, 80 (6): 979-987.

Ubeda-Martin N., Alonso-Apperte E0, Achon M., Varela-Moreiras G., Puerta J., Perez de Miguelsanz J. (1998). Morphological alterations induced by valproate and its concomitant administration of folic acid or S-adenosylmethionine in pregnant rats. *Nutricion Hospitalaria*, 13(1):41–49.

Uchiyama M., Mihara M .(1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thriarbituric acid test. *Analytical Biochemistry* 86, 271-278.

Urquiaga I., Leighton F. (2000). Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biol. Res*, 33 (2):

Ushigome F., Tacanaga H., Matsuo H., Tsokimori K., Nakano H., Ohtani H and Sawada Y. (2001). Uptake mechanism of valproic acid in human placental choriocarcinoma cell line. *Eur. J. Pharmacol*, 417(3):169-79.

Valavanidis A, T Vlachogianni., Fiotakis K. (2009). Tobacco Smoke: Involvement of Reactive Oxygen Species and Stable Free Radicals in Mechanisms of Oxidative Damage, Carcinogenesis and Synergistic Effects with Other Respirable Particles. *Int. J. Environ. Res. Public Health*; 6: 445-462.

Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160 (Issue 1): 1–40.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39:44–84

Van Acker S.A., Berg D.J., Tromp M.N., Griffioen DH., Bennekon V.W.P., Vijgh W.J., Bast A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med*, 20(3): 331-42.

Van Mil N. H., Oosterbaana A. M., Steegers-Theunissen R. P.M. (2010). Teratogenicity and underlying mechanisms of homocysteine in animal models: A review. *Reproductive Toxicology*, 30: 520–531.

Viana M., Herrera E., Bonet B. (1996). Teratogenic effects of diabetes mellitus in the rat. Prevention by vitamin E. *Diabetologia*, 39 (9) ,1041-6.

Vidya M., Subramanian P. (2006). Effects of α -ketoglutarate on antioxidants and lipid peroxidation products in rats treated with sodium valproate. *J. Appl. Biomed.* 4: 141–146.

Verotti A., Basciani F., Trotta D., Pomilio M.P., Chireli F. (2002). Serum Copper, Zinc, Selenium, Glutathione Peroxidase and Superoxide Dismutase levels in Epileptic Children before and after 1 year of Sodium Valprate and Carbamazepine Therapy. *Epilepsy Res*, 48 (1-2):71-75.

Wahba H.M.A. (2011). Protective Effect of Nigella Sativa, Linseed and Celery Oils against Testicular Toxicity Induced by Sodium Valproate in Male Rats *Journal of American Science*, 7(5):687-693.

Wang H., Dong Gao X., Zhou G.C., Cai L., Yao W.B. (2008). In vitro and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit. *Food Chemistry*, 106: 888–895

Wentzel P., Thumberg L., Eriksson U.J. (1997). Teratogenic effect of diabetic serum is prevented by supplementation of superoxide dismutase and N-acetylcysteine in rat embryo culture. *Diabetologia*,

Werling U., Siehler S., Litfin M., Nau H., Göttlicher M. (2001). Induction of differentiation in F9 cells and activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta by valproic acid and its teratogenic derivatives. *Mol. Pharmacol*, 59(5):1269-76.

Wirrell E.C. (2003). Valproic acid-associated weight gain in older children and teens with epilepsy. *Pediatric Neurology*, 28(2):126–129.

Wlodarczyk B.C., Craig J.C., Bennett G.D., Calvin J.A., Finnell R.H. (1996). Valproic acid induced changes in gene expression during neurogenesis in a mouse model. *Teratology*; 54(6):284-97.

Wu M., Khan I.A., Dasmahapatra A. K. (2012). Valproate-induced teratogenesis in Japanese rice fish (*Oryzias latipes*) embryogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 155: 528–537

Yanga J., Guoa J., Yuanb J. (2008). In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT*, 41: 1060–1066.

Yilmaza Y., Tasdemir H.A, Paksua M.S. (2009). The influence of valproic acid treatment on hair and serum zinc levels and serum biotinidase activity. *European journal of paediatric neurology*, 13: 439–443.

Yoshioka T., Motoyama H., Yamazaki F., Noma J. (1982). Lipid peroxidation and its protective mechanism during developmental stage in rat. *Acta Obstet. Gynaecol.jpn*, 34(7), 966-970.

