الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الاخوى منتوري قسنطينة 1

كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم بيولوجيا الحيوان

N° d'ordre : 236/DS/2018
N° de série :06/BA/2018

رسالة
مقدمة لنيل شهادة الدكتوراه علوم في فسيولوجيا امراض الخلية

مقدمة من طرف :

لطرش عائشة

العنوان:

دور المستخلص البيتانولي لنباتين من جنس *(Genista et Limonium)* في الوقاية من سمية مبيد الكلوربيريفوس

أعضاء اللجنة :

لعلاوي قريشي	استاذ التعليم العالي	جامعة الاخوة منتوري	قسنطينة	رئيسا
زعمة جميلة	استاذ التعليم العالي	جامعة الاخوة منتوري	قسنطينة	مشرفا
دحامنة صليحة	استاذ التعليم العالي	جامعة فرحات عباس	سطيف	ممتحنا
خنوف الصديق	استاذ التعليم العالي	جامعة فرحات عباس	سطيف	ممتحنا
عبد النور شريف	استاذ التعليم العالي	جامعة باجي مختار	عنابة	ممتحنا

السنة الجامعية

2018-2017

شكر وعرفان

الحمد لله حمدا كثيرا الذى اعاننى على انجاز هذا العمل ،ووفقنى الى اتمامه ووهبنى الصبر والقوة

الشكر كل الشكر لعائلتى التى دعمتنى منذ بداية هذا العمل ورافقتنى فى كل مراحله

وتحملتنى فى جميع حالاتى

شكر خاص للأستاذة زعمة جميلة ، المشرفة على هذا العمل ،شكرا على نصائحك القيمة

شكرا على رحابة صدرك وطيبة قلبك وحسن معاملتك.

شكرا ، للاستاذ لعلاوى قريشى ، الاستاذة دحامنة صليحة ، الاستاذ خنوف صديق

والاستاذ عبد النور شريف لقبولهم مناقشة هذا العمل واثراءه بخبراتهم العلمية

شكر خاص للأستاذة الزميلة زطال حسنى من جامعة عبد الحميد مهرى على مساعداتها

ودعمها لهذا العمل

شكرا

الاستاذ لهاشمى مسعود من جامعة باتنة

ا للأساتذة من المستشفى الجامعى لقسنطينة جكون رشيد

والاستاذة كتيت سعاد التى اشرفت على الدراسة النسيجية

الاستاذة بوبكرى نسيمة على مساعدتها و نصائحها القيمة

كل التقنيين و المخبريين فى كلية كلوم الطبيعة و الحياة اللذين سهلوا لى انجاز هاذ العمل

شكرا لكل من دعمنى ولو بكلمة طيبة

اهداء

الى سندى وقوتى

أبى

الى من تتطلع دائما لنجاحاتى

الى بهجتى وملاذى

أمى

الى من قاسمونى لحظات حياتى

صابرينة . . . . سميرة . . . منى

رمزى و زوجته هدى

الى ملاكى

قصى . . . .

. . . آلاء

مايا . . .

الفهرس

قائمة المختصرات

قائمة الأشكال

قائمة الجداول

المقدمة..... 1

الجزء النظري

الفصل الأول: المبيدات الفسفوعضوية

I- المبيدات الفسفوعضوية 4

II- استعمالاتها 4

III- الصيغة العامة 5

IV- خواصها 5

V- تصنيفها 6

VI- الية عملها 7

VII- التحول الحيوي للمركبات الفسفوعضوية biotransformation..... 9

VIII- سمية المبيدات الفسفوعضوية..... 10

IX- الأثر الحاد للمبيدات في الحالات المهنية 11

X- العلاجي الكلاسيكي وغير الكلاسيكي 13

XI- المعايرة البيولوجية التي تبين التعرض للمبيدات الفسفوعضوية..... 14

XII- مبيد الكلوربيريفوس Chlorpyrifos (CPF). 15

XII-1 تسميته 15

XII-2 صيغته الكيميائية..... 15

XII-3 نصف عمره..... 16

XIX-4 الجرعة اليومية المقبولة (الآمنة) 16

XIX-5 التحول البيوكميائي 17

الفصل الثاني

أثر التوتر التأكسدي الناتج عن سمية المبيدات الفسفوعضوية

I- التوتر التأكسدي 19

II- الآليات السمية لل OPs المستقلة عن تثبيط AchE..... 21

III-الاثر التأكسدي الناتج عن سمية المبيدات الفسفوعضوية 23

III-1 على مستوى الانزيمات المضادة للاكسدة 23

III-2 التأثير على الاعضاء..... 27

III.-2-1 السمية العصبية 27

III-3 التعبير الجيني 30

III-4 الموت المبرمج..... 32

III-5 الاستجابة الالتهابية 33

III-6 الاضطراب الوظيفي للميتوكوندري 34

الجزء العملي

المواد والطرق المستعملة

المواد و الطرق المستخدمة

I- المواد المستخدمة 35

1- المادة النباتية 35

2- الحيوانات 36

3- الكيمياويات المستعملة 36

4- معاملة الحيوانات..... 37

II- الطرق 39

II-1 طريقة الاستخلاص..... 39

II-2 تشريح الحيوانات و أخذ العينات 40

II-2-1 أخذ الدم 40

II-2- 2 الحصول على المجنس النسيجي 40

II-2- 3 إجراء القياسات البيولوجية 40

القسم الأول

الدراسة التجريبية داخل العضوية _In vivo._

دراسة التوتر التأكسدي الناتج عن CPF على مستوى الأنسجة

III-1 قياس مؤشرات التوتر التأكسدي 41

III-1-1 قياس MDA في مجنس الأعضاء 41

III-2 قياس نشاط الانزيمات المضادة للأكسدة 41

III-2-1 تقدير النشاط الانزيمي لل Catalase 41

III-2-2 تقدير النشاط الانزيمي للGPx 42

III-2 تقدير مستوى GSH.. 42

III-3 قياس المؤشرات البيوكميائية.. 43

III-3- 1 معايرة ALAT, ASAT 43

III-3 -2 معايرة الجلسريدات الثلاثية 43

III-3-3 معايرة Cholesterol 44

III-3-4 معايرة Albumin 44

III-4-4 معايرة Creatinin 45

III-4-5 معايرة Uric Acid 45

IV- الدراسة النسيجية 46

V- التحاليل الاحصائية 46

النتائج

قياس مؤشرات التوتر التأكسدي الناتج عن المبيد CPF وأثر النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصين النباتيين

I-1- قياس MDA في مجنس الأعضاء 47

I -2- تأثير المعاملات المختلفة علي نشاط الانزيمات المضادة للأكسدة

I -2-1 أنزيم CAT 50

I -2-2 أنزيم GPx 54

I -2-3 تركيز GSH 57

I-3 المعايرة البيوكميائية
I-3-1- معايرة الانزيمات المصلية ALAT,ASAT 61
I-3-2- الجلسريدات الثلاثية و الكولسترول Triglycerides and Cholesterol 62
I-3-3 الألبومين Albumin..... 63
I-3-3 الكرياتينين Creatinin 64
I-3-6 معايرة Uric acid..... 65
II-الدراسة النسيجية 66
II-1 على مستوى الكبد..... 66
II-2على مستوى الكلى..... 69
II-3 على مستوى القلب..... 71
المناقشة 74
I- تأثير مبيد CPF على سلامة الاغشية..... 75
II- تأثير مبيد CPF على الجهاز المضادة للأكسدة 76
II-1 على الأنزيمات المضادة للأكسدة..... 76
II-2 على المحتوى غير الانزيمي (GSH) 77
III- تأثير CPF على الأعضاء المختلفة 79
III-1 الدماغ 79
III-2 تأثير CPF على التكامل الوظيفي للكبد..... 80
III-2-1 تأثيره على الانزيمات السيتوزولية الكبدية 81
III-2-2 تأثيره على Albumin 81
III-2-3 تأثير CPF على الكولسترول والجلسريدات الثلاثية 82
III-3 تأثير CPF على التكامل الوظيفي للكلى..... 83
III-4 تأثير CPF على التكامل الوظيفي للقلب..... 84
IV - الدراسة النسيجية..... 85

القسم الثاني

التجارب خارج العضوي *in vitro*

I.مضادات الاكسدة المصنعة..... 91

II- عديدات الفينول Phenolic compounds 92

II -1.الفلافونويدات Flavonoids..... 93

II -1-1.تواجدها الحيوي..... 94

II -1-2. اقسامها 94

II -1-3. نشاطها البيولوجي 95

II -1-4.النشاط المضاد للأكسدة 96

1-اقتناص الجذور الحرة 96

2- تثبيط الانزيمات 97

3- الاتحاد مع الأيونات المعدنية (F_e^{2+},Cu^{+}) : (تشكيل معقد مع الأيونات المعدنية) 97

4- تجديد مضادات الأكسدة المرتبطة بالغشاء مثل α-tocopherol 97

III - الدور الوقائي للمستخلصات النباتية اتجاه سمية المبيدات الفسفوعضوية 99

التجارب خارج العضوية

In vitro Essay

I- قياس النشاط المضاد للاكسدة للمستخلصين النباتيين

I-1 تقدير المركبات الفينولية الكلية 102

I-2 تقدير الفلافونويدات الكلية 102

I-3 اختبارDPPH : دراسة الفعل الآسر للمستخلص النباتي للجذر الحر DPPH 103

I -4 اختبار الاكسدة الفوقية اللبيدية Lipid peroxidation 104

II- النتائج والمناقشة 106

II-1 المحتوى الفينولي والفلافونويدي للمستخلصين النباتيين 106

II-2 النشاط الآسر للجذر الحر DPPH 108

II-3 اختبار النشاط المثبط للأكسدة الفوقية للدهون Lipid peroxidation 111

الخلاصة 114
المراجع 115
الملخصات 136
الملحق 139

قائمة المختصرات

Ach : Acetylcholine

AchE : Acetylcholinesterases

ADI : the acceptable daily intake

BchE : pseudocholinestérase

Alb : Albumin

ALP : Alkaline phosphatase

ALAT : Alanine aminotransferase

ANOVA : One way analysis of variance

ASAT : Aspartate aminotransferase

CAT : Catalase

CNS : Central nervous system

CPF : Chlorbyrifos

COX-2 : Cyclooxygenase

DPPH : Diphenyl-2-picryl-hydrozyl

DTNB : 5 ,5'-Dithiobis 2-nitrobenzoique

DZ : Diazinone

GPx : glutathione peroxidase

GR : glutathione reductase

GSH : Glutathion

GSSG : glutathione disulfide

GST : glutathione S-transferase

H_2O_2 : hydrogen peroxide

HO· : hydroxyl radical

LOO• : lipid peroxides

LPO : lipid peroxidation

LOX-2 : Lipoxygenase

MD : Methidation

MDA : malondialdehyde

NADPH : Nicotinamine Adenine Dinucleotide Phosphate

NTE : Neuropathy target esterase

NO : Nitric oxide

NO2 : Nitrit

NO3 : Nitrate

NOS : Nitric oxide synthase

$O2^{\cdot -}$: superoxide anion

OD : Optical density

$ONOO^{-}$: Peroxynitrite

OPIDP : Delayed Polyneuropathy

OPIS : Organophosphorus Insecticides

OPS : Organophosphorus compounds

PON1 : paraoxonase1

PUFAS : Polyunsaturated fatty acids

RNS : reactive nitrogen species

ROO· : Organic peroxyl radical

ROS : reactive oxygen species

SOD : Superoxide dismutase

TAS : Total AntiOxidant Status

TBA : thiobarbituric acid

TBARS : thiobarbituric acid reactive oxygen species

TCA : trichloro acetic acid

TCPY : 5 ,3, 6-Trichloro-2-pyridinol

TEPP : Tetraethylpyrophosphate

TGO : Transaminas glutamo-oxaloacetique

TGP **:** Transaminas glutamopyruvique

TNB **:** thionitrobenzoique

TNF **:** Tumor Necrosis Factor

TOS **:**Total Oxidant Status

VLDL **:** Verry low-density lipoproteins

WHO **:** World Health Organisation

قائمة الأشكال

الشكل		الصفحة
شكل 1:	**الصيغة العامة للمركبات الفسفوعضوية**	**5**
شكل 2:	**CPFالصيغة الكيميائية لمبيد الكلوربيريفوس**	**15**
شكل 3:	التحول البيوكيميائي للكلوربيريفوس بواسطة انزيمات السيتوكروم CYP450.....	**17**
شكل 4:	عمليات التجديد الانزيمي لمضادات الاكسدة.....	**25**
شكل 5:	مخطط يوضح مراحل استخلاص المستخلصين النباتيين المستعملين في الدراسة....	**39**
شكل 6:	مبدأ معايرة GSH.....	**42**
شكل 7:	**تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي *Limonium Pruinosum* (L)،المستخلص النباتي *Genista ulicina* (G)على قيم MDA في النسيج الكبدي**.....	**47**
شكل 8:	**تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي *Limonium Pruinosum* (L)،المستخلص النباتي *Genista ulicina* (G)على قيم MDA في النسيج الكلوي**.....	**48**
شكل 9:	**تأثير المعاملة بالمبيد CPF،المستخلص النباتي *Limonium Pruinosum* (L)،المستخلص النباتي *Genista ulicina* (G)على قيم MDA في نسيج الدماغ**	**49**
شكل 10:	**تأثير المعاملة بالمبيد CPF،المستخلص النباتي *Limonium Pruinosum* (L)،المستخلص النباتي *Genista ulicina* (G)على قيم MDA في النسيج القلبي**.....	**50**
شكل 11:	**تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي *Limonium Pruinosum* (L)،المستخلص النباتي *Genista ulicina* (G)على نشاط انزيم CAT في النسيج الكبدي**.	**51**
شكل 12:	**تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي *Limonium Pruinosum* (L)،المستخلص النباتي *Genista ulicina* (G)على نشاط انزيم CAT في النسيج الكلوي**	**52**
شكل 13:	**تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي *Limonium Pruinosum* (L)،المستخلص النباتي *Genista ulicina* (G)على نشاط انزيم CAT في نسيج الدماغ**....	**53**
شكل 14:	**تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي *Limonium Pruinosum* (L)،المستخلص النباتي *Genista ulicina* (G)على نشاط انزيم CAT في نسيج القلب**....	**54**

شكل 15: تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي *Limonium Pruinosum* (L)،المستخلص النباتي *Genista ulicina* (G)على نشاط انزيم GPx في النسيج الكبدي... 55

شكل 16: تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي *Limonium Pruinosum* (L)،المستخلص النباتي *Genista ulicina* (G)على نشاط انزيم GPx في النسيج الكلوي 55

شكل 17: تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي *Limonium Pruinosum* (L)،المستخلص النباتي *Genista ulicina* (G)على نشاط انزيم GPx في نسيج الدماغ..... 56

شكل 18: تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي *Limonium Pruinosum* (L)،المستخلص النباتي *Genista ulicina* (G)على نشاط انزيم GPx في النسيج القلبي 57

شكل 19: تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي *Limonium Pruinosum* (L)،المستخلص النباتي *Genista ulicina* (G)على قيم GSH في النسيج الكبدي..... 58

شكل 20: تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي *Limonium Pruinosum* (L)،المستخلص النباتي *Genista ulicina* (G)على قيم GSH في النسيج الكلوي..... 59

شكل 21: تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي *Limonium Pruinosum* (L)،المستخلص النباتي *Genista ulicina* (G)على قيم GSH في نسيج الدماغ..... 60

شكل 22: تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي *Limonium Pruinosum* (L)،المستخلص النباتي *Genista ulicina* (G)على قيم GSH في نسيج القلب..... 61

شكل 23: تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي *Limonium Pruinosum* (L)،المستخلص النباتي *Genista ulicina* (G)على قيم ,ALAT ASAT 62

شكل 24: تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي *Limonium Pruinosum* (L)،المستخلص النباتي *Genista ulicina* (G)على تركيز Triglycerides و Cholesterol 63

شكل 25: تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي *Limonium Pruinosum* (L)،المستخلص النباتي *Genista ulicina* (G)على تركيز Albumin 64

شكل 26: تأثير المعاملة بالمبيد CPF (C) ،المستخلص النباتي Limonium Pruinosum (L)،المستخلص النباتي Genista ulicina (G)على تركيز Creatinine 65

شكل 27: تأثير المعاملة بالمبيد CPF (C) ،المستخلص النباتي *Limonium Pruinosum* (L)،المستخلص النباتي *Genista ulicina* (G)على تركيز Uric acid 65

شكل 28: مقاطع انسجة كبد جرذان معاملة بالمبيد CPF..... 67

شكل 29: مقاطع انسجة كبدية تبين تأثير المعالجة المسبقة بالمستخلصين النباتين مع وبدون جرعة المبيد CPF على سلامة الكبد..... 68

شكل 30: مقاطع نسيجية تبين تأثير المبيد CPF ،المستخلصين النباتيين LوG على سلامة الاغشية الكلوية..... 70

شكل 31: مقاطع لنسيج قلبي تبين تأثير مبيد CPF،المستخلصين النباتيين LوG على سلامة الأغشية..... 72

شكل 32: أقسام عديدات الفينول حسب عدد حلقات الفينول..... 93

شكل 33: البنية القاعدية للفلافونويدات..... 94

شكل 34: المركبات التي تشارك في التفاعل المضاد للأكسدة..... 98

شكل 35: تفاعل مضاد أكسدة مع الجذر الثابت DPPH..... 103

شكل 36: تشكل مولد اللون TBA Chromogen والناتج عن تفاعل جزيئتي TBA مع جزيئة MDA 105

شكل 37: كمية الفينولات الكلية في المستخلص البيتانولي لنباتي *Genista ulicin*a و *Limonium Pruinosum (L).* 107

شكل 38: يوضح كمية الفلافونويدات في المستخلص البيتانولي لنباتي *Genista ulicina*و *Limonium Pruinosum (L.)*..... 107

شكل 39: الامتصاصية الضوئية للنشاط القانص للجذر الحر DPPH للمستخلصين النباتيين *Genista ulicina* و(L.) *Limonium Pruinosum* عند تراكيز مختلفة 109

شكل 40: النشاط القانص للجذر الحر DPPH للمستخلصين النباتيين *Genista ulicina*و *Limonium Pruinosum* (L.) 110

شكل 41: النشاط المضاد للأكسدة اللبيدية للمستخلصين النباتيين *Genista ulicina*و *Limonium Pruinosum* (L.) والفيتامين C..... 113

شكل 42: المنحنى القياسي لمعايرة الفينولات الكلية..... 140

شكل 43: المنحنى القياسي لمعايرة الفلافونويدات الكلية..... 140

قائمة الجداول

الجدول	الصفحة

جدول1: مختلف انواع المبيدات الفسفوعضوية حسب درجة سميتها	6
جدول2: الصور المختلفة للجزيئات الاكسجسنية النشطة (ROS) الجزيئات	19
جدول3: توزع مختلف الاعراض النسيجية المسجلة في مختلف المجاميع المدروسة	73

لقد عرفت المبيدات استعمالا واسعا في السنوات الاخيرة ،وذلك لهدف تحسين ظروف الحياة فبالإضافة الى دورها في الحماية من العوامل الضارة ،تلعب المبيدات دورا مهما في زيادة المردود الزراعي وتوفير الغذاء (Tripathi and Srivastav , 2010) .

ولا يقتصر استعمال المبيدات على المجال الزراعي فحسب بل تستعمل كذلك في القضاء على الحشرات المنزلية ، الحدائق العامة،و حتى في الصناعة (الخشب وبعض الصناعات البلاستيكية).

يسمح الاستعمال الواسع لهذه المبيدات و تنوع أصنافها بزيادة مجال التعرض لمختلف انواعها ،حيث تشير منظمة الصحة العالمية الى وجود اكثر من 1000 نوع من المبيدات يتم استخدامها حول العالم ، ولكل مبيد خصائص مختلفة وأثار سمية متباينة، ويعد الاستعمال الواسع للمبيدات في المجال الزراعي شكلا من اشكال التعرض المستمر للمبيدات مما ينجر عنه عدة اضطرابات صحية و بيئية . ولقد وجدت بقايا المبيدات في المحيط مثل التراب، الماء، الفواكه، الخضر، وعدة منتجات غذائية (Ogut et al ., 2011) ،زيادة الى ذلك يبقى الاستعمال المفرط و اللاعقلاني لهذه المبيدات احد اهم عوامل الخطر التي تهدد صحة الانسان والصحة العامة (Mossa et al., 2015).

و لا يقتصر التعرض لهذه المبيدات على المزارعين والعاملين في هذا المجال فحسب ، حيث سجلت عدة دراسات تعرض أشخاص ليس لهم صلة بالمبيدات ولكن يكونون مع اتصال مباشر لمواد او اماكن ملوثة بهذه المبيدات.

تعد المبيدات الفسفوعضوية (OPIs) من اكثر المبيدات استعمالا،ويرجع ذلك لخواصها العديدة كفاعليتها كمضادات حشرية،سرعة تحللها وكذا استخدامها في عدة صور،ويعتبر Chlorpyrifos (CPF) من اكثرها شيوعا واستعمالا.

تمارس هذه المبيدات سميتها من خلال التثبيط غير العكوس للأستيل كولين استراز AchE ،مما يؤدي الى تراكم الناقل العصبي الاستيلكولين Ach في المشابك العصبية مسببا اضطرابات حسية وسلوكية ،تعطيل للوظائف الحركية ،وحتى قصور تنفسي (Deveci and Karapehlivan, 2017)

وقد يؤدي التنبيه الفائق الى الوفاة في غالب الاحيان ،وتكمن خطورة هذه المركبات في كونها مركبات غير انتقائية لأهدافها أي انها يمكن ان تستهدف الانسان وتمارس سميتها بنفس الآلية ،مما ينجر عنه مشاكل صحية وخيمة.

تعد المبيدات الفسفوعضوية مسؤولة عن نسبة عالية من الوفايات ،بسبب التعرض لجرعات فائقة سواء كان ذلك عمديا أو عرضيا ،والناتج عن اختلال وظيفي للجهاز العصبي. و يتزامن التعرض لهذا النوع من المبيدات مع ظهور اكثر من 100 نوع من الامراض ، منها الرعاش و انواع مختلفة من السرطان (Hinkley and Stehen, 2015) .

اضافة الى آلية السمية المعروفة لهذه المبيدات كمثبطات للأستيل كولين استراز ، فان العديد من الدراسات اثبتت وجود حالات مرضية نسيجية ووظيفية في العديد من الاعضاء مصحوبا بسمية كلوية ، كبدية ، قلبية ....الخ وهو ما يشير الى وجود آلية خلوية اخرى متدخلة في سمية هذه المبيدات بعيدة عن تثبيط للأستيل كولين استراز ، ولقد بينت العديد من التجارب قدرة المبيدات الفسفوعضوية في تخليق المركبات الأوكسيجينية النشطة (ROS)أو ما يعرف بالجذور الحرة مثل $OH^{\bullet}$ ،$O_2^{\bullet}$، H_2O_2... الخ ،حيث يمكن لهذه الجذور ان تسبب خللا في الوضع اكسدة /اختزال والجهاز المضاد للأكسدة من خلال زيادة الاكسدة الفوقية اللبيدية و احداث عجز في مضادات الاكسدة (الانزيمية منها وغير الانزيمية) مما يؤدي الى حدوث حالة التو تر التأكسدي (Mossa et al., 2015).

فيما تساهم اضافة انواع مختلفة من مضادات الاكسدة : طبيعية ، صناعية ، جزيئات نشطة الى عكس مظاهر التوتر التأكسدي من خلال خفض قيم الأكسدة الفوقية اللبيدية وتحسين الاضرار النسيجية ، تنشيط الجهاز المضاد للأكسدة ، مما يؤكد فرضية تدخل التوتر التأكسدي في سمية هذا النوع من المبيدات.

من هذا المنطلق اتجهنا في بحثنا هذا لدراسة السمية الناتجة عن مبيد كلوربيريفوس احد المبيدات الفسفوعضوية الأكثر استعمالا بجرعة تساوي 10ملغ/كلغ من وزن الجسم ، وذلك من خلال قياس مؤشرات التوتر التأكسدي وكذا مؤشرات الاضطراب الوظيفي في العديد من الاعضاء المستهدفة من طرف هذا النوع من المبيدات كالكبد ، الكلى ، الدماغ والقلب وكذلك تقدير نشاط الجهاز المضاد للأكسدة وذلك بهدف الالمام بآلية السمية لهذا المبيد ، فلقد بينت الدراسات التأثير المختلف للمبيدات الفسفوعضوية على الاجهزة المضادة للأكسدة وغيرها من الانظمة الخلوية . وقد يرجع ذلك الى الاختلاف في الطبيعة الكيميائية لكل مركب او الى اختلاف المسارات الأيضية لكل نوع مما ينتج عنه مركبات نشطة تمارس سميتها بطريقة مختلفة ،و ان الفهم الجيد لآلية السمية الناتجة عن التعرض لـلCPF يساهم في الحماية من الاضرار الجانبية الناتجة عن استعماله وتسهيل عملية التخلص منها.

وبحثا عن مصدر للمركبات المضادة للأكسدة اتجهنا في بحثنا هذا كخطوة ثانية الى دراسة دور المستخلصين النباتيين *Genista ulicina Spach* و*Limonium pruinosum* في الوقاية أو حتى التخفيف من سمية هذا المبيد بعد اجراء عدة قياسات مخبرية لتقدير محتوى مكوناتها من المركبات المضادة للأكسدة ،وكذا فعاليتها المضادة للأكسدة ووظيفتها الاقتناصية ،وذلك للربط بين خواصها والدور الذي تلعبه اتجاه سمية هذا المبيد.

I- المبيدات الفسفوعضوية

يرجع تاريخ ظهور المركبات الفسفوعضوية الى العام 1930 حتى 1940،حيث بدأ العالمان Gerhard Schrader في التحقيق في الخواص المبيدية للمركبات الفسفوعضوية وفي نهاية الحرب العالمية الثانية خلصا الى تحديد تركيب العديد من المبيدات التي مازالت مستعملة لحد الساعة (Ernest, 2004) .

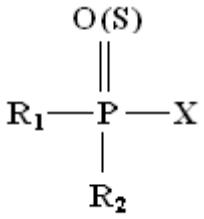
ويعد Tetraethylpyrophosphate (TEPP) أول مبيد فسفوعضوي (OPIs) تم استعماله في المانيا سنة 1944 ولقد جاء كبديل للنيكوتين من اجل محاربة المنة (برقانة آكلة للورق) ،ولكن تم استبداله لاحقا بمبيدات اخرى بسبب سميته اتجاه الثدييات وكذا سرعة ذوبانه في الماء (Ernest, 2000).

II- استعمالاتها

ان اول تاريخ الاستعمال الفعلي للمركبات الفسفوعضوية هو سنة 1970 ولقد جاءت لتعويض المبيدات الكلورونية العضوية organochlorés مثل dichlorodiphényltrichloroéthane(DDT) الذي يتميز ببقائه في المحيط وكذلك جسم الانسان ،ولقد لقى هذا النوع من المبيدات رواجا وذلك لفعاليتها ضد الحشرات ،سهولة استعمالها وكذا سرعة تحللها ،حيث تم تسويق اكثر من اربعين نوع منها مازالت تستعمل لحد الساعة (Reigart and Roberts, 2013) ، ويتم حاليا استعمال العديد من هذه المركبات في عدة صور ولعدة استعمالات : مضادة الحشرات ،القوارض، الديدان ، كمواد لدنة (بلاستيكية سهلة التشكيل). غير ان استعمالها الاساسي هو كمضادات حشرية للنباتات ،الحيوانات و الانسان (ضد القمل، العث ، البرداء (حمى المستنقعات) ،ويتم استعمالها في المجال الزراعي في الحدائق وفي الغابات من اجل القضاء على العوامل الضارة ،كما تستعمل كذلك في المجال الصناعي ،البيطري ،كما تستعمل كذلك في القضاء على الحشرات المنزلية (Lumina and Maria, 2017).

III - الصيغة العامة

يمكن تمثيل الصيغة العامة للمركبات الفسفوعضوية بالشكل التالي:



شكل 1: الصيغة العامة للمركبات الفسفوعضوية (Casarett and Doull's, 2010).

x: تمثل ما يدعى بالمجموعة التاركة (leaving group) وتستبدل هذه المجموعة ،عندما تقوم هذه المبيدات بفسفرة الاستسلكولين استراز AchE

R1 ; R2 هي الاكثر حساسية للتحليل (الحلمأة) وهي غالبا تمثل مجموعة Alkoxy (OCH_3 or OC_2H_5) وقد تكون جزيئة اوكسجين او كبريت في بعض المركبات (في هذه الحالة يدخل المركب تحت تسمية المركبات phosphorothioate)

واعتمادا على الاختلافات الكيميائية يمكن للمركبات الفسفوعضوية ان تنقسم الى عدة تحت اقسام تضم :phosphomidates ,phosphonates phosphorothioates,Phosphates ومركبات اخرى (Casarett and Doull's, 2010).

IV- خواصها

تتميز المبيدات الفسفوعضوية بعدة صفات تميزها عن بقية الأنواع تتمثل في:

- نصف عمر صغير وذلك بسبب حساسيتها للأشعة فوق البنفسجية
- مركبات ذات سمية عصبية للفقاريات
- قليلة او بطيئة التحلل في الماء
- قليلة التبخر
- الجاذبية العالية نحو الأنسجة خاصة على مستوى الجهاز العصبي المركزي
- اختراق الحواجز البيولوجية بسهولة ،جلدية ،هضمية وتنفسية
- سريعة الذوبان في الدهون (Hinkley and Roberts, 2015) .

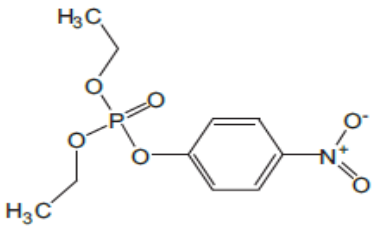
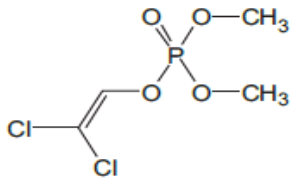
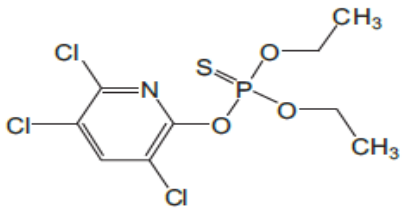
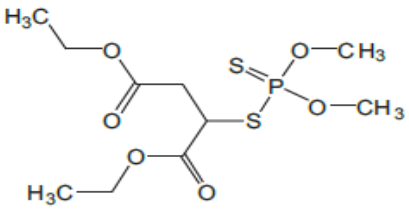
V- تصنيفها

يعتمد تصنيف المبيدات الفسفوعضوية حسب منظمة الصحة العالمية على درجة سميتها أو خطورتها على الانسان (WHO, 2012) حيث يتم تقسيمها الى ثلاثة اقسام : اذ يشمل القسم الاول على تحت وحدتين Ia مركبات حادة السمية، Ib مركبات جد سامة اما القسم الثاني والثالث فيضم المركبات متوسطة وضعيفة السمية (الخطورة) .

- **صنف1** مبيدات عالية الخطورة
  - Ia مبيدات خطيرة للغاية LD_{50}<5mg /bw
  - Ib مبيدات شديدة الخطورة LD_{50}=5-50mg /bw
- **صنف2** مبيدات معتدلة الخطورة LD_{50}= 50 - 2000 mg /bw
- **صنف3** مبيدات قليلة الخطورة LD50>2000 oral mg /bw

ويضم كل قسم منها مجموعة مختلفة من المبيدات كما هو مبين في الجدول اسفله.

جدول1: يمثل مختلف انواع المبيدات الفسفوعضوية حسب درجة سميتها (Nurulain et al., 2012)

Organophosphorus compounds (WHO's hazardous level)	Structures
Paraoxon- ethyl (Extremely hazardous; Class Ia)	
Dichlorvos (Highly hazardous; Class Ib)	
Chlorpyrifos (Moderately hazardous; Class II)	
Malathion (Slightly hazardous; Class III)	

VI- الية عملها

تمارس المبيدات الفسفوعضوية نشاطها من خلال تثبيط الانزيم الاستيل كولين استراز AchE والذي يعمل على تحليل Ach في كل من الجهاز العصبي المركزي والطرفي (Kovacic and Somanathan, 2014).

يعني Acetylcholineesterase اساسا مختلف المركبات القادرة على تحليل استرات الكولين، حيث نميز منه نوعين يختلفان من حيث المصدر والبنية خواص نشاطهما ودورهما الفسيولوجي:

1. Acetylcholineesterase (AchE) : الكولين استراز الحقيقي وهو انزيم يتوضع اساسا في الشق المشبكي (الجهاز العصبي المركزي أو الطرفي) وكذلك على سطح بعض الخلايا ككريات الدم الحمراء وتوجد له عدة مماكبات ولكن ذو منشأ جيني واحد ، ويحلل Ach بكفاءة وبصفة ضعيفة بقية استرات الكولين.

2. pseudocholinesterase (BchE) :**يدعى** الكولين استراز المصلي او البلازمي ويتم تركيبه في الكبد ونجده في معظم الانسجة و الأعضاء (دماغ ، شق مشبكي، كبد ،عضلات ، بنكرياس والأمعاء) ويوجد في عدة اشكال جزيئية ، ذائب او مغروس في سطح الخلايا ،وظيفته التحليلية اقل تخصصا حيث ان له القدرة على تحليل عدة انواع من الاسترات طبيعية كانت أو مركبة (acetylcholine ,butyrylcholine, mivacurium succinylcholine , cocaïne,acide acétylsalicylique) وعلى العكس من AchE فان مورثات BchE يمكن ان تتعرض للطفرات مما يسمح بتنوع جيني كبير (يفوق 40 نوع)؛ كما يعمل BchE على مستوى البلازما كمصفاة طبيعية حيث يعمل على تثبيت السموم والمثبطات وبالتالي يمنع تأثيرها على AchE (Jalady and Dorandeu, 2013) .

يملك AchE موقعين site anionic وesteric فبينما يعمل الأول (anionic)على جذب Ach بفضل الشحنة الموجبة للـ AchE المحمولة على الآزوت الرباعي يعمل الثاني على تحليله.

وترتبط المركبات الفسفوعضوية بطريقة تكافؤية مع الموقع النشط (esteric site) للانزيم AchE بنوعيه AchE وBchE حيث تعمل على فسفرة مجموعة الهيدروكسيل لموقعه النشط (Jalady and Dorandeu, 2013) بفضل الوظيفة P=O (Casarett et Doull's, 2010).

وتتمثل الالية الاساسية لنشاطها في توقيف تحليل Ach الى Choline و Acide acétique من خلال التثبيط غير العكوس لنوعي AchE مما يؤدي الى تراكم Ach في الشق المشبكي مسببا تنبيها فائقا لمستقبلاته وهو ما يسبب ما يعرف بالأزمة الكولينارجية cholenergic crisis .

ويتم اماهة AchE المفسفر ببطء ،ويعتمد معدل التنشيط العشوائي «spontaneous activation » حسب طبيعة R ، وان عدم حدوث اعادة تنشيط للمعقد انزيم-مثبط يؤدي الى شيخوخته، مما يؤدي الى فقدان احد مجموعتي الالكيلR (للمبيد) ،وعندما يتعرض الانزيم لشيخوخة يعتبر مثبطا تثبيطا غير عكوس. ووحدها عملية تركيب انزيم جديد كفيلة بتعويض نشاط هذا الانزيم (Casarett et Doull's, 2010). حيث يكون الرجوع الى الحالة النشطة جد بطيء ويستغرق من 100 الى 120 يوم (في حدود 1% لتجديد الانزيم الموجود في كريات الدم الحمراء) أما BChE فيتم تجديده عن طريق اعادة تركيبه في الكبد ويزداد نشاطه بمعدل 7% عن كل يوم حتى يعدل لاحقا بعد 2 أو 3 أسابيع من التعرض (Sfar, 2013) ويبدو ان تجديد AchE المشبكي يكون اسرع من ذلك الخاص بكريات الدم الحمراء، كما يمكن ان تترجم النسبة المنخفضة لـلAchE في العضوية بعد التعرض للمركبات الفسفوعضوية ببقاء المادة السامة في العضوية (Sfar, 2013;Jalady and Dorandeu, 2013) .

إن الدور الحيوي للـ Acétylcholinestérases هو تحليل Acétylcholine بعد الانتهاء من وظيفته، هذا الاخير الذي يلعب دورا اساسيا في الذاكرة ،التعلم ،النشاط العضلي، نمو الدماغ وعلى المستوى الخلوي تضاعف سوابق العصبونية ، تمايزها وتنظيم العمل المشبكي الموت المبرمج وعمليات الهجرة الخلوية. ورغم اهمية هذا الانزيم و اشرافه على العديد من العمليات التنظيمية الى ان العديد من الدراسات اشارت الى ان سمية المبيدات الفسفوعضوية تتم بآلية خلوية لا ترتبط بتثبيط AchE و تتمثل في توليد الجذور الحرة و استحداث التوتر التأكسدي (Wright and Baccarelli, 2007;Kovacic and Somanathan,2014) وهو ما سوف نأتي على ذكره بالتفصيل في الفصل الثاني.

VII- التحول الحيوي للمركبات الفسفوعضوية biotransformation

تخضع المبيدات الفسفوعضوية كغيرها من المركبات السامة الى عمليات تحويلية داخل الجسم تهدف بالأساس الى تحويلها الى مركبات اقل سمية بهدف التخلص منها وطردها خارج الجسم . حيث تسمح الطبيعة المحبة للدهون للمبيدات الفسفوعضوية بارتباطها باللبيدات الغشائية وكذا نقلها بواسطة البروتينات اللبيدية داخل الدم (Ernest and Randy, 2010) ، ويخضع ايض المبيدات عموما الى مرحلتين تنشيطية تليها مرحلة تثبيطية .

المرحلة الأولى : تنشيطية

ان الايض التنشيطي هو عملية ضرورية لكل مركب يمتلك رابطة كبريتية sulf-bound من اجل نشاطه البيولوجي(Casarett and Doull's,2010) وتتطلب OPs غالبا من اجل تنشيطها استبدال الوظيفة P=S بالوظيفة P=O (مثال CPF يتحول في الكبد الى CPFoxon)(Costa et al., 2003) ، وتنفرد المركبات التي تمتلك الرابطة المزدوجة اوكسجين كبريت S=O بقدرتها على تثبيط AchE، وتؤدي عملية ازالة الكبريت التأكسدية desulfuration Oxidative لهذه المركبات الى تشكيل الصيغة oxon أو ما يعرف بالمماثل الأكسيجيني للجزئية الأم ، بينما تسبب أكسدة أكسيد الإيثيلين Thioether oxidation تشكيل sulfoxide S=O متبوعة بتركيب sulfone O=S=O والذي يحفز بفضل CYP450.

ويلعب تحفيز الاماهة بواسطة A-exterases (ذو طبيعة phosphotriesterase والذي لا يتم تثبيطه بواسطة OPs) ،دورا هاما في ازالة سمية العديد من المركبات الفوسفوعضوية (Casarett and Doull's, 2010).

المرحلة الثانية : تثبيطية

تتميز OPIs بتنوع كبير في استقلابها ويرجع ذلك الى التنوع في المماكبات الانزيمية للإنزيمات الأيضية المثبطة لها خاصة paraoxonase1(PON1) و هو انزيم يحلل النواتج الايضية لل OPIs (Costa et al., 2003).

(PON1) هـو انـزيم بلازمـي وكبـدي يعمـل علـى تثبـيط النـواتج الايضـية الاكسـيجينية مـن نـوع oxon. فالحيوانـات التـي تفتقـر لهـذا النـوع مـن الانزيمـات (او يكـون غيـر فعـال عنـدها) تكـون اكثـر عرضـة لسـمية OPIs ، وعنـد الانسـان يوجـد تنـوع كبيـر فـي نشـاط هـذا الانـزيم المصـلي يرجع هذا للمماكبات عديدية نحصي منها :(Q-192R) (C-108T) (Costa et al., 2003).

ولقد حاولـت دراسـات سـابقة دراسـة تـأثير هـذا التنـوع علـى فعاليـة تحليـل هـذه المركبـات السـامة ، حيـث بـين (Davies et al., 1996) ان المماكـب 192R لديـه نشـاط ضـعيف بالنسـبة لـل Diazoxon (نـاتج ايضـي لـل Diazinon) مقارنـة مـع CPF ،وهـذا مـا جـاء مخالفـا لـبعض الدراسـات (Richter et al., 2009 ; Mutch et al., 2007; O'leary et al., 2005) ، كمـا بينـت دراسـة ل (Cole et al., 2005) اجراهـا علـى حيوانـات معدلـة جينيـا كفـاءة المماكـب R192 فـي تحليـل CPF-oxon مقارنـة مـع Q192 بعـد تعـريض الحيوانـات الـى جرعـات مـن CPF تتـراوح مـابين 0,35 و 0,50ملـغ/كلـغ/يـوم) فيمـا لـم يلاحـظ هـذا الاخـتلاف بـين نشـاط المتمـاكبين بالنسـبة لـل Diazoxon. ان التعـرض المـزمن للمبيـدات (CPF فـي هـذه الدراسـة)،لا يؤثر على الكائنات بنفس الطريقة بل يعتمد على اختلاف التركيب الوراثي لكل نوع.

ويعتمـد التنظـيم الاسـتقرائي للمورثـة PON1 علـى عـدة عوامـل خارجيـة كالمبيـدات مـثلا وتعتمد اكثر على عديدات الفينول الغذائية (Povey et al., 2007) .

VIII- سمية المبيدات الفسفوعضوية

يمتـد تـاريخ المبيـدات الفسفوعضـوية و التسـممات الناتجـة عنهـا الـى اكثـر مـن قـرن ورغـم كـون هـذه المركبـات مبيـدات حشـرية فـي اغلبهـا ، تمـارس سـميتها مـن خـلال تثبـيط اللأنـزيم اسـتيل كـولين اسـتراز "Anticholinesterase" واسـتهداف الجهـاز العصـبي للحشـرات إلا انـه تكمـن خطـورة هـذه المركبـات فـي كونهـا تمـارس سـميتها علـى الثـديات بـنفس الطريقـة ممـا يضـع الصـحة العامة في خطر.

وتبقى عدد حالات الوفيات الناتجة عن هذا النوع من المبيدات جد مرتفعة ،غير انه لم يتم تركيب أي نوع جديد من العلاجات لهذا النوع من المبيدات ، ويوجد اكثر من 150 نوع منها ورغم ان البنية العامة لها متشابهة الى ان كل نوع منها يمارس سميته بشكل خاص . فمثلا تسبب سمية Dichlorvos موت سريعا ، بينما تأخذ سمية dimethoate عدة ساعات حتى تتطور، رغم انهما ينتميان الى نفس النوعى من المبيدات
. (WHO,2012 ;Lumina and Mariana.,2017)

IX- لأثر الحاد للمبيدات في الحالات المهنية

يقصد بالسمية الحادة للمبيدات ظهور مجموعة من الاعراض مباشرة بعد التعرض ،والتي يتم ملاحظتها اساسا في الوسط المهني ، بعيدا عن الحالات الخاصة كحالات الانتحار. و لأجل وضع حد للأضرار الناتجة عنها تم وضع مجموعة صارمة من التعليمات والقوانين من اجل استعمال هذه المركبات والحد من استعمال الخطيرة منها.

وتعد المبيدات organophosphorus وcarbamate من اكثر المبيدات المسببة لحالات التسمم وترجع خطورة هذه المبيدات الى احتواءها على مركبات جد سامة (مبيدات تسبب سمية عصبية مثبطة للاستيل كولين استراز) وناذرا المركبات المشتقة من coumarin (مضاد للتخثر للقوارض) (Cherin et al., 2012).

تظهر السمية الحادة بالمبيدات الفسفوعضوية في ثلاث تأثيرات خاصة تحددها ثلاث مراحل مختلفة: تثبيط حاد لل AchE وينتج عنه ما يعرف ب Acute cholinergec crisis والتي تظهر خلال دقائق الى 24 ساعة intermediate syndrome (IMS) والذي يظهر بعد 48 الى 96 ساعة من التعرض و اخيرا تأثير متأخر او رجعي لتثبيط AchE تدعى delayed neuropathy (Yang and Deng., 2012) ، وتعد المرحلتين الاولى والثانية العامل الاساسي لحدوث حالات الوفيات بسبب حدوثها بكثرة وتسببها في حدوث الفشل التنفسي ،وان تلقي العلاج المناسب يؤدي الى الشفاء التام في غضون 5 الى 18 يوم.

Acute Cholinergec Crisis

في الحالة الاولى والتي تعرف بأعراض تثبيط AchE، تشكل OPs رابطة تكافؤية مع الموقع النشط لل AchE (مع serine) ، حيث يحدث تثبيط غير عكوس للانزيم .ان النتيجة المباشرة للتعرض لـOPs هي تزايد تراكم Ach في الشق المشبكي والتنبيه الفائق للمستقبلات muscarinic and nicotinic ، و تؤدي السمية الحادة بـOPs وحسب شدة التسمم الى ظهور اعراض تثبيط AchE المتمثلة في آلام الرأس، غثيان ، تشوش ، اضطرابات حركية ، غيبوبة وتوقف التنفس حيث لا تظهر هذه الاعراض السريرية الى حين يتخطى تثبيط AchE عتبة 70%.

The intermediate syndrome

وهو الملاحظة الثانية للتعرض لل OPs وتمت ملاحظتها عند 20 الى 50 شخص في حالة السمية الحادة للمركبات الفسفوعضوية ،وتظهر الاعراض بعد يوم أو عدة ايام من التعرض ،خلال تعافي المريض من الاعراض الكولينارجية او في بعض الحالات بعد تشاف المريض تماما من الأزمة الكولينارجية الأولية ،وتتمثل مظاهرها في ضعف ملاحظ في العضلات التنفسية ،عضلات الرقبة و الأربطة الطرفية للعضلات ؛وترجع حالات الوفاة المسجلة في هذه الحالة الى الشلل التنفسي وبعض المضاعفات وتحتاج الشفاء من هذه الاعراض مدة تفوق 15 يوما .ومن المثير للاهتمام معرفة ان هذه الحالة ليست ناتجة عن تثبيط الاستيل كولين استراز وتبقى اللآلية المحددة لحدوثها غير معلومة (Curtis, 2012) .

Delayed Polyneuropathy (DPIDP)

حيث يسبب هذه الاعراض عدد قليل من (OPs) وتشتمل مؤشراتها على وخز في اليدين والقدمين ، متبوعة بفقدان الحس ، ضعف عضلي مستفحل ، تلين في اربطة العضلات الهيكلية للأطراف العليا والسفلى ، ترنح وقد تمتد هذه الاعراض من 2 الى 3 اسابيع بعد التعرض للمبيد ، في حين ان كل من اعراض المرحلتين سابقتي الذكر تكون قد خمدت (Curtis, 2012) .
وقد تدوم المرحلة بدون اعراض ،ويمكن لهذه الأعراض ان تكون عكوسة (تزول) غير ان بعض الآثار الناتجة عن هذه السمية قد يدوم تأثيراها.

ولا تتعلق OPIDP بتثبيت الاستيل كولين بل هي ناتجة عن اصابة esterase خاص يدعى NTE وهو انزيم شديد التعبير في الجهاز العصبي. ويتدخل NTE في ايض الفوسفولبيدات (phospholipase type B) وان التوقف التام لنشاط هذا الانزيم يعد قاتلا . وتظهر النتائج ان الحيوانات التي تعاني من عدم نشاط لهذا الانزيم في مراكز معينة من الدماغ تظهر عندها مظاهر الانحلال العصبي ، وعلى المستوى الخلوي ان هذا الانزيم مثبت على الشبكة الهيولية المحببة ايـن يشكل قناة ايونية حيث يؤدي الاضطراب الوظيفي لها في ظهور اعتلالات عصبية (neuropathy)، كما يمكنه ان يعمل على تحليل عدة فوسفولبيدات مثل phosphatidylcholine ، كما تقترح بعض الدراسات الخلوية دوره الاساسي في عملية التمايز الخلوي العصبي .

