الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة
دائرة بيولوجيا الحيوان

رقم التسلسل: 83/D3/2016
رقم الترتيب: 06/B10A/2016

أطروحة

قدمت لنيل شهادة دكتوراه العلوم

تخصص علم التسمم و الصيدلة

العنوان

دراسة الدور الوقائي لبعض المركبات النشطة بيولوجيا اتجاه الأثر السمي للمبيدات والهيدروكربونات على الجهاز العصبي والمناعي عند الجرذان

تاريخ المناقشة: 10 /07 /2016

تقديم: لقرون زهورة

أعضاء لجنة المناقشة

أستاذ التعليم العالي لعلاوي قريشي	رئيسا	جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
أستاذ التعليم العالي زعمة جميلة	مشرفة و مقررة	جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
أستاذ التعليم العالي خنوف الصديق	ممتحنا	جامعة فرحات عباس سطيف
أستاذ التعليم العالي عبد النور الشريف	ممتحنا	جامعة باجي مختار عنابة
أستاذ التعليم العالي مدني خضير	ممتحنا	جامعة عبد الرحمن ميرة بجاية
أستاذة محاضرة عمراني أمال	ممتحنة	جامعة الإخوة منتوري قسنطينة

السنة الجامعية :2016/2015

تشكر

أحمد الله سبحانه وتعالى وأشكره جزيل الشكر على أن أعانني ووفقني على إتمام هذا البحث

والصلاة والسلام على سيدنا محمد صلى الله عليه وسلم.

أتقدم بالشكر الجزيل لأستاذتي الفاضلة المشرفة على هذه الرسالة زعمة جميلة أستاذة بجامعة

قسنطينة 1 على توجيهاتها القيمة ونصائحها خلال فترة إنجاز البحث وتشجيعي على مواصلة العمل.

كما أتقدم بكل معاني الشكر والعرفان إلى الأساتذة الكرام:

الأستاذ لعلاوي قريشي أستاذ بجامعة قسنطينة 1 الذي تفضل بترأس لجنة المناقشة وإثراء الأطروحة

بنصائحه القيمة.

الأستاذ خنوف صديق أستاذ من جامعة فرحات عباس سطيف، الأستاذ عبد النور الشريف من جامعة

باجي مختار عنابة، الأستاذ مدني خضير من جامعة عبدالرحمان ميرة بجاية، الأستاذة عمراني أمال على

تقبلهم لمناقشة الأطروحة وإثرائها بخبرتهم و مكتسباتهم العلمية.

كما أشكر جزيل الشكر زوجي الأستاذ كبيش محمد

على مساعداته لإنجاز هذه الأطروحة.

قائمة المختصرات

ADN Acide désoxyribonucléique

ALT Alanine Transaminase (GPT/Glutamate Pyruvate Transminase)

AST Aspartate Transaminase (GOT/ Glutamate Oxaloacetate Transminase)

ATP Adénosine triphosphate

B(α) P α-benzepyrane

CABA Gamma-aminobytyric acid

CAT Catalase

CMR Cancérogéne , mutagéne, reprotoxigue

DPPH 2,2-diphynylpicrylhydrasyl

DTNB 5-5'-dithiobis2-nitrobenzoique

END Endosulfan

FNS Formule de numération sanguine

GABA L'acide Y-amino-butrigue

GB Globule blancs

GPX Glutathion Peroxidase

GR Globule rouge

GSH Glutathione

GSSG Glutathione disulfide

H_2O_2 Hydrogene Peroxide

HAPs Hdrocarbures Aromatique polcycliques

HCLO Hypochlorous acid

$HOO^{\cdot}$ Hydroperoxyl radical

LOOH Lipid hydroperoxide

MDA	Malondialdehyde
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide phosphate
Nap	Naphtalène
NBT	Nitro blur Tetrazolim
NO	Nitric oxide
NOS	NO Synthase
$O_2^{\cdot -}$	Superoxide anion radical
$OH^{\cdot}$	Hydroxyl Radical
$ONOO^{-}$	Proxynitrite
POPs	Polluants organiques persistants
Que	Quercétine
$RO^{\cdot}$	Alkoxyl radicale
$ROO^{\cdot}$	Peroxyl radical
ROOH	Organic peroxide (Organic Hydroperoxyde)
ROS	Reactive oxygen species
SOD	Superoxide dismutase
TBA	Thiobrbituric acid
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TCA	Trichloroacetic Acid
UI	Unit Internationale
VC	Vitamin C
VE	Vitamin E

الفهرس

المقدمة	01
الفصل الأول الجزء النظري	
I. المبيدات	03
1- عموميات	03
2- تقسيم المبيدات	03
2 -1-التقسيم البيولوجي	03
2-1-1- مبيدات الأعشاب الضارة (Les herbicides)	03
2-1-2 - مبيد ات الحشرات (Les insecticides)	03
2-1-3 - مبيدات الفطريات (Les fongicides)	03
2- 2 - التقسيم الكيميائي	04
2-2-1- المبيدات الكلوروعضوية (Les Organochlorés)	04
2-2-2 - المبيدات الفسفو عضوي	04
2-2-3- المبيدات الكاربماتية (les carbamales)	04
2-2-4- البيوتريويدات (les pyrethrinwides)	04
3- طريقة عمل أو تأثير المبيدات	05
4 - سمّية المبيدات	05
5 - Endosulfan	05
6- مستقبل الـ Endosulfan في الجسم	06
7- سمية END	07
II. الهيدروكاربونات العطرية متعددة الحلقات(HAPs)	08
1- طرق التعرض وامتصاص الهيدروكربونات المتعددة الحلقات	08
2 - تصنيف الهيدروكاربونات العطرية متعددة الحلقات	09
2-1 - التصنيف حسب معيار التسرطن	09
2-2- التصنيف حسب عدد الحلقات	09
2-3- التصنيف حسب سمية	09
3 - الخصائص الفيزيائية و الكيميائية	10
4 - توزيع الهيدروكربونات	11
5 - المناهج الأيضية للهيدروكربونات	11
6- الإطراح	11
7 - سمية الهيدروكاربونات العطرية متعددة الحلقات	11
8- النفثالين	12
9- التأثير السمي AHPs و المبيدات على الجهاز العصبي والجهاز المناعي	14

9-1-التأثير السمي على الجهاز العصبي	14
9-2- خلايا الجهاز العصبي	14
9- 3- أمراض الجهاز العصبي	14
9- 4- أمراض الجهاز المناعي	15
10- خلايا الجهاز المناعي	16
10-1- الخلايا النخاعية للجهاز المناعي	16
10-2- الخلايا اللمفاوية للجهاز المناعي	17
11- التأثير السمي للهيدروكربونات والمبيدات على الجهاز المناعي	18
III. الجهد التأكسدي	18
1 - الجذور الحرة الأكسجينية وأصلها	19
1-1 - الأصل الداخلي للجذور الحرة الأكسجينية	19
1-2- الأصل الخارجي للجذور الحرة الأكسجينية	22
2- أضرار الأنواع الأكسجينية التفاعلية	23
2-1- تأثير لـ ROS على الدهون	23
2-2- تأثير الأشكال الأكسجينية النشطة على ADN	24
3-2 – تأثير الأشكال الأكسجينية النشطة على البروتينات	26
3- نظام الدفاع ضد الإجهاد التأكسدي	27
3-1- نظام الدفاع ضد الإجهاد التأكسدي الداخلي والخارجي	27
3-1-1- مضادات الأكسدة داخلية	27
3-1-2- الأنظمة المضادة للأكسدة الخارجية	28
3-1-2-1- فيتامين E	29
3-1-2-2- فيتامين C	29
3-1-2-3- الكاروتينويدات	29
3-1-2-4- الفلافونويدات	29
3-1-2-4-1- البنية الكيميائية للفلافونويدات	30
3-1-2-4-2- تقسيم الفلافونويدات	30
3-1-2-5 -الكرسيتين (Quercétine)	32
3-1-2-6 تأثير الفلافونويدا ت على إنتاج ل ROS	33
4- السمية العصبية بواسطة الأكسدة التي تسببها الملوثات العضوية الدائمة	34
الفصل الثاني الوسائل والطرق المستعملة	
1- المواد المستعملة	36
1-1- المستخلص الفينولي لقشور البرتقال	36
1-2- الأندوسلفان و النفثالين	36
1-3- الكرسيتين والفيتامينات	36

1-4- حيوانات التجارب	36
1-4-1- سمية Nap و END علي الخلية العصبية لدي إناث الجرذان	36
1-4-2- دراسة الدور الوقائي للكرسيتين (Quercétine) إتجاه الأثر السمي للأندوسلفان على الخلية العصبية.	37
1-4-3- تقييم الأثر السمي للأندوسلفان والنفثالين على المعايير البيوكيميائية والمناعية للجهاز الدموي والدور الوقائي لكل من VE, VC, Quercétine والمستخلص الفينولي لقشور البرتقال	37
2- الطرق المستعملة	38
2-1- تشريح الحيوانات وأخذ عينات الأنسجة	38
2- 2- طريقة الحصول على السيتوزول	38
2-3- استخلاص الميتوكوندريات	39
2-4- استخلاص الحشوة الميتوكوندرية	39
2-5- تقدير العوامل المؤشرة للتوتر الأوكسيدي في سيتوزول و ميتوكندريات الخلايا العصبية	40
2-5-1- تقدير تركيز MDA	
2-5-2 تقدير الـ Glutathion	41
2-5-3- تقدير النشاط الإنزيمي للـ Catalase	42
2-5-4- تقدير نشاط أنزيم SOD	43
2-5-5 تقدير كمية البروتينات	44
2-5-6- تقدير نشاط Glutathion S–transférase	44
2-5-7- دراسة الانتفاخ المتوكوندري	45
2-6- أخد عينات الدم	45
2-6- 1- تقدير الخلايا المناعية وكريات الدم الحمراء والهيموغلوبين	45
2-6-2- تقدير المعايير البيوكيميائية	45
2-6-2-1 - تقدير تركيز الجلوكوز	46
2-6-2-2- تقدير تركيز اليوريا	46
2-6-2-3- تقدير تركيز الكرياتينين	47
2-6-2-4- تقديرتركيز الجليسيريدات الثلاثية	47
2-6-2-5- تقدير النشاط الانزيمي لكل من ALT (GPT) و AST (GOT)	47
3- الدراسة الاحصائية	48
الفصل الثالث النتائج والمناقشة	
1- تقييم الأثر السمي لمختلف المعاملات على التوتر التأكسدي في سيتوبلازم الخلية العصبية	49
1-1- تركيز MDA	49
1-2- تركيزي GSH والبروتينات السيتوزولية	50
1-3- نشاط إنزيم Catalase	51

4-1- نشاط أنزيمي SOD و Glutathion S-Transférase (GST)	52
المناقشة	54
2- دراسة الدور الوقائي للـ Quercétine اتجاه الأثر السمي للـ END في ميتوكوندريا الخلية	58
2-1- تقدير الأكسدة الفوقية للبيدات	58
2-2- تقدير البروتينات	58
2-3- تقدير نشاط الأنزيمات المضادة للأكسدة CAT, SOD	59
2-4- تقدير GSH	61
2-5- نتائج تقدير عملية الانتفاخ الميتوكوندري	61
المناقشة	63
3- تأثير الأندوسولفان (END) والنفثالين (NAP)، فيتامين Vit.C، فيتامين Vit.E الكرسيتن Quer ومستخلص قشور البرتقال (EXT) على الخلايا المناعية، كرات الدم الحمراء،الهيموغلوبين و المعايير البيوكيميائية	66
3-1- الخلايا المناعية	66
3-1-1- العدد الكلي لكريات الدم البيضاء	66
3-1-2- الكريات البيضاء أحادية النواة (monocyte) و اللمفويات	67
3-1-3- كريات الدم البيضاء الحبيبية (Granulocyte) و الحامضة	68
3-1-4- الخلايا القاعدية و الخلايا المتعادلة	70
3-2- كريات الدم الحمراء	72
3-3- الهيموغلوبين	72
3-4- المعايير البيوكميائية	73
3-4-1- تركيز الجلوكوز	73
3-4-2- تركيز الغليسيريدات الثلاثية	74
3-4-3- تركيز الكوليسترول	75
3-4-4- نشاط إنزيمي AST و ALT	76
3-4-5- تركيز اليوريا	77
3-4-6- تركيز الكرياتينين	78
المناقشة	80
الاستنتاج	87
الاستنتاج العام	90
المراجع	91
الملحق	

المقدمة

المقدمة

يشكل انتشار الأمراض الأيضية و الأمراض المرتبطة بها (أمراض الأوعية الدموية والقلب، مقاومة الجسم للأنسولين وأمراض الاضطرابات الهرمونية .....الخ) وكذلك الأمراض العصبية (أمراض التلف العصبي كالبركينسون والزهايمر) مشكلة صحية كبيرة علي الصحة العامة في المجتمعات. وبرغم أن هذه الأمراض تخضع عموما لدراسات إحصائية كبيرة تقدم سنويا تقارير هامة بهدف التحكم في تسيرها وعلاجها، لكن تبقي هذه الأمراض عموما غير مفهومة ومجهولة الأسباب بحيث أن عوامل الخطورة والعامل الوراثي غير كافية لتفسير زيادة ظهور مثل هذه الأمراض (Ibrahim *et al.*, 2011). كما أذي التطور السريع في الصناعات الكيميائية خلال القرن الماضي إلى إنتاج الآلاف من المواد الكيميائية المستعملة خاصة في المجال الزراعي، وكذلك في حماية الصحة العامة. تساهم هذه الجزيئات المصنعة بدرجة كبيرة في تحسين ظروف حياة الإنسان، غير أن الدراسات والأبحاث العلمية أكدت تأثيراتها المرضية، كما أنها تسبب السمية الحادة والمزمنة (Monaco *et al.*, 2002). هذا من جهة، ومن جهة أخري أدت النشاطات الزراعية في البلدان المتطورة إلى إنتاج ملوثات عديدة تنتشر في الأنظمة البيئية و كذلك في الكائنات الحية مما يؤدي إلي ظهور العديد من الأمراض المزمنة والمستعصية وكذلك الأوبئة الخطرة على الصحة العامة (chevalier, 2012). وفي هذا المجال لقد تم معاينة العديد من الجزيئات الملوثة لسلاسل الغذائية الخاصة بالكائنات الحية منها الملوثات العضوية الدائمة التي تتميز بالسمية الكبيرة وبقائها لمدة طويلة ومقاومتها لتحلل مما يتيح لها التراكم الإحيائي في العضوية ونذكر منها الهيدروكربونات الأروماتية متعددة الحلقات (HAPs) وبعض المبيدات (EPA,2009 ; UNEP, 2002,2009).

