الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة منتوري قسنطينة

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم بيولوجيا الحيوان

أطروحة ماجستير

رقم الترتيب: .....

رقم التسلسل: .....

فرع بيولوجيا وفيزيولوجيا الحيوان

تخصص فيزيولوجيا أمراض الخلية

عنوان الأطروحة

الدور الوقائي لبعض المستخلصات الفلافونيدية ضد الالتهاب الكبدي المحرض بالباراسيتامول لذى الجرذان

تاريخ المناقشة:

تقديم: بوالقندول رمزي

أعضاء لجنة المناقشة :

الأستاذ المحاضر	لعلاوي قريشي	رئيسا	جامعة منتوري قسنطينة
الأستاذة المحاضرة	أمداح سعاد	مقررة	جامعة منتوري قسنطينة
أستاذ التعليم العالي	لحول مصباح	ممتحنا	جامعة عبد الحق بن حمودة جيجل
الأستاذة المحاضرة	زعمة جميلة	ممتحنة	جامعة منتوري قسنطينة

سـنة 2010 /2011

بسم الله الرحمن الرحيم

الإهـــداء

أهدي هذا العمل إلى :

* من أفخر وأعتز بهما والدي العزيزين.

* إخوتي ، أخواتي وكل الأقارب و الأحباب.

* كل من ساهم في تعليمي من قريب أو من بعيد .

* كل من ساعدني في إنجاز هذا العمل .

* طلبة ماجستير فيزيولوجيا أمراض الخلية .

* الأصدقاء والأحباب الأعزاء كل باسمه

التشكرات

الحمد لله حمدا يليق بسلطانه العظيم وبوجهه الكريم حمدا كثيرا طيبا مباركا فيه.

الحمد لله الذي وفقني وقدر لي لأتم هذا البحث وما كنت لأبلغ هذا إلا بتوفيقه .

اللهم لك الحمد حتى ترضى ولك الحمد إذا رضيت ولك الحمد بعد الرضى .

وأصلي وأسلم على نبينا الحبيب محمد فاللهم صلي وسلم عليه وعلى أله وصحبه.

ربنا تقبل منا وبارك لنا إنك أنت السميع العليم.

أصدق عبارات الشكر والتقدير والاحترام للأستاذة القديرة أمداح سعاد على روحها الطيبة والحنونة، وكل ما قدمته لي من توجيهات ونصائح قيمة، ودعمها الكبير لي للوصول للمنهج العلمي الصحيح والهادف.

كما أتقدم كذلك بأتم وأصدق عبارات الشكرو العرفان و الاحترام إلى لأستاذ مناد أحمد الذي تعب كثير معي وأفادني كثيرا بتقديم كل المساعدات،التوجيهات ومبادئ البحث، والدعم المعنوي خاصة من طرفه ومن طرف حرمه الأستاذة أمداح سعاد .

كما لا أنسى أن أشكر الأستاذ لعلاوي قريشي على قبوله ترأس لجنة المناقشة ، وأشكره على روحه الطيبة وعلى كل ما قدمه لهذه الدفعة من توجيهات ونصائح .

كما أتقدم إلى الأستاذة زعمة جميلة بأخلص عبارات الشكر لقبولها أن تكون عضوة في لجنة المناقشة كما أشكرها على تقديمها لنا يد المساعدة واستضافتها لنا بمخبرها.

كما أشكرالأستاذ لحول مصباح من جامعة عبد الحق بن حمودة ولاية جيجل لقبوله أن يكون عضو في لجنة المناقشة وعلى روحه الطيبة وذلك في محاولة النهوض وتطوير البحث العلمي في مختلف الجامعات بقطر الوطن .

كما اجزي جزيل الثناء للأستاذة مكيو رتيبة بكلية العلوم الدقيقة لتوجيهاتهاالقيمة في مجال الكيمياء و كذا الأستاذة مزهود سامية لتمويلهما هذا البحث بالمستخلص النباتي.

كما أتقدم كذلك بالشكر إلى الأستاذة راشد وليدة رئيسة مخبر البيولوجي الإيكولوجيا على مقدمته لنا من تسهيلات قيمة على مستوى مخبرها .

أصدق عبارات الشكر والعرفان للأستاذ بحري العيد على كل ماقدمه لنا على مستوى مستودع الحيونات وعلى تقنيات وكيفيات التعامل مع الجرذان .

وفي الأخير لايفوتني أن أتقدم بعبارات الشكر و العرفان إلى زملائي و زميلاتي في دفعة ماجستير فيزيولوجيا أمراض الخلية كل باسمه على روحهم المرحة والطيبة وكل المساعدات التي قدموها لي كما لا أنسى أن أشكر كل الأصدقاء والزملاء وكل من ساهم في إتمام هذا العمل والبحث من قريب أو من بعيد .

الفـــهرس

1. المقدّمة 11

1. استعراض المراجع 14

2. 1. الـHepatocyte والنظام السيتوكرومي 15

1.1.2 الـHépatocyte 15

2.1.2 النظام السيتوكرومي 16

2.2 السمية الكبدية الدوائية 19

1.2.2 آليات تأثير الأدوية المحرضة للعطب الكبدي 21

1.1.2.2 الأيضيات النشطة بالخلية الكبدية 22

2.1.2.2 الارتباط التساهمي 23

3.1.2.2 الإجهاد التأكسدي وتوليد الـROS 23

4.1.2.2 تنبيه مسارات نقل الإشارة التي تتحكم في الموت أو الحياة الخلوية على مستوى الخلية 25

5.1.2.2 التلف الميتوكوندري 25

3.2. البراسيتامول والسمية الكبدية 26

1.3.2. أثر واستقلاب البراسيتامول 26

2.3.2. سمية البراسيتامول 28

1.2.3.2 المستقلب NAPQI وتوليد الـROS 29

2.2.3.2 التغيرات الرودوكسية البروتينية خلال السمية الكبدية يالـAPAP 30

2. 4. الإجهاد التأكسدي و الجذور الحرة 33

1.4.2 المواد المؤكسدة Oxidants 33

5.2 مضادات الأكسدة Antioxidants 36

1.5.2 مضادات الأكسدة الإنزيمية Enzymatic antioxidants 36

38 2.5.2 مضادات الأكسدة غير الإنزيمية Non-enzymatic antioxidants
40 2. 6. عديد الفينولات و الفلافونيدات
40 1.6.2 الخصائص العامة للفلافونيدات
42 2.6.2. الخصائص البيولوجية للفلافونيدات
42 3.6.2 الدور الوقائي الكبدي للفلافونيدات
44 7.2. الدور الوقائي للنباتات الطبية من الالتهاب الكبدي بالبراسيتامول
45 8.2. جنس *Vitex*
46 9.2. النوع *Vitex agnus-castus*
46 1.9.2. التوزيع الجغرافي
46 2.9.2. الدراسات الكيميائية لنبات Vitex agnus-castus
47 3.9.2. الدراسة الفرماكولوجية لنبات *Vitex agnus-castus*
49 2. مواد وطرق العمل
50 1.3, نبات *Vitex agnus-castus*
51 2.3. تحضير المستخلص البيتانولي للأوراق
52 3.3. اختبارات كروماتوغرافية للمستخلص البيتانولي
52 1.3.3 الخريطة الفلافونيدية (ورق Whatman)
52 2.3.3 الفحص الكروماتوغرافي على الطبقة الرقيقة (TLC)
52 4.3. الحيونات التجريبية
53 5.3. المعايرات
53 1.5.3. معايرة مؤشرات السمية الكبدية
54 2.5.3. معايرة مؤشرات الإجهاد التأكسدي
55 1.2.5.3 قياس الـ TBARS
55 2.2.5.3 معايرة نشاط النظام الجلوتاتيوني

3.2.5.3 تقديرنشاط إنزيمات الإجهاد التأكسدي 56

3.5.3. معايرة البروتينات السيتوزولية 56

7.5.3. الدراسات الهيستولوجية 56

4. النتائج 58

1.4. الدراسة الكيميائية لنيات *Vitex agnus-castus* 59

1.1.4 الخريطة الفلافونيدية للمستخلص البيتانولي للـ*Vitex agnus-castus* 60

2.1.4 الفحص الكروماتوغرافي على الطبقة الرقيقة (TLC) للـ *Vitex agnus-castus* 60

2.4.الدراسة البيولوجية للمستخلص البيتانولي للـ*Vitex agnus-castus* 62

1.2.4 الدور الوقائي للمستخلص البيتانولي للـ*Vitex agnus-castus* على مؤشرات السمية الكبدية المحرضة بالبراسيتامول لدى الجرذان 62

2.2.4 الدور الوقائي للمستخلص البيتانولي للـ *Vitex agnus-castus* على مؤشرات الإجهاد التأكسدي بكبد الجرذان المعاملة بالبراسيتامول 64

1.2.2.4. الـTBARS 64

2.2.2.4 الـنظام الجلوتاتيوني 66

3.2.2.4 نشاط الـCAT و الـSOD 67

3.2.4 الدراسات النسيجية 68

5 المناقشة 70

6. خاتمة واستنتاج 77

7. الملخص 80

8. المراجع 84

المختصرات

APAP	Acetaminophene (paracetamol)
ATP	Adenosine triphosphate
ADP	Adinosine diphosphate
ALT	Alanine aminotransferase
ALT	Alanine transaminase
APND	Aminopyrine N-demethyase
$O_2^{-\bullet}$	Anion superoxyde
AST	Aspartate transaminase
BSS	Balanced salt solution
CAT	Catalase
CYP450	Cyotochrome 450
CYP3A4	Cytochrome 3A4
DILI	Drug-induced liver injury
DMFO	Dimethyl formamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
GSH	Glutathione
G6PD	Glutathione -6-phosphate dehydrogenase
GSSG	Glutathione disulfide
GST	Glutathione-S-transferase
IC_{50}	Inhibition concentration
DILI	Intoxication du foie induite par les médicaments
JNK	JunN-terminal protein Kinase
MDA	Malondialdehyde
NAC	N-acetylcysteine
NAPQI	N-acatyl-p-benzoquinone imine

PN	Neutrophile
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NBT	Nitroblue tetrazolium
NO	Nitric Oxide
Nrf	NF 2related factor 2
PNP-H	p-nitrophenol hydroxilase
$NO^{\bullet}$	Radical oxide nitric
ROS	Reactive oxygene species
GSH	Reduced glutathione
SOD	Superoxide dismutase
TBA	Thiobarbuteric acid
TNF	Tumor necrosis factor
TCA	Trichloroacetic acid
TG	Triglycerides
MPT	Mitochondrial permeability transition
ASK-1	Apoptosis signalining-regulating kinase-1
ARE	Antioxidant reponse element
AMPK	AMPactivated kinase
PAPS	3-Phosphate adinosine 5-phosphosulfate
UDP	Uridine diphosphate
MAPK	MAPkinase

اللقب : بوالقندول

الاسم : رمزي

تاريخ المناقشة :

فرع بيولوجيا وفيزيولوجيا الحيوان

تخصص فيزيولوجيا أمراض الخلية

الدور الوقائي لبعض المستخلصات الفلافونيدية ضد الالتهاب الكبدي المحرض بالباراسيتامول لدى الجرذان

الملخص :

تتمتع نبيتة الـــ *Vitex agnus-castus* ذات الانتشار الواسع بالصحراء الجزائرية بخصائص صيدلانية عدة،أهمها الدور المضاد للالتهاب ، وتهدف الدراسة الحالية إلى اختبار الفعل الوقائي الكبدي لهذه النبتة لدى الجرذان المعاملة بالبراسيتامول و محاولة تحديد آليات هذا الفعل ، يصاحب تعريض الجرذان إلى جرعة منفردة من البراسيتامول عبر الفم (750 mg /Kg) ارتفاع نشاط ناقلات الأمين المصلية وكذا معدلات كل من ALP و Biluribine وTG وكذا ارتفاع الأكسدة اللبيدية في صورة TBARS واختزال في نشاط النظام الجلوتاتيوني و المؤشرات المانعة للأكسدة. مكن التعاطي المسبق للمستخلص البيتانولي للـــ*Vitex agnus-castus* (3oo mg /Kg) لمدة 10 أيام الخلايا الكبدية من الاحتفاظ بنشاط ناقلات الأمين ALT و AST 84-87 % وبنشاط كل من ALP و Biluribine وTG بـــ 64-66 % وبخفض الـــTBARS بـــ 81 % . كما أفاد التعاطي المسبق لهذه النبتة بالاحتفاظ بالنظام الجلوتاتيوني GSH و GPx بما يكافيء 62-68 % وبتعديل نشاط الـــ GST بـــ 80 % ، وبصيانة نشاط كل من CAT و SOD بـــ 77-79 % .وقد دعم هذا العمل بالدراسة النسيجية التي أظهرت بأن الخلايا الكبدية تحتفظ بمعالمها ويختزل بها الارتشاح بالـــPN ويكاد يغيب بها النخر المركزي إثر المعاملة المسبقة بالـــــ*Vitex agnus-castus* ويبدو أن الفعل الواقي لهذا المستخلص يقارب كثيرا أثر الواقي المرجعي الـــNAC

الكلمات الدالة : *Vitex agnus-castus* ، acetaminophen (APAP)، Oxidative stress، Hepatotoxicity ، Hepatprotective ، GSH ، Anti oxidant ، ROS ، Hepatocyte .

المقررة : الدكتورة أمداح سعـــاد

جامعة منتوري قسنطينة

كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم علم الحيوان

1- المقدمة

1 . المقدمة:

بالرغم من أن الصناعة الدوائية قد أسهمت في إنقاذ البشرية من ويلات الأوبئة وآلام الآفات المرضية إلاّ أنها باتت هاجسا يؤرق هذه البشرية لما لازمها من آثار جانبية ومضاعفات علاجية إثر الفعل التراكمي.
والكبد الذي يمثل العضو الرئيسي لأيض الأدوية فإنّه ذاته المكان الرئيسي لأمراض الأدوية ، فأمراض الكبد المحرضة عن طريق الدواء لازالت تمثل مشكلة للعديد من الاستعمالات الدوائية وتحدّ كبير لتحديد العلاجات الممكنة (Han وآخرون ، 2010). و تطوير استراتيجيات للتقليل من الإصابة الكبدية المحرضة بالأدوية لا يمثل أهمية بالنسبة للأمراض الكبدية فحسب بل يمكن أن يزيد من توفير العديد من الأدوية التي تدخل في علاج مدى واسع من الأمراض، حيث تمثل إصابة الخلية الكبدية أو موتها الحالة الابتدائية الحرجة التي تؤدي الى المظاهر السريرية للإصابة الكبدية المحرضة بالأدوية (**DILI**). و إصابة الكبد يمكن أن يتم تحفيزها بواسطة بعض الأدوية (مركب أصلي)، إلا أنه غالبا ما تحدث في وجود أيضيات نشطة تتولد ميتابولزميا داخل الخلية الكبدية (Uetrecht ، 2008).

و مرد الأمراض المزمنة و الحادة العديدة التي يعاني منها العالم إنتاج الأنواع الأكسجينية النشطة (ROS)، إذ تساهم الــROS **في** باتولوجيا أنواع كثيرة حادة ومزمنة من الأمراض التي تصيب الكبد و تسبب تلف ثبات الأغشية الخلوية وكذا موت الخلايا من خلال الأكسدة اللبيدية.
ويعتبر **الــ**Acetaminophene (APAP) أحد الأدوية الأكثر شيوعا والذي ينتج عن الإفراط في تعاطيه حدوث القصور الكبدي الحاد (Ostapowicz و آخرون ، 2002) فقد لوحظ في السنوات الأخيرة على مستوى الدول المتقدمة تزايد مطرد من الإصابات الكبدية التي مردها تناول الجرعات المفرطة **للــ**APAP (Han وآخرون ، 2010).

إنّ الارتباط التساهمي للمستقلبات النشطة N-acetyl-p-bezoquinone imine (NAPQI) بالجزيئات الضخمة يخل **الــ**hepatocyte والجهد الرودوكسي بالعضييات والنظام البيروكسيزومي. ينعكس هذا بأريلة للبروتينات السيتورزولية وبروتينات العضيات الميتوكوندرية والشبكة الأندوبلازمية كما يساهم تسرب الوسائط الأوكسيجينية النشطة في إستنفاذ العتاد الدفاعي **للــ**hepatocyte مطورا الحالة إلى تدهن أو نخر مركزي. تملك **الــ**hepatocyte آليات عدّة للحد من هذا التدخل بإحتواء المستقلبات بالجيب الهيدروفوبي السيتوكرومي أو بالتثبت التساهمي مع أبو بروتين الهيم أو الحديد الهيمي (Liu وآخرون ، 2006).

إنّ محدودية فعل هذه الأدوية حث الكثير من الباحثين إلى رفع شعار العودة إلى الطبيعة ومراجعة الطب التقليدي. وتشكل الفلافونيدات إحدى أهم المستقلبات الثانوية للنباتات الوقائية التي هي أحد أهم المنتجات الطبيعية التي يعلق عليها الأمل كثيرا لما تتميز به من خصائص الفعل المانح للهيدروجين والأسر الجذري وتعزيز الأنظمة المضادة للأكسدة ومخلبة المعادن الداخلة بتفاعلات Fenton **و**Harber-Weiss سندا واعدا للحفاظ على الهيموستازيا والأنظمة الرودوكسية (Halliwell ، 1991).

ومن خلال الدراسات المرجعية التي أحصيناها فقد لوحظ أن العديد من النباتات ولما تحتويه من هذه المركبات فإنها تتميز بالقابلية الوقائية و العلاجية للسمية الناتجة عن دواء الــ APAP . ومن بين النباتات التي

تستوطن بعض مناطق الصحراء الجزائرية و التي تستخدم عل المستوى الشعبي في الاستشفاء من مختلف الالتهابات نبات الـــ*Vitex agnus-castus* والذي يشتهر بالإسم الشائع كف مريم.

لذا تهدف هذه الدراسة إلى اختبار الفعل الوقائي لنبات الـــ*Vitex agnus-castus* من الالتهاب الكبدي المحرض بالبراسيتامول لدى الجرذان اعتمادا على :

- ترشيح أحد مستخلصات الـــ*Vitex agnus-castus* بناء على مدى غناه بالفلافونيدات.
- اختبار الفعل الوقائي على مؤشرات السمية الكبدية المحرضة بالبراسيتامول.
- اختبار الفعل الوقائي على الإجهاد التأكسدي المحرض بالبراسيتامول.
- تأكيد الفعل الوقائي بالدراسات النسيجية.

2- استعراض المراجع

2. 1. الـــHepatocyte والنظام السيتوكرومي

1.1.2 Hépatocyte الـــ

يستقبل الكبد تمويلا متفردا للدم من طرف الشريان الكبدي الذي ينقل الدم الغني بالأوكسجين والوريد البابي الذي يحمل الجزيئات الممتصة على مستوى الأنبوب الهضمي ،كما تعد الفصيصة الكبدية هي الوحدة البنائية والوظيفية للكبد ، والفصيصة لها شكل سداسي الرؤوس ، تنتظم خلاياها في شكل صفوف شعاعية حول الوريد المركزي ، توجد بين الصفوف الشعاعية جيوب وخلايا جيبية (Sinusoids)، كما نجد فراغ Disse الذي يفصل بين الخلايا الجيبية (الجيوب) و الخلايا الكبدية، وكذا الفراغ المثلثي الشكل بين الفصوص الذي يسمى فراغ (Glisson) (Compbell ، 2006).

يتوضع فراغ DISSE بين صفائح ريماك ، المكونة من الخلايا الكبدية وبين الشعيرات الشعاعية ، أين تحدث المبادلات بين الدم و الخلايا الكبدية ، يطل فراغ DISSE على القطب الدموي لغشاء الخلية الكبدية ، كما نجد على مستوى هذا الفراغ تواجد عدد قليل جدا من خيوط الكولاجين في الحالات العادية ،بينما يرتفع عدد هذه الخيوط الكولاجينية في الحالات المرضية ويتوقف على المسببات المرضية (Gerignon ، 1996).

وتمثل الحشوة الخارج خلوية بنية شبكية وعدة أنواع من الكولاجين ،لامينين ، فيبرونكتين ،وغيرها من الجليكوبروتينات الخارج خلوية ويتغير محتواها على حسب حالات الالتهاب الكبدي (Kekis ، 2006)

تتوضع الخلايا الكبدية أوالبرانشمية بشكل صفيحة ، لتتشعب من كل فراغ بابي باتجاه الأوعية المركزية المجاورة ، تحيط الخلايا الكبدية بالطرق البابية مشكلة أوجه بينية بين الأنسجة الضامة للفراغ البابي والبرانشيم الكبدي ، الذي يعرف بالصحيفة المحيطية (Buffet وآخرون، 1994) تتمتع الخلايا الكبدية بشكل سداسي يجاور الشعيرات الدموية و القنية الصفراوية و خلايا كبدية أخرى (Benhamou، 1993). وتبدي أغشية الخلية الكبدية المجاورة المتصل بالشعيرات الدموية استطالات هدبية دقيقة، تؤمن التبادل الغذائي بين الخلية الكبدية و الشعيرات الدموية (Benhamou، 1993؛ Paraf وآخرون، 1995). كما أظهرت دراسة البنية الفوقية للنسيج وجود إنزيم الـــــATPase و "5 "نيكليوتيدازداخل الغشاء المنحصر في فراغ Disse وكذا إنزيمات الفوسفاتاز القلوي(القاعدي)، مستقبلات هرمونية مثل مستقبل الأنسولين (Myer، 1982). وتوجد الشبكة الأندوبلازمية الملساء مبعثرة داخل السيتوبلازم محاطة بحويصلات ملتحمة غالبا ما تضم جزيئات من الجليكوبروتين ، كما تحتوي على إنزيمات مضادة للتسمم ، ويتم فيها بناء اللبيدات المركبة ، ميتابوليزم الهرمونات الستيرويدية، تكوين الأملاح الصفراوية هدم السكريات لاحتوائها على إنزيم الجيليكوز 6 ــ فوسفات (Myer ، 1982) تزود الخلية الكبدية بالبروكسيزومات وهي غنية بالإنزيمات : Hiricase، Dihidroamino-ACIDE Catalase Okase، ويماثل الـــCatalase دور الـــPeroxidase حيث يخرب الماء الأوكسجيني (H_2O_2) المنتج من طرف إنزيمات الأوكسيداز، للبيروكسيزوم دورا مهما في إستحذات السكر ،وإعادة أكسدة الـــNADH (Paraf وآخرون ، 1995).

تكون خلايا كيبفار Kupffer جزء مهم من النظام الشبكي الطلائي وهي خلايا ضخمة ، مغزلية الشكل ،تكون هذه الخلايا على اتصال مباشر مع الخلايا الظاهرية وكذا الكبدية بفضل إستطالاتها تقوم ببلعمة الجزيئات الغريبة، طرح السموم الداخلية ، تعديل الاستجابة المناعية من خلال تحرير وسائط وعوامل خلوية. تتدخل الخلايا الظهارية في تعديل تكاثر الخلايا الكبدية عن طريق (Transforming Growth Factor B) (TGFB)

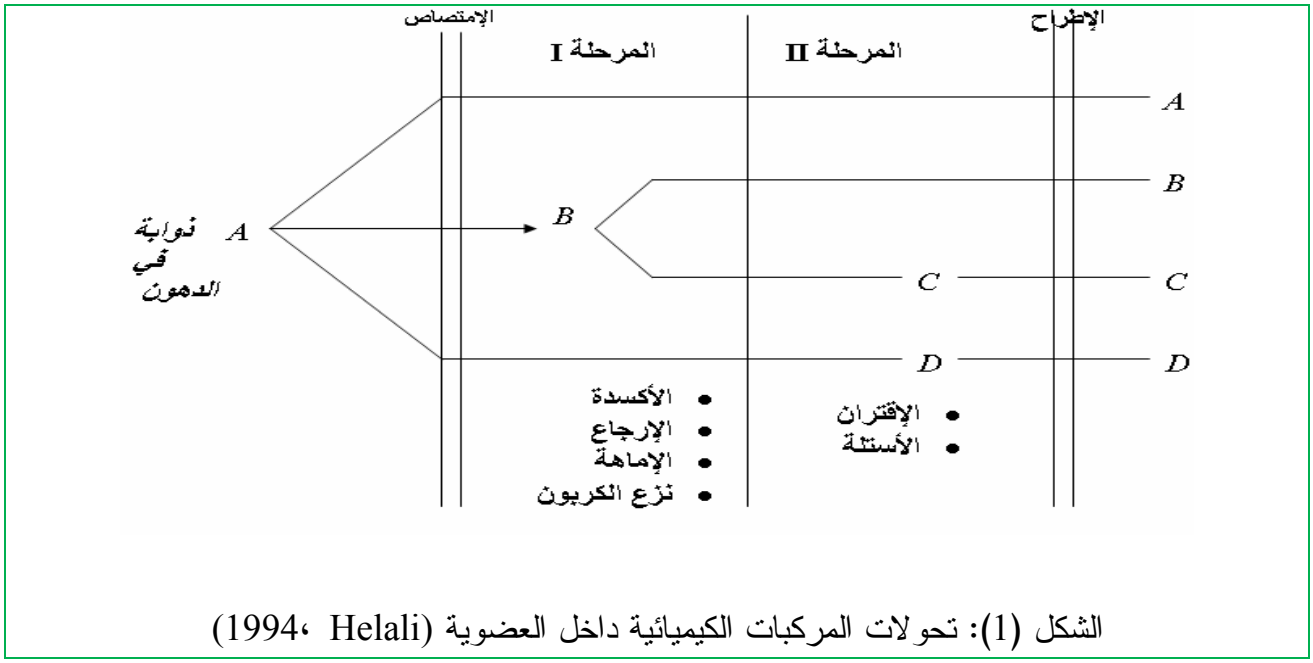
و الأنترلوكين (IL6).

تملك الخلايا الحبيبية (NK) خاصية النفاذية وهي تخلو من الغشاء القاعدي الشيء الذي يسمح بالتبادل بين الخلايا الكبدية والحاجز الظهاري وتقوم بدعم الجهاز المناعي (Gandillet، 2004). وتقع الخلايا النجمية (الخلايا الدهنية) أو خلايا ITO في فراغ DISSE بين الخلاياالكبدية والخلاياالمحببة، وهي خلايا مستطيلة تتميز بوجود حويصلات ذهنية تخزن بداخلها الفيتامين A، تلعب دورا كبيرا أثناء التليف الكبدي حيث تتحول إلى خلايا ليفية نتيجة العوامل والمسببات المرضية ، وتتدخل بصفة عامة في تنظيم النمو الكبدي (Gerignon، 1996؛ Buffet وآخرون،1994؛Gandillet، 2004) و تملك الخلايا المغزلية دورا بنائيا و هندسيا جد مهم مع كل مركبات الحشوة الخارج خلوية، تتدخل في ليونة و تجديد الكبد، كما أنها ليست خلايا متخصصة في الكبد (Gandillet، 2004) .

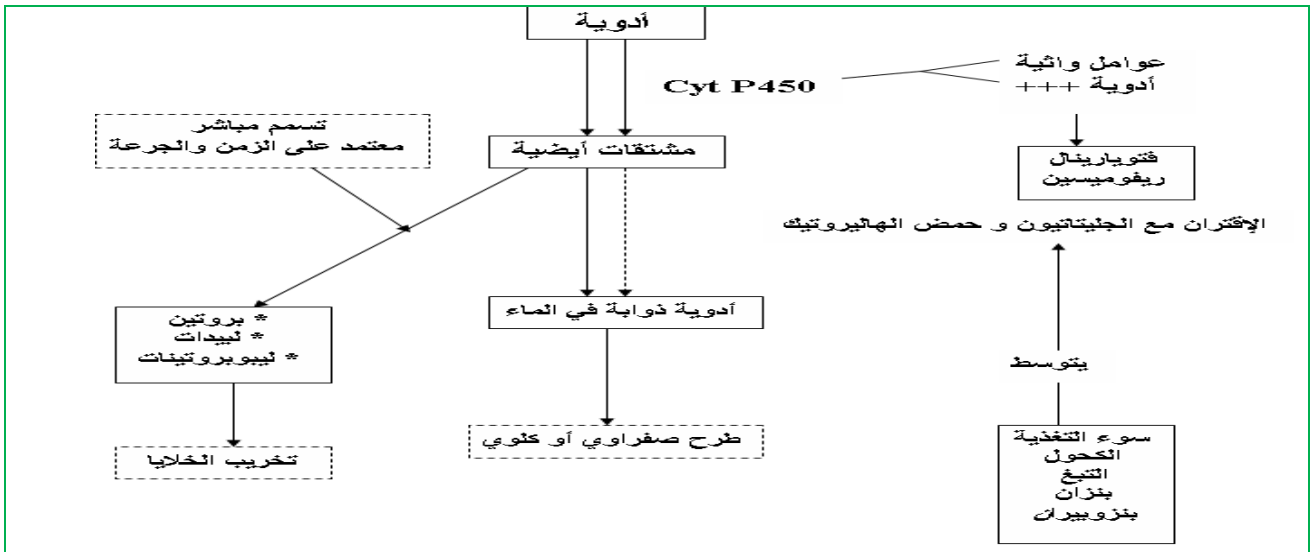
2.1.2 النظام السيتوكرومي

تحتوي الخلايا الكبدية في الشبكة الأنذوبلازمية الملساء على جزيئات يطلق عليها الميكروزومات، ذات نظام نقل إلكتروني يدعى CYP P450 ، يختلف نشاط هذا النظام من نوع لآخر ،وحتى في داخل السلالة ،وهذا ما يفسره اختلاف ميتابوليزم الأدوية لدى مختلف الحيوانات و الأفراد ، وهذا النظام لا يقوم بميتابوليزم الأدوية و السموم فحسب بل يساهم في أيض المركبات الحيوية الداخلية مثل الهرمونات الستيرويدية و الأحماض الذهنية (Benhamou،1993؛ Myer ،1982).

تتعرض معظم المركبات الكميائية التي تدخل إلى الجسم إلى تحولات عديدة داخل العضوية قد تكون كلية أو جزئية تفقد من خلالها نشاطها ،وفي بعض الحالات تعطي نواتج ذات نشاط أكبر من المركب الأصلي كما هو ممثل في الشكل (1). وتحدث أغلبية التحولات داخل الكبد ،خاصة بالميكروزومات الكبدية في وجود NADPH ،H^+ وO_2 وتعد هذه التحولات غاية في الأهمية من أجل الحصول على نواتج أيضية ، أيونية قابلة للذوبان في الماء ليسهل طرحها عبر طرق شتى كما هو موضح في الشكل (2) (Helali ،1994).



الشكل (1): تحولات المركبات الكيميائية داخل العضوية (Helali ،1994)



الشكل (2) : التحولات الحيوية للأدوية ونواتجها وطرق طرحها (Helali ،1994)

يتمتع الكبد بوظائف إطراحية حيث أنه له دور في التصفية الفعالة للبلازما من العديد من الشوائب و السموم و الأدوية والملوثات الموجودة والعالقة بها وخصوصا من مركبات العصارة الصفراوية . كما له دور هام في إزالة السمية عن طريق سلسلة من التفاعلات الإنزيمية حيث يتم فيها تحويل المركبات القابلة للذوبان في الدهون إلي مشتقات مميهة تزال فيما بعد عن طريق البولة ، والعصارة الصفراوية (Wrigth وآخرون، 1980؛ Lhninger، 1989؛ Polonovski وآخرون، 1971) .

يتدخل النظام السيتوكرومي كأحد أهم مسارات إزالة السمية الكبدية، ويعتبر CYP P450 إسم عائلة لمجموعة إنزيمات oxygenases متعددة الوظائف أين تم معرفة أكثر من 100 نوع موزع على 12 عائلة

، توجد هذه الإنزيمات خاصة على مستوى غشاء الشبكة الأندوبلازمية الملساء ، تتواجد إنزيماته بشكل كبير في الكبد ، كما أنه (CYP 450) يتدخل في ثبات الوسط الداخلي (Guengerich وآخرون، 2005)، كما يتدخل في عملية ميتابوليزم العقاقير والمواد السامة بالإضافة للمواد الداخلية و الخارجية المنشأ.يملك CYP 450 ككل أنوع السيتوكرومات مجموعة هيم مع ذرة حديد مركزية التي يمكن أن يكون فيها في شكل مؤكسد أو مرجع ، يعتبر CYP 450 إنزيما غير نوعي يحفز أكسدة العديد من المواد(Monchouwer وآخرون، 2003؛ Soucek، 1999)، يتحكم في هذه المرحلة تغيرات في الوظائف الفعالة ، يتم غالبا نزع أو تثبيت مجموعات جديدة على الجزيئة لرفع فعاليتها ، تؤدي هذه التغيرات غالبا في المجموعات الوظيفية إلى تثبيط النشاط البيولوجي للجزيئة ، كما يمكن لهذه التغيرات أن ترفع من قطبية الجزيئة مما يؤدي إلى زيادة الذوبانية في الماء لتسهيل طرحها وإزالتها ، ويؤمن هذا تفاعلات الأكسدة الإرجاعية (Horn وآخرون، 2003). و باعتبار أن تفاعلات الأكسدة من أهم التفاعلات التي تحدث في المرحلة الأولى فإنها تحفز بواسطة إنزيمات الـــ CYP 450 ، مستعملة الأكسيجين الجزيئي عن طريق مساعدة مرافق الإنزيم CYP 450 و هو الـــ $NADPH / H^+$. وبذا يتم هكذا إدماج ذرة الأكسجين في الجزيئة المستهدفة مشكلة منطقة قطبية. وإذا تم ارتباط ذرة الأوكسجين مع ذرة هيدروجين فإننا نكون هنا بصدد تفاعلات الهدركسلة (Hydroxylation)، و إذا تم إدماجها مع ذرة كبريت فهي تفاعلات Sulfoxydation ، أما إذا تم ارتباطها مع ذرة الأزوت فهي تفاعلات N-oxydation ، وإذا تم نزع للمجموعات الوظيفية مثل نزع مجموعة أمين فهي Désamination أو نزع مجموعة ألكيل فهي Désalkilation هي (Horn وآخرون، 2003).