وتستطيع اغلبية OPs والعديد من Carbamat ومركبات اخرى تثبيط NTE ،كما توجد بعض المركبات كذلك القادرة على تثبيطه ولكن لايسجل حدوث ظاهرة الشيخوخة ، مما يدل على ان تثبيط NTE ليس هو الية التحلل الليفي oxonal degeneration (Curtis, 2012).

X- العلاج الكلاسيكي وغير الكلاسيكي

يضم العلاج التقليدي للتسمم بالمواد الفسفوعضوية Oximes, Atropine و benzodiazepines مع ما يوافقه من اجراءات مناسبة . و لطالما كان استعمال Oximes مثيرا للجدل ، وتتضمن بقية الاجراءات العلاجية التهوية الرئوية و ازالة السمية من الجلد و اجزاء الجسم المصابة بواسطة محلول ألكليني alkali solution (Petroianu, 2007).

ويدعى علاج التسمم بالمبيدات الفسفو عضوية AFLOP وهو اختصار للمركبات المستعملة في هذا العلاج atropine,fluid ,oxygen ,and pralidoxime (oxime)

حيث يعمل atropine على اعادة احياء او تجديد المؤشرات والأعراض muscarinic الموسكارينية ، اما Oxime (pralidoxime/obidoxime/HI-6) فهو يعمل على تقصير مدة شلل العضلات التنفسية من خلال اعادة تنشيط الاستيل كولين استراز.

اما Benzodiazepines فهو يستعمل لمراقبة النوبات او الازمات كما يستعمل كذلك بعض العلاجات (الترياق) غير النظامية مثل: الحليب وعدة علاجات منزلية اخرى clonidine,
fresh frozen plasma, magnesium sulphate activated charcoal, N-acetylcysteine (Shadnia et al., 2011, Pajoumand et al., 2004) ،ولكن لم تثبت فعاليتها كفاية ، كما تبين بعض المقاربات التجريبية استعمال المستقبلات المضادة NMDA (NMDA receptor antagonists) مثل (gacyclidine,haemoperfusion, the nanocarrier of magnetic magnesium
(Peter et al., 2007, Lallement et al.,1999, Mohammadi et al., 2011) وهي ترياقات (أدوية) غير اعتيادية لم تحظي باهتمام كبير من طرف المجتمع العلمي لسبب ما.

XI- المعايرة البيولوجية التي تبين التعرض للمبيدات الفسفوعضوية

بعد حوالي 48 ساعة من التعرض يتم طرح نواتج ايض المبيدات الفسفوعضوية في البول(حوالي 75%) خاصة تلك التي تعرف ب dialkylphosphates وهي تعد المؤشرات المبكرة للتعرض لهذا النوع من المبيدات ، وان تحديد وجود هذه المركبات في البول هو دليل تعرض للمبيدات لكنه لا يعني بالضرورة حدوث اضطرابات صحية خطيرة ،غير ان البعض منها ينتج عنه مركبات خاصة.

كما يتم تشخيص التسمم الحاد للمبيدات عن طريق قياس نشاط Butyrylcholinesterase في البلازما او من خلال قياس نشاط AchE في كامل الدم .

5 ,3, 6-Trichloro-2-pyridol (TCPY) هو ناتج ايضي يقاس في البول من اجل تحديد التعرض للمبيد الفسفوعضوي CPF (Lei et al., 2016) .

XII- مبيد الكلوربيريفوس Chlorpyrifos (CPF)

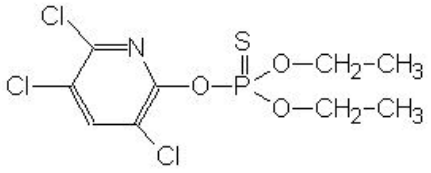
[O,O-diethyl O-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl) phosphorothioate] والمعروف باسم Chlorpyrifos (CPF) تم توزيعه تجاريا سنة 1965 ،حيث لقى رواجا عالميا و استعمالا واسعا في المجال الزراعي وكذلك الحضري (Ernest, 2004) .

ينتمي الكلوربيريفوس الى مجموعة المبيدات الفسفوعضوية ،ولقد كان موضوع العديد من الدراسات نظرا لكثرة استعماله . ولقد اجريت العديد من الدراسات التجريبية وكذا دراسات سريرية مؤخرا بسبب درجة خطورته على الاشخاص الذين يتعرضون له ، ويمارس هذا المبيد كغيره من المبيدات الفسفوعضوية سميته من خلال تثبيط AchE ، اضافة الى ذلك بينت العديد من الدراسات دوره في احداث التوتر التأكسدي بواسطة عدة آليات مثل زيادة مستوى الجذور الحرة ، خفض نشاط الانزيمات المضادة للأكسدة وكذا عجز الجهاز الدفاعي المضاد للأكسدة (Reyna et al., 2016) .

1-IIX تسميته

نظرا لاستعماله الواسع فان لل (CPF) عدة تسميات تجارية ك Chlorozan , Pestpan, Pyriban و اكثرها شيوعا هي insecticides Lorsban Dursban, وهو يسوق في الجزائر تحت هذه التسمية ،ورغم اختلاف التسميات الى ان آلية العمل وكذا الاثر السمي لهذه المركبات متماثل ،ورغم التقييدات المفروضة على استعماله يبقى واحد من اكثر المبيدات الفسفوعضوية استعمالا و دراسة (Basha and Poojary, 2012).

2-IIX صيغته الكيميائية



شكل2 : الصيغة الكيميائية لمبيد الكلوربيريفوس CPF

3-XII نصف عمره

أولا في المحيط

ان المسار الاساسي لهدم CPF في المحيط هو تحليل الرابطة استر- الفسفورية phosphorus ester bond لتشكيل TCP، حيث يعتبر هذا الاخير اكثر بقاء في المحيط من CPF ونظرا لطبيعته المحبة للذوبان في الماء فانه يمكن ان يبقى في التراب او النظام المائي ، مما قد يزيد من خطر التعرض لهذا المبيد ،و يقدر نصف عمر CPF ب 7 الى 120 يوم ويمكنه البقاء في الماء مدة أطول ،حيث يدوم نصف عمره حوالي 24 حتى 126 يوم في المياه الطبيعية (Zhang et al., 2017) ويتميز ببقائه في المحيط الداخلي (المنزل) لمدة اشهر اكثر من المحيط الخارجي وذلك لنقص التعرض لأشعة الشمس.

ثانيا في جسم الانسان

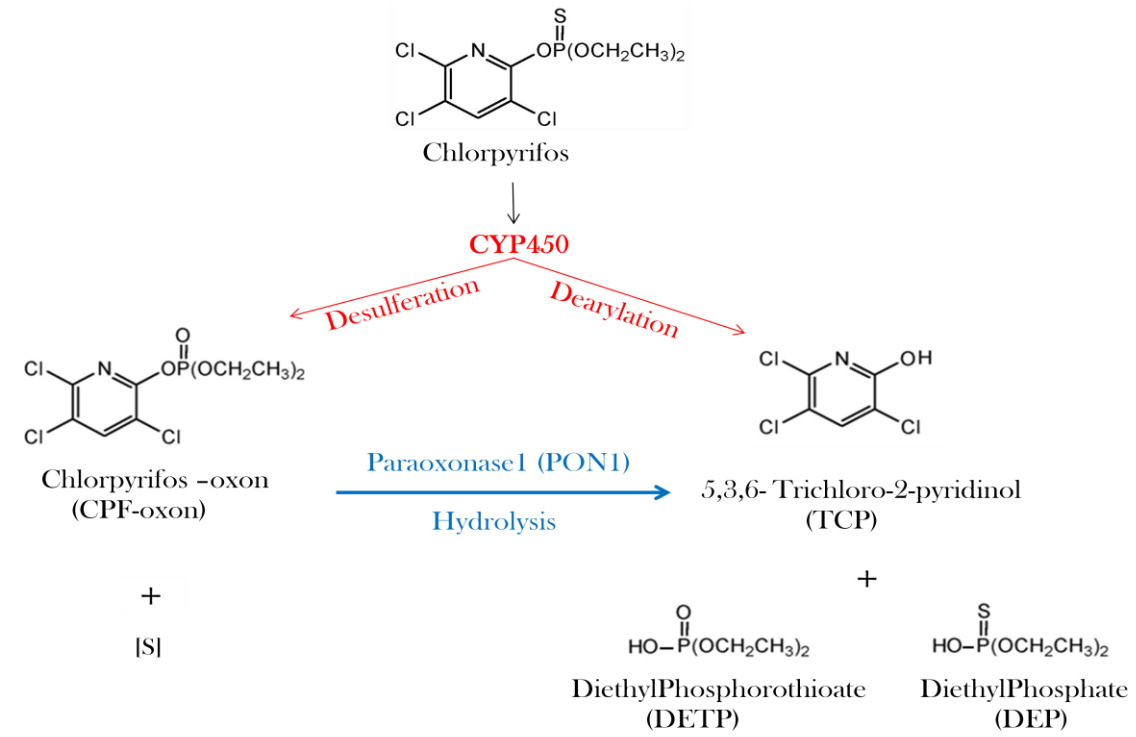
يعد نصف عمر CPF في العضوية قصير مقارنة مع المحيط وذلك بفضل تدخل انظمة الدفاع من اجل ازالة سميته وتحويله الى مركبات اقل سمية يمكن التخلص منها خارج الجسم ،حيث يقدر عمره في الدورة الدموية ب 24 سا بعد التعرض (Dominah et al.,2017) ، ولكن تكمن خطورته في طبيعته المحبة للدهون التي تسمح له بالاختراق مختلف الاغشية بسهولة ،حيث يمكن له ان يخترق الحاجز الدموي العصبي ويتراكم في الدماغ ،النسيج الدهني وغيره من الانسجة.

4.IIX.الجرعة اليومية المقبولة (الآمنة)

تمثل الجرعة اليومية الآمنة (ADI) كمية المبيد التي يمكن ان يتعرض لها الكائن الحي دون احداث أي ضرر ،وهي تساوي 0,01mg/kg/day (Howell et al., 2018) . غير ان العديد من الدراسات اثبتت ان CPF يمارس سميته حتى عند جرعات ضعيفة اقل من الجرعة اليومية الآمنة المحددة ،كما بينت العديد من الدراسات الاثر السمي لهذا المبيد عند عتبة اقل من تلك المثبطة لل AchE

5-IIX التحول البيوكميائي

يختـرق CPF الحـاجز المعـوي ويمـتص بسـرعة داخـل المجـرى الـدموي ويـتم توزيعـه عبـر الجسم وقد يـتم تخزينـه عبـر النسيج الـدهني (Van et al., 2018) ، ويـتم تنشيط و ازالـة سمية CPF بصـــورة اساســـية علـــى مســـتوى الكبـــد بواســـطة انزيمـــات الســـيتوكروم CYP450 تحديـدا CYP2B6 ، حيـث يـتم تعـويض مجموعـة الكبريـت بجزيئـة اوكسـجين desulfuration reaction ليتحـول الـى صـيغته المؤكسـدة CPF-oxon ، أو يخضـع لعمليـة ازالـة جزيئـة المـاء Dearylation Reaction يشـــكل 5,3,6-Trichloro-2-pyridinol (TCP) الـــذي يمكنـــه الارتبـاط بجزيئـات داخليـة مـن اجـل تسـهيل طرحـه خـارج الجسـم، كمـا هـو مبـين فـي الشـكل 3 . (Sanden et al., 2018)



شكل3 : التحول البيوكيميائي للكلوربيريفوس بواسطة انزيمات السيتوكروم CYP450

ولقد سـجلت دراسـات سـابقة ل (Xing et al., 2014 ; Softland et al., 2014) زيـادة فـي نشـاط انزيمـاتCYP450 (EROD ;PROD) ،وكـذا فـي مسـتوى عمليـات النسـخ الجينـي للمورثـة cyp1A فـي الخلايـا الكبديـة للأسـماك التـي تـم تعريضـها لـل CPF ،وهـو مـا يؤكـد دور هـذا النـوع من الانزيمات في عمليات هدم هذا المبيد.

وتتميز انزيمات السيتوكروم بالتنوع في المماكبات ،حيث يتم تنشيط CPF اساسا بواسطة CYP 2B6 (وبنسبة قليلة CYP 1A2) ويتم تثبيطه اساسا بواسطة CYP 2C19 و2C9 ، وان النشاط الفائق لل CYP 2B6 و1A2 مرفوق بنشاط ضعيف لل2C19 CYP و2C9 يؤدي الى سمية عالية بCPF ويختلف تنشيط مختلف انواع OPs باختلاف مماكبات CYP المختلفة (Povey, 2010) ؛مما يفسر كذلك اختلاف الاستجابة لسمية هذه المبيدات من كائن حي الى أخر.

ويعدCPF في حد ذاته مثبطا ضعيفا لل AchE و انما يعزى هذا النشاط الى مستقلبه النشط CPFoxon ، والذي يعد اكثر سمية من المركب الأصلي ، والذي يرتبط ارتباطا غير رجعي مع AchE في الانسجة المستهدفة ، ورغم قصر نصف عمره فهو يعتبر مثبط قوي لل AchE,BchE، Carboxylesterase ; (Kopjar et al., 2017).

لقد بينت العديد من الدراسات ان 3, 5, 6-Trichloro-2-pyridinol (TCP) هو الناتج الأيضي المهيمن لل CPF ،حيث يستعمل كمؤشر للتعرض لل CPF (يتم قياسه في البول) ،حيث تم تسجيل مستوى مرتفع TCP لدى عمال المزارع بعد يوم واحد من التعرض لجرعات عالية نوعا ما ، ولقد لوحظ ارتباطا قويا بين وجود TCP في البول و الاعراض الجانبية الصحية (Li et al., 2013) .

كما تشير دراسات سابقة اجريت على الحيوانات أن 10 الى 20 % من CPF يتحول الى CPFoxon والذي يمكن اماهته بسرعة الى كما يظهر اختلاف تأثير هذا المركب على الجنسين حيث سجل زيادة تراكيزTCP لدى الاناث مقابل الذكور ، وقد يرجع هذا الى الاختلاف في الميتابولزم بين الاناث والذكور وكذا اختلاف توزع الكتلة الدهنية لكلاهما ، وقد يرجع كذلك الى الاختلاف في نشاط الانزيمات CYP عند الجنسين، حيث سجل (Tang et al., 2014) نشاط عال لهذه الانزيمات في الاناث ا كثر من الذكور ،ويتم عادة تنشيط CPF وتحويله الى TCP خلال 24 ساعة من التعرض ، ولكن بينت دراسة لاحقة. (Wang et al 2016),.أن TCP يحتاج 136 ساعة من اجل استرجاع قيمه القاعدية في البول ،بعد عملية الرش. ويتم طرح CPF ببطء من الدهون وبسرعة نسبيا من الكبد القلب والكلى (Kavacic and Somanathan, 2014).

I- التوتر التأكسدي

يعد التوتر التأكسدي الآلية المرضية الاساسية للعديد من السموم والمتدخلة في عدة الأمراض ،كما يرتبط كذلك بالتعرض للمواد الدخيلة وعدة مستويات من التلوث البيئي ، وتعتبر المبيدات مصدرا للتوتر التأكسدي ولقد اظهرت القدرة على تخليق الجذور الحرة ، ولقد بينت عدة اعمال ان سمية المبيدات الفسفوعضوية هي نتيجة وساطة الجذور الحرة (Smida et al., 2016) .

ويعرف الجذر الحر على انه أي جزيئة كيميائية تحمل الكترونا أعزبا أو اكثر ،وهي جزيئات غير مستقرة ،ان الجزيئات الأوكسجينية النشطة Reactive oxygen species (ROS) سواء كانت جذرية ،تحتوي على الاقل على الكترون اعزب ،أو كانت مركبات غير جذرية (جدول2) قادرة على اكسدة الجزيئات الحيوية ،و تدعى هذه الوسائط مؤكسدة أو سوابق مؤكسدة (Halliwell and Gutteridge, 1989) .

جدول 2: جدول يمثل الصور المختلفة للجزيئات الاكسجسنية النشطة (ROS) الجزيئات النيتروجينية النشطة (RNS) والجزيئات غير الجذرية (Gülcin, 2012).

Reactive oxygen species		Non-free-radical species	
Superoxide radical	$O_2^{\cdot-}$	Hydrogen peroxide	H_2O_2
Hydroxyl radical	$HO^{\cdot}$	Singlet oxygen	$^1O_2$
Hydroperoxyl radical	$HOO^{\cdot}$	Ozone	O_3
Lipid radical	$L^{\cdot}$	Lipid hydroperoxide	LOOH
Lipid peroxyl radical	$LOO^{\cdot}$	Hypochlorite	HOCl
Peroxyl radical	$ROO^{\cdot}$	Peroxynitrite	$ONOO^-$
Lipid alkoxyl radical	$LO^{\cdot}$	Dinitrogen trioxide	N_2O_3
Nitrogen dioxide	$NO_2^{\cdot}$	Nitrous acid	HNO_2
Nitric oxide	$NO^{\cdot}$	Nitryl chloride	NO_2Cl
Nitrosyl cation	NO^+	Nitroxyl anion	NO^-
Thiyl radical	$RS^{\cdot}$	Peroxynitrous acid	ONOOH
Protein radical	$P^{\cdot}$	Nitrous oxide	N_2O

و تعتبر الجذور الحرة Reactive oxygen species (ROS) نواتج طبيعية ناتجة عن الآليات الطاقوية الخلوية و عمليات الاستقلاب الحيوية في الحالات الطبيعية ،وتنتج الجذور الحرة ك hydroxyl radicals($HO^{\bullet}$) ,hydrogen peroxide (H_2O_2),superoxide anions ($O^{\bullet -2}$) عن العديد من التفاعلات الخلوية عن طريق عدة انزيمات مثل peroxidases de hydrogenases , lipoxygenases (Gao et al., 2017) .

وتلعب الجذور الحرة (ROS) دورا مهما في عدة عمليات حيوية ،حيث يعد $O^{\bullet -}_2$ و H_2O_2 جزيئات خلوية جد مهمة في نقل الاشارة وفي عملتي النمو و التمايز الخلوي ،كما تتدخل كذلك في احداث الموت الخلوي المبرمج ،وتعد ROS جزيئات وقتية أو زائلة ويرجع ذلك لنشاطها الكيميائي العالي (Mossa et al., 2015).

ورغم أن الجذور الحرة جزيئات وقتية ،تتميز بنصف عمر قصير جدا لا يتعدى الاجزاء من الثانية في اغلبها،إلا انها تعتبر جزيئات جد نشطة وتهاجم بسرعة الجزيئات المجاورة لها ،وتسبب اضرار وخيمة وغير عكوسة في غالب الاحيان ، مما يتسبب في احداث ما يعرف بالتوتر التأكسدي.

ويعرف التوتر التأكسدي عموما على انه حالة عدم الاتزان الحاصل مابين مضاد أكسدة/مؤكسد لصالح المؤكسد ،مسببا اضرارا واضحة (Uchendu et al., 2012) ،وتنتج اضرار التوتر التأكسدي اولا من خلال تركيب الجذور الحرة (ROS) وتشمل هذه الاضرار اضطرابات في الجزيئات الخلوية مثل اللبيدات ،البروتينات (Aly et al., 2010 ; Uchendu et al., 2012)، كما قد تتسبب هذه الجزيئات في كسر ضفائر ADN مما يؤدي الى تغيير القواعد البيورينية، البيرميدية بواسطة H_2O_2 ، $O^{\bullet -}_2$ و $HO^{\bullet}$ مسببة تغيرات جينية قد تسبب امراض وانعكاسات خطيرة ، وقد ينتج التوتر التأكسدي اما عن الزيادة في الجذور الحرة أو النقصان في نشاط مضادات الاكسدة او لكلاهما معا.

لقد اعتبر التوتر التأكسدي منذ عدة سنوات كعامل مرافق قاتل co-lethal factor في سمية المبيدات الفسفوعضوية ، ولقد اكدت عدة أعمال هيمنة التوتر التأكسدي في سميتها (Karami and Abdollahi, 2011; Abdollahi et al., 2004; Kovacic, 2003).

كما بين (Bayrami et al ., 2012) حدوث التوتر التأكسدي وتثبيط AchE مع مجموعة من المعايير الاخرى عند المزارعين في حالة التعرض المزمن للمبيدات الفسفوعضوية ،ولقد اقترح استعمال مضادات الاكسدة كإضافات للعلاج ،كما تم تبين الخاصية المضادة للأكسدة لل oxime المادة المستعملة في العلاج من التسمم بالمبيدات الفسفوعضوية رغم قلة الاعمال المبينة لذلك (Nurulain et al., 2013).

II-الآليات السمية لل OPs المستقلة عن تثبيط AchE

يتبين من خلال العديد من الدراسات ان مع معظم الاضرار الناتجة عن CPF وغيره من المبيدات الفسفوعضوية تحدث بآليات لا تؤثر على تثبيط AchE، كما يظهر ان هناك علاقة طفيفة بين تضرر الاعضاء وتثبيط هذا الانزيم مما يدفعنا للاعتقاد ان الاضطراب الحاصل في معايير أكسدة/ اختزال اهم من علاقة AchE بالسمية الحاصلة
(Hinkley and Rbert, 2015)

اضافة الى دور هذا النوع من المبيدات على تثبيط AchE وقدرته على الارتباط بنوع آخر من البروتينات مثل (NTE) Neuropathy target esterase ،فلقد بينت التجارب قدرة OPs على التسبب في العديد من الاضطرابات في الايض وكذا نقل الاشارة الخلوي اللذان يضران التكاثر و التمايز الخلوي للخلايا العصبية ونجاة الخلايا وكذا التداخل المباشر مع بروتينات غير استرازية nonesterase مثل tubulin (Hargreaves, 2012).

ولقد بينت العديد من الادلة ان التعرض لهذا النوع من المبيدات يعيق او يضعف الاتزان الداخلي للجلوكوز ويسبب مقاومة للانسولين وتزيد من خطر الاصابة بالنوع الثاني من الانسولين وان مقاومة الانسولين هو اضطراب ايضي معقد يصعب شرحه بواسطة مسار واحد،حيث تتدخل كل من ،تراكم نواتج أيض اللبيدات ،تنشيط المسارات الالتهابية ،والتوتر التأكسدي في الالية المرضية له ،وان هذه العمليات الجزيئية تنشط اساسا سلسلة من المسارات التأكسدية بمشاركة عائلة من serine kinases وهي بدورها لها تأثير سلبي على نقل اشارة للأنسولين.

ومن المعروف ان التعرض الجنيني لهذه المبيدات يسبب حالات تشوه ،ويعد CPF النموذج الاكثر استعمالا لدراسة هذه الحالات ،وقبل منع الاستعمال المنزلي لهذا المبيد سجلت عدة حالات تعرض لهذا المبيد للنساء حوامل وكذا اطفال ،ولقد بينت نتائج استعمال نماذج لدراسة تأثير التعرض لهذا النوع من المبيد قبل او بعد الولادة ،وبجرعات مماثلة لتلك المقاسة في العقي (اول اخراج للرضيع) meconium ،تسبب CPF في تشوهات انقسامية و اشارات موت مبرمج في خلايا عصبية نموذجية لأجنة جرذان؛كما سجل كذلك مؤشرات للتوتر التأكسدي عند عمال تعرضوا للمبيدات ،تضاف هذه النتائج الى تلك التي تبين ان التعرض الرحمي للجرذان يسبب عجزا في عدد الخلايا العصبية ؛وفيما يخص الاهداف الخلوية ل CPF ومشتقاته الأيضية فان التشوهات المسجلة في حالات ما بعد الجنينية قد تكون ملاحظة في بعض الحالات حتى في جرعات اقل من تلك المتسببة في تثبيط AchE (Ricceri et al., 2003 et 2006; Moreira et al., 2010) ،مما استدعى اقتراح ان السمية الخلوية لهذه المركبات لا تعتمد على AchE ،مرورا ب Protein KinaseA، Protein KinaseC، عوامل الاستقراء c-fos,p53,AP-1,Sp1,CREB أو بروتينات الهيكل الخلوي (tubulin) ؛كما انه لوحظ عدة اثار لل CPF وفي مراحل جنينية يكون فيها AchE لا يزال غير معبر (غير فعال) او في مناطق يكون فيها تعبيره ضعيفا ؛أو من خلال حقن مباشر CPF من دون مشتقاته الكبدية مما يؤكد الفرضية المستقلة عن AchE المستعملة من طرف المشتقات من نوع oxon (Lauder et Schambra, 1999 ; Whitney et al., 1995).

وتشير بعض الدراسات الحديثة ان المبيدات الفسفوعضوية تتداخل مع عدة عمليات كيميائية كتركيب البروتينات ،التنفس الميتوكوندري ..وغيرها (Gargouri et al., 2011) ،كما تشير Bagchi في دراسة اجريت سنة 1995 ، ان كل تأثير للمبيدات هو ناتج عن تحفيز تركيب الجذور الحرة ، وان LPO هي احدى الآليات المتدخلة في سمية هذه المبيدات . (Ogut et al., 2015)

ويتسبب CPF كغيره من المبيدات الفسفوعضوية في زيادة الاكسدة الفوقية اللبيدية في الخلايا البشرية المختلفة وان اضافة مضادات اكسدة تكبح الاكسدة الفوقية اللبيدية الناتجة عنه ،مما يؤكد ارتباط الاضرار الناتجة عن هذا النوع من المبيدات بما يعرف بالتوتر التأكسدي (Gargouri et al., 2011).

III- الاثر التأكسدي الناتج عن سمية المبيدات الفسفوعضوية

و لا يقتصر الاثر التأكسدي الناتج عن التعرض لهذه المبيدات على زيادة تركيب الجذور الحرة ،وما تسببه من اضرار على الانسجة وغيرها من الجزيئات الكبرى كاللبيدات ،البروتينات وحتى ADN فحسب،حيث يمتد هذا الاثر الى العديد من الاجهزة والوظائف لمختلف الاعضاء والتي سوف نأتي على ذكر اهمها.

III-1 على مستوى الانزيمات المضادة للأكسدة

تمتلك الأنظمة البيولوجية أجهزة مضادة للأكسدة تعمل على حماية الخلية من الأضرار التأكسدية ؛ويمكن تعريف مضادات الاكسدة على انها جزيئات داخلية أو خارجية لها القدرة على ابطاء أو منع اكسدة جزيئات اخرى بواسطة الجذور الحرة ،أو حدوث تفاعلات كيميائية أخرى ؛ويعد الدفاع المضاد للأكسدة مهم للغاية لأنه يسهل التخلص المباشر للجذور الحرة او السوابق المؤكسدة وبالتالي توفير حماية عالية للمواقع البيولوجية (Ping et al., 2013).

وتعتبر مضادات الاكسدة الانزيمية (SOD) superoxide dismutase,(CAT) Catalase, (GST) Glutathione S-transferase وغير الانزيمية مثل GSH, NPSH من اهم مضادات الاكسدة المستعملة كأنظمة دفاعية في الاجهزة الحيوية ،حيث يختل تركيزها بسرعة في الجسم خلال هجوم السموم ،مما يتسبب في زيادة نسبها أو انخفاضها (Acker et al., 2012).

يلعب SOD دورا اساسيا في تحويل جذر فائق الاكسيد $O_2^{\bullet-}$ الى بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 وفق المعادلة التالية :

$$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2 \quad \text{.....(1) (Gargouri et al., 2011)}$$

ويلعب SOD دور اول خط دفاعي ،ويتواجد عادة في خلايا النباتات والحيوانات الهوائية تحديدا في Peroxisome (Valko et al., 2006).

فيما يشترك كل من CAT و GPx في عمليات تحويل الجذر الناتج H_2O_2 الى جزيئة ماء وفق المعادلة التالية :

$$\mathbf{2H_2O_2 \xrightarrow{Catalase} 2H_2O + O_2}$$ ……………………..........(2)(Halliwell, 2011)

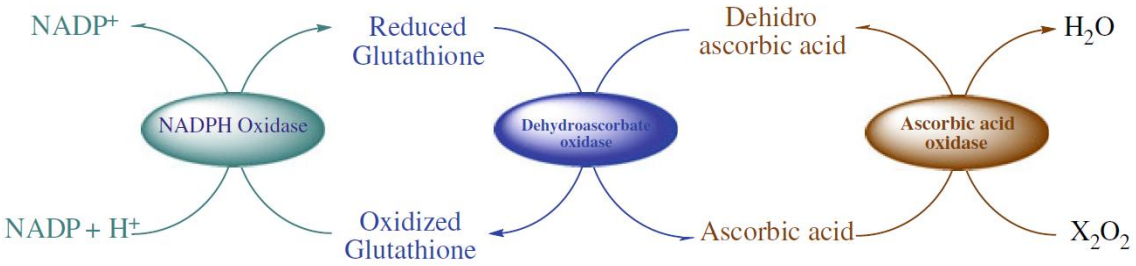
$$\mathbf{2GSH + H_2O_2 + \xrightarrow{GPx} GSSG + 2H_2O_2}$$ ……………......(3) (Lina et al., 2009)

ويلعب GPx اضافة الى دوره في تعديل قيم بيروكسيد الهيدروجين ،دورا مهما في خفض قيم lipid hydroperoxides بواسطة GSH ليرجعه الى شكله المؤكسد GSSG.

اما GST هو انزيم مزيل للسمية يعمل على تحفيز عملية ارتباط المواد المحبة للالكترونات Substrate Electrophilic مع مجموعة الثيول لل GSH مشكلا مركبات اقل سمية ،كما يمكنه ان يقطع السلسة التفاعلية للاكسدة الفوقية اللبيدية من خلال ازالة سمية (LOOH) lipid hydroperoxide (El-Demerdash, 2011) .

ويعد مضاد الاكسدة غير الانزيمي GSH من اكثر مضادات الاكسدة اهمية في الجهاز الدفاعي ،ويوجد في صورتين صورة مختزلة GSH وصورة مؤكسدة GSSG ،حيث تستعمل النسبة GSSG / GSH ،غالبا لقياس حدة التوتر التأكسدي.

ويرجع الدور الاساسي الوقائي لل GSH ضد التوتر التأكسدي الى كونه عامل مساعد للعديد من الانزيمات مثل GPx , GST وغيره..... ،يساهم في عملية نقل الاحماض الآمينية خلال الغشاء البلازمي ،كما انه يقتنص مباشرة جذري $HO^{\bullet}$ و O^1_2 ،يزيل سمية H_2O_2 و Lipid peroxides بواسطة تنشيط GPx ،كما انه قادر على تجديد العديد من مضادات الاكسدة كالفيتامين C (شكل 4) و E ،يمكن لل GSH ان يرجع الصورة الجذرية للفيتامين E سواء بطريقة مباشرة او غير مباشرة .



شكل4: عمليات التجديد الانزيمي لمضادات الاكسدة (Gülcin, 2012)

ويتضح من خلال نشاط هذه الانزيمات التكامل الوظيفي بين مختلف انواع الانزيمات المضادة للأكسدة ،حيث تعمل معا من أجل التخلص من الجذور الحرة وتعديل مستوياتها في العضوية ،وان أي خلل في أي عنصر من عناصر الجهاز المضاد للأكسدة قد يؤدي الي اضطراب في الجهاز كاملا.

تستعمل المعايير Total AntiOxidant Status(TAS), Total Oxidant Status(TOS) من اجل تقييم التوتر التأكسدي في العديد من الامراض كالسرطان مثلا (Ogut et al.,2015) ؛ولطالما استعملت النسبة مضاد اكسدة/مؤكسد كمعيار لقياس الاضطرابات الناتجة عن التعرض للمبيدات عموما والمبيدات الفسفوعضوية تحديدا حيث تبين دراسات سابقة لكل من (Serdal et al ., 2015) و (Prakasam.,2001)على مزارعين (الذين يعملون في الحقول و استعملوا المبيدات لأكثر من خمس سنوات)،ان نسبة (TOS) تكون مرتفعة عند المزارعين مقارنة مع غيرهم من السكان ؛ويكون هذا الارتفاع مرفوقا بزيادة نسبة الاكسدة الفوقية اللبيدية وكذا نشاط الانزيمات المضادة للأكسدة (SOD,CAT,GSH-Px) فيما يسجل انخفاض في نسبة (TAS) في نفس المجموعة ،وقد يرجع انخفاض هذه الاخيرة رغم الارتفاع المسجل في نشاط الانزيمات المضادة للأكسدة حسبهم الى استعمال مضادات الاكسدة غير الانزيمية مثل VitE,VitC , αcarotene ,transferrin للوقاية من التوتر التأكسدي (Ogut et al.,2015) .

عند التعرض للمواد السامة كيميائية أو ملوثات بيئية تظهر الخلايا اضطرابات بنيوية ،اضطراب وخلل في الجهاز المضاد للأكسدة ،كما بينت عدة دراسات ان النشاط الانزيمي المرتبط للجهاز مضاد للأكسدة يضطرب حيويا و مخبريا بواسطة المبيدات (Gultekin et al., 2000).

كما يختلف تأثير مختلف انواع المبيدات على هذا الجهاز ،حيث اشارت دراسة سابقة ان CPF يسبب انخفاض في كل من SOD,CAT بينما يتسبب أنواع اخرى ك Diazinon و Dimethoat في زيادة نشاطها (Gargouri et al.,2011)؛ كما قد يكون هناك اختلاف في الاستجابة في نفس النوع من المبيد ،حيث بينت بعض الدراسات ان التعرض لل CPF يسبب زيادة في نشاط الانزيمات المضادة للأكسدة (Tripathi and Srivastav, 2010)،وعلى العكس من ذلك هناك دراسات تثبت انخفاض في نشاط هذه الانزيمات ،وقد يرجع هذا الاختلاف الى الجرعات ومدة المعاملة بالمبيد ،حيث يتوقف تأثير CPF على طريقة التعرض (Acker et al., 2012).

ولا يمكن توقع أو الاتفاق على كيفية الاستجابة الدفاعية ضد المبيدات الفسفوعضوية في جميع الحالات ،حيث تختلف الاستجابة الخلوية حسب الحالة الدفاعية فيسجل زيادة في نشاط الانزيمات المضادة للأكسدة في حالات السمية تحت الحادة أو تحت المزمنة ،ويعتبر ذلك استجابة دفاعية تلجأ اليها الخلية من أجل التخلص من الجذور الحرة ،وخلق حالة هيمنة لمضادات الاكسدة ،حيث تعتبر جرعة المبيد هنا كمحفز للجهاز الدفاعي ،وعلى العكس من ذلك يسجل نقص نشاط الانزيمات المضادة للأكسدة أو ما يعرف بالعوز في مضادات الاكسدة قد يرجع هذا الى استنفاذ مضادات الاكسدة في عمليات التخلص من الجذور الحرة ، والمسجلة غالبا في حالات السمية المزمنة كما هو الحال بالنسبة للسمية الحادة ،فرغم قصر مدة التعرض في هذه الحالة الى ان الفائض المنتج في هذه الحالة يستنفذ نشاط الانزيمات المضادة للأكسدة و بالتالي تعجز العضوية عن تجديدها في فترة وجيزة ، غير انه قد يرجع هذا الاختلاف في الاستجابة الى طبيعة المبيد نفسه ، كما سبق الاشارة حيث تسبب بعض الأنواع انخفاضا في نشاط الانزيمات المضادة للأكسدة على عكس من الاخرى التي يسبب زيادة في نشاطها ،وتبقى الظاهرتان سواء زيادة أو نقصان في نشاط الانزيمات المضادة للأكسدة انعكاس عن استجابة خلوية تؤكد تدخل آليات خلوية بوساطة الجذور الحرة.

III-2 التأثير على الاعضاء

لقد بين العديد من الباحثين ان السمية الحادة والمزمنة للمبيدات الفسفوعضوية تسبب اضطرابا في العمليات التأكسدية redox processes ،تغيير نشاط الانزيمات المضادة للأكسدة ،كما تسبب في حدوث الاكسدة الفوقية اللبيدية في العديد من الاعضاء (Soltatinejad and Abdollahi, 2009; Lukaszewicz-Hussain, 2010). ، وفي هذا المجال بينت دراسات سابقة عديدية الاثر السمي لـCPF للعديد من الاجهزة و الاعضاء مثل الكبد ، الكلى ، العضلات، الجهاز المناعي والجهاز الدوراني (Nurulain et al., 2013) ، أما (Possami et al., 2006) فقد بينت ان اكثر الاعضاء تضررا او حساسية من التوتر التأكسدي بعد المعالجة بجرعات حادة لل malathion هي الكلى ،الرئتين والحجاب الحاجز ، اما الأعضاء المستهدفة في السمية تحت الحادة هي الكبد ، العضلات الرباعية.

ويظهر من خلال مختلف الدراسات المجرات ،تأثير المبيدات الفسفوعضوية على مختلف الأعضاء كبد، كلى ، دماغ ، رئتين ، قلب ، بنكرياس، الاعضاء التكاثرية للجنسين وحتى بعض الغدد كالغدة الدرقية ،حيث تتسبب هذه المبيدات في عدة اضطرابات وظيفية ويرافق ذلك اضرارا نسيجية ، ويعد الدماغ من أكثر الأعضاء المدروسة الى جانب الكبد والكلى.

III-2-1 السمية العصبية

يعد الجهاز العصبي المركزي جد حساس للأضرار التأكسدية الناتجة عن الجذور الحرة وذلك لاحتوائه على خلايا تتميز بخاصية عدم القدره على الانقسام ، مستوى عالي من الحديد وغناه بالأحماض الدهنية سهله التأكسد، مقابل ضعف الجهاز الانزيمي المضاد للأكسدة و استعمال عالي الاكسجين مما يجعل النسيج اكثر عرضه الجذور الأكسوجينية الحرة اضافه الى التنوع والاختلاف الخلوي و الوظيفي ، ويعتبر CPF احد المبيدات الفوسفوعضوية المعروفة بأثره الضار على الدماغ ، ولقد اجريت عدة دراسات مخبرية باستعمال مسارات تعرض مختلفة ،تبين اثر السمية الحادة والمزمنة لـCPF على الجرذان ، حيث بينت تسبب هذا المبيد أو احد مشتقاته بأضرار كبيرة في الجهاز العصبي المركزي أو احداث تغيرات ملحوظة في عمل العصبونات ، ويلاحظ ان هذا الاثر يمتد حتى بعد التوقف عن التعرض لهذا النوع من المبيدات.

يتضح من خلال نتائج مختلف الدراسات المجرات على مختلف الحيوانات ان CPF يسبب سمية عصبية تكون ناتجة عن عدة آليات ، غير تلك المسؤولة عن تثبيط AchE ، حيث بينت عدة دراسات سوف نأتي على ذكرها تسبب CPF في احداث التوتر التأكسدي ، الالتهابات ، اضطرابات في نشاط الميتوكوندري والموت المبرمج في الدماغ ، ولقد بينت الدراسات أن تأثير هذا المبيد يكون مختلف من منطقة الى اخرى في الدماغ ، وقد يرجع ذلك لكون النسيج العصبي غير متجانس ،يتكون من أنواع مختلفة من الخلايا (عصبونات ،دبقية)، وان وجود مناطق مختلفة للجهاز المضاد للأكسدة واختلاف معدلات الايض من منطقة الى أخرى يؤدي الى خلق مناطق ضعف (او توتر) في الدماغ ، يكون فيها تراكم للتوتر التأكسدي ، وهذا ما يزيد من تأثر مناطق دون غيرها ،كما بينت كذلك الدراسات ارتباط هذه السمية بالعمر فكلما كانت الحيوانات فتية كلما زادت هذه السمية.

تعد البروتينات واللبيدات اهداف حساسة لهده المركبات في الدماغ ، حيث تؤدي اكسدة اللبيدات الى تشكيل MDA ،بينما تدل زيادة تراكيز protein carbonyls (PCO) على حدوث اكسدة البروتينات ، و حسب دراسة اجراها (Xu et al., 2017) فان تعريض الجرذان لجرعات صغيرة من CPF وCadium كل على حدى او ممزوجان ، تسبب في زيادة مستوى MDA و (PCO) في الدماغ ، وتؤدي الاكسدة البروتينية الى اضعاف الوظيفة البروتينية ، مما يؤدي الى موت العصبونات ، ان الملاحظ في هذه التجربة ان المزيج لم يؤدي الى زيادة حدة الاكسدة الفوقية اللبيدية في الدماغ.

ان نقل العضيات و الجزيئات الكبرى مثل الميتوكوندري ،المستقبلات البروتينية ،عوامل النمو من جسم الخلية الى النهايات المشبكية امر ضروري سواء خلال النمو العصبي او حتى في العصبونات النشطة من اجل الحفاظ على النشاط والنمو الطبيعي للعصبونات ولقد لوحظ تأثير CPF و CPF-oxon على نقل هذه الجزيئات داخل الخلية العصبية ، فحسب دراسة اجراها (Jie et al., 2017) فان CPF يتسبب في احداث ضعف النقل العصبي ، وقد تكون هذه الآلية احد العوامل المساهمة في احداث الاضرار الناتجة عن هذا المبيد، حيث لوحظ ان هذه الآليات تتدخل في عدة امراض عصبية كالزهايمر مثلا.

كما تبين نتائج دراسة اجراها (Dominah et al., 2017) بأن CPF بكل صوره CPF-oxo, ;CPF ;TCP يتسبب خفض مستوى GSH ،اضطراب في نشاط SOD ،زيادة الأكسدة الفوقية اللبيدية ،والراجع الى زيادة تركيب الجذور الحرة ،بسبب تنشيط NADPH Oxidase (NOX).

ورغم ان عملية هدم او استقلاب CPF تتم اغلبها في الكبد إلا انه من المعروف ان CYP2B هو المسؤول عن تنشيط CPF وتحويله الى صورته السامة CPF-oxon في الدماغ تحديدا في القشرة الدماغية (المادة الرمادية Substantia nigra وبصفة اقل في straitum) ، لذلك فان فعالية CYP في استقلاب CPO قد تؤثر في مناطق الدماغ المختلفة ، كما انه يمكن لهذا المبيد عبور الحاجز الدموي-العصبي ليتراكم في الدماغ مسببا سمية عصبية.

ولا تقتصر الاضرار الناتجة عن CPF عن العصبونات ، حيث اشارت دراسات سابقة (Garcia et al., 2001 et 2002 ; Qiao et al., 2001) الى ان هذا المبيد يستهدف عمليات حيوية للخلايا الدبقية في الجهاز العصبي مثل عملية التضاعف وكذا المراحل الاخيرة من عمليات التمايز الخلوي وذلك من خلال تركيبه الفائق لجذور الحرة خلال مرحلة النمو العصبي والتي تعد مرحلة يكون فيها الجهاز العصبي هشا وقد تمتد هذه المرحلة حتى مراحل متقدمة من الطفولة.

وقد بينت الدراسات الوبائيه العلاقة بين التعرض المبيدات و ظهور عدة اضطرابات عصبيه انتكاسية وتعد الالتهابات والتركيب الفائق للجذور الحرة بدون ادنى شك عاملان محفزان لتنشيط الخلايا الدبقية وكذا الموت المبرمج و لقد اثبت وجود هذه العوامل سريريا خلال هذه الاضطرابات الانحلاليه (Mariana et al., 2012).

III-3 التعبير الجيني

رغم ان المبيدات الفسفوعضوية تعتبر من مثبطات الاستيل كولين و اضافة الى دورها في تحفيز التوتر التأكسدي إلا انه تم اثبات تأثير هذه المبيدات على التعبير الجيني ،في مختلف النماذج المدروسة ،حيث تعتبر الآلية الجينية احد الاليات التي يؤثر بها مبيد الكلوربيريفوس ،ولقد بينت الدراسات الحديثة ان الآلية الجينية غير مقتصرة على التعبير الجيني فقط و انما تشمل كذلك أي تغيير يمس الحفاظ على عملية النسخ في الخلايا الناضجة.

ولقد ارتبط التعرض CPF ومشتقاته بالعديد من الاعراض الصحية الخطيرة ، وذلك حسب نوع الكائن الحي والجرعة المتعرض لها ولقد اظهرت الدراسات ان التعرض لـTCP CPF، تؤدي الى اضرار على مستوىADN (Wang at al., 2014 ; VanEvon et al., 2018) اختلالات على مستوى التعبير الجيني (Estevan, 2012 ;Abdelaziz, 2010) زيادة الى الشذوذ الصبغي وكذا التبادل بين الضفيرتين (Amer Aly, 1992).

فحسب دراسة اجراها (Young et al., 2016) فان معالجة جرذان بجرعة تقدر ب 10 ملغ /كلغ.وج من CPF (لمدة 21 يوم) اثبتت بوضوح التأثير الجيني لهذا المبيد على عمليات النسخ في الدماغ في الحيوانات (فقط التي بلغت نسبة تثبيط AchE فيها 90%) ، كما قد تمارس جرعات ضئيلة نفس التأثير حيث بين أن جرعة اقل تقدرب 3ملغ /كلغ.وج تتسبب هي كذلك في بعض التغيرات في التعبير الجيني ، ويخص هذا التثبيط الجيني بيبتيدات عصبية لها دور مهم في الحفاظ على الثبات الفسيولوجي وتتدخل في عدة عمليات عصبية الذاكرة التعلم ...الخ ، ويؤثر CPF من خلال احداث خلل في تعبير RNAm للجينات المشفرة للبيتيدات العصبية ، ولا يرتبط التأثير الجيني لهذه المبيدات بتثبيط AchE ،حيث سجل في دراسة اجراها (Lee et al., 2016) تغيرات جينية في منطقة الحصين في دماغ جرذان التجربة عند مستوى تثبيط اقل من 20% ، فيما لم يسجل هذا الاثر عند تثبيط AchE بنسبة تقارب 50% ، حيث تفترض الدراسات التحليلية الجينية علاقة هذه الجينات مع المستقبلات الوسيطة في مسار نقل الاشارة.

تستهدف سميه CPF سلسله نقل الاشارات ،التعبير و وظيفة المورثات (الاستقراء) مما يسبب نقص في تركيب ADNفي الدماغ، ومنه فان CPF قد يسبب اضرارا على مستوى ADNفي الخليه العصبيه ويغير او يضر آلية الترجمة (Singh and Somanathan, 2014) .

كما بين (Lui et al., 2015) ان تعرض اجنة الاسماك لـلCPF يزيد من تعبير ستة بروتينات تشارك بشكل اساسي في بنية الهيكل الخلوي ، الترجمة و أيض الليبوبروتينات ، بينما بينت دراسة (Chebab et al ., 2017) تأثير CPF على التعبير الجيني للجين المسؤول على انتاج وتركيب GnRH (الهرمون النخامي المحفز لإنتاج الهرمونات الجنسية) في منطقة تحت السرير البصري ، مما يؤدي الى اضطرابات في نسبة الهرمونات الانثوية عند جرذان التجربة.

كما يظهر التأثير الجيني لمبيد CPF من خلال تثبيط المورثة المسؤولة عن نسخ GST في الدماغ كما اشار اليه (Nars et al., 2015)،حيث يشير الى ان الانخفاض في قيم GST لا تتعلق بانخفاض قيم GSH فقط ، بل ترجع كذلك الى تثبيط هذه المورثة مسببا انخفاض في التعبير الجيني،ويتضح من خلال اضافة مستخلص نباتي في هذه الدراسة القدرة على استرجاع مستوى نسخ GST والذي يعمل بدوره مع GSH للتخلص من سمية CPF ، تحسين مستوىGR وخفض قيم GSSG،مما يدل على ارتباط السمية الجينية لهذا المبيد بتركيب الجذور الحرة. و بينت دراسة اخرى اجريت على جرذان حوامل معرضة لجرعات مختلفة من CPF ان الهدف الجيني قد يكون مشابها أو مختلفا بين الأم و الاجنة ،ويتم غالبا حدوث تغيرات جينية بجرعات تحت المستوى المسموح من الاستعمال اليومي لهذا النوع من المبيدات.

ان هذا التنوع في اهداف OPIs يجعلنا نعتقد ان مكونان من نفس العائلة يمكنهما ان ينشطا مورثات مشتركة ولكن نماذج جينية مختلفة تؤدي الى مظاهر مرضية تبدو مختلفة.