عموما يتم التعرض لمثل هذه المواد العضوية الدائمة في المخابر، المصانع، والمزارع مما يؤدي إلى ظهور أمراض مستعصية وأخري مزمنة وخطيرة. حيث سمحت العديد من الدراسات الوبائية بتوضيح العلاقة ما بين التعرض لبعض المواد العضوية الدائمة والأمراض العصبية والمناعية

(Gamet-Payrastre, 2008). وحسب المعطيات التجريبية والدراسات العلمية تبين بأن ألية السمية العصبية والمناعية تعتمد أساسا علي أثر الإجهاد ألتأكسدي الذي يعرف بالحالة الناتجة عن عدم التوازن بين prooxydants/ antioxydants ونتيجة ذلك تظهر تأثيرات غالبا ما تكون عكسية التأثير على خلايا الجسم، تترجم هذه التغيرات الخلوية المرتبطة بالجهد المؤكسد بمختلف التحولات الكيميائية الداخل خلوية مثل: أكسدة الحمض النووي ADN والبروتينات وكذلك اختلال توازن الكالسيوم بين الخلايا إضافة إلى تفاعل ما فوق الأكسدة اللبيدية (Bonnefont-Rousselot, 1997).

يعتبر الجهاز العصبي من أكثر الأعضاء عرضة لتأثير السمي للملوثات العضوية الدائمة وهذا بسبب غناه بالأحماض الذهنية الغير مشبعة، وباعتبار قابلية ذوبان الملوثات العضوية في الأوساط الذهنية واختراقها للطبقة الفوسفوليبيدية المشكلة لأغشية الخلايا فإن هذا يجعل من الجهاز العصبي وسط مناسب لتفاعل الأشكال النشطة للأكسجين الناتجة من التفاعلات الأيضية للملوثات العضوية الدائمة هذا من جهة، ومن جهة ثانية يعتبر المخ من أكثر الأعضاء إنتاجا للجذور الحرة، وهذا راجع لاستهلاكه لكمية كبيرة من الأكسجين المستعمل من طرف العضوية وبالتالي إنتاجه لكمية كبيرة من الأشكال النشطة الأكسجينية، بالإضافة إلى ذلك يحتوي المخ على كمية قليلة من مضادات الأكسدة الأنزيمية مقارنة بالكبد والكلي مما يجعله أكثر عرضة للإجهاد التأكسدي (Menon *et al*., 2012 ; Guest and grant, 2012 ; Halliwell, 1992). كما يتعرض الجهاز المناعي لسمية الملوثات العضوية الدائمة وهذا بسبب قدرة اختراق هذه المواد للطبقة الفوسفوليبيدية لأغشية أنسجة الأعضاء و الخلايا المناعية (Guest and Grant, 2012).

كما أظهرت العديد من الدراسات الدور الوقائي الذي تلعبه مجموعة من المواد وهذا باعتبارها كمضادات للأكسدة وبالتالي تقي الجسم من الأمراض الخطرة وتقلل من سمية الملوثات العضوية كبعض المبيدات والهيدروكربونات ، من بين هذه المواد: الفلافونويدات كالكرسيتين ومجموعة من الفيتامينات كفيتامين E وA،C..... الخ (Menon *et al*., 2012). إن الهدف من هذه الدراسة هو تقييم سمية الأندوسلفان والنفثالين علي الجهاز العصبي من خلال تقييم وضع الأكسدة والاختزال في سيتوبلازما الخلية العصبية تحت التأثير السمي للأندوسلفان والنفثالين، ومن خلال تقييم وضع الأكسدة والاختزال في حشوة الميتوكوندريات تحت التأثير السمي للأندوسلفان والوقائي للكرسيتين.

كما تهدف هذه الدراسة أيضا إلى تقييم الأثر السمي للأندوسلفان والنفثالين على الجهاز الدموي، المناعي والمعايير البيوكميائية، والدور الوقائي لكل من الكرسيتين والمستخلص الفينولي لقشور البرتقال و Vitamine E و Vitamine C.

الفصل الأول

الجزء النظري

I - المبيدات

1- عموميات

تعتبر المبيدات عبارة عن مستحضرات تحتوى على مادة أو العديد من المواد موجهة أساسا لحماية النباتات والمحاصيل الزراعية ضد الكائنات الضارة لها أو الحفاظ عليها وعموما تستعمل المبيدات بكثرة في المجال الزراعي و في صيانة الحدائق ووسائل النقل (Domange, 2005)، كذلك تستعمل لحماية المواد المخزنة من الطفيليات ومكافحة الكائنات الناقلة للأمراض كما تستعمل للقضاء على الأعشاب الضارة وهي تسمي بالمواد الحامية للنبات , Agrawal and Sharma, 2010 ; Bourbia (2013).

2- تقسيم المبيدات

تتميز المبيدات المتوفرة الآن في السوق بتعدد بنيانها الكيميائية ومجاميعها الوظيفية المختلف وكذلك نشاطها البيولوجي مما عقد تقسيمها وعموما يمكن تقسيم المبيدات على أساس بطبيعتها الكيميائية أو طبيعة نوع الكائنات الضارة الموجهة ضدها (LNE, 2008).

2 -1- التقسيم حسب الكائنات المستهدفة

يعتمد هذا التقسيم على الكائنات المراد إ زالتها أو حماية النباتات منها:

2-1-1- مبيدات الأعشاب الضارة (Les herbicides)

تعتبر مبيدات الأعشاب الاكثر استعمالا في كل المجلات الزراعية (Edelahi, 2004) بحيث تزيل كل الأعشاب الضارة و الغير مرغوب فيها في المساحات الزراعية أو المهيأة للزراعة وكذلك في حماية المساحات الخضراء (Balloy *et al.*, 2004 ; El mrabet *el al.*, 2008).

2-1-2 - مبيد ات الحشرات (Les insecticides)

تقوم بتخليص المساحات الزراعية من الحشرات والعث (Balloy *et al.*, 2004) كما تمنع فقس بيوض الحشرات والنمو الطبيعي لليرقات، تفيد في منع النضج الجنسي لها (منع نضج الأعضاء الجنسية) (El mrabet *et al.*, 2008 ; Pennetier, 2008 ; Gerhard, 1993).

2-1-3- مبيدات الفطريات (Les fongicides)

تعمل على محاربة تكاثر ونمو الفطريات الممرضة في المزارع والمحاصيل الزراعية التي تسبب خسارة كبيرة للفلاحين (Rocher, 2004 ; Murray, 2008).

2- 2- التقسيم الكيميائي

يعتمد هذا التقسيم على الطبيعة الكيميائية والمادة الفعالة الغالبة في المبيد منها:

2-2-1- المبيدات الكلوروعضوية (Les Organochlorés)

وهي عبارة عن مبيدات محضرة بإضافة الكلور إلى الهيدروكاربونات العطرية مثل:DDT (dichloro- diphénil- trichloréthane)، تعتبر هذه المبيدات ملوثات عضوية ثابتة أو دائمة بسبب مقاومتها لعوامل الهدم البيولوجي الكيميائي حيث يمكن أن تبقى شهور أو عدة سنين ولهذا السبب يتم منع تصنيعها واستعمالها من طرف المنظمة العالمية للصحة منذ 1972 ومن طرف اتفاقية ستوكهولم عام 2001 و2003 (Bouchon and Lemoine, 2003 ; El bakouri , 2006).

2-2-2- المبيدات الفسفو عضوية (Les organophosphorés)

هي عبارة عن أسترات ناتجة من تفاعل الكحول مع الحمض الفسفوري أو حمض الكبريت الفسفوري مثل Dimetox، Parathion، Maltion ، وتعتبر هذه المبيدات العضوية المفسفرة أقل ثبات وديمومة مما يعطيها أفضلية في الاستعمال مقارنة بالمبيدات الكلوروعضوية. عموما لهذه المبيدات فعالية كبيرة في تثبيط غير رجعي لأنزيم Acétylcholinestérasعلى مستوى النهايات العصبية مما ينتج سمية عصبية كبيرة (EPA, 2004).

2-2-3- المبيدات الكاربماتية (les carbamales)

عبارة عن مواد مثبطة لإنزيم الأسيتيل كولين إستراز بصفة رجعية، وهي مشتقة من حمض الكاربونيك حيث تتغير مدة ثباتها من عدة الساعات إلى عدة سنوات على مستوى المياه الجوفية، منها méthonyl , carbafuran , crabaryl، بالإضافة إلى ذلك هنالك كاربامات كبريتية تستعمل خاصة في إبادة الفطريات مثل ثنائي كبريت الكاربامات (Bouchon and Lemoine, 2003).

2-2-4- البيوتريويدات (les pyrethrinwides)

عبارة عن أسترات مشتقة من نواة السيكلوبروبات تتميز بالتغير الكيميائي مما يعطيها القدرة على التحلل الحيوي وبالتالي قلة سميتها بالنسبة للكائنات الحية وخاصة الفقريات الراقية، كما تتميز هذه المبيدات بالخاصية الانتقائية للحشرات مما يجعلها محدودة السمية للثدييات عكس سميتها العالية تجاه البكتيريا والأسماك منها (perméthrine, cyperméthrin) (Bouchon and Lemoine, 2003).

3- طريقة عمل أو تأثير المبيدات

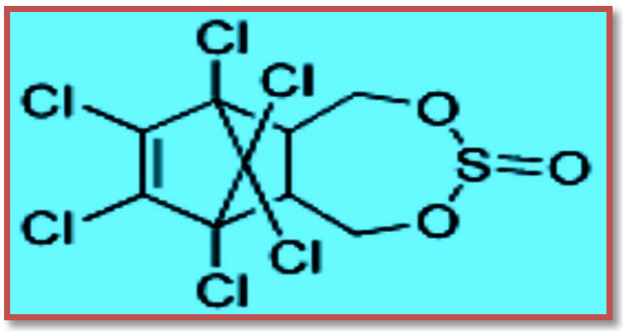
تكون الآليات الأيضية المستهدفة من طرف مبيدات الفطريات مرتبطة بالطبيعة الكيميائية للمبيد المستعمل، حيث بإمكانها منع حدوث البناء الضوئي، الانقسام الخلوي أو تثبيط البناء الحيوي للأحماض الأمينية، البروتينات الدهون والسيليلوز، بينما تعمل مبيدات الحشرات على إحداث سمية عصبية أ و فعل معطل لعملية التنفس من خلال إحداث اضطراب في السلسلة التنفسية الميتوكوندرية، في حين تهاجم مبيدات الفطريات البويغات الفطرية مما يعطل عملية الانقسام الخلوي للفطريات سواء بفعل مباشر على العضوية بإحداث اضطراب على مستوى الأيض العام (التنفسي، البناء الحيوي للأحماض الأمينية، بناء البروتينات، البناء الحيوي للأحماض النووية، ...) أو على مستوى العمل الفيزيولوجي مثل عملية التكاثر أو بطريقة غير مباشرة بعد هدم المبيد وإنتاج مواد مسممة للخلايا (LNE, 2008).