Yoshikawa T., Naito Y., Kondo M. (1997). Food and diseases. *In Hiramatsu M., Yoshikawa T., and Inoue M. (Eds.),* Free radicals and diseases. New York Plenum press; p.11–9

Yukserl A., Cengiz M., Seven M., Ulutin T. (2000). Erythrocyte glutathion, glutathion peroxidase, super oxide dismutase and serum lipid peroxidation in epileptic children with valproate and carbamazepine. *J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol*, 11(1):62-4.

Zaccara G., Tramacere L. (2011). Chapter7. Antiepileptic drugs. *In Aronson J. K. Side Effects of Drugs Annual33: A worldwide yearly survey of new data in adverse drug reactions.* Oxford Ox1 ET2, UK, Elsevier, P 171

Zhao J., Sharma Y., Agarwol R. (1999). Significant inhibition by the flavonoid silymarin against 12-O- Tetra decarboxylphorbol 13- acetate- caused modulation of antioxidant and inflammatory enzymes, and cyclooxygenase 2 and interleukin-1 expression in SENCAR mouse epidemis: Implication in the prevention of stage I tumor promotion. *Molecular Carcinogenesis*, 26(4): 321-333.

Zhang W, Venardos K, Chin-Dusting J., Kaye D. M. (2006). Adverse Effects of Cigarette Smoke on NO Bioavailability: Role of Arginine Metabolism and Oxidative Stress. *Hypertension*; 48: 278-285

Zhang B., Wang X., Nazarali A.J. (2010). Ascorbic acid reverses valproic acid-induced inhibition of hoxa2 and maintains glutathione homeostasis in mouse embryos in culture. *Cell Mol Neurobiol*, 30:137–148.

الملخص

تناولت هذه الدراسة التأثير الوقائي لفيتامين E، C و المستخلص الفينولي لنبات *Chrysanthemum fontanesii* و *Rhantherium suaveolens* اتجاه التسمم المحرض بدواء VPA لدى الفئران الحوامل. وتتبع الأثر السمي لهذا الدواء و علاقته بالتوتر التأكسدي وما يترتب عنه من اضطرابات بيوكيميائية ونسجية.

لهذا الغرض تعطى الفئران الحوامل دواء VPA (400 مغ/كغ) كما تعطى فيتامين E (100 مغ/كغ)، فيتامين C (8.3 مغ/كغ) أو المستخلص البيتانولي (200 مغ/كغ) عن طريق الفم من اليوم السادس إلى اليوم السابع عشر من الحمل. تقتل الفئران في اليوم 18 من الحمل، ينزع الرحم لدراسة مظاهر التسمم أو التشوه الجنيني و ذلك بملاحظة عدد الأجنة الحية و المدمصة، وزن الجنين، وزن المشيمة، كما تفحص الأجنة خارجيا للتعرف على التشوهات الجنينية (exencephaly، cleft palate، تشوهات هيكلية). كما نقوم بدراسة الاضطرابات في مسارات الاستقلاب المحرض بدواء VPA من خلال تقدير تركيز إنزيمات AST و ALT، الجلوكوز، الكرياتينين، اليوريا، الكولسترول، الجليسيريدات الثلاثية في المصل و تقدير تركيز مضادات الأكسدة GSH، GPx، catalase، على مستوى الكبد، المخ، الكلية.

تشير نتائج الدراسة البيوكيميائية و الإنزيمية إلى حدوث خلل في العمليات الاستقلابية و يترجم ذلك بارتفاع معنوي في تركيز إنزيمات AST و ALT، MDA، الجلوكوز و انخفاض معنوي في مستوى أو نشاط مضادات الأكسدة GSH، GPx، catalase في أعضاء الفئران الحوامل المعاملة بدواء VPA. توحي هذه النتائج إلي وجود علاقة طردية بين التغيرات المرفولوجية الكبدية والكولية، و الخلل في العمليات الاستقلابية. حيث أدت المعاملة بالمستخلص البيتانولي لنباتي *C. fontanesii* و *R. suaveolens*، فيتامين E و C إلى الوقاية من هذه الاضطرابات، وبالتالي تملك هذه المستخلصات نشاط مضاد للأكسدة *In Vivo*.