III-4 الموت المبرمج

يتدخل الموت المبرمج سواء بطريقة مباشرة أو غير مباشرة في الآليات المحدثة للأضرار الخلوية وقد يعتبر حدوث الموت المبرمج بواسطة المبيدات عامل مهم في تحديد الاضرار النسيجية (Zhang et al., 2017)، وكذا الآليات الجزيئية الداخلة في سمية هذه المبيدات.

يمكن للموت المبرمج ان ينتج من عوامل داخلية أو خارجية محددة ،وكذا عن طريق تنشيط شبكة من المورثات ،ويعتبر Caspase-3 جزيئة جد مهمة في انطلاق (بدء) الموت المبرمج.

يعتبر Caspase-3 العنصر الجوهري في عائلة Caspase ،نظرا لدوره الاساسي في اتصاله بنقل الاشارة للموت المبرمج وكذا مواد التفاعل المحدثة له (Zhu et al., 2013) ، ورغم ان لل Caspase-3 دور حيوي في المناعة والتمايز الخلوي ،غير ان تنشيطه العالي يلاحظ في العديد من الحالات المرضية ؛كما تم تسجيل هذا الاثر في مختلف انسجة الحيوانات المتعرضة للمبيدات الفسفوعضوية ،حيث سجل (Amos et al., 2017) زيادة في نشاط Caspase-3 في ادمغة وفي الاعضاء التكاثرية الانثوية للجرذان المعالجة بجرعة من CPF ؛كما بينت تحاليل التعبير الجيني للخلايا العصبية Neuroblastoma والمعالجة بجرعات عالية من dichlorvos,CPF و methamidophos تنشيط عال للموت المبرمج وتثبيط لكل من جيني النمو والتمايز الخلوي والتي تؤدي الى حدوث عمليات الموت المبرمج (Lu, 2015 ; Lumina et Maria, 2017) ، بينما بين(Yu et al., 2008) أن CPF يسبب الموت المبرمج في خلايا شبكية العين لجرذان التجارب.

كما يلعب Caspase-8 دورا في تنشيط الموت المبرمج من اخلال احداث التوتر التأكسدي ،تحرير cytochrome C الميتوكوندري وتحفيز معقد نقل الاشارة (Zhu et al. ,2013) ،ان تحرير Cytochrome C من غشاء الميتوكوندري قد يؤدي بدوره الى تنشيط Caspase مما يسبب الموت المبرمج ،حيث ان التوتر التأكسدي قادر على احداث الموت الخلوي بواسطة تحريض أو اثارة الميتوكوندري ، كما قد يتسبب التعرض لل CPF في احداث خلل في النسبة بين Cytochrome السيتوزولي والموجود داخل الميتوكوندري ، وليس على المستوى العام لهذا البروتين ،حيث تحرض زيادة نسبه السيتوزولية مقارنة مع نسبته في الميتوكوندري الموت المبرمج (Dominah et al., 2017) .

يتسبب monocrotophos وهو مبيد فسفوعضوي كثير الاستعمال في زيادة مستوى Cytochrome C, p21, p53,-9, caspase-3 في خلايا PC12 ،وهو ما يبين التأثير السابق للموت المبرمج والذي يعوض بالموت التنكرزي بعد التعرض لمدة اطول لنفس المبيد (kashyap et al., 2010, Lumina et Maria, 2017).

ويعد التوتر التأكسدي (مهما كان مصدره) مصدرا للموت المبرمج ، ولقد بينت الدراسات الدور المهم لGSH في الوقاية منه ، حيث اثبتت الدراسات ان تنشيط caspase-3 يعتمد بدرجة كبيرة على الحفاظ على الحالة مؤكسد/مرجع لمجاميع الثيول Thiol/redox status ، حيث يعد مستوى GSH جد مهم في هذه الظاهرة (Astiz et al., 2012).

ويتبين من خلال دراسة تسبب هذا المبيد ومشتقاته للموت المبرمج التباين في حيوية وقوة الخلايا في الأنواع المختلفة ،حيث ان الخلايا الضعيفة أو الاقل حيوية تدخل في الموت المبرمج فيما تقاومه الخلايا الأكثر حيوية (Van Evan et al., 2018).

III-5 الاستجابة الالتهابية

لقد تم اظهار ان CPF يحفز حدوث الالتهاب في ادمغة الجرذان والفئران المعالجة من خلال زيادة تعبير الوسائط الالتهابية ، حيث اشارت دراسات سابقة (Hirani et al., 2007; Papadakis and Targan, 2000) الى دور CPF في زيادة الوسائط الالتهابية ك IL6 و TNFα وان ارتفاع نسب هذه الاخيرة دليل على حدوث التهاب على مستوى الدماغ و بقية الانسجة المدروسة ؛ كما بين(Amos et al., 2017) ان اكسيد النتريك NO يتدخل في سمية المبيدات عند حيوانات التجارب ؛ويعد اكسيد النتريك جزيئة اساسية في العديد من العمليات الفسيولوجية مثل النقل العصبي ، الدفاع الخلوي والتوسع الوعائي ، حيث يمكن تركيب كميات عالية منه مع مرور الوقت وبفضل عدة عوامل (المورثات المشفرة لتركيب حمض النتريك في النسيج الطلائي ، العصبي والمحرض) وفي هذه الحالة يتوسط التوتر النيتروجيني nitrosative stress احداث الالتهاب في الانسجة من خلال التفاعل مع superoxide anion($O2^{\cdot-}$) ليعطي peroxynitrite ($ONOO^-$) ،مشيرا الى تسبب CPF في احداث التوتر التأكسدي ، التهاب وكذا تسجيل حالات موت مبرمج في الدماغ ، ويعد $HO^{\cdot}$ و($ONOO^-$) من أهم الجذور المتدخلة في السمية العصبية (Kavacic and somanathan, 2014).

كما بينت العديد من التجارب ان السمية الحادة للمبيدات الفسفوعضوية تتسبب في احداث استجابة التهابية جد قوية ، كما بينت كذلك ان التعرض لمدة طويلة وبجرعات ضئيلة تتسبب كذلك في حدوث اضطرابات في تنظيم الوسائط الالتهابية . ومن المعروف ان المبيدات الفسفوعضوية تعد من ملوثات البيئية وخاصة المائية منها ،مما يتسبب في الاضرار بالأحياء المائية حيث بينت دراسات حديثة ل(Diaz-Resendiz et al., 2015) تسببها في احداث سمية مناعية للأسماك .

III-6 الاضطراب الوظيفي للميتوكوندري

ان المعدل العالي لاستهلاك الاوكسجين يقابله المقاومة الضعيفة للتوتر التأكسدي قد تكون العامل الذي يحفز تحرير الجذور الحرة خلال سمية CPF ،مما يعبد الطريق للاختلال الوظيفي للميتوكوندري ، وباعتباره المركز الاساسي لتركيب الجذور الحرة يساهم الميتوكوندري بشكل مفتاحي في الاختلالات الانتكاسية العصبية ، ومن المعروف ان مصدر اغلبية ATP الخلوي هو الميتوكوندري لذا أي ضرر قد يصيب الميتوكوندري قد يؤدي الى العوز في ATP مسببا توليد فائق للجذور الحرة (Basha and Poojary, 2014) ،حيث تبين دراسة سابقة ل (Liu et al., 2013) ان تراكم الجذور الحرة الناتج عن الاضرار التأكسدية في الميتوكوندري يتسبب في اضطرابات عصبية.

تشير نتائج الدراسة (Rajman et al., 2006; Basha and Poojary, 2014) ان سمية مبيد الكلوربيريفوس تسبب تثبيط انزيمات الميتوكوندري، اضافة الى احداث اضطرابا في مسار التفاعلات الانزيمية وتعطيل في نشاط الانزيمات التنفسية للميتوكوندري في اجزاء منفصلة من الدماغ ، من خلال توليد الجذور الحرة. ان هذا التغير في النشاط الانزيمي قد يؤدي الى تعديل استثارة العصبية في كل من الجهاز العصبي وكذا الحبل الشوكي . ولقد لوحظ ان هذا التأثير يكون اكبر في الحيوانات صغيرة السن ويقل كلما زاد العمر كما سبق الذكر، ويرجع ذلك غالبا لعدم اكتمال الكفاءة الاستقلابية ، كما ان نقص الآليات الدفاعية وضعف عملية ازالة المواد السامة تعد احد الاسباب في الحساسية العالية لهذه الحيوانات اتجاه السمية وتقل هذه الحساسية كلما تقدم الحيوان في العمل (كلما نضج الحيوان اكثر).

المواد و الطرق المستخدمة

I- المواد المستخدمة

1- المادة النباتية

تم استعمال نبات عشبي يعرف ب *Genista ulicina Spach* (صورة1) حيث تم قطف الجزء الهوائي من منطقة القالة شمال الشرق الجزائري في ماي 2008 وتم توثيقها حسب مصنف (قاعدة) Quezel and Santa من طرف الاستاذ محمد كعباش (جامعة فرحات عباس ,سطيف) ،اما نبات *Limonium pruinosum* (صورة2) فتم جمعها من منطقة باتنة في مارس 2010.

صورة1 : *Genista ulicina Spach*

صورة2: *Limonium pruinosum (L.)*

تم الحصول على المستخلص البيتانولي للنبتتين المستعملتين في هذه الدراسة من وحدة البحث "تقييم الموارد الطبيعية ، الجزيئات النشطة بيولوجيا ، التحاليل الفيزيوكيميائية والبيولوجية، ، جامعة منتوري ، قسنطينة 1"

2 - الحيوانات

تم جلب الحيوانات ،جرذان بيضاء(ذكور) من سلالة Albinos wistar من معهد باستور بالجزائر العاصمة ،وتم تركها لفترة في مستودع الحيوان لجامعة منتوري قسنطينة لتتكيف قبل بدا الاختبارات ،حيث تتوفر الظروف المثلى من حرارة ورطوبة والإضاءة.

وتمت تربيتها في أقفاص من البلاستيك وغطاء من الحديد ، مع توفير الغذاء من مجموعة "La Ration" للإنتاج المحلي لبوزريعة ، واستعمال رضاعات من البلاستيك والمعدن محتوية على ماء الحنفية، مع المراقبة اليومية للتأكد من إضافة والاستبدال اليومي للماء و الغذاء والحفاظ على نظافة الأقفاص.

3- الكيمياويات المستعملة

المادة المستعملة : مبيد حشري

* عبارة عن مبيد من مجموعة المبيدات الفوسفوعضوية وهوالكلوربيريفوس-إيثيل

الاسم التجاري : Dursban

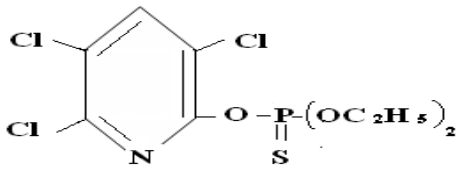
المادة الفعالة : Chlorpyriphos-Ethyl

$[0.0-diethyl\,(3,5,6-trichloro-2\,pyridyl)\,phosphothioate\ ]$

* صيغته الكيميائية هي: $C_4H_{12}O_3NCl_3PS$.

التركيز : 480غ/ل

*صيغته المفصلة هي :



* يتميز هذا المبيد بسمية عالية نحو النحل و الحيوانات المائية خاصة الأسماك. تتراوح قيمة LD_{50} (الجرعة القادرة على قتل 50٪ من حيوانات التجربة) ما بين 120-130 ملغ/كلغ من وزن الحيوان ، تقدرالجرعة المستعملة في هذه التجربة ب 10 ملغ/كغ.

4 - معاملة الحيوانات

من أجل دراسة الدور الوقائي للمستخلصين النباتيين *Genista ulicina* و *Limonium pruinosum* ضد سمية المبيد CPF، تم تقسيم الحيوانات إلى ستة مجموعات، متوافقة من حيث الوزن ،يتراوح عددها من 5-7 جرذان في كل مجموعة.

دامت فترة المعاملة مدة عشرة أيام حيث تم إعطاء جرعات المبيد و المستخلص النباتي عن طريق الفم بواسطة إبرة خاصة ،و في نفس التوقيت يوميا .

ملاحظة:

تغسل أقفاص الحيوانات بالماء و ماء الجافيل ، كما تغير النجارة طول مدة التجربة (كل يومين) و هذا لضمان النظافة التامة و لتفادي أية عدوى.

تم تقسيم الحيوانات إلى ستة مجموعات

***المجموعة الأولى (1):** مجموعة الشاهد حيوانات شاهدة غير معاملة ، تضم 8 جرذان تراوح أوزانهم ما بين [154-230غ] ، حيث لم تعامل هذه المجموعة بأي مادة، فقط تمت المراقبة اليومية وأخذ قياسات الوزن والغّذاء المستهلك ، نرمز لها بالرمز**(T)**.

***المجموعة الثانية (2):** المجموعة المعالجة بالمبيد الفسفوعضويCPF
حيوانات معاملة بمادة سامة (مبيد بجرعة تقدرب 10 ملغ/كلغ)، تضم 7 جرذان تراوح أوزانهم بين [217-263غ] ، حيث تلقت هذه المجموعة صبيحة كل يوم ولمدة عشرة أيام الجرعة المذكورة أعلاه من CPF ،عن طريق الفم ، نرمز لها بالرمز **(C)**.

***المجموعة الثالثة (3):** المجموعة المعالجة بالمستخلص النباتي *Genista ulicina*
تتكون هذه المجموعة من 7 جرذان تراوح أوزانهم ما بين [170-187غ] حيث تتلقى هذه المجموعة جرعة تقدر ب150ملغ/ كلغ من وزن الجرذ ،صبيحة كل يوم ولمدة عشرة أيام من المستخلص النباتي عن طريق الفم نرمز لها بالرمز **(G)**.

***المجموعة الرابعة (4):** المجموعة المعالجة بالمستخلص النباتي *Limonium pruinosum* تتكون هذه المجموعة من 5 جرذان تراوح أوزانهم ما بين [155-161غ] حيث تتلقى هذه المجموعة جرعة تقدر ب 150ملغ/ كلغ من وزن الجرذ ، صبيحة كل يوم ولمدة عشرة أيام من المستخلص النباتي عن طريق الفم نرمز لها بالرمز **(L)**.

***المجموعة الخامسة (5):** حيوانات معاملة بمادة سامة (مبيد تركيزه 10 ملغ/كلغ) و المستخلص البيثانولي للنبات *Genista ulicina* ، تتكون هذه المجموعة من 7 جرذان تراوح أوزانهم ما بين [203-224غ] تتلقى هذه المجموعة هي كذلك ، كل صباح جرعة من المستخلص النباتي تقدر ب150 ملغ/كلغ وبعد 30 دقيقة تتم المعاملة ب CPF بجرعة تقدر ب10ملغ/ كلغ ،عن طريق الفم ولمدة عشرة أيام، نرمز لها ب **(GC)**.

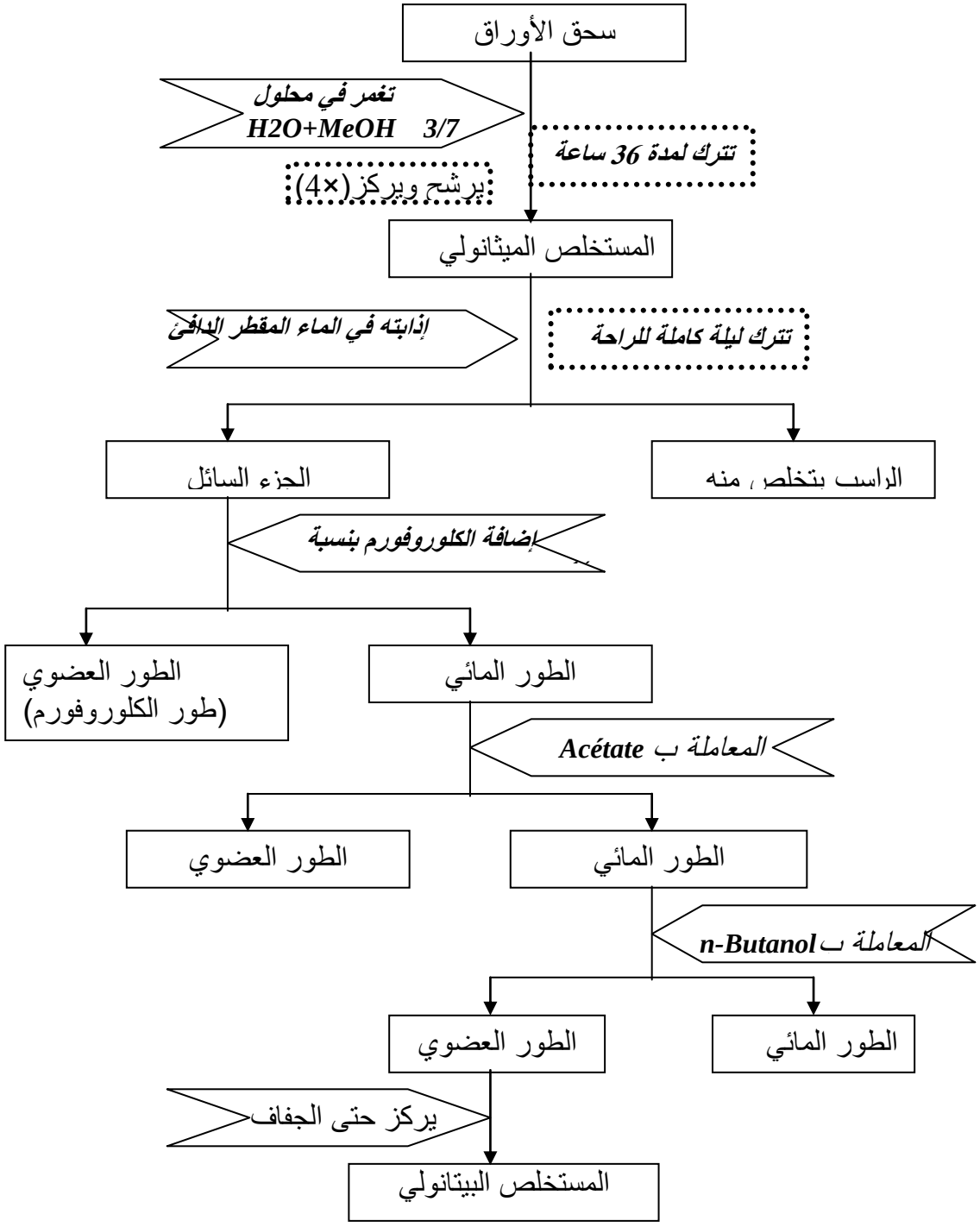
***المجموعة السادسة (6):** حيوانات معاملة بمادة سامة (مبيد تركيزه 10 ملغ/كلغ) و المستخلص البيثانولي للنبات *Limonium pruinosum* ،تتكون هذه المجموعة من 5 جرذان تراوح أوزانهم ما بين [156-163غ] تتلقى هذه المجموعة هي كذلك ، كل صباح جرعة من المستخلص النباتي تقدر ب150 ملغ/كلغ وبعد 30 دقيقة تتم المعاملة ب CPF بجرعة تقدر ب10ملغ/ كلغ ،عن طريق الفم ولمدة عشرة أيام، نرمز لها ب **(LC)**.

تكون معاملة الجرذان مصحوبة بمراقبة يومية لأي تغير في السلوك ، وزن أو تغذية الحيوان لرصد أي تغيرات قد تكون ذات دلالات فسيولوجية مرضية.

II- الطرق

II-1 طريقة الاستخلاص

بعد تجفيف الجزء الهوائي للنبتة في الظل، ثم وضعت المادة النباتية في أواني مجهزة لهذه العملية وتتم طريقة الاستخلاص وفق المخطط التالي:



شكل5: مخطط يوضح مراحل استخلاص المستخلصين النباتيين المستعملين في الدراسة

II-2 تشريح الحيوانات و أخذ العينات

عند نهاية التجربة (في صبيحة اليوم الحادي عشر من المعاملة) تشرح الحيوانات وذلك بعد تخدير الجرذان بواسطة مادة الكلوروفورم.

II-2-1 أخذ الدم

يتم أخذ الدم عن طريق الوريد البابي وتوضع كمية الدم المسحوبة في أنابيب اختبارجافة أو محتوية علي مادة مضادة للتخثر بعدها توضع عينات الدم في جهاز الطرد المركزي بسرعة تقدر بـ 3000 دورة /د لمدة 10 دقائق، حيث تستعمل البلازما أو المصل لمعايرة المؤشرات البيوكيميائية (كل من الكولسترول الإنزيمات المصلية، الجلسريدات الثلاثية،حمض اليوريا.....الخ)

II-2- 2 الحصول على المجنس النسيجي

بعد الاستئصال المباشر للأعضاء (الدماغ ، القلب، الكبد، الكلى) ، يغسل كل عضو في المحلول الفسيولوجي Nacl 0.9٪ ثم يجفف ويوزن، ويتم قطع جزء من العضو ويحفظ في الفورمول بتركيز 10% لغرض اجراء الدراسة النسيجية المرضية ، اما البقية فهي تعلق في محلول Kcl المثلج بعد وزنها ثم تسحق في ساحق كهربائي للحصول على مجنس متجانس يحفظ بعدها في أنابيب اختبار لحين إجراء القياسات البيولوجية.

II-2- 3 إجراء القياسات البيولوجية

تم قياس المعايير البيولوجية إما في مختبر الجامعة (المتاح منها) أما الباقي فتم قياسه في مختبر المستشفى الجامعي CHU قسنطينة.

لقد قسمت هذه الدراسة إلى قسمين ، قسم *In vivo* والذي يهتم بقياس مختلف المعايير البيوكميائية والدراسة النسيجية لمختلف اعضاء جرذان التجربة ، وقسم أخر خارج العضوية *In vitro* يعني بقياس النشاط المضاد للأكسدة ودراسة بعض المكونات النشطة للمستخلصات النباتية المستعملة في بحثنا هذا من أجل دعم النظريات المطروحة في القسم النظري.

القسم الأول

الدراسة التجريبية داخل العضوية *In vivo*

III- دراسة التوتر التأكسدي الناتج عن CPF على مستوى الأنسجة

1-III قياس مؤشرات التوتر التأكسدي

1-1-III قياس MDA في مجنس الأعضاء

يعد تقدير Malondialdehyde (MDA) من أكثر الطرق استعمالا وذلك لسهولتها وفعاليتها، حيث أن قياسها يسمح لنا بتقدير ظاهرة الأكسدة الفوقية اللبيدية و الناتجة في دراستنا هذه عن المبيد الفسفوعضوي الكلوربيريفوس CPF.

وتعتبر هذه الطريقة معايرة غير مباشرة للجذور الحرة، فهي تقدر المادة الناتجة عن الأكسدة اللبيدية المتمثلة في MDA (مركب ثانوي ناتج عن الأكسدة الفوقية اللبيدية –أول مركب يظهر-) التي تتفاعل مع Thiobarbituric acid (TBA) حسب طريقة (Uchiama and Mihara,1978)

مبدأ العمل

تتفاعل كل جزيئة MDA ناتجة مع جزيئتي(TBA) Thiobarbituric acids في وسط حامضي ودرجة حرارة تعادل 100مº ، ليشكل معقد ذو لون وردي يمكن قياسه مطيافيا على طول الموجة 532 نانومتر ، بعد استخلاص النواتج المتفاعلة بواسطة n-butanol.

2-III قياس نشاط الانزيمات المضادة للأكسدة

1-2-III تقدير النشاط الانزيمي لل Catalase

تم قياس النشاط الانزيمي لل Catalase حسب طريقة Clairborne 1985 التي تعتمد عل اختفاء الماء الاوكسيجسني في وجود المصدر الانزيمي حسب التفاعل التالي:

$$2H_2O_2 \xrightarrow{Catalase} 2H_2O + O_2 \quad \text{.....(4)}$$

طريقة العمل

نضيف 25 ميكرولتر من السيتوزول الى 1 ملل من محلول الفوسفات المنظم (KH_2PO_4 ;0,05M ,PH7)و 975 ميكرولتر من H_2O_2 (0,019 M) المحضر حديثا. يقاس اختفاء H_2O_2 عند طول الموجة 240 نانومتر خلال الدقيقة الاولى للتفاعل.

III-2-2 تقدير النشاط الانزيمي للGPx

لتقدير النشاط الانزيمي لـل GPx اتبعنا طريقة (Flohe et Gunzler, 1984) التي تعتمد على اختزال الماء الاوكسيجيني H_2O_2 في وجود الجلوتاثيون المختزل GSH الذي يتحول الى GSSH في وجود GPx حسب التفاعل التالي:

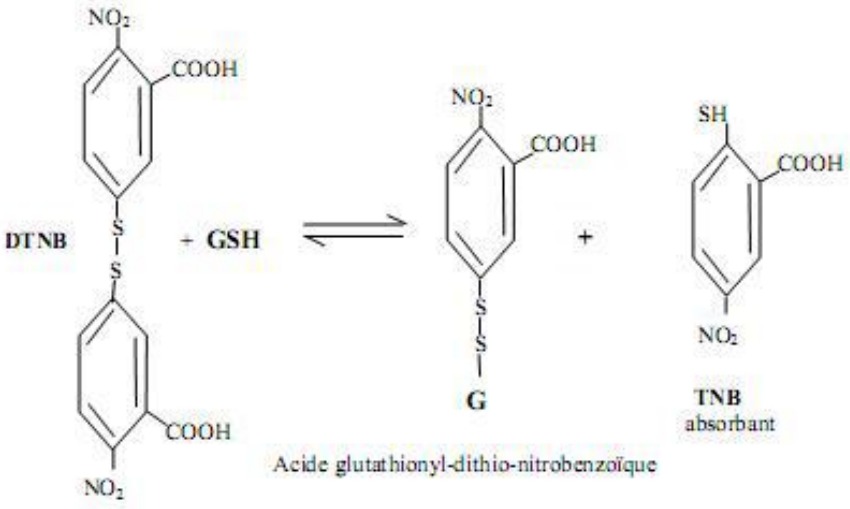
$$2GSH + H_2O_2 + \xrightarrow{GPx} GSSG + 2H_2O_2 \quad \text{.....(5)}$$

طريقة العمل

يضاف الى 0,2 ملل من المعلق النسيجي 0,4 ملل من GSH (0,1mM) و 0,2 ملل من محلول TBS (Tris 50M ,Nacl150 mM,PH7,4) ويحضن الخليط في حمام مائي على درجة 25م° لمدة 5 دقائق ثم يضاف 0,2 ملل من الماء الاوكسيجيني (H_2O_2 13 mM) لبدا التفاعل وبعد 10 دقائق نضيف TCA (1%)لإيقاف التفاعل ثم يوضع المزيج في الثلج لمدة 30 دقيقة، بعد اجراء عملية الطرد المركزي يؤخذ 0,48 ملل من السائل الطافي ويضاف له 2,2 ملل من محلول TBSو 0,32 ملل من محلول DTNB(1mM)و بعد 5 دقائق من التفاعل تقرا الكثافة الضوئية عند طول الموجة 412 نانومتر.

III-2-تقدير مستوى GSH

حسب (Ellman, 1959),يعتمد قياس GSH على اكسدته بحمض 2-nitrobenzoique (DTNB) 5 ,5'-Dithiobis محررا بذلك (TNB) Thionitrobenzoique الذي يمتص على طول الموجة 412 نانومتر حسب التفاعل التالي :



شكل6: مبدأ معايرة GSH

طريقة العمل :

بعد ترسيب البروتينات باستعمال محلول 10% TCA ،يؤخذ 200 ميكرولتر من الجزء الطافي ويضاف اليها 1,8 ملل من الفوسفات المنظم (tampon phosphate 0 ,1M ,ph8) و 1ملل من محلول DTNB(0,01M) وبعد 5 دقائق تقرا الكثافة الضوئية على طول الموجة 412 نانومتر .يتم استعمال GSH كمعيار.

III-3 قياس المؤشرات البيوكميائية

III-3- 1 معايرة ALAT, ASAT

تعرف ALAT, ASAT بإنزيمات Transaminases أو Aminotransferases وهي إنزيمات سيتوزولية تدخل في ميتابولزم الأحماض الآمينية من اجل تحفيز نقل الوظيفة الآمينية من حمض مانح لآخر مستقبل ، مع تحرير Ammoniaque، وتوجد خاصة في الكبد ، القلب ، العضلات ، الطحال ، الكلى .....الخ ، وتشير الزيادة في تراكيزها إلى حدوث أضرار كبدية .

يتم قياس ALAT, ASAT بالاعتماد على قياس معدل اختفاء NADH على طول الموجة 340nm ،وذلك وفق طريقة (Bergmeyer et al., 1978) .

III-3- 2 معايرة الجلسريدات الثلاثية

عبارة عن استرات الجلسرول وثلاث أحماض دهنية ، نحصل على جزء منها من الغذاء والجزء الآخر يصنع على مستوى الكبد ،تستعمل معايرة الجلسريدات الثلاثية في تشخيص مرض السكري ، النفرون وتخريب المسالك الصفراوية ، اضطراب أيض اللبيدات وكذا العديد من الأمراض الغدية.

يتم قياس نسبة الجلسريدات الثلاثية ، بقياس شدة الامتصاص للون الاحمر الناتج عن تفاعل H_2O_2 ،الناتج عن التحلل الانزيمي للجلسريدات الثلاثية مع بقية المركبات ،وذلك وفق طريقة (Fossati et al., 1982).

III-3-3 معايرة Cholesterol

هو جزيئه لبيدية، ضروري من أجل سلامة الوظائف في العضوية ، يلعب دورا في تركيب الغشاء الخلوي ، تركيب الهرمونات (Cortisone، الهرمونات الجنسية) ، يعطي شكلا للخلية من خلال توضعه في الغشاء ، يلعب دورا في هضم الدهون (على مستوى الصفراء) ، يدخل في تركيب العظام (فيتامينD)، يمكن أن يركب من طرف الخلايا ، بينما تتم أكبر مراحل تركيبه في الكبد (2غ يوميا). يوجد في الدم بصورة مرتبطة مع البروتينات البلازمية (البروتينات الناقلة)لأنه غير قابل للذوبان في الدم أو بصورة حرة متوضع على سطح lipoproteins أو يكون مرتبط مع حمض دهني من أجل تشكيل sterides.

بإتباع الطريقة الانزيمية (Roeschlau et al., 1974)، يتم قياس نسبة الكولسترول بقياس الامتصاص الضوئي على طول الموجة 500nm للناتج اللوني الناتج عن تفاعل H_2O_2 المشتق من سلسلة التحليلات الانزيمة للمركب Cholesterol esters مع المركب (HBA) و 4-aminoantipyrine

III-3-4 معايرة Albumin

هو البروتين الأساسي للدم، يمثل 50-65٪ من البروتينات البلازمية ، يركب على مستوى الكبد ، تتمثل مستوياته الفسيولوجية في حدود 40غ/ل.

يلعب دورا أساسيا في الحفاظ على الضغط الأسموزي، كما يساهم في نقل العديد من المركبات، مثل الأحماض الدهنية، bilirubin ، الأدوية في الدورة الدموية.

تعتمد معايرة Albumin على المركب bromocresol purple، حيث تؤدي اضافته الى الوسط الى تشكيل معقد مع Albumin العينة ، حيث يمكن قياس كثافة هذا المعقد اللوني على طول الموجة 604nm وذلك حسب طريقة (Lasky et al., 1980).

III-4-4 معايرة Creatinine

هو مركب داخلي مشتق من السابق Creatinine phosphate الذي يعتبر مخزون طاقوي في العضلات ، يلعب دورا أساسيا في التقلص العضلي ، يوجد في العديد من الأنسجة إضافة إلى الأنسجة العضلية ، وهو مركب لا يخضع لا لإعادة امتصاص ولا للطرح حيث توجد علاقة خطية بينه وبين الوظيفة الكلوية (الترشيح) ، ويعتبر مؤشر هام للنشاط الكلوي(خاصة الفشل الكلوي)، تتراوح مستوياته الفسيولوجية ما بين 9-12ملغ/ل ، وقد تعرف هذه القيم اضطرابا ، حيث يشير ارتفاع تركيزه البلازمي إلى حالة العجز الكلوي ، بينما يدل انخفاض تركيزه إلى انخفاض الكتلة العضلية ، كما هو الحال عند المسنين.

يعتمد قياس الكرياتينين على حركية Picrate القلوي ، حيث يؤدي اضافة هذا الاخير في وسط قاعدي الى تفاعل Creatinine الموجود في العينة ليشكل معقد Creatinine-Picrate يمكن قياسة على طول الموجة 500nm ، وذلك حسب طريقة (Jaffe, 1886).

III-4-5 معايرة Uric Acid

هو حمض ناتج عن الهدم النهائي لpurine يوجد في الدم بكميات قليلة تتراوح ما بين 20-70 ملغ/ل ، قد يؤدي ارتفاع تركيزه إلى الإصابة بداء النقرص (La goutte) المسئول عن الاعتلال المفصلي(Arthropathies).

يتم قياس حمض البولة عن طريق استعمال Uricase الذي يعوض المركب Trinder ، وفق طريقة (Fossati et al., 1980) والذي يسمح بتحويل Uric Acid الى Allantoine وH_2O_2 ،هذا الاخير وفي وجود 4-aminophenazone(4-AAP) و$TOOS^-$ [N-ethyl-N(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline] وتحت تأثير انزيم Peroxidase يعطي مركب لوني يقاس على طول الموجة 545nm ،تتناسب شدته مع تركيزه Uric Acid في العينة.

IV- الدراسة النسيجية

في نهاية المرحلة التجريبية (اليوم الحادي عشر) ، وبعد استئصال الاعضاء الكبد ، الكلى ، القلب والدماغ تم تثبيتها في الفورمول بتركيز 10% من اجل الحفاظ على سلامة الانسجة لحين اجراء الدراسة النسيجية ، والتي تمت باختصار وفق المراحل التالية حيث يتم وضع مقاطع الانسجة المحفوظة سابقا في الفرمول في درجات متزايدة من الكحول من اجل تجفيفها من الماء ثم يتم غمرها في شمع البرافين ، وبعد الحصول على الشرائح النسيجية يتم تلوينها بواسطة الاصبغة الاعتيادية (H&E) Haematoxylin وEosin وتمت الملاحظة المجهرية بواسطة مجهر (Microscope model : LEICA ICC 50 HD) مجهز بآلة تصوير خاصة من اجل التقاط الصور .وتمت الدراسة النسيجية تحت اشراف طبيب جامعي متخصص في علم الانسجة المرضية ،وتقني متخصص في المستشفى الجامعي لقسنطينة.

V- التحاليل الاحصائية

تم تقدير جميع التجارب بواسطة (المتوسط ± الخطأ المعياري) (means ± SD) وتم هذا التحليل بواسطة النظام SPSS Statistics 19 ، حيث تمت مقارنة النتائج باستعمال طريق واحد للتباين(One way analysis of variance (ANOVA ، متبوعة باختبار المقارنة المتعدد لTukey (Tukey-kramer multiple comparisons)

ولقد اختيرت عتبة المعنوية أقل من 95٪ أي ($p<0.05$) وتم التعبير عن مستواها كما يلي:

$P > 0.05$: أثرا غير معنوي ns

$0.05 > p$: أثرا معنوي P^{*}

$0.01 > p$: أثرا جد معنوي P^{**}

$P < 0.001$: أثرا عالي المعنوية P^{***}

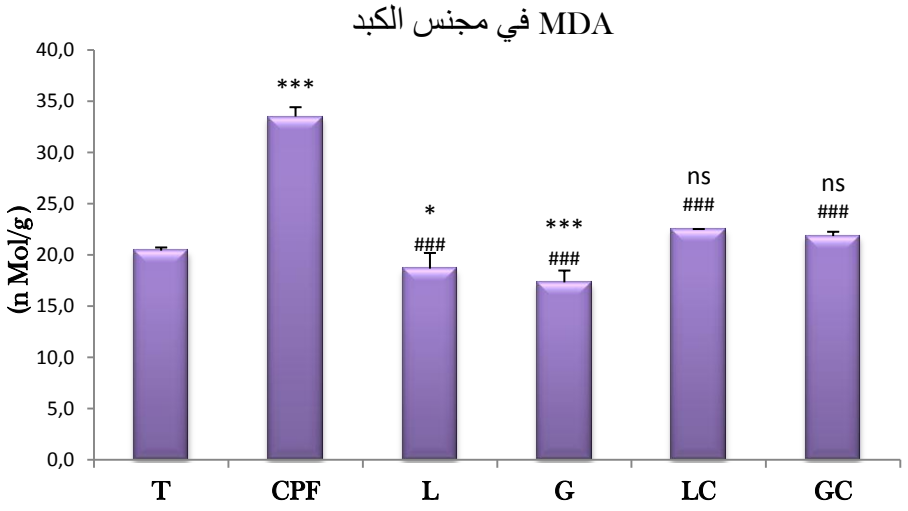
النتائج

I - قياس مؤشرات التوتر التأكسدي الناتج عن المبيد CPF وأثر النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصين النباتيين

I -1- قياس MDA في مجنس الأعضاء

I -1-1 المجنس الكبدي

يتسبب CPF في زيادة مستوى MDA النسيجية حيث نسجل ارتفاع عالي المعنوية (P<0,001) في مجموعة المبيد (33,51±0,9 نانومول/ملل) مقارنة مع مجموعة الشاهد (20,4±0,3 نانومول/ملل) ، فيما يتمكن كل من مستخلص *Limonium Pruinosum (L.)* و*Genista ulicina* في خفض قيمها ، حيث سجل انخفاض معنوي (P<0,05) وجد معنوي (P<0,01) بمعدلات (18,7±1,5 و17,3±1,2 نانومول/ملل) على التوالي بينما يعتبر هذا الانخفاض عالي المعنوية مقارنة مع مجموعة المبيد ، فيما أدت المعاملة بكل من المستخلصين+المبيد LCوGC الى انخفاض عالي المعنوية في تراكيز MDA مقارنة مع مجموعة المبيد (22,5±00 نانومول/ملل و 21,8±0,4 نانومول/ملل) على التوالي.

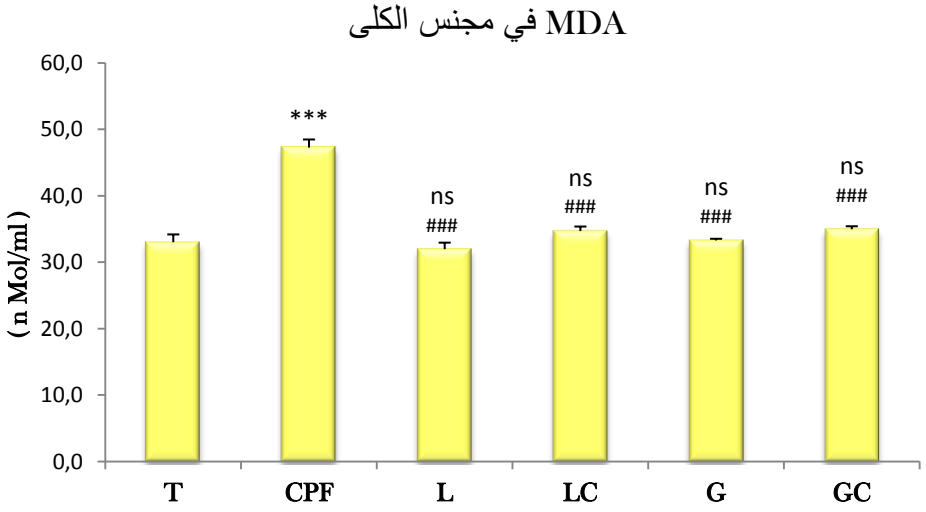


شكل 7: تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي*Limonium Pruinosum (L)* ،المستخلص النباتي (G) *Genista ulicina*على قيم MDA في المجنس الكبدي

ns : فرق غير معنوي، *: فرق معنوي بالنسبة لمجموعة الشاهد# : فرق المعنوي بالنسبة لمجموعة المبيد
^{ns}: p>0.05 , *: p<0.05 ,**: p<0.01 , ***: p<0.001

I-1-2 المجنس الكلوي

يلاحظ ارتفاع عالي المعنوية في مجموعة المبيد بمعدل(1,2±47,3 نانومول/ملل)مقارنة مع مجموعة الشاهد (1,2±33نانومول/ملل) ، فيما نسجل ثبات في قيم MDA في مجموعتي المستخلصL وG على التوالي بمعدل (1±32 نانومول /ملل) و(0,2±33,3 نانومول /ملل)، بينما نسجل انخفاض عالي المعنوية في المجموعتين الوقائيتينLC وGCعلى التوالي (0,7±34,7 نانومول /ملل)و (0,5±35 نانومول /ملل) مقارنة مع مجموعة المبيد.



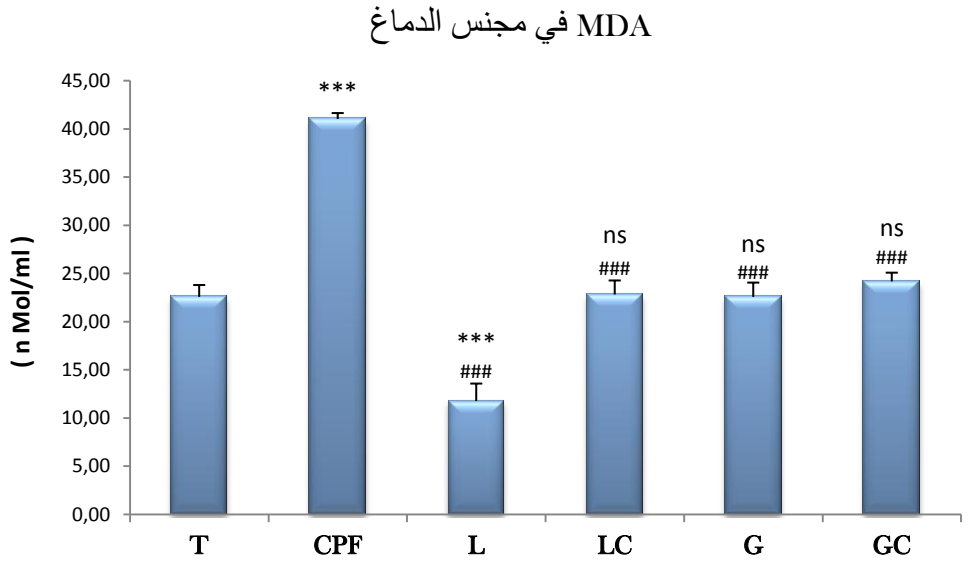
شكل 8: تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي*Limonium Pruinosum (L)* ، المستخلص النباتي (G) *Genista ulicina*على قيم MDA في المجنس الكلوي

ns : فرق غير معنوي، *: فرق معنوي بالنسبة لمجموعة الشاهد# : فرق المعنوي بالنسبة لمجموعة المبيد

$p<0.001$:*** , $p<0.01$:** ,$p<0.05$: *, $p>0.05$:^{ns}

I -1-3 المجنس الدماغي

من خلال النتائج لوحظ ارتفاعا عالي المعنوية في مجموعة المبيد (0,61±41,03 نانومول/ملل) مقارنة مع مجموعة الشاهد (1,23±22,58 نانومول/ملل)، فيما سجل انخفاضا عالي المعنوية في مجموعة المستخلص L (1,82±11,77 نانومول/ملل) ، بينما سمحت المعالجة بمستخلص G في الحفاظ على قيم MDA الطبيعية بمعدل (1,48±22,58 نانومول/ملل)، كما هو الحال بالنسبة لمجموعة LC (1,46±22,83 نانومول/ملل)، بينما سجل ارتفاعا طفيفا غير معنوي في مجموعة GC (0,91±24,18 نانومول/ملل) ، فيما تمثل هذه القيم للمجموعات الاربعة انخفاضا عالي المعنوية مقارنة مع مجموعة المبيد.



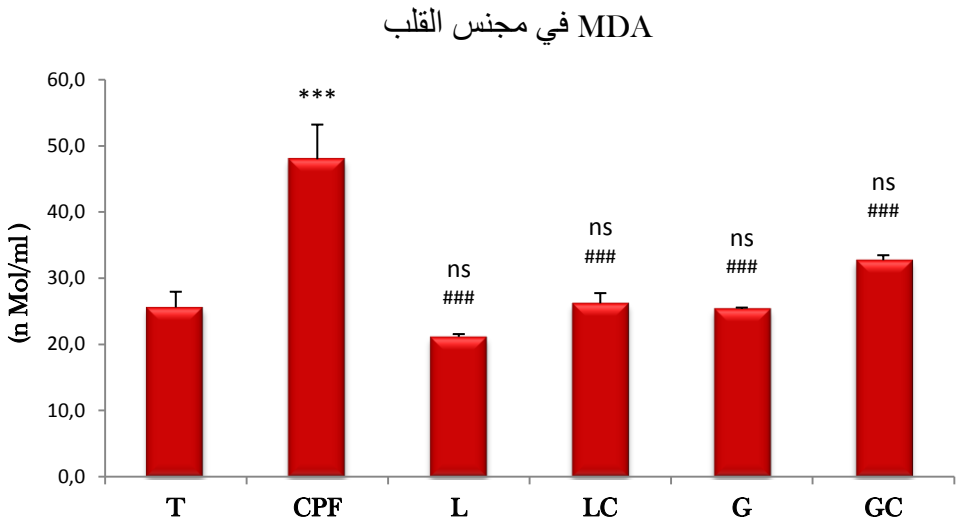
شكل 9: تأثير المعاملة بالمبيد CPF،المستخلص النباتي(*Limonium Pruinosum (L*، المستخلص النباتي (G) *Genista ulicina*على قيم MDA في مجنس الدماغ

ns : فرق غير معنوي، *: فرق معنوي بالنسبة لمجموعة الشاهد،# : فرق المعنوي بالنسبة لمجموعة المبيد

$p<0.001$:*** , $p<0.01$:** ,$p<0.05$: *, $p>0.05$:^{ns}

I -1-4 مجنس القلب

لوحظ ارتفاعا عالي المعنوية في مجموعة المبيد (48,0±5,2 نانومول/ملل) مقارنة مع مجموعة الشاهد (25,6±2,4 نانومول/ملل) ، فيما حافظت مجموعة المستخلص G على القيم الطبيعية للMDA بمعدل (25,4±0,2 نانومول/ملل) كما سجل المستخلص L انخفاضا بقيمة (21,1±0,4 نانومول/ملل)، كما لوحظ ارتفاعا طفيفا في مجموعة المستخلص +المبيد LC (26,2±1,5 نانومول/ملل) ، بينما سجلت مجموعة GC ارتفاعا اكبر(32,7±0,8 نانومول/ملل)، لكنه غير معنوي مقارنة مع مجموعة الشاهد ، في حين سجلت المجموعات الاربعة انخفاضا عالي المعنوية مقارنة مع مجموعة المبيد.