4- سمّية المبيدات

أدي الاستعمال الواسع للمبيدات المختلفة إلى وجود بقايا من هذه المواد في مختلف الأنظمة البيئية من ماء وهواء وتربة وكذلك في المواد الغذائية مما يشكل خطرا كبيرا على الصحة العامة نتيجة تعرض الأفراد لهذه السموم سواء أثناء استعمالها في شروط غير سليمة أو تناولها بطريقة غير مباشرة من خلال الماء والهواء أو الأغذية مما يسبب تسمم حاد أو أمراض مزمنة لهؤلاء، ومما زاد في خطر سمية هذه المبيدات هو التراكم الحيوي داخل العضوية خاصة عندما تكون ذات طبيعة غير محبة للماء ومحبة لدهون لتظهر آثارها السامة بعد مدة زمنية (LNE, 2008). حسب العديد من الدراسات حول آثار سمية هذه المبيدات على الأشخاص، اتضح بأن بقايا هذه المبيدات بإمكانها إحداث سمية خطيرة على العضوية مثل اضطرابات هرمونية، اضطرابات عصبية وأمراض مستعصية مثل السرطان والسكري والزهايمر والباركنسون (Lasram *et al.*, 2014 ; Rekha,2005).هذا من جهة ومن جهة أخرى بينت بحوث الكثير من الباحثين في مجال التنمية البيئية بأن الإنسان يفقد الكثير من قدرته المناعية عند تعرضه لهذه المبيدات بالإضافة إلى اضطراب في نمو الجنين وتعرض هذا الأخير لعيوب خلقية تؤدي إلى وجود عاهات دائمة بعد الولادة ، كما أنها مواد مطفرة ومتسرطنة وسامة للجهاز العصبي ; LNE, 2008 (Fattach, 2010 ; Lee *et al.*, 2013 ; Deb and Das , 2013).

Endosulfan -5

هو عبارة عن هيدروكاربون حلقي ينتمي إلى العائلة الكيميائية للمبيدات العضوية المكلورة تحتوي على رابطة ثنائية (Gouzy and Brignon, 2006) الشكل (1).



الشكل (1): البنية الكيميائية Endosulfan

(Gouzy and Brignon., 2006)

يستعمل هذاا لمبيد لإبادة الحشرات والعث، وضع في السوق في منتصف الخمسينيات من القرن الماضي وما زال استعماله إلى يومنا هذا في كثير من البلدان (Dhananjayan, 2012 ; Stockholm, 2007)

تحتوي البنية الكيميائية للـ Endosulfan على مشابهين اثنين: المشابه α والمشابه β الجدول (1)، صيغته العامة $C_3H_6CL_6O_3S$ ووزنه الجزيئي يساوي 406.95 غ/مول (Brignom, 2006) الكتلة الحجمية 1.745 غ/سم3، كثافة الغاز 14.1يتواجد الـ END على شكل بلورات بنية ثابتة في الضوء وقليلة التطاير في الهواء وقليل الذوبان في الماء (Tomlin, 1994 ; Muir *et al*, 2004). أقل ألفة للدهون مقارنة بالمبيدات العضوية المكلورة الأخرى مما يعيق نوعا ما تراكمه في السلاسل الغذائية الأرضية الملوثة به، نصف حياة الـ END تتعدى 120 يوما (Agritox, 2007). سهل الامتصاص على مستوى الأنبوب الهضمي وتوزيعه نحو الكبد والكليتين و الأنسجة (Agritox, 2007 ; Lauwerys and Hoet, 2001).

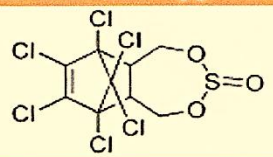
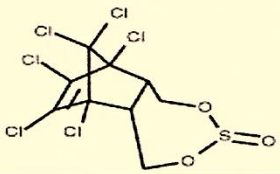
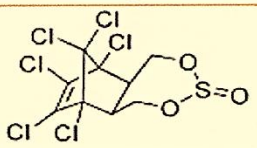
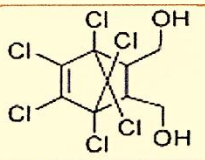
يعمل هذا المبيد كمادة سامة باللمس أو البلع عند العديد من الحشرات والعث بحيث له فعل مثبط لعمل مستقبلات الوسيط العصبي Gamma amino butyric acid (GABA) للجهاز العصبي المركزي (Brigon, 2006 ; Silva *et al*., 2010 ; Kovalkovicova *et al*., 2013).

6- مستقبل Endosulfan في الجسم

يدخل الأندوسلفان (END) جسم الكائن الحي (الإنسان، الحيوان) من خلال طرق التعرض (الاستنشاق، عن طريق الفم، الجلد) امتصاصه بطئ جدا وغير كامل حوالي 40 إلى 60 بالمائة من END في 48 ساعة، يمتص عن طريق الجهاز الهضمي، ويصبح الامتصاص في وجود الكحول والزيوت و المستحلبات أسرع ، يوزع نحو الكبد و الكلى وبكميات أقل نحو الأنسجة الأخرى

(Dalsenter *et al.*, 1999 ; Ullah *et al.*, 2014). كل تفاعلات الارتباط تتم بتدخل إنزيمات CYP45، END α بواسطة CYP2B6 , CYP 3A و ENDB بواسطة CYP3A4، CYPA5. كما يتم التخلص من نواتج أيضه وأيضا المتبقي منه عن طريق البول (10 – 47 %) أو عن طريق البراز (15-22 بالمائة) بعد عدة أيام أو أسبوع من دخوله الجسم (Dalsenter *et al* ., 1999) .

جدول (1) : أنواع الأندوسلفان ومشابهاته ((Brignom, 2006)

Substance chimique	Synonyme	Formule développée
Endosulfan $C_9H_6Cl_6O_3S$	Endosulfan Thiodan Rasayansulfan Thiosulfan	
α-endosulfan $C_9H_6Cl_6O_3S$	Endosulfan I Endosulfan α	
β-endosulfan $C_9H_6Cl_6O_3S$	Endosulfan II Endosulfan β	
Endosulfan alcohol $C_9H_6Cl_6O_2$	-	

7- سمية END

الجرعات الحادة لأندوسلفان ذات سمية شديدة عن طريق الفم والإستنشاق، كما أنه شديد السمية للأرانب عند المعاملة عن طريق الجلد، و يسبب تهيج معتدل في العيون كما توجد حساسية للأندوسلفان عن طريق الجلد في خنازير غينيا، أما لدي الجرذان وجد أن الإناث أكثر حساسية بكثير من الذكور لتأثير الجرعة الحادة المعاملة عن طريق الفم والجلد، وحسب دراسات أخرى طويلة الأجل هذه الحساسية تزداد في الإناث (Dalsenter *et al.*, 1999). يعتبر الأندوسلفان مادة كيميائية شديدة السمية لجميع الأنظمة الحية إذ يسبب خلل في نظام الغدد الصماء في الأنواع البرية والمائية، يسبب السمية العصبية، الكلوية، الدموية والمناعية والجنينية، كما يمكن أن يؤدي التسمم الحاد بهذا المبيد إلى مظاهر عصبية مثل التهيج، الأرق، تشنج العضلات، انعدام التنسيق أو حتى فقدان القدرة على الوقوف، كما يسبب علامات أخرى من التسمم كالإسهال، القيء، فقدان الوعي في الحيوانات

(Extonext,1993 ; Petit *et al* ., 1997 ; OMS,2004 ; Silva *et al.*, 2010).

II- الهيدروكاربونات العطرية متعددة الحلقات (HAPs)

عبارة عن عائلة من المركبات العضوية المتواجدة في البيئة تحتوي على اثنين أو أكثر من حلقات البنزين مندمجة مع بعضها البعض عن طريقة رابطة كربون – كربون مشتركة أكثرها بساطة تحتوي على حلقتين وهو naphtalène (C_{10} H_8) (Adene, 2004).تتشكل الهيدروكاربونات الأروماتية متعددة الحلقات أثناء الانحلال الحراري أو الاحتراق الغير الكامل للمواد العضوية مثل حرق المخلفات الزراعية، حرق الخشب والفحم، حرق القمامة، موجودة في دخان السجائر، دخان البراكين، الغازات المنبعثة من محركات وسائل النقل والمدفئات المنزلية. (Adene, 2004 ; Wessel, 2010). تتكون HAPS أيضا أثناء طبخ وكرملة المواد الغذائية على درجات حرارة مرتفعة لفترات طويلة (Nikolaou *et al.*, 1984 ; Ruzzin, 2012 ; Tokiwa *et al.*, 1994).

1- طرق التعرض وامتصاص الهيدروكاربونات العضوية متعددة الحلقات (HAPs)

تعتبر لـ HAPS شديدة الذوبان في الدهون، تمتص بأعضاء مختلفة، بواسطة الجلد والأمعاء والرئتين يعتبر (Reichl *et al.*, 2004). الجهاز التنفسي طريق شائع لامتصاص الهيدروكاربونات، ويتم الامتصاص عن طريق الرئة بدلالة حجم تراكيبها الجزيئية، حيث تطرد الجزيئات الكبيرة بواسطة الأهداب والمخاط، أما الجزيئات الصغيرة جدا فتترسب في البرانشيم الرئوي أين يتم حدوث الأيض. (Moody, 1995 ; Bonnard, 2005). كما يعتبر الجهاز الهضمي وسيلة هامة لدخول الـ HAPS إلى الجسم عن طريق المواد الغذائية الملوثة كالمواد الغذائية المدخنة مثل اللحوم والأسماك (Boffeta *et al.*, 1997 ; Wornat *et al.*, 20015)، كما يتم امتصاص لـ HAPS على مستوى الأمعاء ويكون سهلا بواسطة الأغذية الغنية بالدهون (Tarantini, 2009)، أظهرت الدراسات على الفئران أن 30 إلى 50% من الجرعات الضعيفة تمتص بسرعة على مستوى الأمعاء وجزء كبير يحدث له الأيض على مستوى الكبد. (Reichl *et al.*, 2004). يعتبر الجلد أحد أكثر الأجزاء تعرضا للمواد الكيميائية، أظهرت الدراسات المخبرية (invitro) عند الإنسان أنه بعد 24 ساعة من التعرض للـ Benzo [a] pyrène بـ (10mg/kg) يكون الامتصاص حوالي 3% (Cooke *et al.*, 2003).

تعتبر الأوساط المهنية كمصانع الخشب والفحم مصدرا خطيرا لتعرض العمال للهيدروكاربونات حيث يمكن للجلد أن يمتص 50 % من الهيدروكربونات المنتشرة.

(Vanrooy *et al.*, 1993 ; Bocard, 2006 ; Boffeta *et al.*, 1997 ; Tebbens *et al.*,1966)

2 - تصنيف الهيدروكاربونات العطرية متعددة الحلقات (HAPs)

2-1- التصنيف حسب معيار التسرطن

تم تصنف لـ HAPS من طرف مركز بحث السرطان (CIRC) وأيضا من قبل الإتحاد الأوروبي (UE) اللذان يركزان على عامل التسرطن، إذ يؤخذ هذا التصنيف بعين الاعتبار في الأوساط المهنية في فرنسا.)، يعتمد هذا التصنيف على النتائج المتحصل عليها من الدراسات العلمية سواء كانت على الحيوان أو مخبرية (Garrtner and Theriau, 2002). تضم هذه العائلة الكيميائية مئات المركبات الأروماتية بحيث صنف 16 مركب أروماتي صنف من قبل وكالة حماية البيئة للولايات المتحدة (USEPA) كمركبات تسبب آثار مرضية على صحة الإنسان وخاصة Benzo (a) pyrène يعتبر هذا الأخير كعامل مسبب للطفرة على مستوى ADN الأكثر احتمالا لأصل السرطان.

(Martin *et al*., 2003 ; Tarantini, 2009). صنفت كذلك كمواد مسرطنة من قبل المركز الدولي لأبحاث السرطان ومن قبل الأمم المتحدة وهي تتواجد في البيئة على شكل خليط مكون من عدة مواد حسب مصد ر الانبعاث (Straif *et al*., 2005 ; Olanow, 1993).