جدول (1) أقسام السيتوكرومات ومواد تفاعلها ومحفزاتها ومثبطاتها (Horn وآخرون، 2003)

	CY P1A2	**CY P2C9**	**CY P2D6**	**CY P3A4**
Substrat	Théophylline Caféine	Phénytoine Diclofenoc Warfarine	Codéine Ciptopril Imipramine Fluoxétine metoprolol	Ciclosporine Tacrolimus Ketoconazol Midazolam Statine
Inhibiteur	Cimétidine Quinolones Fluvoxamine	Isoniazide Ritonavir	Quinidine Fluoxetine	Macrolides Naringenine (jus pample-ousse) Antifungiques Azolés Antiprotéase
Inducteur	Rifampicine Omeprazole Cigarette	Rifampicine		Carbamazépine Phénytoine Phénobarbital Millepertuis(tisanes…...)

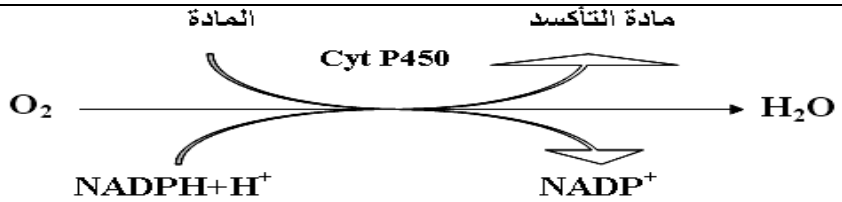
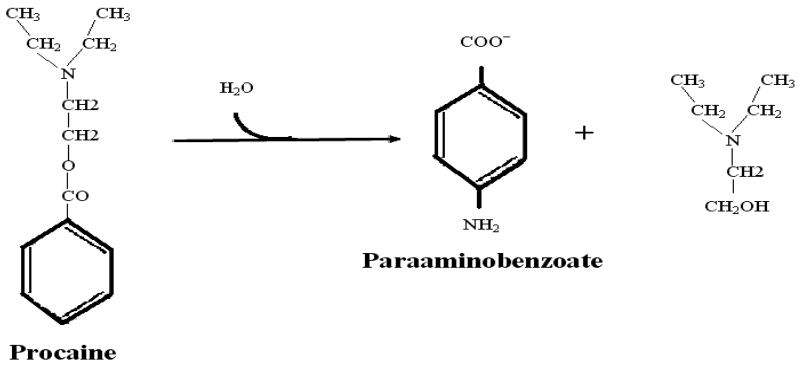
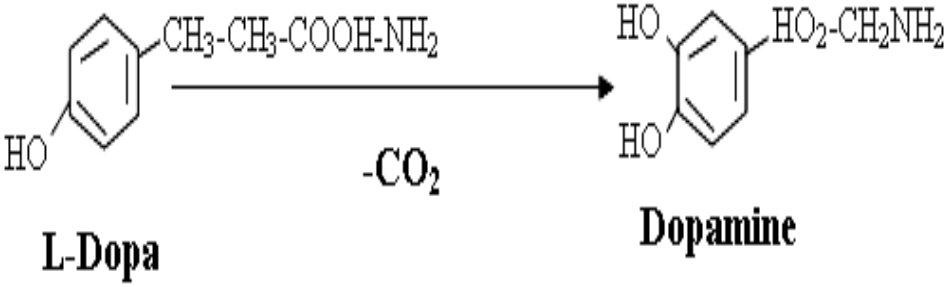
2.2 السمية الكبدية الدوائية

للكبد دورا مهما في عملية الهدم بما يحتويه من أنظمة إنزيمية جد نشطة تعمل على هدم المركبات الدوائية، وتحويلها إلى مشتقات أيضية بواسطة عمليات الإماهة ،الأكسدة ،الإرجاع ،نزع NH_2 ، ونزع CH_3 .وغالبا مايطلق عليها تفاعلات المرحلة الأولى (Benhamou ، 1993).

1. تفاعلات المرحلة الأولى

و يلخصها الجدول (2)

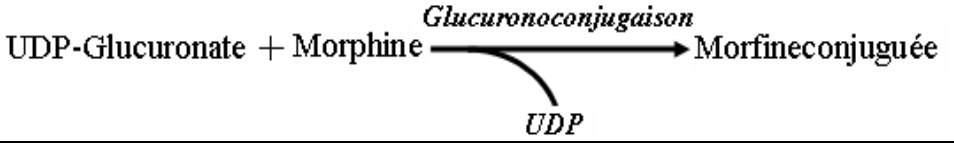
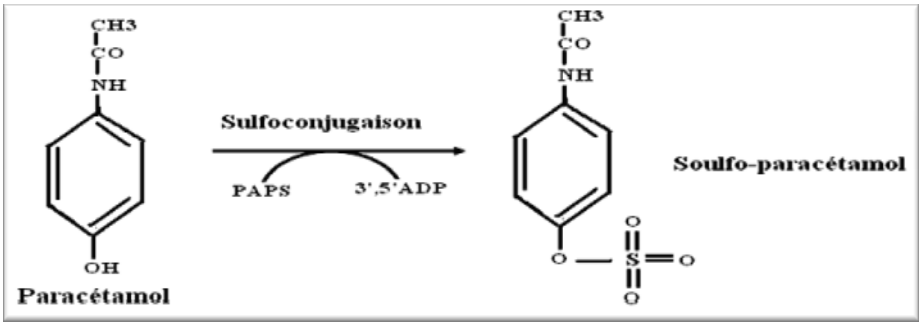
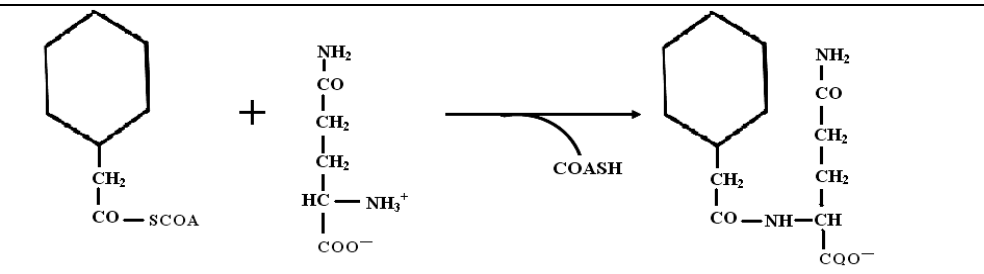
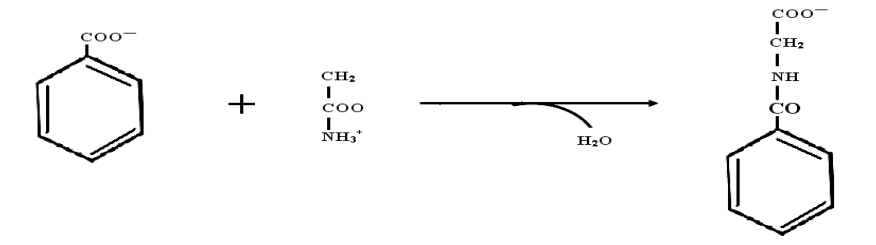
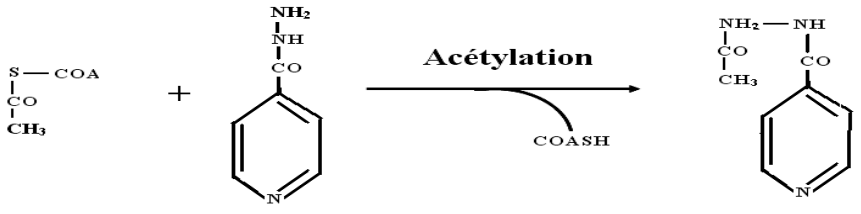
الجدول(2): تفاعلات المرحلة الأولى(Benhamou ، 1993)

• الأكسدة	
• الإماهة	
• نزع مجموعة الكربوكسيل	
• الإرجاع	Sulfamido Chrysoidine ⟶ Para-aminophenyl-sulfamide

2. تفاعلات المرحلة الثانية

و يلخصها الجدول (3)

الجدول(3): تفاعلات المرحلة الثانية (Benhamou ، 1993)

الاقتران	مع حمض الغليكورونيك	
	مع الكبريت	
	مع الحمض الأميني	
	مع الغليكوكول	
الأستلة		
الميثلة		المجاميع NH_2، OH، NH، SH بواسطة Méthyl-transferase ويكون المانح هو S-adénosyl méthionine

1.2.2 آليات تأثير الأدوية المحرضة للعطب الكبدي

يمكن أن يحدث العطب الكبدي بآليات عدّة منها ما يلخصها الجدول (4)

الجدول (4): آليات تأثير الأدوية المحرضة للعطب الكبدي (Helali، 1994)

آلية التأثير	العقاقير و المواد
تخريب الميتابوليزم اللبيدي مسببا التشحم الكبدي	الأميوداورون، أمينبتين، ثيثراسيكلين دوكسيسيلين.
انخفاض تصفية الأملاح الصفراوية مسببا حالة الاحتباس الصفراوي Cholestasis	سيكلوسبورين،إستراديول ،بثا–د–جلوكورونيد، الأثينيل إستراديول.
ارتفاع الإجهاد التأكسدي مؤديا إلى أضرار خلوية	الأسيتوأمينوفان (الباراسيتامول) ،ديكلوفيناك،كيثوكونازول
التداخل بين الطرق الأيضية النوعية أو التأثير الاختياري للمستقبلات الغشائية الخلوية ،جزيئات الـــ ADN و ARN مؤديا إلى أضرار بنيوية	الأسيتوأمينوفان (الباراسيتامول) ،الستيرويدات
تثبيط عملية ال β-oxydation للميتوكوندري	ثيثراسيكلين ،أسبيرين
خفض إفراز البروتينات اللبيدية من طرف الخلايا الكبدية	ميثوثريكساث ، الأميوداورون ، الجليكوكورتيكويد ، ثاموكسيفان
تنقرز المركز الفصي مؤديا إلى انخفاض الجلوثاثيون وتشكيل روابط بروتينية قوية مسببا قصور كبدي حاد	الأسيتوأمينوفان (الباراسيتامول)
التنشيط الميتابوليزمي للسم (TOXIN) عن طريق نشاط السيتوكروم (CYT P450)	الأسيتوأمينوفان (الباراسيتامول)
العطب الخلوي الناتج عن فوق أكسدة اللبيدات الغشائية	الأسيتوأمينوفان (الباراسيتامول)

أظهرت الدراسات على سواء النماذج الحيوانية أو مزارع الخلايا الكبدية الأولية أن إصابة الكبد (nonallergique) تتقاسم العديد من التأثيرات المتماثلة ، إلاّ أنّ كل دواء يمكن أن يتميز بمجموعة من الأعراض الخاصة والتي من بينها إصابة الكبد ، كما أن العديد من الأدوية التي تسبب ضررا للكبد (non

allergique) تشترك في مجموعة من المسارات الهامة التي تؤدي إلى إصابة الخلية الكبدية أو موتها . يمكن تقسيم المجموعة الأساسية التي تتضمنها الـــ (DILI) إجمالا إلى ما يلي :

1- استقلاب الدواء وتكوين أيضيات نشطة بالخلية الكبدية
2- الارتباط التساهمي
3- توليد الأنواع الأكسيجينية النشطة (ROS)
4- تنشيط مسارات نقل التنبيه (الإشارة) التي تتحكم في الموت أو الحياة الخلوية على مستوى الخلية الكبدية
5- التلف الميتوكوندري

في أغلب الحالات فإن إصابة الخلية الكبدية وضررها تمثل المرحلة الحرجة التي تؤدي إلى المظاهر السريرية للـــ (DILI) إلا أنه في بعض الحالات فإن الخلايا الصفراوية (الـــChalangiocytes) أو الطلائية (Endothelial) قد تمثل الهدف الأساسي مثال Sinusoridal obstruction، ductopenic chlestasicsyndrome

1.1.2.2 الأيضيات النشطة بالخلية الكبدية

يتم تحضير معظم الأدوية لكي يكون لها قابلية الذوبان في الدهون و بالتالي فإنها تستطيع إختراق الخلايا المعوية وتمتص بسهولة لتصل إلى الدورة الدموية ، و لهذا فإن تصفية الأدوية تتضمن تحويل الدواء إلى جزيئات أكثر ذوبانية في الماء لطرحها في الصفراء أو البول و التي تتم عادة من خلال التزاوج مع نواقل هيدروفيلية (مثل الـــ Glucorunide ، Suflate، GSH). إلا أنه بالنسبة للعديد من الأدوية فإن التزاوج مع النواقل الهيدروفيلية يكون غير ميسر قبل أن يخضع الدواء لتحول حيوي إلى جزيئة أكثر نشاطا عن طريق السيتوكروم CYPأو أنزيمات أخرى خلال المرحلة I. و بالتالي فإن المركبات الوسطية النشطة تتولد أثناء استقلاب الدواء لكي يتزاوج مع نواقل هيدروفيلية يتم تنشيطها بواسطة إنزيمات المرحلة II لتتكون جزيئات هيدروفيلية يمكن طرحها عن طريق البول أو الصفراء. وكل دواء ينتج نوع معين من الأيضيات النشطة عندما يتم استقلابه بواسطة السيتوكروم CYP أو أنزيمات أخرى من المرحلة I.

إن استقلاب الـــAPAP بواسطة CYP2E1 يؤدي إلى إنتاج NAPQI وهو مركب وسطي عالي النشاط يرتبط بالثيولات البروتينية و الـــ GSH (Hinson وآخرون ، 2004). وبالمثل فإن أيض الـــtraglitazone ينتج مركبا غير ثابت (traglitazone-sulfaxide) و الذي يكون روابط ثنائية الكبريت مع الـــGSH (Alvarez-Sanchez ، 2006).

ويرجح أنّ تكوين الأيضيات النشطة يمثل المرحلة الأولية (الإبتدائية) الهامة التي تستحث الـــDILI في أغلب الحالات .إلاّ أن الذي يحدد ما إذا كانت هذه الأيضيات غير ضارة (مثل AMP) أو تزال سميتها أو تحرض الإصابة الكبدية يبقى معقدا ،إلاّ أنه بالتأكيد يتضمن تأثيرات كل من المحيط و الوراثة ، على التعرض للأيضيات النشطة لدى المريض و الطبيعة الكيميائية لهذه الأيضيات وكذا توزيعها و المواقع المستهدفة داخل الخلايا.

2.1.2.2 الارتباط التساهمي

بما أن الوسائط النشطة تتولد عن طريق CYP ليتم تزاوجها مع النواقل الهيدروفيلية فإنّ هذه الوسائط النشطة لها قابلية طبيعية للارتباط التساهمي .و الأيضيات النشطة التي تتولد أثناء استقلاب الدواء لا تتزاوج مع النواقل الهيدروفيلية فحسب بل أيضا يمكن أن تكوّن روابط تساهمية مع الجزيئات الضخمة المختلفة و التي منها البروتينات، إن الطبيعة الكيميائية للمستقلب هي التي تحدد ارتباطه مع الثيولات أو مع أجزاء أخرى.

إن الارتباط التساهمي للوسائط النشطة مع البروتين يمثل مرحلة هامة في حدوث إصابة الخلية الكبدية بواسطة العديد من الأدوية (Kaplowitz ، 2005). وكما أشير سابقا فإن الارتباط التساهمي للـNAPQI مع البروتين يمكن أن يؤثر على نشاط البروتين و الارتباط التساهمي لأيضيات أدوية نشطة أخرى يمكن أن يكون لها نفس التأثيرات على نشاط البروتين في خلخلة وظيفة الخلية الكبدية ونقل الإشارة (signaling).

وفي عدد قليل من الحالات فإن أيضيات الدواء لا تكوّن روابط تساهمية بل تعطي نواتج تقوم بتثبيط البروتينات الأساسية (المفتاحية). فمثلا فان الـــvalporate وهو دواء يسبب إصابة الكبد بالحساسية الذاتية ينتج أيضيات تقوم بحجز العوامل المرافقة (cofactor) (مثل الـcoA وcarnitine) مؤدية إلى تثبيط أكسدة الأحماض الذهنية بالميتوكوندريا (Eyer وآخرون ، 2005).

3.1.2.2 الإجهاد التأكسدي وتوليد الـROS.

إنّ العديد من الأيضيات النشطة يمكن أن تخضع للدورة الرودوسكية المولدة للـــROS و تقوم بأكسدة البروتينات والدهون و الـــ DNA و مركبات ضخمة أخرى مما يؤدي إلى تقطع وانفصال المسارات الخلوية و يسبب الإصابة الكبدية. فمثلا الDicentra وهو دواء مضاد للالتهاب غير الستيرويدي يصفه الأطباء بصورة واسعة فإنّه يتم أيضه من قبل الـــCYP لتكوين Qunine وImine و التي تتميز بالدورة الرودوكسية التي ينتج عنها الـــROS و إصابة الخلية الكبدية (Boelsterli ،2003). و من جهة أخرى فإن الأيضيات النشطة مثل الـــ NAPQI يمكن أن تسبب بصورة غير مباشرة تكوين ال ROS من خلال استنفاذ الـــGSH بالميتوكوندريا (Hanawa وآخرون ، 2008).

إن أنواع الـــROS يمكن لها أن تنشط أو تثبط مسارات التنبيه من خلال الدورة الرودوكسية والذي يؤدي إلى تغيير البروتينات (شكل1) أو من خلال الإصابة الخلوية الناتجة عن هدم الجذور الحرة للبروتينات و الليبيدات و الـــ DNA (Han و آخرون ، 2006b). ويمكن أن يؤدي كل من الارتباط التساهمي و التأثيرات التأكسدية على النقل الالكتروني لاحقا إلى ارتفاع إنتاج الـــROS. ولأن الهدم التأكسدي يمكن أن يتراكم مع الزمن فإن الكمون

الطويل المدى الذي يشاهد في حالة العديد من الأدوية التي تسبب الحساسية الذاتية من النوع DILI non allergicيمكن أن يعزى إلى التكون المستمر (buildup) للهدم التأكسدي بالخلية الكبدية .

إن الــROS تمثل محفزات (activators)هامة لمنبهات الموت الخلوي مثل JNK وعوامل هدم تتوسط إصابة الكبد الناتجة عن الأدوية. وبما أنّ أغلب الأدوية قابلة للذوبان في الدهون فإن تحفيز الأدوية يتضمن التحول الحيوي للدواء بواسطة السيتوكروم CYP P450 أو إنزيمات أخرى للمرحلة I لتنشيط الأيضيات كي تقترن مع العوامل الحاملة (الناقلة) المحبة للماء مثل الجلوكورونيد و الــGSH لطرحها في البول أو الصفراء.

إلا أنه كما بذلك الاسم يوحي فإن الأيضيات النشطة هي مركبات شديدة التفاعل و التي لا ترتبط تساهميا فقط مع النواقل المحبة للماء فحسب بل أيضا ترتبط تساهميا مع البروتينات (kaplawtz ، 2005).

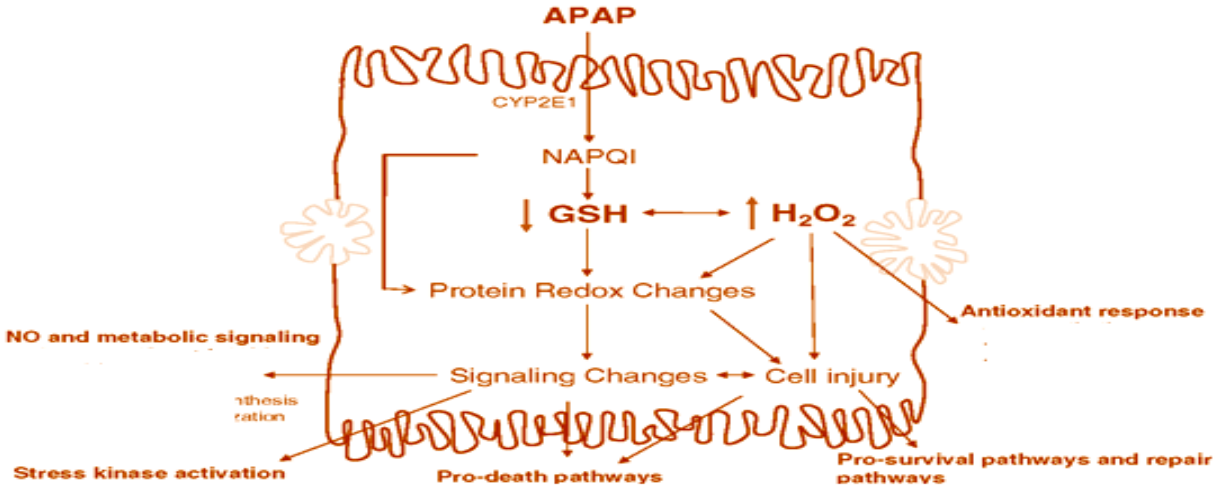
إن الأيضيات النشطة يمكن أن تتكون مباشرة من خلال دورة الرودوكس أو بصورة غير مباشرة من خلال استنزاف الجلوتاتيون ويمكن أن تزيد من الأنواع الأكسيجينية النشطة (ROS) مثلOH° ، O°_2 , H_2O_2 التي تتولد بالخلية الكبدية (Hanawa وآخرون ، 2008). و يمكن للارتباط التساهمي وكذا إنتاج الــROS الذي تتسبب فيه الأيضيات النشطة أن يغيرا من البروتينات و مركبات ضخمة أخرى وبذلك تكون سببا في إجهاد الخلية الكبدية و إصابتها . و الإجهاد أو الإصابة الناتجة عن الأيضيات النشطة يمكن أن تنشط أو تثبط عددا كبير من مسارات التنبيه ، و الخلية الكبدية إما أن تعيش أو تخضع للموت الخلوي الذي يلي الإصابة الناتجة عن الأيضيات النشطة وهذا يخضع بصورة كبيرة للتوازن بين مسارات التنبيه الخاصة بالبقاء الموالي أو الموت المسبق التي يتم تنشيطها. فإذا تم تنشيط مسارات الموت المسبق (prodeath) كما في حالة الــ *JNK* و الـ *BAX*) فإنّ مسارات التنبيه هذه ستحفز موت الخلية الكبدية الذي يلي إصابتها. ففي حالة النكرزة فإن مسارات الموت المسبق مثل *JNK* يمكن أن تعجل بظهور الموت الخلوي (Hanawa وآخرون ، 2008) ونتيجة لذلك فإنّ التثبيط عن طريق الأدوية الصيدلانية لمسارات الموت المسبق هذه تحمي غالبا من الموت الخلوي حتى في حالة وجود إصابة خلوية شديدة. ومن جانب أخر فإن تنشيط مسارات البقاء المسبق مثل AKT وهي إنزيمات تصليح الــDNA يمكن أن تنشط الموت الخلوي من خلال التثبيط المباشر لتنبيه الموت المسبق أو بصورة غير مباشرة من خلال زيادة التصليح الخلوي أو الميتابولزمي (Saberi و آخرون 2008). فتعديل مفاتيح مسارات تنبيه البقاء المسبق أو الموت المسبق هذه بالخلية الكبدية يمكن أن يزيد من مدى إصابة الخلية الناتجة عن الأدوية و بالتالي يمثل أهداف علاجية ممكنة من خلال معاملة الـDILI.

إن مصطلح DILI يصف الظروف والحالة التي من خلالها يؤدي تعاطي فرد معين دواء أو مجموعة أدوية طبية إلى حدوث اضطرابات في الاختبارات الكبدية غالبا تظهر على صورة ارتفاع في معدلات الــALT بالمصل (Serum)، وبالتالي فإن DILI يمكن أن تتسبب في أضرارا خطيرة بالكبد تكون نتيجتها الوخيمة الفشل أو القصور الكبدي الحاد منشؤه الأدوية ، إذ قدّر أن حوالي 60% من كل حالات الفشل والقصور الكبدي الحاد يكون سببها الأدوية (Han وآخرون ، 2010). و الحالات السريرية للقصور الكبدي الحاد الذي ينشأ عن الــDILI يعود أساسا إلى الجرعة المفرطة من الــ Acetaminphen (APAP) (حوالي 50% من

القصور الكبدي الناتج عن الأدوية ، و إلى الأدوية التي تسبب إصابة الكبد بالـــIdiosynoratic (حوالي10%).

4.1.2.2 تنبيه مسارات نقل الإشارة التي تتحكم في الموت أو الحياة الخلوية على مستوى الخلية

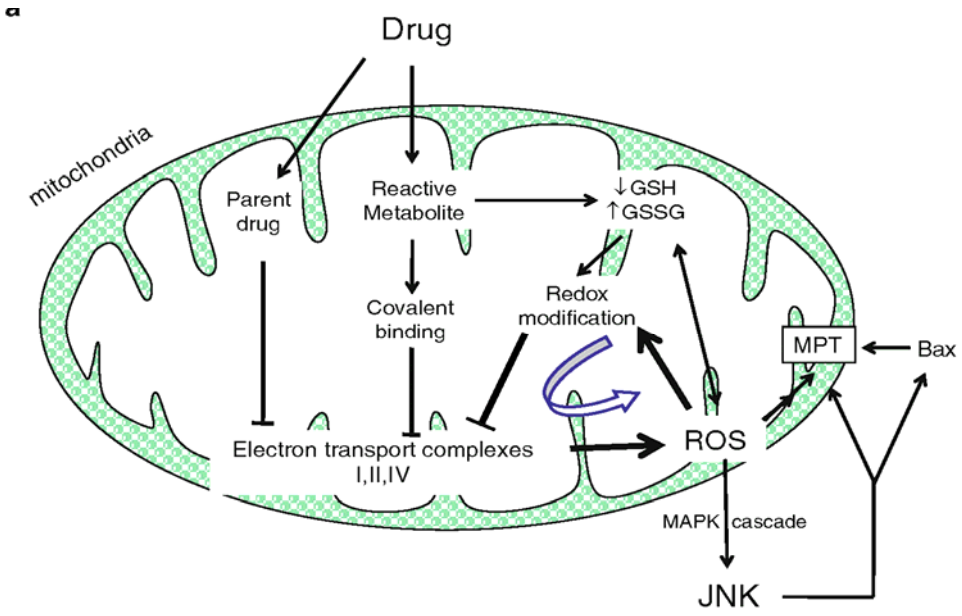
يلخص الشكل (3) أهم المسارات التي تتأثر بفعل الجرعات السامة للـــAPAP على مستوى الخلية الكبدية



شكل (3) تغيرات نقل الإشارة بالخلية الكبدية إثر الجرعات السامة للـــAPAP (Han وآخرون ، 2010)

5.1.2.2 التلف الميتوكوندري.

أهم مسارات التلف الميتوكوندري التي تتأثر بفعل الجرعات السامة للـــAPAP على مستوى الخلية الكبدية يلخصها الشكل (4)

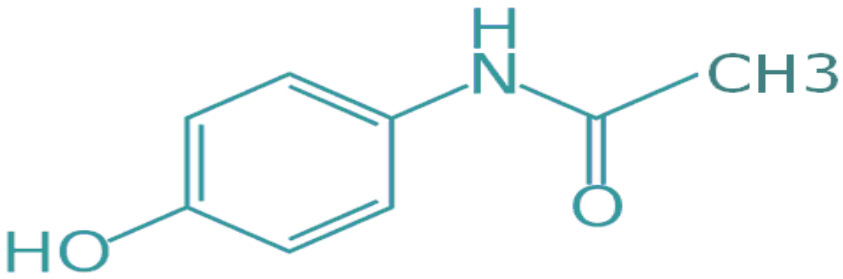


شكل (4): مسارات التلف الميتوكوندري بفعل الجرعات السامة للأدوية على الخلية الكبدية(Han وآخرون ، 2010)

3.2. البراسيتامول والسمية الكبدية

1.3.2. أثر واستقلاب البراسيتامول

يؤخذ البراسيتامول كمسكن للألم و مخفض للحرارة وهو الأكثر تداولا في العالم، إن أخذ البراسيتامول بجرعات علاجية يعطي نتائج حميدة، غير أن الجرعات المفرطة منه تحدث التسمم الكبدي (Sumioka وآخرون، 2004). والاسم الكميائي للبراسيتامول N-Acétyl-P-AminoPhenol ($C_8H_9NO_2$) وصيغته الكميائية المفصلة فهي :



ويتميز بالخواص التالية :

- الوزن الجزيئي : 151.169 غرام /مول .
- نصف العمر الحيوي :1-4 ساعات.
- التصنيف الكميائي : Acétanilide .
- التصنيف الصيدلاني : Antipyrétique، Analgésique .

- للبراسيتامول بعض التسميات الأخرى منها : Acétaminophene ،Para-acétamidophénol و Hydroxyl 4-acétanilide

مثل الساليسيليك يستخدم البراسيتامول كمضاد للحرارة و الألم، دون أن يبدي تأثيرا ضد الالتهاب و التخثر، وفعله ضد الحمى يكون من خلال تأثيره على مراكز التحكم في حرارة الجسم بتحت المهاد البصري، وهو نفس ما يحدث مع الأسبرين في خفض حرارة الجسم،كما أنه غير سام لمخاطية المعدة . وبعد قرن من إدخاله في العلاج ، تبقى طريقة عمله غير مؤكدة تماما (Bonnefont وآخرون، 2003)، غير أن البراسيتامول يعتبر مثبط لدورة إنزيمات السيكلوجيناز ، ومن خلال تثبيط عمل هذه الإنزيمات على الجهاز العصبي (Flower وآخرون، 1972). وقد أكدت دراسات حديثة أن البراسيتامول يثبط بشكل خاص إنزيم مشابه لـــ Cox يسمى Cox_3 وهو بديل لل Cox_1 الموجود بالجهاز العصبي الذي يعد مستهدفا لعمل البراسيتامول (Chandrasekharan وآخرون، 2002)، لكن وجود Cox_3 عند الإنسان يبقى غير مؤكد (Warner وآخرون، 2004). كما دلت دراسات أخرى على وجود نشاط مركزي يسمح للبراسيتامول بالعمل على الأعصاب مؤديا إلى تثبيط المسارات الناقلة للألم على مستوى النخاع الشوكي (Tjolson وآخرون، 1991)، و للبراسيتامول خصائص مضادة للأكسدة تسمح بالتقليل من أكسدة LDL وكذا تقليل الخطر على القلب والأوعية ،كما أنها تحمي من داء بياض العين (Prescott وآخرون، 2003). ويكون امتصاص البراسيتامول سريعا عندما يأخذ

على شكل مشروب (عن طريق الفم) أين يصل أعلى تركيز بالدم عند الأطفال بين 20و30 دقيقة ، يتأخر هذا الامتصاص بالتغذية فتنقص من امتصاصه ،وأما مركب Métoclopramide يزيد من امتصاصه (Aujardوآخرون، 1992). يمتص البراسيتامول من طرف المعي الدقيق ليصل إلى الدورة الدموية بعد 15 دقيقة إلى ساعتين (Bannwarth وآخرون، 2003). وكون الامتصاص الشرجي أو المستقيمي جيد إلا أنه بطيء على عكس الامتصاص المعوي، عندما يؤخذ عن طريق الفم، وقدرت نسبة الامتصاص الشرجي ب10%إلى20% (Bannwarth وآخرون، 2003).

يحقن البراسيتامول في الأوردة سواءا بشكله الأصلي براسيتامول، أو بشكل براسيتامول بدائي ، أين يتحول هذا الأخير بفعل تأثير إنزيم الإستراز إلى براسيتامول ، حيث أن 1غرام من البراسيتامول بدائي،تعطي لنا 500ملغ من البراسيتامول ، والتركيز الأقصى للبراسيتامول الوريدي هو ضعف كمية حبة واحدة من البراسيتامول المأخوذ عن طرق الفم بعد 1ساعة،إن أخذ البراسيتامول عن طريق الفم ،أو عن طريق الحقن في الوريد يعطي تراكيز بلازمية متساوية (Bannwarth وآخرون، 2003).

لا تزيد نسبة ارتباط البراسيتامول بالبروتينات البلازمية عن 20%، حيث أنه سريع الانتشار في النسيج إذ يخترق الحاجز الدموي الدماغي بسرعة ، له تركيز متساوي بين المادة السائلة للنخاع الشوكي والدم (Moreau وآخرون، 1993)، حجم توزيعه متقارب بين الأطفال والكبار، ويقدر بـــ0.9إلى 1.2لتر/كغ (Aujard وآخرون، 1992). يخترق البراسيتامول الحاجز المشيمي وجدار الرحم كما يصل إلى حليب الأم بكميات أقل من 2%من الكمية المأخوذة من طرف الأم (Moreau وآخرون، 1993).