شكل 10: تأثير المعاملة بالمبيد CPF،المستخلص النباتي*Limonium Pruinosum (L)*، المستخلص النباتي (G) *Genista ulicina*على قيم MDA في مجنس القلب

ns : فرق غير معنوي، *: فرق معنوي بالنسبة لمجموعة الشاهد# : فرق المعنوي بالنسبة لمجموعة المبيد

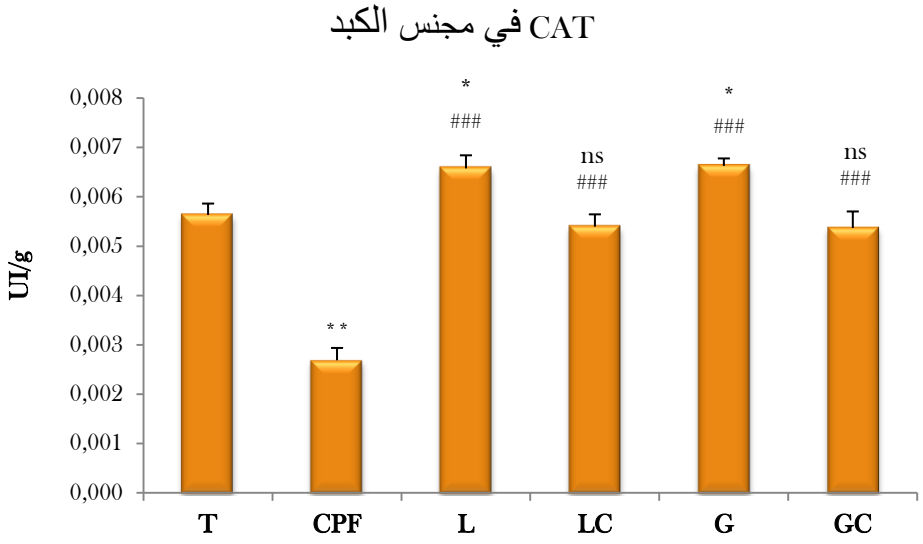
$p<0.001$:*** , $p<0.01$:** ,$p<0.05$: *, $p>0.05$:^{ns}

I -2- تأثير المعاملات المختلفة علي نشاط الانزيمات المضادة للأكسدة

I -2-1 أنزيم CAT

1 .في المجنس الكبدي

من خلال النتائج ، لوحظ انخفاضا عالي المعنوية (P<0,001) في مجموعة المبيد (UI/g0,0004±0,003) ، وبالمقابل سجل ارتفاعا معنويا (P<0,01) في مجموعتي المستخلص L (0,0003±0,007) وG (0,0002±0,007) على التوالي مقارنة مع مجموعة الشاهد (UI/g0,0003±0,006) ، فيما بقي الانخفاض المسجل في المجموعتين الوقائيتين المبيد LC وGC غير معنوي مقارنة مع مجموعة الشاهد ولكنه عالي المعنوية مقارنة مع مجموعة المبيد (UI/g 0,0003±0,005) (UI/g 0,0003±0,005).



شكل 11: تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي(*Limonium Pruinosum (L*، المستخلص النباتي (G) *Genista ulicina*على نشاط انزيم CAT في المجنس الكبدي

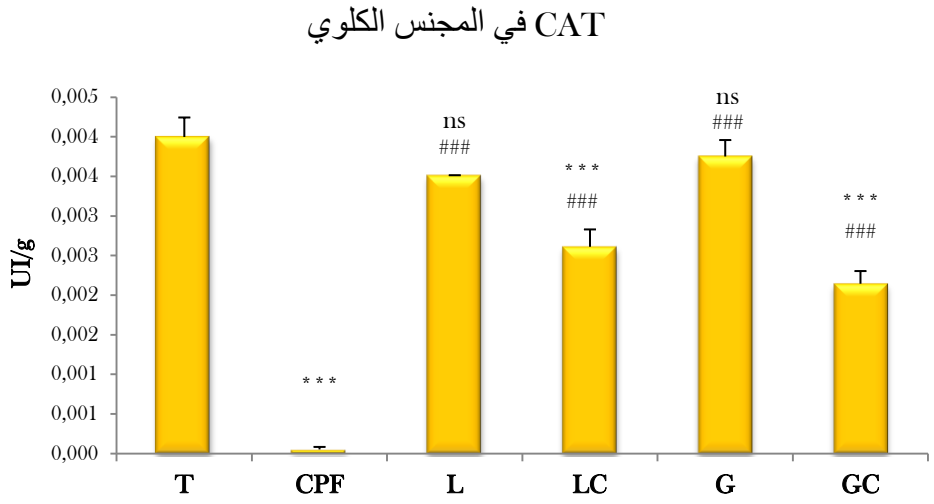
ns : فرق غير معنوي، *: فرق معنوي بالنسبة لمجموعة الشاهد# : فرق المعنوي بالنسبة لمجموعة المبيد

$p<0.001$:*** , $p<0.01$:** ,$p<0.05$: *, $p>0.05$:^{ns}

2.في المجنس الكلوي

مقارنة مع مجموعة الشاهد (UI/g 0,0002±0,004) لوحظ انخفاضا حادا عالي المعنوية (P<0,001) في مجموعة المبيد (UI/g (0,0000±0,0001 ، فيما سجل ثبات في هذه القيم في مجموعتي المستخلص L و G (0,0001±0,004)(UI/g0,0002±0,004) على التوالي.

وبالمقابل عجزت مجموعتي المستخلص+المبيد LC وGC عن تعديل قيم CAT الكلوي حيث سجل انخفاضا عالى المعنوية (UI/g 0,0002±0,003) (UI/g 0,0002±0,002) مقارنة مع مجموعة الشاهد فيما بقيت هذه القيم عالية المعنوية مقارنة مع مجموعة المبيد في المجموعات الاربعة (جاءت هذه النتائج مماثلة لنتائج للنسيج القلبي).



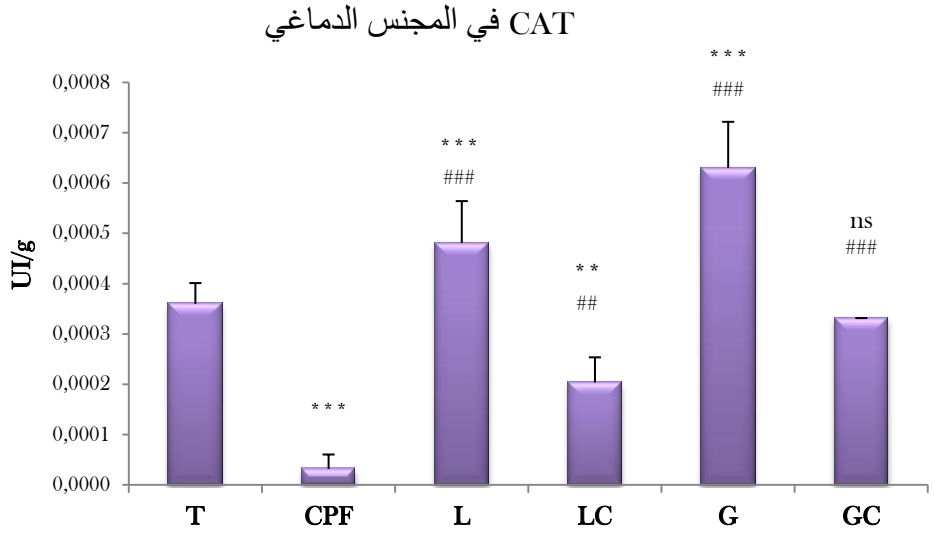
شكل12 : تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي(*Limonium Pruinosum (L*، المستخلص النباتي (G) *Genista ulicina*على نشاط انزيم CAT في النسيج الكلوي

ns : فرق غير معنوي، *: فرق معنوي بالنسبة لمجموعة الشاهد# : فرق المعنوي بالنسبة لمجموعة المبيد

$p<0.001$:*** , $p<0.01$:** ,$p<0.05$: *, $p>0.05$:^{ns}

3 .في المجنس الدماغي

مقارنة مع مجموعة الشاهد(0,0004±0,0000 UI/g) لوحظ انخفاضا حادا عالي المعنوية (P<0,001) في مجموعة المبيد (0,0000±0,0000 UI/g) وبالمقابل سجل ارتفاعا في مجموعتي المستخلص L وG (0,0001±0,0005) (0,0001±0,0006UI/g) على التوالي ورغم انه غير معنوي مقارنة مع مجموعة الشاهد إلا انه يعد ارتفاعا معنويا مقارنة مع مجموعة المبيد ، اما الانخفاض المسجل في مجموعتي المستخلص+المبيد LC وGC (0,0003±0,0000UI/g) (0,0002±0,0001UI/g) فهو جد معنوي في المجموعة الاولى وغير معنوي في المجموعة الثانية مقارنة مع مجموعة الشاهد و عالية المعنوية مقارنة مع مجموعة المبيد.



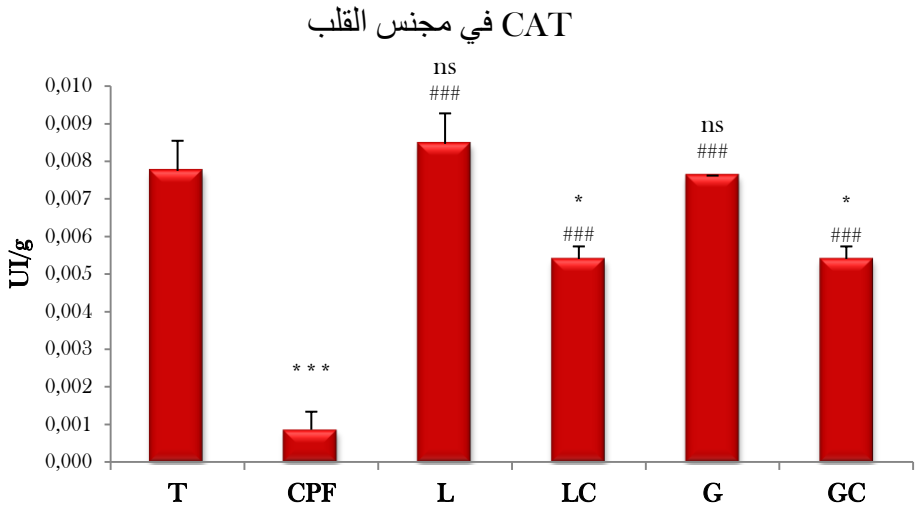
شكل 13 : تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي(*Limonium Pruinosum (L*، المستخلص النباتي (G) *Genista ulicina*على نشاط انزيم CAT في نسيج الدماغ

ns : فرق غير معنوي، *: فرق معنوي بالنسبة لمجموعة الشاهد# : فرق المعنوي بالنسبة لمجموعة المبيد

$p<0.001$:*** , $p<0.01$:** ,$p<0.05$: *, $p>0.05$:ns

4 .في مجنس القلب

لـوحظ انخفاضـا حـادا عـالي المعنويـة ($P<0,001$) فـي مجموعـة المبيـد(0,000±0,001 UI/g) مقارنـة مـع مجموعـة الشـاهد(0,008±0,001 UI/g) فيمـا سـجل ثبـات فـي هـذه القـيم فـي مجمـوعتي المسـتخلص L وG (0,008±0,001 UI/g)(0,008±0,000 UI/g) علـى التـوالي وبالمقابـل عجـزت مجمـوعتي المسـتخلص+المبيـد LC وGC عـن تعـديل قـيم CATالكلـوي حيـث سـجل انخفاضـا عـالي المعنويـة (0,005±0,000 UI/g)(0,005±0,000) مقارنـة مـع مجموعـة الشـاهد ، فيما بقيت هذه القيم عالية المعنوية مقارنة مع مجموعة المبيد في المجموعات الاربعة.



شكل 14 : تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي(*Limonium Pruinosum (L*،المستخلص النباتي (G) *Genista ulicina*على نشاط انزيم CAT في نسيج القلب

ns : فرق غير معنوي، *: فرق معنوي بالنسبة لمجموعة الشاهد#: فرق المعنوي بالنسبة لمجموعة المبيد

$p<0.001$:*** , $p<0.01$:** ,$p<0.05$: *, $p>0.05$:[ns]

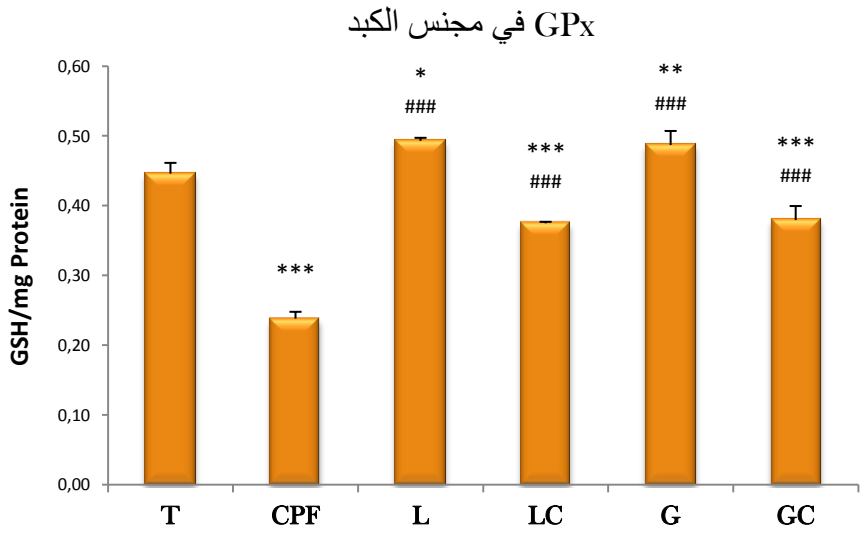
I -2-2 أنزيم GPx

1. في المجنس الكبدي

من خلال النتائج ، لوحظ انخفاضا عالي المعنوية (P<0,001) في نشاط GPx في مجموعة المبيد بمعدل (GSHmg/Protein 0,01±0,24)مقارنة مع مجموعة الشاهد (GSHmg/Protein 0,02±0,45) وعلى العكس من ذلك نسجل ارتفاع معنوي في مجموعتي المستخلصG وL (0,02±0,49و0,001±0,49 GSHmg/Protein) على التوالي ،فيما تعجز المجموعتين الوقائيتين LC وGC عن تعديل تراكيز GPx ،مقارنة مع مجموعة الشاهد بما يعادل (0,02±0,38; 0,001±0,37 GSH mg/Protein)،ورغم ذلك تعتبر هذه التغيرات في المجاميع الاربعة عالية المعنوية بالنسبة لمجموعة المبيد.

2. في المجنس الكلوي

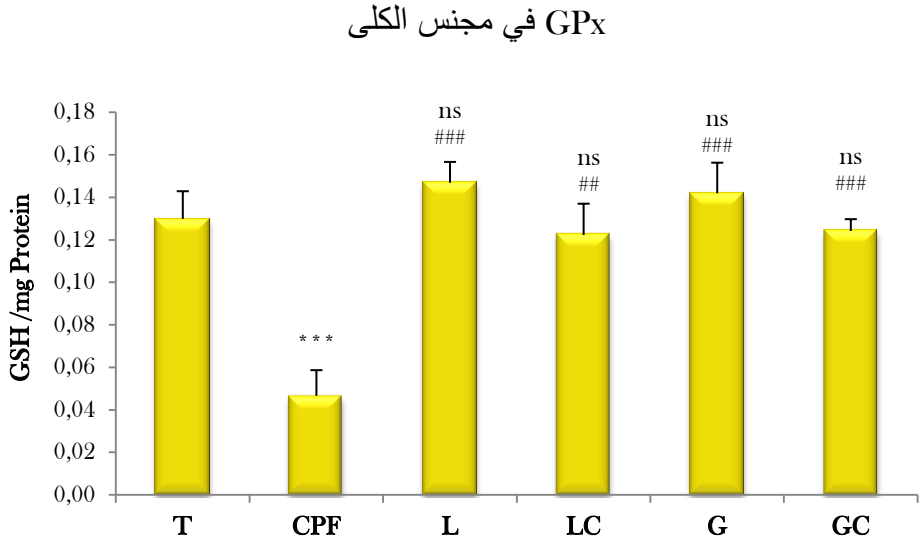
مقارنة مع مجموعة الشاهد (GSH/mgProtein 0,01±0,13) لوحظ انخفاضا عالي المعنوية في مجموعة المبيد (GSHmg/Protein 0,01±0,05)، يقابله ارتفاعا في مجموعتي المستخلص L و G (0,01±0,15و0,01±0,14GSH/mgProtein) بينما سجل انخفاضا لكنه غير معنوي في مجموعتي المستخلص +المبيد LC و GC بمعدل (GSH/mgProtein0,01±0,12)ورغم ذلك بقيت تلك التغيرات معنوية بالنسبة لمجموعة المبيد، كما هو مبين في الشكل 16.



شكل 15 : تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي*Limonium Pruinosum (L)* ،المستخلص النباتي (G) *Genista ulicina*على نشاط انزيم GPx في النسيج الكبدي

ns : فرق غير معنوي، *: فرق معنوي بالنسبة لمجموعة الشاهد# : فرق المعنوي بالنسبة لمجموعة المبيد

$p<0.001$:*** , $p<0.01$:** ,$p<0.05$: *, $p>0.05$:ns



شكل 16 : تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي*Limonium Pruinosum (L)* ،المستخلص النباتي (G)*Genista ulicina* على نشاط انزيم GPx في النسيج الكلوي

ns : فرق غير معنوي، *: فرق معنوي بالنسبة لمجموعة الشاهد# : فرق المعنوي بالنسبة لمجموعة المبيد

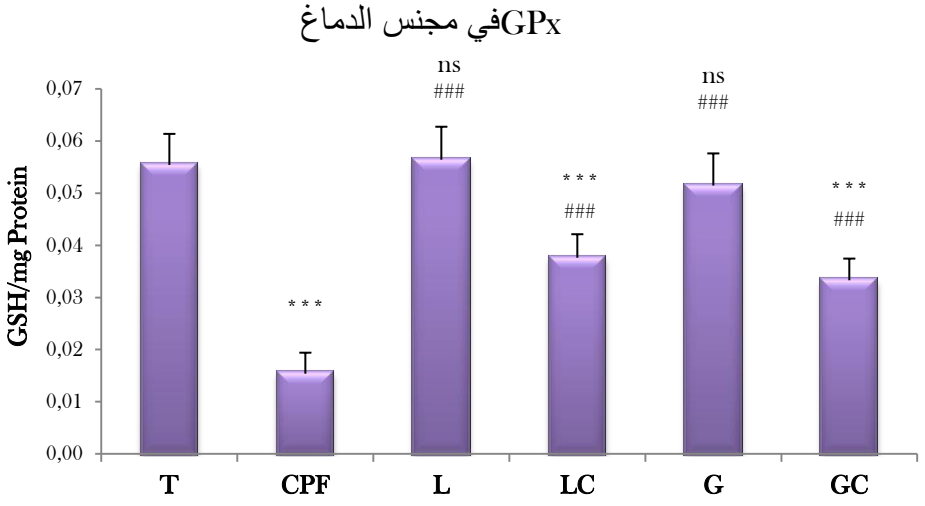
$p<0.001$:*** , $p<0.01$:** ,$p<0.05$: *, $p>0.05$:ns

3.في مجنس الدماغ

لـــوحظ انخفاضـــا عـــالي المعنويـــة فـــي مجموعـــة المبيـــد (GSH/mgProtein 0,02±0,004) مقارنـــة مـــع مجموعـــة الشـــاهد (GSH/mgProtein 0,006±0,06) ، يقابلـــه ارتفاعـــا فـــي مجمـــوعتي المســـتخلص L وG (GSH/mgProtein 0,006±0,06و0,006±0,05) بينمـــا ســـجل انخفاضـــا لكنـــه غيـــر معنـــوي فـــي مجمـــوعتي المســـتخلص +المبيـــد LC و GC علـــى التـــوالي (0,004±0,03 وGSH/mgProtein0,005±0,04) ورغـــم ذلـــك بقيـــت هـــذه التغيـــرات معنويـــة بالنســـبة لمجموعـــة المبيد ، كما هو مبين في الشكل 17 .

4 .في مجنس القلب

مقارنـــة مـــع مجموعـــة الشـــاهد (GSH/mgProtein 0,002±0,042) لـــوحظ انخفاضـــا عـــالي المعنويـــة فـــي مجموعـــة المبيـــد (GSH/mgProtein 0,003±0,017)، بينمـــا ســـجل انخفاضـــا فـــي قيم GPx فـي مجموعـة المستخلص L (GSH/mgProtein 0,006±0,037) قابلـه ارتفاعـا فـي المســتخلص الثــاني بمعــدل(0,004±0,045) فــي حــين ســجل انخفاضــا لكنــه غيــر معنــوي فــي مجمـــــوعتي المســـــتخلص +المبيـــــد GC و LC علـــــى التـــــوالي(0,002±0,029) (GSH/mgProtein0,0001±0,031) غيـــر أن تلـــك التغيـــرات بقيـــت معنويـــة بالنســـبة لمجموعـــة المبيد، كما هو مبين في الشكل 18.

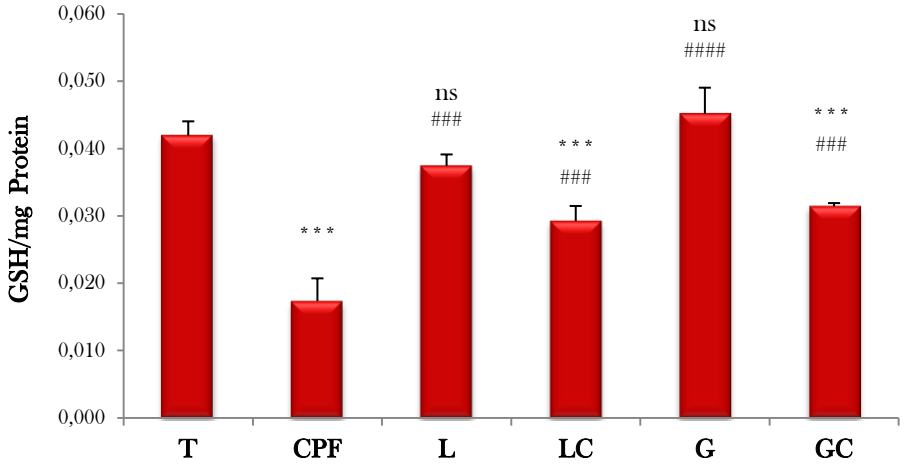


شكل17: تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي*Limonium Pruinosum (L)*، المستخلص النباتي (G) *Genista ulicina*على نشاط انزيم GPx في نسيج الدماغ

ns : فرق غير معنوي، *: فرق معنوي بالنسبة لمجموعة الشاهد# : فرق المعنوي بالنسبة لمجموعة المبيد

$p<0.001$:*** , $p<0.01$:** ,$p<0.05$: *, $p>0.05$:ns

GPx في مجنس القلب



شكل 18: تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي*Limonium Pruinosum (L)* ،المستخلص النباتي (G) *Genista ulicina*على نشاط انزيم GPx في النسيج القلبي

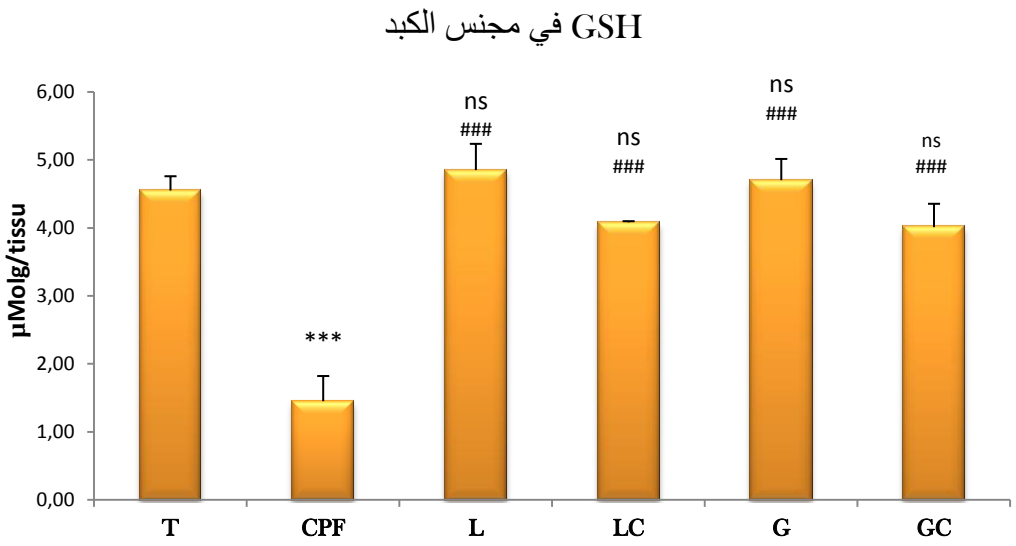
ns : فرق غير معنوي، *: فرق معنوي بالنسبة لمجموعة الشاهد# : فرق المعنوي بالنسبة لمجموعة المبيد

$p<0.001$:*** , $p<0.01$:** ,$p<0.05$: *, $p>0.05$:^{ns}

I -3-2- تركيز GSH

1. في المجنس الكبدي

نلاحظ انخفاض عالي المعنوية في تركيز GSH (P<0,001) في مجموعة المبيد (µMolGSH/gWeighttissu0,37±1,45) مقارنة مع مجموعة الشاهد (0,21±4,55) بالمقابل تؤدي المعالجة بالمستخلصين النباتيين L وG على التوالي الى زيادة تركيزه بمعدل(0,39±4,85)و(0,31±4,70) ،اما بالنسبة الى المجموعتين الوقائيتين فنسجل انخفاضا طفيفا بمعدل (0,02±4,08و0,34±4,01µMolGSH/g Weight tissu)في المجموعتين LC و GC على التوالي ،ورغم ان هذه التغيرات غير معنوية بالنسبة لمجموعة الشاهد إلا انها عالية المعنوية بالنسبة لمجموعة المبيد في المجاميع الاربعة (P<0,001).



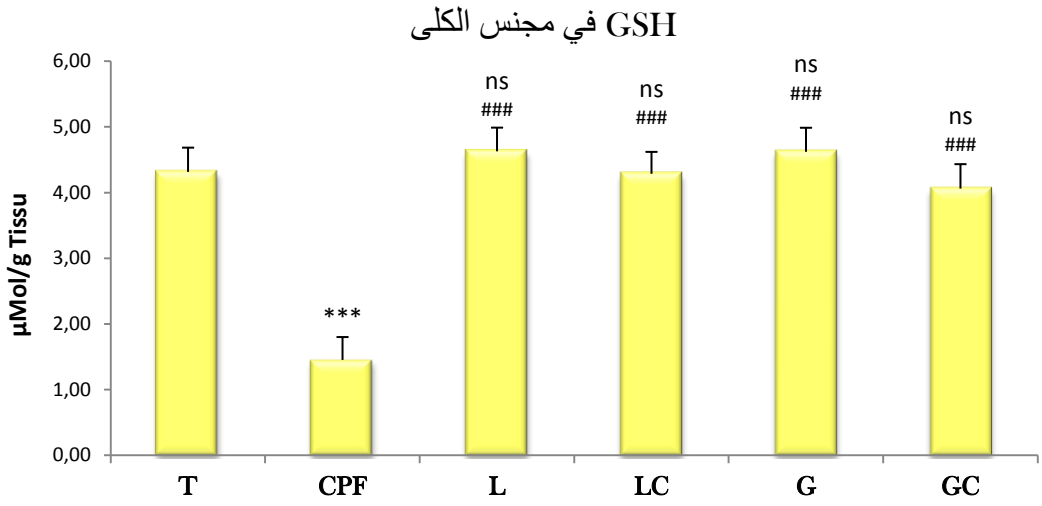
شكل 19: تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي*Limonium Pruinosum (L)*، المستخلص النباتي (G) *Genista ulicina*على قيم GSH في النسيج الكبدي

ns : فرق غير معنوي، *: فرق معنوي بالنسبة لمجموعة الشاهد# : فرق المعنوي بالنسبة لمجموعة المبيد

$p<0.001$:*** , $p<0.01$:** ,$p<0.05$: *, $p>0.05$:^{ns}

2. في مجنس الكلي

مقارنة مع مجموعة الشاهد (µMol/g Weight tissu 0,37±4,32) لوحظ انخفاضا عالي المعنوية (P<0,001) في تركيز GSH في مجموعة المبيد (0,35±1,45)، بالمقابل أدت المعاملة بالمستخلصين النباتيين L وG على التوالي الى زيادة تركيزه بمعدل (0,36±4,63) و(0,37±4,62) ، اما بالنسبة الى مجموعتي مستخلص +مبيد فسجل انخفاضا طفيفا بمعدل (0,33±4,29 و0,37±4,06 µMolGSH/gWeighttissu) لكل من LC وGC على التوالي ، ورغم ان هذه التغيرات غير معنوية بالنسبة لمجموعة الشاهد إلا انها عالية المعنوية بالنسبة لمجموعة المبيد في المجاميع الاربعة (P<0,001).



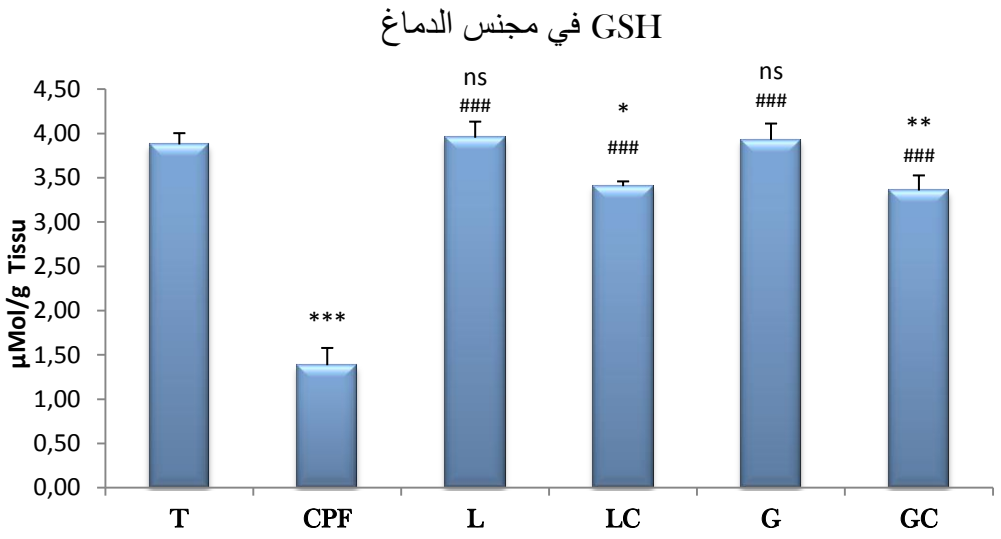
شكل 20: تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي(*Limonium Pruinosum (L*، المستخلص النباتي (G) *Genista ulicina*على قيم GSH في النسيج الكلوي

ns : فرق غير معنوي، *: فرق معنوي بالنسبة لمجموعة الشاهد# : فرق المعنوي بالنسبة لمجموعة المبيد

$p<0.001$:*** , $p<0.01$:** ,$p<0.05$: *, $p>0.05$:^{ns}

3. في مجنس الدماغ

مقارنة مع مجموعة الشاهد (µMol/g Weight tissu 0,13±3,88) وجد انخفاضا عالي المعنوية (P<0,001) في تركيزGSH في مجموعة المبيد (0,19±1,38) ، بينما أدت المعاملة بالمستخلصين النباتيين L وG على التوالي الى زيادة تركيزه بمعدل (0,18±3,95) و (µMol/g Weight tissu 0,18±3,93) ورغم انها غير معنوية بالنسبة لمجموعة الشاهد إلا انها تمثل تغيرا عالي المعنوية بالنسبة لمجموعة المبيد، اما بالنسبة الى مجموعتي مستخلص +مبيد LC و GC فسجل انخفاضا معنوي(P<0,05) وجد معنوي(P<0,001) على التوالي مقارنة بمجموعة الشاهد و بمعدل (0,05±3,41) و(0,17±3,36 µMolGSH/gWeighttissu) فيما بقيت هذه التغيرات عالية المعنوية بالنسبة لمجموعة المبيد (P<0,001).



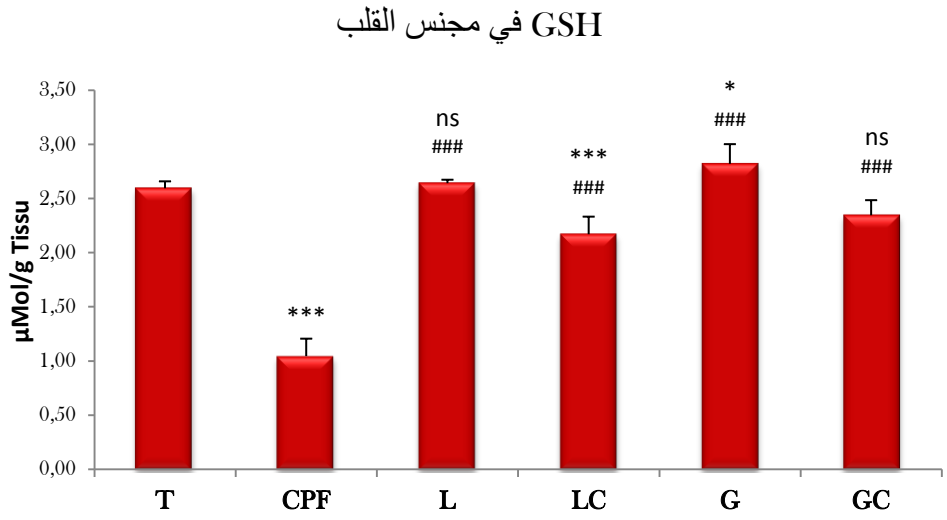
شكل21 : تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي(*Limonium Pruinosum (L*، المستخلص النباتي (G) *Genista ulicina*على قيم GSH في نسيج الدماغ

ns : فرق غير معنوي، *: فرق معنوي بالنسبة لمجموعة الشاهد# : فرق المعنوي بالنسبة لمجموعة المبيد

^{ns}: p>0.05 , p<0.05 : *, p<0.01:** , p<0.001:***

4 .في مجنس القلب

مقارنة مع مجموعة الشاهد (µMol/g Weight tissu 0,06±2,60)لوحظ انخفاضا عالي المعنوية (P<0,001) في تركيزGSH في مجموعة المبيد(µMol/g Weight tissu 0,06±1,05) ، بينما أدت المعاملة بالمستخلصين النباتيين L وG الى زيادة غير معنوية في المستخلص الاول بينما معنوية في الثاني بمعدل (µMol/g Weight tissu 0,03±2,64 و 0,18±2,82)على التوالي .فيما سجل انخفاضا عالي المعنوية (0,16±2,17) في مجموعة LC ، قابله انخفاضا غير معنوي في مجموعة GC (µMol/gWeight tissu 0,14±2,35) مقارنة بمجموعة الشاهد ، فيما بقيت هذه التغيرات في المجاميع الاربعة عالية المعنوية مقارنة بمجموعة المبيد (P<0,001).



شكل 22: تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي(*Limonium Pruinosum (L*، المستخلص النباتي (G) *Genista ulicina*على قيم GSH في نسيج القلب

ns : فرق غير معنوي، *: فرق معنوي بالنسبة لمجموعة الشاهد# : فرق المعنوي بالنسبة لمجموعة المبيد

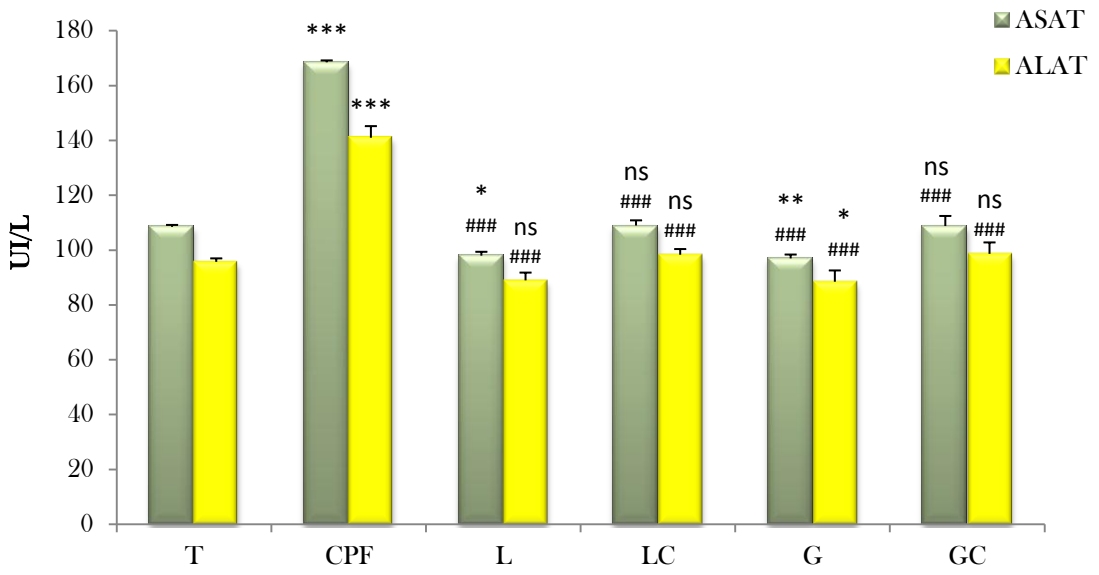
$p<0.001$:*** , $p<0.01$:** ,$p<0.05$: *, $p>0.05$:^{ns}

I -3 المعايرة البيوكميائية

I -3-1 معايرة الانزيمات المصلية ASAT ALAT,

كما هو مبين في الشكل 23 سجل ارتفاعا عالي المعنوية في قيم ALAT المصلي في مجموعة المبيد (UI/L4,24±141) مقارنة مع مجموعة الشاهد (UI/L1,26±95,75) وبالمقابل سجل تراجع في هذه القيم في مجموعتي المستخلص L وG ورغم انه غير معنوي في المجموعة الاولى(UI/L2,83±89) الى ان المستخلص الثاني تمكن من التأثير معنويا في قيم هذا الانزيم (UI/L4,11±88,5) ،اما بالنسبة للتغيرات المسجلة في مجموعتي المستخلص +المبيد LC وGC(2,08±98,33و UI/L4,16 ±98,67) على التوالي فهي غير معنوية مقارنة مع مجموعة الشاهد لكنها عالية المعنوية مقارنة مع مجموعة المبيد.

أيضا ومقارنة مع مجموعة الشاهد (UI/L 0,71±108,5) سجل ارتفاعا عالي المعنوية في قيم ASAT المصلي في مجموعة المبيد (UI/L 0,71±168,5) وبالمقابل سجل تراجع في هذه القيم في مجموعتي المستخلص L وG تراجعا معنويا وجد معنوي على التوالي (1,41±98و1,41±97UI/L) ، اما بالنسبة للتغيرات المسجلة في مجموعتي المستخلص +المبيد LC وGC(1,89±109و UI/L3,68 ±108,8) على التوالي فهي غير معنوية مقارنة مع مجموعة الشاهد لكنها عالية المعنوية مقارنة مع مجموعة المبيد في المجاميع الأربعة .



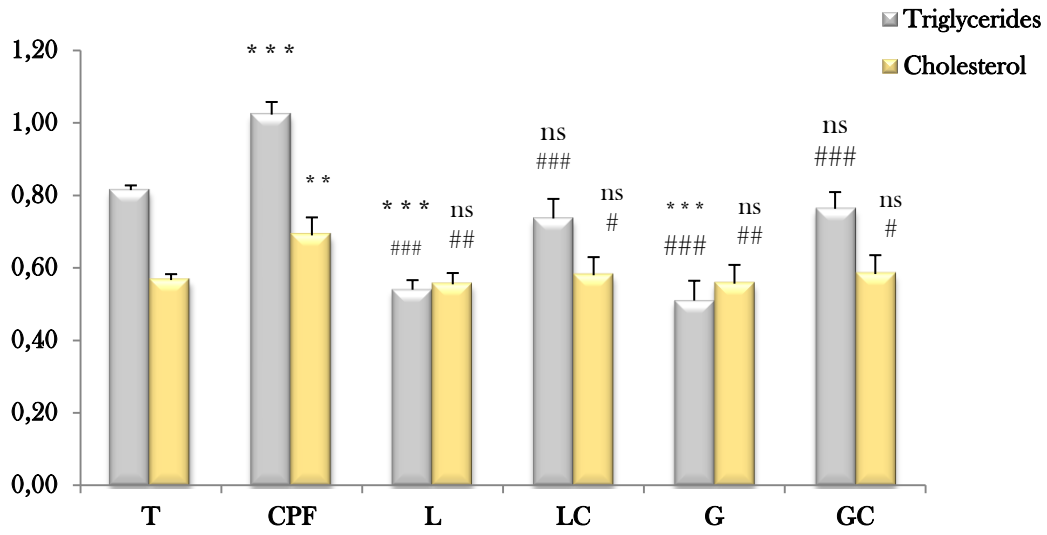
شكل 23 : تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي(*Limonium Pruinosum (L*، المستخلص النباتي *Genista ulicina* (G)على قيم ASAT ALAT,

ns : فرق غير معنوي، *: فرق معنوي بالنسبة لمجموعة الشاهد# : فرق المعنوي بالنسبة لمجموعة المبيد

$p<0.001$:*** , $p<0.01$:** ,$p<0.05$: *, $p>0.05$:^{ns}

I- 2-3 الجلسريدات الثلاثية و الكولسترول Triglycerides and Cholesterol

تسبب المعالجة بCPF زيادة عالية المعنوية و جد معنوية (g/L0,03±1,02) (g/L0,05±0,69) في تركيز الجلسريدات الثلاثية و الكولسترول على التوالي في مجموعة المبيد ،مقارنة مع مجموعة الشاهد ،فيما تسمح المعالجة بالمستخلصين النباتيين بخفض قيم الجلسريدات الثلاثية و الكولسترول في بقية المجاميع مقارنة مع مجموعة المبيد كما هو مبين في الشكل (24)



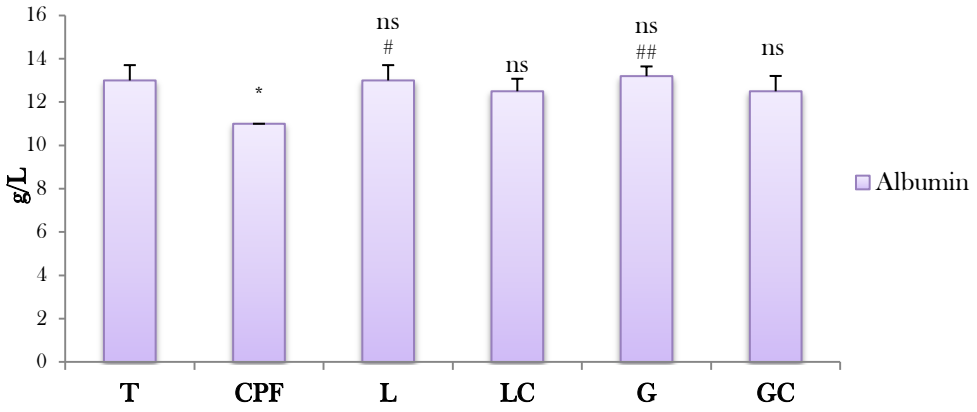
شكل 24 : تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي*Limonium Pruinosum (L)* ،المستخلص النباتي *Genista ulicina* (G)على تركيز Triglycerides و Cholesterol

ns : فرق غير معنوي، *: فرق معنوي بالنسبة لمجموعة الشاهد# : فرق المعنوي بالنسبة لمجموعة المبيد

$p<0.001$:*** , $p<0.01$:** ,$p<0.05$: *, $p>0.05$:^{ns}

I- 4-3 الالبومين Albumin

مقارنة مع مجموعة الشاهد (13±0,7 g/L) سجل انخفاضا معنويا في مجموعة المبيد (11±0,0 g/L) وفيما حافظت مجموعة المستخلصL على القيم الطبيعية للألبومين (13±0,7 g/L) سجل ارتفاعا طفيفا وغير معنوي (13,2±0,4 g/L) في مجموعة المستخلصG لكنه معنويا مقارنة مع مجموعة المبيد ، اما مجموعتي المستخلص+المبيد LC وGC فسجل انخفاضا(12,5±0,6 و 12,5±0,7 g/L) لكنه غير معنوي مقارنة مع مجموعة الشاهد.



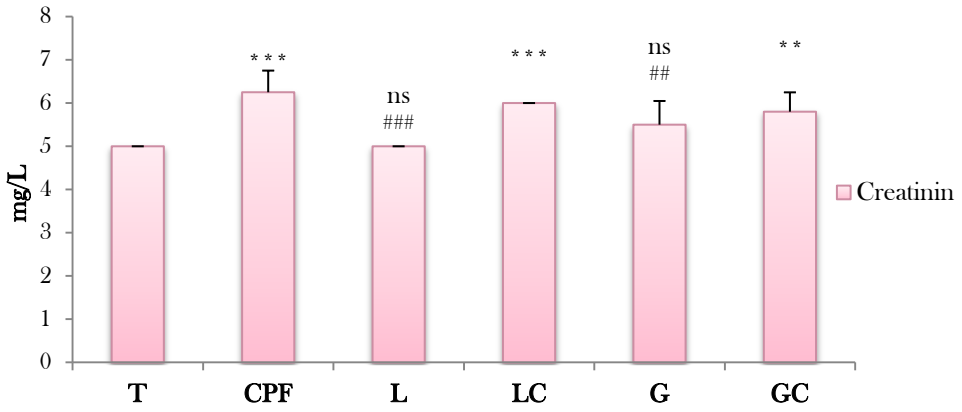
شكل 25: تأثير المعاملة بالمبيد CPF ،المستخلص النباتي*Limonium Pruinosum (L)*، المستخلص النباتي *Genista ulicina* (G)على تركيز Albumin

ns : فرق غير معنوي، *: فرق معنوي بالنسبة لمجموعة الشاهد# : فرق المعنوي بالنسبة لمجموعة المبيد

$p<0.001$:*** , $p<0.01$:** ,$p<0.05$: *, $p>0.05$:^{ns}

I- 5-3 الكرياتنين Creatinin

سجل ارتفاعا عالي المعنوية في مجموعة المبيد (g/L0,5±6,25) مقارنة مع مجموعة الشاهد (g/L0±5) ، فيما حافظت مجموعة المستخلص L على القيم الطبيعية للألبومين (g/L0±5) غير أنه سجل ارتفاعا طفيفا وغير معنوي (g/L0,5±5,5) في مجموعة المستخلص G لكنه جد معنوية مقارنة مع مجموعة المبيد ، فيما عجزت مجموعتي المستخلص+المبيد LC و GC في تعديل قيمه حيث سجل ارتفاعا عالي المعنوية ومعنوي على التوالي (6±0 و g/L 0,4±5,8) مقارنة مع مجموعة الشاهد.



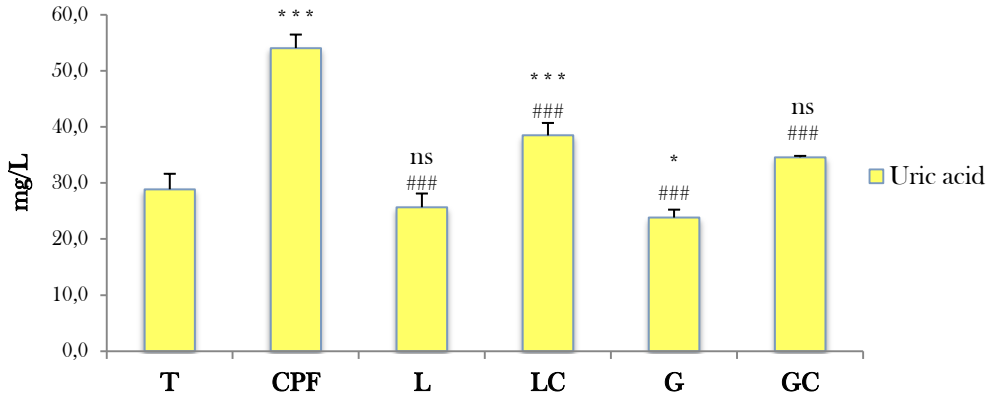
شكل 26 : تأثير المعاملة بالمبيد CPF (C) ،المستخلص النباتي*Limonium Pruinosum (L)* ،المستخلص النباتي *Genista ulicina* (G)على تركيز Creatinin

ns : فرق غير معنوي، *: فرق معنوي بالنسبة لمجموعة الشاهد# : فرق المعنوي بالنسبة لمجموعة المبيد

$p<0.001$:*** , $p<0.01$:** ,$p<0.05$: *, $p>0.05$:^{ns}

I- 6-3 معايرة Uric acid

سجلنا ارتفاعا عاليا المعنوية في مجموعة المبيد(mg/L2,4±54,1) مقارنة مع مجموعة الشاهد (mg/L2,8±28,9) وبالمقابل سجل انخفاض وبالرغم من انه غير معنوي في مجموعة المستخلص L (2,5±25,7) إلا انه معنوي في مجموعتي المستخلص G (1,4±23,8 mg/L)وبقي هذا الانخفاض معنوي في المجموعتين مقارنة مع مجموعة المبيد، فيما سجل انخفاضا في مجموعتي المستخلص +المبيد LC وGC مقارنة مع مجموعة المبيد(mg/L2,2±38,5) (mg/L0,2±34,6) على التوالي.