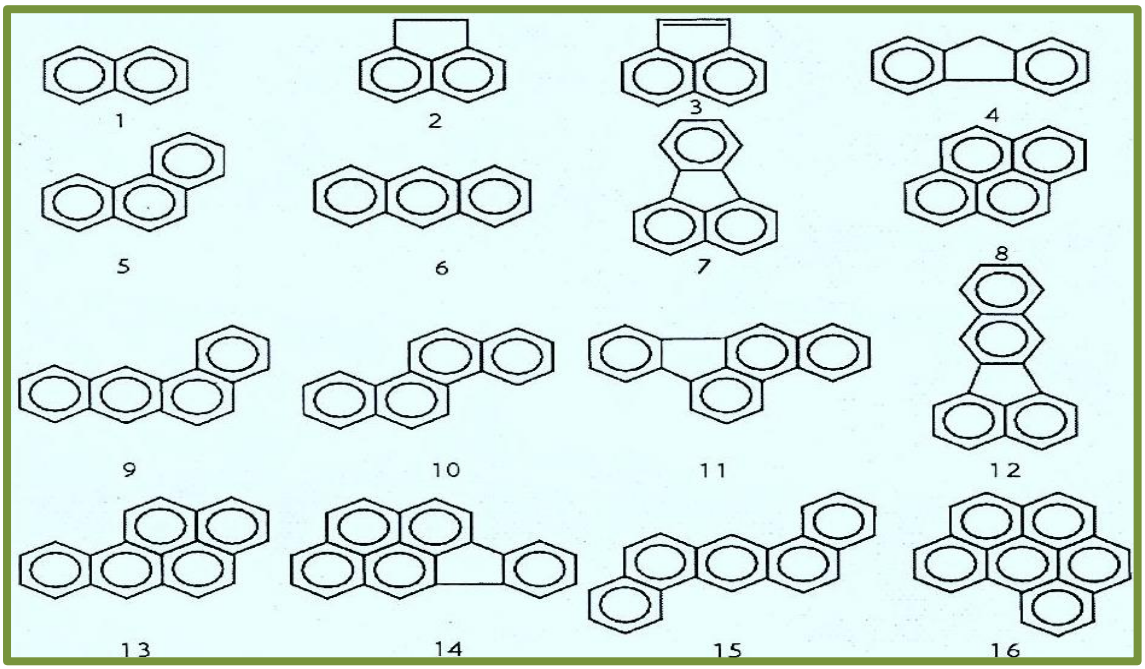
2-2- التصنيف حسب عدد الحلقات

تصنف حسب عدد الحلقات إلى HAPS خفيفة وتضم من 2 إلى 3 حلقات بنزين وHAPS ثقيلة تضم أكثر من 3 حلقات بنزينية الشكل(2) (USEPA,1984).

2-3- التصنيف حسب سمية HAPS

تعتبر HAPS حسب تصنيف الوكالة الأمريكية لحماية البيئة (USEPA, 1993) من الملوثات ذات الأولوية التي تتميز بخصائصها السامة والمختلفة عن بعضها البعض، وهي عبارة عن جزيئات بيولوجية نشطة بمجرد امتصاصها من طرف العضوية، نتيجة تفاعلات إنزيمية تؤدي إلى تشكل مواد époxyde أو مشتقاتها، قد تكون نواتج الأيض ذات أثر سمي على الجزيئات البيولوجية الأساسية مثل البروتينات والأحماض النووية ADN وARN والفوسفوليبيدات، هذا الأثر السمي أكبر من تأثير الجزيئات الأصلية وبالتالي تؤدي إلى تحفيز الاختلالات الوظيفية الخلوي (Pitts *et al*., 1978).

الشكل(2) يوضح البنية الكيميائية للهيدروكربونات الأكثر سمية حسب تصنيف الوكالة الأمريكية لحماية البيئة.



الشكل (2):البنية الكيميائية للمركبات الأروماتية متعددة الحلقات (HAPs)الأكثر سمية حسب تصنيف الوكالة الأمريكية لحماية البيئة (USEPA,1993)

(1) Naphtalène (2) Acénaphtalène , (3) Acénaphthylène, (4) Fluorène (5) phénanthrène, (6) Anthracène, (7) Fluoranthène, (8) pyrène , (9)Benzo(a) anthracène, (10) , Chrysène, (11) Benzo(b) fluoranthène, (12) ,Beno(k) fluoranthène , (13) Benzo(a) pyrène , (14) Indénol (1,2,3- cd) pyrène, (15)Dibenzo (a,h) anthracène , (16) Benzo(g,h,i) pérylène

3 - الخصائص الفيزيائية و الكيميائية لـ (AHPS)

تعتبر الهيدروكاربونات العطرية متعددة الحلقات نصف متطايرة، ضعيفة الذوبان في الماء بالنسبة للهيدروكاربونات الخفيفة وضعيفة جدا بالنسبة للهيدروكاربونات الثقيلة. (1ug/L à 1 mg/L) إذ تقل كلما زاد الوزن الجزيئي (Lumière *et al.*, 2001) .تتميز الهيدروكاربونات متعددة الحلقات بخواص كارهة للماء (hydrophobes) وتذوب في الدهون، كما أنها قابلة للذوبان في العديد من المذيبات العضوية، تتركز في الرسوبيات والتربة وفي الماء. وأيضا في النباتات، يزيد ثبات الهيدروكاربونات الحلقية العطرية كلما زاد عدد الحلقات الجزيئية (Bliefert and Perrand, 2003).

يعتبر البنزين القاعدة الرئيسية التي تشكل HAPS حيث يتكون من نواة تتكون من 6 ذرات كربون مرتبطة مع بعضها البعض بروابط مزدوجة وذرة هيدروجين ($C_6 H_6$)، تحتوي من 2 إلى 6 حلقات بنزينية (Doonaert and Pichard, 2003 ; SCF, 2002) .

4 - توزيع الهيدروكربونات

أظهرت الدراسات على الحيوان أن الهيدروكربونات متعددة الحلقات (HAPs) تنتقل بسرعة باتجاه باقي الأعضاء عن طريق الدم والأوعية اللمفاوية وذلك من خلال خاصيتها المحبة للدهون التي تمكنها من اختراق الأغشية البلازمية حيث ترتبط عموما مع الجزيئات الكارهة للماء التي تساهم في توزيعها داخل الخلايا و قد تم كشف عنها في جميع الأعضاء قريبا.

(Garrtner and Theriaul, 2002 ; Trantini, 2009 ; Maric, 2007 ; Sheu *et al*., 1997)

5 - المناهج الأيضية لـ HAPS

توجد ثلاث طرق رئيسية لأيض الهيدروكربونات متعددة الحلقات. المسار الأكثر أهمية يضم عائلة السيتوكرومات (Cytochrome P450) الذي يحفز الأكسجة الأحادية للهيدروكربونات متعدد الحلقات إلى (époxyde) أما المرحلة الثانية فتعمل على تشكيل جدر كاتيوني متبوعا بأكسدة إلكترون الهيدروكربونات متعددة الحلقات محفزا بواسطة (cyp450 péroxydase)، وفي المرحلة الأخيرة يتم تشكيل (O-quinone) انطلاقا من (cathéchol) محفزا ب (Dihydrodioldéhydrogénase)، كما يمكن أن تنشط بواسطة (lipoxygénase).

(Miller and Romos, 2001 ; Xue and Warshawshy, 2005 ; Yang, 1988)

6- الإطراح

يتم طرح نواتج أيض الهيدروكربونات متعددة الحلقات (HAPS) يتم غالبا عن طريق البراز والبول (Tarantini, 2009)، كما وجد أن جزء من البنزين يمكن طرحه في هواء الزفير أما الجزء الأكبر الذي يحدث له الأيض فيتم في البول (Negraia , 2010).

7 - سمية الهيدروكاربونات العطرية متعددة الحلقات

هناك نقص في معرفة الأثار السامة HAPS ومع ذلك فقد أظهرت البيانات التجريبية المتاحة على الحيوانات أن بعضها يمكن أن يحفز على وجه التحديد العديد من الآثار المرضية (على الكبد، أمراض الدم، أمراض المناعة، أثار على النمو، تصلب الشرايين)، كما تؤثر على التكاثر وأيضا الآثار السامة للجينات المسببة للسرطان، تساهم إلى حد كبير في الحد من تطور جميع الأجهزة في الجسم، كما تؤدي إلى ظهور تصبغ موضعي في الجلد، التعرض في نفس الوقت لـ AHPS والأشعة فوق البنفسجية يسبب حدوث الالتهاب الجلدي، يرافقه التهاب العين وتعتبر هذه السمية حادة جدا، كما يمكن أن تسبب التهيج الرئوي والأكزيما واضطرابات الجهاز المناعي وخاصة انخفاض الغلوبينات المناعية G وA خاصة عند عمال المسابك (Mastrangelo *et al*., 1996).

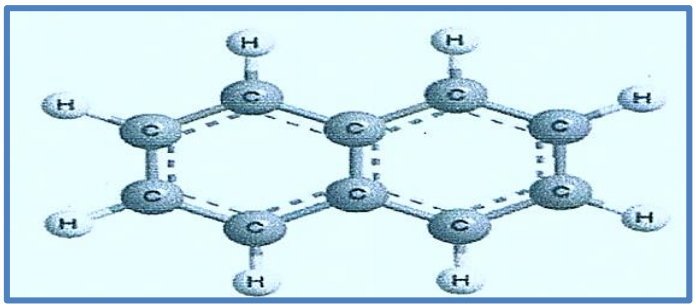
أظهرت الدراسات المتاحة وجود ارتباط بين مستويات التعرض AHPS بين العاملين في بعض القطاعات المهنية (كمصانع الفحم، مصانع الكوك، المسابك، استخدام مشتقات الفحم....). وزيادة خطر الإصابة بسرطان الرئة والمثانة والجلد هذه الإصابات السرطانية مدرجة في جدول السرطان المتفق عليها كأمراض مهنية في فرنسا (Durand *et al.*, 1996 ; Bosetti *et al.*, 2007) .

كما أظهرت الدراسات تأثيرات ماسخة وسامة على جنين الحيوانات، أما على الإنسان هناك دراسات علمية جارية في هذا المجال (Tokiwa *et al.*, 1994 ; Tillement, 2001 ; SZZeklik *et al.*, 1991). كما تحفز تشكل الأورام في الأعضاء المختلفة كالجهاز العصبي، كما أن موضع تطور الأورام مرتبط بطريقة دخول AHPs، مثل أورام المعدة بعد التناول عن طريق الفم، كما لوحظت أورام في مواقع أخري غير مواقع دخول AHPs مثل إدخال Banzo (a)pyrène عن طريق الفم يسبب ورم الجهاز الهضمي و الكبد والرئة و الغدد الثديية في فئران وجرذان التجارب (Straif *et al.*, 2005 ; Albert *et al.*, 1991 ; EFSA , 2008 ;Tartu, 2014).

8- النفثالين (Naphtalène)

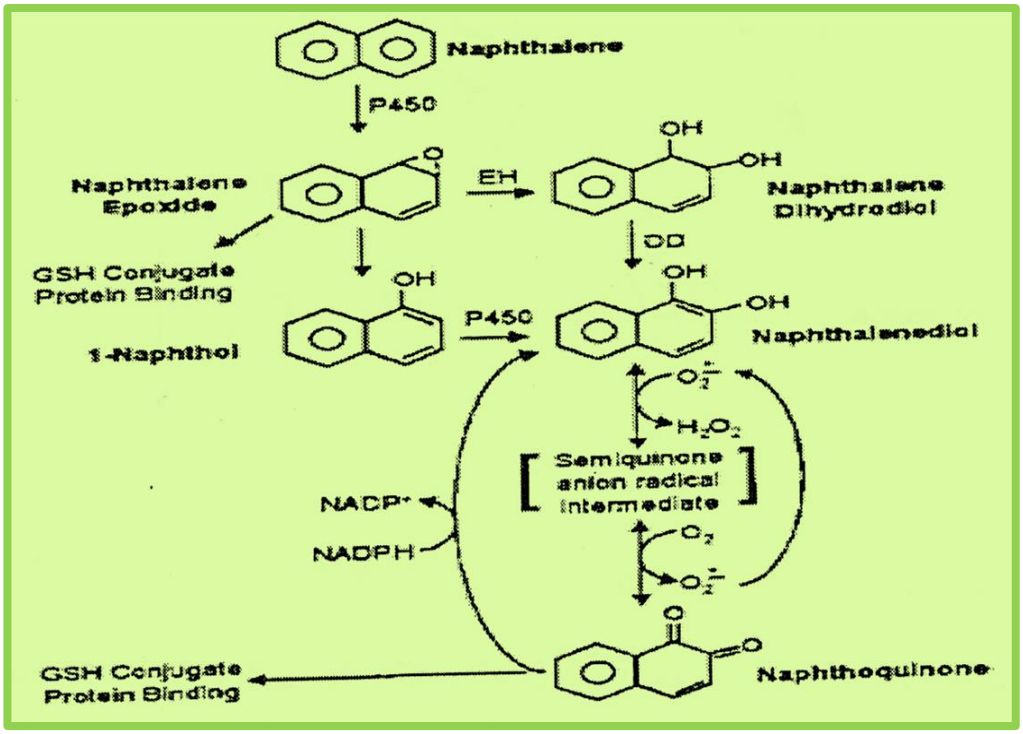
تم عزل النفثالين في عام 1820 من قبل Garden، وأقترح له التمثيل الحالي، (حلقتان من البنزين)، إذا يعتبر النفثالين من الهيدروكربونات العطرية الحلقية الشكل(3)، ويستعمل بكثرة في المجال الصناعي والتجاري كمادة مبدئية عضوية في بعض الصناعات كصناعة مواد التجميل ومزيل الروائح ومطهر الأرضيات، كما يستعمل كثرا في المنازل للقضاء على العث، يتميز بلون أبيض ورائحة مميزة حادة شكله تشبه رائحة القطران شكله الجزيئي $C_{10}H_8$ (Le Moullec *et al.*, 2012). يتم توزيع النفثالين في الأنسجة الذهنية بسبب الانجذاب العالي للمواد الذهنية. يصنف كمادة مسرطنة من الفئة (3) من قبل الاتحاد الأوربي وفي المجموعة B من قبل IARC . أثبتت الدراسات التي أجريت على حيوانات التجارب أن النفثالين يسبب التسمم عن طريق الجهاز التنفسي والهضمي، كما يمكن أن يسبب السمية الحادة مثل الانهيار العصبي و تخثر الدم، أيضا يسبب فقر الدم الانحلالي وتحريض سرطان الرئة. توصلت دراسات أجريت على الفئران أن النفثالين يعبر المشيمة، كما تم الكشف عنه في حليب الأم ويحرض أضرار وكسور على مستوي الماد الوراثية ADN في الدراسات التي أجريت على مستوي الكبد والمخ

(Le Moullec *et al.*, 2012 ; Montandon, 2005 ; Boseti, 2007 ; Sthos *et al.*, 2002).