توحي النتائج المحصل عليها بوجود علاقة طردية، بين ظهور التشوهات الجنينية و ارتفاع مستوى الأكسدة الفوقية للبيدات، حيث يعمل كل من فيتامين E، C و المستخلص الفلافوني على التقليل من مظاهر التسمم و التشوه المحرض بدواء VPA.

كما تناولت هذه الدراسة تقييم النشاط البيولوجي لمختلف مستخلصات نبات *C. fontanesii* و *R. suaveolens* (*In Vitro*)، وذلك من خلال دراسة دورها المضاد للأكسدة (اقتناص جذور DPPH و جذور OH و تثبيط الأكسدة الفوقية للبيدات)، بالإضافة إلى دراسة النشاط المضاد للبكتيريا، المضاد للسرطان و المثبت للغشاء للمستخلص البيتانولي لنبات *C. fontanesii*.

تبين النتائج احتواء مختلف المستخلصات لنباتي *C. fontanesii* و *R. suaveolens* على كمية معتبرة من المركبات الفينولية والفلافونويدات، التي يمكن أن تقتنص بكفاءة الجذور الحرة. و يرجع ذلك إلى قدرتها على إعطاء الهيدروجين، و ذلك من خلال اقتناص جذور DPPH و جذور OH و تثبيط الأكسدة الفوقية للبيدات.

كذلك أبدت السلالات البكتيرية المدروسة حساسية مختلفة اتجاه المستخلص البيتانولي لنبات *C. fontanesii* حيث أن البكتيريا الموجبة الغرام أكثر حساسية للمستخلص النباتي مقارنة بالبكتيريا السالبة الغرام.

بالإضافة إلي ذلك فان المستخلص البيتانولي لنبات *C. fontanesii* جد فعال في حماية غشاء

كريات الدم الحمراء، وذلك من خلال قدرته على تثبيط انحلال كريات الدم الحمراء المحرض بالحرارة، المحلول منخفض التوتر و الماء الأكسجيني مقارنة مع المعيار ASA و فيتامين C على التوالي أي أن المستخلص يملك نشاط مثبت للغشاء.

أخيرا لقد أعطت الاختبارات على الخلايا السرطانية EAC، PC3 و خلايا PNT1a بالمستخلص البيتانولي لنبات *C. fontanesii* نتيجة ايجابية حيث بلغت النسبة المئوية لتثبيط حيوية الخلايا السرطانية

عند التركيز 100 ميكرو لتر/ملي ب 90 %، 80 % و 50 % على التوالي و هذا ما يؤكد دوره المضاد للسرطان.

Evaluation of The protective effect of plant extracts *Chrysanthemum fontanesii*, *Rhantherium suaveolens*, vitamin E and C on sodium valproate induced toxicity in pregnant mice: *In vivo* and *in vitro* test

Abstract

The objective of the present study was to investigate the ability of butanolic extracts of *Chrysanthemum fontanesii*, *Rhantherium suaveolens*, vitamin E and C to modulate sodium valproate-Induced toxicity and oxidative damage in maternal and fetal tissues of mice.

Butanolic extracts of *C. fontanesii* (200 mg/Kg per day), *R. suaveolens* (200mg/kg), vitamin E (100mg/Kg per day) and C (8.3mg/Kg per day) were administered by gavage to groups of pregnant mice from the 6 th to 17 th day of gestation. A number of animals received plant extracts, vitamin E and C, also treated with an oral administration of sodium valproate (400mg/kg per day) in same conditions. On day 18 of gestation, pregnant mice were killed, fetus, placenta, fetal liver, liver, kidneys and brain were removed, homogenised and used for determination of lipid peroxidation (LPO) using TBARS method. Embryotoxicity was assessed by counting the number of implants, live and dead fetuses, and growth retardation. The fetuses were observed for malformation including neural tube defect (Exencephaly), cleft palate and skeletal malformation.

In addition serum transaminases, serum urea, creatinine, glucose, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), reduced glutathione (GSH) were estimated to access maternal organs damage. The biochemical findings were supplemented by histopathological examination of the liver and kidney sections.