شكل 27: تأثير المعاملة بالمبيد CPF (C) ،المستخلص النباتي*Limonium Pruinosum (L)* ،المستخلص النباتي *Genista ulicina* (G)على تركيز Uric acid

ns : فرق غير معنوي، *: فرق معنوي بالنسبة لمجموعة الشاهد# : فرق المعنوي بالنسبة لمجموعة المبيد

$p<0.001$:*** , $p<0.01$:** ,$p<0.05$: *, $p>0.05$:^{ns}

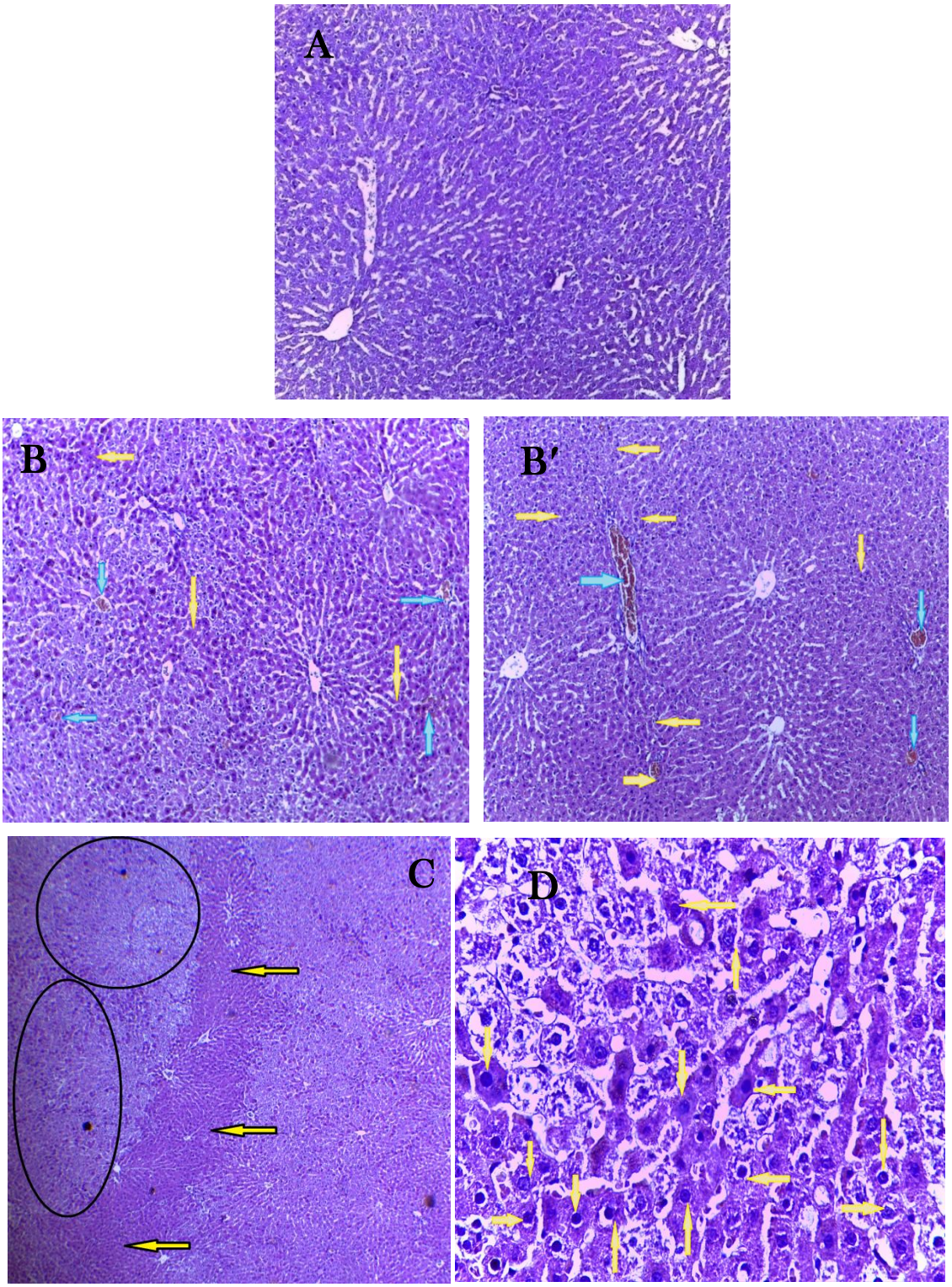
II- الدراسة النسيجية

II-1 على مستوى الكبد

يظهر المقطع A (شكل 28) نسيج برانشيمي سليم لجرذان شواهد محافظ على البنية العامة للكبد التي تتميز باصطفاف خلاياها على شكل صفائح تكون مفصولة بواسطة فراغات تدعى الجيوب الدموية (Sinusoids) ، تتجمع هذه الاخيرة لتكون الوريد المركزي الفصيصي (Centrilobular Vein) ، وتبدو الخلايا الكبدية كبيرة الحجم واضحة الأنوية تحتوى على سيتوبلازم كثيف ذو مظهر حببي ، وهي نفس البنية الملاحظة في المقاطع الخاصة بالجرذان المعاملة بالمستخلصين النباتيين *Limonium Pruinosum(L.)* و*Genista ulicina* بجرعة تقدر ب 150ملغ/كلغ عموما ، كما موضح في المقطع D وE (شكل 29).

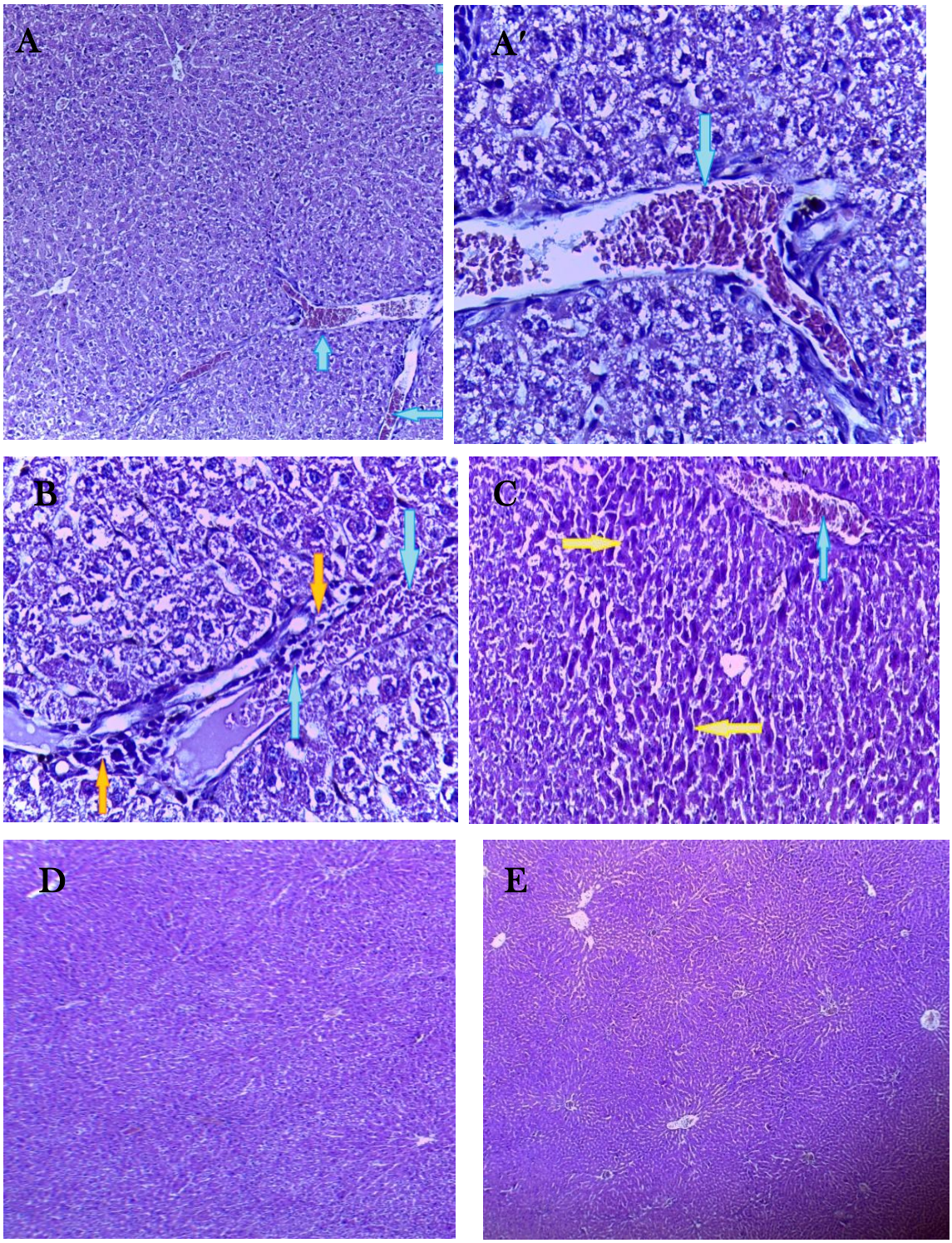
أدت معاملة الجرذان بواسطة جرعة تقدر ب10 ملغ/كلغ من المبيد CPF الى احداث تغيرات مورفولوجية على مستوى الكبد، تتمثل في الاحتقان الوعائي الحاد (Congestion)، موت موضعي (Necrosis) في النسيج البرانشيمي ، كان مرافقا في بعض الحالات بما يعرف بزيادة شفافية الخلايا (كما هو مبين في المقطع (C)(الشكل 28)، او قلة تصبغها ، كما سجلت زيادة في حجم الأنوية وزيادة تصبغها Hyperchromatic nuclei ، كما سجلت بعض حالات الاستسقاء Oedema ،كما هو مبين في (الشكل 28) .

بينما سمحت المعاملة المسبقة بالمستخلصين النباتيين *Limonium Pruinosum (L.)* و*Genista ulicina* بجرعة تقدر ب 150 ملغ/كلغ تليها نفس الجرعة سابقة الذكر من المبيد ، بتخفيف مظاهر الضرر النسيجي السابقة ، كالتخفيف من حدة الاحتقان الوعائي ، الموت الموضعي وكذا اختفاء مؤشرات الضرر الكبدي ، فيما تم تسجيل حالات تسلل التهابي infiltration of inflammatory cellls في بعض النماذج المعالجة بالمستخلص *Limonium Pruinosum (L.)*.



شكل 28: مقاطع انسجة كبد جرذان معاملة بالمبيد CPF

(A) برانشيم كبدي سليم مجموعة الشاهد (X10)، **(B)** مجموعة المبيد (X10) : موت موضعي في مواضع متفرقة سهم اصفر و احتقان وعائي سهم ازرق ، **(B′)** مجموعة المبيد (10×) احتقان وعائي سهم ازرق وموت موضعي سهم اصفر، **(C)** (X10) بؤرة موت موضعي سهم اصفر وزيادة شفافية الخلايا (clairification) دوائر بالاسود ، **(D)** (X40) موت موضعي سهم اصفر مع زيادة حجم الانوية.

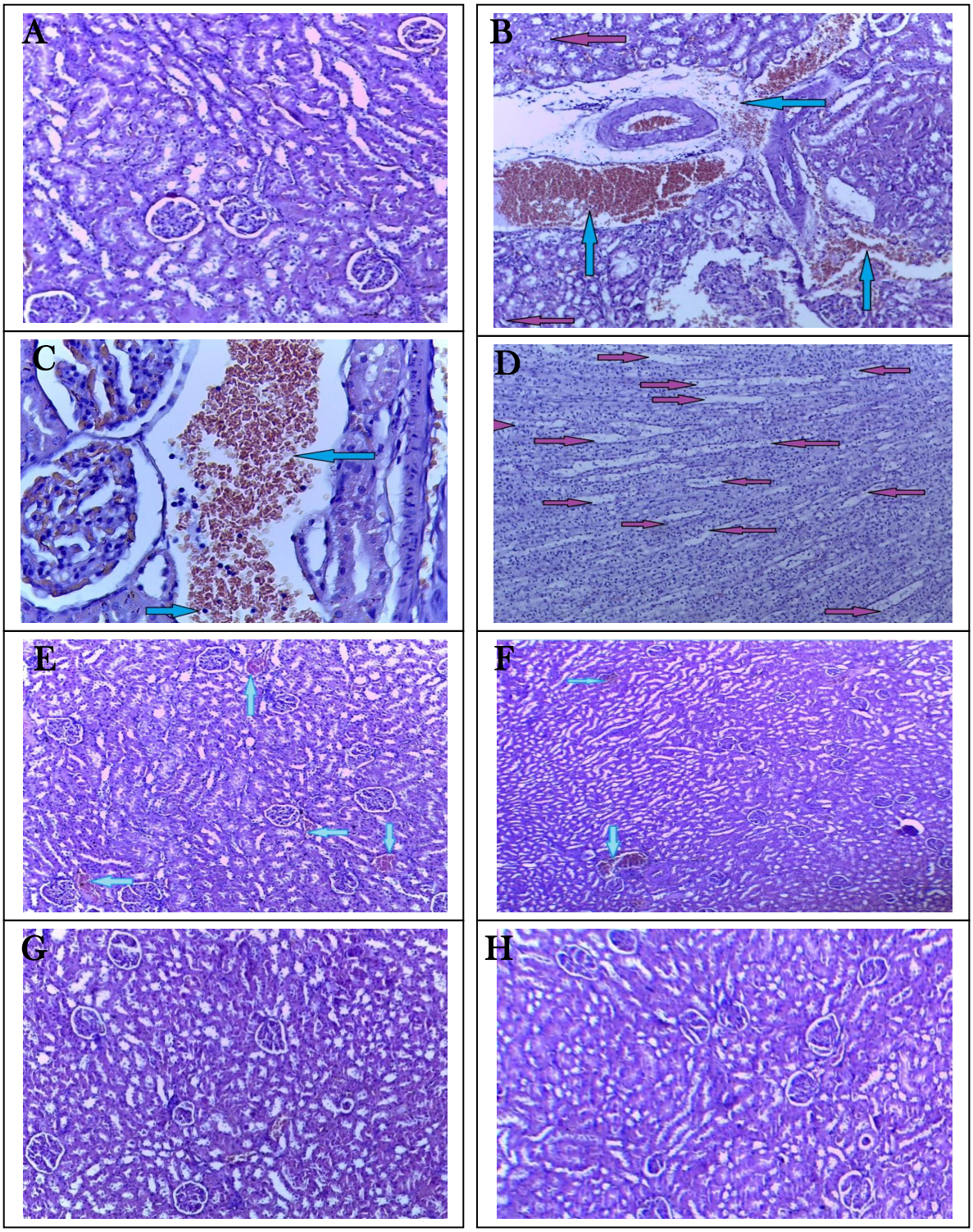


شكل 29: مقاطع انسجة كبدية تبين تأثير المعالجة المسبقة بالمستخلصين النباتين مع وبدون جرعة المبيد CPF على سلامة الكبد: (A) مجموعة (LC) (X10) احتقان وعائي وتوزع اقل للموت الموضعي وعدم وجود مؤشرات الضرر الكبدي ،**(A′)** مجموعة (LC) (X40) احتقان وعائي وتوزع اقل للموت الموضعي وعدم وجود مؤشرات الضرر الكبدي ،**(B)** مجموعة (LC) (X40) احتقان وعائي سهم ازرق وتسلل التهابي سهم برتقالي ،**(C)** مجموعة (CG) (10×) احتقان وعائي معتدل باللون الازرق وموت موضعي باللون الاصفر ، **(D)** مجموعة المستخلص النباتي G (4×) نسيج كبدي سليم ، **(E)** مجموعة المستخلص النباتي L (4×) نسيج كبدي سليم.

2-II على مستوى الكلى

تمثل الكبيبات و الأنابيب الكلوية اهم البنى الوظيفية الموجودة في الكلى وتدل سلامتها مورفولوجيا على سلامة وظيفتها ويمثل المقطعA (شكل 30) البنية التشريحية لنسيج كلوي سليم في مجموعة الشواهد يبين البنية العادية للكبيبات التي تتضمن محفظة بومان مع طبقة خارجية من الغشاء الظهاري الحرشفي squamos epithelium وجدران داخلية متشكلة من خلايا ظهارية ، وتبدي الكبيبات هيئة قاعدية عادية ،وكذا تواجد الانابيب بوفرة ملتفة في شكل دائري.

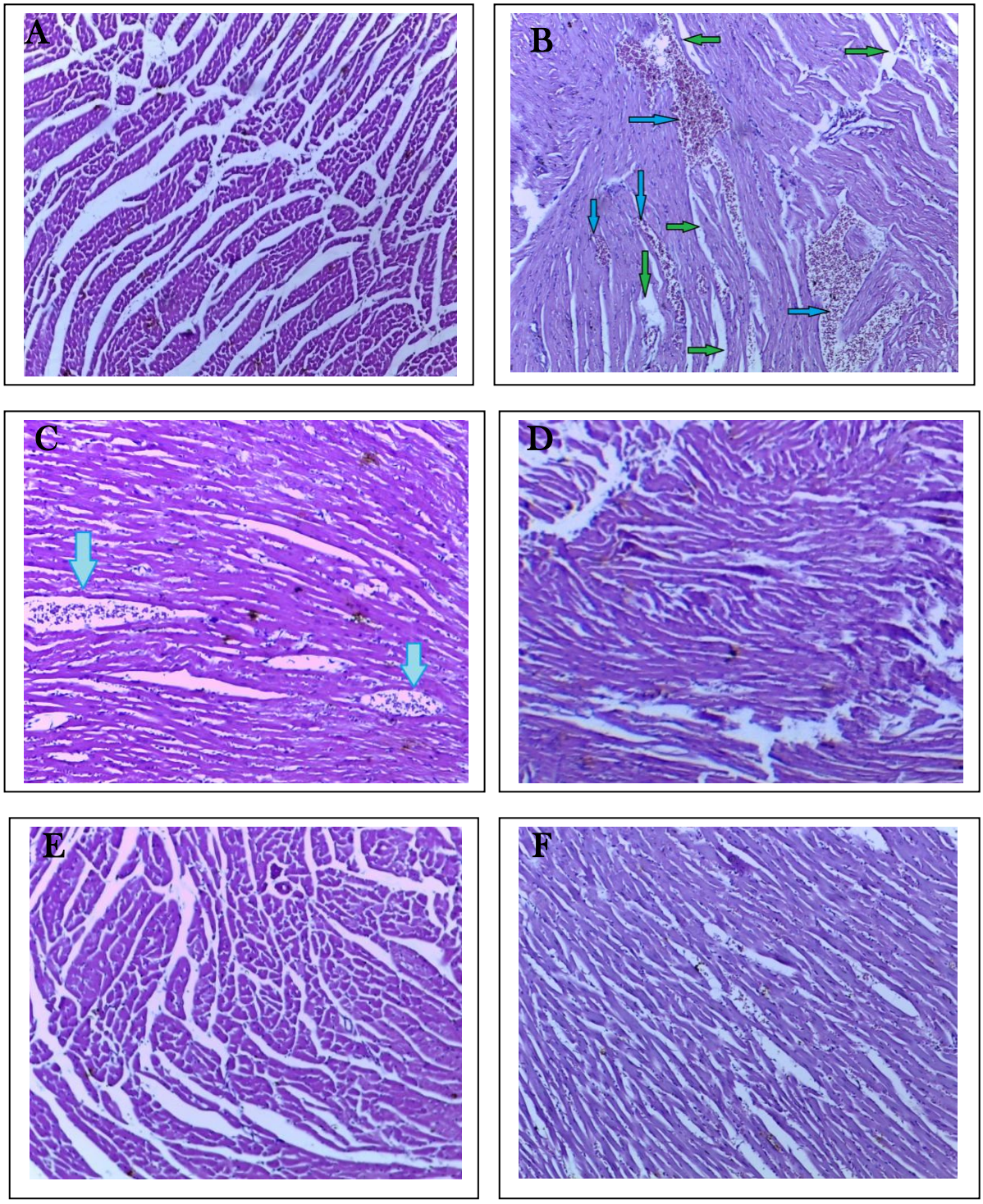
في حين أدت المعاملة بجرعة 10 ملغ/كلغ من المبيد CPF الى تغيرات مورفولوجية سبق و لوحظت في النسيج الكبدي ، كالاحتقان الوعائي ، حيث سجل احتقان وعائي انبوبي واقل حدة منه كبيبي يكون مصحوب بحالات استسقاء او الوذمة الانبوبية الحادة ، كما سجل ضمور atrophie في البرانشيم الكلوي وتغير الهيئة العامة للنسيج الكلوي كما هو مبين في المقطع (B) . فيما سمحت المعاملة المسبقة بالمستخلصين النباتين بجرعة تقدر ب 150 ملغ/كلغ من التخفيف من بعض الاضرار النسيجية ، حيث لوحظت هيئة عادية للنسيج الكلوي مع ملاحظة بعض حالات الاحتقان الوعائي التي تكون اقل حدة من مجموعة المبيد ، كما هو مبين في المقطع (C) و (D) ، فيما أوضحت الملاحظة المجهرية في مجموعتي المستخلصين النباتيين هيئة عادية لنسيج الكلوي مبينة في المقاطع (E) و (F) على التوالي.



شكل 30: مقاطع نسيجية تبين تأثير المبيد CPF ،المستخلصين النباتيين LوG على سلامة الاغشية الكلوية : **(A)** مجموعة الشاهد (X10) نسيج كلوي ذو بنية عادية ،**(B)** مجموعة المبيد (X10) احتقان وعائي سهم ازرق وذمة او استسقاء انبوبي سهم بنفسجي، اختفاء الهيئة العامة للنسيج ،**(C)** مجموعة المبيد (40×) احتقان وعائي انبوبي ،**(D)** مجموعة المبيد (10×) استسقاء انبوبي وضمور انبوبي **(E)**مجموعة المستخلص+ المبيد (LC) (4×)احتقان وعائي ، **(F)** مجموعة المستخلص+ المبيد (GC) (4×) احتقان وعائي ، (G) مجموعة المستخلص **(G)** (4×) نسيج كلوي عادي ،**(H)** مجموعة المستخلص (L) (4×) نسيج كلوي عادي.

3-II على مستوى القلب

لقد ابدت دراسة المقاطع النسيجية لقلب مجموعة الشواهد الهيئة العادية للقلب كما هو مبين في المقطع A (شكل31) حيث تتوضع الخلايا القلبية طولية الشكل جنبا الى جنب ، يفصل بينها نسيج ضام غني بالأوعية الدموية ، بينما لوحظ في المجموعة المعاملة بالمبيد حدوث حالات الاحتقان الوعائي كغيره من الانسجة اضافة الى عدم انتظام (ارتصاف) في الانسجة لكن دون تسجيل أي حالات مرضية اخرى جديرة بالذكر (المقطع B) ، بينما أدت المعاملة المسبقة بجرعة تقدر ب 150 ملغ/كلغ من المستخلصين النباتيين الى التخفيف من هذه الاضرار حيث سجل بعض حالات الاحتقان الخفيفة كما هو مبين في المقطعين C وD (في مجموعة المستخلص النباتي LC وCGعلى التوالي) ، بينما أبدت مقاطع مجموعتي المستخلصين دون المبيد هيئة عادية لأنسجة القلب كما هو مبين في المقطعين E و F.



شكل31 : مقاطع لنسيج قلبي تبين تأثير مبيد CPF،المستخلصين النباتيين LوG على سلامة الأغشية :
(A) نسيج قلبي سليم لمجموعة الشاهد ، **(B)** مجموعة المبيد : احتقان قلبي حاد سهم ازرق ،عدم انتضام (عدم ارتصاف) في النسيج سهم أخضر ، **(C)**احتقان قلبي خفيف مجموعة (LC) ، **(D)** نسيج قلبي دون اضرار واضحة مجموعة (G)، **(F)** **(E)** نسيج قلبي سليم في مجموعتي المستخلص النباتي Lو G على التوالي جميع المقاطع بتكبير (10×).

ويمكن تلخيص مجموع التغيرات المرضية في الانسجة المدروسة في الجدول التالي :

جدول3 : جدول يبين توزع مختلف الاعراض النسيجية المسجلة في مختلف المجاميع المدروسة : حيث تدل (-)غير موجود،(+) ضعيف، (++) متوسط، (+++) حاد، (++++) جد حاد.

	T	C	L	G	LC	GC
Vascular Congestion	-	++++	+	+	++	++
Necrosis	-	++++	-	-	++	++
Oedema	-	+++	-	-	-	-
Hyperchromatic nuclei	-	++	-	-	+	+
Atrophy	-	+	-	-	-	-
Inflammatory cells Infiltration	-	++	+	-	-	-
Clarification	-	+	-	-	-	-
Pyknotic Nuclei	-	+	-	-	-	-
زيادة حجم الانوية	-	-	+	+	-	-

المناقشة

من المعروف ان مبيد CPF كغيره من المبيدات الفسفوعضوية يعتبر من المركبات المثبطة لإنزيم الاستيل كولين استراز AchE، اذ يمارس تأثيره السمي من خلال التداخل مع مسارات الاستيل كولين وغيره من النواقل العصبية وكذا مسارات نقل الاشارة (Van Emon et al., 2018) ، حيث يرافق التعرض المزمن لهذا النوع من المبيدات العديد من الاعتلالات العصبية كالزهايمر ، الرعاش ، الاضطرابات المعرفية وغيرها (Juricek and Coumoul, 2014) إضافة الى ذلك بينت العديد من الدراسات الأثر السمي لهذا المبيد في العديد من الانظمة و الاعضاء مثل الكبد ، الكلى ، الدماغ ، البنكرياس (Ojha et al., 2011)، الرئتين (Uzun et al., 2010) ، القلب ، العضلات ، الجهاز المناعي (Díaz-Resendiz et al., 2015) ،والجهاز الانزيمي . وقد يرجع ذلك لسرعة اجتيازه للحاجز المعوي و توزيعه عبر كافة انحاء الجسم بفضل المجرى الدموي مما يسمح بزيادة اتصاله بكافة الاعضاء مما يزيد احتمال توسيع تأثيره السمي.

وترجع هذه الاختلالات الى قدرة هذا المبيد على في تحفيز انتاج الجذور الحرة مسببة ما يعرف بالتوتر التأكسدي (Basha and Poojary, 2012) ، كما يؤكد العديد من الباحثين قدرة هذا المبيد على احداث اضطراب في كل من النسبة مؤكسد-مضاد اكسدة وكذا في النظام الدفاعي المضاد للأكسدة (Aker et al., 2012).

و لقد بينت دراسات حديثة ان السمية الحادة والمزمنة لل CPF قد تكون مرتبطة بتحفيز تشكيل الجذور الحرة والتي اقترحت كآلية لإحداث ما يعرف بالتوتر التأكسدي الذي يؤدي الى الحاق الضرر بمكونات الخلية مثل : اللبيدات ، البروتينات الغشائية و الاحماض النووية ،حيث تؤدي هذه الاضطرابات الى حدوث تغير في الوظيفة الخلوية مثل التغير في نسبة الكالسيوم داخل الخلية ،PH الخلية وهو ما يؤدي غالبا الى الموت الخلوي و تخريب الانسجة . (Ping et al., 2013)

I. تأثير المبيد CPF على سلامة الاغشية

يعتبر Malondialdehyde (MDA) المركب النهائي الناتج عن اكسدة الاحماض الدهنية عديدة عديمة التشبع ، وزيادة مستوياته تعد مؤشرا مهما لحدوث الأكسدة الفوقية اللبيدية (LPO) (Demir et al., 2011) ،والناتجة عن التفاعل ما بين الجذور الحرة و المكونات الدهنية للغشاء الخلوي. وان أي خلل يحدث على مستوى الغشاء الخلوي قد يؤدي الى فقدان الاستتباب الداخل خلوي و يسبب بذلك تغير خواص هذا الغشاء (Gultekin et al.,2000) ، حيث يسبب ضعف في ميوعة الغشاء وتعطيل العديد من الانزيمات الغشائية (Kalender et al., 2012).

وتسمح طبيعة CPF المحبة للدهون بالمرور بسهولة عبر الاغشية الخلوية وصولا الى السيتوبلازم مما يسبب في حدوث اضرارا على مستوى الجزيئات الخلوية الكبرى ، كالبروتينات واللبيدات ، الاحماض النووية. ان اكسدة البروتينات قد تؤدي الى حدوث اضطرابات في العديد من الوظائف الخلوية كالمستقبلات الخلوية وآليات نقل الاشارة ونظام النقل الخلوي والنظام الأنزيمي (Basha and Poojary, 2012) ، وتعد اللبيدات من اكثر المكونات الخلوية استهدافا من طرف هذا النوع من المبيدات حيث تتسبب الجذور الحرة الناتجة عنها في اكسدة الأحماض الدهنية عديدة عديمة التشبع ، مما يسبب ما يعرف بالأكسدة الفوقية اللبيدية LPO (Van Emon et al., 2018)، ولقد تمت الاشارة في العديد من الدراسات بان الأكسدة الفوقية اللبيدية هي الآلية المتدخلة في السمية الخلوية لهذه المبيدات (Deveci and karapehlivan, 2017; Amos et al., 2017 ; Abdollahi al., 2017; Abolaji et al., 2004)

من خلال نتائج دراستنا هذه لوحظ ارتفاعا عالي المعنوية في قيم Malondialdehyde MDA في المجموعات المعاملة بالمبيد بجرعة تقدر ب10 ملغ/كلغ ، في كل من الكبد الكلى الدماغ والقلب . ولقد جاءت هذه النتائج مماثلة للعديد من الدراسات السابقة التي تشير جميعها الى ارتفاع قيم MDA في جميع الانسجة المعاملة دون استثناء (Deveci et al., 2017 ; Zhange et al., 2017 ; Nars et al., 2015 ; Singh and Panwar, 2014 ; Liel et al., 2013 ; El-chenawy, 2010 ; Aly et al., 2010 ; Verma et al., 2007)

تشير هذه الزيادة في قيم MDA الى الزيادة في حدوث الأكسدة الفوقية اللبيدية في اغشية الأعضاء المدروسة ، و قد ترجع هذه الزيادة الى التأثير المباشر ل CPF بواسطة نواتجه الأيضية النشطة ، والتي تعتبر مركبات سابق-مؤكسدة قد تتداخل مباشرة مع المكونات اللبيدية للغشاء مسببة اكسدتها ، أو من خلال زيادة تشكيل الجذور الحرة مثل جذر الهيدروكسيل $HO^{\bullet}$ الذي يتداخل مع الاحماض الدهنية غير المشبعة للمركبات الفسفولبيدية في مختلف انسجة الأعضاء المدروسة مما يؤدي الى خلل وظيفي في هذه الأخيرة ، أو من خلال تثبيطه لأحد الانزيمات المضادة للأكسدة او نتيجة تراجع الدور الوقائي للإنزيمات المضادة للأكسدة تحت تأثير CPF.

II- تأثير مبيد CPF على الجهاز المضادة للأكسدة

II- 1 على الأنزيمات المضادة للأكسدة

تتميز خلايا الثدييات بغناها بالأجهزة المضادة للأكسدة ، التي تعمل على عكس اضرار الجذور الحرة (ROS,RNS) الناتجة عن ايض العديد من المواد السامة . يسبب الانتاج الفائق للجذور الحرة العديد من للأضرار الخلوية وتحت الخلوية ، والتي تؤدي الى اضطراب الوظيفة الخلوية وبالتالي تسبب العديد من الحالات المرضية (Raina et al., 2015).

يعد الانزيمين SOD ; CAT من اهم الأنظمة الدفاعية ضد الميتابولزم الأوكسيجيني ، ويعتبران الخط الدفاعي الاول ضد الجذور الحرة ، بحيث يعمل SOD على تحويل جذر فائق الاكسيد $O^{\bullet}_2$ الى بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 ،فيما يتولى CAT بالاشتراك مع GPx التخلص من البقية في صورة ماء (Nasr et al., 2015).

ينتمي GPx الى عائلة الانزيمات ذات النشاط المرجع ويتمثل دوره الاساسي في خفض تفاعل بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 الحر ،ونسب الجذر البيروكسيلي $LOO^{\bullet}$ من خلال تحويله الى كحول ،وتعمل هذه الانزيمات بالتنسيق معا وان أي تغيير في مستويات هذه الانزيمات قد يدفع بالخلية الى الدخول في حالة التوتر التأكسدي (Attia et al., 2012).

ولقد جاء في نتائج دراستنا هذه تسجيل انخفاض حاد في قيم الانزيمات المضادة للأكسدة CAT; GPx ، حيث كانت هذه النتائج ماثلة لسابقاتها (Deveci and Karapehlivan, 2017; Abolaji et al.,2017 ;Amos et al.,2017 ;Abdollahi et al. ,2004; Aly et al ., 2010)

ويرجع العوز المسجل في قيم CAT الى زيادة تشكيل جذر فائق الاكسيد ، حيث بينت دراسات سابقة ان التركيب الفائق لهذا الجذر يؤدي الى تثبيط نشاط CAT (Khan et al., 2005) ،و يمكن لكل من $O_2^{\cdot-}$ و $ONOO^-$ تثبيط نشاط CAT عند إصابة مجموعة الهيم (Heme group) الموجودة في موقعه النشط (Astiz et al., 2009).

إن GP_X حساس لتراكم الجزيئات الأوكسجينية والنتروجينية النشطة ROS/RNSوقد تتسبب الاضطرابات في السلسلة التأكسدية ، في إصابة ذرة السيلينيوم المتوضعة في الموقع النشط له (Mariana et al., 2009) مسببة بذلك عجزه في أداء وظائفه ، وبالتالي الانخفاض في نشاطه. وقد يرجع الانخفاض المسجل في نشاط GPx الى النقص الكبير او العوز المسجل في مستوى GSH والذي سوف نأتي على ذكره لاحقا بالتفصيل.

2.II على المحتوى غير الانزيمي (GSH)

يعتبر GSH مضاد الاكسدة غير أنزيمي الخط الدفاعي الثاني في النظام المضاد للأكسدة ، حيث يقتنص بقايا الجذور الحرة الناتجة عن الاستقلاب التأكسدي ، وكذا بعض المركبات المنفلتة من الانزيمات المضادة للأكسدة الاخرى . وخلال نشاطه المزيل للأكسدة يتم اكسدة مجموعة Sulfhydryl مما يؤدي الى تحوله الى الصورة المؤكسدة له GSSH (El-Demerdash, 2011) ،حيث تعد النسبة GSH/GSSH مؤشرا حيويا جد مهم لقياس التوتر التأكسدي في الامراض او الاضطرابات الانتكاسية عند الانسان(Astiz et al.,2012)

كما يساهم كذلك في ازالة سمية بعض المركبات عن طريق ارتباطه مع هذه المواد الكيميائية (Deveci and karapehlivan, 2017) ،ويلعب دورا محوريا في الجهاز المضاد للأكسدة ،حيث يلعب دور مرافق انزيمي أو مادة فعالة للأنزيمات GST و GPx . كما يلعب الجلوتاثيون وغيره من البروتينات المحتوية على مجموعة الثيول Thiol دورا مفتاحيا مهما في الدفاع الخلوي ضد سمية المبيدات (El-Demerdash, 2011) ،وترجع اهمية GSH كمضاد للأكسدة الى قدرته على تجديد مضادات أكسدة أخرى (محبة للذوبان في الماء) مثل الفيتامين C من خلال الدورة ascorbate-glutathione cycle ، ويستعمل العوز في مستوياته عادة كمقياس او معيار لقياس التوتر التأكسدي (Pig et al., 2013).

مـن خـلال نتـائج دراسـتنا هـذه سـجل انخفاضـا عـالي المعنويـة فـي قـيم GSH فـي جميـع الأعضـاء المدروسـة ، وهـذا الانخفـاض نـاتج عـن اسـتفحال التـوتر التأكسـدي . ويعـد العـوز فـي قـيم GSH مؤشـرا مهمـا للتـوتر التأكسـدي وهـذا راجـع الـي اسـتعماله فـي ارجـاع او /و مشـاركته كمضـاد اكسـدة فـي تعـديل الجـذور الحـرة الناتجـة عـن مبيـد CPF والحفـاظ علـى التـوازن التأكسـدي (redox balance) الـداخل خلـوي فـي الخلايـا . ولقـد تمـت ملاحظـة هـذا الاثـر فـي العديـد مـن الدراسـات السـابقة (Thompson et al., 2002 ; El-Shenawy, 2010; El-Demerdash, 2011) ، فحسـب (Amos et al., 2017)فـان العجـز الكبيـر المسـجل فـي مسـتوياته ، قـد يرجـع لاسـتعماله فـي اختـزال النـواتج الايضـية (electrophilic metabolites) لـلCPF مـن أجـل وقايـة المجموعـة الكبريتيـة SH للبـروتين ، اضـافة الـى دوره المباشـر فـي عمليـة ازالـة سـمية CPF كمـادة تفاعـال لـل GST (Adedara et al., 2016) ، كمـا قـد يرجـع هـذا الانخفـاض الـى تدخلـه فـي عمليـة قـنص الجـذور الحـرة عـن طريـق تفاعلـه كمـادة تفاعـال لكـل مـن GST ;GPx خلال مراحل ازالة سمية H_2O_2 ، الاكسدة الفوقية اللبيدية.

ولقـد أشـار الباحـث(Fetoui et al., 2009) فـي دراسـات سـابقة الـى ان انخفـاض مجـاميع الثيـول البروتينيـة فـي ادمغـة الحيوانـات المعالجـة بـCPF (Basha and Poojary, 2012) ، قـد يرجـع الـى هـدم البروتينـات أو الزيـادة فـي اسـتهلاك مضـادات الاكسـدة فـي حالـة التـوتر التأكسـدي ، لان العـوز فـي مجـاميع السـلفهيدريل (SH groups) sulfhydryl نـاتج عـن متطلبـات انتـاج الجـذور الحـرة، حيـث قـد تـؤثر هـذه الأخيـرة مباشـرة علـى الوظيفـة الكبريتيـة (السلفهيدريل) للجزيئات من خلال اكسدة مجموعة (شاردة) الثيول.

وقـد يفسـر تشـعب دور GSH فـي مختلـف العمليـات المضـادة للأكسـدة الـنقص الحـاد المسـجل في هذه الدراسة ، مما قد يزيد من خطر التعرض للأضرار الناتجة عن الجذور الحرة.

ان هـذا الانخفـاض المسـجل فـي نشـاط الانزيمـات المضـادة للأكسـدة ومسـتوى GSH فـي انسـجة الاعضـاء المدروسـة يعـد دلـيلا علـى اسـتنفاذ هـذه الانزيمـات بسـب الاضـرار التأكسـدية والنـاتج عـن عجـز الجهـاز الـدفاعي امـام حالـة التـوتر التأكسـدي المحرضـة بـCPF، والراجـع الـى الإنتـاج الفـائق للجـذور الحـرة وزيـادة الاكسـدة الفوقيـة فـي هـذه الانسـجة وهـو مـا تؤكـده نتائجنـا من خلال الزيادة العالية في قيم MDA المسجلة في هذه الدراسة .

ومع اختلاف الأعضاء المدروسة سجل تباينا في نسب هذه الانزيمات وكانت الكبد حسب نتائج دراستنا هذه اكثر الاعضاء التي سجل بها انخفاضا لقيم GSH ;GPx معا تليها الكلى ثم الدماغ و اخيرا القلب وقد يرجع هذا لخصوصية النسيج والوظيفة الكبدية والكلوية التي سوف نأتي على ذكرها لاحقا ، وعلى عكس من ذلك فان اكثر عضو عرف عجزا في نشاط CAT كان الدماغ ثم القلب والكلى تليها الكبد في الاخير، وقد يرجع هذا الى اختلاف النشاط الايضي بين مختلف الانواع الخلوية المدروسة ، مما يؤثر على القدرة المضادة للأكسدة . وقد يرجع هذا التباين كذلك في تضرر الاعضاء الى التوزيع غير المتساوي لهذا المبيد في العضوية حيث ، بينت دراسات حديثة (Tanvir, 2016) انه بعد تعريض اناث جرذان لسمية تحت المزمنة لل CPF فان حوالي 6,18% منه يتراكم في الانسجة بنسبة : 3,80 % النسيج الدهني ، 0,29% الكبد ، 0,22% الدماغ و 0,10% الكلى.

III تأثير CPFعلى الأعضاء المختلفة

III -1 الدماغ

يعتبر الدماغ العضو الاساسي الحيوي المسؤول عن مراقبه وتنسيق نشاط بقيه الاعضاء وباعتباره عضو جد نشيط فان اي تغيير في الوسط الخارجي أو الداخلي قد يؤثر على وتيرة نشاطه.

وقد اشارت دراسة سابقة ل (Astis et al., 2012) ان التسمم بمختلف انواع المواد الكيميائيه المستعمله في الزراعه بجرعات ضعيفة تسبب التوتر التأكسدي في كل من الدماغ ، الكبد والكلى. كما اظهرت نتائج هذه الدراسة ان التعرض لمزيج من المبيدات يسبب ظهور مؤشرات التوتر التأكسدي بكل وضوح وانعكاسها على كامل الدماغ .

وترجع حساسية الجهاز العصبي للأضرار التأكسدية الناتجة عن CPF الى طبيعة نشاطه الذي يتطلب استهلاك عالي للأوكسجين مما يؤدي الى تشكيل الجذور الحرة انطلاقا من Superoxide $O^{\bullet}_2$ وكذا كثرة تواجد الأحماض الدهنية عديدة عديمة التشبع في اغشية الخلايا العصبية مما يجعلها عرضة للأكسدة الفوقية زيادة على الحديد المتواجد في الدماغ الذي يعتبر محفز قوي لتفاعل Fenton ، مقابل ضعف الجهاز الأنزيمي المضاد للأكسدة، كما يتسبب التداخل مع النقل الايوني في تشكيل مستوى عالي من الكالسيوم داخل الخلية مما يؤدي الى حدوث التوتر التأكسدي . (Kovacic and Somanathan, 2014; Basha et al., 2012)

اضافه الى تثبيط AchE ، فان التوتر التأكسدي والأكسدة الفوقية اللبيدية يعتبران كآلية اساسية في السمية العصبية (Singh and Panwar, 2014) ، حيث بين (Xu et al., 2017) ان تعريض الجرذان لجرعات صغيرة من CPF، تسبب في زيادة مستوى MAD في الدماغ ، دليل حدوث الأكسدة الفوقية اللبيدية في الدماغ ، بينما تبين (Crumpton et al.,2000) ان CPF له القدرة على احداث زيادة حادة في الجذور الحرة ، وهو ما جاء مطابقا لدراسة لاحقة ل (Giordano, 2007) اذ تبين ان استهلاك هذا المبيد تتسبب في زيادة تشكيل الجذور الحرة داخل الخلايا وكذا الاكسدة الفوقية اللبيدية ، كما سجل انخفاض كبير في نشاط الأنزيمات المضادات للأكسدة ،وهو ما جاء مطابقا لنتائج دراستنا وهذا ما تؤكده النتائج النسيجية كما سبق الذكر.

2-III تأثير CPF على التكامل الوظيفي للكبد

يعتبر الكبد من اكثر الاعضاء حساسية واستهدافا من طرف سمية المبيدات ، و اكثرها تضررا ، وهو يلعب دورا أساسيا في ميتابولزم و إزالة سمية المبيدات (Mossa et al. 2015) . ويعتبر الكبد الموقع الأساسي لأيض مختلف المواد الكيميائية (مبيدات، أدوية ، ومعادن) ، مما ينتج عنه تكوين نواتج ايضية قد تكون اقل او اكثر سمية من المركب الأصلي ، كما انه ينتمي الى الجهاز الهضمي ، مما يجعله اكثر عرضة للسموم المبتلعة (Acker et al., 2015) .

ويتم تنشيط CPF من طرف CyP450 و انزيماته المرافقة الموجودة في الميكروزومات الغشائية للكبد (Attia et al., 2012) ،وبالتالي تحويله الى صيغته المؤكسدة CPF-Oxon التي تعد اكثر خطورة من CPF نفسه، وتكمن خطورة الاضرار الناتجة عن السموم ومن ضمنها المبيدات الفسفوعضوية احداث ظاهرة التوتر التأكسدي (Acker et al., 2015) ،فحسب دراسة (Xu et al., 2017) فان جرعات صغيرة من CPF رغم انها لم تحدث تغيرا مورفولوجيا في النسيج الكبدي الى انها قادرة على احداث التوتر التأكسدي لدى الجرذان المعاملة كما تتسبب في احداث اختلالات في الثبات الداخلي و الأيضي للكبد. وهذا ما جاء مطابق لنتائج دراستنا هذه ، حيث اتضح من خلال نتائج دراستنا هذه هيمنة التوتر التأكسدي في النسيج الكبدي الناتج عن جرعة CPF المستعملة في هذه الدراسة ، من خلال زيادة قيم MDA والاضطرابات الحادثة في المعايير الكبدية التي سوف نأتي على ذكرها .

III -2-1 تأثيره على الانزيمات السيتوزولية الكبدية

تعد الإنزيمات السيتوزولية AST, ALT, Transaminases إنزيمات مهمة وضرورية في العمليات البيولوجية حيث توجد هذه الإنزيمات في سيتوزول الخلية الكبدية، وان إصابة الغشاء البلازمي للخلايا الكبدية ينتج عنه تحرير العديد من الإنزيمات المتمركزة في السيتوزول كا AST, ALT, ALP وكذلك LDH في الدم، وبالتالي يمكن اعتبارها كمؤشرات للأضرار الكبدية.

يسبب CPF في دراستنا هذه سمية كبدية ويتضح ذلك من خلال الزيادة العالية في نسبة ASAT; ALAT البلازمية والتي تعد مؤشرات للضرر الخلوي الكبدي ، ولقد جاءت هذه النتائج مماثلة لدراسات سابقة تبين السمية الكبدية الناتجة عن التعرض لـCPF في الجرذان (Mansour and Mossa, 2010 ; Tripathi and Srivastav, 2010 ; Acker et al., 2012 Basha and Poojary, 2012 ; Raina et al., 2015). ويدل الارتفاع في نسب هذه الانزيمات دون شك على الاضرار الكبدية الناتجة عن الاختلال في نفاذية الغشاء الخلوي لتخريب مكوناته الخلوية لاسيما اللبيدية منها، تحت تأثير الجذور الحرة والتي تتجلى واضحة من خلال زيادة مستويات الاكسدة الفوقية اللبيدية والمترافقة مع انخفاض في نشاط مضادات الاكسدة مسببة تسرب هذه الانزيمات في المجرى الدموي.

III -2-2 تأثيره على Albumin

يعد الألبيومين أهم البروتينات البلازمية وأكثرها تواجدا ، و يعد ناقلا هاما للعديد من المركبات الداخلية والخارجية ، حيث يمكنه الارتباط مع العديد من المركبات كالأحماض الدهنية Bilirubine، المضادات الحشرية والنباتية. يتم تركيب هذا البروتين على مستوى الكبد ، ولقد أظهرت عدة دراسات أن هذا التركيب يمكن أن يقل تحت تأثير المبيدات الفسفوعضوية خاصة CPF (Suna et al., 2010).

يلاحظ من خلال دراستنا هذه انخفاض ملحوظ في مستوى الألبيومين المصلي ، مقارنة مع مجموعة الشاهد وجاءت هذه النتائج مطابقة لنتائج سابقة (Saida et al., 2008 ; Ayse et al., 2008).

ويفسر هذا الانخفاض بإمكانية تدخل المبيدات الفسفوعضوية في ميتابولزم البروتينات و الأحماض الآمينية الحرة ،أو إلى انخفاض تركيبه في الكبد أو قد يعزى إلى نقص قيمه الحرة بسبب ارتباطه مع CPF و يدل هذا الانخفاض عموما على الاضطرابات الوظيفية والأضرار النسيجية وهو ما تؤكده نتائج دراستنا السابقة الذكر.