الشكل(3): البنية الكيميائية للنفثالين (Le Moullec *et al.*, 2012)

ترتبط سمية النفثالين مباشرة بعمليات التمثيل الغذائي، المرحلة الأولي لأيضه يؤدي إلى تشكل époxyde بعملية désoxydation تحفز بواسطة cytochromes P450 مشكلاً naphtalène-1,2 époxyde ، تنتج هذه السمية عن تشكل مركبات quinones بمنهج 1- naphtalène التي تؤدي إلى تشكل naphtoquinone أو منهج 1,2 oxyde de naphtalène (الشكل4). كما يؤدي التعرض لفترات طويلة لنفثالين إلي تقليص مستويات تعبير مستقبلات n-méthyle-D- aspartate والسيروتونين (sérotonine) والدوبامين (dopamine) و التي يمكن أن تؤدي إلى تغيرات في المعلومات العصبية و السلوكية (Callister *et al.*, 2008). ومع ذلك معلومات قليلة متوفرة حول الآثار المرضية العصبية نتيجة التعرض للنفثالين في حيوانات التجارب ; (ATSDR, 1995 (Le Moullec., *et al.*, 2012)



الشكل(4) : مناهج أيض النفثالين (Viravaidya *et al.*, 2004) .

9- التأثير السمي AHPs والمبيدات على الجهاز العصبي والجهاز المناعي

9-1-التأثير السمي على الجهاز العصبي

يعتبر الجهاز العصبي نظام معقد، ومركز للتحكم في الجسم وشبكة اتصالات بفضل الوحدات الأساسية المتمثلة في الخلايا العصبية، يعمل الجهاز العصبي على ضبط وظائف الجسم المختلفة وينسق أعمالها بدقة بالغة عن طريق استقباله للمعلومات الخارجية أو الداخلية مما يؤدى إلى استجابات مناسبة في العضلات والأعضاء المختلفة والغدد، ينقسم الجهاز العصبي إلى الجهاز العصبي المركزي والمحيطي(Marieb, 2000 ; Crossman *et al.*, 2004 ; Ramé and Therond, 2006). ينمو الجزء الأكبر لدماغ في المرحلة الجنينية، يتألف من الدماغ الخلفي، الدماغ المتوسط والدماغ الأمامي والنخاع الشوكي. يسيطر على جميع الأفعال و الأحاسيس لمختلف أجزاء الجسم المختلفة (Zayed *et al.*, 2003 ; Hauss, 2006 ; Richard and Orsal, 2007).

9-2- خلايا الجهاز العصبي

يتكون الجهاز العصبي من الخلايا العصبية (العصبونات) التي تعتبر الخلايا الإعلامية للجهاز العصبي (خلايا توصيل المعلومات)، وتمثل 10إلى 20 % من خلايا الدماغ وهي متخصصة في استقبال ومعالجة ونقل النبضات العصبية. تتكون من ثلاثة أجزاء هم: جسم الخلية، المحور العصبي، التفرعات العصبية الشكل(5)

(Jessen, 2004 ; Hauss , 2006 ; Amiel-Tison and Gosselin, 2010).

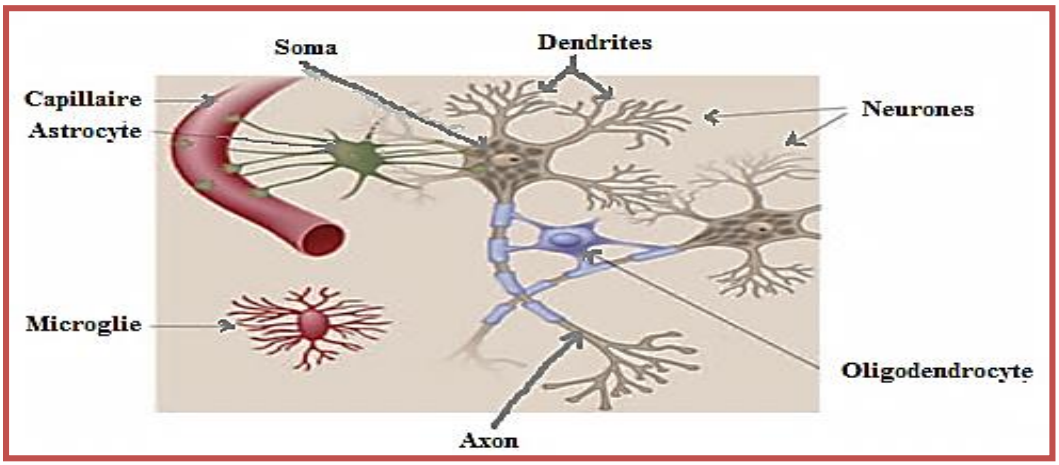
كما يتكون من الخلايا الدبقية وتمثل من80 إلى 90% من خلايا الجهاز العصبي و هي تشغل حوالي نصف الدماغ، توفر أساسا دور مدعم ومساند للخلايا العصبية وهي أربعة أنواع: دبقية قليلة التفرع (Oligodendrocyte) دبقية صغيرة (Microglie)، الخلايا الدبقية المتشعبة (Dendrites) ، الخلايا الد بقية النجمية Astrocyte (Hauss, 2006; Christe, 2013) .

9- 3- أمراض الجهاز العصبي

تتمثل أمراض الجهاز العصبي في تلف و/أو التهاب مكوناته المختلفة، يؤدي هذا إلي الضمور التدريجي للجهاز العصبي بسبب موت أنواع مختلفة من الخلايا العصبية (Hauss, 2006) .

التلف العصبي (Neurodégenerescence) وهو ما يعادل الخسارة الهيكلية والوظيفية للخلايا العصبية، يمكن أن تكون حادة أو مزمنة، الحوادث الخارجية في بعض الأحيان مثل الإصابات المؤلمة أو التعرض للعوامل الكيميائية (كالمبيدات، الهيدروكربونات متعددة الحلقات .....الخ) والتي يمكن أن

تحدث الأكسدة مما تسبب اضطرابات في عملية التنظيم الخلوي، أو الحوادث الموضعية مثل نقص التروية أو السكة الدماغية هذا ما يؤدي إلى حث التلف العصبي الأكثر انتشارا في حالة الأمراض العصبية، مسببات هذه الحالة إلى يومنا الحالي غير مفهومة جيدا عموما العوامل الرئيسية المسببة لأمراض الالتهاب العصبي (Neuroinflammation) تشمل إلتهاب الخلايا الدبقية الصغيرة والخلايا النجمية فهي تشكل جزءا من العمليات المرضية لمرضى الباركنسون، حيث كشفت دراسات تشريح الجثة على دماغ مصاب بمرض الباركنسون وجود نشاط لخلايا دبقية وتشكل كتل ضخمة للخلايا النجمية .(Gilbert, 2013)



الشكل(5): يوضح بنية العصبونات والخلايا الدبقية (Chevallier, 2012)

أكدت الدراسات العلمية أن التعرض لأنواع مختلفة من الملوثات الشائعة في الطبيعة وخاصة الملوثات العضوية الدائمة كالمبيدات الكلورية مثل END وبعض الهيدروكربونات متعددة الحلقات مثل Nap تلعب دور كبير في إحداث الأمراض العصبية، كما أن التعرض لجرعات عالية من الملوثات العضوية الدائمة يؤدى إلى تأخر نمو الجنين داخل الرحم وظهور عيوب تطوريةعلى وجه الخصوص تأخر النمو العصبي قبل الولادة (Juricek and Coumoul, 2014 ; Ravanan *et al*., 2008) . يمكن لهذه الملوثات أن تؤدى لحدوث تغيرات وأضرار في نسيج ووظائف الجهاز العصبي المركزي والمحيطي، التلوث البيئي يمكن أن يصل إلى حد التأثيرات السمية العصبية من خلال التغيرات الوظيفية للدماغ كالانهيار العصبي ،فقدان الرغبة الجنسية، الصداع النصفي، ضعف التنسيق، الغثيان، الدوار الارتباك، الحيرة واللامبالاة، كما يمكن للجرعات العالية أن تسبب فقدان الوعي والانهيار العصبي(Juricek and Coumoul, 2014). استطاعت تقنيات التصوير الطبي إظهار أن الهيدروكربونات تغير نشاط الأيض الدماغي في منطقة محددة من الدماغ مثل الثلاموس والمشبك العصبي، هذه التغيرات تبين أن الفعل الضار للهيدروكربونات ناتج عن التغيرات الوظيفية الفيزيولوجية

للقشرة المخية والأعصاب الدماغية، علاوة على ذلك فإن النشاط القشري الناتج عن الهيدروكربونات يثبط أيضا النشاط العصبي للنخاع الشوكي عن طريق تثبيط النقل المشبكي لمختلف الطرق الحسية الجسمية والحركية (Odin, 2005 ; Lefelevere, 2003 ; Lundstedt *et al*., 2007).

التعرض لبعض مركبات ال AHPS خلال فترة الحمل يسبب اضطرابات السلوك العصبي و تأخر النمو الفكري وانخفاض الوزن عند الولادة، وهذا عند التعرض بشكل خاص لنفثا لين والبنزو (أ) بيرين (Pèrera *et al*. ,2009 ; Choi *et al*. , 2008). كما أكدت دراسات أجريت من قبل Dutta وأخرون(2010) أن benzo (a) pyrène يعبر حاجز الدم في الدماغ كما يؤثر على مستقبلات النواقل العصبية، كما أتضح تراكمه و استقلابه في الجهاز العصبي، أيضا أظهرت الدراسات أن التعرض له قبل الولادة يؤدي إلى تغير الأداء السلوكي لاحقا للطفل (Slokin and Sridler, 2010 ; Chen *et al*., 2012 ; Brown *et al*., 2007).

تبين بالإضافة إلى ذلك أن الهيدروكربون B(a)P يؤثر على الوظيفة العصبية والعضلية والحسية والفسيولوجية، كما يؤثر على تطور الجهاز العصبي المركزي (Saunders *et al*., 2006). وبشكل مباشر الخلايا العصبية هي أيضا عرضة للتلف الالتهابي الناتج عن تنشيط الخلايا الدبقية (Butta 2010)

9- 4- أمراض الجهاز المناعي

يعتبر الجهاز المناعي من الأجهزة الوظيفية التي تؤدي دور في غاية الأهمية في العضوية، يتكون من البلايين من الخلايا المناعية التي تتشكل وتتواجد في الأعضاء اللمفاوية مثل الطحال والغدة التيموسية والعقد اللمفاوية واللوزتان، وهذه الخلايا المناعية تقاوم الأجسام الغريبة التي تهاجم جسم الإنسان والحيوان، لذلك فالجهاز المناعي يعتبر آلة هامة من آليات ثبات الاتزان الداخلي (mécanisme homéostatique) في الجسم حيث يقاوم الأجسام الغريبة كالجراثيم والفيروسات التي استطاعت أن تخترق الجسم، وبالتالي وظيفته الرئيسية هي التعرف على ما هو غريب عن الجسم ثم القضاء عليه بتنفيذ آليات الدفاع المناسبة وبالتالي فمن الأهمية بالنسبة للنظام المناعي التمييز بين الذاتي والغير الذاتي وأيضا التعرف على الوضع الخطير للكائن الحي (Petre, 2003 ; Janway *et al*., 2003).

10- خلايا الجهاز المناعي

يتكون الجهاز المناعي من العديد من الخلايا المناعية النخاعية و اللمفاوية:

10-1- الخلايا النخاعية للجهاز المناعي

يعطي المنشئ النخاعي العام في نخاع العظام الخلايا الوحيدة (Monocyte) التي تسبح في الدم وتهاجر إلي الأعضاء والأنسجة لتصبح خلايا بالعات كبيرة (Macrophages mononucléaires)

وتكون الخلية الوحيدة في دم الإنسان أكبر من الخلية اللمفاوية والتي تكون ذات نواة كلوية الشكل وتحتوي العديد من الحبيبات السيتوبلازمية والأجسام المحللة التي تدخل في قتل الميكروبات، وتلتصق المبتلعات وحيدة النواة بشدة بالسطوح حيث تمتلك الخلية مستقبلات مختلفة تساعدها في الارتباط بالمادة الغريبة وهضمها، ويمكن تعزيز نشاطاتها بجزيئات الليمفوكينات منتجة بواسطة الخلايا اللمفاوية التائية (Philippe, 2007).