تتم عملية أيض البراسيتامول بواسطة CYP P450 الموجود في الميكروزومات الكبدية، وقد وجد أن 2% من البراسيتامول تطرح في البول دون إستقلاب و 94 % تستقلب إلى نواتج أيضية غير سامة لتطرح على شكل مركبات مقترنة بالجليكوكول أو الكبريت و4 % يتحول بتدخل CYP P450 (CYP 1A2، CYP 2E1، CYP 3A4) إلى نواتج أيضية بصورة N-Acetyl-P-BenzoQuinone(NAPBQ) الذي يمكن من تعديل سميته بواسطة الجلوتاتيون ويطرح في البول مرتبطا مع السيستين (Aujard وآخرون، 1992).
ترجع السمية الكبدية للبراسيتامول لإنتاجه الجذور الحرة السامة في شكل NAPBQI ، ففي حالة زيادة معدل هذا الأخير يعمل على أكسدة الجزيئات الضخمة للأنسجة ، مثل اللبيدات أو مجاميع Thiol (SH) للبروتينات ومن ثم اختلال توازن الكالسيوم بعد اختزال محتوى النسيج من GSH (Johen وآخرون، 2004) . حيث يعد الجلوتاتيون أهم الببتيدات الثلاثية المستعملة كمضادات للأكسدة غير الإنزيمية في الكبد، دوره يتمثل في الحد من الجذور الحرة مثل بروكسيد الهيدروجين، فوق البيروكسيد حفظ مجاميع ال Thiol للبروتينات الغشائية، يلعب دور كمادة تفاعل إنزيم الجلوتاتيون بيروكسيداز وجلوتاتيون ترانسفيراز ،انخفاض معدل GSH من جراء السمية بالبراسيتامول ،ويكون مرفوق بزيادة معدل الأكسدة اللبيدية (Johen وآخرون،2004).
يطرح البراسيتامول مبدئيا عن طريق الكلية ، بأشكال ميتابوليزمية مقترنة مع الغليكوز أوالكبريت أقل من 10% من الجرعة الدوائية تطرح عبر البول تحت أشكال متغيرة (Jallom ،1973) .

2.3.2. سمية البراسيتامول

عند تعاطي جرعة علاجية من البراسيتامول تزيد عن 150ملغ – 12غ يحدث تشكيل كميات كبيرة من المستقلبات السامة مؤديا إلى نفاذ المحتوى الكبدي من الجلوثاتيون ، ويسبب بالتالي النخر الكبدي وحدوث غثيان وتقيئ، خلال عدة ساعات (Jallom، 1973). ويتوقع موت المريض نتيجة لامتصاص جرعة واحدة تزيد عن 15غ. و لما يزيد التركيز داخل الدم عن 200 ملغ/مل عند البالغ المعافى فإنه يعتبر ساما، أما لدى الأطفال فتتراوح الجرعة المميتة من2 إلى 8 غرام حسب العمر، و0.5 غ بالنسبة للرضيع (Jallom، 1973).
إن آليات التسمم الحاد بالبراسيتامول تعتمد على طبيعة النواتج الأيضية النشطة المختلفة الناتجة عن CYP P450 في ميكروزومات الكبد، وهذا التأثير السام يكون من خلال :

1- تكوين روابط ثنائية مع بروتينات النسيج الكبدي مؤدية إلى تخريبها ، فقد أثبتت التجارب المجرات على القوارض أن اقتران النواتج الأيضية على الجزيئات الكبرى تكون غير عكسية وتكون متزامنة مع ظهور حالة نخر كبدي .
2- تحليل اللبيدات الغشائية مؤديا إلى تخريب غشاء الخلية الكبدية .
3- اختلال التوازن الداخلي للكالسيوم هذا الأخير يؤدي إلى تنشيط الإنزيمات الحلولية و مجموع هذه الإختلالات يؤدي إلى نخر كبدي مركز فصي (Jallom ، 1973).

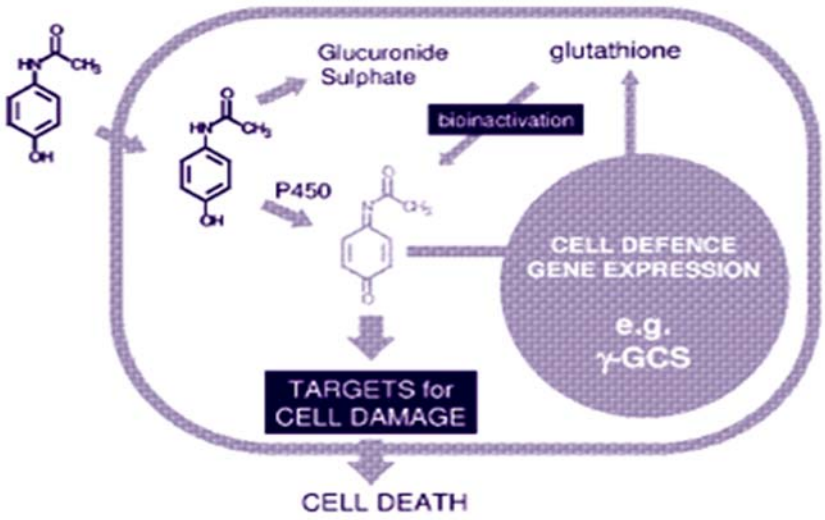
ويمكن تقسيم مرور وتطور التسمم بالباراسيتامول إلى 4 مراحل :

أ- المرحلة الأولى: من 0.5-24 ساعة من أخذ الدواء يبدو المريض عادي أو في حالة تعب خفيف وقد تظهر بعض الأعراض مثل فقدان الشهية ،غثيان ،شحوب ،وتقيء ،ألام في الجزء العلوي من البطن.

ب- المرحلة الثانية :تظهر بعد 24 ساعة من أخذ الدواء تظهر لدى المريض ألام في الجزء الأيمن من الحجاب الحاجز مع رفع معدل الإنزيمات الناقلة للأمين,

ت- المرحلة الثالثة :تبدأ من 72إلى 96 ساعة من تعاطي الدواء تتميز هذه المرحلة بتنكرز كبدي مع يرقان واختلال عملية التجلط ،إصابة كلوية كبدية ودماغية ، انخفاض في تركيب السكريات وحدوث نزيف دموي.

ث- الحالة الرابعة :تبدأ من 4 إلى 14 يوم من تناول الباراسيتامول ، إذا عاش المريض فإنه يعاني طول إصابته من تراجع كلي للوظائف الكبدية، إما أن تجدد وظائف الكبد أو تدمر عن طريق النخر الكبدي ، وفي الحالات الخطيرة ، تحدث تشنجات ، وعجز قلبي ،وصعوبة في التنفس ،ثم الموت(Jallom، 1973 ؛ Auzèpy وآخرون،1990؛ Aschish وآخرون، 2006).



شكل (5) أيض وسمية البراسيتامول (Kevin وآخرون ، 2001)

إن دراسة مسارات النقل الذاتية الداخلية التي تتضمنها الـــDILI قد اصطدمت بعدم وجود نموذج حيواني جيد (Dixit و Boelsterli، 2007) فكل الأدوية التي تم التنقيب عنها أجريت على الحيوانات من اجل التأثيرات الضارة المحتملة على الكبد أو على أعضاء أخرى وقد وجد أن هذه الأدوية و التي تسبب أضرار للكبد لدى الحيوانات فإنها نادرا ما تتطور لدى الأفراد الذين يستهلكونها ولذا فإن اغلب الأدوية التي تسبب الضرر الكبدي الناتج عن الحساسية الذاتية لذى الإنسان فإنها نادرا ما تسبب ضررا كبديا لدى الحيوانات التي تم إحصاؤها. واالقليل جدا من الأدوية التي تسبب ضررا كبديا لذى الإنسان يمكن دراستها على الحيوان و لذلك يصعب فهم الآليات التي يسبب بها الدواء إصابة الكبد وتبقى مجهولة. والاستثناء المسجل هو فقط في حالة APAP و الذي يسبب ضررا كبديا لدى الحيوانات على صورة جرعة استجابة و بالتالي فإن معظم (اغلب)

معرفتنا حول DILI تمّ استيقاؤها من العمل على الـــAPAP عند جرعات عالية تسبب ضررا كبديا لدى الحيوانات (kaplowtz، 2005). إضافة إلى ذلك و بما أنّ إصابة الكبد المحرضة عن طريق الـــAPAP تبدي أعراض وخصائص الحساسية الذاتية في الحيوانات فإنّ عددا من الدراسات الجينومية و الأيضية قد ركزت على فهم الآلية الأساسية المسؤولة عن طبيعة الحساسية الذاتية للـــAPAP (Welch وآخرون، 2006).

1.2.3.2 المستقلب NAPQI وتوليد الـــROS

إنّ السمية الكبدية الناتجة عن الـــAPAP يمكن أن تعزى إلى NAPQI وهو مادة أيضية نشطة تتكون خلال أيض الـــAPAP بواسطة الـــ CYP وفي البداية بواسطة المشابه (الايزومورف) CYP2E1 (Dahlim وآخرون ن 1984). والـــNAPQI جزيئة شديدة التفاعل تكون روابط تساهمية مع المجاميع الكبريتة و الثيولات البروتينية و غير البروتينية (Hinson وآخرون ، 2004). وبالخلية الكبدية تزال سمية الـــNAPQI أساسا عن طريق الـــ GSH الذي يمثل أكبر مضاد أكسدة ،في حالة جرعات الـــ APAP التي تسبب سمية للخلية الكبدية فإن الـــGSH يغمر الخلية و يستنفذ بقوة من السيتوبلازم و الميتوكوندريا التي تحتوي بدورها على كمية منفصلة من الـــGSH (James وآخرون ، 2003). تستنزف جرعات الـــAPAP المسببة للسمية الكبدية (≤250 مغ/كغ المجربة على الفئران) أكثر من 90% من GSH بكل من الستوبلازم و الميتوكوندريا (Hanawa و آخرون ، 2008) . ويمثل أيض الـــAPAP إلى NAPQI مسارا صغيرا في إزالة الـــAPAP وعليه فالجرعات العالية تكون عادة ضرورية لإنتاج معدلات كافية من الـــNAPQI بكل من السيتوبلازم و الميتوكوندريا ، وبمجرد أن يستنفذ الـــGSH فإنّ NAPQI يرتبط تساهميا مع البقايا الثيولية في البروتينات و الذي يؤثر بقوة على نشاط البروتينات (Burcham ، 1991).

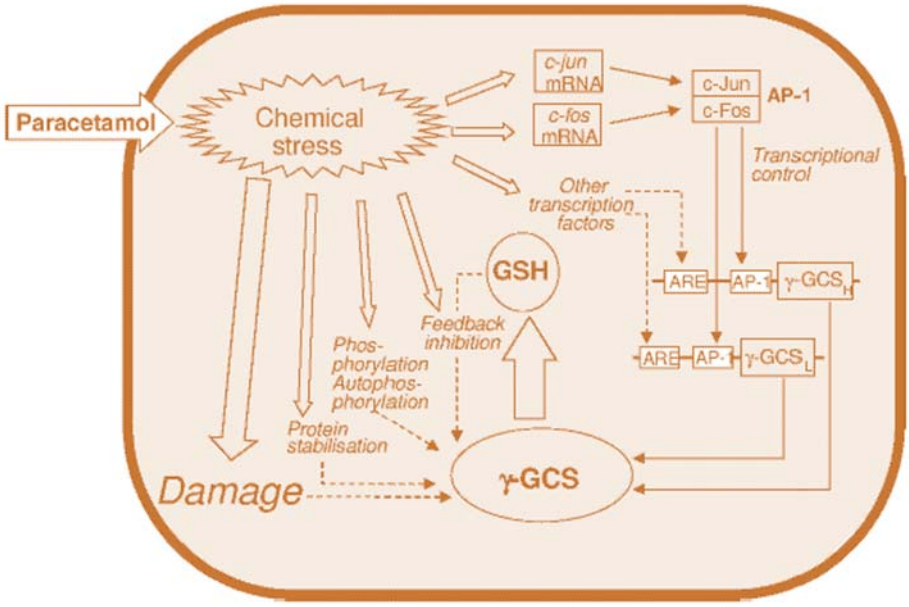
إن استنفاذ الـــGSH المتيوكوندري بواسطة الـــNAPQI له تأثير كبيرعلى توليد الـــROS بالميتوكوندري، فالـــGSH يلعب دورا هاما في إزالة سمية H_2O_2 بحشوة الميتوكوندريا و السيتوبلازم حيث يستخدم إنزيم GSH peroxidase القوة الإختزالية للـــGSH لإختزال H_2O_2 إلى ماء (Han وآخرون 2003). فقد لوحظ ارتفاع في انتاج الـــ H_2O_2 الميتوكوندري لدى الميتوكوندريا المعزولة ساعة بعد معاملتها بالـــAPAP (Hanawa و آخرون، 2008). و ارتفاع الـــ ROS قد يكون نتيجة مباشرة لفقد الـــGSH و الذي يسمح بذلك للـــNAPQI بإتلاف سلسلة النقل الالكتروني مما يزيد في انتاج توليد الـــ ROS (HANوآخرون 2003) . وتوجد مؤشرات توحي بأن الـــNAPQI يمكن أن يحفز حلقة الـــRedox في توليد الـــROS بالخلية الكبدية. إضافة إلى ارتفاع توليد الـــROS فقد اتضح أن المعاملة بواسطة APAP تسبب ارتفاعا في توليد اوكسيد النتريك (NO) بالكبد عن طريق خلخلة تنظيم إنزيم NO synthase المحرض وكذا إنزيم NO synthase المتواجد على مستوى الخلايا الطلائية (Ito و آخرون، 2004)

إن جزءا من الـــNO المتكون عقب المعاملة بـــAPAP يتفاعل مع فوق الأكسيد O°_2 لتكوين بيروكسي نتريت ($ONOO^-$) وهو مؤكسد قوي يقوم بأكسدة البروتينات وجزيئات ضخمة أخرى (Jaeschke، 2003)، وبالتالي

فإنّ السمية الكبدية بالـــ APAP تكون مرفقة بإجهاد تأكسدي مرده إستنفاذ الـــGSH وارتفاع توليد الـــROS وكذلك ارتفاع إجهاد الـــ Nitrosative سببه ارتفاع NO وتوليد $ONOO^-$ بالكبد.

2.2.3.2 التغيرات الرودوكسية البروتينية خلال السمية الكبدية بالـــAPAP

إنّ استنفاذ الـــGSH وكذا ارتفاع الـــROS والأنواع النيتروجينية النشطة ($ONOO^-$، NO، RNS) الناتجة عنNAPQI له تأثير كبير على نظام الرودوكس الخلوي و الميتوكوندري (Hon وآخرون ، 2006؛ Yap ، 2008).

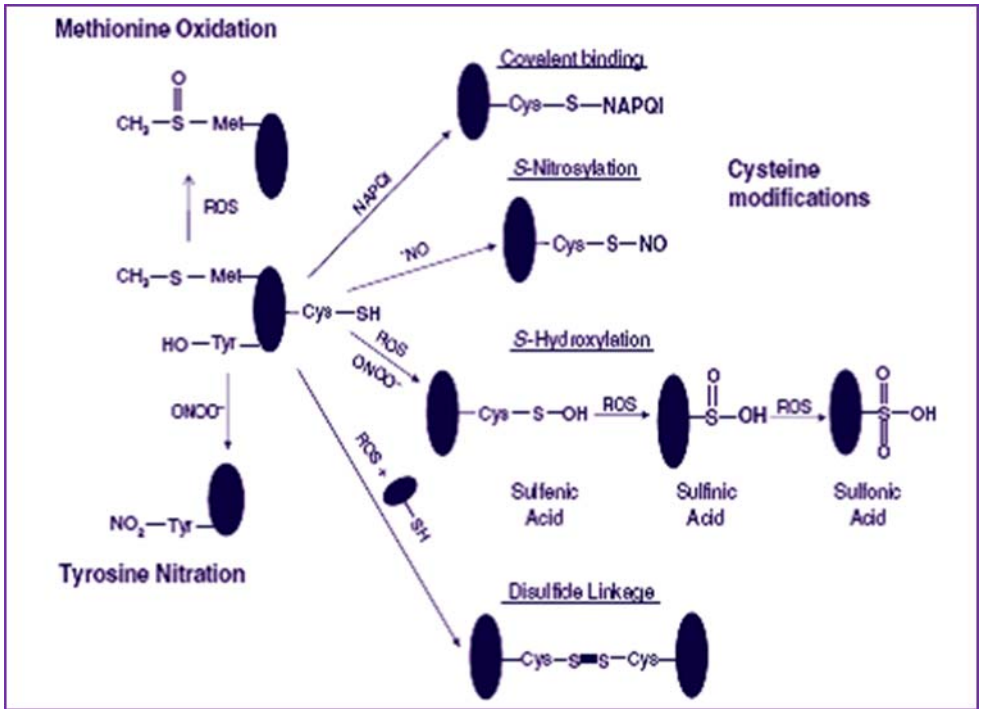


شكل (6) تنظيم الـــGSH أثر الإجهاد الكيميائي الناتج عن البراسيتامول (Kevin وآخرون ، 2001)

تتميز الخلية الكبدية كأغلب خلايا الثدييات بأنها تحتوي على وسط داخل خلوي شديد الاختزال لـــ GSH–GSSG يصبح عاليا أكبر بـــ1:100 والمجاميع الكبريتية في البروتينات تصبح أساسا في صورة ثيولات مختزلة (Kaplowtz و آخرون ، 1985)، وكذا الميتوكوندريا و التي تحتوي على كمية معزولة من الـــGSH يعتقد أيضا أنها تمثل وسطا أكثر اختزالا من السيتوبلازم (Hansen وآخرون ، 2006). و النتيجة الرئيسية لمعدلات الـــGSH المختزل و/ أو ارتفاع الإجهاد التأكسدي و الإجهاد الـــNitrosative الناتج عنNAPQI هو ظهور عطب وفساد نظام الرودوكس البروتيني ومن المحتمل أيضا وظيفته ، فالـــNAPQI يمكن أن يرتبط تساهميا بالثيولات البروتينية ويقوم بإتلاف وظيفة البروتين عندما يستنفذ معدلات الـــGSH. و الـــH_2O_2 المرتفع نتيجة استنفاذ الـــGSH يمكن أن يتفاعل مع الثيولات البروتينية ويؤدي الى تكوين جسور ثنائية الكبريت وحمض الـــsulfenic وتغيرات رودوكسية اخرى للثيولات البروتينية (Han و آخرون، 2006)، وبالمثل فإنّ الـــNO يمكن أن يسببnitrasylation مجاميع الـــthiol البروتينية بينما $ONOO^-$

يمكن أن تسبب اكسدة مجاميع الثيول الى حمضي الـــ sulfeni والـــ sulfenic وكذا نترتة (nitratation) الـــtyrosine (klutt و Lamas، 2000). إضافة إلى السيستيين فهناك العديد من الأحماض الامينية الأخرى مثل الميثيونين و البرولين و الهستدين يمكن أن تتاكسد بواسطة الـــROS ، و الـــRNS (Standman و آخرون، 2003)، وكل هذه التغيرات يمكن أن تؤثر بقوة على نشاط البروتين وهذا يعتمد على الأحماض الامينية المتاثرة بواسطة كل من الـــROS و الـــNAPQI و الـــRNS، فقد لوحظ خلال الإصابة الكبدية المحرضة بواسطة APAP ارتباط تساهمي قوي وأكسدة بروتينية وnitrotytrosine وتكوين هام للـــ$ONOO^-$. و التغيرات الرودوكسية البعدية للبروتينات قد يكون لها آلية هامة في تنشيط العديد من مسارات التنبيه بالخلية الكبدية بعد المعاملة بالـــAPAP، فمثلا فإن بروتينات التنبيه مثل NF-KB وبروتينات انزيمات phosphatases يمكن تثبيطها بواسطة التغيرات الرودوكسية (kamata و آخرون، 2005)، ومن جهة أخرى فإن بروتينات مثل العامل Nrf 2 المرتبط بNFE2 يتم تنشيطها بواسطة التغيرات الرودوكسية (شكل 2) و الـــ Nrf2 هو عامل نسخ هام يرتبط بالعامل المستجيب لمضاد الاكسدة مثل تتابع DNA بالمخصص (promator) للانزيمات المضادة للاكسدة مثل إنزيم GlutamylCysteine ligase (GCL) وانزيم Heme oxygenase وأنزيم Eoxide hydrolase الميكروزومي ، وفي الحالات العادية فان Nrf2 يوجد بالستوبلازم مرتبطا بkeap (Itoh و آخرون ، 2004). يحتوي الـــ keap ثيولات أساسية تكون هامة في ارتباط و احتفاظ بـــ Nrf2 بالسيتوبلازم (Han وآخرون 2010). إن الـــNAPQI يقوم بأكسدة و تغيير الثيولات بالـــ keap بصورة مباشرة من خلال الارتباط التساهمي او بصورة غير مباشرة من خلال استنفاذ الـــGSH و/او ارتفاع ROS . وتؤدي اكسدة keap1 الى تحرير Nrf2 الذي ينتقل بعد ذلك الى النواة . و في النواة فإنNrf2 يرتبط بالـــARE ويقوم بتنشيط جينات استنساخ مضادات الأكسدة مثل الـــ GCL لمعارضة و إيقاف الاختلال الرودوكسي الناتج عن الـــNAPQI (Goldring و آخرون، 2004).

وقد وجد أن بروتينات أخرى تكون عرضة لتغيرات رودوكسية بعد انتقالية (post-translational) اثر المعاملة بـــAPAP تشمل كل من 3OH-3-methy glutauryl curnzyme synthetase وهو انزيم تنظيم اساسي في عملية الـــ kettogensis وكذ اإنزيم الـــcatalase الذي يعمل على إزالة سمية الـــH_2O_2 (Adringa و آخرون ، 2008). ان التغير الرودوكسي للبروتينات تم اعتباره على انه آلية هامة في تنشيط أو تثبيط العديد من بروتينات التنبيه عند الاستجابة للـــ ROS وRNS (Yap و آخرون ، 2008).



شكل (7) التغيرات الرودوكسية للأحماض الأمينية في البروتينات (Han وآخرون ، 2010)

2. 4. الإجهاد التأكسدي و الجذور الحرة

1.4.2 المواد المؤكسدة Oxidants

يعتبر الأكسجين عنصراً أساسياً ومهماً في إنتاج الطاقة عن طريق أكسدة الغذاء (Pincemail وآخرون، 2003 ؛ Cyprus و Pratico، 2006)، ومع ذلك فإن اختزال هذا العنصر لا يكون كاملاً، حتى تحت الظروف الطبيعية. إذ غالباً ما تنشأ مجموعات وسطية من المواد الكيميائية النشطة الطبيعية من عمليات التحول الغذائي وهي تلك التي يطلق عليها الجذور الحرة Free radicals (Palazzetti، 2005). وتعمل الجذور الحرة على مهاجمة وتدمير مكونات الخلايا لتحدث بها أضراراً بالغة في مادتها الوراثية ووظائفها الخلوية المختلفة . ومع زيادة تراكم الجذور الحرة، تظهر أمراض عديدة مثل الأمراض الانحلالية وأمراض القلب والأوعية الدموية والسرطان والشيخوخة وغيرها(Kehrer، 1993؛ Chen وآخرون، 2000؛ Al-Omar وآخرون، 2004؛ Blair وآخرون، 2006؛ Durand وآخرون،2003).

والجذر الحر هو عبارة عن جزيء أو ذرة تحتوي على إلكترون غير مزدوج في مداره الخارجي، وقد تكون تلك الشوارذ عضوية أو غير عضوية، ويطلق بعض العلماء مصطلح العامل المؤكسد على الجذر الحر(Delattre وآخرون، 2005). وتبقى الإلكترونات في الأحوال العادية في الجزيئات مزدوجة، وحين يفقد

الجزيء أحدها فإنه يصبح غير مستقر ومؤذ للجزيئات الأخرى المجاورة، إذ أن بقاء الإلكترون وحيداً في مداره الخارجي يجعله في حالة بحث دائم ونشط عن الإلكترون المفقود ليكون زوجاً من الإلكترونات المستقرة،وهذا ما يجعله ينتزع إلكتروناً من الجزيئات المجاورة مما يسبب إتلاف جزيئات الخلية الطبيعية في الجسم(Milane، 2004). وبالرغم من قصر فترة حياة الجذر الحر التي لا تتجاوز أجزاء من الثانية، إلا أن جذراً حراً واحداً قد ينشر حالة من الفوضى أو عدم التوازن وبالتالي نشوء الأمراض(Bierl وآخرون، 2006).

إن نشاط حركة وانتقال الإلكترونات يعتبر من الأمور الأساسية في صناعة الطاقة وفي التفاعلات الحيوية الأخرى في الجسم، لكن إذا تمت هذه السلسلة من التفاعلات بطريقة عشوائية وغير مسيطر عليها فإنها تتسبب في تمزيق الأغشية البلازمية للخـــلايا وتغيير وظائفها، كما قد تؤدي إلى طفرات جينية وربما إلى موت الخـــلايا(Brent، 1993). كما تؤدي الجذور الحرة إلى إتلاف الأغشية الحيوية الأخرى كأغشية الميتوكوندريا وتؤثر على الدهون غير المشبعة في الدهون الفوسفاتية وتؤدي إلى تصلب الأغشية ونقص نشاط الارتباط الإنزيمي بها كنقص نشاط مضخات الصوديوم Sodium pumps. كما تؤثر الجذور الحرة كذلك على نشاط المستقبلات الغشائية وعلى نفاذية الأغشية أو ربما تؤدي إلى السرطان من خلال تدميرها لل(ADN) أو إلى أمراض أخرى كأمراض القلب والتهاب المفاصل. ويعزي كثير من العلماء الشيخوخة وأمراض ضمور الخلايا إلى نشاط الجذور الحرة (Lairon، 2004). ويســتطيع جســم الإنســان الســيطرة على هــذه السلسلة من التفاعلات في الوقت المناسب، عن طريق نظام يدعى بنظام المواد المضادة للأكسدة داخل الخلايا والذي يوجد، أيضاً،في بعض الفيتامينات والأملاح التي تعمل كآليات حماية ضد التأثيرات الضارة للجذور الحرة (Halliwell ، 1996).

يتم إنتاج العديد من المواد المؤكسدة القوية خلال عمليات الأيض في كل من الخلايا الدموية الحمراء ومعظم خلايا الجسم الأخرى، وهذه المواد المؤكسدة تتضمن جذر فوق الأكسجين ($O_2^{\circ -}$) Superoxide وفوق أكسيد الهيدروجين (H_2O_2) وجذور Peroxyl radical ($ROO^{\cdot}$) وجذور الهيدروكسيل Hydroxyl radical (OH°) (Vladimirov، 1998؛ Skaper وآخرون ،1997؛ Cadenas وDavies ،2000)

1 ــ فوق الأكسجين: ($O_2^{\circ -}$) Superoxide

يتم تكوينه في خلايا الدم الحمراء عن طريق الأكسدة الذاتية للهيموجلوبين Hemoglobin (Hb) إلى ميثيموجلوبين Methemoglobin. وفي الأنسجة الأخرى يتم تكــوين هــذا الجــذر الحــر عن طــريق عمل إنزيمات Cytochrome-P450 reductase وَ Xanthine oxidase .(Cadenas وDavies ،2000)

2 ــ فوق أكسيد الهيدروجين: (H_2O_2) Hydrogen peroxide

يكون هذا المركب عرضة لعدد من المصائر (Fates). فإنزيم الكاتلاز Catalase الموجود في العديد من أنواع الخلايا يحوله إلى ماء H_2O وأكسجين O_2 ، كما أن الخلايا الدموية البيضاء المتعادلة تمتلك إنزيم فريد يسمى Myeloperoxidase يحول H_2O_2 والهاليدات Halide إلى أحماض. (Cadenas و Davies،2000؛ Kitteringham وآخرون، 2000)

3 ــ جذور الهيدروكسيل ($OH^{\cdot}$) وأيونات الهيدروكسيل OH^-

يمكن أن تتكون من H_2O_2 في تفاعل غير إنزيمي يتم تحفيزه بأيونات الحديدوز (Fe^{+2})، ويسمى هذا التفاعل بتفاعل Fenton. إن جذر الهيدروكسيل $OH^{\cdot}$ هو جزيء نشط جداً ويمكن أن يتفاعل مع البروتينات والأحماض النووية والليبيدات وغيرها من الجزيئات ليغير من تركيبها ويسبب تلفاً للأنسجة (Cadenas و Davies،2000 ؛ Halliwel، 1996)

عند إنتاج الخلايا للطاقة التي تحتاجها لعملياتها الحيوية المختلفة فإن كل جزيء أكسجين يتقبل أربعة إلكترونات لينتج الماء، فإذا تمت إضافة هذه الإلكترونات واحداً تلو الآخر، وهذا ما يحدث عادة، فإن الأكسجين سوف يتحول إلى جذر حر يدعى فوق الأكسيد الذي يساهم في تشكيل مركب آخر يسمى فوق أكسيد الهيدروجين H_2O_2 المعروف بالماء الثقيل (المؤكسج). ولا يتوقف الأمر عند هذا الحد، بل يقوم هذا المركب بتكوين جزيئات أخرى ذات شحنة كهربائية ضعيفة هي الجذور الهيدروكسيلية $OH^{\cdot}$. إن مثل هذه العملية قد تحدث في جسم الإنسان من خلال عمليات أخرى مثل تلوث الهواء والتدخين والتعرض للإشعاعات، بالرغم من أن معظم تفاعلات الجذور الحرة هي إختراقية (Chowdhury وآخرون، 2006؛ Delattere وآخرون؛ 2005). ولقد لوحظ أن الجذور الحرة لأنواع الأكسجين النشط Reactive oxygen species (ROS) تدخل في العديد من التفاعلات التي من أهمها تفاعلها مع ADN وتكسيره وخاصة عند الإجهاد التأكسدي Oxidative stress حيث تصل عملية الأكسدة إلى ذروتها. كما يتعرضADN أيضاً إلى أضرار طفورية. وهذه التفاعلات يعزى إليها أكبر الأثر في إحداث مظاهر الضرر والتسمم للجزيئات الحيوية في الخلية حتى حدوث الموت الخلوي بالتنكرز(Pero وآخرون،1990 ؛ Hansen وآخرون، 2006). كما أن ROS تزيد من نفاذية غشاء الميتوكوندريا، مما ينتج عنه تحرير العوامل المحثة للموت الخلوي المبرمج (Apoptose) (AIF) وبالتالي حدوث هذا النوع من موت الخلية(Singh وCzaja ،2007). كما يعتقد أن أنواع الأكسجين النشطة تلعب دوراً مهماً في أنواع عديدة من الضرر الخلوي (الناتج عن تناول أو تعاطي مواد كيميائية سامة) بعضها يمكن أن يتسبب في موت الخلايا. إن مقدرة الجذور الحرة على إحداث التسرطن تتم عن طريق اتحاد جذر ال $OH^{\cdot}$ معADN ، كما أوضحت العديد من الدراسات علاقة ROS بطفرات الجين P53.(Delattere وآخرون؛ 2005؛ Williamson وآخرون، 1998؛ Pero وآخرون، 1990؛ Valko وآخرون، 2006).

إن إزالة الجذور الحرة بواسطة مضادات الأكسدة مهمة جداً لصحة وحياة الكائن الحي ومع ذلك فالجذور الحرة ليست مجرد مواد ضارة فحسب، لكنها قد تكون في بعض الأحيان بمثابة السلاح الذي يستخدمه الجسم للدفاع عن نفسه (Vladimirov، 1998). فبعض خلايا الدم البيضاء (الخلايا الملتهمة الكبيرة والخلايا المتعادلة الصبغة) عندما تلتهم البكتيريا فإنها تظهر زيادة سريعة في استهلاك الأكسجين وهذا ما يعرف بـ Respiratory burst الذي ينتج عنه كميات كبيرة من الجذور الحرة مثل $OH^{\cdot}$ ، $O_2^{\circ -}$ ، و H_2O_2 وبعض هذه الجذور هي عوامل فعالة لقتل البكتيريا. كما تعمل جذور الأكسجين كإشارات خلوية داخلية وخارجية لتحفيز العديد من الوظائف الخلوية مثل تنظيم التعبير الجيني وتحفيز النمو والتكاثر، ولقد عرف أن الخلايا التي تنتج مستويات منخفضة من ROS تعمر أطول (Valko وآخرون، 2006)

تنشأ الجذور الحرة في جسم الإنسان من مصادر داخلية Endogenous وخارجية Exogenous وتزيد في حالات المرض والإرهاق النفسي والجسدي وبتقدم العمر شيئاً فشيئاً. ويعتبر النشاط الأيضي داخل الخلايا مصدراً داخلياً للجذور الحرة، كما أن العديد من المركبات في الجسم مثل الأدرينالين والدوبامين وبعض مكونات الميتوكوندريا يمكن أن تتفاعل مع الأكسجين لإنتاج جذور فوق الأكسجين والذي يتم إنتاجه كذلك داخل الجسم من خلايا الدم البيضاء كآلية دفاعية ضد البكتيريا (Singh وCzaja، 2007).

كما تتولد الجذور الحرة في جسم الكائن الحي من عدة مصادر خارجية أهمها: الأشعة فوق البنفسجية والسجائر وكل أنواع التدخين ومبيدات الحشائش والآفات Herbicides and Pesticides والمواد البتروكيميائية والمذيبات كالبنزين وبعض العقاقير Drugs والأشعة الكونية وأشعة(x) X-rays وفرن الأمواج القصيرة Microwaves oven والقوى الكهرومغناطيسية المنبعثة من خطوط الضغط العالي والمولدات الكهربائية والهواتف الجوالة وشاشات التلفزيون والحاسب الآلي وبعض المركبات الموجودة ضمن الأطعمة المأكولة والغازات المنبعثة من العوادم.