III -3-2- تأثير CPF على الكولسترول والجلسريدات الثلاثية

في بحثنا هذا يتسبب CPF في ارتفاع مستوى الكولسترول المصلي في المجموعة المعاملة بالمبيد. وقد جاءت نتائج بحثنا مطابقة لنتائج سابقة (Ambali et al., 2011; El- Banna et al., 2009 ; Lasram et al., 2009; Elsharkawy et al.,2013; Ogutcu et al., 2008) قد ترجع هذه الزيادة إلى تأثير المبيد على نفاذية أغشية الخلايا الكبدية (Suna et al., 2010) ، أو قد يرجع إلى انسداد القناة الكبدية الصفراوية ، بسبب الاضرار الكبدية الناتجة عنCPF (Deveci and karapehlivan, 2017) ، مما يؤدي إلى تقليل أو توقيف تحرير الكولسترول في الاثنى عشر. ومن جهة اخرى قد يكون ارتفاع في مستوى الكولسترول ناتج عن اضطراب في نشاط CYP450 مسببا تشكل Oxysterol 24s hydroxyle.
(Singh and Panwar, 2014).

كما سجلنا ارتفاع معنوي في قيم الجلسريدات الثلاثية كذلك . ولقد جاءت هذه النتائج موازية لنتائج سابقة (Howell et al., 2018; Acker and Nogueira, 2012; Abdou and El Mazoudy, 2010 ; Lasram et al., 2009)

لقد اثبتت الدراسات ان التعرض للمركبات الفسفوعضوية يسبب استقلابا غير طبيعي للبيدات (حيوياin vivo) ، حيث بين (Slotkin et al., 2005) ان تعرض صغار الحيوانات لCPF يؤدي الى ارتفاع نسبة الجلسريدات الثلاثية (مرتبط بالجنس) عند ذكور الجرذان من نوع sprague Dawley . كما بينت دراسة اجراها (George et al., 2016) تم فيها تعريض خلايا كبدية مخبريا لجرعات من CPF ، تراكم للبيدات داخل الخلية الكبدية مما يسبب ظهور حالات مرضية مثل التشحم الكبدي، رغم استعمال جرعات تعد امنة 0,01 ملغ/كلغ (وهي ما يعرف بنسبة التعرض اليومي الامنة ADI) ،

حيث تبين نتائج هذه الدراسة زيادة في تراكم اللبيدات بعد 48 ساعة من التعرض لل CPF (بجرعة تقدر ب 20µ M) والذي يرجع الى تراكم الجلسريدات الثلاثية بعد الارتفاع المحسوس في مستواها داخل الخلايا . وتؤيد نتائج هذه الدراسات دراسات حديثة تفيد بان التعرض للمبيدات الفسفوعضوية قد يؤدي الى احداث خلل في أيض اللبيدات الكبدية وينتج عنه ارتفاع في نسبة الجلسريدات الثلاثية ، وتبقى الآلية المتحكمة في هذا التأثير غير واضحة تماما (Xu et al ., 2017).

III -3 تأثير CPF على التكامل الوظيفي للكلى

تكون الكلى عرضة للسمية الناتجة عن الملوثات البيئية جزئيا بسبب كمية الدم المتدفقة اليها يوميا والذي يكون مركز بالمواد المذابة به حيث تعمل هذه الاعضاء على التخلص من المركبات السامة (El-Demerdash et al., 2013). كما تلعب الكلى الى جانب الكبد دورا مهما في ايض بعض المركبات السامة ، فبالرغم من ان تحويل CPF الى صورته النشطه oxon يكون بفضل CYP450 أساسا في الكبد ، إلا ان الكلى تعرف كذلك نشاطا عاليا نسبيا لهذا الانزيم . وان الدور الذي يلعبه هذا العضو في تحويل المواد الضارة او السامة سواء خارجية او داخلية المصدر الى صورة قابلة للأطراح يعد دورا غاية في الاهمية (Ping et al., 2013).

يعتبر Creatinin مؤشر على سلامة الوظيفة الكلوية ، أي النشاط الكبيبي الترشيحي والإخراج الأنبوبي . و ان ارتفاع مستوى اليوريا والكرياتينين Creatinin يدل على عدم قدرة الكلى على التخلص من هذه المركبات وطرحها في البول ، بينما تدل الزيادة في مستويات Uric acid الى تراجع وتدهور الوظيفة الكلوية بعد الاصابة (Nars et al., 2015) .

من خلال نتائج دراستنا هذه سجل ارتفاع عالي في مستوى الكرياتينين Creatinin و Uric acid . ولقد جاءت هذه النتائج مماثلة لنتائج (Sameeh and Abdel-Tawab, 2009) ، وقد ترجع هذه الزيادة إلى حدوث إتلاف في الوظيفة الترشيحية أو إلى حدوث أضرار كلوية .

ينتج Creatinin عن هدم Creatinin phosphate في العضلات ، ويتم تركيبه في الجسم عادة بمعدل ثابت ، حسب الكتلة العضلية (Refaie et al., 2014)، ويعتمد ثبات هذه النسبة على التوازن بين تركيب الكرياتينين من طرف العضلات وطرحه من طرف الكلى ، لذا يمكن القول انCPF كغيره من المواد السامة ، يتسبب في زيادة معدل هدم المركبات الكيميائية الحيوية من اجل توفير الطاقة اللازمة

للحيوان تحت ظرف التوتر التأكسدي او في حالة نقض تركيبها والتي تسبب ضعف للوظائف الخلوية ،ويعتمد طرح Creatinin على ظاهرة التصفية الكبيبية ، حيث تساهم الانيبات الكلوية جزئيا في هذه الظاهرة ، وقد يرجع الزيادة في نسبه الى ضعف الوظيفة الكبيبية أو الاضرار الكبيبية الكلوية.

إن Uric acid هو المركب النهائي لهدم القواعد لآزوتية (purine pyrimidine)، قد ترجع الزيادة في نسبته بعد المعاملة بCPF إلى زيادة المركبات الأوكسجينية الناتجة عن أيض المبيد والتي تعتبر أكثر سمية من المركبات الأصلية ، حيث تكون قادرة على بناء روابط مع القواعد الآزوتية مؤدية إلى هدمها ،أو قد يرجع هذا إلى زيادة تركيب Uric acid ونقص طرحه.

كما قد تشير الزيادة في الجلسريدات الثلاثية الى جانب المعايير سابقة الذكر الى تراجع او انخفاض التصفية الكبيبية الكلوية ، كما ترجع كذلك الزيادة في هذه النسب الى الاضطراب الوظيفي الأنبوبي.

ان الزيادة في تراكيز الكرياتنين والكولسترول قد تكون مؤشرا على التضرر الكلوي باعتبار الكرياتنين المركب النهائي الناتج عن هدم البروتينات(Wilson et al., 2016) .

III-4 تأثير CPF على التكامل الوظيفي للقلب

يظهر من خلال قياس معايير الاكسدة ومختلف نشاط الانزيمات المضاد للأكسدة في هذه الدراسة ، السمية القلبية الممارسة من طرف مبيد CPF من خلال احداث التوتر التأكسدي وبالتالي التأثير على الوظيفة القلبية . ولقد جاءت هذه النتائج مماثلة لدراسة سابقة ل (Razavi et al., 2013 ; Bas and Kalender, 2011) حيث تسبب السمية تحت المزمنة للكل من Diazinon(DZ) وCPF الى زيادة مستوى MDA وانخفاض قيم GSH، GPx في النسيج القلبي. وقد تكون الآلية الممارسة من هذا المبيد ناتجة عن احداث اضطراب في توزيع الشوارد، والناتج عن الإخلال بالتكامل الوظيفي للغشاء باعتباره بوابة التبادلات الخلوية الحيوية. حيث بينا في دراسة سابقة تأثير CPF على سلامة توزيع الشوارد وتسببه في انخفاض عال المعنوية في قيم Na^+ وk^+ البلازمي . وبما أن النسيج القلبي نسيج عضلي فان ثبات نشاطه يعتمد بدرجة كبيرة على التوازن الشاردي ، حيث بين (Çetin et al.,2007)

ان OPs ترتبط مباشرة مع المستقبلات M2 Muscarinic receptor مما يؤدي الى تنشيطها، ويؤدي هذا التنشيط الى زيادة نفاذية شوارد k^+ مسببا زيادة في القطبية . كما بينت دراسات سابقة (Howard and Pope, 2002) ان هذا الارتباط قد يؤدي الى تغيرات في الوظيفة القلبية لفترة طويلة .

يبدو من الدراسات السابقة للسمية تحت الحادة القلبية ان اغلبية الضرر الممارس من طرف مبيد CPF وغيره من المبيدات الفسفوعضوية وظيفي اكثر منه نسيجي ، كتسجيل حالات ارتفاع مستوى الضغط الدموي ، واضطرابات ناتجة على مستوى عمل الصمامات ، وكذا تثبيط انقباض العضلة القلبية ...الخ (Çetin et al., 2007; Gordon and Padnos, 2000) ، فيما تبقى اغلبية الاضرار النسيجية مسجلة في حالة السمية المزمنة وتحت المزمنة حتى بجرعات ضئيلة من هذا النوع من المبيدات .

IV- الدراسة النسيجية

تؤكد نتائج الدراسة النسيجية نتائج الدراسة الكيميائية والتي سبق الاشارة اليها والناتجة عن التغير في الايض الخلوي ، حيث تبين الدراسة المجهرية لمختلف المقاطع المدروسة قدرة المبيد بجرعة تقدر ب 10ملغ/كلغ على احداث تغيرات مورفولوجية في جميع الانسجة المدروسة كبد، كلى وقلب . ولقد كان القلب اقل الاعضاء تضررا على عكس الكلى والكبد ولقد سجل من خلال دراستنا هذه عدة اضطرابات نسيجية كبدية كالاحتقان الوعائي ، ولقد جاءت هذه النتائج مماثلة لدراسة سابقة ل (Cunningham et al., 1994) . كما لوحظ كذلك زيادة حجم الأنوية وزيادة تضبغها في البرانشيم الكبدي Hyperchromatic nuclei ، و جاءت هذه النتائج مماثلة لنتائج كل من (Tripathi et al., 2010 ; Sata et al., 2004) بعد اسبوعين من معاملة الجرذان بجرعة تقدر ب10ملغ/كلغ من CPF ، وتشير عموما التغيرات المرضية على مستوى الأنوية الى الامراض الانحلالية أو الانتكاسية ، والتي سبق واشرنا الى امكانية حدوثها تحت تأثير السمية الجينية للCPF ، كما قد تكون مؤشرا لحدوث الموت الموضعي .

ان الموت الموضعي البؤري المسجل في هذه الدراسة في النسيج البرانشيمي الكبدي ، سبق وتمت ملاحظته في اعمال مماثلة ل (Jee et al., 2005) ،ويدل حدوث الموت الموضعي على السمية الخلوية لهذا المبيد ،ومدى تأثير الاجهاد التوتري على الاستتباب الخلوي، ويرجع حدوث الموت الموضعي الى الفقدان غير الرجعي لحيوية الخلية والناتج عن الخلل في الغشاء الخلوي ، والناتج في دراستنا هذه الى ارتباط النواتج الايضية النشطة لـلCPF ،او الجذور الحرة الناتجة عنها مع المركبات الخلوية وأكسدتها ، مما يسبب تخريب الغشاء الخلوي و احداث اضطراب في ثبات الشوارد على جانبيه ، تثبيط تركيب البروتين ، والتغيير في كيمياء الدم ، وقد ينتج عن تفاقمه اضرار كبدية وفشل كبدي .

كما تبين الملاحظة المجهرية للمقاطع الكبدية لمجموعة المبيد حالة زيادة شفافية على مستوى البرانشيم الكبدي للجرذان ، والتي تترجم بحالات الاستسقاء او ما يعرف بالوذمة Oedema ، وهي من الاعراض المرضية التي لم تتم الاشارة اليها بإسهاب في الاعمال السابقة . وينتج الاستسقاء غالبا عن اضطرابات في نفاذية الاوعية الدموية ناتج عن انخفاض الضغط الاسموزي والراجع الى انخفاض قيم البروتينات تحت تأثير مبيد CPF، حيث بينت دراسات سابقة تسبب المبيدات في انخفاض النسبة العامة للبروتينات ، وذلك من خلال ارتباطه ببعض انواعها ك Albumin وHemoglobin ، حيث يعتقد أن CPF ينتقل إلى الأعضاء المستهدفة بواسطة تجزئه في دهون الدم ، وارتباطه مع البروتينات المصلية (Yang et al., 2009) ، ويدل هذا الانخفاض على حدوث خلل كبدي، قد يكون نسيجي أو وظيفي، وهو ما يدعم ما سبق من النتائج الخاصة بالأنزيمات المصلية الكبدية. ويفسر هذا الانخفاض بإمكانية تدخل المبيدات الفسفوعضوية في ميتابولزم البروتينات و الأحماض الآمينية الحرة ، أو إلى انخفاض تركيبه في الكبد.

وقد ترجع حساسية هذا العضو لمبيد CPF الى كونه المركز الاساسي لعمليات ايض هذا المبيد وتحويله الى صيغه النشطة TCP وCPF-oxon والتي سبق واشرنا اليها ، كونها مركبات نشطة وجد سامة وبالتالي زيادة تركيز هذه النواتج الايضية السامة به مما يؤدي الى تضخيم الضرر الناتج عنها سواء مباشرة أو من خلال زيادة تشكيل الجذور الحرة ، كما يعتبر كذلك بوابة للمواد المتدفقة عبر المسار االمعوي-المعدي مما يزيد من احتمال احتكاك الكبد لمدة اطول مع صيغ CPF المختلفة المعاد امتصاصها عبر هذا المجرى .

اما الملاحظة المجهرية للمقاطع الكلوية فقد بينت الضرر الممارس من طرف هذا المبيد على البنية الوظيفية العامة للكلى ، حيث لوحظ حالات احتقان وعائي حاد أنبوبي في اغلبه ، يكون مصحوبا في بعض الحالات بالاستسقاء ، كما تتسبب المعاملة بجرعة تقدر ب10 ملغ/كلغ من CPF بإحداث حالات استسقاء انبوبي مصحوبة بحالات ضمور في البرانشيم الكلوي renal Parenchymal atrophy ، ولقد سبق ملاحظة نفس هذه الأعراض المرضية في دراسات سابقة ل (El-Demerdash et al., 2013) بعد معاملة الجرذان بجرعة تقدر ب 1ملغ/كلغ من المبيد الفسفوعضوي Methomyl لمدة 20 يوما و(Ping et al., 2013) بعد معاملة الجرذان بجرعة تقدر ب 12ملغ/كلغ لمدة سبعة ايام. ويرجع حدوث الاستسقاء الكلوي عادة الى حالة العجز الكلوي ، وترجع هذه الاضطرابات المرضية المسجلة على مستوى النسيج الكلوي الى الدور الاساسي الذي تلعبه الكلى في التخلص من صيغ CPF السامة كما سبق الذكر . كما يرجع ذلك الى دورها في تحويل هذا المبيد الى جانب الكبد الى صيغه النشطة من اجل التخلص منها خارج الجسم وكذا كمية الدم العالية المتدفقة الى هذه الاعضاء . لذا فان اغلبية الحالات المرضية النسيجية تم تسجيلها في كل من الكلى والكبد وذلك لزيادة مدة احتكاكهما مع هذا المبيد ومشتقاته ، اما الدراسة المجهرية النسيجية للمقاطع القلبية المعالجة بهذا المبيد فلم تبدى حالات مرضية حادة مقارنة مع بقية الاعضاء واغلب الحالات المسجلة كانت عبارة عن احتقان وعائي حاد في انسجة القلب ، وعدم انتظام في صفوف النسيج Disorganisation ، توافق هذه النتائج نتائج دراسة (Bas and Kalender., 2011) ، والناتجة عموما عن تراكم الجذور الحرة في الأنسجة القلبية.

V- الدور الوقائي للمستخلص النباتي اتجاه سمية CPF

لقد تم استعمال في هذه الدراسة نوعين مختلفين من المستخلصات النباتية ، من النبات التي تنمو في منطقتين من الشرق الجزائري لتميزه بتنوع الغطاء النباتي فالنوع الأول *Genista ulicina (G)* تم قطفه تحديدا من مدينة القالة من شمال الشرق الجزائري ،أما النوع الثاني فهو*Limonium pruinosum (L)* وقد تم جلبه من منطقة باتنة ، ولهدف دراسة الدور الوقائي لكلا النوعين تم تطبيق نفس الجرعة ونفس البروتوكول بالنسبة للنباتين من اجل تفادي تداخل أي عامل آخر غير الخواص الوقائية لهذين النوعين.

ولغرض دراسة الدور الوقائي لهذين المستخلصين النباتيين تم استعمال جرعة تقدر ب (150 ملغ/كلغ من وزن الجسم) ، ضد ما يساوي (10 ملغ/كلغ من وزن الجسم) من CPF.

ولقد بنت نتائج دراستنا هذه قدرة كلا المستخلصين في تعديل قيم MDA النسيجية ، حيث تمكن كلا المستخلصين من خفض قيمها في انسجة جميع الاعضاء المدروسة خاصة في الدماغ والكبد وكانت النتيجة متقاربة لكلا المستخلصين ، عدا الدماغ أين سجل فيه فعالية اكثر لمستخلص (L)، كما تظهر المعاملة بهاذين المستخلصين قدرة عالية على تنشيط او تحفيز الانزيمات المضادة للأكسدة GPx ,CAT ، قيم GSH وكذا تعديل أو المحافظة على القيم الطبيعية لمجموعة المؤشرات الحيوية المدروسة الانزيمية منها ALAT ,ASLT ، وغيرها كالجلسريدات الثلاثية ، الكولسترول ،الالبومين ، الكرياتينين و حمض اليوريا في جميع الانسجة المدروسة دون استثناء . وقد يرجع هذا الى خواص هذه المستخلصات وما تحويه من مركبات (فينولية و فلافونويدية) تعزز دورها المضاد للأكسدة وذلك من خلال الاقتناص المباشر للجذور الحرة الناتجة عن مختلف العمليات الأيضية النشطة ، وبالتالي منع او حتى التخفيف من تفاعل هذه الجزيئات مع الجزيئات الخلوية وبالتالي تثبيط عملية الأكسدة الفوقية اللبيدية سواء بقطع سلسلة التفاعلات الجذرية أو من خلال تثبيط تركيب الجزيئات الجذرية والحفاظ على السلامة الوظيفية لمكوناتها ، وذلك ما تؤكده الدراسة النسيجية من خلال ابداء المظهر النسيجي العام لمجموع الانسجة المدروسة قلب، كلى وكبد ، دون ملاحظة حالات مرضية تذكر .

اما بالنسبة للدراسة الوقائية لهذين المستخلصين بجرعة تقدر ب150ملغ /كلغ تليها جرعة من CPF تقدر ب10 ملغ/كلغ من وزن الجسم بعد 30 د ، فقد بينت دور المستخلصين في خفض قيم MDA النسيجية في جميع الاعضاء المدروسة مقارنة مع مجموعة المبيد دون مجموعة الشاهد ، وقد يرجع هذا الى التدخل المباشر للنواتج الأيضية للمبيد التي قد تسبب تداخلا مع الجزيئات المضادة للأكسدة لهذين المستخلصين والتالي تنقص من فعاليتهما امام هذا المركب مما يجعل العضوية عرضة للأثر التأكسدي لهذه الجذور الناتجة عن سمية CPF ، أمام الضعف المسجل في مضادات الاكسدة في هذه الحالة .

ورغم هذا سجلنا قدرة المستخلصين النباتيين على تحفيز وزيادة نشاط مضادات الاكسدة مثل GPx و قيم GSH في كل من الكلى ، الدماغ ، الكبد والقلب على التوالي ، وقد يرجع هذا الى التدخل المباشر للمستخلصين في ازالة سمية المبيد ، مما يتيح تعويض نشاط هذه الانزيمات المضادة للأكسدة في ازالة سمية المركبات وبالتالي تعديل مستوياتها او من خلال تعزيز نشاطها . فيما يبقى هذا الاثر محدود بالنسبة CAT وهذا ما يدل على استنزاف هذا الانزيم في هذه الحالة والذي يعد الخط الدفاعي الاول في الجهاز المضاد للأكسدة، وقد يرجع هذا الى تثبيطه بواسطة التركيب الفائق لجذر $O^{\bullet}_2$. حيث بينت دراسات سابقة ان الإنتاج الفائق للجذور الحرة يؤدي الى استنفاذ الانزيمات المضادة للأكسدة مما يؤدي الى تراكم البيروكسيد في العضوية فينتج عنه الاكسدة الفوقية اللبيدية (Zhang et al., 2017)، ولكن هذا لا ينفي دور هذين المستخلصين في استرجاع قيمه في حالة هيمنة التوتر التأكسدي (مقارنة مع مجموعة المبيد) كما تبينه نتائج هذه الدراسة . ولقد جاءت نتائج دراستنا هذه مماثلة لدراسات سابقة تهدف لدراسة الدور الوقائي لمركبات مضادة للأكسدة مختلفة ضد سمية مبيد الكلوربيريفوس ، من ضمنها الفيتامينC (Raina et al.,2015 ; Rajinder et al,2015)، وكذلك الفيتامينE (Pig et al.,2013)، Diphenyl diselenide (Acker et al.,2012) ، الزنجبيل Zingiber officinale (Amos et al.,2017)، catechin and quercetine (Attia et al.,2012) ، Propolis (Kalender et al,2012) وكذا العسل (Tanvir al,2015).

يؤدي تفاعل الجذور الحرة مع الجزيئات الخلوية الي التغيير من طبيعتها وبالتالي التغيير من وظيفة و نفاذية الاغشية الخلوية ، مما يسمح بتسرب بعض الجزئيات الى المجرى الدموي . ولقد بينت نتائج دراستنا هذه دور المستخلصين النباتيين في الحماية من الاضرار النسيجية (الغشائية) ، كما هو واضح من خلال خفض قيم MDA الدالة على كبح او التخفيف من الضرر التأكسدي للمكونات الغشائية اللبيدية ، وكذا من خلال خفض قيم الانزيمات المصلية والمحافظة على قيمها السيتوزولية الطبيعية ، لما لها من اهمية لسلامة الوظيفة الكبدية ، مبينا الدور الوقائي للمستخلصين في السمية الكبدية . حيث يتمكن المستخلصين في دراستنا هذه من خفض قيم ASLT مقارنة مع مجموعة الشاهد وبالتالي الحفاظ على نشاطه، فيما يكون خفض قيم ALAT مقارنة مع مجموعة المبيد.

لا يقتصر الدور الوقائي لهاذين المستخلصين على الوظيفة الكبدية فحسب بل تسمح المعالجة المسبقة بهاذين المستخلصين من تعديل قيم الجلسريدات الثلاثية و الكولسترول ، وقد يرجع هذا الي فاعلية المستخلصين اتجاه الاضطرابات الايضية لنشاط CYP450، خفض او التخفيف من سمية CPF اضافة الى استرجاع المستوى اللبيدي (Singh and Panwar, 2014)، اضافة الى الالبومين ، اليوريا و ، وهذا ما يؤكد الدور الوقائي لهذين المستخلصين والذي يسمح بتعديل القيم لبعض المؤشرات الحيوية التي تعد عوامل مهمة للثبات الداخلي وبالتالي سلامة الوظائف الحيوية . وهذا ما اكدته نتائج الدراسة النسيجية ، حيث سمحت المعاملة المسبقة بالمستخلصين (LC) و (GC) بالتخفيف من حالات الاحتقان الوعائي الاستسقاء ، وكذا التخفيف من حدة الموت الموضعي في النسيج الكبدي ، وقد يرجع ذلك الى دور المستخلصين النباتيين في التخلص من فائض الجذور الحرة المتسبب في مجموع الاضرار النسيجية المسجلة في مجموعة المبيد وبالتالي التخفيف من حدتها ، نظرا لغناها بالمركبات المضادة للأكسدة والتي تمنحها خواصها القانصة للجذور الحرة أو القاطعة للسلسة التأكسدية مما يضمن حماية من الاضرار النسيجية ، أو من خلال المساهمة في تجديد الانسجة المتضررة .

رغم احتواء الانظمة البيولوجية خاصة الهوائية منها على اجهزة دفاع مضادة للأكسدة ، تعمل على حماية العضوية وكذا اصلاح الاضرار الجزيئية الناتجة عن نشاط الجزيئات الأوكسيجينية الحرة، الا أن التعرض المستمر للملوثات البيئية والمركبات الصناعية يزيد من خطر زيادة تشكيل الجذور الحرة مما يجعل العضوية عرضة الامراض الانحلالية والمزمنة الخطيرة .

لذا كان من الضروري البحث عن مركبات تدعم عمل هذه الانظمة الدفاعية في الجسم ، لذا أولي في الآونة الاخيرة اهتماما كبيرا للبحث عن مقاربة تمكن العضوية من التخفيف من حدة الاضرار الناتجة عن التوتر التأكسدي ، ومن هذا المنطلق فان العديد من الدراسات بينت ان اخذ المواد المضادة للأكسدة الطبيعية فعالة في الوقاية أو التخلص من بعض الاضرار (Smida et al., 2017).

ولطالما ارتبط تناول الخضر والفواكه ،والمواد النباتية بالتقليل من نسبة الاصابة بالأمراض المزمنة ،حيث بينت الدراسات الوبائية العلاقة ما بين تناول الفواكه والمواد النباتية ، و انخفاض نسبة الوفيات المرتبطة بالعمر ، مثل الامراض التاجية القلبية والسرطانات والراجع الى النشاط المضاد للأكسدة.

I- مضادات الاكسدة المصنعة

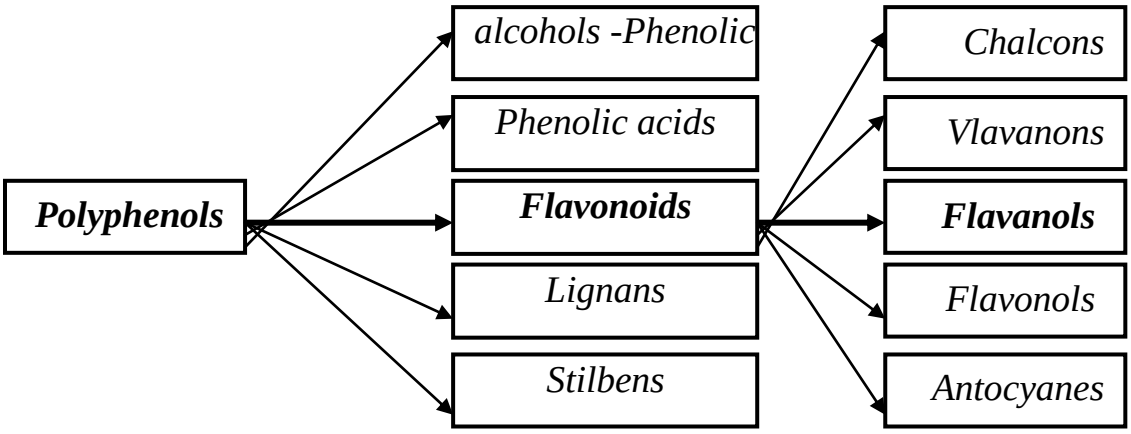
ان الدور الايجابي الذي تلعبه هذه المركبات في الدفاع عن العضوية كحماية الانظمة والأنسجة الحية ، دفع بالباحثين الى استحداث جزيئات مضادة للأكسدة مركبة أو مصنعة مثل butylated hydroxyanisole (BHA), tert-butylhydroquinone (TBHQ) Butylated hydroxytoluene (BHT) , propyl gallate(PG) . وتستعمل عادة هذه المركبات في الصناعة الغذائية لتفادي تلفها (Tusevski et al.,2014) ،وتكون هذه المركبات غالبا مرتبطة بمجموعة الكيل Alkyls من أجل تحسين ذوبانها في الدهون والزيوت ، غير ان استعمالها يخضع للتقنين وذلك بعد التأكد بان هذه المركبات مسرطنة وتسبب ظهور الاورام (Gülcin, 2012) ،لذا كان من الضروري البحث عن مصادر طبيعية آمنة لمضادات الاكسدة ،خاصة نباتية المصدر.

يحتوى غذاء الانسان على مختلف المركبات المضادة للأكسدة ، فعلى سبيل المثال من بين 600 نوع من مختلف انواع Carotenoids التي تم تحديدها، فان 50 نوع منها موجود في الحمية الغذائية للإنسان (وكل مجموعة منها تحتوى على مجموعة مختلفة بنيويا من المركبات) ، كما استخدم الانسان ومنذ القدم الزيوت والمستخلصات النباتية في العلاج من العديد من الامراض والوقاية منها ، وتنسب الخواص العلاجية لهذه المركبات الى المركبات الفينولية الغنية بها (Gülcin, 2012).

II-عديدات الفينول Phenolic compounds

تركب النباتات الطبيعية مضادات الاكسدة كمركبات ايض ثانوية ،هذه المركبات هي غالبا الفينولات ،والتي تتدخل في الآلية الدفاعية من اجل مواجهة المركبات الأوكسيجينية الحرة وتجنب الاضرار التأكسدية ،لقد وجد تنوع كبير في المركبات الفينولية النشطة بيولوجيا والمحتوية على حلقة عطرية أو اكثر في المركبات النباتية الغذائية، والتي يتخطى دورها منح النكهة ، الملمس ، اللون ، الدفاع عن النباتات ضد الأخطار الخارجية وحمايتها من الأمراض خاصة الجرثومية و الأشعة فوق البنفسجية الى مجموعة من الوظائف تختلف باختلاف انواعها ، ويعد monophenol الذي يحتوى على حلقة Benzene واحدة مثل 3-ethylphenol و 3-4 dimithylphenol من ابسط المركبات الفينولية.

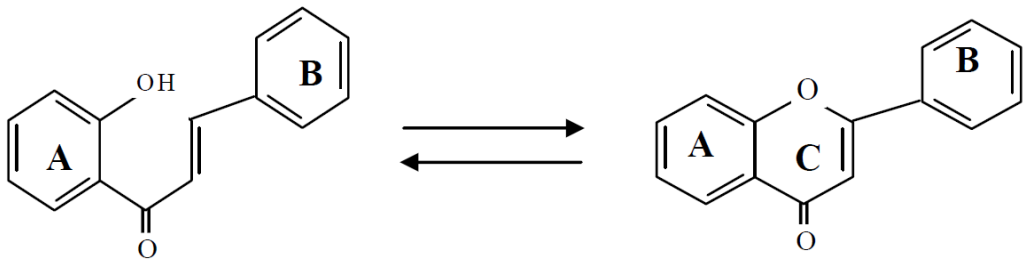
وتعد الفينولات من اكثر المركبات اهمية و انتشارا في المملكة النباتية ، وتختلف من نبتة لأخرى وذلك تبعا لنوع وعدد العمليات الأيضية التي تخضع لها وتتوزع على كامل اجزاء النبات من الجذور الى الثمار، حسب نوع النبات وطبيعة هذه الفينولات ، وتضم عديدات الفينول مجموعة جد واسعة من المركبات ابسطها الاحماض الفينولية واكثرها تعقيدا Tanine(وهي مركبات عالية البلمرة) و يمكن تقسيمها إلى عدة أقسام حسب عدد حلقات الفينول ومكوناتها الكيميائية إلى الفلافونويدات Flavonoids الأحماض الفينولية Phenolic acids، الكحولات الفينولية Phenolic -alcohols ، Stilbenes و lignans (شكل32) (Massimo et al.,2007)



شكل32: أقسام عديدات الفينول حسب عدد حلقات الفينول

II-1.الفلافونويدات Flavonoids

وتمثل المجموعة الاكبر و الاكثر تنوعا في الفينولات ، وهي مركبات مشتركة بين جميع الانواع النباتية ، حيث تم تحديد اكثر من 4000 نوع منها (Harborne et al.,1999) ومازال هذا العدد في تزايد حيث يعتقد انه يتم تحويل حوالي 109 طن سنويا من الكربون الى فلافونويدات بواسطة التمثيل الضوئي في النباتات (Agrawal and Markham ,1989)، ويشتق اسم فلافونويدات من المصطلح اللاتيني flavus أي اصفر والذي يدل على دورها المتمثل في اعطاء اللون في النباتات الى جانب مجموعة اخرى من المركبات ، وتتميز بهيكل قاعدي مشترك يتمثل في نواة الفلافان (Flavan nucleus) المتكون من 15 ذرة كربون متوضعة في شكل حلقتين من الفينيل سداسية الكربون (A,B Cycle) مرتبطة مع بعضها البعض بواسطة سلسلة ثلاثية التي يمكن ان تتحول الى حلقة غير متجانسة (C Cycle) (كما هو مبين في (الشكل33)



شكل33: البنية القاعدية للفلافونويدات (Heller and Forkmann,1993)

II-1-1.تواجدها الحيوي

توجد الفلافونويدات في اجزاء مختلفة من النبات : الجذور ، الأوراق ، الجذع ، الازهار ، البذور ، الفواكه ، الخشب .....الخ . و تتوضع بصورة عامة في القسم الهوائي ، وتتراكم الأنواع المحبة للماء منها في الحويصلات وتتركز في بشرة الأوراق أو تنتشر بين البشرة و الطبقة الوسطى (mésophile) حسب النوع النباتي . كما تختلف في الكمية والنوعية حسب مرحلة نمو النباتي ، وهناك من هي خاصة بنوع معين من الانسجة مثل Chalcons والتي توجد اكثر في بتلات الازهار، ويتم تركيب الفلافونويدات في النباتات انطلاقا من الحمض الآميني العطري Phenylalanine و Tyrosineو Malonate (Gülçin, 2012) .

وتوجد غالبا الفلافونويدات في النباتات في صورة مرتبطة مع السكريات في صورة (سكر غير متجانس) d'heterosides مشكلة من جزء فينولي aglycone أوGenin مرتبط مع سكر ،ويمكن ان تكون الروابط السكرية من نوع C-O-C أو C-C ،كما توجد بكثرة انواع اخرى من الروابط في الفلافونويدات مثل الروابط الكبريتية (Rösch et al., 2004) .

II-1-2 اقسامها

يمكن تقسيم الفلافونويدات حسب درجة اكسدة النواة المركزية ،التي يمكن ان تكون مفتوحة أو مغلقة الى تسع مجموعات هي : chalcones, aurones, flavones, isoflavones, flavonols, flavanones, flavane-3-ols flavane-3,4-diols and anthocyanins ، وتحتوي الفلافونويدات على عدة مشتقات فلافونويدية والتي تتمثل اساسا في مشتقات flavonols وFlavan .

II-1-3 نشاطها البيولوجي

نظـرا لاخـتلاف وتنـوع نشـاطها البيولـوجي اولـى العديـد مـن البـاحثين فـي عـدة مجـالات (البيولوجيـا ، الكيميـاء ،الصـيدلة والطـب) اهتمامـا كبيـرا بالفلافونويـدات . فبالإضـافة الـى دورهـا فـي إعطـاء اللـون والرائحـة ، نقـل الالكترونـات خـلال التركيـب الضـوئي ، فإنهـا تعمـل علـى مراقبـة نمـو وتطـور النبـات مـن خـلال التـداخل بطريقـة معقـدة مـع هرمونـات النمـو النباتيـة إضـافة إلـى دورهـا الأساسـي فـي حمايـة النباتـات مـن الأشـعة فـوق البنفسـجية ، الإصـابة البكتيريـة و الفطرية .

و لا يقتصـر نشـاطها علـى حمايـة الانسـجة النباتيـة فحسـب بـل بينـت العديـد مـن الدراسـات العديـد من الوظائف الوقائية لهذه المركبات لمستهلكيها ويرجع ذلك الى تنوع نشاطها الحيوي.

حيـث بينـت بعـض الدراسـات النشـاط المضـاد للسـرطان لـبعض انـواع الفلافونويـدات ، و يعـد Quercetin وCatechin والموجـودة بـوفرة فـي الاغذيـة مـن المركبـات الجـد نشـطة اتجـاه الخلايـا الورميـة ، غيـر انـه يلاحـظ ان آليـة نشـاطها تختلـف مـن نـوع لآخـر ، حيـث يعمـل Quercetin كمضـاد (Antogonist) لـل Topoisomerases I,II المركبـة مـن طـرف الخلايـا السـرطانية ، ويقـي بـذلك مـن سـرطان الجلـد والقولـون ، بينمـا تعمـل الكاتشـينات علـى تثبـيط عـدة تفـاعلات اكسـدة ، وبالتـالي تحمـي DNA مـن الاضـرار التأكسـدية (Tomofuji et al., 2009) ، كمـا ان الفلافونويـدات قـادرة علـى تثبـيط نمـو البكتيريـا (الجـراثيم) وتبقـى الآليـة التـي تمـارس بهـا الفلافونويـدات نشـاطها المضـاد للجـراثيم غيـر واضـحة كليـا (ويعتقـد انهـا تـتم مـن خـلال كسـر DNA الجـراثيم ، وبالتـالي منعهـا مـن احـداث تغيـرات تسـمح بتكاثرهـا) ولكنهـا تختلـف بـاختلاف نـوع العضـيات الدقيقـة ، الوسـط الموجـودة فيـه ، كثافتهـا ، كمـا وجـد تخصـص او نوعيـة لكـل مركـب اتجـاه الانـواع المختلفـة للبكتيريـا، كمـا تمـارس الفلافونويـدات نشـاطا مضـادا للميكروبـات ، ويرتكـز هـذا النشـاط اساسـا علـى قـدرتها علـى تثبـيط تعبيـر DNA و عـدة انزيمـات وبروتينـات غشائية للعضيات الدقيقة (Okigbo et al., 2005; Ulanowska et al. 2006) .

ومـن المعـروف ان الفلافونويـدات تمـارس نشـاطا مضـادا للفيروسـات مثـل فيـروس الزكـام ،الفيـروس المسـبب لفقـدان المناعـة المكتسـبة (VHI)،Adenovirus(ADV) ، herpes(HV) ، ويـتم ذلـك مـن خـلال تثبـيط RNAm الفيروسـي (Choi et al., 2009) ، اضـافة الـى دورهـا كمضـاد للفطريـات ، مضـادة للالتهـاب ، مضـادة للحساسـية (Enomoto et al., 2008) مضـادة للإسـهال (Galvez et al., 1993a,b) ،كمـا يمكـن للفلافونويـدات تعـديل بعـض الاسـتجابات البيولوجيـة (لـذا اطلـق عليهـا اسـم المعـدلات الطبيعيـة للاسـتجابة البيولوجيـة) مثـل : تثبـيط واختـزال مختلـف الأنزيمـات (Lipoxygenase, telomerase, cycloxygenase) ،التـداخل مـع مسـارات نقـل الإشـارة الخلويـة ، تنظـيم الـدورة الخلويـة (Massimo et al., 2007)، خفـض السـيتوكينات الالتهابيـة المفـرزة مـن الخلايـا المناعيـة (Lin et al., 2006) ، الوقايـة مـن الأمـراض القلبيـة الوعائيـة وقـدرتها علـى تحفيـز المـوت المبـرمج وتثبـيط انسـلال (توالـد) الخلايـا السـرطانية (Hirota et al., 2005)، كما يمكن للفلافونويدات ان تتداخل مع انظمة النقل الخلوي للأدوية (Boumendjel et al.,2002)، تنـافس الجلوكـوز علـى بعـض مسـتقبلاته الغشـائية (Vera et al.,1996)، التـأثير علـى عمـل الصـفائح الدمويـة (Murphy et al.,2003) ،وغيرهـا مـن الانشطة وان اهم نشاط يمكن التطرق اليه هو النشاط المضاد للأكسدة.

II-1-4 النشاط المضاد للأكسدة

تمارس الفلافونويدات نشاطها المضاد للأكسدة بعدة طرق :

1- اقتناص الجذور الحرة

تمتلـك الفلافونويـدات القـدرة علـى اسـر العديـد مـن الانـواع مـن الجـذور الحـرة Chlorine, ROS,RNS species مثل peroxyl, peroxynitrous acid, hypochlorus acid , $O^{\bullet}_{2}$, $HO^{\bullet}$ (Halliwell et al.,2005) ، ويتم ذلك من خلال نقل ذرة هيدروجين (HAT).

$$ArOH \rightarrow ArO^{\cdot} + H^{\cdot} \quad \text{.....(6)}$$

أو من خلال نقل الكترون فردي متبوعة بنقل بروتون (SET-PT)

$$\mathbf{ArOH} \rightarrow \mathbf{ArOH^{+\cdot}} + \mathbf{e^-} \quad \text{.....(7)}$$

$$\mathbf{ArOH^{+\cdot}} \rightarrow \mathbf{ArO^{\cdot}} + \mathbf{H^+} \quad \text{...(8) (Wright et al.,2001)}$$

لكن اكتشف لاحقا آلية (SPLET) والمتمثلة في فقد بروتون تليها نقل الكترون وتتم في مرحلتين :

$$\mathbf{ArOH^{+\cdot}} \rightarrow \mathbf{ArO^-} + \mathbf{H^+} \quad \text{.....(9)}$$

$$\boldsymbol{ArOH} + \mathbf{ROO^{\cdot}} \rightarrow \mathbf{ArO^{\cdot}} + \mathbf{ROO^{-\cdot}} \quad \text{.....(10)}$$

وتلعب مجموعة الهيدروكسيل 7-OH دورا مهما كموقع للتأين ،ولنقل الالكترون في هذه العملية .(Litwinienko and Ingold 2003, 2004; Foti et al. 2004a, b) . ويمكن للالكترونات غير المتزاوجة أن تنتقل إلى الحلقة العطرية أو تكمل دورتها من خلال عدة عمليات، سواء بالتداخل مع جذور حرة أو مضادات أكسدة أخرى .

2- تثبيط الانزيمات

تمتلك الفلافونويدات خاصية تثبيط انزيمات الاكسدة و الارجاع ك xanthine Oxydase , Lipoxygénase, cyclo-oxygenase, monoxygenase ,proteine kinase, phospholipase A2 ، والتي تعد مصدرا اساسيا لتشكيل الجذور الحرة خلال دورتها التنشيطية .

3- الاتحاد مع الأيونات المعدنية (Cu^+,F_e^{2+}) : (تشكيل معقد مع الأيونات المعدنية)

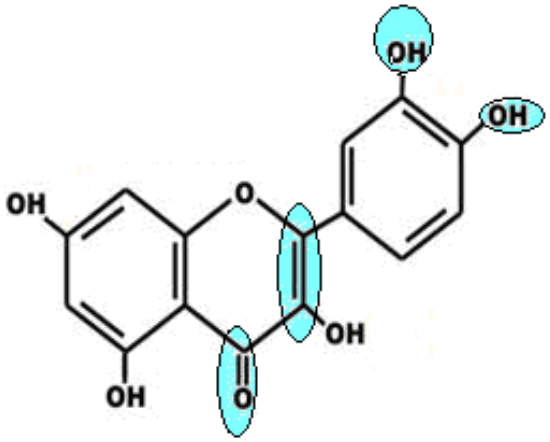
ان وجود المعادن مثل Cu^+,F_e^{2+} في الوسط قد يساهم في تشكيل الجذور الحرة وذلك من خلال تفاعل Fenton ،غير أن الفلافونويدات يمكنها أن تتحد مع هذه المعادن وتشكل معقد مستقر وبالتالي تساهم في خفض نسبة الجذور الحرة من خلال تثبيط هذا التفاعل .

4- تجديد مضادات الأكسدة المرتبطة بالغشاء مثل α-tocopherol

إضافة إلى دورها في تجديد الفيتامين E الغشائي ، تعمل الفلافونويدات على توفير الفيتامين E خاصة في LDL من خلال التأكسد بدله وتجديده بمنحه ذرة هيدروجين.

وترجع هذه الخواص المضادة للأكسدة الى البنية الوظيفية الخاصة لهذه المركبات (كما هو مبين في الشكل) ، وقد تكون وجود مجاميع الهيدروكسيل اهم صفة تسمح بإعطائها هذه الخواص ، حيث يعتبر وجودها في الحلقة B المعيار التركيبي الأكثر دلالة للنشاط المضاد للأكسدة، كما يدعم وجودها في الموقع 3 وكذا 5 للحلقة C هذه الخاصية .

ومن جهة أخرى كلما زادت درجة الهدرجة كلما زادت القدرة المضادة للأكسدة ، كما أن عملية البلمرة يمكن أن تحسن أو توفر النشاط المضاد للجذور كما هو الحال بالنسبة لمماكبات Rutineو procyanidins . اضافة الى دور الرابطة الثنائية في الحلقةC بين C2 وC3 و الوظيفة الكربونيلية C4 التي تسمح بالانتقال الإلكتروني الثابت للجذر فينوكسي Phenox



شكل 34 : المركبات التي تشارك في التفاعل المضاد للأكسدة

III- الدور الوقائي للمستخلصات النباتية اتجاه سمية المبيدات الفسفوعضوية

لقد ازداد الاهتمام في السنوات الاخيرة بدراسة الدور الوقائي للمستخلصات النباتية أو المركبات المعزولة منها اتجاه مختلف الاضطرابات المرضية ، خاصة تلك الناتجة عن التوتر التأكسدي . وباعتبار أن الآلية الخلوية لسمية المبيدات الفسفوعضوية ناتجة عن تشكيل الجذور الحرة ، فان استعمال مضادات الاكسدة يعد الآلية الاساسية ضد بعض الاضرار الناتجة عن سمية هذا النوع من المبيدات .

حيث بينت دراسة ل (Heikal et al., 2012) الدور الوقائي للمستخلص المائي للشاي الاخضر ضد السمية الكلوية الناتجة عن مبيد الكلوربيريفوس ، وذلك من خلال التخفيف من مظاهر التوتر التأكسدي وخاصة قيم الاكسدة الفوقية اللبيدية ، وكذا الاضرار النسيجية الملاحظة في النسيج الكلوي و كذا تعديل قيم بعض المعايير الكيميائية . ان اهم المركبات الفعالة في الشاي هي الكاتشينات Catechins والتي تعتبر من اكثر مضادات الاكسدة نشاطا ، ويرجع ذلك لقدرتها على اختزال الالكترونات ، اضافة الى ذلك فان الشاي الاخضر يحتوي على معادن تعمل كعوامل مرافقة للانزيمات المضادة للاكسدة Zinc, Selenium, Manganese . وتمتلك عديدات الفينول آلية اضافية تسمح لها بخفض مستوى الاكسدة اضافة الى دورها المباشر كمضادات اكسدة وذلك من خلال : الارتباط مع الايونات مثل الحديد والنحاس وبالتالي منعها من المشاركة في العمليات التأكسدية ، الحماية من تحفيز العوامل الاستقرائية التاكسدية ،التخلص من محفزات التوتر التاكسدي مثل

Lipoxygenase(LOX-2), Cyclooxygenase(COX-2), (iNOS) ، وكذا تحفيز الانزيمات المضادة للأكسدة . كما بينت دراسة ل(Korany and Ezzat ., 2011) الدور الوقائي لكل من الشاي الأخضر والمستخلص الزيتي للحبة السوداء *(Nigella Sativa)* ضد سمية المبيد الفسفوعضوي Fenitrothion في الغدد النكفية Parotide gland .حيث تمكن المستخلصان من التخفيف من السمية الخلوية وكذا الأعراض النسيجية لكن الشاي وفر حماية احسن من المستخلص الزيتي للحبة السوداء ،وقد يرجع ذلك كما سبقنا الذكر لغناه بالمركبات الفينولية والفلافونويدية.