كما تلعب الخلايا الشجيرة (Cellules dendritiques) دورا مهما في تحريض الاستجابة المناعية، حيث يعتقد أن لها دور في تقديم مولدات الضد البروتينية للخلايا . كما نجد الخلايا الحبيبية (Granulocytes) التي تتميز بعمر قصير مقارنة بالبالعات الكبيرة وهي تشمل من 60 إلى 70% من خلايا الدم البيضاء، للأشكال الناضجة نواة متعددة الفصوص والعديد من الحبيبات. نجد منها الخلايا المعتدلة (Neutrophiles) وهي الأكثر وفرة من بين الخلايا الحبيبية وتحتوي حبيباتها على العديد من الجزيئات القاتلة للميكروبات، وعندما ينتج عامل الجذب الكيميائي (Chimiotactique)نتيجة للإصابة أو الضرر في موضع خارج وعائي فأنها تدخل إلى الأنسجة، دورها الرئيسي البلعمة. بالإضافة إلى الخلايا الحمضية (Eosinophiles) التي توجد بأعداد قليلة (من1إلي 2% من الخلايا البيضاء) لكن أعدادها ترتفع في ظروف معينة من الحساسية والمناعة ضد الطفيليات . كما نجد الخلايا الحبيبة القاعدية (Basophiles) توجد في الدورة الدموية بأعداد قليلة جدا (أقل من 0.6%) ولها مميزات مشتركة مع الخلايا البدئية (Mastocytes) فلكل نوع من الخلايا مستقبلات على سطوحها للجزء المتبلور Fragment Cristallisable(FC)، دورها الرئيسي يتمثل في الاستجابة الالتهابية ومناعة ضد التعفن (Daphid, 2005 ; Martin *et al*., 2008 ; Eric and Pascal, 2006).

2-10- الخلايا اللمفاوية للجهاز المناعي

توجد الخلايا اللمفاوية في العضوية بنسبة 20 إلى 40 % من مجموع خلايا كريات الدم البيضاء، وبنسبة 99 % من خلايا اللمف ،تتحرك هذه الخلايا بطريقة متواصلة بين الدم واللمف ،كما لها القدرة على الهجرة في الفراغ النسيجي والأعضاء اللمفاوية ،نجد منها ثلاثة أنواع أساسية هي الخلايا اللمفاوية T وBوالخلايا الطبيعية القاتلة (NK). تفرز الخلايا اللمفاوية T عوامل شبيهة جدا بالهرمونات تدعى السيتوكينات (Cytokines) أو اللمفوكينات (Lymphokines) ذات الوظيفة المحفزة لتضاعف وتمايز الخلايا اللمفاوية نفسها، بينما تفرز الخلايا اللمفاوية B الأجسام المضادة، فارتباط وتداخل مولد الضد مع هذه الجزيئات هو الذي يسبب بدء سلسلة تنشيط الخلايا اللمفاوية البائية وينتج عن ذلك ظهور خلايا مؤثرة تتحول إلى خلايا بلازمية (Plasmocyte) تفرز الأجسام المضادة أو إلى الخلايا الذاكرة. أما الخلايا

الطبيعية القاتلة (NK) فلها وظيفة سمية ضد الكثير من الهجمات الممرضة التي تحدثها الخلايا السرطانية، وضد الخلايا المتعفنة بالفيروسات

.(Eric and Pascal, 2006 ; Martin *et al*., 2008 ; Charles *et al*., 2003)

11- التأثير السمي للهيدروكربونات والمبيدات على الجهاز المناعي

التعرض لفترات طويلة لـ AHPs يمكن أن تسبب فقر الدم السرطاني النخاعي، كما تعمل على تثبيط تشكل كريات الدم الحمراء والبيضاء، كما تسبب نقص تنسج نخاع العظام (Hypoplasie médullaire) (Descotes *et al*., 1992). يسبب التعرض ل HAPs والمبيدات انخفاضا في مستوي الغلوبينلت في المصل (IgA ,IgG, IgM)، وزيادة في IgE، كما تعتبر HAPs كمسببات للحساسية، وتحث على زيادة تشكل الكريات الدم البيضاء (leucocytes)، كما تؤدي المبيدات والهيدروكربونات إلى ضعف الجهاز المناعي الخلطي والخلوي، هذا ما يفسر الخطر الكبير لإصابة الأطفال بسبب ضعف نظامهم المناعي، كما يسبب تأخرا لنمو وتثبيط تشكيل كل أنواع كريات الدم البيضاء ., Aderson *et al* (1995)

كما يؤدى التعرض ل HAPs إلى الموت المبرمج للخلايا اللمفاوية B ويخفض إنتاج الغلوبيولينات المناعية (Salas and Burchiel , 1998) .الخطر الرئيسي AH Ps على الصحة في القدرة على احداث تطور السرطان في الكائنات المعرضة مثل الثدييات، وهذا بمشاركة مجموعة من الإنزيمات القادرة على تحويل المركبات الصيدلانية Xénobiotique لمركبات قابلة للذوبان في الماء هذه الأنزيمات هي monooxygénases التابعة لمجموعة cytochrome p 450 يتم تحويل AHPs إلى مركبات AHPs diol époxyde والتي تتفاعل خاصة مع ال ADN وARN والبروتينات الخلوية وبالتالي ظهور العديد من الطفرات الغير رجعية (Albert *et al*., 1991 ; EFSA , 2008 ; Jager and Rakovie, 1974 ; Lafon *et al*., 2000).

III- الإجهاد التأكسدي

يعرف الجدر الحر على أنه عبارة عن ذرة أو جزيئة تحوي في مدارها الخارجي إلكترون غير متزاوج، مما يكسبه نشاطا تفاعليا وجها لوجه مع الجزيئات البيولوجية الأخرى الأكثر استقرارا، تشارك الجذور الحرة في الكثير من الوظائف البيولوجية كالانقسام الخلوي، عملية الموت المبرمج للخلايا (Davies, 2003 ; Favier, 2003 ; Droge, 2002). في جميع الأنسجة السليمة آليات الدفاع المضادة للأكسدة قادرة على مواجهة وتدمير الجذور الحرة الزائدة، في هذه الحالة نقول أن ميزان الأكسدة / ومضادات الأكسدة في توازن، ولكن في بعض الحالات وذلك بسبب الإفراط في إنتاج الجذور الحرة أو

نقص في القدرة المضادة للأكسدة أو الاثنين معا يؤدي إلى اختلال التوازن بين إنتاج الجذور الحرة ونظام الدفاع التأكسدي تسمى هذه الحالة بالتوتر أو الجهد التأكسدي. لذلك يعرف الجهد التأكسدي باختلال التوازن بين أنظمة الأكسدة (prooxidants) والقدرة المضادة للأكسدة (antioxydants) في خلية أو كائن حي

.(Pincemail *et al.*, 2000 ; Pincemail *et al.*, 2000 ; Lee *el al.*, 2004)

يؤدي هذا الاختلال إلى تراكم الجذور الحرة التي تتميز بقدرة عالية على إتلاف فوسفوليبيدات الأغشية (Gilbert, 2013). كما تسبب أضرارا على مستوى الجزيئات البيولوجية الكبيرة كالبروتينات والدهون، السكريات، الأحماض النووية (Sevais, 2004 ; Lerbours, 2009))، كما يشارك الجهد التأكسدي في آليات موت الخلايا في أمراض الجهاز العصبي مثل مرض الباركنسون ومرض الزهايمر .(Desport and Couration, 2002)

1-الجذور الحرة الأكسجينية وأصلها

من بين الجذور الحرة الأكسجينية نجد Radical hydroxyle (OH) ، oxyde nitrique Anion superoxyle (O_2°-)... إلخ تتكون هذه الجذور طبيعيا في العضوية وتسمى بالجذور الحرة الأولية، على مستوى بعض العضيات الخلوية مثل Peroxysomes، خلال عملية البلعمة خلال الانقسام الخلوي والأكسدة الذاتية للعديد من الجزيئات الداخل خلوية

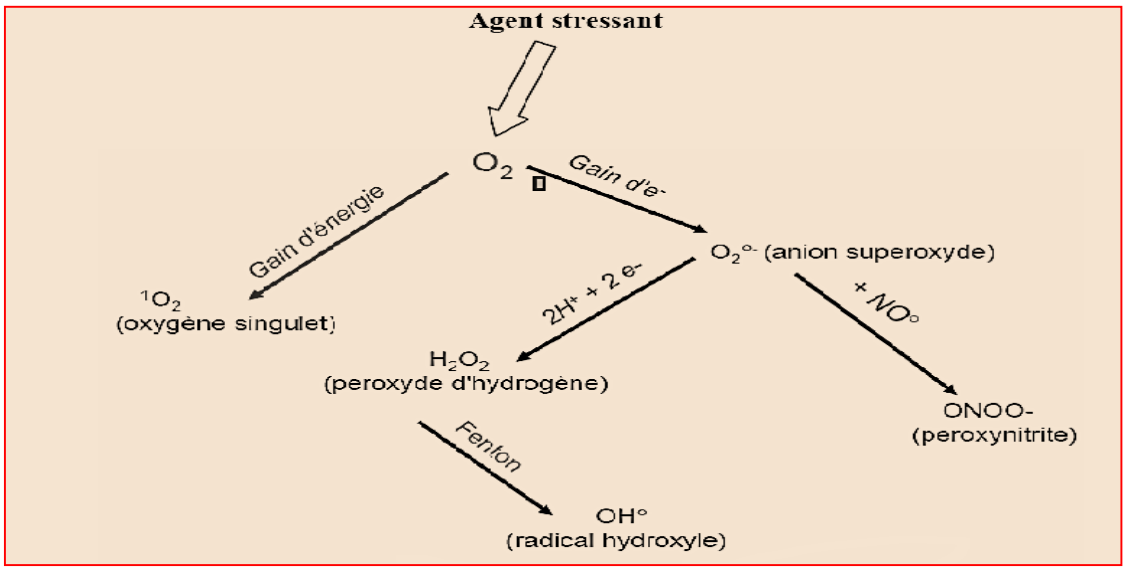
.(Ceurtin *et al.*, 2002 ; Valko *et al* ., 2006) الجذور الحرة الأكسجينية النشطة قادرة على أخذ إلكترون الجزيئات المجاورة لتزويج إلكترونها العازب (تتصرف كمؤكسد) أو تتخلى عن إلكترونها (تتصرف كمرجع) وهذا ما يؤدي إلى تكون جذور جديدة تسمى بالجذور الحرة الثانوية مثل peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)، peroxynitrite (ONOO.)، Singlet oxygen (1O) ..... إلخ (Ceurtin *et al.*, 2002).

1-1 - الأصل الداخلي للجذور الحرة الأكسجينية

تتشكل الجذور الحرة خلال العديد من التفاعلات المتدخلة في الآليات الفيزيولوجية كالسلسلة التنفسية الميثوكوندرية، خلال البلعمة، الانقسام الخلوي، الأكسدة الذاتية للعديد من الجزيئات الداخل خلوية، تفاعلات Fenton .... إلخ. يعتبر (AcetylcoA) ناتج أيض السكريات، البروتينات، اللبيدات يدخل حلقة كريبس لأكسدته كليا إلى H_2O، CO_2 . المرافقات الإنزيمية المرجعة الناتجة NADPH, $FADH_2$, NADH, تحتوي على إلكترونات عالية الطاقة، وتعتبر المعطي الأول للإلكترونات في السلسلة التنفسية، حوالي 95% من الأكسجين المستهلك خلال الأيض الخلوي يختزل إلى ماء في السلسلة

التنفسية الميثوكوندرية حسب عملية رباعية التكافؤ وهذا في وجود إنزيم cytochromeoxydase الشكل (6) (Lee *et al*., 2004).

$$O_2 + é \longrightarrow O_2^{\cdot}$$



الشكل (6):مصادرو أنواع الجذور الأوكسوجينية الحرة (Auberval, 2010) .

يتشكل جذر $O_2^{\cdot -}$ أيضا أثناء تنشيط إنزيم NAD oxydase خلال البلعمة، يتواجد بالخلايا البلعمية أين يقوم بدور أساسي في الرد المناعي ومكافحة الكائنات الدقيقة، يتواجد كذلك في الخلايا الغير بلعمية التي لها دور في تنظيم النمو الخلوي.(Gradé *et al*., 2003 ; Milane, 2004) يعتبر NADH oxydase البلعمي مصدر أساسي لإنتاج لـ ROS وذلك في إطار الاستجابة المناعية، يكون الإنزيم في حالته العادية خامل وينشط مع نشاط الخلية البلعمية الخاضعة لظاهرة تدعى الالتهاب المؤكسد، تتحول كمية كبيرة من الأكسجين المستهلك من قبل الخلايا البلعمية إلى جذر فوق الأكسيد، ($O_2^{\cdot -}$) بتدخل إنزيم NADPH oxydase الذي يتوضع على الغشاء البلازمي حسب التفاعل التالي (Dlton *et al*., 2002).