إننا لا نستطيع إيقاف تكون الجذور الحرة, لأنها جزء من عملياتنا الأيضية وحياتنا اليومية في هذا العالم الصناعي (Delattere وآخرون؛ 2005؛ Singh وCzaja ، 2007؛ Chowdhury وآخرون، 2006). ويعمل الجلد على حماية الجسم والحد من تأثير الجذور الحرة خارجية المصدر. أما الجذور الحرة داخلية المصدر، فإن للجسم آلية للسيطرة على سلسلة التفاعلات المنتجة للجذور الحرة والتي تتمثل في مضادات الأكسدة التي تدور داخل الجسم وتقف حائلاً بين الجزيئات السليمة والجذور الحرة وتقدم لها إلكتروناتها للقضاء عليها وإبطال مفعولها قبل أن تؤثر على الجسم أو القيام بتدمير الأكسجين المختزل مثلا لمنع تكوين جذور $OH^{\cdot}$ التي تهاجم الجزيئات الحيوية . (Valkoوآخرون، 2006 ؛Pietta، 2000).

و يشار إلى المركبات الكيميائية والتفاعلات القادرة على إنتاج أنواع الأكسجين شديدة السمية بالمؤكسدات الأولية Pro-oxidants، كما يطلق على المركبات والتفاعـــلات التي تحـــلل أو تدمـــر هذه الأنواع أو تصيدها أو تكبت تكوينها أو تضاد تأثيراتها بالمواد المضادة للأكسدة Antioxidants والتي منها NADPH وَ GSH والفيتامين E والفيتامين C وفي الخلايا الطبيعية هناك اتزان بين المؤكسدات الأولية ومضادات الأكسدة،إلا أن هذا الاتزان يمكن وأن يتغير باتجاه المؤكسدات الأولية عندما يزيد إنتاج أنواع الأكسجين النشـــطة بدرجة كبيرة (بعد تناول مـــواد كيميائية أو عقاقير معينة) أو عندما يتم إضعاف أو إنقاص مستويات المواد المضادة للأكسدة (عندما تكبح الإنزيمات المسؤولة عن تدمير أنواع الأكسجين النشطة). وتسمى هذه الحالة " بالإجهاد التأكسدي " والتي يمكن أن تؤدي إلى دمار شديد في الخلايا إذا كان هذا الإجهاد مكثف أو طالت فترته الزمنية.(Chowdhury وآخرون، 2006؛ Hansen وآخرون، 2006)

5.2 مضادات الأكسدة Antioxidants

هي مجموعة من العناصر والمركبات التي لها القدرة على منع أو إبطاء عملية الأكسدة بهدف حماية المركبات الأخرى من الأكسجين. وتوجد مضادات الأكسدة في جسم الكائن الحي على صورة إنزيمات أو

مرافقات إنزيمية Co-enzymes أو مركبات تحتوي على عنصر الكبريت المختزل مثل الجلوتاثيون (Kitteringham وآخرون، 2000). كما توجد مضادات الأكسدة بصورة طبيعية في الخضروات والفواكه والحبوب ومعظم الأعشاب الطبية. ولقد زاد الاهتمام بمضادات الأكسدة في السنوات الأخيرة بسبب قدرتها على تحصين الجسم ضد غزو الجراثيم والقضاء عليها، كما تقي الجسم من أمراض العصر الشائعة. وتتعدد وظائف مضادات الأكسدة لتغطي معظم حاجات جسم الإنسان من الوقاية والشفاء وترميم أنسجته وخلايا جسمه(Pietta، 2000). كما تحميADN من الضرر وتثبط عمل الجذور الحرة. ومع أن آلية عمل مضادات الأكسدة غير واضحة بدقة، إلا أن البحوث العلمية والدراسات الإحصائية أكدت فاعليتها في الوقاية من الأمراض ومقاومتها (Chowdhury وآخرون،2006). وتصنف مضادات الأكسدة في مجموعتين أساسيتين هما:

1.5.2 مضادات الأكسدة الإنزيمية: Enzymatic antioxidants

وتلعب دوراً هاماً وأساسياً في حماية الخلية من الإجهاد التأكسدي، وتنقسم هذه المجموعة إلى ثلاث فئات هي:

- **فوق أكسيد الديسموتاز: Superoxide dismutase(SOD)**

يعتبر هذا الإنزيم أحد أهم الإنزيمات الفاعلة كمضاد للأكسدة. فهو يقوم بإزالة جذور فوق الأكسجين وذلك بتسريع معدل إزالته بحوالي أربع مرات بمساعدة بعض المعادن مثل السيلينيوم والنحاس والزنك كما يوضحه التفاعل التالي: (Yoshino و Murakami، 1998)

$$2O^{\circ-}_2 + \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

ولأنه يعتبر عامل مؤكسد ومختزل في آن واحد، فإن إنزيم SOD يقي الكائنات الحية الهوائية من التأثيرات الضارة لهذا الجذر (غير موجود في اللاهوائية إجبارياً) وهو يوجد في كل الأنسجة الهوائية في الميتوكوندريا والسيتوزول (Valko وآخرون، 2006).

- **الكاتلاز: Catalase**

ويوجد في الأجسام البيروكسية Peroxisomes في خلايا أنسجة الكائنات الراقية كالدم ونخاع العظام والأغشية المخاطية والكلى والكبد. كما أن هذه الأجسام غنية بإنزيم آخر هو الاكسيداز Oxidase. فبينما يعمل الاكسيداز على تكوين H_2O_2 يقوم الكاتلاز بتكسيره وتحويله إلى ماء وأكسجين حسب التفاعل التالي:

$$2H_2O_2 \xrightarrow[Catalase]{} 2H_2O+O_2$$

حيث أن الماء والأكسجين الناتجة ثابتة ومستقرة ولا ضرر منها. تحمي إنزيمات Hydroperoxidases الموجودة أيضاً في الأجسام البيروكسية الجسم ضد الأكاسيد الضارة، لأن تراكم الأكاسيد يؤدي إلى تكون جذور حرة تؤثر على الأغشية الخلوية وتسبب السرطان وأمراض الشرايين.

لإنزيم الكاتلاز نشاط البيروكسيداز فهو يمكن أن يستخدم جزيئات H_2O_2 كركيزة مانحة للإلكترون وجزيئات H_2O_2 أخرى كمؤكسد أو مستقبل للإلكترون (Jeyapaul و Jaiswal، 2000).

- **جلوتاثيون بيروكسيداز: Glutathione Peroxidase**

يوجد هذا الإنزيم في خلايا الدم الحمراء والأنسجة الأخرى. ويقوم هذا الإنزيم بتحفيز تكسير H_2O_2 وَ Hydroperoxides اللبيدات بواسطة الجلوتاثيون المختزل (GSH) وَ H_2O_2 ليعطي الجلوتاثيون المؤكسد (2GS) والماء، حسب المعادلة التالية:

$$2GSH + H_2O_2 \xrightarrow[GP_X]{} GS\text{-}SG + 2H_2O$$

يقوم الجلوتاثيون بيروكسيداز بحماية دهون الأغشية الحيوية والهيموجلوبين ضد الأكسدة بواسطة Peroxides التي يمكن أن يستخدمها كركائز أخرى (Jaeschke، 1990).

$$ROOH + 2\ GSH \xrightarrow{GPx} ROH + H2O + GSSG$$

2.5.2 مضادات الأكسدة غير الإنزيمية: Non-enzymatic antioxidants

هناك عدة أنواع من مضادات الأكسدة غير الإنزيمية ومنها:

- **فيتامين ــ ج:** Vitamin-C

يسمى، كذلك، بحمض الأسكوربك Ascorbic acid؛ وهو مضاد أكسدة يذوب في الماء ويعمل داخل الخلايا ويستطيع اختزال الجذور الحرة من معظم مصادرها، كما يعمل على مساندة النظام الدفاعي للجسم ويستخدم أيضاً ضمن آليات الجسم لإزالة سمية بعض المواد الكيميائية وله دور هام في عملية الأكسدة والاختزال في الجسم. كما أن لهذا الفيتامين دوراً مضاداً للموت الخلوي المبرمج ويؤثر أيضاً على بعض المواد المضادة للتكاثر. وبصفة عامة، يلعب فيتامين C دوراً هاماً في الحفاظ على الصحة العامة ومقاومة الأمراض وتقوية الأغشية الخلوية وإبطال فعل السموم والجذور الحرة. ولأن جسم الإنسان لا يستطيع إنتاج هذا الفيتامين،

يجب تناول الأطعمة التي تحتوي عليه كالحمضيات وخاصة من قبل الأشخاص المدخنين (Bostick،1996 ؛ Lee وآخرون،2001)

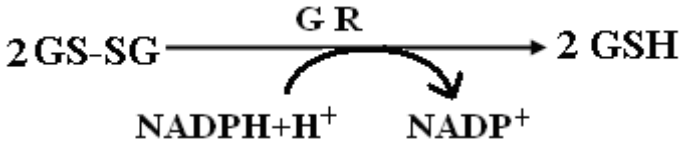
- **فيتامين ــ هـــ:** Vitamin-E

يعتبر فيتامين E من أكثر مضادات الأكسدة ذوبانية في الدهون وتعرف مركباته بالتوكوفيرولات Tocopherols والتوكوترينولات Tocotrenols ومن أهمها مركب ألفاتوكوفيرول α-Tocopherols الذي يلعب دوراً حيوياً في حماية الأغشية الخلوية من التلف التأكسدي وبالتالي منع الكولسترول من الالتصاق بجدران الشرايين حيث إن هذا الفيتامين يقوم باقتناص الجذور البيروكسية في الأغشية الخلوية ولذلك يطلق عليه تعبير " كاسح الجذور " Radicals Scavenger. كما يعادل تأثير بعض الجذور الحرة الأخرى وبالتالي يعمل على الوقاية من بعض الأمراض. كما تعمل مركبات فيتامين E على منع أكسدة بعض العناصر الغذائية وإعاقة سلسلة التفاعلات التي تؤدي إلى أكسدة الدهون والزيوت وذلك بمعادلة مركبات أنواع الأكسجين النشط.

اكتسب فيتامين E أهمية بالغة بعد أن عرف دوره كمضاد للأكسدة وإطالة العمر الافتراضي لخلايا الجسم ومعالجة عدد من الأمراض كتقليل نسبة حدوث الإصابة بالجلطات القلبية بمعدل 77 ٪ وتصلب الشرايين بنسبة 47 ٪، كما أن لهذا الفيتامين دور في وقاية الجين P53 من التطفر. ومن المصادر الغنية بهذا الفيتامين زيت النخيل والذرة والفول السوداني. (Bostick،1996؛ Prieto وآخرون،1999 ؛ Kahl وKappus ،1993)

- **الجلوتاثيون:** Glutathione

هو ببتيد قصير مكون من ثلاثة أحماض أمينية هي: الجلوتاميك Glutamic والسيستين Cystine والجلايسين Glycine. يوجد الجلوتاثيون في الأنسجة الحيوانية ويلعب دوراً مهماً كمضاد للأكسدة حيث يحمي الخلية من التلف التأكسدي ويثبط تكون الجذور الحرة داخل الخلية، كما يحفز اختزال البيروكسيداز Peroxidase. يعاد تكوين الجلوتاثيون المختزل (GSH) من الجلوتاثيون المؤكسد 2GS بتحفيز إنزيم Glutathione reductase الذي يعتمد على تواجد NADPH كما يوضحه التفاعل التالي:



هناك العديد من المواد السامة الغريبة المحبة للإلكترونات Toxic electrophilic xenobiotics التي ترتبط مع GSH الذي يوجد بكميات عالية في الكبد وبكميات أقل في الأنسجة الأخرى. إذا لم يتم ارتباط المواد الغريبة بالجلوتاثيون فإنها سترتبط مع (ADN) أو (ARN) أو بروتينات الخلية، مما ينتج عنه دمار خلوي كبير. ولهذا فإن للـــGSH دوراً مهماً كآلية دفاعية ضد المركبات السامة مثل العقاقير والمواد المسرطنة(Hayes و McLellan ،1999 ؛ Jaeschke ،1990؛ AhlgrenBeckendorf وآخرون، 1999).

توجد العديد من مضادات الأكسدة غير الإنزيمية الأخرى مثل الفلافونويدات Flavonoids والكاروتينويدات Carotenoids وهي مضادات أكسدة فعالة خصوصاً في عمليات الأكسدة الخاصة ببعض المعادن. توجد الفلافونويدات والكاروتينويدات في العديد من الأطعمة كالفواكه والخضروات. وقد تم التعرف على أكثر من 4000 نوع من الفلافونويدات الطبيعية التي من أهمها الكاتشنات Catechines التي لها دور في القضاء على بعض الجراثيم المعوية وإبطال مفعول سمومها القوية المسمات بالفيروتوكسين Verotoxin وتتواجد الكاتشنات بوفرة في الشاي الأخضر. (Pietta، 2000 ؛ Sudheesh وآخرون،1999 ؛ Cotelle، 2001). وهناك أيضاً عنصر السيلينيوم Selenium الذي يوجد بتراكيز مرتفعة في الكبد والكليتين والطحال والقلب ويعمل كمضاد أكسدة بالاشتراك مع فيتامين E في بعض التفاعلات الحيوية لحماية خلايا الدم الحمراء من الأكسدة (Stephens وآخرون، 1996).

ويعتبر أخصائيو التغذية أن تعزيز النظام الغذائي الطبيعي الشامل بمعظم أنواع مضادات الأكسدة يؤدي إلى إطالة فترة حياة الكائن وتحسين صحته وتخفيف علامات الشيخوخة(Pietta، 2000) وتعمل مضادات الأكسدة بصفة عامة كمجموعة واحدة متكاملة ضد أنواع مختلفة من الجذور الحرة في أجزاء مختلفة من الخلايا وفي مواضع مختلفة من الجسم وبطرق مختلفة أيضاً، أي أن تأثيرات مضادات الأكسدة مجتمعة تكون أفضل من تأثير كل مضاد أكسدة بمفرده، كما تستعيد بعض مضادات الأكسدة فاعليتها بواسطة مضادات الأكسدة الأخرى، وهذه إحدى الأسباب الهامة لتأثيرها المجتمع (Yoshino و Murakami، 1998). إن مضادات الأكسدة التي تتكون طبيعياً داخل الخلايا غير كافية مما أدى إلى تصنيع مجموعة من المركبات التي تعمل كمضادات للتأكسد أطلق عليها مسمى مضادات الأكسدة المصنعة والتي يضاف بعضها إلى الأطعمة لمنع أكسدة مكوناتها من الدهون والسكريات والبروتينات. ومن هذه المركبات مادة بيوتيلاتيد هيدروكسي تولوين Butylated hydroxytoluene (BHT) (Cotelle، 2001؛ Pietta، 2000؛ Delattere وآخرون، 2005).

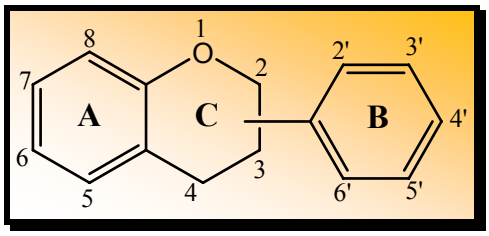
2. 6. عديد الفينولات و الفلافونيدات

1.6.2 الخصائص العامة للفلافونيدات

تشكل الفلافونيدات قسما معتبرا من الجزيئات البوليفينولية المتنوعة، وهي مركبات يتكون هيكلها من 15 ذرة كاربون، وتقسم بنيويا إلى 15 عائلة أهمها مايلي : الفلافون ، الفلافونول ، الفلافانول ، الأيزوفلافون ، الشاكلون ، الأورون ، الأنثوسيان .ويمكن لهذه المركبات أن توجد بصورة حرة وتعرف بالأجليكونات و بصورة جليكوزيدات (Elliot، 1984). إنّ أول من أشار إلى الفلافونيدات هو Geissman (1955) وذلك لتعريف

الصبغات المهيكلة بـــ C6-C3-C6 (مماثلا للفلافون). وقد أشتق اسم الفلافونيد من الاسم الإغريقي Flavus والذي يعني اللون الأصفر (Sanni و Sauvin، 1952).

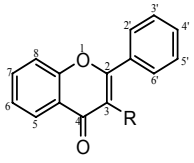
تنتشر الفلافونيدات بشكل مفرط على مستوى النباتات الراقية خاصة على مستوى بعض العائلات مثل المركبة والقرعية والخيمية، و يمكن أن تتواجد على مستوى كل من الأوراق، الأزهار، الجذور، البذور، حبوب الطلع (Jurd و Horowitz، 1962). وقد تكون منصهرة داخل فجوات كما هو حال الـــHeterosides أو كمركبات بلاستيدية. تتميز هذه النواتج الأيضية بامتلاكها نواتين بنزينيتين تعرف إحداهما بالنواة A والأخرى بالنواة B ترتبطان بسلسلة ثلاثية الكربون كما يدلي بذلك الشكل

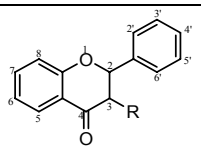
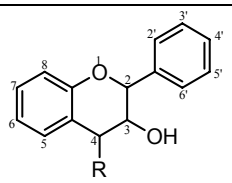
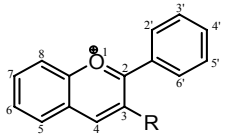
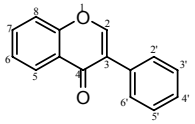
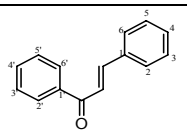
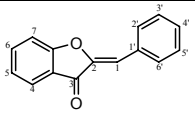


شكل(8) : الهيكل الفلافونيدي

تتدخل الفلافونيدات كمضادات أكسدة على مستوى كيمياء النبتة، كما تعتبر ضابطات أنزيمية وطلائع للمواد السامة والصبغات (Middleton ، 1996). كما يمكن لها أن تتدخل في تنظيم النمو النباتي من خلال تداخلها مع مختلف الهرمونات النباتية. وتلعب دور الواقيات من الإصابات الطفيلية أو البكتيرية (Middleton، 1996)، وتحمي أيضا النبات من تأثير الإشعاعات الضارة لخاصيتها الإمتصاصية للأشعة فوق البنفسجية (Bruneton ، 1993).

جدول (5) : أقسام الفلافونيدات (**Harbone، 1999**)

المشتقات	البنية	أسم العائلة	توزيع OH	الاسم
2-phenyl		R = H Flavone	5, 7, 4’ 5, 7, 3’, 4’	Apigenin Luteolin
		R=OH Flavonol	5, 7, 4’	Kaempferol

chromone			5, 7, 3', 4'	Quercetin
		R = H Flavanone (dihydroflavone)	5, 7, 4' 7, 3', 4'	Naringenin Butin
		R=OH Flavanonol (dihydroflavonol)	7, 3', 4' 5, 7, 3', 4'	Fustin Taxifolin
2-phenyl chromanes		R = H Catechin (flavonol-3)	5, 7, 3', 4', 5' 5, 7, 3', 4'	Gallocatechin Catechin
		R=OH Leucoanthocyanidin (flavandiol-3,4)	5, 7, 3', 4' 5, 7, 3', 4'	Leucocyanidin Leucodelphinidin
Flavyliums		R = H Flavylium (Anthocyan)	5, 7, 4' 5, 7, 3', 4'	Apigenidin Luteolidin
		R = OH (Anthocyanidin)		Cyanidin Delphinidin
3-phenyl chromone		Isoflavone	7, 4' 5, 7, 3', 4'	Daidzein Orobol
Chalcone		Chalcone	2', 4', 3, 4 2', 3', 4', 3, 4	Butein Okanin
Aurone		Aurone	6, 3', 4' 6, 7, 3',4'	Sulphuretin Maritimetin

2.6.2. الخصائص البيولوجية للفلافونيدات

أمكن تحديد أول نشاط بيولوجي للفلافونيدات إنطلاقا من إكتشاف Szent Gyorgyi بجامعة Szeged بالمجر للفيتامين C والذي بمؤداه حصل على جائزة نوبل سنة 1937 ، إذ ربط بين الهشاشة الوعائية والعوز الفيتاميني والذي زال بتعاطي عصير غني بالفيتامين C ومركبات لقبت فعاليتها بفيتامين P (Middleton،

1996). وعقب ذلك بسنوات تداول مفهوم الجذور الأوكسيجينية النشطة ROS وإنعكاساتها الممرضة، وأعتبر Halliwell ومساعدو (1986) مدرسة لخصت آليات تدخل الفلافونيدات كمضادات أكسدة بالشكل التالي:

1 – أسر الجذور الأوكسيجينية النشطة ROS .

2 – التثبيط الأنزيمي ومخلبة الآثار المعدنية المولدة للـــ ROS .

3 – حماية الأنظمة المضادة للأكسدة الداخل خلوية (Halliwell وآخرون ،1986)

لقد أدلت العديد من الدراسات *in vivo* و*in vitro* والتي أعتمدت على الفلافونيدات ذات الدور الحيوي (Bioflavonoids) بأنّ هذه الفلافونيدات يمكنها أن تسلك مسلك المقوي الوعائي بإختزال النفاذية الغشائية عن طريق تثبيط أنزيمات : histidine decarboxylase أوelastase وhyaloruomidase للحفاظ على المادة الأساسية بالقميص الوعائي كما هو الحال بالنسبة للـــ rutin (Cody وآخرون، 1986). ويبدي كل من ال apizenol وchryzin وtaxifolin دورا مضادا للإلتهاب نظرا لتداخلها مع ميتابولزم حمض الأراشيدونيك (Loguercio وآخرون، 2003) . وأعتبرت الـ isoflavones خاصة منها الـ genistein مشابهات للـــ œstrogenes وبدائل لمنع الحمل (Rice-Evans وآخرون،2001). بينما أعتمدت الـ quercetin وluteolin وkaempferol مضادات للتشنج ، مسكنات ، مضادات للتقرح ، مانعات للحساسية و مثبطات للـــ phosphodiesterase المضاد للتكتل الصفائحي (Lysandro وآخرون، 2006) . بينما تكون الفلافونيدات الميتوكسيلية مضادات بكتيرية ومضادات فيروسية (Aruoma وأخـــــرون، 1989) ، مضادات سرطانية ومضادات للطفور (Day وآخرون، 2000). ولم يهمل الدور الوقائي للفلافونيدات حالات الالتهابات الكبدية حيث أبدت كل من isobutrin وhispidtulin وflavonolignans خاصة منها silymarin فعلا وقائيا وعلاجيا إذ أعتمد sylibin وهو أحد مقترنات dihydroflavonol وكحول coniferyl كخليط مضاد للسمية الكبدية تمّ إدراجه بالمستحضرات الطبية التجارية (Frantisek وآخرون، 1998).

3.6.2 الدور الوقائي الكبدي للفلافونيدات

وللتصدي للإختلالات التي تصيب الكبد إنصبّ الإهتمام سابقا على تعزيز الغذاء بالأحماض الأمينية وزيت الزيتون وعصائر اللّيمون، ثم التوجه نحو موانع الأكسدة الطبيعية والمصنعة مثل: N-acety-cystein - αtocopherol، vitamine C، الفينولات والسيلينيوم (Carmella وAllessandro، 2003). واتجهت الدراسات الحديثة إلى مراجعة أساليب الطب الشعبي من حيث التعرّف على المواد الفعالة والتحكم في الجرعة وطريقة التعاطي لإدراجها بشكل رسمى إكلينيكيا. ومن أهم النباتات الغنية بالفلافونيدات التي تم تداولها في علاج أمراض الكبد: نبات *Silybium marianum* (Compositae) (شوك النصارى، شوك الجمل)؛ فقد أشار ما يزيد عن 450 بحثا إلى أنّ من أهم مكونات *Silybum* الـــflavonolignans بما فيها silybin، silydianin، silychnistin والتي تعرف في مجموعها بـــsilymarin؛ يتركز تواجدها بكل من البذور والثمار (Wren، 1989). وقد ظهر بأنّ تعاطي 420 mg يوميا لمدة أربع أسابيع يخفض معدل ناقلات الأمين ويكون ذلك وفقا لآليات منع الأكسدة بإختزال معدلات الـــMDA ومنع تشكل الـــleukotreine، مجددا للخلايا الكبدية،

مانعا للتليف بإختزال الخلايا النجمية بنسبة 75% (Prostova وآخرون، 2002) ومنشطا لأنزيمات الطور الأول (النظام السيتوكرومي) وكذا النظام الجلوتاتيوني؛ وقدّرت الجرعة اليومية للإنسان 1750 mg يوميا (Wren، 1989).

أعتمدت جذور *Picrorhiza* (Scrofulariaceae) في علاج الاحتباس الصفراوي وذلك لغناها بالمجموع kukton . وقد أبدت نجاعتها على السمية المستحدثة بكل من CCl_4، galactosamin، ethanol، الـــaflatoxin والـــamanite. وبالرغم من أنّ آليات تأثيره غير واضحة جيدا فهو يخفض ناقلات الأمين ومعدلات MDA ومثبط لمولدات الـــ$O_2^{\circ-}$ وممخلب معدني ومانع لإستنفاذ GSH ومماثل لتأثير الـــSOD ،محدد للالتهاب ومجدد للخلايا الكبدية؛ يقدم بشكل كبسولات 4% من kukton و تقدر الجرعة اليومية بـــ (400-1500 mg) (Dhawan، 1995).

أظهرت عشبة *Hypericum perforatum l.* (Clusiaceae) الغنية بالفلافونيدات والفينولات استجابة واضحة لمنع اليرقان والإلتهاب الفيروسي عند تعاطيها في صورة منقوع (Scott، 1998). واستغلت *shizandrin chines* في علاج الإلتهابات الكبدية المزمنة انطلاقا من سنة 1997، إذ أمكن لـــ (4 mg – 1.5 يوميا) من خفض ناقلات الأمين، والبروتين α ومنع ارتفاع البليربين؛ ويبدو أنّ فعاليته تقتضي تعاطيه بمعدل 7.5-15 mg يوميا لمدة لا تقل عن السنة (Yina وآخرون، 1993؛ Scott، 1998).

استعملت أوراق *Cynarae folium* (Compositae) كمدرات للصفراء لغناها بالفينولات العديدة مثل caffeic acid 2%، flavonol (0.1−1%) و أهمها مشتقات luteolin، ويظهر أثرا أبلغ مقارنة ب silybin بالدراسات *in vitro* بالعزلات الكبدية المعرضة لـــCCl_4، ووجد أنّ الجرعة 400 mg تمنع تولد الكولسترول الكبدي ومخفضة للدهون (Millis وBone، 2000).

أبدى سن الأسد *Taraxacum officinae weber* (Compositae) الغني بالفلافونيدات وtaraxinic acid دورا وقيا من اليرقان وفقدان الشهية عندما تؤخذ جذوره كمشروب يعزز التدفق الصفراوي (Galestio وآخرون، 2006).

اهتم الطب الهندي بجذور *Phyllantus amarus* (Euphorbiaceae) لغناها بالفلافونيدات والقلويدات واستعملت كواقيات كبدية خاصة ضد الإلتهابات الفيروسية، بينما ركز الطب الصيني على جذور *Bupleurum falcatum* (Umbelliferae) لغناها بالـــ pectin والـــphytosterols حيث أظهر تعاطي 3-12 g يوميا من الجذور أو 8 مل من المستخلص المائي دورا واقيا للكبد ومخفضا للحمى (Bor وآخرون، 2006).

أظهر الـــ *Desmodium ascenders* (Leguminoseae) دورا مضاد للسمية الكبدية المستحدثة بالدواء والـــCCl_4 والإلتهابات الفيروسية (Hen وآخرون، 2005). كما عرف الجزر منذ القدم في العلاج الكبدي لغناه بالفلافونات(apigenin، chrysin، luteolin) والفلافانول (kaempferol، quercetin) ، فهو يرفع كفاءة الكبد عند الجرعة 2-4 g ثلاث مرات يوميا أو بإستعمال المستخلص من 2-4 ml (1:1% كحول ثلاث مرات يوميا) (Newall وآخرون، 1996). إنّ أوراق *Peunus beldus* (Monimiaceae) الغنية بالفلافونيدات

والقلويدات اعتمدت كمنشطات كبدية إذ يستعمل المستخلص المائي–الكحولي كواقي كبدي عند الجرعة اليومية 60-200 mg بشكل منقوع بمعدل ثلاث مرات يوميا (Wren، 1989).

7.2. الدور الوقائي للنباتات الطبية من الالتهاب الكبدي بالبراسيتامول

من بين النباتات التي تم إستخدامها في هذا المجال و ذلك لغنها واحتوائها على الفلافونويدات نذكر على سبيل المثال لا الحصر النباتات التالية :

1- *Pratuim hepatohyllum* : نبات ينتشر في مناطق الأوزون ويساهم في الحماية من الآثار الجانبية المحرضة عن طريق الـــAPAP والتي تصيب على الخصوص عضو الكبد نتيجة تكوين الأيضيات السامة **N**-Acetyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI) عن طريق السيتوكروم CYP P450 2E1 حيث تؤدي فرط الجرعة من هذا الدواء إلى استنفاذ الـــGSH الداخل خلوي وإلى اضطراب هيموستازيا الكالسيوم. (Oliveira و آخرون ، 2005).

2- *Pocrnia Suffruticosu* : نبات شعبي صيني وجد أنه يساعد في الحماية من الآثار السامة الناتجة عن الـــ APAP

3- *Cuscuta Chinensis* من عائلة Cinvulvaceae نبات شعبي صيني يستخدم في الاستشفاء من أمراض الكلى والكبد وجد أنه يساهم في الحفاظ على التوازن التأكسدي على مستوى الخلية الكبدية من خلال مجابهة السمية الكبدية المحرضة عن طريق APAP لدى الفئران (Yen وآخرون، 2007)،وذلك لما تحتويه من فلافونات و فلافونويدات و عديد السكر (Du، وآخرون، 1998).

4- *Aquilgeua vulgaris* : من عائلة Ranunailaceae فقد أظهرت مستخلصات الخلات و الإيثانول لهذا النبات قدرة معتبرة على الإنقاص وخفض الأكسدة اللبيدية وتعديل النشاط الإنزيمي على مستوى كبد الجرذان المعاملة بالـــAPAP (Libert، 2005).

5- *Hedyotis corymbosa* **من** عائلة Rubiaceae نبات ينتشر بكل من الهند والصين وجد أن المستخلص الميثانولي لمجموع النبات قد أظهر وقاية معتبرة للخلية الكبدية من الأضرار لدى الجرذان المعاملة بالـــAPAP وذلك من خلال المحافظة على النشاط الإنزيمي لكل من ALT ، AST و البيلربين والمحافظة على الهيكلة النسيجية للكبد (Sadasivan و آخرون، 2006).

6- *Guoguma almifoliree* من عائلة Sterculiacea التي تنتشر في الإكوادور بأمريكا اللاتينية وهو يستخدم في الطب الشعبي بسبب خصائصه المضادة للأكسدة و المضادة للميكروبات فقد تبين أن الأجزاء الهوائية لهذا النبات تقلل من الآثار الجانبية الناتجة عن المعاملة بدواء Diclofenac وكذا دواء Nsaid على الخصوص على القرحة المعدية وهما دواءان مماثلان للـــAPAP في جانبه العلاجي وكذا في الآثار الجانبية الناتجة عن استعمالهما (Berenguer، 2007).

7- *Euphorbia Fusiformis* ينتمي إلى عائلة Euphorbiaceae يستوطن منطقة غرب الهند تبين أن درناته تساهم في الوقاية من الأضرار الجانبية التي يسببها مضاد السل Rifampicine لدى الفئران (Anusuya وآخرون ، 2010).

8- *Byrsocarpus Coccineus* ينتمي إلى عائلة Connaraceal إن المستخلص المائي لأوراق هذا النبات تساهم في الوقاية من الآثار السمية المحرضة بواسطة CCL_4 لدى الفئران وذلك من خلال اختزال معدلات MDA وتحفيز نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة . ولعلى هذا هو السبب في استخدام هذا النبات شعبيا في معالجة أمراض الكبد في منطقة غرب إفريقيا (Akindele وآخرون ، 2010) .

9- جنس *Scutellaria* ينشر هذا النبات في أوروبا و الولايات المتحدة الأمريكية وشرق أسيا وقد بينت الدراسات المرجعية أنه يحتوي أكثر من 350نوع عزل منها أكثر من 295 مركب أغلبها فلافونويدات وتربينات ثنائية معظمها يساهم في الوقاية من الأمراض الكبدية ويعمل كمضادات للأكسدة (Shang وآخرون، 2010).

10- *Trianthema Portulacastrum* ينتمي إلى عائلة Aizoaceae و لقد أبدى المستخلص الميثانولي لهذا النبات وقاية معتبرة للسمية الكبدية المحرضة بالباراسيتامول من خلال المحافظة على المؤشرات البيوكميائية (AST ، ALT ، البلربين و البروتين الكلي)، كما أظهر هذا المستخلص نشاط وقائي معنوي من خلال الحفاظ على المؤشرات المصلية (Kumar وآخرون، 2004).

11- *Solanum Fastigiatum* من عائلة Solanaceae ينتشر هذا النبات في جنوب البرازيل ويستخدم شعبيا في معالجة أمراض الكبد،وإختلالات الطحال وسرطان الرحم. أشارت نتائج الدراسة التي أجريت على هذا النبات أنه يتميز بخصائص وقائية من الآثار الجانبية التي يسببها الباراسيتامول على الكبد.(Sabir، وآخرون 2008).

12- *Biden pilosa* : نبات حولي يستخدم في الطب الشعبي بالصين ويستخدم في معالجة الأمراض الكبدية (Yuan و آخرون، 2008).