يعد Catechin وQuercetin من اكثر مضادات الاكسدة تواجدا في النباتات ، ولقد لقيت اهتماما واسعا حيث اجريت عدة دراسات حول نشاطهما المضاد للأكسدة. ففي دراسة ل (Uzun and Kalender, 2013) أظهرت الدور الوقائي للمركبين ضد الاضرار الكبدية ، النسيجية وكذا المعايير الدموية الناتجة عن مبيد CPF ، كما بينت دراسة سابقة (Uzun et al., 2010) دور هذه المركبات في الوقاية من السمية الرئوية الناتجة عن نفس المبيد ، وذلك من خلال خفض قيم MDA، تحفيز نشاط الأنزيمات المضادة للأكسدة CAT,SOD, GST, GPx ،وكذا تخفيف بعض الاضرار النسيجية . وترجع الخاصية المضادة للأكسدة للفلافونويدات الى الاقتناص المباشر لبعض الانواع الجذرية ، تجديد بعض مضادات الاكسدة الاخرى ك α-tocopherol من خلال منحها ذرة هيدروجين ، كما تعرف الفلافونويدات وخاصة Quercetin بتعديل نشاط عدة أنزيمات وذلك من خلال تداخلها مع عدة جزيئات . كما يساهم Catechin و Quercetin في الحماية الجزئية من السمية القلبية الناتجة عن مبيد CPF ، وذلك من خلال حماية الأنزيمات المضادة للأكسدة والوقاية من الاضرار التأكسدية والموت الخلوي بعدة طرق . وقد يرجع الاثر الوقائي من السمية الخلوية للQuercetin الى قدرته الى على التفاعل وكذا النفوذ في الطبقة اللبيدية المزدوجة . (Bas and Kalender,2011)

ولا يقتصر دور مضادات الاكسدة الطبيعية على الاقتناص المباشر للجذور الحرة وتحفيز الجهاز المضاد للأكسدة وإنما يمكن لهذه الأخيرة تعديل التعبير الجيني ومسارات نقل الاشارة ، وبالتالي الوقاية من حدوث الموت المبرمج .

نأخذ كمثال عن ذلك المادة الفعالة Crocin والمشتقة من نبتة الزعفران (*Crocus Sativus L.*)، حيث بينت دراسة (Razavi et al ., 2013) دور هذا المركب في الوقاية من السمية القلبية الناتجة عن المبيد الفسفوعضوي Diazinon (DZN) ، وذلك من خلال خفض قيم LPO و المساهمة في زيادة محتوى GSH في النسيج القلبي. ويرجع هذا الدور الوقائي الى تثبيط الأكسدة الفوقية اللبيدية مما يؤدي الى ثبات الغشاء البلازمي وبالتالي الوقاية من تحرير الانزيمات القلبية . كما يمارس دوره المضاد للموت المبرمج من خلال دوره التثبيطي ل TNF-α (المسبب للموت المبرمج الخلوي) ، تعديل تعبير البروتينات من عائلة Bcl2(المتدخلة في تعديل مسارات الموت المبرمج) وتثبيط تحرير Cyp c في السيتوزول .

ومـن المعـروف ان المركبـات الفينوليـة والفلافونويديـة تلعـب دورا اساسـيا فـي الحفـاظ علـى النسـبة مضادأكسـدة/ مؤكسـد وذلـك مـن خـلال خواصـها المضـادة للأكسـدة وكـذا مـن خـلال تحفيـز الجهـاز المنـاعي كمـا هـو الحـال بالنسـبة لمسـتخلص البصـل الاحمـر(*Allium cepa L.*) ، الـذي يسـاهم فـي الحفـاظ علـى حيويـة كريـات الـدم الحمـراء وبالتـالي حمايـة الجهـاز الوعـائي مـن خـلال خفـض قـيم LPO وتعـديل نشـاط الجهـاز المضـاد للأكسـدة وكـذا تحفيـز الجهـاز المنـاعي (Jaiswal et al ., 2013) ، كمـا يسـاهم المركـب eugenol المشـتق مـن النـوع النبـاتي *Syzygium* والمتواجـد بكثـرة فـي العديـد مـن الزيـوت الاساسـية النباتيـة ، فـي الوقايـة مـن السـمية المناعيـة الناتجـة عـن سـمية مبيـد CPF وذلـك مـن خـلال تحفيـز الخلايـا اللمفاويـة ، تعـديل النسـبة الكميـة الاجماليـة لكريـات الـدم البيضـاء تحفيـز نشـاط CAT و تعـديل قـيمIgG (Elelaimy et al.,2012)

ويبقـى العسـل أو احـد مشـتقاته خاصـة Propolis (العكبـر) مـن اكثـر المـواد دراسـة فـي ازالـة سـمية المبيـدات الفسفوعضـوية ، وقـد يرجـع ذلـك لغنـاه بالمكونـات الفينوليـة والفلافونويديـة التـي تتغيـر بتغيـر المنطقـة و نوعيـة النبـات الـداخل فـي التغذيـة ، حيـث بـين (Tanvir et al ., 2015) دور العسـل فـي الحمايـة مـن سـمية المبيد CPF مـن خـلال تعـديل قـيم الانزيمـات المصـلية الكبديـة ، تعـــديل بعـــض المعـــايير الكيميائيـــة الكبديـــة والكلويـــة كالكلســـترول ، الكريـــاتينين ، اليوريـا....وغيرهـا، والوقايـة مـن التغيـرات النسـيجية فـي كـلا العضـوين ، وذلـك مـن خـلال تثبـيط الاكسـدة الفوقيـة الليبيديـة . و لا يقـل Propolis اهميـة عـن العسـل حيـث بينـت دراسـات سـابقة (Attia et al ., 2012) (Diab et al ., 2012) الـدور الوقـائي لهـذه المـادة اتجـاه السـمية العصـبية، الكلويـة والكبديـة وفـي نسـيج الخصـيتين وذلـك مـن خـلال تعـديل قـيم الانزيمـات المضـادة للأكسـدة CAT,SOD ,GST ,GPx زيـادة قـيم GSH النسـيجية وكـذا خفـض قـيم LPO . كمـا يعمـل علـى خفـض قـيم الكـورتيزول، ويرجـع هـذا لخواصـه المضـادة للأكسـدة . ان اهـم خاصـية مضـادة للأكسـدة لهـذا المسـتخلص ترجـع لقدرتـه علـى اقتنـاص جـذر HO• وتثبـيط الاكسـدة الفوقيـة الليبيديـة ، كمـا يعمـل علـى تنشـيط مضـادات الاكسـدة ، ويرجـع ذلـك الـى غنـاه بالمكونـات الفينوليـة والفلافونويدية .

التجارب خارج العضوية *In vitro* Essay

I- قياس النشاط المضاد للاكسدة للمستخلصين النباتيين

I- 1 تقدير المركبات الفينولية الكلية

تم تقدير محتوى المركبات الفينولية الكلية في مختلف المستخلصات لنباتي *Genista ulicina* *Limonium Pruinosum (L.)* باستعمال كاشف Folin–Ciocalteus reagent واعتمادا على المنحنى القياسي لحمض الجاليك Gallic acid حسب طريقة (Singleton et al. 1999).

حيث تمزج 20µl من العينة مع 100µl من Folin–Ciocalteus reagent و 1580µl من الماء المقطر وبعد 3 دقائق يضاف 300µl من كربونات الصوديوم Na_2CO_3 ويترك للتفاعل لمدة ساعتين في درجة حرارة الغرفة .ثم تقرأ الكثافة الضوئية على طول موجة 765 نانومتر.

يحضر المنحنى القياسي باستعمال التراكيز 0, 50,100,150,200,250, 500 (ملغ/ملم) من حمض الجاليك المذاب في الميثانول و الماء بنسبة (90:10). يحدد تركيز المركبات الفينولية الكلية في مختلف المستخلصات بالميكروغرام لحمض الجاليك المكافئ ل1 ملغ من المستخلص بإتباع المعادلة المحصل عليها من المنحنى القياسي لحمض الجاليك.

I- 2 تقدير الفلافونويدات الكلية

1.المبدأ

تعتمد معايرة الفلافونويدات على الخصائص المخلبية للجزيئات الفينولية ضد كلورور الألومينيوم ($AlCl_3$) ذو التركيز 2% المذاب في المحلول الميثانولى النقي.

يعتمد مبدأ التفاعل على تشكل معقد بين كلورور الألومينيوم و ذرات الأوكسجين الموجودة على ذرات الكربون 4 و 5 للفلافونويدات.

2.الطريقة

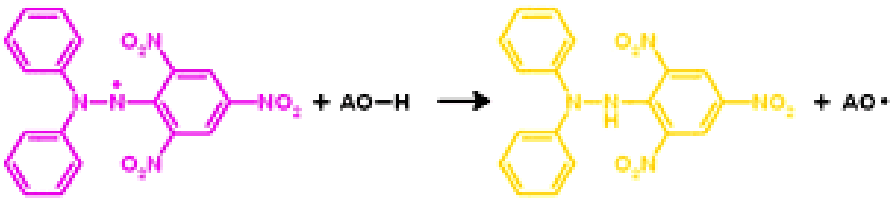
لتقدير كمية الفلافونويدات الكلية في المستخلصين لنباتيين *Genista ulicina* و *Limonium Pruinosum (L.)* يتم اضافة 0,5mL من أحد المستخلصين الى نفس الكمية من $AlCl_3$ (2%) المذاب في الميثانول, يترك الخليط لمدة ساعة في درجة حرارة الغرفة ثم تقرا الكثافة الضوئية على طول الموجة 420nm .

يستعمل Quercetin كمعيار، اذ يحضر المنحنى المعياري باستعمال التراكيز 30,25,20,15,10,5,0 (µg/ml) من Quercetin المذاب في الميثانول وذلك حسب طريقة (Ordonez et al., 2006).

3.I اختبارDPPH : دراسة الفعل الآسر للمستخلص النباتي للجذر الحر DPPH

1- المبدأ

لقد تم قياس النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص النباتي المستعمل في دراستنا هذه من خلال قدرته على منح ذرة هيدروجين أو إلكترون (Bektas et al., 2006) والمتمثل في فعله الآسر للجذر الحر DPPH (Diphenyl-2-picryl-hydrozyl , stable free radical) ويرتكز هذا الاختبار على قدرة المستخلص على أسر الجذر المستقر DPPH (Ju-Sung and Myong-Jo, 2010) ، ويظهر ذلك من خلال التفاعل اللوني الحاصل للجذر DPPH (2-2'-diphenylpicrylhydrazyl) ذو اللون البنفسجي الذي يتحول إلى DPPH-H (2-2'-diphenylpicrylhydrazine) ذو اللون الأصفر ، ويترجم هذا التغيير في اللون بانخفاض الامتصاصية الضوئية (OD).



شكل35: تفاعل مضاد أكسدة مع الجذر الثابت DPPH

2- الطريقة :

حسب (YuCao et al., 2009; Naznin et al., 2009) و تتمثل الخطوات باختصار في :
بعد تحضير تراكيز مختلفة من المستخلص الميثانولي للنبتة، يؤخذ 0.1 ملل من كل تركيز ويضاف إليه 3مل من محلول DPPH الميثانولي ذو التركيز 0.004٪ ، ثم ترج الأنابيب جيدا ثم تحضن في الظلام لمدة 30 دقيقة ، ثم يتم تسجيل قراءات الكثافة الضوئية للتراكيز المختلفة في جهاز المطيافية الضوئية Spectrophotométre عند طول الموجة517 نانومتر.

ويتم حساب النسبة المئوية لتثبيط الجذر DPPH (I٪) وفق المعادلة التالية :

$$\%\ DPPH\ radical\text{-}scavenging = [(Absorbance\ of\ control - Absorbance\ of\ test\ Sample) / (Absorbance\ Of\ control)] \times 100$$

Ac : الكثافة الضوئية للعينة القياسية

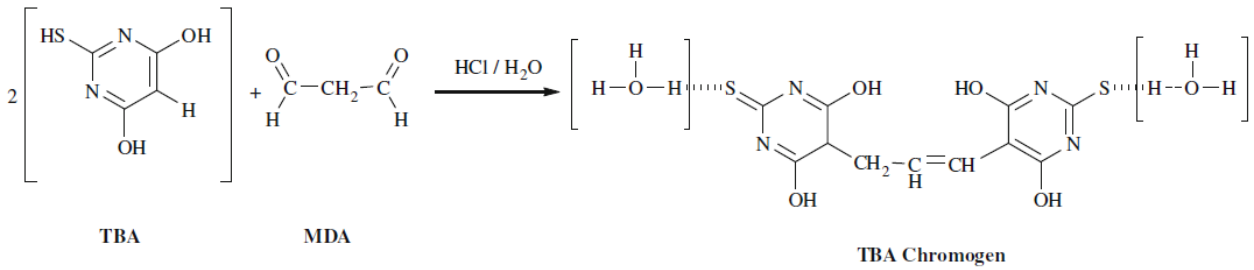
As : الكثافة الضوئية للعينة

أما حساب التركيز المثبط ل50٪ من نشاط DPPH (IC_{50})، فيتم انطلاقا من منحنى الامتصاصية الضوئية بدلالة التركيز. وتتم مقارنة النتائج مع نظيرتها بالنسبة ل Quercetine الذي استعمل كمضاد أكسدة مرجعي .

4.I اختبار الاكسدة الفوقية اللبيدية Lipid peroxidation

1- المبدأ

يتم تحديد النشاط المثبط للأكسدة الفوقية اللبيدية للمستخلصات النباتية المدروسة حسب طريقة (Banerjee et al., 2005)، بتقدير تركيز(MDA) الناتج عن الأكسدة الفوقية للبيدات انطلاقا من صفار البيض المتفاعل مع حمض thiobarbituric (TBA) ، ويظهر ذلك من خلال ظهور ترسبات حمراء اللون و التي يمكن قياسها مطيافيا على طول الموجة 532nm (Gülcin, 2012).



شكل36: تشكل مولد اللون TBA Chromogen والناتج عن تفاعل جزيئتي TBA مع جزيئة MDA (Gülcin, 2012) .

2-الطريقة

يحضر معلق صفار البيض (10%) باستعمال محلول PBS البارد (PH=7 ,4) ، يعرض المعلق للطرد المركزي .ثم يحضن 0.5 ملل من السائل الطافي مع 0.1 ملل من المستخلصات النباتية بتركيز 0,5,0,4,0,3,0,2,0,1 (مغ/ملل) في وجود50 ميكرولتر من محلول $FeSO_4$ (0.07M) لمدة ساعة في درجة حرارة 37م° ثم بعد ذلك يضاف 1ملل من (TCA 1%) و0,5 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.

II- النتائج والمناقشة

II- 1 المحتوى الفينولي والفلافونويدي للمستخلصين النباتيين

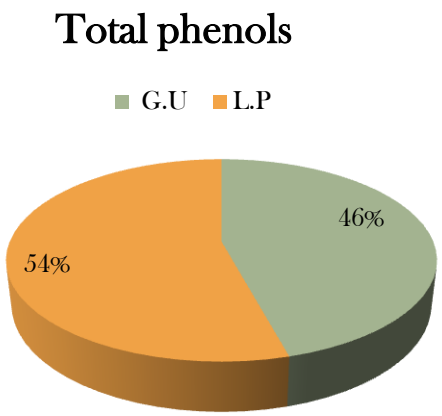
تحظى المركبات الفينولية وخاصة الفلافونويدية منها باهتمام واسع في المجال الطبي والصيدلاني ويرجع ذلك لتنوع خواصها ، وتعتبر كمصدر طبيعي لمضادات الاكسدة وقد تستعمل كمؤشر جيد للقدرة المضادة للأكسدة (Ananth et al., 2014).
وتعتبر المركبات الفينولية جد مهمة بسبب مجاميع الهيدروكسيل التي تعطيها الخاصية المضادة للأكسدة (Acker et al., 2012) .

لقد سمح قياس كمية المركبات الفينولية والفلافونويدية في المستخلصين المدروسين الى اعطاء النتائج التالية ،حيث يبدو ان المستخلصان النباتيان غنيان بالمركبات الفينولية ، بينما يحتوي المستخلص النباتي ل(*L.) Limonium Pruinosum* على كمية اكبر من الفينولات µg/mg(0,019±308) مقارنة بالمستخلص النباتي *Genista ulicina* µg/mg(0,002±260) من حمض الجاليك المكافيء/ملغ مستخلص ، (شكل37) .

بينما يحتوي المستخلص البيتانولي لنباتي *Genista ulicina* و(L.) *Limonium Pruinosum* على كمية كبيرة من المركبات الفلافونويدية قدرت ب (0,010±318) و µg/mg (0,029±305) على التوالي (شكل38) ، وهاذ ما يدل على ان اغلبية المركبات الفينولية الموجودة في المستخلص البيتانولي ل *Genista ulicina* هي مركبات فلافونويدية ، فيما يتميز المستخلص النباتي البيتانولي ل*Limonium Pruinosum* بتنوع المركبات الفينولية .

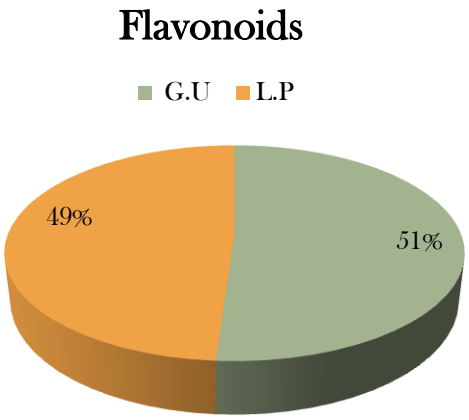
وهذا ما اكدته دراسة سابقة اجرتها الباحثة (Boutaghane, 2013) وذلك عند فصل مكونات المستخلص البيتانولي لنبات *Genista ulicina* حيث كشفت عن وجود ستة انواع من الفلافونويدات تم كشفها اول مرة في النوع *Genista* :ثلاثة من نوع flavonols quercetin, isorhamnetine, kaempferol وهي معروفة بتنوع خواصها البيولوجية خاصة : مضادة للاستسقاء ، مضادة للالتهاب ، مضادة للتخثر ، مضادة لانخفاض الضغط الدموي ، مضادة للنزيف ، اثنان من نوع flavones ونوع منisoflavonoide . كما بينت الدراسات غنى هذا النوع النباتي بنوعين من المركبات Les alcaloides والفلافونويدات خاصة من نوع isoflavones ، ويعزى عموما النشاط الصيدلاني للمستخلصات النباتية الطبية حسب تقارير دراسات حديثة الى المركبات الفينولية والفلافونويدية (Ananth et al., 2014).

ويسمح هذا التنوع في المركبات الفينولية بتنوع الخواص البيولوجية للمستخلصين النباتيين المدروسين كالخاصية المضادة للالتهاب ، تعديل ايض المواد السامة ، تثبيط الانزيمات المؤكسدة ، التدخل في مسارات نقل الاشارة الخلوي ،الحفاظ على التوازن مؤكسد/مرجع ،.....والعديد من الخواص الاخرى والتي تعمل على تعزيز الخاصية المضادة للأكسدة.



شكل37 : يوضح كمية الفينولات الكلية في المستخلص البيتانولي لنباتي

Limonium Pruinosum (L.) و *Genista ulicina*



شكل38 : يوضح كمية الفلافونويدات في المستخلص البيتانولي لنباتي

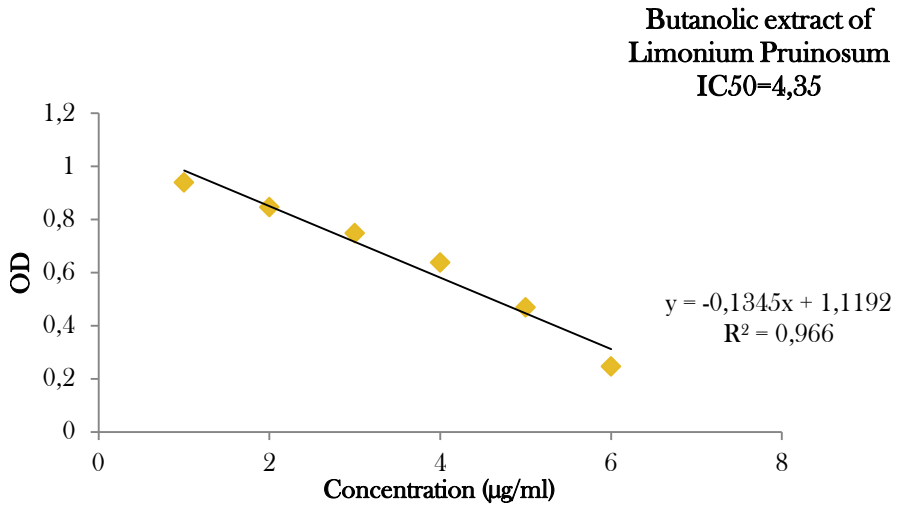
Limonium Pruinosum (L.) و *Genista ulicina*

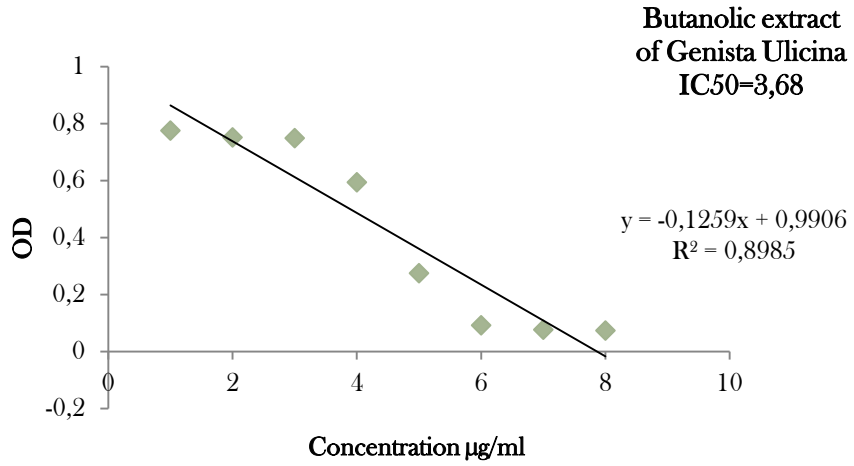
II -2 النشاط الآسر للجذر الحر DPPH

يعد اختبار النشاط الاسر للجذر الحرDPPH احد اهم الطرق و الاكثر استعمالا لقياس النشاط المضاد للأكسدة من خلال قياس القدرة على منح ذرة هيدروجين ، ويعتبر جذر DPPH جذرا مستقر عموما ، حيث يقبل الكترون أو جزيئة هيدروجين لكي يصبح جزيئة ثابتة ، ويستعمل هذا الجذر عموما من اجل تقييم النشاط المضاد للأكسدة وذلك لقدرته على تحديد المكونات النشطة حتي عند جرعات ضئيلة (Ananth et al., 2014).

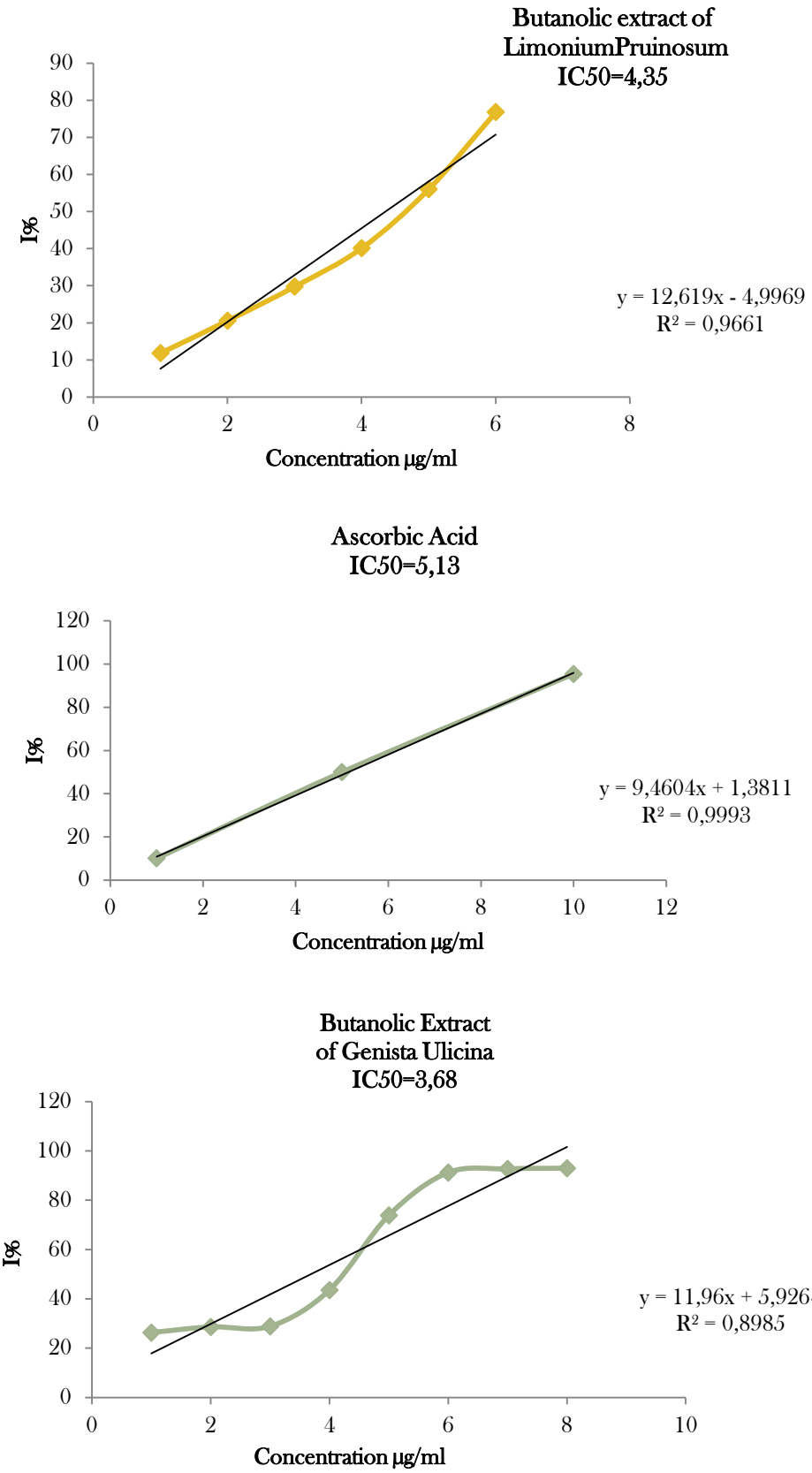
ابدى كل المستخلصين النباتيين قدرة عالية على اقتناص جذر DPPH، مقارنة مع الفيتامين C (IC50=5,18±0,12µg /ml) عالى النشاط ، حيث قدرت قيم IC_{50} لكل من المستخلصين *Genista ulicina* و(L.) *Limonium Pruinosum* ب 3,68 µg /ml و 4,35 µg /ml على التوالي (شكل 40،39) .

وتترجم قدرة المستخلص النباتي على تعديل او اقتناص الجذر DPPH نشاطها المضاد للأكسدة ، والذي يرجع اساسا الى غناها بالمركبات الفينولية كما بينت نتائج بحثنا ، حيث تمتلك هذه المركبات قدرة عالية على تعديل أو اقتناص الجذور الحرة بعدة طرق اهمها منح ذرة الهيدروجين ، وقد يفسر القدرة العالية للمستخلص النباتي *Genista ulicina* لاحتوائه على اكبر نسبة من الفلافونويدات والتي تتميز بقدرتها المضادة للأكسدة مقارنة مع بقية المركبات الفينولية ، ويرجع هذا النشاط المضاد للأكسدة الى خواصها التركيبة كما سبق الذكر





شكل39: الامتصاصية الضوئية للنشاط القانص للجذر الحر DPPH للمستخلصين النباتيين *Genista ulicina* و*Limonium Pruinosum* (L.) عند تراكيز مختلفة (متوسط 3 تكرارات)



شكل40: النشاط القانص للجذر الحر DPPH للمستخلصين النباتيين *Genista ulicina* و *Limonium Pruinosum (L.)* والفيتامين C.

3.II اختبار النشاط المثبط للأكسدة الفوقية للدهون Lipid peroxidation

ان الاكسدة الفوفية اللبيدية LPO هي اكسدة الاحماض الدهنية عديدة عديمة التشبع(PUFAs) في الغشاء الخلوي مشكلة جزيئة (MDA) Malondialdehyde كمركب نهائي ، ويرجع ذلك لوجود عدة روابط مزدوجة بين ذرات الكربون ، وبما ان (PUFAs) غير مستقرة فإنها تستطيع التفاعل بسرعة مع المركبات الاوكسيجينية الحرة ، من اجل تشكيل الجذور اللبيدية Lipid peroxide radical مسببة اضرار تأكسدية (Ananth et al., 2014) .

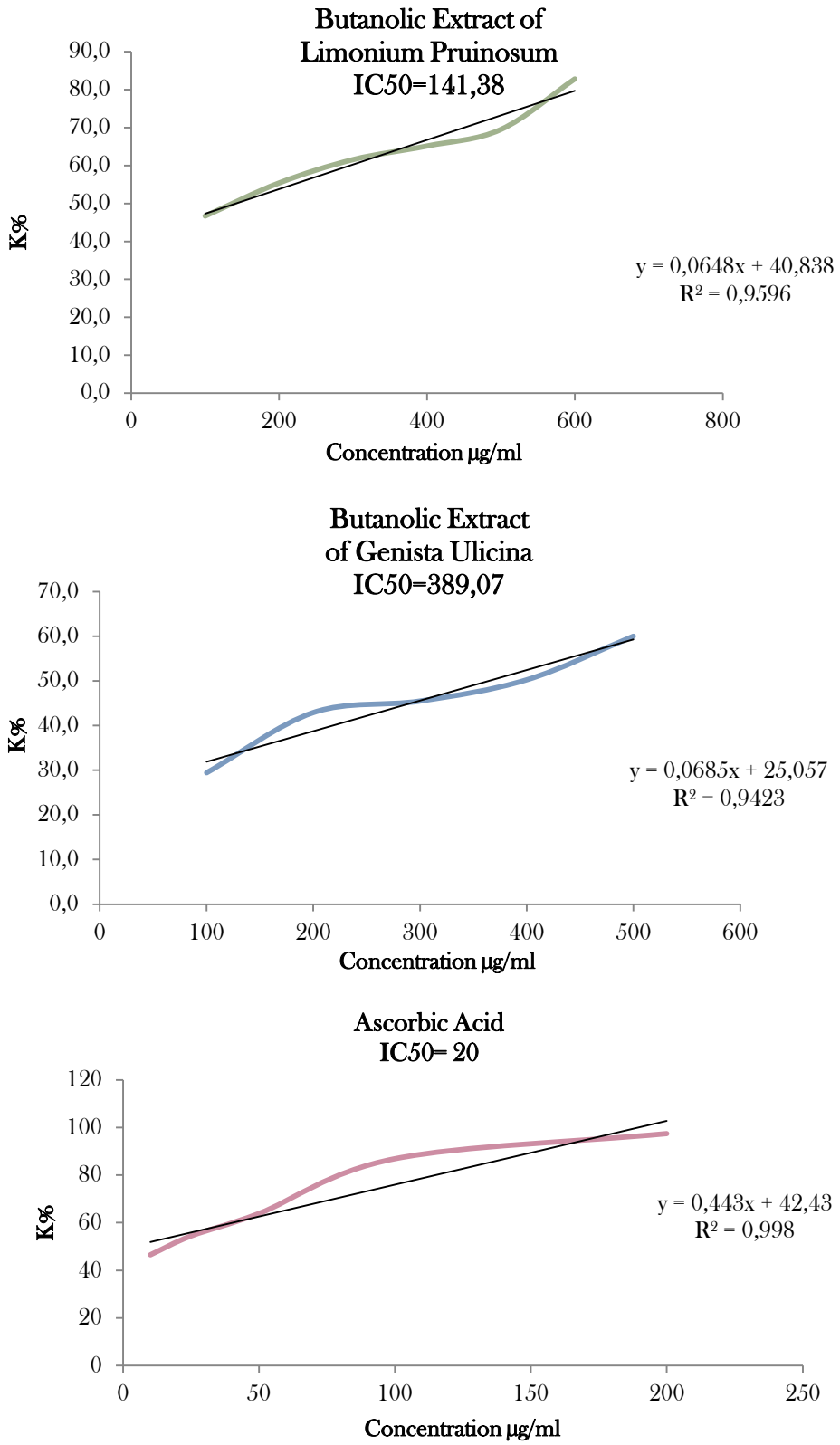
ويمكن لمضادات الاكسدة تثبيط أو تأخير عمليات الاكسدة بواسطة طريقتين : اما عن طريق الاسر المباشر للجذور الحرة وتدعى في هذه الحالة مضادات الاكسدة بالأولية ، وتضم مضادات الاكسدة الاولية المركبات الفينولية مثل α-tocopherol وتستنفذ هذه المركبات خلال مرحلة الاستقراء (التخليق) ، و اما عن طريق آلية غير مباشرة تتدخل بها مضادات الاكسدة الثانوية بعدة آليات كالارتباط مع الايونات المعدنية ، اقتناص الجزيئات الأوكسيجينية النشطة ، تحويل Hydroperoxides الى صيغ غير جذرية ، امتصاص الاشعاعات فوق البنفسجية أو تثبيط $^1O_2$. وتبدي مضادات الاكسدة الثانوية نشاطا مضادا للأكسدة فقط في حالة وجود المركبات الثانوية ، مثل الفيتامين C الذي يكون فعالا في وجود tocopherol او مضادات اكسدة اولية اخرى (Gulçin et al ., 2008a).

ان سلسلة التفاعلات الجذرية هي غالبا الآلية المشتركة للأكسدة الفوقية اللبيدية ، ويعد اسر الجذور الحرة احد الآليات المعروفة في تثبيط الاكسدة الفوقية اللبيدية بواسطة المركبات الفينولية ، حيث تعمل هذه المركبات على تعديل حالة توازن الاكسدة-ارجاع الخلوي وذلك من خلال تثبيط مرحلة الانطلاق او الانتشار ، مسببة توقف التفاعل وتأخير العملية التأكسدية ، كما بيت الدراسات قدرت الفينولات عل تعديل ايض المواد السامة .

يبين حضن فسفولبيدات البيض في (FeSO4) Ferrous Sulphate في عملنا هذا ، الاكسدة غير الانزيمية السريعة. وفعالية النشاط المثبط للأكسدة الفوقية اللبيدية للمستخلص البيتانولي *Limonium Pruinosum* تقدر ب IC_{50} =141,38 مقارنة مع الفيتامينC ب IC_{50}=20 المعروف بنشاطه المضاد للأكسدة العالي ، فيما ابدى المستخلص النباتي *Genista Ulicina* نشاطا اقل يقدر ب IC_{50} =389 (شكل 41) .

وقد يرجع ذلك الى اختلاف المكونات الفينولية لكل مستخلص وبالتالي اختلاف تأثيرها او فعاليتها في كل عملية ، او قد يرجع ذلك الى استنفاذ مضادات الاكسدة الاولية في عملية الانطلاق او الانتشار مما يضعف النشاط المثبط للأكسدة اللبيدية في المستخلص النباتي *Genista Ulicina* ، حيث بينت التقارير ان مشاركة مضاد الاكسدة في التفاعلات الجانبية للسلسلة التأكسدية في مرحلة الانطلاق أو الانتشار قد ينتج عنه نقص في كفاءة مضاد الاكسدة وذلك من خلال تركيب صيغ جذرية جديدة يكمل حركية السلسة التأكسدية (Gulçin, 2012) .

ولا يعتمد النشاط المضاد للأكسدة على البنية الكيميائية ، أو تفاعلها مع الجذور أو الجزيئات النشطة الاخرى فحسب ، بل تعتمد كذلك على عدة عوامل اخرى مثل التركيز ، درجة الحرارة ، مستوى الاضاءة ، نوع مادة التفاعل ، الحالة الفيزيائية للنظام وكذلك عدد المركبات الجزيئية التي تنشط كسوابق مؤكسدة أو المساعدة لها .



شكل41: النشاط المضاد للأكسدة اللبيدية للمستخلصين النباتيين *Genista ulicina* و *Limonium Pruinosum (L.)* والفيتامين C .

يعد كلوربيريفوس المبيد الفسفوعضوي ، مبيدا قادرا على احداث التوتر التأكسدي في مختلف أنسجة الأعضاء المدروسة بجرعة تقدر ب10ملغ/كلغ ،من خلال ظهور مؤشرات التوتر التأكسدي كالزيادة في قيم MDA النسيجية وانخفاض نشاط الانزيمات المضادة للأكسدة ،ومستوى GSH ،والتي تعد مؤشرات على حدوث اختلال في الثبات التأكسدي الخلوي ،والراجع عموما الى التركيب الفائق للجذور الحرة و استفحال الأكسدة الفوقية اللبيدية ،حيث تعد هذه الاخيرة الآلية الجزيئية لسمية هذا النوع من المبيدات ،مسببة اضرار نسيجية كNecrosis، Oedema وحالات الالتهاب والاحتقان الوعائي، ويتزامن ذلك مع الزيادة في نسبة الانزيمات المصلية ، دليل تسربها عبر الأغشية الخلوية المتضررة ، اضافة الى مختلف الاضطرابات في مختلف المؤشرات الحيوية Triglycerides ,Cholesterol Albumin,Creatinine,Uric Acid الدالة على الاختلالات الوظيفية لتي رافقت هذه الاضطرابات.

و سمحت المعاملة بالمستخلصين النباتيين *Genista ulicina* و *Limonium pruinosum* بفضل دورهما الوقائي من تنشيط انزيمات الجهاز المضاد للأكسدة ، و الحفاظ على القيم العادية لمختلف المؤشرات البيولوجية المدروسة ، وكذا تحسين بعض الأضرار النسيجية .

بينما سمحت المعاملة المسبقة بالمستخلصات النباتية بجرعة تقدر ب150 ملغ/كلغ بالتخفيف من مظاهر التوتر التأكسدي من خلال خفض قيم MDA النسيجية ، تنشيط انزيمات الجهاز المضاد للأكسدة واستعادة النسب العادية لبعض المؤشرات البيوكميائية ، اضافة الى خفض قيم الانزيمات المصلية بفضل تحسينها لبعض الاضرار النسيجية المسجلة . ويرجع الدور الوقائي لهذه المستخلصات ، الى غناها بالمركبات الفينولية والفلافونويدية ذات الخواص المضادة للأكسدة ، من خلال قدرتها على تثبيط الاكسدة الفوقية اللبيدية و نشاطها الآسر للجذور الحرة والمثبتة من خلال نتائج الدراسة خارج العضوية *In Vitro*، زيادة الى دورها المثبط لسمية المركبات الأيضية النشطة لهذا المبيد ، وكذا تجديد وتعويض نشاط الانزيمات المضادة للأكسدة .

Abdelaziz K.B., El Makawy A.I., Elsalam, A.Z.E.-A.A., Darwish A.M. (2010). Genotoxicity of chlorpyrifos and the antimutagenic role of lettuce leaves in male mice. Comun. Sci. 1 (2), 137e145.

Abdollahi M., Ranjbar A., Shadnia S,. Nikfar S,. Rezaie A. (2004). Pesticides and oxidative stress: a review, Med. Sci. Monitor 10 RA141–147.

Abolaji A.O., Ojo M., Afolabi T.T., Arowoogun M.D, Nwawolor D. (2017). Farombi E.O. Protective properties of 6-gingerol-rich fraction from Zingiber officinale (Ginger) on chlorpyrifosinduced oxidative damage and inflammation in the brain, ovary and uterus of rats, Chemico-Biological Interactions 25;270:15-23.

Acker C.I., Souza A.C. G., Santos M .P . d., Mazzanti .C. M., Nogueira C.W. (2012). Diphenyl diselenide attenuates hepatic and hematologic toxicity induced by chlorpyrifos acute exposure in rats Environ Sci Pollut Res 19:3481–3490 DOI 10.1007/s11356-012-0882-4.

Adedara I.A., Rosemberg D.B., de Souza D., Farombi E.O, Aschner M., Souza, D.O.,Rocha JBT (2016). Neurobehavioral and biochemical changes in Nauphoeta cinerea following dietary exposure to chlorpyrifos. Pestic Biochem Physiol. Jun;130:22-30. doi: 10.1016/j.pestbp.2015.12.004.

Agrawal P.K., Markham K.R. (1989). Introduction in Carbon-13 NMR of flavonoids. Agrawal P.K. Ed. Elsevier. Amsterdam. pp 1-31.

Aldridge JE., Levin ED., Seidler FJ., Slotkin TA. (2005). Developmental exposure of rats to chlorpyrifos leads to behavioral alterations in adulthood, involving serotonergic mechanisms and resembling animal models of depression. Environ Health Perspect. 113(5):527-31.

Aly N., El-Gendy K., Mahmoud F., El-Sebae AK. (2010). Protective effect of vitamin C against chlorpyrifos oxidative stress in male mice. Pesticide and Biochemical Physiology 97, 7–12.

Ambali S.F., Shittu M., Ayo J.O., Esievo K.A.N., Ojo S.A. (2011). Vitamin C alleviates and histopathological changes in the liver of rats: ameliorative effect of ascorbic acid. Exp. Toxicol. Pathol. 61, 189–196.

Amer S.M., Aly F.A.E. (1992). Cytogenetic effects of pesticides. IV. Cytogenetic effects of the insecticides Gardona and Dursban. Mutat. Res. 279, 165e170.

Amos O. Abolaji., Mercy Ojo, Tosin T. Afolabi, Mary D. Arowoogun, Darlinton Nwawolor, Ebenezer O. Farombi.(2017). Protective properties of 6-gingerol-rich fraction from Zingiber officinale (Ginger) on chlorpyrifos-induced oxidative damage and inflammation in the brain, ovary and uterus of rats. Chemico-Biological Interactions. v.270, : Pages 15-23.

Ananth D.A, Bell Aseervatham G. S., Karthik R., Sivasudha T.(2014) . Detection of Phenolics and Appraisal of Antioxidant and Antimicrobial Properties of Arenga wightiiInt. J. Pharm. Sci. Rev. Res., 26(1), May – Jun 2014; Article No. 08, Pages: 55-62.

Astiz M., de Alaniz M. J.T., Marra C.A.(2012). The oxidative damage and inflammation caused by pesticides are reverted by lipoic acid in rat brainNeurochemistry International 61. 1231–1241.

Atterberry T.T., Burnett W.T., Chambers J.E.(1997). Age-related differences in parathion and chlorpyrifos toxicity in male rats: Target and non-target esterase sensitivity and cytochrome P450- mediated metabolism. Toxicol Appl Pharmacol 147:411–418.

Attia A. A., ElMazoudy R. H., El-Shenawy N.(2012). S. Antioxidant role of propolis extract against oxidative damage of testicular tissue induced by insecticide chlorpyrifos in rats Pesticide Biochemistry and Physiology 103 87–93.

Bagchi D., Bagchi M., Hassoum E.A., Stohs SJ.(1995). In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. Toxicology104:129–140.

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

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

Bas H., Kalender Y.(2011). Chlorpyrifos Induced Cardiotoxicity in Rats and the Protective Role of Quercetin and Catechin Gazi University Journal of Science GU J Sci24(3):387-395.

Basha P. M., Poojary A. (2012) . Oxidative Macromolecular Alterations in the Rat Central Nervous System in Response to Experimentally Co-Induced Chlorpyrifos and Cold Stress: A Comparative Assessment in Aging RatsNeurochem Res 37:335–348.

Bayrami M., Hashemi T., Malekirad A.A., Ashayeri H., Faraji F., Abdollahi M. (2012). Electroencephalogram, cognitive state, psychological disorders, clinical symptom, and oxidative stress in horticulture farmers exposed to organophosphate pesticides. Toxicol Indl Health;28:90-6.

Bektas T., Munevver S., Akpulat H.A., Atalay S.(2005). In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of five Allium species from Turkey. Food Chemistry 92 89-92.

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

Boumendjel A., Di Pietro A., Dumontet C., Barron D.(2002). Recent advances in the discovery of flavonoids and analogs with high-affinity binding to P-glycoprotein responsible for cancer cell multidrug resistance. Med Res Rev;22:512–29.

Boutaghane N . (2013). These Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat en sciences Etude phytochimique et pharmacologique de plantes médicinales Algériennes Genista ulicina Spach (Fabaceae) et Chrysanthemum macrocarpum (Sch. Bip.) Coss. & Kralik ex Batt (Asteraceae).

Casarett and Boull's,(2010). Essentials of Toxicology .Second Edition.ISBN 978-0-07-162240-0.

Çetin N., Cetin E., Eraslan G., Bilgili A.(2007).Chlorpyrifos induces cardiac dysfunction in rabbits. Research in Veterinary Science 82 405‑408.

Cherin .P, Voronska. E, Fraoucene. N, de Jaeger. (2012). C.Toxicité aiguë des pesticides chez l'homme. Revue Générale. Médecine & Longévité 4, 68-74.

Choi HJ., Song JH., Park KS.(2009). Inhibitory effects of quercetin 3-rhamnoside on influenza A virus replication. Eur. J. Pharm. Sci., 37 (3-4): 329-33.

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

Cole T.b., Walter B.j., Shih D.m., Tward A.d., Lusis A.j.(2005). Toxicity of chlorpyrifos and chlorpyrifos oxon in a transgenic mouse model of the human paraoxonase(PON1) Q192R polymorphism. *Pharmacogenet Genomics*, **15** : 589‑598.

Costa Lg., Richter R.j., Li W.f., Cole T., Guizzetti M.(2003). Paraoxonase (PON 1) as a biomarker of susceptibility for organophosphate toxicity. Biomarkers, 8: 1-12.

Crumpton T.L., Seidler F.J., Slotkin T.A.(2000).Is oxidative stress involved in the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos? Dev Brain Res 121:189–195.

Cunningham M.L., Elwell M.R., Matthews H.B., (1994). Relationship of carcinogenicity and cellular proliferations induced by mutagenic noncarcinogens vs carcinogens. III Organophosphate pesticides vs tris (2,3-bibromopropyl) phosphate, Fundam. Appl. Toxicol. 23 363–369.

Curtis D., Klaassen, Ph.D**. (2012)**.Casarett And Doull's. Toxicology The Basic Science Of Poisons.904-4069.

Davies H.g., Richter R.j., Keifer M., Broomfield C., Sowalla J., Et al.(1996). The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. Nat Genet, 14 : 334-336.

Demir F., Uzun F.G., Durak D., Kalender Y.(2011). Subacute chlorpyrifos-induced oxidative stress in rat erythrocytes and the protective effects of catechin and quercetin. Pesticide and Biochemical Physiology 99, 77–81.

Deng Y., Zhang Y., Lu Y., Zhao Y., Ren H. **(2016).** Hepatotoxicity and nephrotoxicity induced by the chlorpyrifos and chlorpyrifos-methyl metabolite, 3,5,6-trichloro-2-pyridinol, in orally exposed mice Science of the Total Environment 544. 507–514 .

Deveci H.A., Karapehlivan M. (2017). Chlorpyrifos induced Parkinson in model in mice: Behavior, histopathology and biochemistry .Pesticide Biochemestry and Physiology . V144. 36-41.

Diab A.A., Abd El-Aziz E.A., Hendawy A.A., Zahra M.H., Hamza. R.Z.(2012). Antioxidative Role of both Propolis and Ginseng against Neurotoxicity of Chlorpyrifos and Profenofos in Male Rats. Life Sci J;9(3):987-1008.

Díaz-Resendiz K.J., Toledo-Ibarra G.A., Girón-Pérez M.I.(2015). Modulation of immune response by organophosphorus pesticides: fishes as a potential model in immunotoxicology. J. Immunol. Res. 2015, 213836.

Dominah Gifty A., McMinimy Rachael A., Kallon S., Kwakye G. F.(2017). Acute exposure to chlorpyrifos caused NADPH oxidase mediated oxidative stress and neurotoxicity in a striatal cell model of Huntington's disease.Neurotoxicology;60:54-69. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2017.03.004.

El-Banna S.G,. Attia A.M,. Hafez A.M, El-Kazaz S.M. (2009). Effect of garlic consumption on blood lipid and oxidant/antioxidant parameters in rat males exposed to chlorpyrifos, Slovak J. Anim. Sci., 42 111-117.

El-Demerdash F. M. **(2011).**Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides Food and Chemical Toxicology 49. 1346–1352.

Elelaimy I.A., Ibrahim H.M., Abdel Ghaffar F.R., Alawthan Y.S. (2012). Evaluation of sub-chronic chlorpyrifos poisoning on immunological and biochemical changes in rats and protective effect of eugenolJournal of Applied Pharmaceutical Science 02 (06);: 51-61.

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

El-Shenawy N.S.(2010).Effects of insecticides fenitrothion, endosulfan and abamectin on antioxidant parameters of isolated rat hepatocytes. Toxicology in Vitro 24(4):1148–1157.