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

يعتبر $O_2^{\cdot -}$ قليل التفاعل، ينتشر بسهولة في الجسم، يتفاعل في وجود SOD مع H^+ معطيا H_2O_2 كما هو موضح في التفاعل التالي:

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

كما يمكن أن ينتشر H_2O_2 عبر الأغشية الخلوية وله قدرة عالية على الأكسدة، يتحلل في وجود Fe^{2+} حسب تفاعل Fenton ليعطي $^{\cdot}OH$ و $\bar{O}H$

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow \bar{O}H + {}^{\cdot}OH + Fe^{3+}$$

يمكن أن يتفاعل H_2O_2 مع جذر $O_2^{\cdot-}$ ليعطي $\bar{O}H$ والجذر الهيدروكسيلي وهذا حسب تفاعل (weissHaber).

$$H_2O_2 + O_2^{\cdot-} \longrightarrow \bar{O}H + {}^{\cdot}OH + O_2$$

أيضا يتحول بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) في وجود myeloperoxidase وأيون cl^- إلى hypochlorous acid (HclO) .

يتفاعل هذا الأخير مع جزيئات الوسط التي تملك الوظائف الأمينية ومع أيون الأمونيوم مشكلا مركبات chloroamines حسب التفاعل التالي:

$$HclO + RNH_2 \longrightarrow NHcl + H_2O$$

$$HclO + NH_3 \longrightarrow N\,H_2cl + H_2O$$

كما يتكون الأكسجين المفرد ($^1O_2$) من تفاعل hypochlorous مع بيروكسيد الهيدروجين حسب التفاعل التالي .

$$HclO + H_2O_2 \longrightarrow Hcl + H_2O + {}^1O_2$$

وهكذا يتشكل خلال البلعمة نسبة مرتفعة من الجذور الحرة الأكسجينية مثل $O_2^{\cdot-}$، H_2O، $^1O_2$، $^{\cdot}OH$

(Tillement, 2001 ; Milane, 2004 ; Borg and Reeber, 2008 ; Favier, 2003)

يمكن أن تتكون الجذور الحرة الأكسجينية بتدخل إنزيم Xanthine oxidase الذي يعمل على تحويل hypoxanthine في وجود الأكسجين إلى حمض اليوريا وجذر فوق الأكسيد حسب التفاعل التالي (Jessen, 2004 ; Hauss , 2006 ; Amiel-Tison and Gosselin, 2010).

$$Hypoxanthine + O_2 + H_2O \longrightarrow xanthine + H_2O_2$$

$$Xanthine + 2O_2 + H_2O_2 \longrightarrow acid\ eurique + 2O_2^{\cdot -} + 2H^+$$

أيضا يتشكل $O_2^{\cdot -}$ بتدخل إنزيم cytochrome P450 الكبدي الذي يتدخل في أيض بعض الجزيئات الغريبة، وعلى مستوى الشبكة الأندوبلازمية التي تحتوي على إنزيمات محفزة لسلسلة تفاعلات نزع سمية الجزيئات الدهنية المذابة ومواد أيضية أخرى، من أهم هذه الإنزيمات cytochrome P450 الذي يؤكسد الدهون الحمضية الغير المشبعة (Turrens and Freeman, 1982).

كما أن العديد من الخلايا لها القدرة على إنتاج جذر أحادي أكسيد الأزوت في التفاعل المحفز بإنزيم NO-synthase(NOS) حسب التفاعل التالي:

$$L\text{-}argenine + O_2 + NADPH \longrightarrow L\text{-}citruline + N\dot{O} + NADP$$

يلعب أكسيد الأزوت (NO) دورا فسيولوجيا أساسيا، ينتج في الخلايا الطلائية المبطنة للأوعية والعصبونات والبالعات الكبيرة، يتفاعل مع أنيون فوق الأكسيد ($O_2^{\cdot -}$)مولدا Peroxynitrite ($ONOO^-$) (Favier, 2003 ; Servais, 2004) . تتشكل جذور الألكوكسيل (R°) والبيروكسيل ($ROO^{\cdot}$) من أكسدة الأحماض الدهنية الغير مشبعة بواسطة $O_2^{\cdot -}$ و $^{\cdot}OH$ $^1O_2$

(Valko *et al*., 2006 ; Valko *et al*., 2007).

كما تعتبر الأكسدة الذاتية للعديد من الجزيئات الخلوية مصدرا للجذور الحرة كأكسدة الدوبامين الأدرينالين، الفلافيين، الهيدروكينون..الخ. الجذر الناتج غالبا هو $O_2^{\cdot -}$، كما أن الأكسدة الذاتية للدوبامين هي جزء متضمن في عمليات الموت المبرمج للخلايا في حالة الأمراض العصبية خاصة مرض الباركينسون(Thannickal and Fonburg, 2000 ; Lee *et al*., 2008 ; Lee *et al*. , 2004) .

2-1- الأصل الخارجي للجذور الحرة الأكسجينية

يتعرض جسم الإنسان لتأثير مختلف العوامل الخارجية القادرة على إنتاج الجذور الحرة مثل الإشعاعات الأيونية كالأشعة الفوق البنفسجية والأشعة السينية (X) والتفاعلات الضوئية الكيميائية، تحث الأشعة الفو البنفسجية على إنتاج الجذور الحرة مثل $^1O_2$، $^{\cdot}OH$، $O_2^{\cdot -}$ وتوليد جزيئات أخرى مثل H_2O_2 القادرة بدورها على إنتاج الجذور الحرة، (Favier, 1998 ; Germain *et al* . , 2003).

تشير الدراسات الحديثة أن التعرض الدائم للملوثات العضوية الدائمة يمكن أن تسبب الإجهاد ألتأكسدي عن طريق عدة آليات، حيث تعمل هذه الملوثات بما في ذلك المبيدات الزراعية المختلفة الكلورية والفوسفورية والهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات على اختلال توازن الكالسيوم مما يؤدي إلى اختلال نظام glutaminergique وزيادة إنتاج الجذور الحرة الأكسجينية (ROS) ، كما تؤثر على نشاط مختلف مكونات النظام المضاد للأكسدة (Wisternik, 2014 ; Halliwell, 2006 ; Sharma, 2010). كما يلعب تدخين السجائر دور كبير في تشكيل الأنواع الأكسجينية الجذرية التي تسبب أمراض خطيرة، إضافة إلى بعض الأدوية كالمضادات الحيوية ومضادات السرطان قادرة على إنتاج الجذور الحرة

.(Pein *et al*., 1995 ; Germai *et al*., 2003)

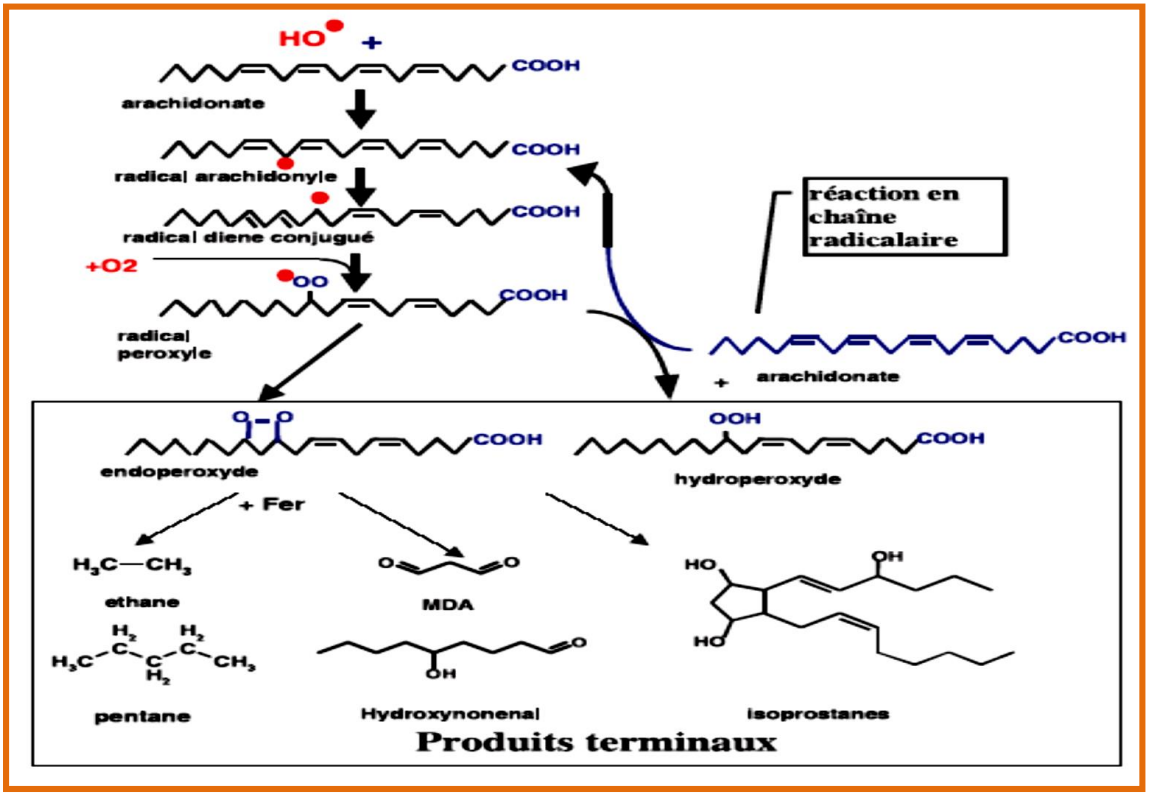
2- أضرار الأنواع الأكسجينية التفاعلية (ROS)

الإفراط في إنتاج الجذور الحرة يسبب أضرارا مباشرة للجزيئات البيولوجية، كأكسدة ADN، البروتينات، الدهون السكريات.... الخ، كما تسبب أضرارا ثانوية (غير مباشرة) بسبب خاصيتها السامة والمطفرة للخلايا نتيجة تأثير نواتج أيضها المتشكلة خاصة خلال أكسدة الدهون. (Halliwell and Cross, 1994 ; Favier, 2003).

2-1- تأثير ROS على الدهون

بالرغم من نصف عمر الجذور الحرة و التي لا تتجاوز أجزاء من الثانية، إلا أن جذرا واحدا قد يحدث حالة من الفوضى وعدم التوازن وبالتالي نشوء الأمراض. تهاجم الجذور الحرة الروابط الزوجية للأحماض الدهنية الغير مشبعة المتواجدة في الفوسفوليبيدات الغشائية وهذا ما يؤدي إلى حدوث الأكسدة الفوقية للدهون مما يؤدي إلى إتلاف الأغشية الحيوية كأغشية الميتوكوندري وتغيير وظائف و نفاذية و ميوعة الأغشية الحيوية، كما تؤثر على نشاط المستقبلات الغشائية وتؤدي إلى نقص الارتباط الإنزيمي بها كنقص نشاط مضخات الصوديوم (Magalhaces and Church, 2006). يعتبر جذر الهيدروكسيل ($OH^{\cdot}$) من الجذور الأكسجينية التفاعلية النشطة جدا التي تهاجم الروابط الزوجية للأحماض الدهنية الغير مشبعة المتواجدة بالفوسفوليبيدات الغشائية، وبالتالي حدوث الأكسدة الفوقية للدهون، يقوم جذر $OH^{\cdot}$ بنزع ذرة الهيدروجين وهذا ما يؤدي إلى تشكيل جذر كاربوني (R°) وجزيئة الماء، يتفاعل الجذر الكاربوني مع الأكسجين ويؤدي إلى تشكيل peroocyl (ROO^{-}) هذا الأخير يتفاعل مع حمض دهني آخر مشكلا (ROOH) hydroperoxide وإعادة تشكيل الجذر الكاربوني، يتفكك الـ hydroperoxide في وجود Fe^{2+} إلى

جذر alkoxyle (RO°) وهو شديد الفعالية يؤدي إلى حدوث دورات جديدة من الأكسدة الفوقية. تعتبر الهيدروبيروكسيدات مركبات غير مستقرة تتفكك إلى مشتقات ثانوية مؤكسدة كالألديهدات مثل (MDA) وhydroxynonenal . تعتبر هذه المواد كمؤشرات للأكسدة الفوقية للدهون الشكل(7).