13- *Artemisia sacarom* : نبات من العالة المركبة وهو أحد الأنواع التي تستخدم في الطب الشعبي الشرقي للوقاية و معالجة بعض الأمراض الكبدية المزمنة و الحادة *(*Yuan وآخرون، 2010)

8.2. جنس *Vitex*

يشمل جنسVitex شجيرات و أشجار صغيرة صنفت سابقا إلى عائلة Verbénacées ، ولكن تصنيف النشوء والتطور (Phylogénétique) صنفها وضمها بالعائلة الشفوية (Lamiacées) (Quezel و Santa 1963) ، تنمو هذه النبتة بالمناطق الحارة ، كما أن لها أوراق خاصة كفية كأوراق النخيل. الكأس (Le Calice) مسنن بخمسة أسنان وعموما تكون قصيرة ، تويج الزهرة يتكون من خمسة فصوص غير متساوية وتتشكل من أكثر أو أقل من حافتين ، ونجد بأن الفص السفلي هو الأكثر تطورا وتنمو من الفصوص الأخرى، والسداة (Etamine) (الجزء الذكري في الزهرة) الأربعة تكون بارزة وتعلو تويج الزهرة، وتكون السداة

محاطة بنمط من صفتين أو علامتين. الفاكهة أو الثمرة التي تحوي النواة التي تكون مقسمة إلى 4 مربعات تحتوي كل منها على بذرة واحدة . يحتوي جنس Vitex على أكثرمن200 نوع ، من بين هذه الأنواع نذكر:

1- *Vitex negundo L* : و يسمى أيضا Indrasura، يحتوي على الفلافونويدات المضادة للأندروجان ،وعلى زيت من الزيوت الأساسية يستعمل ضد الحمى و الروماتيزم.
2- *Vitex mollis kunth* : تستعمل من طرف الهنود كنبتة للتزين و لإستهلاك الثمار ، و تغلى أوراقها في الماء وتأخذ كعلاج ضد الآلام.
3- *Vitex trifolia L* : تستعمل كتوابل وضد الحمى.
4- *Vitex agnus-castus* : نجد من بين أنواعها ما يلي :
   - *Vitex agnus-castus 'Alba*
   - *Vitex agnus-castus 'Latifolia*
   - *Vitex agnus-castus 'Rosea*

9.2. النوع *Vitex agnus-castus*

1.9.2. التوزيع الجغرافي :

يتم العثور على جنس *Vitex* نوع agnus-*castus* في المناطق الرطبة ، على حواف الأنهار أو في المناطق الساحلية ،لاسيما في منطقة البحر الأبيض المتوسط ،كما أنها توجد أيضا في شمال إفريقيا وأسيا الوسطى وغرب أسيا .كما أنها تزرع حاليا في جميع أنحاء العالم وكذا جنوب الولايات المتحدة (Upton، 2001) في الجزائر هذه الأنواع وجدت أخيرا في واد مينوعرعار و واد خيرواع بولاية بشارفي قلب الصحراء. لنبات *Vitex agnus-castus* أسماء أخرى شائعة منها : الشجرة العفيفة (Gattilier) ،الضأن العفيف ،قليل الفلفل ، الفلفل الوحشي ، كف مريم ، شجرة الفلفل Agnolyt ، عفيف شجرة التوت ،شجرة القنب ،فلفل الراهب ، التوابل الهندية (Jellin وآخرون، 2002 ؛ Grieve ، 1982).

2.9.2. الدراسات الكيميائية لنبات *Vitex agnus-castus* :

يتميز نبات الـ*Vitex agnus-castus* بغناه بالمستقلبات الثانوية ، ويتكون من عناصر أساسية هي الفلافونويدات ، التربينات الثنائية والزيوت الأساسية إلى جانب بعض المكونات الأخرى، ويلخص جدول (3): أهم المركبات المعزولة من نبات الـ *Vitex agnus-castus*

جدول(6): أهم المركبات المعزولة من نبات الـــ *Vitex agnus-castus*

	اسم المركب	المرجع
1	Quercetagetine	(Anonymous، 1998 ؛ Mills وآخرون،2000)
2	Casticine	(Anonymous، 1998؛ Mills وآخرون، 2000 ؛ Jarry وآخرون،2006)
3	Eupatorine	(Jarry وآخرون، 2006)
4	Vitexine	(Anonymous، 1998)
5	Isovitexine	(Mills وآخرون،2000 ؛ Jarry وآخرون، 2006 ؛ Brown، 1994)
6	Orientine	(Mills وآخرون، 2000 ؛ Brown، 1994)
7	Isoorientine	(Jarry وآخرون، 2006)
8	Apigénine	
9	Kaempférol	(Mills وآخرون،2000 ؛ Brown ، 1994)
10	6-C-(4"-methyl-6"-O-trans caffeoylglucoside) Lutéoline	(Hirobe وآخرون،1997)
11	6-C-(6"-O-trans caffeoylglucoside) Lutéoline	
12	6-C-(2"-O-trans caffeoylglucoside) Lutéoline	
13	7-O-(6"-p-benzoylglucoside) Lutéoline	
14	5,4'-dihydroxy-3,6,7,3'-tetramethoxyflavone	(Atta-ur-Rahman وآخرون،1988)
15	Artemetine	(Jarry وآخرون، 2006 ؛Linuma وآخرون، 1980 ؛ Harborne، 1988)
16	Isorhamnetine	(Harborne، 1988)
17	Lutéoline	(Harborne ، 1988)
18	7-Glucosyllutéoline	(Raynaud وآخرون، 2005)
19	Penduletine	(Jarry وآخرون،2006)
20	5-hydroxy-3,6,7,4'-tetramethoxyflavone	(Jarry وآخرون، 2006)
21	5,3'-dihydroxy-6,7,4'-trimethoxyflavone	(Jarry وآخرون،2006)

3.9.2. الدراسة الفرماكولوجية لنبات *Vitex agnus-castus*:

تشير بعض الدلائل إلى أن هذا النوع أي كف مريم يمكن أن يملك بعض الخصائص الهرمونية وذلك من خلال نشاط الإستروجان و البروجسترون (Liu وآخرون، 2001) ، كما أن مركبات نبتة كف مريم ترتبط بشكل إنتقائي وإختياري مع المستقبلات الخاصة بالإستروجين بيتا (bêta) في القلب ،الأوعية الدموية ،العظام والمثانة (Wuttke وآخرون، 2003). ونبتة كف مريم يمكن أن تؤثر على الدوبامين ،الأستيل كولين وعلى المستقبلات الدوائية في حالة الجرعة العالية (Meier وآخرون، 2000) كما أن لها أثر منشط على مستقبلات الدوبامين في الغدة النخامية [***D2***] (Wuttke ، 1996 ؛ Jarry وآخرون، 1994) كما أن نبتة كف مريم تمنع تدفق أو تحرير البرولاكتين و تضبط بعض الإختلالات التي يمكن أن تعتري مرحلة الجسم الأصفر في دورة

الطمث عند النساء وذلك بزيادة البرولاكتين في الدم (Milewicz وآخرون ،1993) ولكن لا يؤثر على

مستويات هرمون التستستيرون (Merz وآخرون، 1996). وتشير الدراسات المخبرية *in vitro* أن نوع *vitex* يمكن له أن يثبط نمو سرطان الثدي ،المبيض،عنق الرحم ، المعدة ،القلون ،وخلايا سرطان الرئة (Dixon-Shanies وآخرون، 1999؛ Ohyama وآخرون،2003). كما أن مستخلصات هذه النبتة من الزيوت الأساسية أظهرت خصائص مضادة للبكتيريا والفطريات (Mills وآخرون، 2000). وتشكل الفلافونويدات نسبة معتبرة من المستقلبات الثانوية ، وقد تم تحديدها في هذا النوع أي نبتة كف مريم في الأوراق بنسبة (1−2,7 %) أما في الزهور فبنسبة (1−1,5%) وفي الثمار أو الفواكه بنسبة (0,5−1%) (Anonymous، 1998). تتواجد الفلافونويدات بهذا الشكل في هذا النوع من النبات في حالتها الحرة أو بصورة عديد السكر(Hétérosides) ، ومن بين الفلافونويدات التي تسود في هذا النوع النباتي هي : Casticine وLutéoline يمثل الجدول السابق الفلافونويدات المعزولة و المعرفة في نوع *Vitex agnus-castus* (Anonymous ، 1998).

3-مواد وطرق العمل

3 .المواد وطرق العمل

1.3. نبات *Vitex agnus-castus*

تمّ جلب النبتة في شهر أفريل 2006 من منطقة بشار وجففت هوائيا بعيدا عن أشعة الشمس في جو جاف ثم فصلت إلى أوراق وأزهار حيث أعطت الأولى بعد السحق 590 غرام وأعطت الثانية 299 غرام .

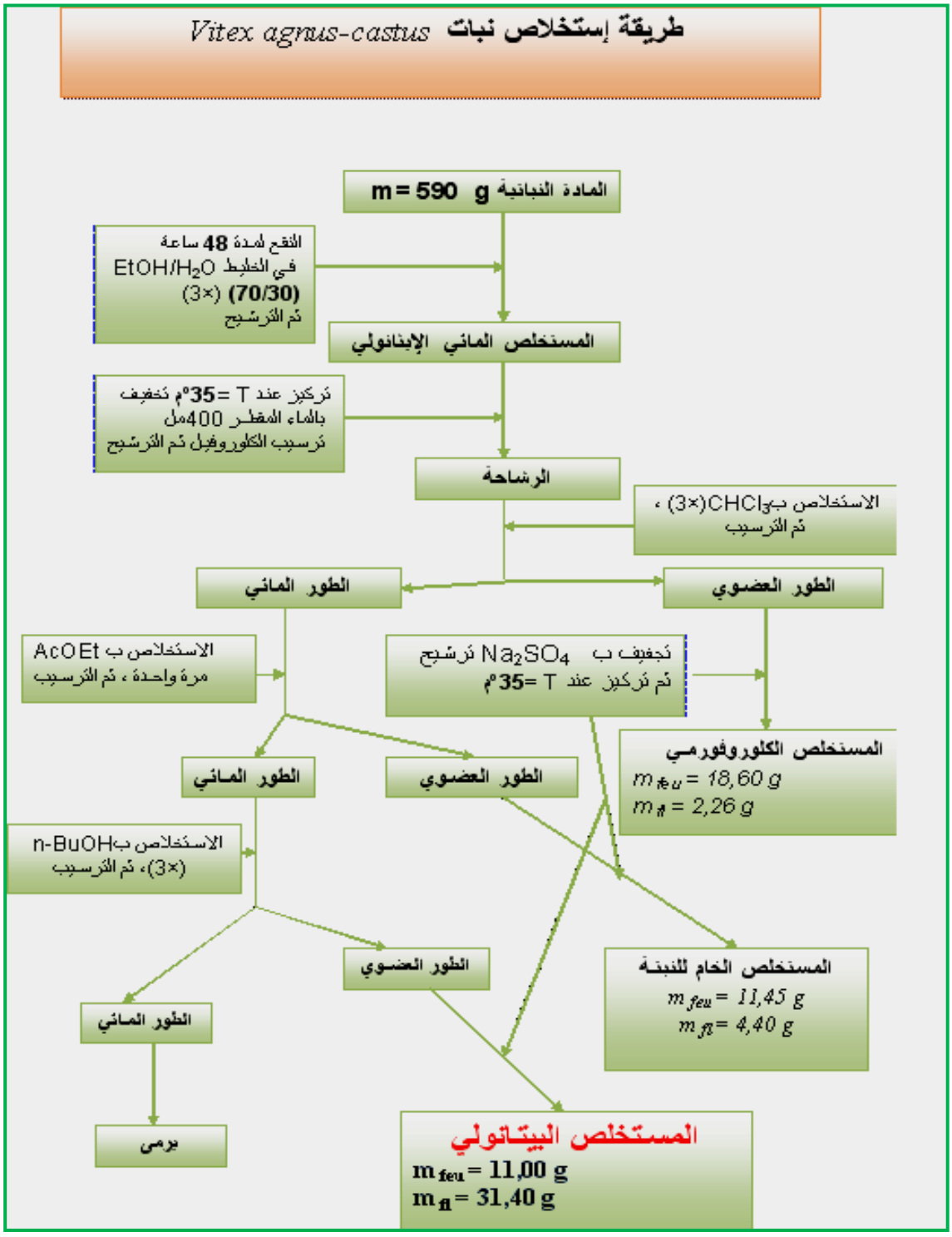
1.1.3 التصنيف النباتي:

Règne	Plantae	المملكة
Sous règne	Tracheobionta	تحت المملكة
Division	Magnoliophyta	القسم
Classe	Magnoliopsida	طائفة
Sous-classe	Asteridae	تحت الطائفة
Ordre	Lamiales	الرتبة
Famille	Verbenaceae	العائلة
Genre	*Vitex*	الجنس
Espèce	*Agnus-castus*	النوع

شكل(9) نبات الـ***Vitex agnus-castus***

2.3. تحضير المستخلص البيتانولي للأوراق :

تمت عملية استخلاص الأوراق على مستوى معهد الكيمياء وذلك وفق المخطط الذي يوضحه الشكل رقم (4)



الشكل (10) تحضير المستخلص البيتانولي للأوراق لنبات *Vitex agnus-castus*

3.3. اختبارات كروماتوغرافية للمستخلص البيتانولي

1.3.3 الخريطة الفلافونيدية (ورق **Whatman**)

إنّ الخريطة الفلافونيدية للمستخلص البيتانولي للنبتة قيد الدراسة يمكن أن تفي بمعطيات مهمة حول مكونات هذا المستخلص المحتملة لتنجز عن الكروماتوغرافيا ثنائية البعد بواسطة ورق Whatman أوكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة اعتمادا على الأنظمة المذيبة .

تم استخدام ورق Wattman رقم 3 للفحص التمهيدي وفقا للجمل الآتية :

- البعد الأول n-BuOH /AcOH/ H_2O:(BAW) (4/1/5).
- البعد الثاني: 15 % AcOH.

2.3.3 الفحص الكروماتوغرافي على الطبقة الرقيقة (TLC)

وهو اختبار تمهيدي ينجز على الطبقة الرقيقة لهلام السيليس المحضر على ورق الألومونيوم وقد اعتمد أسن نظام للمذيب وهو (1: 4) $CHCl_3$: MeOH .

4.3. الحيونات التجريبية :

أختيرت لهذه الدراسة جرذان ذكور *Albino wistar* من معهد باستور الجزائر ،عمرها شهران ،أوزانها في حدود (233,43غ ± 9.16). تمت التربية بمستودع الحيوانات بمعهد علوم الطبيعة والحياة ،جامعة قسنطينة تحت ظروف المستودع الحيواني ، كما أن النظام الغذائي المتبع إلى جانب ماء الشرب العادي فهو غذاء الأدلبتوم من الديوان الوطني لإنتاج أغذية الأنعام (إلا أنه تم التزويد بالخبز عند نفاذ الغذاء). وزعت الحيوانات على أقفاص معدنية إلى 04 مجموعات بمعدل خمسة (5) جرذان بكل قفص وبعد تكيف هذه الجردان مع الظروف ،تتلقى المعاملات المبرمجة كما يلي :

1- مجموعة الشواهد تعامل بالمحلول الفيزيولوجي (NaCL 0.9%) يوميا لمدة عشرة أيام .

2- المجموعة المسممة تعامل بالمحلول الفيزيولوجي (NaCL 0.9%) يوميا لمدة عشرة أيام .

3- المجموعة الموقاة تعامل بالـــ N-acetyl cystéine (NAC) بجرعة 200 mg/Kg يوميا لمدة عشرة أيام

4- المجموعة الموقاة بمستخلص بيتانولي لنبات ***Vitex agnus-castus*** بجرعة 300 mg/Kg يوميا لمدة عشرة أيام .

وفي اليوم العاشر وبعد ثلاث ساعات من أخذ الجرعة من المعاملات المختلفة يتم تسميم كل المجموعات ماعدا المجموعة الشاهدة بإعطاء البراسيتامول بجرعة (750 mg/Kg).

توزن يوميا الحيوانات لتحديد الجرعة الموافقة وتعطى عبر المجرى الهضمي.

5.3. المعايرات :

1.5.3. معايرة مؤشرات السمية الكبدية:

تخضع الجردان لصيام ليلة كاملة قبل موعد التشريح ليأخذ الدم من الجيب الأنسي الداخلي للعين قبل التشريح وأثناءه من الوريد البابي ،ليستقبل في أنابيب هيبارينية ثم يعرض للطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة عند 4°م في جهاز الطرد المركزي ، لتأخذ البلازما و المصل لتقدير مؤشرات السمية الكبدية ، أعتمد تقدير الإنزيمات الناقلة لمجموعة الأمين AST، ALT ، (TGO ، TGP) والفوسفتاز القاعدي (ALP) والجليسريدات الثلاثية (TG) والبيلربين (Bilirubines) اعتمادا على مشخصات الـــKits.

1- نشاط الـ ALT

تم تقدير ALT وفقا لمبدأ التفاعل الآتي :

$$\alpha\text{-Ketoglutarate} + \text{L-alanine} \xrightarrow{ALT} \text{L- glutamate} + \text{pyruvate}$$

$$\text{Pyruvate} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\textit{Lactate dehydrogenase}} \text{L-lactate} + NAD^+$$

2- نشاط الـAST :

تم تقدير AST وفقا لمبدأ التفاعل الآتي :

$$\alpha\text{-Ketooglutarate} + \text{L-aspartate} \xrightarrow{AST} \text{L-glutamate} + \text{Oxaloacetate}$$

$$\text{Oxaloacetate} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\textit{Malate dehydrogenase}} \text{L-malate} + NAD^+$$

3- نشاط الـALP

تم تقدير ALP وفقا لمبدأ التفاعل الآتي :

$$\textbf{p-Nitrophenyl phosphate} + H_2O \xrightarrow{ALP+Mg^{++}} \textbf{p-Nitrophenol} + \textbf{phosphate}$$

في الوسط القاعدي يحلل بالإماهة إنزيم الفوسفتاز القاعدي مركب الـــ p-Nitrophenyl phosphate إلى p-Nitrophenol و phosphate .

4 - البلربين الكلي

يتمثل مبدأ التفاعل في كون مركب الأزوبلربين الناتج من تفاعل البلربين مع أملاح الديازوميوم لحمض السيلفانيك يعطي إمتصاصا أقصى في الوسط الحامضي ، فشدة اللون الناتج تتناسب طرديا وكمية البلربين المتفاعل .

5 الجليسيريدات الثلاثية :

يعتمد تقدير TG على التقدير الإنزيمي للجليسيرول المتحرر بفعل الليباز Lipase ، والذي يتفسفر في وجود إنزيم Glycerol Kinase وATP مؤديا إلى تشكيل بيروكسيد الهيدروجين وذلك في وجود إنزيم Glycerol 3P Oxidase. يتم الكشف عنH_2O_2 بواسطة مستقبل لوني للأكسجين وهو الـــPhenol-4-aminophenazone في وجود الـــ Peroxidase .

$$\text{Triglycerides} \xrightarrow{\textit{Lipase}} \text{Glycerol+3R-COOH}$$

$$\text{Glycerol+ATP} \xrightarrow{\textit{Glycerol kinase}} \text{Glycerol 3P+ADP}$$

$$\text{Glycerol 3P} \xrightarrow{\textit{Glycerol 3P Oxydase}} \text{Dihydroxyacetone P+}H_2O_2$$

$$2\,H_2O_2\text{+Amino-4-phenazone+Phenol} \xrightarrow{\textit{Peroxidase}} \text{(Monoimino-p-benzoquinone)-4-phenazone+}4H_2O$$

تقاس إمتصاصية اللون الأحمر التي تتناسب مع تركيز الجليسيريدات الثلاثية بعينة المصل .

2.5.3. معايرة مؤشرات الإجهاد التأكسدي:

- **تحضير المجنس الكبدي**

يرفق 1غ من الكبد بثلاثة أضعاف من KCl (1.15%)، ثم يسحق بواسطة المجنس الزجاجي Glass teflon homogenizer ويعاير TBARS بالمجنس الكبدي المتحصل عليه.

- **تحضير القطفة السيتوزولية للكبد**

يخلط 1غ من الكبد مع 9 مل من منظم الفسفات (EDTA-Tris ، 0,1mM ، pH 7,6) (v/w 10/1) : ثم يسحق بواسطة المجنس الزجاجي(Glass teflon homogenizer) ، ليطرد مركزيا (1000 دورة/دقيقة)

لمدة 15 دقيقة ثم عرضت القطفة الطافية لطرد مركزي عند 9600 دورة / دقيقة لمدة 45 دقيقة عند درجة حرارة 4 م° للحصول على القطفة السيتوزولية . استعملت القطفة الطافية الكبدية المتحصل عليها لقياس مؤشرات الإجهاد التأكسدي (GSH ، GP_X ،GST ، Catalase ، Superoxide dismutase) وكذا البروتين الكلي .

1.2.5.3 قياس الـ TBARS :

إنّ معايرة الــ MDA تعتبر مؤشرا معتبرا لدراسة أثر سمية المواد ،و يعتمد مبدأ التفاعل لتقدير الــMDA على القياس اللوني على 530 nm الذي يحصل عليه اثر التفاعل المعتمد ما بين جزيئة MDA الناجمة من الأكسدة الليبيدية مع جزيئتين من Thiobarbuteric acid (TBA) وفقا لطريقة (Ohkwa وآخرون، 1979) حيث ينطلق التفاعل بوسط حمضي(pH 2-3) ودرجة حرارة 100م° في وجود TBA واثر الإستخلاص في وجود*n*-butanol

2.2.5.3 معايرة نشاط النظام الجلوتاتيوني

1. الجلوتاتيون المختزل GSH

اعتمد قياس الجلوتاتيون السيتوزولي على الكاشف 5,5́- Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) وفقا لطريقة (Ellman ، 1959) ، ويعتمد المبدأ التجريبي على أكسدة الــ GSH بواسطة الــDTNB محررا حمض thionitrobenzoic (TNB) و الذي يظهر على pH قاعدي قدرة إمتصاصية عند 412 nm وفقا للتفاعل الأتي :

$$GSH + DTNB \longrightarrow GSTNB - TNB$$

2. نشاط الـ GP_X

تم تقدير الــ GP_X وفقا لطريقة (Mohandas وآخرون، 1984) واعتمد الــH_2O_2 كمادة تفاعل . إن غياب الــNADPH على 340 nm اعتبر قياسا للنشاط الإنزيمي و الذي عبر عنه باكسدة nmol NADPH لكل دقيقة لكل مغ من البروتين. إن الــ GPx يحفز اكسدة الــGSH بواسطة H_2O_2 (ROOH) و الذي يتحول إلى (ROH) في وجود GR و الــNADPH . إنّ الــGSSG عادة ما يتحول الى الصورة المختزلة مع الاكسدة المزامنة للــ NADPH الى $NADP^+$ و الاختزال الناجم للــ OD على 340 nm .

$$2GSH + ROOH \xrightarrow{GPX} ROH + GSSG + H_2O$$

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

3. نشاط : GST

قدر نشاط الـــGST مطيافيا وفقا لطريقة (Alin وآخرون، 1985) إعتمادا على تحديد 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) المقترن المتشكل من التفاعل المتزاوج مع الـــ GSH ، ويعبر عن النشاط بـــnmol CDNB conjugaded with GSH/min/mg protein

3.2.5.3 تقديرنشاط إنزيمات الإجهاد التأكسدي

- **نشاط الـ catalase (CAT)**

أمكن تقدير نشاط الـــ CAT وفقا لطريقة (Aebi، 1974) حيث تم إضافة قدر من القطفة السيتوزولية إلى محضن من الكوارتز وانطلق التفاعل بإضافة H_2O_2 30 mM المحضر بشكل فوري بالمنظم الفوسفاتي (pH 7) قدر معدل تفكك H_2O_2 مطيافيا على طول موجي 420 nm خلال 120 ثانية ليعبر عن النشاط للـــCAT بـــ µmol H_2O_2 /mg protein/min أو nmol H_2O_2 decomposed/min/mg protein .

- **نشاط الـ Superoxcid Dismutase (SOD)**

يعتمد تقدير نشاط الـــ super oxide dismutase على طريقة (Beauchamp و Fridovich ، 1971) وهي تتوقف على مدى قابلية الإنزيم لتثبيط اختزال nitrobleue tetrazolium (NBT) بواسطة الجذرsuperoxide و الذي تم توليده بواسطة التفاعل الاختزالي في وجود riboflavin و الاكسجين.

$$\text{Riboflavin} + \text{oxygen} \xrightarrow{\textit{phto reaction}} \text{superoxide} + \text{NBT} \xrightarrow{\textit{SOD}}$$

Formazan formation a reduction product of NBT

الفورمازين المتشكل هو المنتج المختزل من NBT

3.5.3. معايرة البروتينات السيتوزولية

أعتمد في هذه التجربة على طريقة (Lowry وآخرون، 1951) ، تجرى هذه التجربة ميطيافيا على أن مجاميع الفينوليك لبواقي الـــ tyrosine يمكنها إعطاء لونا أزرق بنفسجي ، ومبدأ هذا التفاعل يعتمد على إنتاج cuprous ion الذي يختزل كاشف Folin-Ciocalteau Phenol ، ويمكن قياس هذا اللون عند 660 nm

4.5.3. الدراسات الهيستولوجية

تلحق باقي الفصوص الكبدية بمحلول الـــفورمالدهيد 10 % ، pH 7.4 ثم يغمر بالبرافين وتصبغ القطع (5 µm) بكل من الهيماتوكسيلين و الأيوزين لأجل دراسة البنى العامة للهيباتوسيت.

التحليل الاحصائي

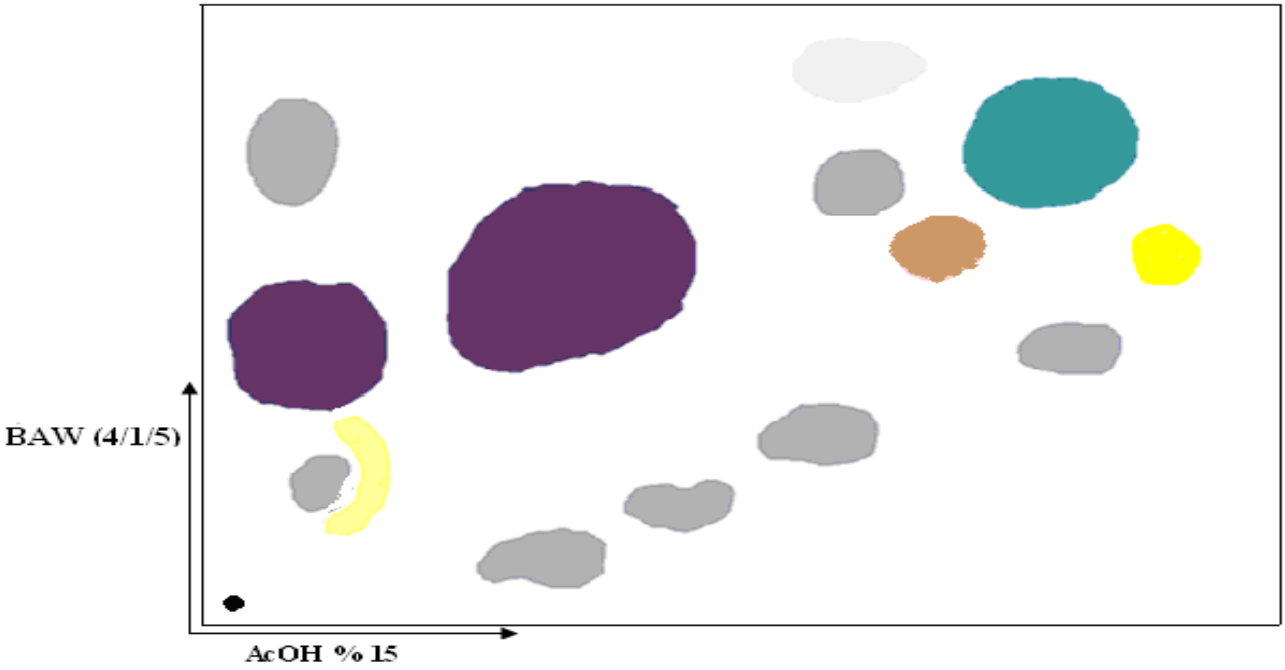
تمّ التعبير عن النتائج بالمتوسط ± الانحراف المعياري واخضعت للتحليل الاحصائي باستخدام اختبار Student اختبار تحليل التباين (ANOVA) (P*< 0.05, P**< 0.001).