Our results showed that VPA induce increased serum transminases, lipid peroxidase, glucose and GSH levels. in addition Decreased the activities of CAT and GPx. Buthanolic extracts of *C. fontanesii*, *R. suaveolens*, vitamin E and C significantly decreased the levels of AST, ALT, TBARS, glucose and also GSH, significantly elevated the activities of CAT and GPx in maternal organs (liver, kidney and brain) as compared to those of untreated VPA-administered mice. Histopathological observations also correlated with the biochemical parameters. Thus, the data indicate that treatment with buthanolic extracts of *C. fontanesii*, *R. suaveolens*, and vitamin E and C offers protection against free radical-mediated oxidative stress in organs of animals with VPA-induced toxicity. So that butanolic extracts *C. fontanesii* and *R. suaveolens* posses *in vivo* antioxidant properties.

The obtained results shows clearly that there is a positf correlation between the increase of the level of the lipid peroxidation and the congenital malformation induced by sodium valproate, so that plant extracts, vitamin E and C participates in the partial decrease of the aspects of embryotoxicity and congenital malformation induced by VPA in mice.

Antioxidant activities of differents extracts (butanol and ethyl acetate fractions) from *C. fontanesii* and *R. suaveolens* were studied *in vitro*. The inhibition of the formation of malondialdehyde (MDA) and the scavenging of DPPH and ·OH radicals were assayed .The total phenolic and flavonoid contents of the extracts were determined. The experimental results show that all extracts had antioxidant activity *in vitro*. The extracts showed a high antioxidant effect, especially scavenging of DPPH anions and inhibition of lipid peroxidation. Those various antioxidant activities were compared to standard antioxidants such as vitamin C.

In one hand, the antibacterial and membrane stabilizing activity of n-butanol extract of *C. fontanesii* was investigated. The n-butanol extracts was effective against pathogens and against H₂O₂, heat-as well as hypotonic solution-induced haemolysis of erythrocytes *in vitro*.

In other hand, the anticancer activity has been done using three cell lines (PNT1a, PC3 and EAC) and the effects of different doses of extract were tested. The data showed that the

butanolic extract of leaves from *C. fontanesii* demonstrated anticancer activities which are concentration dependent.

**L'effet Protecteur Des Vitamines E, C Et Des extraits Butanolique Des Deux Plantes
Chrysanthemum fontanesii et *Rhantherium suaveolens* vis-à-vis d'une Toxicité Provoquée
par Valproate de Sodium Chez Les Souris en Gestation.**

Etude *In Vivo* et *In Vitro*

Résumé

Le but de cette étude est d'étudier l'effet protecteur des vitamines E et C et l'extrait butanolique des deux plantes *Chrysanthemum fontanesii* et *Rhantherium suaveolens* vis-à-vis d'une Toxicité Provoquée par le Valproate de Sodium sur les tissus fœtaux, maternels et placentaires des souris gestantes. Pour atteindre cet objective, les extraits végétaux (200 mg/kg), de la vitamine E (100mg/kg) et de la vitamine C (8.3 mg/kg) combiné à un traitement par le VPA (400mg/kg) ont été administrés par gavage a des souris gestantes (entre le 6^{ème} et le 17^{ème} jour de gestation). Après les animaux sont sacrifiés et disséqués au 18^{ème} jour de la gestation. L'utérus est enlevé pour étudier les malformations. Une ablation suivie d'une homogénéisation des organes du fœtus (placenta, foie) et de la mère (foie, reins et encéphale) ont été réalisées pour l'étude de la peroxydation lipidique selon la méthode de TBARs et le dosage des antioxydants catalase (CAT), glutathion peroxydase (GPx) et glutathion réduit (GSH).

Le dénombrement des implants, des fœtus morts et vivants et de la résorption sont choisis comme indicateurs de l'embryotoxicité due au valproate et d'autre part, les malformations fœtales qui consistent à la recherche d'anomalies de fermeture de tube neural (exencéphalie), division palatine et des malformations du squelette sont également notées.

Les résultats indiquent que le VPA provoque un stress oxydatif chez le fœtus et les organes des souris en augmentant le niveau du MDA et en réduisant significativement la CAT, GPx et GSH dans le foie, reins et encéphale résultants d'une peroxydation excessive, qui provoque des modifications histopathologiques. Cette dernière provoque la libération des transaminases hépatiques (ALAT, ASAT) et leur augmentation significative dans le sang. Par contre le prétraitement des souris avec la vitamine E, la vitamine C et les extraits de la plante *C. fontanesii* et *R. suaveolens* protège les cellules de l'attaque des ROS générés par le VPA permettant ainsi, la prévention des souris vis-à-vis la toxicité du VPA.