Enomoto T., Nagasako-Akazome Y., Kanda T., Ikeda M., Dake Y. (2008). Original Article:Clinical Effects of Apple Polyphenols on Persistent Allergic Rhinitis: A Randomized Double-Blind Placebo- Controlled Parallel Arm Study. J Investig Allergol Clin Immunol 2006; Vol. 16(5): 283-289.

Ernest H And Randy L. R .(2010).A Textbook of Modern Toxicology, Fourth Edition. Edited by Ernest Hodgson Copyright © John Wiley & Sons, Inc.

Ernest H and Patricia E. Levi A.(2004). Textbook of Modern Toxicology, Third Edition, edited by Ernest Hodgson ISBN 0-471-26508-X Copyright . John Wiley & Sons, Inc.(Ernest200) P594.

Ernest H .(2004) .A Textbook Of Modern Toxicology, Third Edition; Agricultural Chemicals (Pesticides) P 55- 58.

Estevan C., Vilanova E., Sogorb M.A.(2013). Chlorpyrifos and its metabolites alter gene expression at non-cytotoxic concentrations in D3 mouse embryonic stem cells under in vitro differentiation: considerations for embryotoxic risk assessment. Toxicol. Lett. 217 (1), 14e22.

Farmer E.E., Mueller M.J.,(2013). ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. Annual Review of Plant Biology Vol 64 (64), 429–450.

Fetoui, H., Garoui, E.M., Zeghal, E.,(2009). Lambda-cyhalothrin-induced biochemical and histopathological changes in the liver of rats: ameliorative effect of ascorbic acid**.** Exp Toxicol Pathol. ;61(3):189-96.

Flohé L., GunzlerW.A.(1984). Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol, 105:114-121.

Fossati P., Prencipe L., Berti G. (1980). Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. Clin Chem. Feb;26(2):227-31.

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

Foti MC., Daquino C., Geraci C.(2004a) .Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstraction. 2. Resolution of the curcumin antioxidant controversy. The role of sequential proton loss electron transfer. J Org Chem 69:5888–5896.

Foti M.C., Daquino C., Geraci C.(2004b).Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH_ radical in alcoholic solutions. J Org Chem 69:2309–2314.

Galvez J., Crespo J., Jimenez J., Suarez A., Zarzuelo A.(1993a) Antidiarrhoeic activity of quercitin in mice and rats. J. Pharmacol., 45: 157-9.

Galvez J., Zarzuelo A., Crespo J., Lorente MD., Acete MA., Jimenez J. (1993b). Antidiarrhoeic activity of *Euphorbia hirta* extract and isolation of an active flavonoid constituent. Planta Med. b, 59: 333-6.

Gao J., Naughton S.X., Beck W.D., Hernandez C.M., Wua G., Weia Z., Yangb X., Michael G. Bartlettb., Alvin V. T.(2017). Chlorpyrifos and chlorpyrifos oxon impair the transport of membrane bound organelles in rat cortical axons. Jr. NeuroToxicology 62 111–123.

Garcia S.j., Seidler F.j., Crumpton T.l., Slotkin T.(2001). Does the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos involve glial targets? Macromolecule synthesis, adenylyl cyclase signaling, nuclear transcription factors, and formation of reactive oxygen in C6 glioma cells. Brain Res, 891 : 54-68.

Garcia S.j., Seidler F.j., Qiao D., Slotkin T.(2002). Chlorpyrifos targets developing glia: effects on glial fibrillary acidic protein. Brain Res Dev Brain Res, 133 : 151-161.

Gargouri B., Ben Mansour R., Ben Abdallah F., Elfekih A., Lassoued S., Hamden K. .(2011). Protective effect of quercetin against oxidative stress caused by dimethoate in human peripheral blood lymphocytesGargouri et al. Lipids in Health and Disease, 10:149.

Giordano G., Afsharinejad Z., Guizzetti M., Vitalone A., Kavanagh TJ., Costa LG .(2007). Organophosphorus insecticides chlorpyrifos and diazinon and oxidative stress in neuronal cells in a genetic model of glutathione deficiency. Toxicol Appl Pharmacol 219:181–189.

Gordon C.J., Padnos B.K.(2000). Prolonged elevation in blood pressure in the unrestrained rat exposed to chlorpyrifos. Toxicology 146, 1–13.

Gordon C.J., Padnos B.K., (2000). Prolonged elevation in blood pressure in the unrestrained rat exposed to chlorpyrifos. Toxicology 146, 1–13.

Gülcin I. (2012); Antioxidant activity of food constituent: an overview. Review Article .Arch Toxicol 86:345-391.

Gülcin I., Oktay M., Koksal E., Serbetci H., Beydemir S.¸ Kufrevioglu O.I.(2008a) Antioxidant and radical scavenging activities of uric acid. Asian J Chem 20:2079–2090.

Gultekin F., Ozturk M., Akdogan M.(2000). The effect of organophosphate insecticide chlorpyrifos-ethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes (in vitro).Arch Toxicol.74:533-538.

Halliwell B.(2011). Free radicals and antioxidants quo vadis? Trends in pharmacological science. V: 32, Issue (3), 125-130

Halliwell B., Gutteridge J.M.C.(1989). Free radicals in biology and medicine, 2nd edn. Clarendon Press, Oxford. 543 pages.

Harborne J.B., Baxter H., Moss G.P. (1999) .Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants, 2nd edn. Taylor and Francis, London.

Hargreaves, A.J.(2012). Neurodegenerations induced by organophosphorous compounds. Adv. Exp. Med. Biol. 724, 189–204.

Hinkley Heikal T.M., Mossa A.T.H., Marei G.I.K., Abdel Rasoul M.A.(2012). Cyromazine and Chlorpyrifos Induced Renal Toxicity in Rats: The Ameliorating Effects of Green Tea Extract. J Environ Anal Toxicol 2:146.

Hinkley G. K and Roberts S.M.(2015). Insecticides and Herbicides. Studies on Experimental Toxicology and Pharmacology, Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice, 9-13.

Howell III G. E., Mulligan C., Young D., Kondakala S. (2016). Exposure to chlorpyrifos increases neutral lipid accumulation with accompanying increased de novo lipogenesis and decreased triglyceride secretion in McArdle-RH7777 hepatoma cellsToxicology in Vitro 32 181–189.

Hinkey G. K ., Roberts S. M (eds.).(2015). Studies on Experimental Toxicology and Pharmacology, Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice, Springer International Publishing Switzerland . http://dx.doi.org/10.1016/j .tox.2016.01.001.

Hirani A., Lee W.H., Kang S., Ehrich M., Lee Y.W. (2007). Chlorpyrifos induces pro549 inflammatory environment in discrete region of mouse brain, FASEB J. 21 (785) 4.

Hirota F., Masami S., Satoru M., Kohji M.(2005). Cancer Prevention with Green Tea Polyphenols for the General Population, and for Patients Following Cancer Treatment. Current Cancer Therapy Reviews, 1, 109-114.

Howard M.D., Pope C.N. (2002). In vitro effects of chlorpyrifos, parathion, methyl parathion and their oxons on cardiac muscarinic receptor binding in neonatal and adult rats. Toxicology 70, 1‑10.

J**affe M ,Ueber den Niederschlag.(1886).**Welchen Pikrinsaure in normalem Harn erzeugt ubd uber eine neue Reaction des Kreatinins.Hoppe Seylers Z Physiol Chem ,10:391-400.

Jaiswal N., Kumar D., Rizvi S I.(2013).Red onion extract (Allium cepa L.) supplementation improves redox balance in oxidatively stressed ratsFood Science and Human Wellness 2 99–104.

Jaiswal N., Rizvi S.I., (2011) Protective effect of different layers of onion extracts (*Allium cepa* L.) on markers of oxidative stress in erythrocytes, Cell Membranes and Free Radical Research 3 147–153.

Jalady M., Dorandeu F. (2013). Intérêt du dosage des cholinestérases dans le cadre des intoxications aux organophosphorés. Interest of the cholinesterase assay during organophosphate poisonings A. Annales Franc¸aises d'Anesthe´ sie et de Re´animation .32 856–862.

Jee L.H., Masroor F., Kang J.C., (2005). Responses of cypermethrin-induced stress in hematological parameters of Korean rockfish, Sebastes schlegeli (Hilgendorf), Agri. Res. 36 898–905.

Juricek L and Coumoul X. (2014). Alimentation, pesticides et pathologies neurologiques.Diet, pesticides and neurological diseases Cahiers de nutrition et de diététique 49, 74-80.p396.

Ju-Sung K and Myong-Jo K.(2010). In vitro antioxidant activity of Lespedeza cuneata methanolic extracts. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 4(8), pp. 674-679.

Kalender Y., Kaya S., Durak D., Uzun F. G., Demir F. (2012). Protective effects of catechin and quercetin on antioxidant status, lipid peroxidation and testis-histoarchitecture induced by chlorpyrifos in male rats. e nvir o n m e n t a l t o x i c o l o g y a n d p h a r m a c o l o g y 3 3 141–148.

Karami-Mohajeri S., Abdollahi M.(2011). Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. Hum Exp Toxicol 2011;30:1119-40.

Kashyap M.P., Singh A.K., Siddiqui M.A., Kumar V., Tripathi V.K., Khanna V.K., Yadav S., Jain S.K., Pant A.B.,(2010). Caspase cascade regulated mitochondria mediated apoptosis in monocrotophos exposed PC12 cells. Chem. Res. Toxicol. 23 (11), 1663–1672.

Khan S.M., Sobti R.C., Kataria L.(2005). Pesticide-induced alteration in mice hepatooxidative status and protective effects of black tea extract. Clin Chim Acta 358:131–138.

Kopjar N., Žunec S., Mendaš G,. Micek V., Kašuba V., Mikolić A., Tariba B. Lovaković,. Milić M, Pavičić I., Marjanović Čermak A.M, Pizent A., Lucić Vrdoljak A,. Želježić D. (2017). Evaluation of chlorpyrifos toxicity through a 28-day study: Cholinesterase activity, oxidative stress responses, parent compound/metabolite levels, and primary DNA damage in blood and brain tissue of adult male Wistar rats, Chemico-Biological Interactions . 279 (2018) 51–63.

Korany N.S and Ezzat B.A(2 0 1 1) Prophylactic effect of green tea and Nigella sativa extracts against fenitrothion-induced toxicity in rat parotid gland a r c h i v e s o f o r a l b i o l o g y 5 6 1 3 3 9 – 1 3 4 6.

Kovacic P and Somanathan R.(2014). Nervous About Developments in Electron Transfer-Reactive Oxygen Species-Oxidative Stress Mechanisms of Neurotoxicity?. Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants .Springer-Verlag Berlin Heidelberg ;642-30018-9.

Kovacic P.(2003). Mechanism of organophosphates (nerve gases and pesticides) and antidotes: electron transfer and oxidative stress. Curr Med Chem;10:2705-9.

Lallement G., Baubichon D., Clarencon D., Galonnier M., Peoch M., Carpentier P.(1999).Review of the value of gacyclidine(GK-11) as adjuvant medication to conventional treatments of organophosphate poisoning: primate experiments mimicking various scenarios of military or terrorist attack by soman. Neurotoxicology;20:675-84.

Lasky F.D., Li Z.M.C., Shaver D., Savory J, Savory M. G,. Willey D.G, Mikolak B.J., Lantry C L.(1985). Evaluation of a Bromocresol Purple Method for the Determination of Albumin Adapted to the DuPont aca Discrete Clinical Analyzer Clinical Biochemistry, Volume 18, October 290-296.

Lauder J.m., Schambra U.b.(1999). Morphogenetic roles of acetylcholine. Environ Health Perspect, 107 (suppl 1) : 65-69.

Lee Y.S., Lewis J.A., Ippolito D.L., Hussainzada N., Lein P.J., Jackson D.A., Stallings J.D.(2016). Repeated exposure to neurotoxic levels of chlorpyrifos alters hippocampal expression of neurotrophins and neuropeptides.Toxicology 18;340:53-62.

Lei W., Zhen L ., JunjieZ ., Yinghong W ., Hongwen S. (2016). Chlorpyrifos exposure in farmers and urban adults:Metabolic characteristic ,exposure estimation ,and potential effect of oxidative damage Environmental Research149164–170.

Li M., You T. Z ., Zhu W. J., Qu J. P., Liu C., Zhao B ., Xu S.-W., Li S. (2013). Antioxidant response and histopathological changes in brain tissue of pigeon exposed to avermectin Ecotoxicology 22:1241–1254.

Lin N., Mitchell W., David P., Mohsen M. (2006).Mechanism by which avenanthramide a polyphenol of oats, blocks cell cycle progression in vascular smooth muscle cells. Free Radical Biology & Medicine 41.702-708.

Litwinienko G., Ingold K.U. (2004). Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstraction. 2. Resolution of the curcumin antioxidant controversy. The role of sequential proton loss electron transfer. J Org Chem 69:5888–5896.

Litwinienko G., Ingold KU.(2003). Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstractions. 1. The reactions of phenols with 2, 2-diphenyl-l-picrylhydrazyl (DPPH) in alcohols. J Org Chem68:3433–3438.

Liu, L., Xu, Y., Xu, L., Wang, J., Wu, W., Xu, L., Yan, Y., 2015. Analysis of differentially expressed proteins in zebrafish (Danio rerio) embryos exposed to chlorpyrifos. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 167, 183–189.

Lopez O., Hernandez A.F., Rodrigoa L., Gil F., Pena G., Serrano J.L et al (2007). Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides. Toxicol Lett 171(3):146–153.

Lu J.C.(2015). Related factors of sperm DNA damage: advances in studies. Zhonghua Nan Ke Xue 21 (8), 675–680.

Lu L., Fu F., Wang T., He P., Xin W., Li Ch. (2009). Protective effect of reduced glutathione on the respiratory muscle injury induced by acute omethoate poisoning.Pesticide Biochemistry and Physiology 95 135–140.

Lukaszewicz-Hussain A.(2010). Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity ‐ Short review. Pest Biochem Physiol;98:145-50

Lumina M., Maria C C(2017). Molecular mechanisms of pesticides toxicity (Chapter 11). New Pesticides and Soil Sensors. http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-804299-1.00012-6

Mansour S.A., Mossa A.H (2010).Oxidative damage, biochemical and histopathological alterations in rats exposed to chlorpyrifos and the antioxidant role of zinc. Pest Biochem Physiol 96:14–23.

Marutescu L., Chifiriuc M.C. (2017) . Molecular Mechanism of Pesticides Toxicity .New Pesticide and soil Sensors .393-402.

Massimo D., Carmela F., Roberta D.B., Raffaella G., Claudio G., Roberta M. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. Ann Ist Super Sanità 2007 | Vol. 43, No. 4: 348-361.

Mohammadi H., Karimi G., Seyed M.R., Ahmad R.D., Shafiee H., Nikfar S., Baeeri M., Sabzevari O., Abdollahi M.(2011). Benefit of nanocarrier of magnetic magnesium in rat malathion-induced toxicity and cardiac failure using non-invasive monitoring of electrocardiogram and blood pressure. Toxicol Ind Health.;27(5):417-2.

Monnet Tschudi F., Zurich Mg., Schilter B., Costa Lg., Honegger P.(2000). (in vitro). Arch Toxicol 2000, 74:533-538.

Moreira E.g., Yu X., Robinson J.f., Griffith W., Hong S.w., Et al (2010). Toxicogenomic profiling in maternal and fetal rodent brains following gestational exposure to chlorpyrifos. Toxicol Appl Pharmacol, 245 : 310-325.

Mossa A.H ., Heikal T.M., Belaiba M., Raoelison E.G., Ferhout H., Bouajila J. (2015). Antioxidant activity and hepatoprotective potential of Cedrelopsis grevei on cypermethrin induced oxidative stress and liver damage in male miceBMC Complementary and Alternative Medicine 15:251 DOI 10.1186/s12906-015-0740-2.

Murphy K.J., Chronopoulos A.K., Singh I., et al.(2003). Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (Theobroma cacao) inhibit platelet function. Am J Clin Nutr;77:1466 –73.

Mutch E., Daly A.k., Williams F..(2007). The Relationship between PON1 phenotype and PON1‑192 genotype in detoxification of three oxons by human liver. *Drug Metab Dispos*, **35** : 315‑320.

Nasr H. M., El-Demerdash F. M A., El-Nagar W.(2015). Neuro and renal toxicity induced by chlorpyrifos and abamectin in rats Toxicity of insecticide mixture Environ Sci Pollut Res. .DOI 10.1007/s11356-015-5448-9.

NazninA and Hasan ,N. **(2009).** In Vitro Antioxidant Activity of Methanolic Leaves and Flowers Extracts of Lippia AlbaResearch Journal of Medicine and Medical Sciences, 4(1): 107-110.

Nurulain S.M., Szegi P., Tekes K., Naqvi Nh.S.(2013). Antioxidants In Organophosphorus Compounds Poisoning Arh Hig Rada Toksikol;64:169-177.

O'leary K.a., Edwards R.j., Town M., Boobis A.(2005). Genetic and other sources of variation in the activity of serum paraoxonase/diazoxonase in humans: consequences for risk from exposure to diazinon. Pharmacogenet Genomics, 15 : 51-60.

Ogut S., Gultekin F., Kisioglu A.N., Kucukoner E .(2011) .Oxidative stress in the blood of farm workers following intensive pesticide exposure. Cell Membr Free Radic Res2 (1):30.

Ogut S., Kucukoner E., Gultekin F., Gurbuz N.A**(2015).** Study of Long-Term Pesticide Application Amongst Agricultural Workers: Total Antioxidant Status, Total Oxidant Status and Acetylcholinesterase Activity in BloodProc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci. (Jan–Mar 2015) 85(1):155–159 DOI 10.1007/s40011-013-0291-6.

Ojha A., Yaduvanshi S.K., Pant S.C., Lomash V., Srivastava N.(2011). Evaluation of DNA damage and cytotoxicity induced by three commonly used organophosphate pesticides individually and in mixture, in rat tissues. Environ Toxicol; 28(10):543-52.

Okigbo R.N., Mbajinka C.S., Njoku C.O.(2005). Antimicrobial potentials of (UDA) *Xylopia aethopica* and *Occinum gratissimum L.* some pathogenous of man. Int. J. Mol. Med. Adv. Sci., 1 (4): 392-7.

Ordonez A. AL.,Gomez J.D.,Vattuone M.A., Ilsa M.L.(2006). Antioxidant actinity of Sechium edule (Jacq.) Swartz extract.Food Chemistry,99:452-458.

Ozturk F., Akdogan M.M,.(2000). The effect of organophosphate insecticide chlorpyrifos-ethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes (in vitro). Arch Toxicol, 74:533-538.

Pajoumand A., Shadnia S., Rezaie A., Abdi M., Abdollahi M.(2004). Benefits of magnesium sulfate in the management of acute human poisoning by organophosphorus insecticides. Hum Exp Toxicol;23:565-9.

Papadakis K.A., Targan S.R,.(2000). The role of chemokines and chemokine receptors in666 mucosal inflammation, Inflamm. Bowel Dis. 6303–313.

Peter J.V., Moran J.L., Graham P.L.(2007). Advances in the management of organophosphate poisoning. Expert Opin Pharmacother;8:1451-64.

Petroianu G.A.(2007). Poisoning with organophosphorus compounds Pharmacol Sci 32:125-130.

Ping M , Yang W, Qiang, Yaping, Jiaoe, Xin, Xu Y(2013). Oxidative damage induced by chlorpyrifos in the hepatic and renal tissue of Kunming mice and the antioxidant role of vitamin EFood and Chemical Toxicology 58 177–183.

Possamai F.P, Fortunato J.J, Agostinho J, Quevedo D, Wilhelm F.F, Dal-Pizzol F.(2007) Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats. Environ Toxicol Pharmacol;23:198-204.

Povey Ac (**2010).** Gene environmental interactions and organophosphate toxicity. Toxicology, 278 : 294‑304.

Povey A., Jury F., Dippnall W., Smith A., Thomson S., et al.(2007).GST CYP and PON1 polymorphisms in farmers attributing ill health to organophosphate containing sheep dip. Biomarkers, 12 : 188-202.

Prakasam A., Sethupathy S., Lalitha S.(2001). Plasma and RBCs antioxidant status in occupational male pesticide sprayers. Clinica Chimca Acta 310:107–112.

Qiao D., Seidler Fj., Slotkin T.(2001). Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos modeled in vitro: comparative effects of metabolites and other cholinesterase inhibitors on DNA synthesis in PC12 and C6 cells. Environ Health Perspect, 109 : 909-913.

Quezel P and Santa S. **(1962)**.Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Editions du C.N.R.S, Paris.. Tome I. p. 474.

Raina R., Baba N. A., Verma P. K., Sultana M., Singh M. (2015) . Hepatotoxicity Induced by Subchronic Exposure of Fluoride and Chlorpyrifos in Wistar Rats: Mitigating Effect of Ascorbic Acid. Biol Trace Elem Res 166:157–162.

Rajman M., Jurani M., Lamosova D., Macajova M., Sedlackova M., Kostal L., Jezova D., Vyboh P (2006). The effects of feed restriction on plasma biochemistry in growing meat type chickens(Gallus gallus). Comp Biochem Phys A 145:363–371.

Razavi B.M., Hosseinzadeh H., Movassaghi A.R, Imenshahidi M.(2013). Khalil AbnousProtective effect of crocin on diazinon induced cardiotoxicity in rats in subchronic exposureChemico-Biological Interactions 203 547–555.

Refaie A.A, 1., Ramadan A., Mossa A.H.(2014). Oxidative damage and nephrotoxicity induced by prallethrin in rat and the protective effect of Origanum majorana essential oil Asian Pac J Trop Med; 7(Suppl 1): S506-S513.

Reigart J.R and Roberts J.R.**(2013)** .Recognition and management of pesticide poisonings. US Environmental Protection Agency . Ecotoxicology 23, 1858e1869.

Reyna L., Flores-Martín J., Ridano M.E., Panzetta-Dutari G.M., Genti-Raimondi S., (2016).Chlorpyrifos induces endoplasmic reticulum stress in JEG-3 cells. Tivdoi: 10.1016/j.tiv.2016.12.008.

Ricceri L., Markina N., Valanzano A., Fortuna S., Cometa Mf., et al. (2003) Developmental exposure to chlorpyrifos alters reactivity to environmental and social cues in adolescent mice. Toxicol Appl Pharmacol, 191 : 189-201.

Richter Rj., Jarvik Gp., Furlong C.(2009). Paraoxonase 1 (PON1) status and substrate hydrolysis. Toxicol Appl Pharmacol, 235 : 109.

Rocha J.B.T, (2016). Neurobehavioral and biochemical changes in *Nauphoeta cinereal* following517 dietary exposure to chlorpyrifos, Pestic. Biochem.Phys. 130 22–30.

Roeschlau P., Bernt E.,Gruber W.A.,(1974). Enzymatic determination of total cholesterol in serum .Z Klin chem. Klin Biochem;12:226.

Roginsky V., Lissi E.A .(2005). Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food. Food Chem 92:235–254.

Rösch D., Krumbein A. and KrohL.W. (2004). Antioxidant gallocatechins, dimeric and trimeric proanthocyanidins from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) pomace. *European Food Research and Technology*, 219(6), 605-613.

Sanchez-Valle V., Chavez-Tapia N.C., Uribe M., Mendez-Sanchez N.,(2012). Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. Curr. Med. Chem. 19, 4850–4860.

Sanden M., Olsvik P.A., Søfteland L., Rasinger J.D.,. Rosenlund G, Garlito B., Ibáñez M, Berntssen M.H.G .(2018). Dietary pesticide chlorpyrifos-methyl affects arachidonic acid metabolism including phospholipid remodeling in Atlantic salmon (Salmo salar L.). Aquaculture 484 (2018) 1–12.

Sata S., Satar D., Tap O., Koseoglu Z., Kaya M., (2004) . Ultrastructural changes in rat liver treated with pralidoxime following acute organophosphate poisoning, Mt. Sinai J. Med. 71 405–410.

Saulsbury M.D., Heyliger S.O., Wang K., Johnson D.J. (2009). Chlorpyrifos induces oxidative stress in oligodendrocyte progenitor cells, Toxicology 259 1–9.

Shadnia S., Ashrafi vand S., Mostafalou S., Abdollahi M.(2011). N-acetylcysteine a Novel Treatment for Acute Human Organophosphate Poisoning International Journal of Pharmacology Volume 7 (6): 732-735, 2011.

Singh V., Panwar R. (2014). In vivo antioxidative and neuroprotective effect of 4-Allyl-2- methoxyphenol against chlorpyrifos-induced neurotoxicity in rat brainMol Cell Biochem 388:61–74.

Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M .(1991). Methods in enzymol: oxidant and antioxidant In:Packer L,editor (partA),San Diego, CA:Academic Press 299:152-178.

Smida A., Ncibib S., Taleba J., ABen Saada S., Ncibd, L Zourguia. (2017). Immunoprotective activity and antioxidant properties of cactus (Opuntia ficus indica) extract against chlorpyrifos toxicity in rats Biomedicine & Pharmacotherapy; 88. 844–851.

Société´ française d'anesthésie et de réanimation (Sfar). **(2013)**.Mesure de l'activité´ des cholinestérases pour intoxication par un compose organophosphoré´ : l'approche clinique reste primordiale. Measurement of cholinesterase activity in poisoning with an organophosphate compound: The clinical approach remains essential Annales Francaises d'Anesthesie et de Reanimation 32. 825–826.

Softeland L., Kirwan J.A., Hori T.S.F., Storseth T.R., Sommer U., Berntssen M.H.G., Viant M.R., Rise M.L., Waagbo R., Torstensen B.E., Booman M., Olsvik P.A.(2014). Toxicological effect of single contaminants and contaminant mixtures associated with plant ingredients in novel salmon feeds. Food Chem. Toxicol. 73, 157‑174.

Soltaninejad K, Abdollahi M(2009). Current opinion on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: a systemic review. Med Sci Monit;15:RA75-90.

Tanvir E.M., Afroz R., Chowdhury M.A.Z., Khalil M.d.I., Hossain M.d.S., Rahman M.d.A., Rashid M.d.H., Gan SH., (2015). Honey has a protective effect against chlorpyrifos-induced toxicity on lipid peroxidation, diagnostic markers and hepatic histoarchitecture, European Journal of Integrative Medicine;7(5),525-533.

ThompsonR.W., Valentine H.L., Valentine W.M.(2002). In vivo and in vitro hepatotoxicity and glutathione interactions of N-methyldithiocarbamate and N,N-dimethyl dithiocarbamate in rat. Toxicol. Sci. 70, 269–280.

Tomofuji T., Ekuni D., Irie K., Azuma T., Endo Y., Tamaki N., Sanbe T., Murakami J., Yamamoto T., Morita M.(2009). Preventive effects of a cocoa-enriched diet on gingival oxidative stress in experimental periodontitis. J. Periodontol., 80 (11): 1799-808.

Tripathi S., Srivastav A.K. (2010). Liver profile of rats after long-term ingestion of different doses of chlorpyrifos. Pest Biochem Physiol97:60–65.

Uchendu C., Ambali S.F ., Ayo J.O.(2012). The organophosphate, chlorpyrifos, oxidative stress and the role of some antioxidants: A review African Journal of Agricultural Research Vol. 7(18), pp. 2720-2728.

Ulanowska K., Traczyk A., Konopa G., Wegrzym G.(2006). Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DND, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. Arch. Microbiol., 184 (5): 271-8.

Uzun F.G., Demir F., Kalender S., Bas H, Kalender Y. (2010). Protective effect of catechin and quercetin on chlorpyrifos-induced lung toxicity in male rats. Food Chem Toxicol 48:1714–1720

Uzun FG and Kalender Y. (2013). Chlorpyrifos induced hepatotoxic and hematologic changes in rats: The role of quercetin and catechin. Food and Chemical Toxicology 55 (2013) 549–556.

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

Van Emon J. M.., Pan P., van Breukelen F. (2018). Effects of chlorpyrifos and trichloropyridinol on HEK 293 human embryonic kidney cells Chemosphere .191 537e547.

Vera J.C., Reyes A.M., Ca´rcamo J.G., et al(1996). Genistein is a natural inhibitor of hexose and dehydroascorbic acid transport through the glucose transporter, GLUT1. J Biol Chem;271:8719 –24.

Verma R.S., Mehta A., Srivastava N.(2007). In vivo chlorpyrifos oxidative stress: attenuation b antioxidant vitamins. Pesticide and Biochemical Physiology 88, 191–196.

Verma R.S., Srivastava N. (2003). Effects of chlorpyrifos on thiobarbi-turic acid reactive substances, scavenging enzymes and glutathione in rat tissues, Indian J Biochem Biophys.;40(6):423-8.

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.

Wang J., Wang J., Zhu L., Xie H., Shao B., Hou X.(2014). The enzyme toxicity and genotoxicity of chlorpyrifos and its toxic metabolite TCP to zebrafish Danio rerio. Ecotoxicology 23, 1858e1869.

Wang L., Liu Z., Zhang J., Wu Y., Sun H. (2016). Chlorpyrifos exposure in farmers and urban adults :Metabolic characteristic ,exposure estimation, and potential effect of oxidative damage EnvironmentalResearch149164–170.

Wang, J., Wang, J., Zhu, L., Xie, H., Shao, B., Hou, X., (2014). The enzyme toxicity and genotoxicity of chlorpyrifos and its toxic metabolite TCP to zebrafish Danio rerio. Ecotoxicology 23, 1858e1869.

Whitney K.d., Seidler F., Slotkin T. (1995). Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: cellular mechanisms. Toxicol Appl Pharmacol, 134 : 53-62.

WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009 [displayed 6 September 2012]. Available at http://www.inchem.org/ documents/pds/pdsother/class-2009.pdf.

Wilson M.B, El_sayed Mohamed F. , Seleem Amin A,. Sarhan Rana S . (2016) Ameliorative effect of antioxidants (vitamins C and E) against abamectin toxicity in liver, kidney and testis of male albino rats The Journal of Basic & Applied Zoology 77, 69–82 .

Wright RO and Baccarelli A (2007). Metals and neurotoxicology. J Nutr 137:2809–2813 Xia Q, Feng X, Huang H, Du L, Yang X, Wang K (2011) Gadolinium-induced oxidative stress triggers endoplasmic reticulum stress in rat cortical neurons. J Neurochem 117:38–47.

Xing, H.J., Zhang, Z.W., Yao, H.D., Liu, T., Wang, L.L., Xu, S.W., Li, S.(2014). Effects of atrazine and chlorpyrifos on cytochrome P450 in common carp liver. Chemosphere104, 244‑250.

Xu, M. Y., Wang, P., Sun, Y. J., Yang, L., Wu, Y. J., (2017a).Joint toxicity of chlorpyrifos and cadmium on the oxidative stress and mitochondrial damage in neuronal cells, Food and Chemical Toxicology103:246-252

.

Xu M.Y., Wang P., Sun, Y.J., Wu Y.J.(2017b)., Metabolomic analysis for combined hepatotoxicity of chlorpyrifos and cadmium in rats.Toxicology . 1;384:50-58.

Yang ,C. L ;Jeffrey, B.B;Robert, M.R;Kyung-Jin.(2009)A fluorometric assay to determine antioxidant activity of both hydrophilic and lipophilic components in plants foods .journal of nutritional biochemistry20 219-22.

Yang C.C and Deng J.F.(2007). Intermediate syndrome following organophosphate insecticide poisoning. J Chin Med Assoc;70:467-72.

Yu C and Isao I. (2009). Antioxidant activity and antitumor activity (in vitro) of xyloglucan selenious ester and sulfated xyloglucan.International Journal of Biological macromolecules 45 231-235.

Zhang J., Liu L., Ren L., W Feng, P Lv, Wei Wu, Yanchun Yan.(2017). The single and joint toxicity effects of chlorpyrifos and beta-cypermethrin in zebrafish (Danio rerio) early life stages, Journal of Hazardous Materialshttp ://dx.doi.org /10.1016/j.jhazma t..03.055.

Zhu W.J., LiM, Liu C., Qu J.P., Min Y.H., Xu S.W ., Li S. (2013). Avermectin induced liver injury in pigeon:Mechanisms of apoptosis and oxidative stress Ecotoxicology and Environmental Safety 9874–81.

الملخص

يعمل المبيد كلوربيفيروس(CPF) كغيره من المبيدات الفسفوعضوية سميته من خلال توليد الجذور الحرة ،و احداث اضطراب في وضع أكسدة اختزال ،مسببا ما يعرف بالتوتر التأكسدي .

تهدف هذه الدراسة الى تقييم الأثر الوقائي للمستخلصين النباتيين *Genista ulicina Spach(G)* و*Limonium pruinosum(L)* ضد سمية هذا المبيد وما ينتج عنها من اختلالات وظيفية ونسيجية .

حيث بينت نتائج المعالجة اليومية للجرذان بجرعة تقدر ب10 ملغ/كلغ من وزن الجسم ،عن طريق الفم ،تسبب الكلوربيريفوس في زيادة مستوى الاكسدة الفوقية اللبيدية من خلال زيادة مستوى MDA ،وهذا ما يفسر الزيادة المسجلة في الانزيمات المصلية ASAT, ALAT،وكذا اضطراب في بعض المعايير البيولوجية ك Triglycerides, cholesterol, Creatinine Albumin,Uric Acid,،والتي كانت مصحوبة ببعض التغيرات النسيجية المرضية ،وبالمقابل نسجل انخفاض في نشاط الانزيمات المضادة للأكسدة GPx, CAT وكذا مستوى GSH.

اما المعالجة بكل من المستخلص النباتي (G)و (L) بجرعة تقدر ب 150ملغ/كلغ من وزن الجسم ،فقد سمحت بخفض قيم MDA في انسجة الاعضاء المدروسة ،الانزيمات المصلية وبالمقابل زيادة نشاط الانزيمات المضادة للأكسدة ،كما سمحت كذلك بالحفاظ على قيم بعض المعايير البيوكيميائية . فيما تسمح المعالجة المسبقة بالمستخلصين النباتيين وبنفس الجرعة سابقة الذكر وبعد 30 دقيقة من المعالجة ب CPF في التخفيف من حدة مظاهر التوتر التأكسدي ،الناتجة عن المعالجة بالمبيد ،من خلال خفض قيم MDA،تعديل قيم ALAT,ASAT و الحفاظ على القيم الطبيعية لبعض المعايير البيوكميائية ،زيادة نشاط الانزيمات المضادة للأكسدة مقارنة مع مجموعة المبيد ؛اضافة الى تخفيف بعض مظاهر التلف أو الضرر النسيجي ،ويرجع ذلك الى الدور المضاد للأكسدة لهذه المركبات ،وهو ما تم اثباته من خلال الدراسة خارج العضوية *in vitro* والذي يرمي الى دراسة الخواص المضادة للأكسدة ،والدور القانص لهذه المستخلصات ،حيث بينت نتائج هذه الدراسة غنى هذه المستخلصات بالمركبات الفينولية و الفلافونويدية وهو ما يفسر قدرتها العالية على اقتناص الجذر DPPH وقدرتها على التخلص من سمية هذا المبيد من خلال خفض معايير التوتر التأكسدي وتعديل قيم وضع اكسدة اختزال .

ويرجع هذا النشاط المضاد للأكسدة لهاذين المستخلصين النباتيين الى غناهما بالمركبات الفينولية والفلافونويدية ذات الخواص الاقتناصية والمضادة للأكسدة ،مما يسمح بالتخفيف من الاضرار التأكسدية الناتجة عن سمية مبيد الكلوربيريفوس .

Résumé

Bien qu'étant surtout connu comme un pesticide Organophosphoré (OPs) le Chlorpyrifos (CPF), est peut réagir également comme un pro-oxydant et provoque la génération des radicaux libres ROS (Reactive oxygen species).

l'objectif de notre travail est d'évaluer l'effet protecteur des extraits butanolique des deux plantes *Genista ulicina Spach (G) et Limonium pruinosum (L),vis-à-vis* du stress oxydatif qui a impliqué dans la toxicité de ce pesticide.

Notre résultat indique que l'administration de CPF avec une dose estimée à de 10mg/kg par voie orale pendant 10 jours induit la peroxydation lipidique , qui a été détermine par l'augmentation significative du Malondialdehyde (MDA) tissulaire dans tous les organes ; ainsi l'augmentation de taux des transaminases sériques ALAT ,ASAT et la perturbation de certains paramètres biologique , tell que le Cholestérole, les triglycérides, albumine, acide urique …etc.; par contre l'activité des enzymes antioxydantes CAT,GPx ,et de la teneur en glutathion(GSH) a été significativement diminuée. Des changements histo-pathologiques corrélés avec ces paramètres biochimique été également observée chez les rats traités par le CPF.

Par ailleurs le prétraitement par l'extraits des plantes *Genista ulicina Spach* et *Limonium pruinosum* par une dose de (150mg/kg pm) à montrer l'efficacité de ces extraits de stimuler les mécanismes naturels de défenses ,en réduisant le taux d'MDA, activant les enzymes antioxidants aussi bien que le taux de GSH et ajustant les niveaux des enzymes sériques ALAT ,ASAT et quelques paramètres biochimiques, par ailleurs moins des changement histo-pathologique on été observé. Ces effets protecteurs d'extraits de plantes peuvent être dus à ses propriétés antioxydant puissantes.

Le pouvoir antioxydant de ces extraits a été évalué in vitro par les tests du DPPH• et l'inhibition de la peroxydation lipidique(LPO).Les teneurs en flavonoïdes et phénols totaux a été également évaluée .Ces résultats montrent que Ces extraits présentent une activité antioxydante *in vitro* particulièrement élevé et constitue une source prometteuse d'agents antioxydant . Ses capacités antioxydantes dues aux présences des composés phénoliques. Ces composés phénoliques sont pourvus également d'un pouvoir anti- radicalaire et antioxydant qui leur confère un rôle protecteur en atténuant le stress oxydatif généré dans les organes des rats par le CPF.

ABSTRACT

Although mostly known as an organophosphorus pesticides (OPs) Chlorpyrifos (CPF) can react also as a pro-oxidant resulting in the generation of (ROS) (Reactive oxygen species).

The purpose of this study was to evaluate the protective effect of Genista ulicina Spach and Limonium pruinosum extract Towards the oxidative stress which implied (involved) in the toxicity of this pesticide.

Our result indicated that administration of CPF at a dose (10mg/kg/BW) for 10 days by oral gavage induced a significant increase in MDA level in all tissues, organs; transaminase enzymes ALAT, ASAT; Triglycerides, cholesterol, Creatinine and Uric Acid; on the other hand the activity of antioxidant enzyme including GPx, CAT and GSH levels were significantly decreased. Histopathological observations also correlated with the biochemical parameters was shown.

Also, the protective effects of Buthanolic extract of *Genista ulicina Spach* and *Limonium pruinosum* (150mg/kg/BW) alone or in combination with CPF were investigated. Co-administration of plants extract with CPF or alone in male rats decreased MDA levels, normalized CAT and GPx activity as well as GSH content and restore some biochemical parameters by suppressing CPF stress. Furthermore Milder pathological alterations were observed. Overall, the protective effects of plants extract on CPF induced toxicity may be due to its potent antioxidative properties

Antioxidant activities of the extracts were studied in vitro. The inhibition of the formation of malondialdehyde (MDA) and the scavenging of DPPH radicals were assayed. The total phenolic and flavonoid contents of the extracts were determined. The experimental results show that the extracts had antioxidant activity in vitro. The extracts showed a high antioxidant effect, especially scavenging of DPPH anions and inhibition of lipid peroxidation.

That extracts can inhibit membrane LPO and free radical formation due to its free radical scavenging ability. The biological and antioxidant effects exhibited by these extracts could be related to an overall effect of the phenolic compounds present in this extract .Leading to ensure a protective role in attenuating the oxidative stress generated by CPF.

الوضع التصنيفي لنبات *Genista ulicina Spach*

Phylum: Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Order : Fabales

Family : Fabaceae

Genus : Genista

Specific epithet : ulicina Spach

Botanical name :Genista ulicina Spach

الوضع التصنيفي لنبات *Limonium Pruinosum* (L.)

Règne : Plantae

Embranchement:Tracheophyta

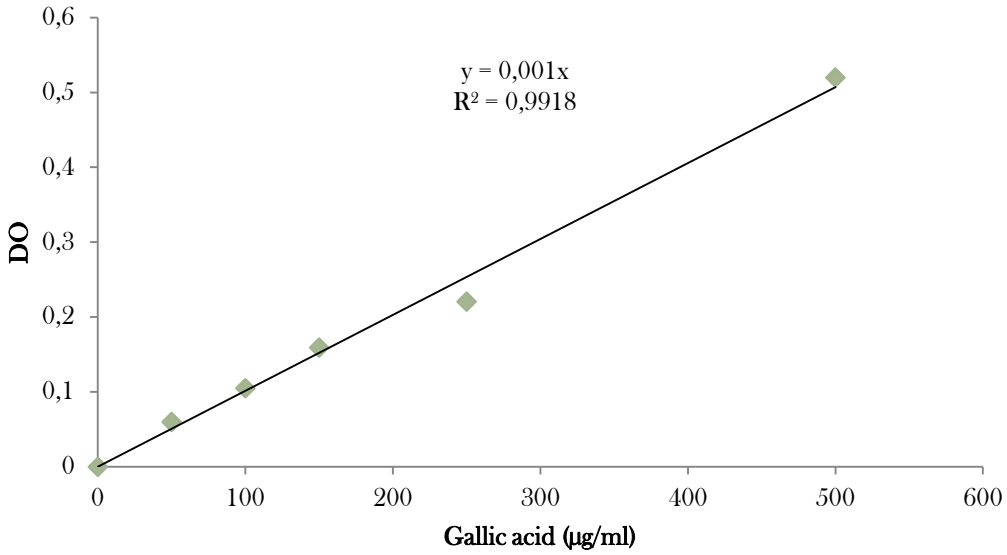
Classe : Magnoliopsida

Ordre : Caryophyllales

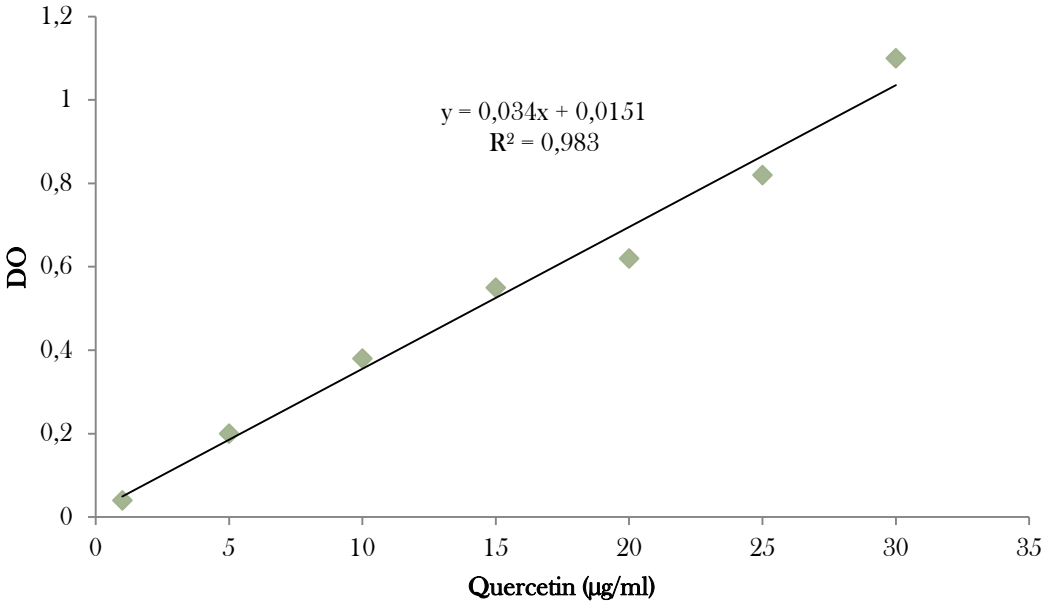
Famille : Plumbaginaceae

Genre : Limonium

Espese : Limonium Pruinosum (L.)



شكل42: المنحنى القياسي لمعايرة الفينولات الكلية (متوسط 3مكررات)



شكل43: المنحنى القياسي لمعايرة الفلافونويدات الكلية (متوسط 3 تكرارات)

مقدمة من طرف : لطرش عائشة	تاريخ المناقشة :2018/11/29

العنوان

دور المستخلص البيتانولي لنباتين من جنس *(Genista et Limonium)* ***في الوقاية من سمية مبيد الكلوربيريفوس***

طبيعة الشهادة : دكتوراه علوم في فسيولوجية امراض الخلية

الملخص

يمارس المبيد كلوربيفيروس(CPF) كغيره من المبيدات الفسفوعضوية سميته من خلال توليد الجذور الحرة ،و احداث اضطراب في وضع أكسدة اختزال ،مسببا ما يعرف بالتوتر التأكسدي .

تهدف هذه الدراسة الى تقييم الأثر الوقائي للمستخلصين النباتيين *Genista ulicina Spach(G)* و *Limonium pruinosum(L)* ضد سمية هذا المبيد وما ينتج عنها من اختلالات وظيفية ونسيجية .

حيث بينت نتائج المعالجة اليومية للجرذان بجرعة تقدر ب10 ملغ/كلغ من وزن الجسم ،عن طريق الفم ،تسبب الكلوربيريفوس في زيادة مستوى الاكسدة الفوقية اللبيدية من خلال زيادة مستوى MDA ،وهذا ما يفسر الزيادة المسجلة في الانزيمات المصلية ALAT,ASAT،وكذا اضطراب في بعض المعايير البيولوجية ك Triglycerides, cholesterol, Creatinine Albumin,Uric Acid،والتي كانت مصحوبة ببعض التغيرات النسيجية المرضية ،وبالمقابل نسجل انخفاض في نشاط الانزيمات المضادة للأكسدة CAT ,GPx وكذا مستوى GSH.

اما المعالجة بكل من المستخلص النباتي (G)و (L) بجرعة تقدر ب 150ملغ/كلغ من وزن الجسم ،فقد سمحت بخفض قيم MDA في انسجة الاعضاء المدروسة ،الانزيمات المصلية وبالمقابل زيادة نشاط الانزيمات المضادة للأكسدة ،كما سمحت كذلك بالحفاظ على قيم بعض المعايير البيوكيميائية . فيما تسمح المعالجة المسبقة بالمستخلصين النباتيين وبنفس الجرعة سابقة الذكر وبعد 30 دقيقة من المعالجة ب CPF في التخفيف من حدة مظاهر التوتر التأكسدي ،الناتجة عن المعالجة بالمبيد ،من خلال خفض قيم MDA،تعديل قيم ALAT,ASAT و الحفاظ على القيم الطبيعية لبعض المعايير البيوكميائية ،زيادة نشاط الانزيمات المضادة للأكسدة مقارنة مع مجموعة المبيد ؛اضافة الى تخفيف بعض مظاهر التلف أو الضرر النسيجي ،ويرجع ذلك الى الدور المضاد للأكسدة لهذه المركبات ،وهو ما تم اثباته من خلال الدراسة خارج العضوية *in vitro* والذي يرمي الى دراسة الخواص المضادة للأكسدة ،والدور القانص لهذه المستخلصات ،حيث بينت نتائج هذه الدراسة غنى هذه المستخلصات بالمركبات الفينولية و الفلافونويدية وهو ما يفسر قدرتها العالية على اقتناص الجذر DPPH وقدرتها على التخلص من سمية هذا المبيد من خلال خفض معايير التوتر التأكسدي وتعديل قيم وضع اكسدة اختزال .

ويرجع هذا النشاط المضاد للأكسدة لهاذين المستخلصين النباتيين الى غناهما بالمركبات الفينولية والفلافونويدية ذات الخواص الاقتناصية والمضادة للأكسدة ،مما يسمح بالتخفيف من الاضرار التأكسدية الناتجة عن سمية مبيد الكلوربيريفوس .

الكلمات المفتاحية : **Chlorpyrifos , Oxidative stress, Lipid peroxidation, Plant extract, Flavonoids,AchE,**

Limonium pruinosum, Genista ulicina

مخبر البحث: مخبر فسيولوجيا الحيوان قسم بيولوجيا الحيوان كلية علوم الطبيعة و الحياة جامعة منتوري- قسنطينة