4 - النتائج

4. النتائج

1.4. الدراسة الكيميائية لنبات *Vitex agnus-castus*

1.1.4 الخريطة الفلافونيدية للمستخلص البيتانولي للـــــ *Vitex agnus-castus*



شكل (11) : الخريطة الفلافونيدية لنبات *Vitex agnus-castus*

الفلافونويدات بتراكيز عالية +++	عديدات الفينول بتراكيز عالية +
الفلافونويدات بتراكيز أقل +	عديدات الفينول بتراكيز أقل
الفلافونويدات بتراكيز عالية +	أيزوفلافون
الفلافونويدات بتراكيز أقل	

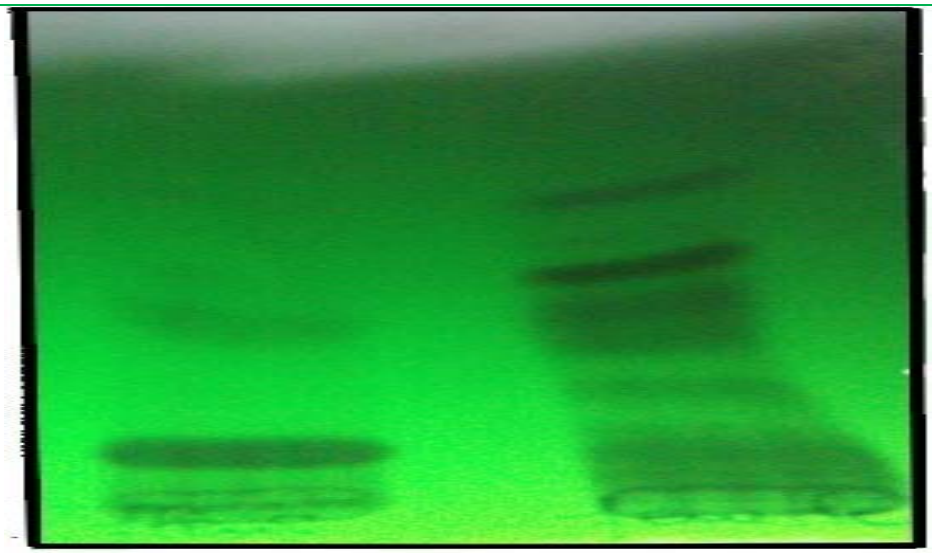
شكل (5) : الخريطة الفلافونيدية لنبات *Vitex agnus-castus*

جدول (7): العلاقة بين طبيعة الفلافونيد و الإستشعاع تحت UV

لون البقعة الفلافونيدية		نمط الفلافونيد
	أسود بنفسجي	فلافون 5،6،7 أو 5،7،8 ثلاثي OH
		فلافونول مستبدل بالموقع3
		بعض الشالكونات
	أسود	فلافانون أو فلافانول يملك 3− OH
		فلافون أو فلافانون دون OH بالموقع 5
		فلافونول مستبدل بالموقع 3 بدون OH بالموقع 5
	الأصفر	فلافونول مع OH بالموقع 5
	أصفر− لامع	فلافونول مستبدل بالموقع 5
	برتقالي – لامع	أيزوفلافون
	أزرق مخضر	فلافانون بدون OH بالموقع 5

2.1.4 الفحص الكروماتوغرافي على الطبقة الرقيقة (TLC) للـــــ *Vitex agnus-castus*

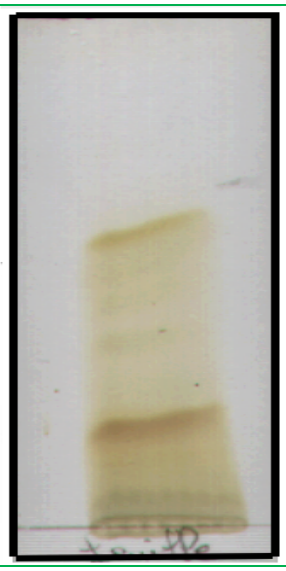
يبدي الفحص التمهيدي لكروماتوغرافيا مستخلصي الأوراق و الأزهار الشكل (12) تماثلا ليظهر الاختلاف في النركيز مما ساعدنا في اختيار مستخلص للأوراق و الذي يوضحه الشكل (13),



مستخلص الأوراق	مستخلص الأزهار

شكل (12) البروفيل الكروماتوغرافي لمستخلصي الأزهار و الأوراق لنبات *Vitex agnus-castus*

نظام التمليص : **$CHCl_3$: MeOH (4 :1)**

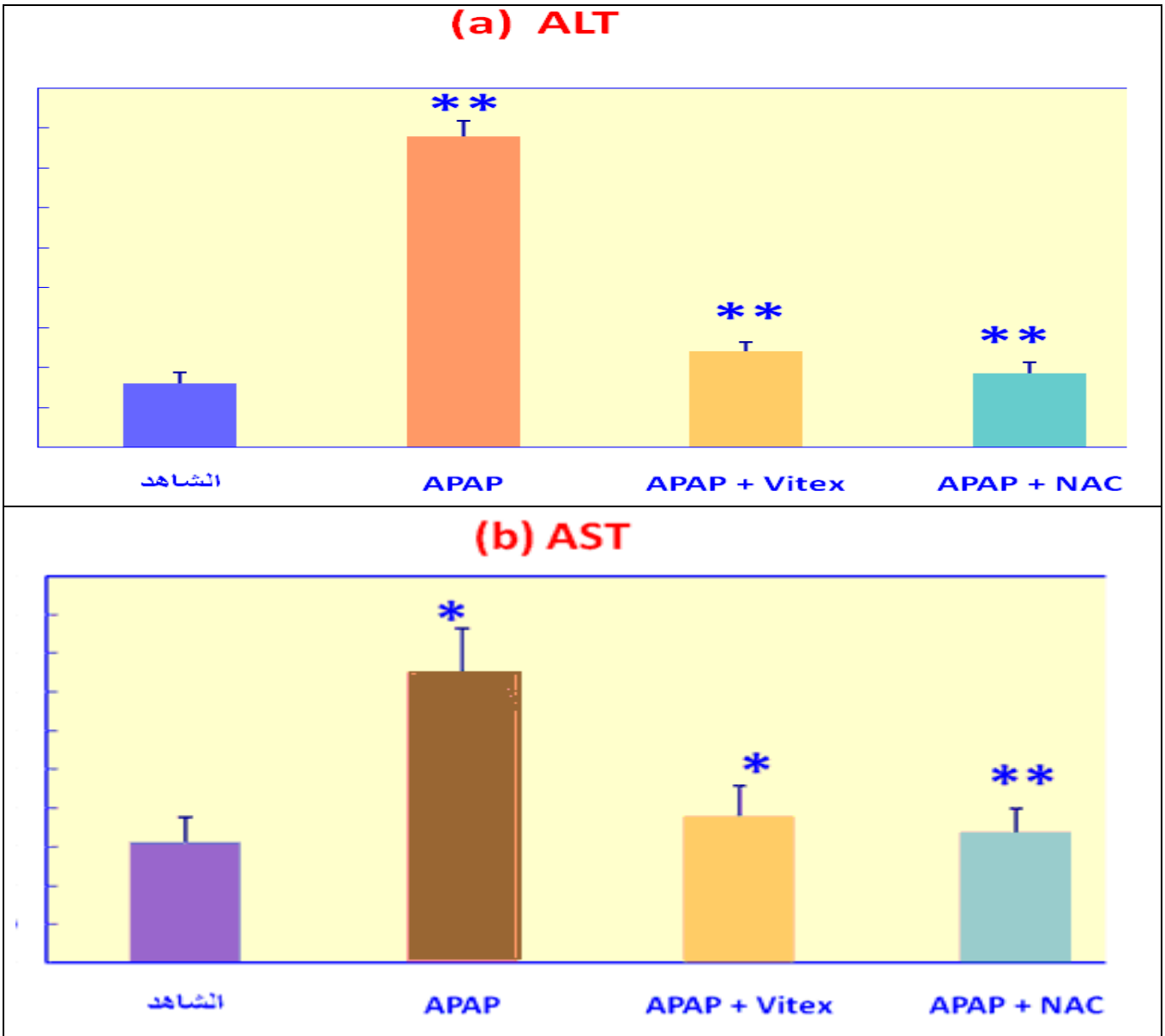


تحت ضوء 254 nm	يكشف عن طريق الـــNH_3

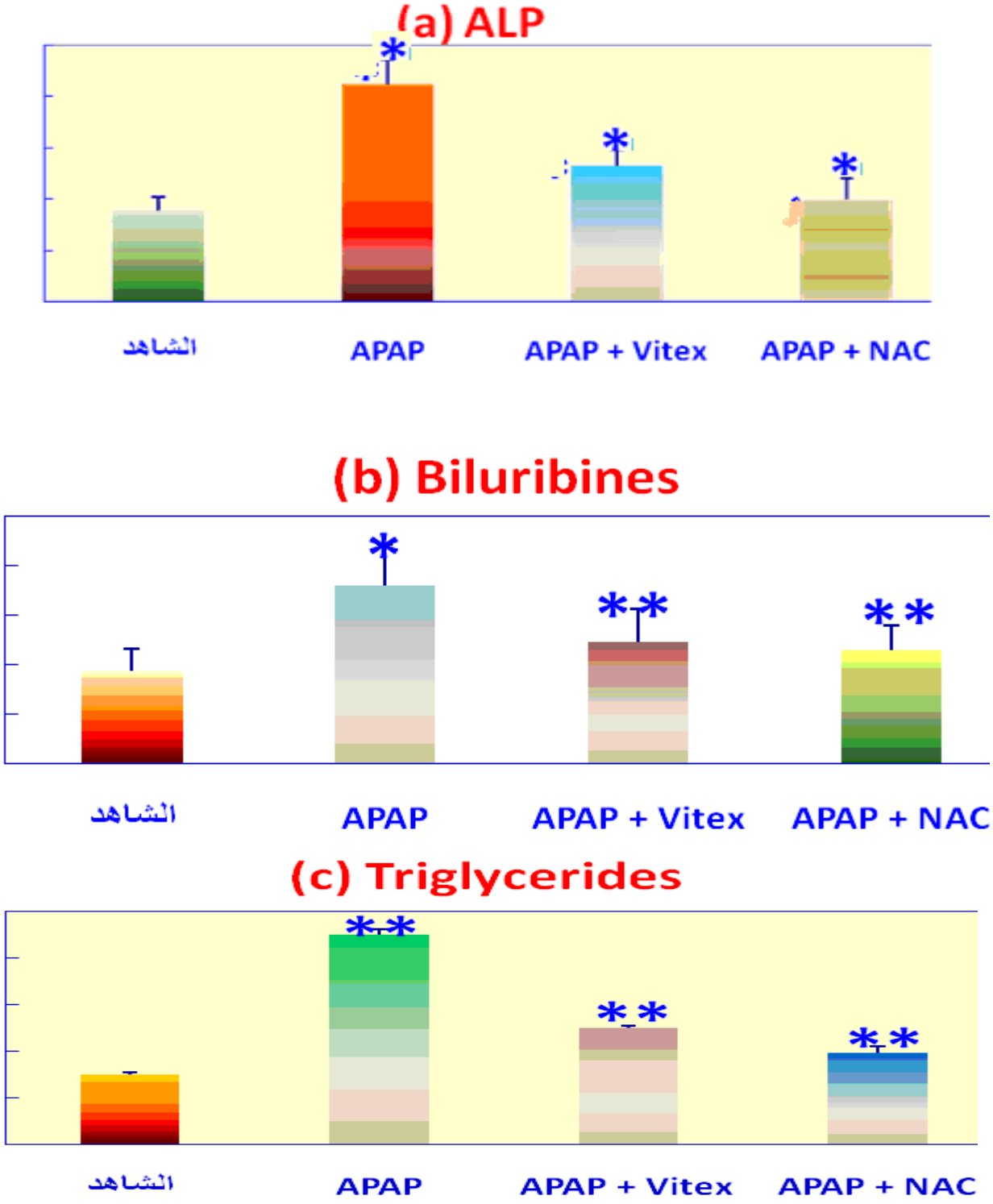
شكل (13) : TLC مستخلص الأوراق نبات *Vitex agnus-castus* نظام التمليص :
$CHCl_3$: MeOH (4 :1)

2.4.الدراسة البيولوجية للمستخلص البيتانولي للـــــ*Vitex agnus-castus*

1.2.4 الدور الوقائي للمستخلص البيتانولي للـــــ*Vitex agnus-castus* على مؤشرات السمية الكبدية المحرضة بالبراسيتامول لدى الجرذان.



شكل (14) الدور الوقائي للمستخلص البيتانولي للـــ Vitex agnus-castus على مؤشرات السمية الكبدية



شكل (15) الدور الوقائي للمستخلص البيتانولي للـــــ Vitex agnus-castus على مؤشرات السمية الكبدية المحرضة بالبراسيتامول لدى الجرذان

جدول (8) النسبة المئوية للدور الوقائي للمستخلص البيتانولي للـــــ *Vitex agnus-castus* على مؤشرات السمية الكبدية بالجرذان المعاملة بالبراسيتامول

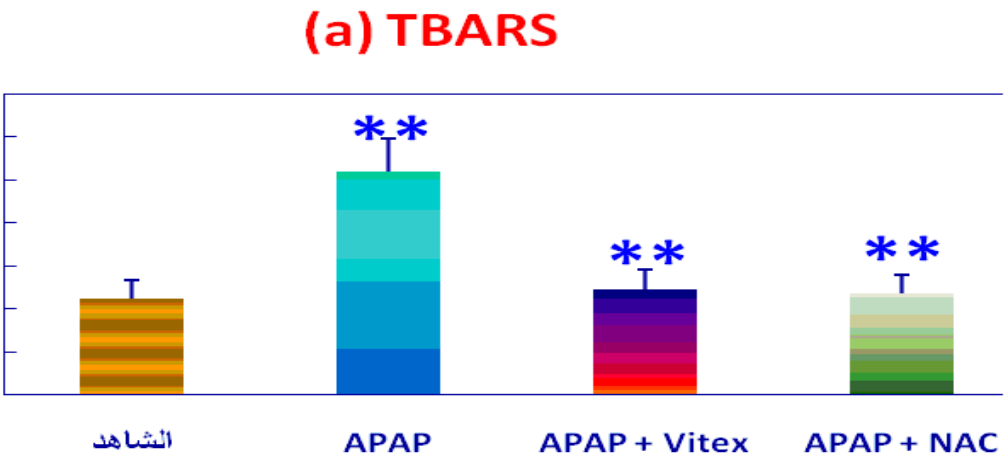
المعاملة	*Vitex* (%)	NAC (%)
ALT	5.3 ± 87	7.11 ± 91
AST	12.1 ± 84	9.1 ± 94
ALP	3.4 ± 64	8.9 ± 91
Biluribines	4.2 ± 66	5.1 ± 76
TG	4.9 ± 66	4.11 ± 85

أعربت الجرذان المعاملة بجرعة منفردة من APAP (750 mg/kg) عن ارتفاع معدلات نشاط ALT وAST عن المعدلات المعهودة بما يكافيء 4 و 2 مرة على التوالي شكل (14 a و b) مقارنة بالشواهد، وقد يفسر هذا بتهتك أغشية الخلايا الكبدية ، كما سجل ارتفاع بمعدلات الـــ biluribine و نشاط ALP بمعدل الضعفين وبمعدل ثلاثة أضعاف بالنسبة للـــ TG شكل (15 a و b و c) .

وفرت المعاملة المسبقة بالمستخلص البيتانولي للـــــ *Vitex agnus-castus* (300 mg/kg) لمدة 10 أيام دورا و قائيا ضد السمية بالـــAPAP تتمثل في الحد من التسرب الإنزيمي لناقلات الأمين بما يكافيء 84 – 87 % مقارنة بالفعل الوقائي للـــNAC 91 – 94 % جدول رقم (4). كما تراجعت معدلات كل من الـــ biluribine و نشاط ALP و الـــTG بما يكافيء 64 – 66 % بالنسبة للمعاملة بالـــ Vitex agnus-castus مقارنة بـــالـــNAC 85 – 91 % جدول رقم (8) .

2.2.4 الدور الوقائي للمستخلص البيتانولي للـــــ *Vitex agnus-castus* على مؤشرات الإجهاد التأكسدي بكبد الجرذان المعاملة بالبراسيتامول

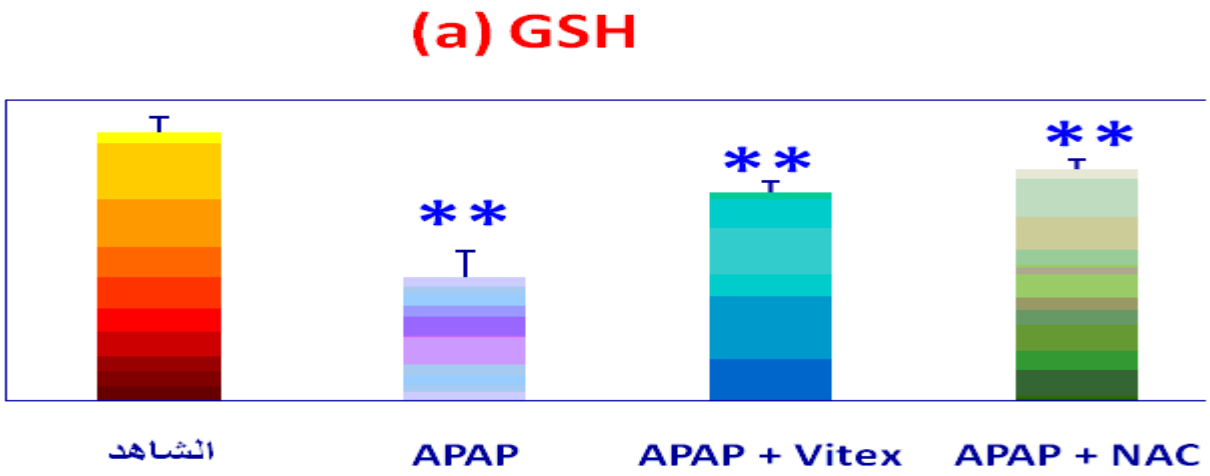
1.2.2.4. الـــTBARS

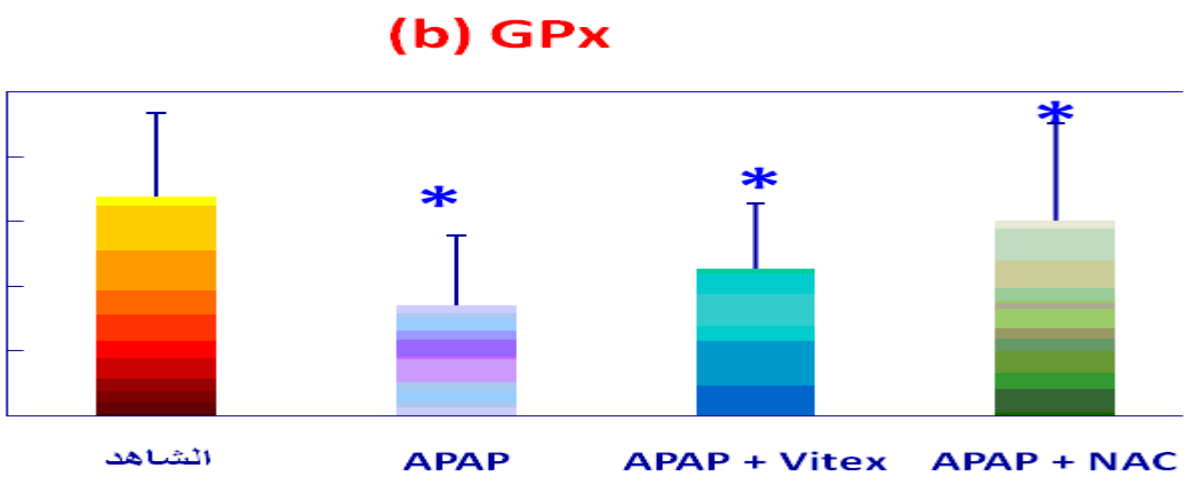


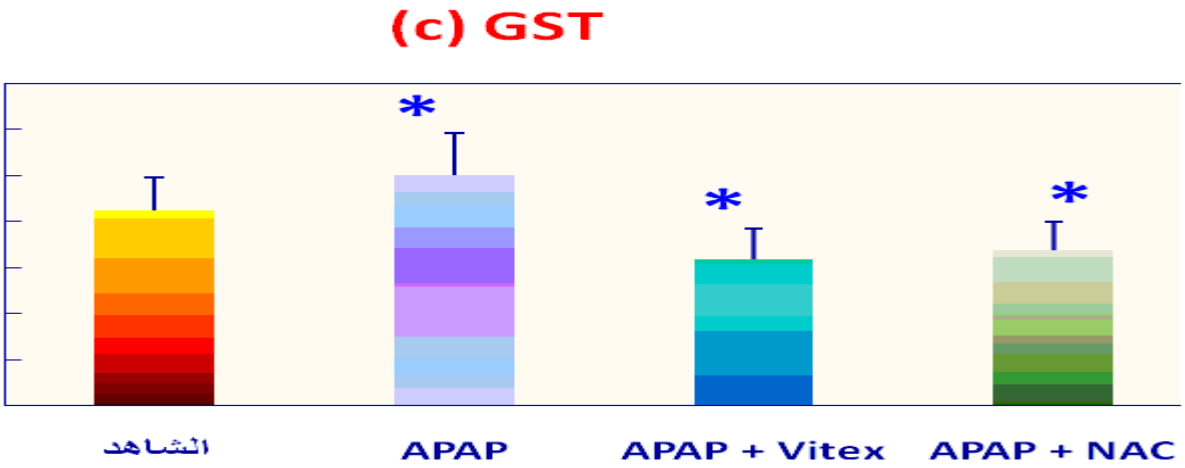
شكل (16) الدور الوقائي للمستخلص البيتانولي *للـــــVitex agnus-castus* على مؤشرات الإجهاد التأكسدي (الـــــTBARS) بكبد الجرذان المعاملة بالبراسيتامول

تدلي نتائج الدراسة الخاصة برصد الفعل المانع للأكسدة للمستخلص البيتانولي لنبات *Vitex agnus-castus* بأن الجردان المعاملة بجرعة منفردة من البرسيتامول قد تولد عندها الـــــTBARS بشكل معنوي و يظهر الشكل (16) أن المعاملة المسبقة بكل من المستخلص البيتانولي لنبات *Vitex agnus-castus* (300mg/kg) لمدة 10 أيام دورا و قائيا ضد السمية بالـــAPAP تتمثل في تراجع هذه الأكسدة اللبيدية بـــ81 % مقارنة بالـــ NAC 86 % جدول رقم (9).

2.2.2.4.. النظام الجلوتاتيوني



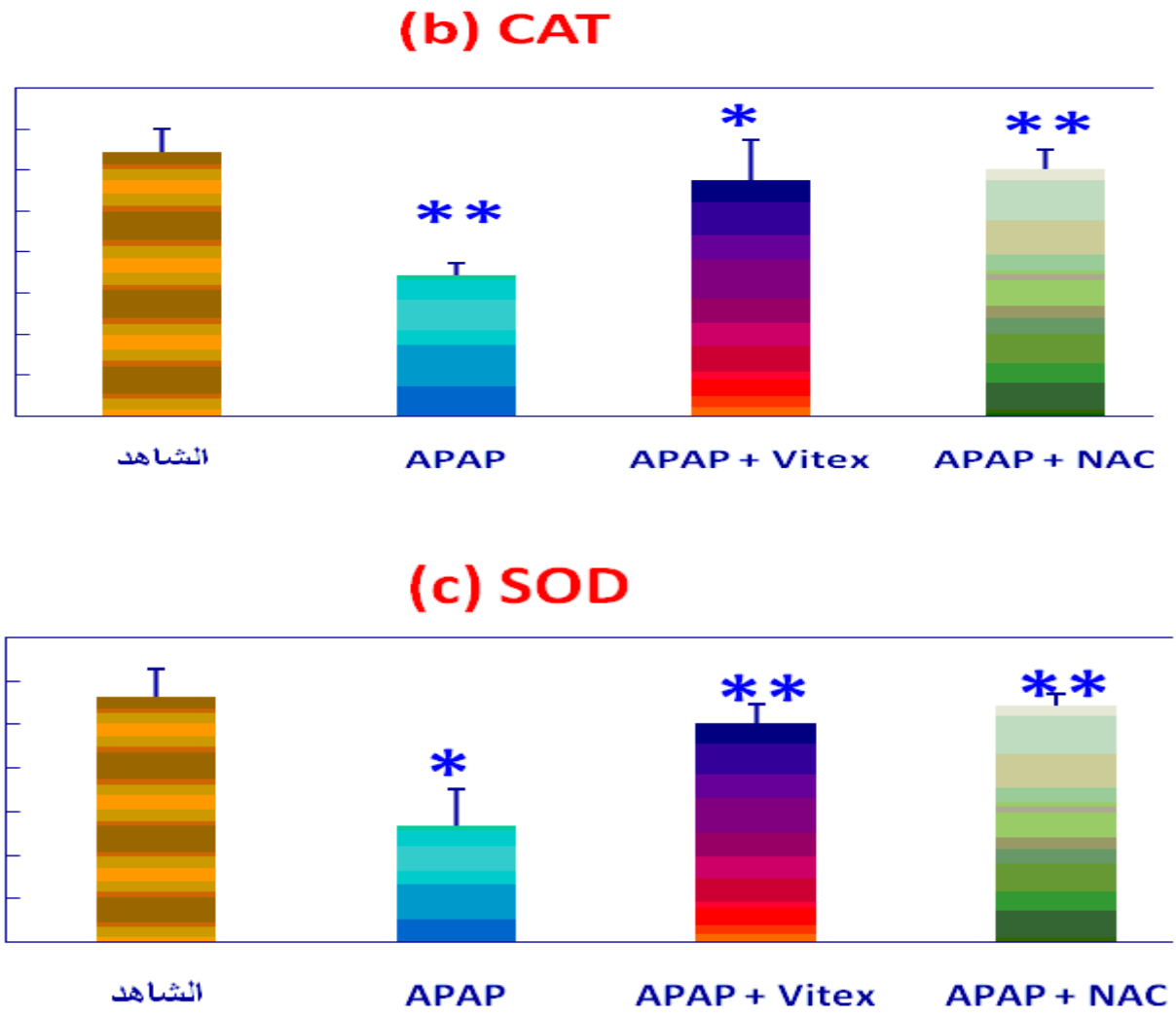




شكل (17) الدور الوقائي للمستخلص البيتانولي للـــــ *Vitex agnus-castus* على النظام الجلوتاتيوني بكبد الجرذان المعاملة بالبراسيتامول GSH ، GPx ، GST.

تدلي نتائج الشكل (17 a و b و c) و الجدول رقم (9) بأن معاملة الجرذان بجرعة منفردة من البراسيتامول قد أحدثت خللا بكافة أنظمة الدفاع المانعة للأكسدة حيث اختل النظام الجلوتاتيوني GSH و GPx نقصا بينما سجلت زيادة معتيرة قي نشاط الـــــ GST وتظهر نفس النتائج بأن المعاملة المسبقة بكل من المستخلص البيتانولي للـــــ Vitex agnus-castus (300 mg/kg) لمدة 10 أيام دورا وقائيا ضد السمية بالـــAPAP تتمثل في الاحتفاظ بنشاط النظام الجلوتاتيوني بما يكافيء 62 – 68 % مقارنة مقارنة بالـــ NAC 74–77 % بالنسبة لكل GSH و GPx جدول رقم (9) . و بما يكافيء(80 %) بالنسبة للمستخلص البيتانولي للـــــ Vitex agnus-castus بمقارنة ذلك بالأثر الوقائي للـــ NAC (83 %) في حالة الـــ GST.

3.2.2.4. نشاط الـــCAT و الـــ SOD



شكل (18) الدور الوقائي للمستخلص البيتانولي للــــ Vitex agnus-castus على مؤشرات الإجهاد التأكسدي (CAT و SOD) بكبد الجرذان المعاملة بالبراسيتامول

تدلي نتائج الشكل (18 a و b) و الجدول رقم(9) بأنه قد سجلت استجابة معتبرة بالإنزيمات المانعة للأكسدة والتي إنخفض نشاطها بشكل معنوي بكبد الجرذان المعاملة بالبراسيتامول حيث تم الاحتفاظ بهذا النشاط بنسبة 77 و 79 % بكل من الــCAT والــSOD في حالة المعاملة بالمستخلص البيتانولي للــــ *Vitex agnus-castus* وبـــ 86 و 93 % في حالة المعاملة بالــ NAC .

جدول (9) الدور الوقائي للمستخلص البيتانولي للـــــ*Vitex agnus-castus* على مؤشرات الإجهاد التأكسدي بكبد الجرذان المعاملة بالبراسيتامول

NAC (%)	*Vitex* (%)	**المعاملة**
7.3 ± 86	8,1 ± 81	**TBARS**
4.3 ± 74	5,2 ± 68	**GSH**
5.8 ± 77	4.5 ± 62	**GPx**
8,1 ± 83	7.1 ± 80	**GST**

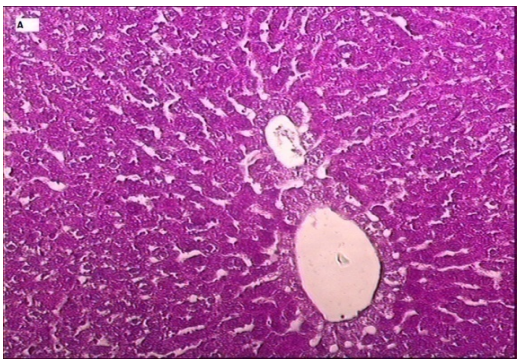
CAT	6 ± 77	7.9 ± 86
SOD	6.8 ± 79	9 ± 93

3.2.4 الدراسات النسيجية

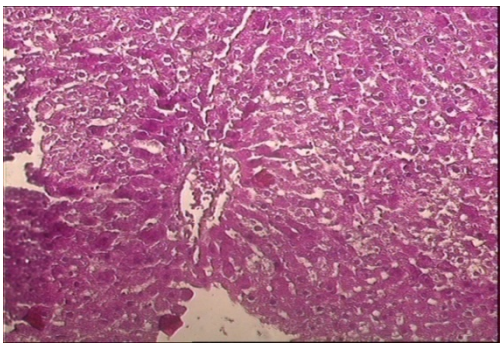
يبدي النسيج الكبدي في الشواهد هيئة نسيجية بنيوية عادية من خلال الحفاظ على الصورة المشعة للنسيج ومسافات بينية منتظمة، الخلايا الكبدية ذات سيتوبلازم متجانس بها نواة مستديرة مركزية، بينما تظهر المقاطع النسيجية لكبد الجرذان المعاملة بالباراسيتامول فقدان الهيئة المشعة ، اختزال المسافات البينية للجيوب الدموية ، عدم الانتظام في شكل صفائح ، كما نميز وجود العديد من المناطق الباهتة وتبدو الخلايا الكبدية بأحجام غير عادية مع فقدانها لحدودها الغشائية (التخريب الغشائي نتيجة فوق الأكسدة اللبيدية) واحتوائها على نواة صغيرة وداكنة مقارنة مع الشواهد ، وعلى نفس المقطع النسيجي وبالقرب من المنطقة المحيطة بالوريد المركز الفصي (VC) نميز تمدا جيبيا ونكرزة وارتشاح لخلايا الـــPN مما يترجم التهابا بؤريا بالفص المركزي والتهاب بالفضاء البابي واحتقان جيبي ووعائي.

مع ملاحظة فرط في التنسج لخلايا كيبفار حول الخلايا المخربة خاصة القريبة من الوريد المركز الفصي ، هذا الأخير يبدي ضيقا في لمعته مقارنة بالشواهد. إنّ خلايا كيبفار إثر استجاباتها الالتهابية للبراسيتامول تحرض النكرزة الكبدية من خلال توليد السيتوكينات الالتهابية و الجذور الحرة

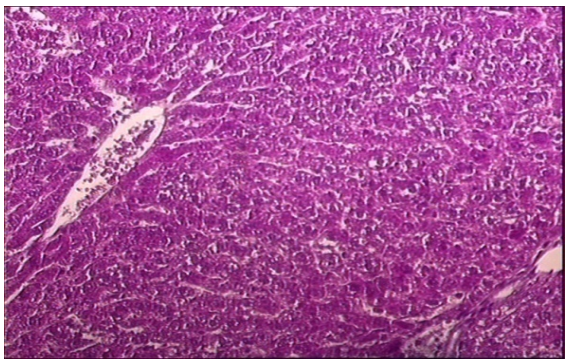
على خلاف مجموعة البراسيتامول تبدي المقاطع النسيجية للكبد المجاميع الموقاة بالـــNAC وبالمستخلص البيتانولي ، مظهرا عاما متماثلا إلى حد ما ، من خلال حفظ الهيئة المشعة للنسيج ، كما تظهر الخلايا المحيطة بالوريد المركز الفصي مماثلة لدى مقاطع الشواهد إلى حد كبير .



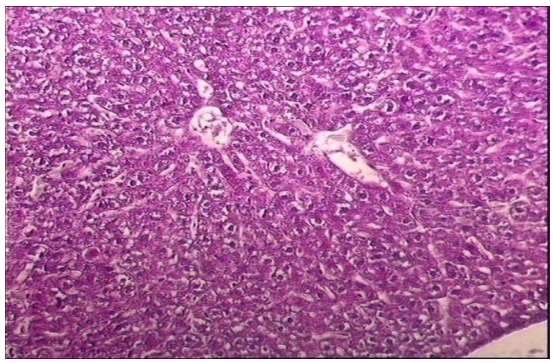
A



B



C **D**



شكل (19) ميكروغراف القطع الكبدية بالجرذان (هيماتوكسيلين + أيوزين) OM 200 x الدور الوقائي لـــنبات الـــ*Vitex agnus-castus*

A الشاهـــــد

B المعاملة بالبراسيتامول (750 mg / Kg) : نخر مركزي ، فقد معالم الخلية ، ارتشاح الـــــPN

C المعاملة بالبراسيتامول + المستخلص البيتانولي للـــــ*Vitex agnus-castus*

D المعاملة بالبراسيتامول + NAC

5- المناقشة

5.المناقشة :

إنّ العديد من حالات التسمم الكبدي المحرض بواسطة APAP لا يتم تشخيصها و ملاحظتها بصورة مبكرة تسمح بإمكانية المعالجة للوقاية من الإصابة الكبدية، لذا فإن تطوير استراتيجيات علاجية لمعاملة و معالجة إصابة الكبد المحرضة بواسطة APAP و خاصة خلال المراحل المتأخرة من إصابة الكبد يمثل حقلا هاما في مجال الدراسة و البحث العلمي. ويعتبر الـــacetaminophen أو N-acetyl-p-aminophenol كمسكن للآلام إلا أن الجرعات العالية منه عرف منذ ازل أنها تحدث اختلالات و سمية كبدية، و بالرغم من أن بعض من آليات هذه السمية قد تم تفسيرها إلا أن علاقة هذا بالخلل التاكسدي لا زال يقتضي الكثير من التحري . يستقلب الـــ acetaminophen (APAP) الى العديد من المركبات خلال عمليات glucuronidation وsulfation ليفرز في صورة مقترنة. الى جانب أن APAP يستقلب جزئيا عبر CYP450 الى بعض المستقلبات خاصة (NAPQI) ، يزال هذا الاخير اثر اقترانه بالجلوتانيون مسببا استنفاذه في حالة الجرعات العالية متبوعا بإنشاء روابط تساهمية مع البروتينات الداخل خلوية متلفا وظائفها ومحدثا خللا بهميوستازيا الخلية ليؤدي إلى الموت المبرمج و حالات النكرزة (Sabir وRochab ، 2008).

تعتبر الـــROS التي تنجم عن اختزال الأكسجين الثنائي الى $O^{\circ}_2^-$ متحولا بدوره إلىH_2O_2 و O_2 وفقا لتفاعل محفز بواسطة superoxide dismutase ويتحول الـــH_2O_2 أيضا بفضل الـــcatalase و الجلوتايتون إلى ماء مولد الجذر العالي النشاط OH° اثر تفاعلات Fenton و المتسبب الأول عادة في آليات الإتلاف الكبدي.

يحول GSH preoxidase الـــH_2O_2 أو البيروكسيدات اللبيدية إلى ماء أو اللبيدات الهيدروكسيلية و يقتضي التفاعل تحول الـــGSH إلى جلوتايتون مؤكسد GSSG ، و لأجل استرجاع الـــGSSG فإن الخلية تعمد إلى NADPH المتوقف على GSH reductase ويدعم الـــ NADPH بواسطة G.6 phosphatase (Shang ، 2010).

أدلت الدراسات السابقة أن بعضا من مضادات الأكسدة كالفيتامين C والـــ Mélatonine وPunicalogen تحد من سمية APAP ، كما اعتبر الـــ N-acetylcysteine (NAC) طليعة الجلوتايتون إكلينيكيا ، و من أهم مضادات الأكسدة إلاّ أنّ هذا الاستعمال لم يخلو من أثار جانبية مما استدعى البحث عن بدائل طبيعية كالشاي الأخضر وsilymarin . إن الجلوتايتون المختزل GSH كمضاد أكسدة القابل للذوبان في الماء يعتبر الخط الأول الدفاعي للجذور الحرة و يساهم بدور فعال في إزالة السمية كما يتدخل كمختزل للـــ H_2O_2 و الهيدروكسيدات اللبيدية مباشرة إلى H_2O مع تكون الـــGSSH. و باستمرار الإجهاد التأكسدي يتم استنفاذه يؤدي إلى أكسدة و عطب اللبيدات و البروتينات و الـــ DNA بواسطة الجذور، و باستنفاذ الـــ GSH فإن المستقلبات الالكتروفيلية النشطة لا تتمكن من الاقتران لترتبط مباشرة و بشكل مكتل بالبروتينات النشطة (**Yuan** وآخرون، 2010).

أعربت الجرذان المعاملة بجرعة منفردة (750 mg/Kg) من APAP عن تلف كبدي يترجم بارتفاع معدل نشاط ALP ، ALT ، AST وكذا مستويات TG بفعل التراكم اللبيدي وكذا خلل بمستو ى البيليريبين الذي يعكس خلل البرانشيم الكبدي ، كما يعكس التسرب الأنزيمي الفقد الوظيفي و البنيوي لأغشية الهيباتوسيت الناجم عن الغزو الجذري .