Aussi bien les dosages biochimiques révèlent que le VPA induit une élévation de la concentration sérique de glucose. Alors que l'administration des extraits des deux plantes et le VPA a diminué la concentration du glucose.

Les résultats obtenus montrent l'existence d'une corrélation positive entre l'augmentation de degré de la peroxydation lipidique et les malformations congénitales provoqué par le VPA. Ce fait suggère que les vitamines E, C et les extraits des plantes exercent un effet protecteur vis-à-vis le développement de la toxicité et les malformations congénitales induites par le VPA chez les souris.

Ces composés phénoliques sont pourvus également d'un pouvoir anti radicalaire et antioxydant *In Vivo* qui leur confère un rôle protecteur contre le stress oxydatif généré dans les organes des souris et chez le fœtus par le VPA.

Les testes antioxydant *In Vitro* (DPPH, piégeage de ·OH et inhibition du LPO) des extraits des différentes phases (phase éthyle acétate; phase butanolique) de la plante *C. fontanesii* et *R. suaveolens* ont indiqué que les différent extrais jouent le rôle de scavengers des radicaux

libres, de plus ces activités sont fortement corrélées avec les teneurs en flavonoïdes et phénols totaux (Les teneurs en flavonoïdes et phénols totaux sont relativement élevées).

Les érythrocytes lavés ont été utilisés pour évaluer la fragilité membranaire. L'étude a montré que l'extrait butanolique de la plante *C. fontanesii* joue un rôle protecteur de la membrane contre l'effet de H₂O₂, la chaleur et de la solution hypotonique.

L'activité antibactérienne a été réalisée, Le test de susceptibilité a été effectué par la méthode de diffusion. Les CMI et les CMB ont été déterminées par la méthode micro dilution en milieu liquide. Certains micro organismes ont été sensibles a l'extrait avec des valeurs CMI et CMB comprises entre 2 - 8 mg/ml.

Les tests de cytotoxicité et anticancéreuse ont été réalisé en utilisant 3 souches cellulaires (PC3, PNT1a, EAC) en analysant les différentes doses de l'extrait butanolique de la plante *C. fontanesii*. Les résultats indiquent que l'extrait exerce un effet anticancéreux selon des concentrations dépendant (l'effet anticancéreux dépend de la concentration).

Mots clés : acide valproïque, stress oxydant, malformation congénitale, antioxydant, vitamine E, vitamine C, *Chrysanthemum fontanesii*, *Rhanterium suaveolens*, polyphénols, DPPH, LPO, activité anticancéreuse, activité antibactérienne.

ملحق 1

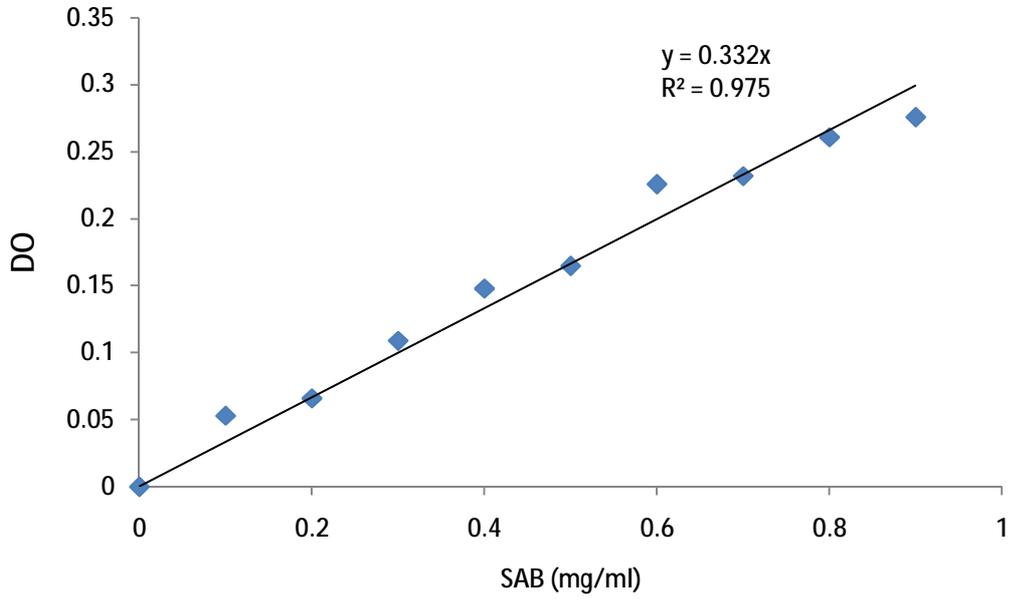
الوضع التصنيفي لنبات *Chrysanthemum fontanesii*

Règne: Plantes (Végétal)
Embranchement: Spermatophytes
S/Embranchement: Angiospermes
Classe: Dicotyledones
S/Classe: Asteridées
Ordre: Asterales
Famille: Compositae (Asteraceae)
S/Famille: Tubuliflore
Genre: *Chrysanthemum*
Espèce: *fontanesii*

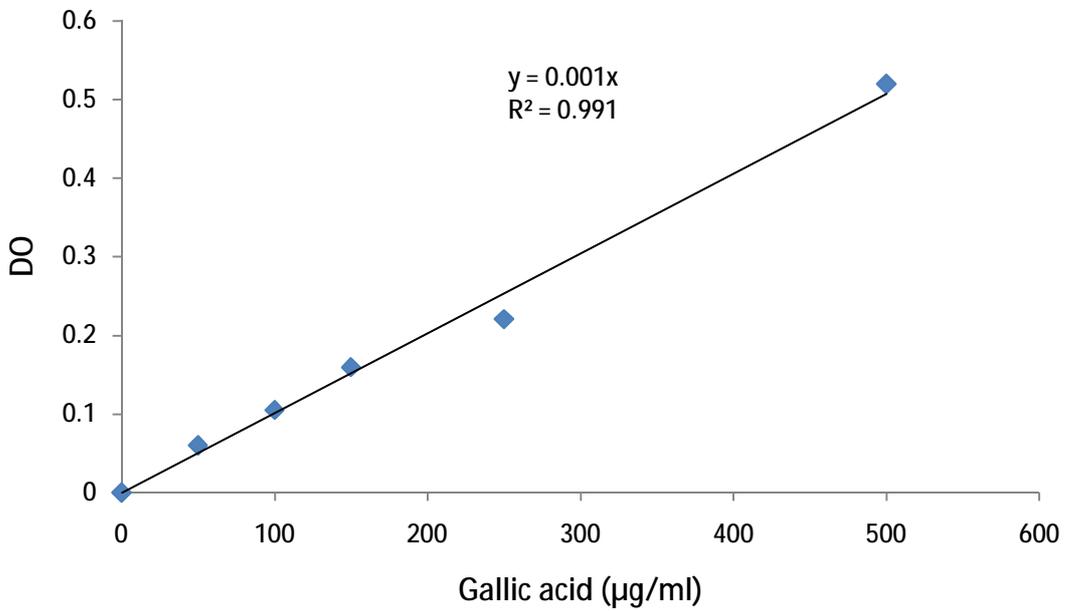
الوضع التصنيفي لنبات *Rhantherium suaveolens*

Règne: Plantes (Végétal)
Embranchement: Spermatophytes
S/Embranchement: Angiospermes
Classe: Dicotylédones
Ordre: Astérales
Famille: Compositae (Asteraceae)
Sous-famille: Tubiliflore
Genre : *Rantherium*
Espèce : *suaveolens*