يستنفذ المستقلب APPQ1 الـــ GSH بشكل معتبر عند معاملة الجرذان بـــ750 mg/Kg بالدراسة الحالية، ولقد وجد بأنّ استقلاب NAPQ1 يتجه نحو الاختزال الإلكتروني متبوعا بإعادة الأكسدة (Reoxidation) و تساهم هذه الدورة الرودوكسية باختزال جزيئة الـــO_2 لإعطاء الـــO^-_2 مع التتابع الجذري لكل من H_2O_2 و °OH . أدلت أبحاث عدة بأن انتاج الجذور النشطة يحدث مبكرا قبيل استنفاذ الـــGSH ولذا اعتبر التراكم الجذري واستنفاذ الـــGSH من أهم آليات السمية الكبدية يالـــAPAP (**Yuan** وآخرون، 2008).. وهذا ما يعكسه أيضا ارتفاع مستويات الـــMDA بالجرذان المعاملة بالـــAPAP بهذه الدراسة. وبالخلية الكبدية تزال سمية الـــNAPQI أساسا عن طريق الـــ GSH الذي يمثل اكبر مضاد اكسدة ،في حالة جرعات الـــ APAP التي تسبب سمية للخلية الكبدية فإن الـــGSH يغمر الخلية و يستنفذ بقوة من السيتوبلازم و الميتوكوندريا التي تحتوي بدورها على كمية منفصلة من الـــGSH (James وآخرون ، 2003). تستنزف جرعات الـــAPAP المسببة للسمية الكبدية (≤250 مع/كغ المجربة على الفئران) أكثر من 90% من GSH بكل من الستوبلازم و الميتوكوندريا (Hanawa و آخرون، 2008) . إن ايض الـــAPAP الى NAPQI يمثل مسار صغير في ازالة الـــAPAP وعليه فالجرعات العالية تكون عادة ضرورية لإنتاج معدلات كافية من الـــNAPQI بكل من السيتوبلازم و الميتوكومندريا ، وبمجرد أن يستنفذ الـــGSH فإنّ NAPQI يرتبط تساهميا مع البقايا الثبولية في البروتينات و الذي يؤثر بقوة على نشاط البروتينات (Burcham، 1991).

إن استنفاذ الـــGSH المتيوكوندري بواسطة الـــNAPQI له تاثير كبيرعلى توليد الـــROS بالميتوكومندري ، فالـــ GSH يلعب دورا هاما في ازالة سمية H_2O_2 بحشوة الميتوكوندريا و السيتوبلازم حيث يستخدم انزيم GSH peraxidase القوة الاختزالية للـــGSH لاختزال H_2O_2 إلى ماء (Han واخرون 2003). فقد لوحظ ارتفاع في انتاج الـــH_2O_2 الميتوكوندري لدى الميتوكوندريا المعزولة ساعة بعد معاملتها بالـــAPAP (Hanawa و آخرون ، 2008). و ارتفاع الـــ ROS قد يكون نتيجة مباشرة لفقد الـــ GSH و الذي يسمح بذلك للـــNAPQI بإتلاف سلسلة النقل الالكتروني مما يزيد في انتاج توليد الـــ ROS (Han واخرون 2003) . وتوجد مؤشرات توحي بان الـــNAPQI يمكن أن يحفز حلقة الـــRedox في توليد الـــROS بالخلية الكبدية. إضافة إلى ارتفاع توليد الـــROS فقد اتضح أن المعاملة بواسطة APAP تسبب ارتفاعا في توليد اوكسيد التتريك (NO) بالكبد عن طريق خلخلة تنظيم انزيم NO synthase المحرض وكذا إنزيم NO synthase المتواجد على مستوى الخلايا الطلائية (Ito و آخرون، 2004). وان جزءا من الـــ NO المتكون عقب المعاملة بـــAPAP يتفاعل مع فوق الاكسيد $O°_2$ لتكوين بيروكسي نتريت (ONOO-) وهو مؤكسد قوي يقوم باكسدة البروتينات وجزيئات ضخمة اخرى (Jaeschke ، 2003) ، وبالتالي فإنّ السمية الكبدية بالـــAPAP تكون مرفقة بإجهاد تأكسدي مرده استنفاذ الـــGSH وارتفاع توليد الـــROS وكذلك ارتفاع اجهاد

الــNitrosative سببه ارتفاع NO وتوليد -ONOO بالكبد. واستنفاذ الــGSH وكذا ارتفاع الــROS و الانواع النيتروجينية النشطة (-ONOO، NO، RNS) الناتجة عنNAPQI له تأثير كبير على نظام الرودوكس الخلوي و الميتوكوندري (Han وآخرون ، 2006؛ Yap ، 2008).

إذا تم اكتشاف الإصابة الكبدية التي يحرضها الــAPAP مبكرا فإنه يمكن معالجتها بسرعة بواسطة N–acteyl cysteine (NAC) وهو عبارة عن cysteine طليعة و محفز للجلوتايتون (GSH) غالبا لا يرافقه إصابة معنوية للكبد (Rumack، 1981) وقد اعتمد في دراستنا هذه كشاهد موجب. والنتيجة الرئيسية لمعدلات الــ GSH المختزل و/او ارتفاع الاجهاد التاكسدي و الاجهاد الــNitrosative الناتج عنNAPQI هو ظهور عطب وفساد نظام الرودوكس البروتيني ومن المحتمل أيضا وظيفته، فالــNAPQI يمكن أن يرتبط تساهميا بالثيولات البروتينية ويقوم اتلاف وظيفة البروتين عندما يستنفذ معدلات الــGSH. و الــH_2O_2ا لمرتفع نتيجة استنفاذ الGSH يمكن أن يتفاعل مع الثيولات البروتينية ويؤدي الى تكوين جسور ثنائية الكبريت وحمض الــsulfenic وتغيرات رودوكسية اخرى للثيولات البروتينية (Han و آخرون ، 2006)، وبالمثل فإنّ الــNO يمكن ان يسببnitrasylation مجاميع الــthiol البروتينية بينما $ONOO^-$ يمكن أن تسبب اكسدة مجاميع الثيول الى حمضي الــ sulfeni والــ sulfenic وكذا نترتة (nitratation) الــtyrosine (klatt و Lamas ، 2000). إضافة إلى السيستيين فهناك العديد من الأحماض الامينية الأخرى مثل الميثيونين و البرولين و الهستدين يمكن أن تتاكسد بواسطة الــROS ، و الــRNS (Standman و آخرون ، 2003)، وكل هذه التغيرات يمكن أن تؤثر بقوة على نشاط البروتين وهذا يعتمد على الأحماض الامينية المتاثرة بواسطة كل من الــROS و الــ NAPQI و الــRNS ، فقد لوحظ خلال الإصابة الكبدية المحرضة بواسطة APAP ارتباط تساهمي قوي وأكسدة بروتينية وnitrotytrosine وتكوين هام للــ $ONOO^-$ (Han و آخرون ، 2010).

و التغيرات الرودوكسية البعدية للبروتينات قد يكون لها آلية هامة في تنشيط العديد من مسارات التنبيه بالخلية الكبدية بعد المعاملة بالــAPAP ، فمثلا فإن بروتينات التنبيه مثل NF-KB وبروتينات انزيمات phosphatases يمكن تثبيطها بواسطة التغيرات الرودوكسية (kamata و اخرون ، 2005)، ومن جهة أخرى فإن بروتينات مثل العامل Nrf 2 المرتبط بNFE2 يتم تنشيطها بواسطة التغيرات الرودوكسية و الــNrf2 هو عامل نسخ هام يرتبط بالعامل المستجيب لمضاد الاكسدة مثل تتابع DNA بالمخصص (promator) للانزيمات المضادة للاكسدة مثل إنزيم Glutamylaysteine ligase (GCL) وانزيم Heme oxygenase وأنزيم Eoxide hydrolase السيكروزومي، وفي الحالات العادية فان Nrf2 يوجد بالستوبلازم مرتبطا بkeap (Itoh و اخرون ، 2004). يحتوي الــ keap ثيولات أساسية تكون هامة في ارتباط و احتفاظ بــ Nrf2 بالسيتوبلازم (Han واخرون 2010).

وقد وجد أن بروتينات أخرى تكون عرضه لتغيرات رودوكسية بعد انتقالية (pos-translational) اثر المعاملة بــAPAP تشمل كل من 3OH-3-methy glutauryl curnzyme synthetase

وهو انزيم تنظيم اساسي في عملية الـ وkettogensis وكذاإنزيم الـcatalase انزيم يعمل على إزالة سمية الـH_2O_2 (Adringa و آخرون ، 2008). ان التغير الرودوكسي للبروتينات تم اعتباره على انه آلية هامة في تنشيط أو تثبيط العديد من بروتينات التنبيه عند الاسجابة للـ ROS وRNS (Yap و آخرون ، 2008).

يعتبر الجلوتاتيون منظما مفتاحيا بالطور الرودسكي لثيول السيستيئين البروتيني ويقدر الـGSH الداخل خلوي المتموقع عادة بالسيتوزول بمقدار (1-11 mM)، إذ يخلق على هذا المستوى انطلاقا من L-glatamate (Kritin وVasagayam،2000) بتدخل أنزميγ-glutamyl cysteine synthetase (γ-GCS) و (GS) glutathione synthetase (Williamson وآخرون، 1996)، وفضلا عن دوره المضاد للأكسدة وإزالة سمية الكتروفيلات الxenobiotics فهو معدّل نقل إشارات التنظيم الردوكسي، مخزّن وناقل للسيستيئين (Bray وTaylor، 1993)، منظم التوالد الخلوي، مخلّق لdeoxyribonucléolides، منظّم للاستجابة المناعية وإستقلاب الLeukotreine والProstaglandine (Okuno وآخرون، 1998).

يتدخل الGSH بآليتين لمنع التأكسد عن طريق التفاعل الفوري مع الROS وبشكل متزامن مع الGPx، لا يلبث الGSSG المنتج داخل خلويا من أن يختزل في وجود الGR أو يحرر خارج خلويا ليعتبر تراكما لـGSSG عاملا محددا لمدى التحسس الخلوي للإجهاد التأكسدي. كما يتواجد كل من الـGSH والـGSSG خارج خلويا بكميات محدودة، ويساهم الجلوتاثيون الخارج خلوي بدوره في إزالة السمية وتعزيز الفعل المضاد للأكسدة، ويقل تركيزه عن تركيز الداخل خلوي بمقدار 100 إلى 1000 مرة. تحتفظ النواة بالـGSH مستقلا عن السيتوزول وهذا لتأمين البروتينات الكبريتية الضرورية للـADN والتعبير الجيني (Arriago، 1999). وخلافا لذلك فإنّ جلوتاثيون الشبكة الأندوبلازمية يكون أكثر تأكسدا مقارنة بالسيتوزول وتتراوح النسبة GSSG/GSH ما بين 1 : 3 (Griffith، 1999).

ينظم المحتوى الجلوتاثيوني توازن الـthiol-disuffides، كما يؤمّن SH السيستئين الجلوتاثيوني العديد من الوظائف الفيزيولوجية، وتعتبر ثيولات الشبكة الأندوبلازمية: CoSH وcysteine إشارات التواصل الرودوكسي ما بين الخلوي. كما يحكم GSH الداخل خلوي التعبير الجيني *C-Jun* Onco protein و كذا عائلة البروتين *AP-1*، ويتوقف ارتباط الـ*apo-sp1* بالـ DNA على النسبة

GSH/GSSG (Kritin وآخرون، 1999). ويتحسس الكالسيوم الداخل خلوي أيضا العوامل الثيولية، ولعل هذا ما يفسر استنفاذ مخازن الكالسيوم من خلال ترا كم الـGSSG (Nakamura وآخرون، 1997). ينعكس إرتفاع معدل GSSG برفع أكسدة الثيولات البروتينية وظهور التشوهات البروتينية. وتتدخل مختزلات ثيولية مثل thioredoxin والـglutaredoxin والـprotein disulfde isomerase في تأمين مستويلت الجلوتاثيون (Seen، 1998).

ومن المعلوم أنّ الـGSH السيتوزولي بالخلية الكبدية يشكل 85% و15% منه يتموقع ميتوكوندريا . يحمي الجلوتايتون المختزل الخلية الكبدية ضد ROS و المواد السامة عبر مسارين :

1- منظم رودوكسي داخل خلوي ملتقط جذري مستبعد للبيروكسيدات الليبيدية وكمادة تفاعل للـGPX

2- يتفاعل مع المركبات الالكتروفيلية المحفزة بواسطة الـــGST الذي بدوره قد اختزل هنا بما يكافيء (%) لاعطاء glutathione s-conjugates والتي تشير طرحها بالبولة.

بحالة الإجهاد التاكسدي يتحول الـــGSH الى GSSG و يستنفذ محدثا أكسدة لبيدية وهذا أيضا ما يترجمه بدراستنا هذه بارتفاع معدلات الـــMDA بالجرذان المعاملة بالـــAPAP لأجل تعديل معدلات الـــMDA من الضروري الاحتفاظ بمعدلات طبيعية للـــGSH. ويتوقف هذا الأخير على مستويات الـــNADPH المؤمن بالمسارات البنتوزية في وجود الـــGR .

أظهرت نتائج الدراسة الحالية بأنّ باقي النظام الجلوتاتيوني قد استجاب لفعل السمية بالـــAPAP حيث اختزل نشاط الـــGPx و حفز نشاط الـــGST. يعتبر الـــGST بروتينا ستوزوليا ذائبا يؤمن فعاليات إزالة السمية xenobiotiques منشطا ارتباط الوظائف واقتران الثيولية للـــGSH مع الـــ xenobiotiques الالكتروفيلية رافعا بذلك معدلات الذوبانية و بالتالي طرح مقترنات الـــGSH أو تحويلها إلى مركبات mercapteuric acid. كما أن من وظائف الـــGST الارتباط ما بين الـــGSH و المواد endogenous أو exogenous حيث إن دور الـــGSH يرفع من هيدرفوبية المواد فهو بذلك يرفع من قدرتها الاطراحية. كما يمارس الـــGST فعلا مماثلا للـــGPx حيث بإمكانه اختزال البيروكسيدات اللبيدية . إنّ ارتفع معدلات الـــMDA قد يرتبط بنثبيط نشاط انزيمات الأسر الجذري كالCAT و الـــSOD وهذا ماترجمته نتائج الدراسة الحالية حيث أنذ اختزال نشاط الـــCAT المفكك للـــ H_2O_2 قد نجم عنه تراكم كل من OH° و O°_2 .إنّ اختزال نشاط الـــSOD قديكون ناجما عن Futile cycling للـــP450 المحرض بواسطة NAPQU و الذي يستعمل المكافيء المختزل NADPH من خلال الاختزال المزامن للجذر O°_2 منعكسا بذلك على نشاط الـــSOD .

تظهر نتائج هذه الدراسة بأنّ المعاملة المسقبة للجرذان بجرعة 300 mg/kg من المستخلص البيتانولي لأوراق وأزهار نبات الـــ*Vitex agnus-castus* الـــ للجرذان التي سممت بجرعة منفردة من APAP قد تعزز بها كثيرا النظام المضاد للأكسدة حيث تراجع اختزال النظام الجلوتاتيوني ، GSH و GPX وعدل نشاط الـــGST وتحدد التسرب الانزيمي وبقيت مستويات الـــMDA بهذه الجرذان مقاربة لمستوياتها بالشواهد وبتلك المعاملة بالـــNAC , لقد مكن المستخلص البيتانولي من مجابهة الجذور المولدة إثر سمية الـــAPAP ومكن من الاحتفاظ بالنشاط الأنزيمي السيتوزولي . ولعل هذا مرده العل الآسر جذري أو الممخلب للمعادن منة طرف المركبات الفينولية التي يتضمنها المستخلص البيتانولي أو بدعم النظام المضاد للأكسدة و المتلف للجذور النشطة . إنّ الخواص الفرماكولوجية لهذه النبتة تدلي وفقا للدراسات المرجعبة بأنها مضادة للالتهاب مما قد يرشحها لمجابهة الالتهاب الكبدي وقذ اثبت غناها بالفلافونيدات حيث بلغت نسبتها من 1 إلى 2.7 % بالأوراق و بـــ 1 إلى 1.5 % بالأزهارتتنوع بين خرة وعيدة التسكر كالـــcasticine و الـــapigenine و الـــkampherol . وتدلي نتائج دراسة تمت على طور الأسيتات بأنها غنية بالـــcasticine و 7-methy-luteonine و 7-O-glucosyl-luteoline . وتدلي الدزاسة الحالية أنّ الخريطة الفلافونيدية للطور البيتانولي تفصح عن وجود الفلافونيدات بتراكيز عالية و أحماض فينولية ويرشخ منها فلافونات ميتوكسيلية وجليكوزيلية . إنّ

الوظيفة المعززة للنظام الجلوتاتيوني والأنزيمات المضادة للأطسدة وأسر الجذور الحرة وتحريض آليات الأقلمة مع الاجهاد التأكسدي مرده وجود هذه الفلافونيدات وكذا بناها ومستبدلاتها حيث أنّ ortho-dihydroxy بالحلقة B يؤمن الحركية الالكترونية ، كما أنّ الرابطة المضاعفة C_2-C_3 المقترنة مع الوظيفة 4-oxo وكذا تواجد 3-OH متضافرا مع الرابطة المضاعفة C_2-C_3 تعزز النظام المضاد للأكسدة للهيباتوسيت مما يرشح هذه النبتة كبديل وقائي عن الـــNAC الذي بالرغم من اعتماده كواق تقليدي فإنه لا يخلو من آثار جانبية.

6- الخلاصة

6. خاتمة واستنتاج :

يمثل الباراسيتامول السبب الأكثر شيوعا في القصور الكبدي الحاد الناشئ عن الأدوية و الذي يكون سببه التعاطي المزمن أو الجرعات المفرطة، و لسوء الحظ فإنّ العديد من حالات التسمم الكبدي المحرض بواسطة الـــ acetaminophen لا يتم تشخيصها و ملاحظتها بصورة مبكرة تسمح بإمكانية المعالجة للوقاية من الإصابة الكبدية، لذا فإن تطوير استراتيجيات علاجية لمعاملة و معالجة إصابة الكبد المحرضة بواسطة APAP و خاصة خلال المراحل المتأخرة من إصابة الكبد أصبحت ضرورة ملحة و من بين الأهداف المنشودة . وقد أجريت هذه الدراسة بغرض اختبار الفعل الوقائي لنبات الـــ *Vitex agnus-castus* من الالتهاب الكبدي المحرض بالبراسيتامول لدى الجرذان اعتمادا على ترشيح المستخلص البيتانولي بناء على مدى غناه بالفلافونيدات التي أكدها الفحص التمهيدي الذي عكسته الخريطة الفلافونيدية و بروفيل كروماتغرام الـــTLC واختبار فعله الوقائي على مؤشرات كل من السمية الكبدية و الإجهاد التأكسدي و إظهار ذلك بالدراسات النسيجية.

اختيرت لهذه الدراسة جرذان ذكور *Albino wistar*. وزعت إلى 4 مجموعات بمعدل خمسة (5) جرذان عوملت الأولى (الشاهدة) و الثانية (المسممة) بالمحلول الفيزيولوجي (NaCL 0.9%) يوميا لمدة عشرة أيام والثالثة بالـــ N-acetyl cystéine (NAC) بجرعة 200 mg/Kg يوميا لمدة عشرة أيام و الرابعة المجموعة الموقاة بمستخلص بيتانولي لنبات *Vitex agnus-castus* بجرعة 300 mg/Kg يوميا لمدة عشرة أيام .وفي اليوم العاشر وبعد ثلاث ساعات من أخذ الجرعة من المعاملات المختلفة يتم تسميم كل المجموعات ماعدا المجموعة الشاهدة بإعطاء البراسيتامول بجرعة (750 mg/Kg). وقد شملت معايرة مؤشرات السمية الكبدية كل من نشاط الـــ ALT، الـــAST ، الـــALP ، البلربين الكلي ، و الجليسيريدات الثلاثية ، أما مؤشرات الإجهاد التأكسدي فقد تناولت قياس كل من الـــ TBARS والنظام الجلوتاتيوني الذي شمل كل من الجلوتاتيون المختزل GSH و نشاط الـــGPx الـــGST وكذا نشاط إنزيمات الإجهاد التأكسدي المتمثل في كل من الـــ

catalase (CAT) و الـــ Superoxid Dismutase (SOD) . وقد أظهرت الجرذان المعاملة ارتفاع معدلات نشاط ALT وAST عن المعدلات المعهودة بما يكافيء 4 و 2 مرة على التوالي مقارنة بالشواهد، كما سجل ارتفاع بمعدلات الـــbiluribine و نشاط ALP بمعدل الضعفين وبمعدل ثلاثة أضعاف بالنسبة للـــTG . كما وفرت المعاملة المسبقة بالمستخلص البيتانولي دورا وقائيا ضد السمية بالـــAPAP تتمثل في الحد من التسرب الإنزيمي لناقلات الأمين بما يكافيء 84 – 87 % مقارنة بالفعل الوقائي للـــNAC 91 – 94 %، كما انخفضت معدلات كل من الـــ biluribine و نشاط ALP و الـــTG بما يكافيء 64 – 66 % بالنسبة للمعاملة

بالـــVitex agnus-castus مقارنة بـــالـــNAC 85 – 91 % .إن الجرذان المعاملة بالبرسيتامول قد تولد بها الـــــTBARS بشكل معنوي وقد أظهرت المعاملة المسبقة بالمستخلص البيتانولي لنبات -*Vitex agnus-castus* دورا و قائيا ضد السمية بالـــAPAP تتمثل في تراجع هذه الأكسدة اللبيدية بـــ81 % مقارنة بالـــ NAC 86 % . وقد أحدث معاملة الجرذان بالبراسيتامول خللا بكافة أنظمة الدفاع المانعة للأكسدة حيث اختل النظام الجلوتاتيوني GSH و GPx نقصا بينما سجلت زيادة معتبرة قي نشاط الـــــ GST وقد أدت المعاملة المسبقة بالمستخلص البيتانولي ضد السمية بالـــAPAP إلى الاحتفاظ بنشاط النظام الجلوتاتيوني بما يكافيء 62 – 68 % مقارنة بالـــ NAC 74–77 % بالنسبة لكل GSH و GPx و بما يكافيء 80 % بانسبة للمستخلص البيتانولييالـــNAC (83 %) في حالة الـــGST . و قد سجلت استجابة معتبرة بالإنزيمات المانعة للأكسدة والتي انخفض نشاطها بشكل معنوي بكبد الجرذان المعاملة بالبراسيتامول حيث تم الاحتفاظ بهذا النشاط بنسبة 77 و 79 % بكل من الـــCAT والـــSOD في حالة المعاملة بالمستخلص البيتانولي وبـــ 86 و 93 % في حالة المعاملة بالـــ NAC. وعلى خلاف مجموعة البراسيتامول تبدي المقاطع النسيجية للكبد للمجموعتين الموقاتين بالـــNAC والمستخلص مظهرا عاما متماثلا إلى حد ما، من خلال حفظ الهيئة المشعة للنسيج بصورة أحسن من تلك الملاحظة لدى مقاطع البراسيتامول ، كما تظهر الخلايا المحيطة بالوريد المركز فصي مماثلة لمقاطع الشواهد إلى حد كبير. يظهر نسيج هذه المجموعة الموقاة بالمستخلص النباتي إحتواءه على خلايا ثنائية النواة خاصة تلك المحيطة بالوريد المركز فصي دون ملاحظة ذلك على نسيج كبد المجاميع الموقاة بالـــ NAC . ونخلص من هذه الدراسة أن نبات الـــ*Vitex agnus-castus* الذي أبدى فعلا واقيا تمثل قي صيانة النظام *المان*ع للاكسدة قد يكون مرده إلى غناه بالفلافونيدات الأجليكونية و الهيدروكسيلية و الميتوكسيلية كما أظهرت الدراسات الكيميائية التمهيدية و كذا الدراسات المرجعية.

7. الآفـــــاق

إن الدور الوقائي الواعد للنبتة يفتح أفاقا تتمثل فيما يلي :

- البحث عن الجزيئات الفعالة

- علاقة هذه الجزيئات بآليات السمية اعتمادا على المزارع الخلوية ودراسة الـــWestern Blot

7- الملخص

7. الملخص :

تتمتع نبتة الـــ *Vitex agnus-castus* ذات الانتشار الواسع بالصحراء الجزائرية بخصائص صيدلانية عدة أهمها الدور المضاد للالتهاب ، وتهدف الدراسة الحالية إلى اختبار الفعل الوقائي الكبدي لهذه النبتة لدى الجرذان المعاملة بالبراسيتامول و محاولة تحديد آليات هذا الفعل ، يصاحب تعريض الجرذان إلى جرعة منفردة من البراسيتامول عبر الفم (750 mg /Kg) ارتفاع نشاط ناقلات الأمين المصلية وكذا معدلات كل من ALP و Biluribine وTG وكذا ارتفاع الأكسدة اللبيدية في صورة TBARSواختزال في نشاط النظام الجلوتاتيوني و المؤشرات المانعة للأكسدة.

مكن التعاطي المسبق للمستخلص البيتانولي للـــ*Vitex agnus-castus* (300 mg /Kg) لمدة 10 أيام الخلايا الكبدية من الاحتفاظ بنشاط ناقلات الأمين ALT و AST (84-87 %) وبنشاط كل من ALP و Biluribine وTG بـــ 64-66 % وبخفض الـــTBARS بـــ 81 % . كما أفاد التعاطي المسبق لهذه النبتة بالاحتفاظ بالنظام الجلوتاتيوني GSH و GPx بما يكافيء 62-68 % وبتعديل نشاط الـــ GST بـــ 80 % ، وبصيانة نشاط كل من CAT و SOD بـــ 77-79 % .

وقد دعم هذا العمل بالدراسة النسيجية التي أظهرت بأن الخلايا الكبدية تحتفظ بمعالمها ويختزل بها الارتشاح بالـــPN ويكاد يغيب بها النخر المركزي إثر المعاملة المسبقة *بالـــــVitex agnus-castus* ويبدو أن الفعل الواقي لهذا المستخلص يقارب كثيرا أثر الواقي المرجعي الـــNAC.

Abstract

Vitex agnus-castus (verbenaceae), widely distributed in the Sahara of Algeria, is used as a nutrient and as popular drug in folk medicine. Previous studies have confirmed that *Vitex agnus-castus* has some pharmacological effect. In this study, we were interested in the antioxidant and hepatoprotective activities. The presente work examines the protective mechanism of the *n*-butanol extract of *Vitex agnus-castus*. Acetaminophen (APAP) is commonly used anlgysie / antipyretic drug which can cause hepatotoxicity in cases of high over dose. Hepatotoxicity was assessed by quantifying serum activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), phosphatase alkaline. Malondialdehyde (MDA) concentration and reduced glutathione (GSH) level in liver homogenates was also assessed. Exposure of rats with APAP (750 mg/Kg orally) induced acute increase in serum enzymes, this was associated with a significant reduction of the GSH and in the activities of GPx, GST, CAT. The *n*-butanol extract of *Vitex agnus-castus* (300 mg/Kg/ 10days) was able to reverse the condition near normal levels by lowering the serum levels of enzymes (60-80 %) and MDA (60-70%) and by enhancing the GSH (75-88 %), and the activities of the antioxidant system and prevented the hepatocyte necrosis and the inflamatory changes. These results provide evidence that *n*-butanol extract of *Vitex agnus-castus* plays a provital role in the protective effect against APAP induced liver injury.

Keywords: Acetaminophen, Hepatprotective, MDA, GSH, *Vitex agnus-castus*

Résumé

Vitex agnus-castus (verbenacées), plante largement distribuée au Sahara d'Algérie, est utilisée comme aliment et comme médicament populaire en médecine traditionnelle. La documentation bibliographique a cité que cette plantes est dotée de certaines propriétés pharmacologiques. Dans cette étude nous nous sommes intéressés aux activités antioxydants et hépatoprotectrices . Ainsi, dans ce travail, nous nous proposons d'élucider le mécanisme protecteur de l'extrait butanolique de *Vitex agnus-castus***.** L'acetaminophène (APAP), médicament communément répandu, peut provoquer une toxicité hépatique chez les patients subissant un traitement chronique ou prenant des doses abusives, (excessives). L'hépatotoxicité induite par le APAP a été évaluée en dosant les activités des alanine aminotransferase (ALT) et aspartate aminotransferase (AST) et la phosphatase alkaline. Concentration de la malondialdehyde (MDA) ainsi que la glutathione (GSH) ont dosées dans l'homogénat hépatique. L'admition préalable de de 10 jours de l'extrait butanolique de ***Vitex agnus-castus*** chez les rats traité par l'acetaminophène (750 mg /Kg) a maintenu l'activité des tansaminases ALT, AST, (84-87 %), ALP, les biluribines et les TG (64-66 %), et a diminué les TBARS par un taux de 81 %. l'extrait butanolique a permis la préservation du taux du GSH, l'activité du GPx ,62-66 % , et celle du GST (81 %) . l'activité des enzymes antioxydants CAT, SOD s'est maintenu par un taux de 77-79 %. L'examinassions Histologique appuyant cette étude a montré que les cellules hépatocytaires ont gardé l'aspect des traits fondamentaux, et a marqué la dispartion presque totale de l'infiltration des PN s'absente et la nécrose centrolobulaire.

Mots clés : Acetaminophen, Hepatprotective, MDA, GSH, *Vitex agnus-castus*

8- المراجع

8.المراجع

Aebi, H., (1984). Catalase in vitro. Methods in Enzymology 105, 121–126.

AhlgrenBeckendorf, J.A., Reising, A.M., Schander, M.A., Herdler, J.W. and Johnson, J.A. (1999).Coordinate regulation of NAD(P)H: Quinone oxidoreductase and glutathione-S-transferases in primary cultures of rat neurons and glia: role of the antioxidant/ electrophile responsive element,Glia 25, 131–142.

Akindele A. J., Ezenwanebe K.O., Anunobi C.C., Adeyemia O.O. (2010). Hepatoprotective and in vivo antioxidant effects of Byrsocarpus coccineus Schum.and Thonn. (Connaraceae). Journal of Ethnopharmacology 129, 46–52

Al-omar,M.A.,Beedham,C.and Alsarra,I.A.(2004). Pathological rolles of reactive oxygen species and their defence mechanisms .Review Articale. Saudi Pharmaceutical Journal.12. 1-18.

Alvarez-Sanchez R, Montavon F, Hartung T, Pahler A (2006) Thiazolidinedione bioactivation: a and *Thonn*. (Connaraceae). Journal of Ethnopharmacology, 129, 46–52

Andringa KK, Bajt ML, Jaeschke H, Bailey SM (2008) Mitochondrial protein thiol modifications in acetaminophen hepatotoxicity: effect on HMG-CoA synthase. Toxicol Lett 177(3):188-197

Andringa KK, Bajt ML, Jaeschke H, Bailey SM (2008) Mitochondrial protein thiol modifications in acetaminophen hepatotoxicity: effect on HMG-CoA synthase. Toxicol Lett 177(3):188–197

Anonymous , (1998). Chaste tree.In: Dombek C, ED. Lawerence Review of Natural Products. St.Louis : Facts and Communications.

Anusuya N., Raju K., Manian S. (2010). Hepatoprotective and toxicological assessment of an ethnomedicinal plant Euphorbia fusiformis Buch.-Ham.ex D.Don. Journal of Ethnopharmacology 127, 463–467

Aruoma, OI, Halliwell, B, Hoey BM, Butler I, (1989). The antioxidant action of N-acetylcytein, its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, superoxide and hydrocorus afid, Free radical Biology and Medecin,

Arriago, A. P. (1999). Gene expression and thiol redox state. Free. Radic. Biol. Med. 27, 936 – 944.

Aschish.A.Dessmon YH.,choong CT.,Melvin L.,(2006). Plentailly futal Paracètamol overdose.35:108-111.

Atta-ur-Rahman, Ahmed. D., Choudhary. M.I. et al.,(1988). Planta. Medica, 54, 173.

attenuates acetaminophen hepatotoxicity in mice. Microcirculation 13(1):19–27

Aujard.4.,Autret.E.,Lenoir.G.(1992),Pharmacologie et Thèrapeutique Pèdiatrique.Flammarion.France.P.177-178,451-452.

Auzèpy.PH.et G .Manicand.,(1990).Accidents des Medicaments Paris,P.323-324.

B.(2003).Biochimie humaine.Paris:Médecine-Sciences Flammarion .512-535.

Bannwarth B.,(2003). Pehourcq F «Basespharmacologiques de l'emploi du paracètamol :Aspects Pharmacocinètiques et Phrmacodynamiques»

Beauchamp, C., Fridovich, I., (1971). Superoxide dismutase: improved assaysand an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry 44, 276–287.

Benhamou J.P .,(1993).hepatologie chimique.Flammarion,Paris, P586-612.

Berenguer, B., Trabadela C., S´anchez-Fidalgo, S., Qu´ılez A., Mino P., De la Puerta R.,. Martiın-Calero M.J, (2007). The aerial parts of *Guazuma ulmifolia* Lam. protect against NSAID-induced gastric lesions. Journal of Ethnopharmacology 114 153–160

Bierl,C.,Forgione,M.and Lascalzo,J.(2006).The antioxidanthypothesis.In:Antioxidants cardiovascular disease.ed.Bourassa.M.G and Tardif.J.C.pp 87-101. Springer Science+Business Media, Inc.

Blair,I.A.,Lawson,J.A.,Ischiropoulos.,H.and Fitzgerald,G.A.(2006).Biomarkers of oxidant stress in vivo: Oxidative modifications of lipids, proteins and DNA.In:Antioxidants cardiovascular disease.ed.Bourassa.M.G and Tardif.J.C.pp 131-165. Springer Science+Business Media, Inc.
Boelsterli UA (2003) Diclofenac-induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity. Toxicol Appl Pharmacol 192(3):307–322
Bonnefont J.,Courade J.-P.,AllaouiA.,Eschalier A .(2003). «Mécanismes de l'action antinociceptive du paracétamol» .Drugs ;63,N°Spécial2,1-4.Abstract-related Articles.
Bor, J.Y.; Chen, H.Y; Yen, G.C. (2006). Evaluation of antioxidant activity and inhibitory effect on nitric oxide production of some common vegetables; J. Agric. Food Chem., 54(5), 1680-1686. .
Brandt K . «Le Paracètamol dans le traitement des douleurs arthrosique». Drugs ,(2003),63, N° Spècial 2,23-41.Abstract-related Articles.
Bray, T. M.; Taylor, C. G. (1993). Tissue glutathione, nutrition, and oxidative stress. Can J. Physiol. Pharmacol. 71: 746 – 751.
Brent ,J.A.and Rumack ,B.H.(1993).Mechanisms.Role of free radicals in toxic hepatic injury. I.Free radical biochemistry. Clinical Toxicology 31,139-171.
Brown. D.J. (1994). Qtrly.Rev.Nat.Med,2,111-121.
Bruneton, (1993). Pharmacgynosie phytochmie des plantes medicinales P. 272-279 technique et documenttions Lavoisier.
Bruneton, J. (1986**)**. Drogues and flavonoids . Elements de phytochimie et de pharmacognosie P 156-170
Buffet.C,and Pelleter.G,(1994). Hépatologie,Maison ,Paris.P.35-41.2.
Burcham PC, Harman AW (1991) Acetaminophen toxicity results in site-specific mitochondrial damage in isolated mouse hepatocytes. J Biol Chem 266(8):5049–5054
Cadenas E, Davies KJ (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. Free Radic Biol Med 29(3–4):222–230.
Carmella, L.; Alessandro, F. (2003). Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. Frre. Radic; Biol. Med. 34(1), 1-10
Castell JV, CastellM(2006) Allergic hepatitis induced by drugs. Curr Opin Allergy Clin Immunol 6(4):258–265
Chandrasekharan N.V.,Turepu Ross L.K.,EvansonN.K.,Tomsik J.,EltonT.S.,Simmons D.L.(2002). «Cox-3,a Cyclooxygenase-1variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic druges : clining , structure, end expression ». Proc nath acad s ci (usa),99,13926-31.Abstract-related Articles.
Chen, L.; Lee, M-J.; Li, H.; Yang, C.S, (1997.). Absorpation, distrubution and elimination of tea polyphenols in rats, Drug Metab. Dispos 25, 1045-1050.
Chen,Y., Miles,A.m.and Grisham, M.B.(2000).Pathophysiology and reactive oxygen metabolites. Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology .ed .Ahmad. S. pp.62-95, CHAPMAN&HALL:An International Thomson Publishing Company.
Chowdhury A, Santra A, Bhattacharjee K, Ghatak S, Saha DR, Dhali GK (2006) Mitochondrialoxidative stress and permeability transition in isoniazid and rifampicin induced liver injury in mice. J Hepatol 45(1):117-126
Chowdhury A, Santra A, Bhattacharjee K, Ghatak S, Saha DR, Dhali GK (2006). Mitochondrialoxidative stress and permeability transition in isoniazid and rifampicin induced liver injury in mice. J Hepatol 45(1):117-126 .
Cody, V.; Mideleton, E.; Haeborne, J.B. (1986). Plant flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure Activity Relationships. ALAN, R. LISS, New York.
Compbell, L. (2006). Functional anatomy and blood supply. Anaesthesia and intensive care medicine 7:2 , 49-51.compounds: application to antioxidant characterization. Anal Biochem 257, 40– 44.
Cotelle, N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. Curr Top Med Chem. 1(6), 569-90.
Cyprus,T. and Pratico,D. (2006).Antioxidant and chronic vascular disease:In:Antioxidants cardiovascular disease.ed.Bourassa.M.G and Tardif.J.C. pp, 226-253.
Dahlin DC, Miwa GT, Lu AY, Nelson SD (1984) N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P450 mediated oxidation product of acetaminophen. Proc Natl Acad Sci USA 81(5): 1327–1331
Dai G, He L, Chou N, Wan YJ (2006) Acetaminophen metabolism does not contribute to gender difference in its hepatotoxicity in mouse. Toxicol Sci 92(1):33–41
Day, A. J.; Canada, F. J.; Diaz, J.C.; Kroon, P.A.; Mclauchlan, R.; Flauds, C.B.; Plumb, G.W.; Mor gan, M.R.A.; Williamson, G. (2000). Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. FEBS Lett. 468, 166-170.
Delattere, J.,Beaudeux,J.-L.,Bonnefort-Rousselot, D.(2005).Radicaux libers et stress oxidant.Aspect biologiques et pathologiques .Tec &Doc Lavoisier : Londres Paris –New York.

Delattre,J., Beaudeux,J.L., Bonnefont-Rousselot,D.,(2005). Radicaux libers et stress oxydant , Aspects biologiques et pathologiques .Edition TEC&DOC .pp.355-376.
Dhawan, B.N. (1995); A new hepatoprotective agent from an indian medicinal plant *Picorrhizia kuvroa*. Med. Chem. Res. 5(8), 595-605.
Dixit R, Boelsterli UA (2007) Healthy animals and animal models of human disease(s) in safety assessment of human pharmaceuticals, including therapeutic antibodies. Drug Discov Today 12 (7–8):336–342
Dixon-Shanies.D., Shaikh. N.,(1999). Oncol. Rep,6,1383-7.
Du, X.M., Kohinata, K., Kawasaki, T., Guo, Y.T., Miyahara, K., 1998. Components of the ether-insoluble resin glycoside-like fraction from *Cuscuta chinensis*. Phytochemistry 48, 843–850.
Durand,G.,Polidori,A.et Pucci,B.(2003).La vectorisation de pièges à radicaux libers : Nouvelle stratégie thérapeutique. Molécule et matériaux d'intérét médical.26-29.
Durgs, 63, N• Spècial 2,5-13.Abstract-rlated Articles.
Elliot Medleton, J. (1984). The flavonoids. Trends Pharmacol Sci 5, 335-338.
Ellman, G.L., (1959). Tissue sulfhydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics 82, 70–77 endocrinology that relate to the influence of dietary factors on the pathogenesis of prostate cancer. Eur Urol 35, 443–455.
Eyer F, Felgenhauer N, Gempel K, Steimer W, Gerbitz KD, Zilker T (2005) Acute valproate poisoning: pharmacokinetics, alteration in fatty acid metabolism, and changes during therapy. J Clin Psychopharmacol 25(4):376–380
Flower R.J.Vane J.R. (1972). «Inhibition of prostaglandin Synthetase in brain explain the anti-pyretic activity of paracétamol (4-acetamidophenol) ».Nature, 240,410-1.Abstract-related Articles.
Gandillet,A.(2004).Evaluation de la cinétique de régénération hépatique et de l'efficacité de transplantation d'hépatocytes dans différents modèles murins d'insuffisance hépatique .Th. Sciences du vivant. Strasbourg I.P17-33.
Geissman, T. (1955). In modern methods of plant nalysis. Vol III, K. Paech et V. Tracey P:133
Gerignon.J.,(1996).Histologie,Edition,MorvetingS.A,P.236-239.
Goldring CE, Kitteringham NR, Elsby R, Randle LE, Clement YN, Williams DP, McMahon M, Hayes JD, Itoh K, Yamamoto M, Park BK (2004) Activation of hepatic Nrf2 in vivo by acetaminophen in CD-1 mice. Hepatology 39(5):1267–1276
Granneman GR, Wang SI, Kesterson JW, Machinist JM (1984) The hepatotoxicity of valproic acid and its metabolites in rats. II. Intermediary and valproic acid metabolism. Hepatology 4(6):1153-1158
Grieve. M.,(1982). A moderm herbal,2ed ED.Dover Publications,New York, Vol. I, 188.
Griffith, O.W. (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. Free Redic – Biol. Med 27: 922 – 935
Guengerich,F.P.,Wu,Z.L.and Bartleson,C.J.(2005).Fonction of human cytochrome P450:Characterization of the orphans. Biochemical and Biophysical Research Communications 338; 465-469.
Halliwell, B., (1996). Oxidative stress. Nutrition and health. Experimental strategies for optimazation of nutritionnal antioxidante intake in humans. Free Radical Research 25, 57-74.
Halliwell, B.; Gutteridge, J.M**. (1986)**. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts. Arch. Biochem. Biophys. 246, 501-514.
Halliwell, S.; Guilteridge, J. M.C. (1986). Free radicals in biology and medicine 2nd edn, clarendon Press: Ox forod, 416- 494.
Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D, Cadenas E (2003a) Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. J Biol Chem 278(8):5557-5563
Han D, Canali R, Rettori D, Kaplowitz N (2003). Effect of glutathione depletion on sites and topology of superoxide and hydrogen peroxide production in mitochondria. Mol Pharmacol 64 (5):1136-1144.
Han D, Canali R, Rettori D, Kaplowitz N (2003b) Effect of glutathione depletion on sites and topology of superoxide and hydrogen peroxide production in mitochondria. Mol Pharmacol 64 (5):1136-1144
Han D, Hanawa N, Saberi B, Kaplowitz N (2006a) Hydrogen peroxide and redox modulation sensitize primary mouse hepatocytes to TNF-induced apoptosis. Free Radic Biol Med 41(4):627-639
Han D, Hanawa N, Saberi B, Kaplowitz N (2006b) Mechanisms of liver injury. III. Role of glutathione redox status in liver injury. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 291(1):G1-G7
Han D, Loukianoff S, McLaughlin L (2010). Oxidative stress indices: analytical aspects and significance. In: Sen CK, Packer L, Hanninen O (eds) Handbook of oxidants and antioxidants in exercise. Elsevier, New York, pp 43 3-484 .
Han D, Loukianoff, S., McLaughlin L (2000) Oxidative stress indices: analytical aspects and significance. In: Sen CK, Packer L, Hanninen O (eds) Handbook of oxidants and antioxidants in exercise. Elsevier, New York, pp 43 3-484

Han D,Shinohara, M., Yabnez, M.D., Saberi, B., Kaplowitz, N. (2010) Signal transduction pathawas involved in drug-induced liver injury; from Uetrecht, J;, (ed) Adverse drug reactions, handbook of experimental pharmacology, 196, Springer-Verlag Berlinheideberg 2010.
Hanawa N, Shinohara M, Saberi B, Gaarde WA, Han D, Kaplowitz N (2008) Role of JNK translocation to mitochondria leading to inhibition of mitochondria bioenergetics in acetaminophen induced liver injury. J Biol Chem 283(20):13565–13577
Hansen JM, Go YM, Jones DP (2006) .Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. Annu Rev Pharmacol Toxicol 46:215-234.
Hansen JM, Go YM, Jones DP (2006) Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. Annu Rev Pharmacol Toxicol 46:215–234
Harbone, J.B.; Baxter, H. (1999). The hand book of natural flavonoids , Willey , Chapman and Hall, London.
Harborne. J.B., (1988). The Flavonoids: Advances in Research Since 1980, ED.Chapman and Hall, London.
Helali .Ab,(1994).Pharmacologie Fondamentale et Chimique.Maison ,Alger.P29-32.
Hen, K.; Plumb, G.W.; Bennett, R.N.; Bao, Y. (2005). Antioxidant activities of extracts from five anti-viral medicinal plants. J. Ethnopharm. 96(1-2), 201-205.
Henderson NC, Pollock KJ, Frew J, Mackinnon AC, Flavell RA, Davis RJ, Sethi T, Simpson KJ (2007) Critical role of c-jun (NH2) terminal kinase in paracetamol- induced acute liver failure. Gut 56(7):982-990
Hinson JA, Reid AB, McCullough SS, James LP (2004) Acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of metabolic activation, reactive oxygen/nitrogen species, and mitochondrial permeability transition. Drug Metab Rev 36(3-1):805-822
Hirobe .C., Qiao. Z.S., Takeya. k. et al.,(1997). Phytochemistry. Vol 46, 521-524.
Horn,F.,Lindenmeier,G.,Grillhosl,C.,Moc,I.,Breghold,S.,Schnider,N.,Munster,
Ito Y, Abril ER, Bethea NW, McCuskey MK, McCuskey RS (2006). Dietary steatotic liver attenuates acetaminophen hepatotoxicity in mice. Microcirculation 13(1):19-27.
Ito Y, Abril ER, Bethea NW, McCuskey RS (2004). Role of nitric oxide in hepatic microvascular injury elicited by acetaminophen in mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 286 (1):G60-G67.
Itoh K, Tong KI, Yamamoto M (2004). Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. Free Radic Biol Med 36(10):1208–1213.
Jaeschke H, Knight TR, Bajt ML (2003) The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. Toxicol Lett 144(3):279–288
Jaeschke, H. (1990). Glutathione disul. de formation and oxidant stress during acetaminopheninduced hepatotoxicity in mice in vivo: the protective effect of allopurinol, J. Pharmacol. Exp.Ther. 255, 935–941.
Jallom.D.J.,(1973). Acètomophen en duced hèpatic necrosis J .Pharnocol.187.195.
James LP, Mayeux PR, Hinson JA (2003) Acetaminophen-induced hepatotoxicity. Drug Metab Dispos 31(12):1499–1506
Jarry.H., Spengler. B., Wuttke. W. et al.,(2006). Mat, 55S , S26-S36.
Jarry.H.et al., (1994). Exp.Clin. Endocrinol,102(6),448-54.
Jellin. J.M., Batz.F., Hitchens. K.,(2002). Naural medicines comprehensive database,3rd ED .Stockton,CA :Therapeutic Research Faculty.1530.
Jeyapaul, J. and Jaiswal, A.K. (2000). Nrf2 and c-Jun regulation of antioxidant response element (ARE)-mediated expression and induction of gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene, Biochem. Pharmacol. 59, 1433– 1439.
Johen et monil 2.,(2004). Toxicologie tradiction,la2^{eme} edition ellemande de par Rebert Perraud et Eduard Karale .P.74-75.
Jurd, L.; Horowitz, L.; (1962). Spectral properties of flavonoid compounds. In Gers sman, T. T., the chemistry of the flavonoids. Editeur Pergaman Press Oxford. P.107
Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M (2005) Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. Cell 120(5):649–661
Kaplowitz N (2005) Idiosyncratic drug hepatotoxicity. Nat Rev Drug Discov 4(6):489–499
Kaplowitz N, Shinohara M, Liu ZX, Han D (2008) How to protect against acetaminophen: don't ask for JUNK. Gastroenterology 135(4):1047-1051
Kehrer,J.L.(1993). Free radicals as mediateurs of tissue injury and Disease.Critical Reviews in Toxicology,23: 21-48.
Kekis.P and Kekis.B. (2006). Surgical anatomy of the liver .In : Liver and biliary tract surgery : Embryological anatomy to 3D- imaging and transplant innovation .ed .Karaliotas. C., Broelsch .C and Habib .N.pp 17-33. Springer wienNewYork.
Kitteringham, N.R., Powell, H., Clement, Y.N., Dodd, C.C., Tettey, J.N., Pirmohamed, M., Smith,D.A., McLellan, L.I. and Kevin Park, B. (2000). Hepatocellular response to chemical stress in

CD-1 mice: induction of early genes and gamma-glutamylcysteine synthetase, Hepatology 32,321–333.
Klatt P, Lamas S (2000) Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. Eur J Biochem 267(16):4928–4944
Kovalovich K, Li W, DeAngelis R, Greenbaum LE, Ciliberto G, Taub R (2001) Interleukin-6 protects against Fas-mediated death by establishing a critical level of anti-apoptotic hepatic proteins FLIP, Bcl-2, and Bcl-xL. J Biol Chem 276(28):26605-26613
Kritin, W. G ; Cai. J ; Thampson S.A; Diaz,D; Kavanagh, T.J; Jones, D.P. (1999). Glutathione redox potential in response to differentiation and enzym inducers. Free Radic. Biol. Med. 27, 1208-1218.
Kumar G., Sharmila Banu, G., Vanitha P. P., Sundararajan, M., Rajasekara P. M., (2004). Hepatoprotective activity of *Trianthema portulacastrum* L. against paracetamol and thioacetamide intoxication in albino rats. Journal of Ethnopharmacology, 92, 37–40.
Lairon,D.(2004). Biodisponibilité et effets biologiques des antioxidants de nature polyphenolique. Association mediterranéinne de phytothérapie et plantes médicinales. 1-7.
Le Chat.p.,Calvo.f.,Decriemou.P.,(1990).Pharmacologie Médical. Maison,Paris.P78-85.
Lee, S.H., Oe, T., Blair, I.A.,(2001). Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins. Science 292,208.
Lhninger,A.L.(1989).Principes de biochimie. Paris :Médecine-Sciences Flammarion.691-997.
Liebert, J. J, Matławskab, I,. Bylkab, W. Muriasa, M., (2005). Protective effect of *Aquilegia vulgaris* (L.) on APAP-induced oxidative stress in rats. Journal of Ethnopharmacology 97, 351–358
Liebert, J. J., Matławska, I., Bylka, W., Murias, M., (2005). Protective effect of *Aquilegia vulgaris* (L.) on APAP-induced oxidative stress in rats. Journal of Ethnopharmacology, 97, 351–358.
Liu ZX, Govindarajan S, Kaplowitz N (2004) Innate immune system plays a critical role in determining the progression and severity of acetaminophen hepatotoxicity. Gastroenterology 127(6):1760-1774
Liu ZX, Han D, Gunawan B, Kaplowitz N (2006) Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. Hepatology 43(6):1220-1230
Liu. J.et al., J. Agric., (2001).Food. Chem, 49(5),2472-9.
liver damage in mice. Journal of Ethnopharmacology, 120, 226–232.
Loguercio, C.; Alessandro, F.; (2003). Oxidative stress inviral and alcoholic hepatitis. Free radical and medicine, vol 34, n°1 pp 1-10.
Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry 193, 265–275.

Kevin P¦B., Neil R. Kitteringham, J.R. Kenny and M. Pirmohamed **(2001).** Drug metabolism and drug toxicity. *In ammopharmacology*, Vol. 9, No. 1,2, pp. 183–199
Lysandro, P.B.; Cristina, W.N.; Rodrigo, B.P.; Joao, B.T.R.; Gilson, Z. (2006). Acute liver damage indueced by 2-nitropropane in rats: Effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. Chemico-Biological interactions 160, 99-107.
Masubuchi Y, Suda C, Horie T (2005) Involvement of mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced liver injury in mice. J Hepatol 42(1):110-116
Meier.B .et al., (2000). Phytomedicine,7,373-81.
Merz.P.et al ., (1996). Exp.Clin. Endocrinol. Diabetes,104,447-53.
Middleton , E.J. (1996). In biological properties of plant flavonoids: an overview. Intel. Pharmcognosy
Milane,H.(2004).La quercétine et ses derives: molecules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libers ; études et applications thérapeutiques . UNIVRSITE LOUIS PASTEUR STRASBOURG I.pp.268.
Milewicz.A.et al., (1993). Arzneimittelforschung,43,752-6.
Millis, S.; Bone, K. (2000). Principles of practice of phytotherapy; Churchill Livingstome, pp 313-318.
Mills. S., Bone. K., (2000). Prenciples and Practice of Photothérapy :Modem Herbal Medicine, ED.Churchill Livingstone, London.
Mohandas, J., Marshall, J.J., Duggin, G.G., Horvath, J.S., Tiller, D.J., (1984). Low activities of glutathione-related enzymes as factors in the genesis of urinary bladder cancer. Cancer Research 44, 5086–5091.

Monchouwer,M.and Hoebe,K.H.N.(2003).Hepatic (dys-)function during inflammation .Toxicology.17;681-686
Moreau X.,Le Quay L., Granry J .-C.,Boishardy N .,Delhumeau A. (1993). «Pharmacocinètiques du Paracètamol dans le liquide ciphalorachidien de sujets agès».Thèrapie,48,393-6. Abstract-related Articles .
Myer P.,(1982) .Physiologie humaine. Maison,Paris, P115-117.
Nakamura, H; Nakamura, K; Yodoi. J. (1997). Redox regulation of cellular activation. Annu. Rev. Immunol. 15: 351-369
Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochemistry 95, 351–358.
Ohyama.K.et al ., (2003). Biol. Pharm. Bull,26,10-8.
Okuno, H.; Akahori, A.; Sato, H.; Xanthoudakis, S. (1993). Curran T and Iba H, Escape from redox regulation enhances the transforming activity of Fos. Oncogene 8, 695-701.
Oliveira, F.A., Chaves, M.H., Almeida, F.R.C., Lima Jr,R.C.P., Silva, R.M., et al., (2005) Protective effect of α and β amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. Journal of Ethnopharmacology 98 103–108
Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiodt FV, Larson A, Davern TJ, Han SH, McCashland TM, Shakil AO, Hay JE, Hynan L, Crippin JS, Blei AT, Samuel G, Reisch J, Lee WM (2002). Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. Ann Intern Med 137(12):947–954
Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiodt FV, Larson A, Davern TJ, Han SH, McCashland TM, Shakil AO, Hay JE, Hynan L, Crippin JS, Blei AT, Samuel G, Reisch J, Lee WM (2002). Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. Ann Intern Med 137(12):947–954
Osterloh J, Cunningham W, Dixon A, Combest D (1989) Biochemical relationships between Reye's and Reye's-like metabolic and toxicological syndromes. Med Toxicol Adverse Drug Exp 4(4):272–294
Palazzetti,S.(2005). Sport-Stress-Nutrition:Ce que doit savoir le biologiste.In :Cahier de formation, Biologie médicale : Sport et Biologie. ed. Bermon, S. Bioforma. Formation Continue des biologistes. 87-128.
Paraf A.,Rautureau.Jand.Tard.J.,(1995).Foie voies biliares.pancreas.Maison,Paris ,P31-36.
Pero RW, Roush GC, Markowitz MM, Miller DG (1990) .Oxidative stress, DNA repair, and cancer susceptibility. Cancer Detect Prev 14: 551–561.
Pietta ,P.G.(2000).Flavonoids as antioxidants.J.Nat.Prod.,63(7),1035-1042.
Pincemail,J.,Lecomte,J.,Collart,E.,Castiaux,J.P.and Defraigne,J.O.(2003).Stress oxydant, antioxydants et exercice physique.MEDECINE INTERNE.Vaisseaux, Cœur,Poumons.8.1-3.
Polonovski,M.,Boulanger,P.,Macheboeuf,M.,Roche,J.(1971).Biochimie médicale.Paris Masson et Cie,EDITEURS.439-463.
Prescott L.F. (2003).«Nouvelle perspectives avec le paracetamol».Drugs ,63, N˚Spécial 2,51-6.Abstract- related Articles.
Prostova, J.; chlopcikova S.; Grambal F.; Simanek U.; Lilrichorva, J. (2002). Influence of silymrin and its flavonoligans on doxorubicin *in vivo* on induced lipid peroxidation in rat heat microsomes and mitochondria, a comparison with quercetin .
Quezel, P.; Santa, S. (1963). Nouvelle flore de L'Algerie et des régions désertiques méridionales. U.2 P, 902, CNRS Paris.
Raynaud. J. et al., (2005). Prescription et conseil en phytothérapie, ED.TecetDoc,97-9.
Rice-Evans, **C.A; (2001).** Flavonoid antioxidants. Curr. Med chem. 8, 797-807.
Rumack BH, Peterson RC, Koch GG, Amara IA (1981) Acetaminophen overdose. 662 cases with evaluation of oral acetylcysteine treatment. Arch Intern Med 141(3 Spec No):380-385
Rumack BH, Peterson RC, Koch GG, Amara IA (1981) Acetaminophen overdose. 662 cases with evaluation of oral acetylcysteine treatment. Arch Intern Med 141(3 Spec No):380–385
Saberi B, Shinohara M, Ybanez MD, Hanawa N, Gaarde WA, Kaplowitz N, Han D (2008) Regulation of H(2) O(2)-induced necrosis by PKC and AMP-activated kinase signaling in primary cultured hepatocytes. Am J Physiol Cell Physiol 295(1):C50–C63

Sabir ,S.M., Rochab, J.B.T., (2008). Antioxidant and hepatoprotective activity of aqueous extract of *Solanum fastigiatum* (false "Jurubeba") against paracetamol-induced
SadasivanS. . Latha P.G, Sasikumar J.M., Rajashekaran S., Shyamal S., Shine, V.J. (2006). Hepatoprotective studies on *Hedyotis corymbosa* (L.) Lam. Journal of Ethnopharmacology 106, 245–249
Sanni, C.; Sauvin, H. (1952). Les couleurs des fleurs et des fruits, Anthocyannes et flavones.
Scott; L.N.D; (1998). A review of plant used in the trearment of liver disease. Part I Altern. Med. Rev. 3(6), 410-419.
Seen C.K. (1998). Redox signalling and the emerginy therapeutic potential of thiol antioxidants. Biochem pharmacol. 55, 1747 – 1758
Shang, **X**., Hea, X., Hea X., Li M., Zhanga, R. Fana, P. Zhanga, Q. Jia, Z. (2010). The genus Scutellaria an ethnopharmacological and phytochemical review. Journal of Ethnopharmacology 128, 279–313
Singh R, Czaja MJ (2007) .Regulation of hepatocyte apoptosis by oxidative stress. J Gastroenterol Hepatol 22(Suppl 1):S45–S48.
Skaper, S. D., Fabris, M., Ferrari, V., Dalle Carbonare, M., & Leon, A.(1997). Quercetin protects cutaneous tissue-associated cell types including sensory neurons from oxidative stress induced by glutathione depletion: cooperative effects of ascorbic acid. Free Radic Biol Med 22, 669– 678.
Soucek,P.(1999).Cytochrome P450 destrution by quinines: Comparaison of effects in rat and human liver microsomes.Chemico.Biolog.121;223-236.
Stadtman ER, Moskovitz J, Levine RL (2003) .Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences. Antioxid Redox Signal 5(5):577–582.
Stadtman ER, Moskovitz J, Levine RL (2003) Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences. Antioxid Redox Signal 5(5):577–582
Sudheesh, S., Sandhya, C., Sarah Koshy, A., & Vijayalakshmi, N. R.(1999). Antioxidant activity of flavonoids from Solanum melongena.Phytother Res 13, 393–396.
Sumioka I, Matsura T, Kai M, Yamada K (2004) Potential roles of hepatic heat shock protein 25 and 70i in protection of mice against acetaminophen-induced liver injury. Life Sci 74 (20):2551-2561
Tjolson A., Lund A.,Hole K. (1991). «Antinociceptive effect of paracetamol in rats is party dependent of spinal serotoninergic systems» .Eur J pharmacol,193-201 Abstract-related Articles.
Uetrecht J (2008) Idiosyncratic drug reactions: past, present, and future. Chem Res Toxicol 21 (1):84–92
Ulrich RG (2007). Idiosyncratic toxicity: a convergence of risk factors. Annu Rev Med 58:17–34
Upton. R. (2001). Chaste Tree Fruit, Vitex agnus-castus :Standards of Analysis, Quality Control and Therapeutics, ED.American Herbal Pharmacopoeia, Santa Cruz,CA.
Valko, M.; Rhodes, C. J., Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological interactions 160, 1-40.
Valko, M.; Rhodes, C. J., Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological interactions 160, 1-40.
Vladimirov Iu, A. (1998). Free radicals and antioxidants. (Russian). Vestn Ross Akad Med, 43– 51.
Warner T.D.,Mitchell J.A. (2004). «Cyclo oxygenase: new forms. new inhibitors , and lessons from the clinic ».Faseb J,18,780-804 Abstract related Articles.
Watkins PB (2005) Idiosyncratic liver injury: challenges and approaches. Toxicol Pathol 33 (1):1–5
Welch KD, Reilly TP, Bourdi M, Hays T, Pise-Masison CA, Radonovich MF, Brady JN, Dix DJ, Pohl LR (2006) Genomic identification of potential risk factors during acetaminophen-induced liver disease in susceptible and resistant strains of mice. Chem Res Toxicol 19(2):223–233
Williamson, G., Faulkner, K., & Plumb, G. W. (1998). Glucosinolates and phenolics as antioxidants from plant foods. Eur J Cancer Prev 7,17–21.
Williamson, G.; plumb, G. W.; Uda, Y.; price, K. R.; Rhodes, M. J. C. (1996). Dietary quercetin glycosides: antioxidant activity and induction of the anticarinogenic phase II marker enzyme quinine reductase in Hepal clc 7 cells. Carcinogenesis 17: 2385 – 2387
Wren, R.C. (1989). Potter's new cyclopedia of botanical drugs and preparations. Saffron Walden: Daniel

Wrigth,S.,Keele,C.A.and Neil,E.(1980).Physiologie appliqué a la medicine.Médecine-Sciences Flammarion.2éme éd.494-500.
Wuttke.W.,(1996). Forschende Komplementar Medizen,3,329-30.
Wuttke.W.et al., (2003). Phytomedicine, 10(4),348-57.
Yap LP, Chang AHK, Han D, Cadenas E (2008) Free radical biology, mitochondrial functions, and nitric oxide. In: Zierhut M, Cadenas E, Rao NA (eds) Free radicals in ophthalmic disorders. Informa Healthcare, New York
Yen, F.L., Wu, T.H. a, Lin, L.T., Lin, C.C., (2007). Hepatoprotective and antioxidant effects of *Cuscuta chinensis* against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. Journal of Ethnopharmacology 111, 123–128 .
Yina, J.; Wenberg,R.P;; Miller, M. **(1993).** Induction of hepatic bilirubin and drug metabolizing enzymes by individual herbs present in the traditional chinese medicin, yin z huan. Develop. Pharm.Therap. 20(3-4), 186-194.
Yina, J.; Wenberg,R.P;; Miller, M. (1993). Induction of hepatic bilirubin and drug metabolizing enzymes by individual herbs present in the traditional chinese medicin, yin z huan. Develop. Pharm.Therap. 20(3-4), 186-194.
Yoshino, M., & Murakami, K. (1998). Interaction of iron with polyphenolic
Yuan L., Chen,F., Ling, L., Dou, P., Bo, H., Zhong, M., Xia, L. (2008). Protective effects of total flavonoids of *Bidens pilosa* L. (TFB) on animal liver injury and liver fibrosis. Journal of Ethnopharmacology, 116, 539–546.
Yuan, H.D., Jin, G.Z., Piao, G.C. (2010). Hepatoprotective effects of an active part from *Artemisia* sacrorum Ledeb. Against acetaminophen-induced toxicity in mice, Journal of Ethnopharmacology, 127, 528–533

تاريخ المناقشة :

اللقب : بوالقندول

الاسم : رمزي

فرع بيولوجيا وفيزيولوجيا الحيوان

تخصص فيزيولوجيا أمراض الخلية

الدور الوقائي لبعض المستخلصات الفلافونيدية ضد الالتهاب الكبدي المحرض بالباراسيتامول لدى الجرذان

الملخص :

تتمتع نبيتة الـــ *Vitex agnus-castus* ذات الانتشار الواسع بالصحراء الجزائرية بخصائص صيدلانية عد' أهمها الدور المضاد للالتهاب ، وتهدف الدراسة الحالية إلى اختبار الفعل الوقائي الكبدي لهده النبتة لدى الجرذان المعاملة بالبراسيتامول و محاولة تحديد آليات هدا الفعل , يصاحب تعريض الجرذان إلى جرعة منفردة من البراسيتامول عبر الفم (750 mg /Kg) ارتفاع نشاط ناقلات الأمين المصلية وكدا معدلات كل من ALP و Biluribine وTG وكدا ارتفاع الأكسدة اللبيدية في صورة TBARS واختزال في نشاط النظام الجلوتاتيوني و المؤشرات المانعة للأكسدة. مكن التعاطي المسبق للمستخلص البيتانولي للـــ *Vitex agnus-castus* (3oo mg /Kg) لمدة 10 أيام الخلايا الكبدية من الاحتفاظ بنشاط ناقلات الأمين ALT و AST (84-87 %) وبنشاط كل من ALP و Biluribine وTG بـــ 64-66 % وبخفض الـــTBARS بـــ 81 % . كما أفاد التعاطي المسبق لهده النبتة بالاحتفاظ بالنظام الجلوتاتيوني GSH و GPx بما يكافيء 62-68 % وبتعديل نشاط الـــ GST بـــ 80 % ، وبصيانة نشاط كل من CAT و SOD بـــ 77-79 % .وقد دعم هدا العمل بالدراسة النسيجية التي أظهرت بأن الخلايا الكبدية تحتفظ بمعالمها ويختزل بها الارتشاح بالـــPN ويكاد يغيب بها النخر المركزي إثر المعاملة المسبقة بالـــــ *Vitex agnus-castus* ويبدو أن الفعل الواقي لهدا المستخلص يقارب كثيرا أثر الواقي المرجعي الـــNAC

الكلمات الدالة : *Vitex agnus-castus* ، acetaminophen (APAP)، Oxidative stress، Hepatotoxicity ، Hepatprotective ، GSH ، Anti oxidant ، ROS ، Hepatocyte .

المقررة : الدكتورة أمداح سعـــاد

جامعة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم علم الحيوان