ملحق 2

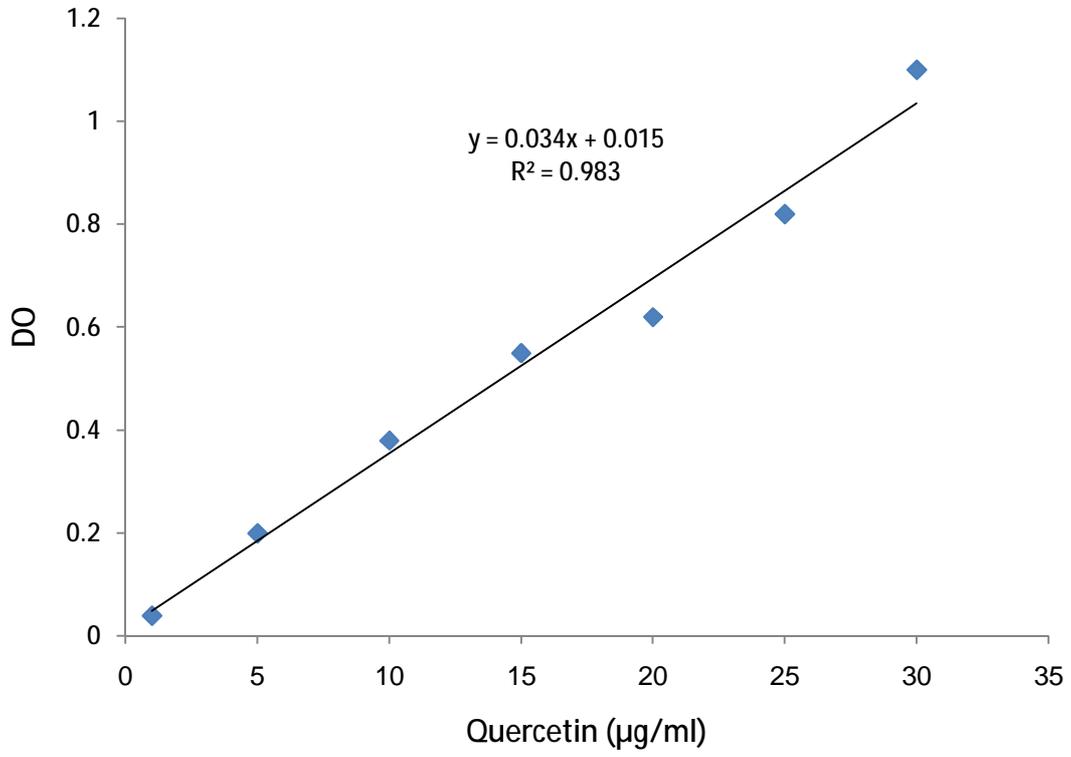


شكل 1 المنحنى القياسي لمعايرة البروتينات الكلية باستعمال serum albumine bovine كمعيار (متوسط 3 مكررات)



شكل 2 المنحنى القياسي لمعايرة الفينولات الكلية (متوسط 3 مكررات)

ملحق 3



شكل 3 المنحنى القياسي لمعايرة الفلافونويدات الكلية (متوسط 3 مكررات)

دور فيتامين E ، C والمستخلص البوتانولي لنبات *Chrysanthemum fontanesii* و *Rhantherium suaveolens* في الوقاية من التسمم المحرض بدواء Sodium Valproate لدى الفئران الحوامل. دراسة *In vivo* و *In vitro*

طبيعة الشهادة: دكتورا العلوم في بيولوجيا و فسيولوجيا الخلية الحيوانية

تناولت هذه الدراسة التأثير الوقائي لفيتامين E، C و المستخلص الفينولي لنبات *Chrysanthemum fontanesii* و *Rhantherium suaveolens* اتجاه التسمم المحرض لدى الفئران الحوامل بدواء VPA وتتبع الأثر السمي لهذا الدواء و علاقته بالتوتر التأكسدي وما يترتب عنه من اضطرابات بيوكيميائية ونسجية. لهذا الغرض تعطى الفئران الحوامل دواء VPA (400 مغ/كغ) كما تعطى فيتامين E (100 مغ/كغ)، فيتامين C (8.3 مغ/كغ) أو المستخلص الفينولي (200 مغ/كغ) عن طريق الفم من اليوم السادس إلى اليوم السابع عشر من الحمل. تقتل الفئران في اليوم 18 من الحمل، يزرع الرحم لدراسة مظاهر التسمم أو التشوه الجنيني و ذلك بملاحظة عدد الأجنة الحية و المدمصة، وزن الجنين، وزن المشيمة، كما تفحص الأجنة خارجيا للتعرف على التشوهات الجنينية (exencephaly، cleft palate، تشوهات هيكلية). و إضافة إلى هذا نقوم بتقدير [MDA] على مستوى الكبد، المخ، الكلية، الجنين، كبد الجنين و المشيمة باستعمال طريقة (TBARS). كما نقوم بدراسة الاضطرابات في مسارات الاستقلاب المحرض بدواء VPA من خلال تقدير تركيز انزيمات AST و ALT، الجلوكوز، الكرياتينين، اليوريا، الكولسترول، الجليسيريدات الثلاثية في المصل و تقدير مستوى أو نشاط مضادات الأكسدة GSH، GPx، Catalase، على مستوى الكبد، المخ و الكلية. تشير نتائج الدراسة البيوكيميائية و الانزيمية الى حدوث خلل في العمليات الاستقلابية و يترجم ذلك بارتفاع معنوي في تركيز انزيمات AST و ALT، MDA، الجلوكوز و انخفاض معنوي في مستوى أو نشاط مضادات الأكسدة GSH، GPx، catalase في أعضاء الفئران الحوامل المعاملة بدواء VPA، توحى هذه النتائج على وجود علاقة طردية بين التغيرات المرفولوجية الكبدية و الكلوية و الخلل في العمليات الاستقلابية. أدت المعاملة بالمستخلص البوتانولي لنبات *C. fontanesii* و *R. suaveolens* فيتامين E و فيتامين C الى الوقاية من هذه الاضطرابات وبالتالي تملك هذه المستخلصات نشاط مضاد للأكسدة *in vivo*. توحى النتائج المحصل عليها بوجود علاقة طردية بين ظهور التشوهات الجنينية و ارتفاع مستوى الأكسدة الفوقية للبيدات، حيث يعمل كل من فيتامين E، C و المستخلص الفلافوني على التقليل من مظاهر التسمم و التشوه المحرض بدواء VPA. كما تناولت هذه الدراسة تقييم النشاط البيولوجي لمختلف مستخلصات نبات *C. fontanesii* و *R. suaveolens* (*in vitro*) وذلك من خلال دراسة دورها المضاد للأكسدة (اقتناص جذور DPPH و جذور OH و تثبيط الأكسدة الفوقية للبيدات)، بالإضافة إلى دراسة النشاط المضاد للبكتيريا، المضاد للسرطان و المثبت للغشاء للمستخلص البوتانولي لنبات *C. fontanesii*. تبين النتائج بأن مختلف مستخلصات نبات *C. fontanesii* و *R. suaveolens* تحتوي على العديد من المركبات الفينولية التي يمكن أن تقتنص بكفاءة الجذور الحرة و يرجع ذلك إلى قدرتها على إعطاء الهيدروجين و ذلك من خلال اقتناص جذور DPPH و جذور OH و تثبيط الأكسدة الفوقية للبيدات. أبدت السلالات البكتيرية المدروسة حساسية مختلفة اتجاه المستخلص البوتانولي لنبات *C. fontanesii* حيث أن البكتيريا الموجبة الغرام أكثر حساسية للمستخلص النباتي مقارنة بالبكتيريا السالبة الغرام. المستخلص البوتانولي لنبات *C. fontanesii* جد فعال في حماية غشاء كريات الدم الحمراء و ذلك من خلال قدرته على تثبيط انحلال كريات الدم الحمراء المحرض بالحرارة، المحلول منخفض التوتر و الماء الأكسجيني مقارنة مع المعيار ASA و فيتامين C على التوالي أي المستخلص يملك نشاط مثبت للغشاء. أعطت الاختبارات على الخلايا السرطانية EAC، PC3 و خلايا PNT1a بالمستخلص البوتانولي لنبات *C. fontanesii* نتيجة ايجابية حيث بلغت النسبة المئوية لتثبيط حيوية الخلايا السرطانية عند التركيز 100 ميكرو لتر/مل ب 90 %، 80 % و 50 % على التوالي و هذا ما يؤكد دوره المضاد للسرطان.

Key words Valproic acid; embryotoxicity; Oxidative stress, Lipid peroxidation, Plant extract, Flavonoids, Vitamin E; Vitamin C; *Chrysanthemum fontanesii*; *Rhantherium suaveolens*; Antioxidant activity; Phenolic compounds; DPPH; Membrane stabilizing activity; Antibacterial activity; Anticancer activity.

مخبر البحث: مخبر فيزيولوجيا الحيوان - قسم بيولوجيا الحيوان كلية علوم الطبيعة و الحياة جامعة قسنطينة I.