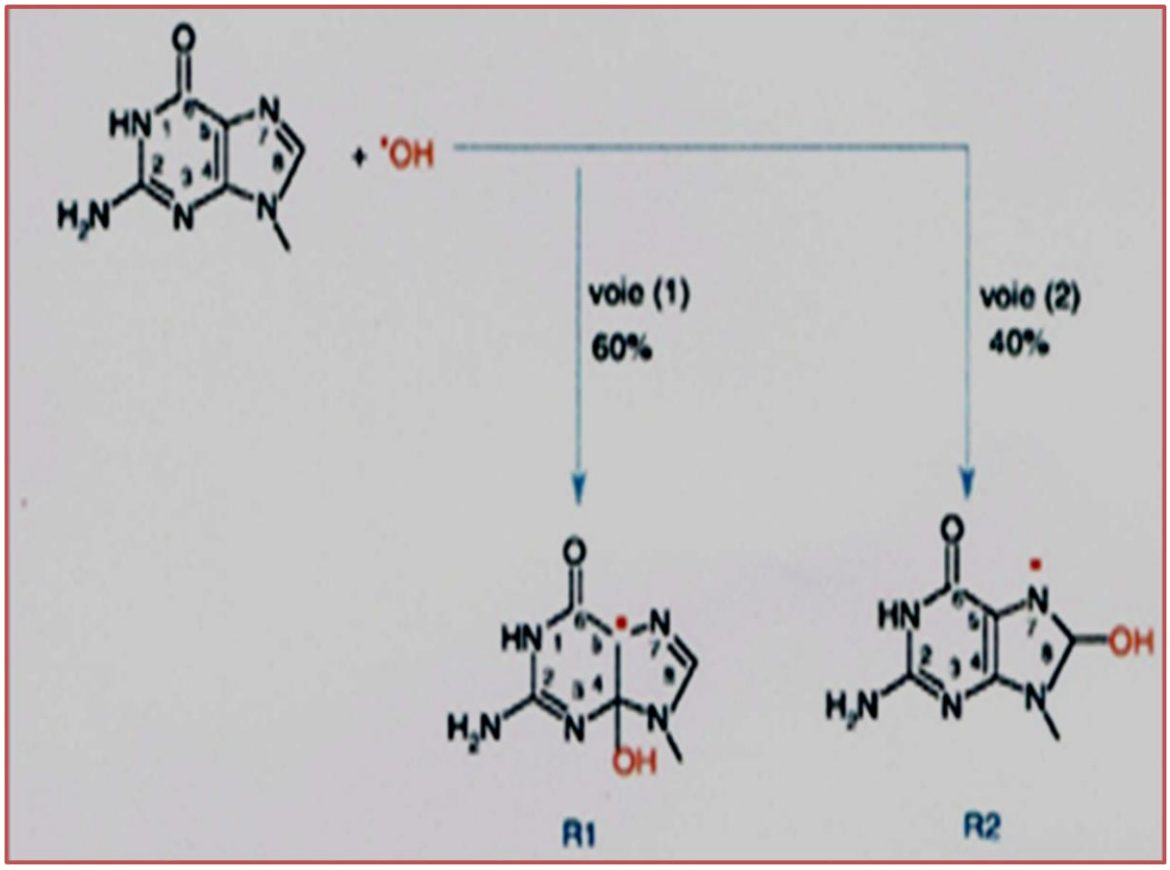


الشكل (7): آلية أكسدة الأحماض الذهنية والمواد الناتجة (Favier, 2003)

2-2- تأثير الأشكال الأكسجينية النشطة على ADN

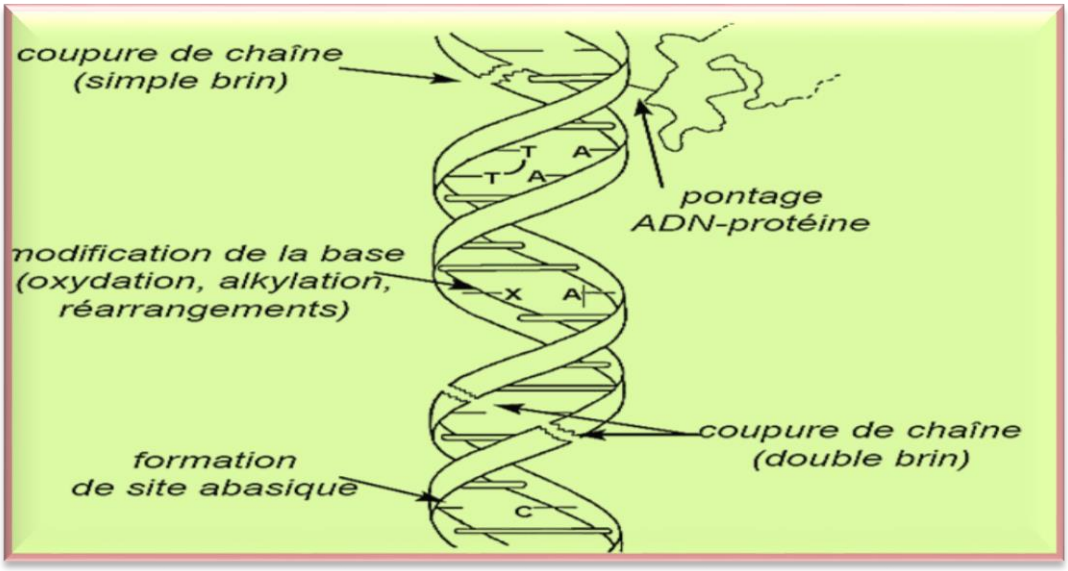
الجذور الحرة الأكسجينية تؤثر مباشرة على ADN و تؤكسد بعض القواعد الأزوتية مثل قاعدة guanine، والروابط بين désoxyribose مما يخلق موضع غير قاعدي، أو مهاجمة السكر نفسه الذي

يسبب قطع في السلسلة البسيطة، كما يمكن مهاجمة الجسور بين ADN والبروتينات، تؤدي كل هذه التأثيرات إلى حدوث تغيرات في سلاسل ADN مسببا بذلك حدوث طفرات، من أهم مؤشرات التوتر التأكسدي لـ ADN نذكر 8-oxoguanine الذي ينتج عن مهاجمة جذر الهيدروكسيل على guanine في الموقع C-8، كما يؤدي تأثير الجذور الحرة إلى تشكيل قواعد أخرى معدلة مثل 8-nitroguanine، 8- oxoadenine..... إلخ. الشكل(8) و الشكل (9) (Singal *et al.*, 1988) .



الشكل(8) :طريقة تأثير جذر الهيدروكسيل (·OH)على قواعد ADN(guanine)

(Singal *et al.*, 1988)



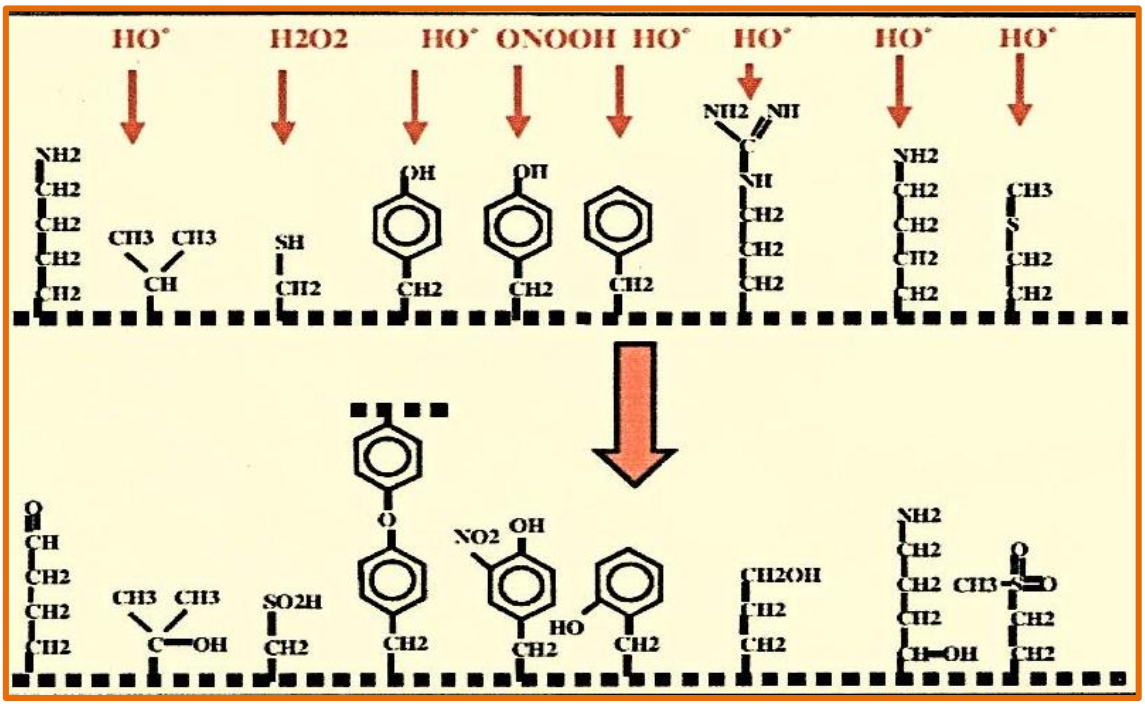
الشكل (9) :مواضع ADN المتأثرة بالأكسدة .(Singal *et al.*, 1988)

كذلك يعتبر الإجهاد التأكسدي وسيلة تحريض تمنع جينات الدورة الخلوية عن التعبير ويزيد في فترة المرحلة البينية G1 وخلال هذا التوقف تتحقق الخلية من مادتها الوراثية مع احتمال دخولها في الموت المبرمج، كما ينعكس الإجهاد التأكسدي على ADN الميتوكوندري (Vonsonntage, 1987; Valko *et al*., 2006 ; Clavel *et al*., 1985 ; Dodet, 1991)

3-2 – تأثير الأشكال الأكسجينية النشطة على البروتينات

البروتينات الأكثر حساسية للجذور الحرة هي البروتينات الحاملة لمجاميع (Thiol) او ما تسمى بوظائف Sulfhydryle (SH) كالبروتينات الناقلة و الإنزيمات والمستقبلات، تصبح هذه البروتينات أكثر حساسية لإنزيمات protéases نتيجة تعرضها للأكسدة، كما يكون تفاعل أكسدة البروتينات أيضا بتأثير الكاتيونات المعدنية مثل النحاس (Cu^2) و الحديد Fe^2 التي يمكن تصنيفها لمجموعتين:

المجموعة الأولى المحطمة للروابط البيتيدية ومغيرة للسلسلة البروتينية، والثانية مغيرة بواسطة إضافة المواد الناتجة عن فوق الأكسدة الليبيدية، حيث يتشكل جسر ثنائي الكبريت الذي يغير بنية البروتينات ويضر بنشاطها البيولوجي، كما تصبح البروتينات المتأكسدة جد كارهة للماء نتيجة حذف المجاميع الأمينية المتأنية أو إظهار المناطق الكارهة للماء للمركزية وتشكل البروتينات المتأكسدة كتل غير طبيعية داخل وحول الخلية الشكل (10) ; (Levéne.,2002 Singal.,1988 .(Vonsonntage., 1987



الشكل (10):طبيعة بعض التغيرات التي تحدثها الجذور الأوكسيجينية على سلسلة الأحماض الأمينية (Favier, 2003).

3- نظام الدفاع ضد الإجهاد التأكسدي

3-1- نظام الدفاع ضد الإجهاد التأكسدي الداخلي والخارجي

تستعمل الخلايا عدة آليات مضادة للأكسدة، تستهلك في البعض منها كمية كبيرة من الطاقة من أجل مراقبة مستوى الأنواع النشطة للأكسجين. مضادات الأكسدة عبارة عن مركبات أو إنزيمات لها القدرة على تثبيط أو توقيف الأكسدة، تتواجد في معظم العضيات، في الغشاء الخلوي، في السيتوزول... إلخ . يمكن أن تقسم إلى مضادات أكسدة أنزيمية مثل superoxyde-dismutas (SOD) catalase (CAT) التي تلعب دور الحماية وأيضا glutathion peroxydases (GSH-Px) التي تلعب دور مضاد للسمية (Germain *et al.*, 2003 ; Avissar *et al.*, 1989 ; Gradés *et al.*, 2003).
كما تستعمل أيضا مضادات الأكسدة الغير إنزيمية داخلية مثل Glutathion، وخارجية مثل فيتامينات A، E، C، متعددات الفينول مثل الفلافونويدات .... إلخ (Milane, 2004 ; Favier, 2003).

3-1-1- مضادات الأكسدة الداخلية

Glutathion (GSH): عبارة عن ببتيد قصير مكون من ثلاثة أحماض أمينية (gly-Cys-Glu) يلعب دور كمضاد للأكسدة بالتقاط الجذور الحرة، يحمي الخلية من التلف التأكسدي، كما يثبط عملية تكون الجذور الحرة داخل الخلية(Milane, 2004).

كما يعتبر Glutathione كقانص لجذور الهيدروكسيل والأكسجين المفرد، كما يتأكسد بـ H_2O_2 في وجود أيونات المعادن كالنحاس والحديد، كما هو موضح في التفاعلات التالية (Favier, 2003)

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

$$GSH + {}^{\cdot}OH \longrightarrow GS^{\cdot} + H_2$$

$$GSH + Fe^{3+} \longrightarrow GS^{\bullet} + Fe^{2+} + H^{+}$$

$$GSH + Cu^{2+} \longrightarrow GS^{\bullet} + Cu^{+} + H^{+}$$

❖ **Superoxide Dismutase (SOD)** عبارة عن بروتين معدني، يمنع تشكل جذر الهيدروكسيل انطلاقا من أنيون فوق الأكسيد حيث يحفز تحويل O_2^- إلى H_2O_2 كما هو موضح في التفاعل التالي:

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

يحدث هذا التفاعل تلقائيا ولا يحتاج إلى طاقة، تتواجد SOD بأشكال مختلفة التمركز الخلوي بمرافقتها المعدين(Mates *et al*., 1999 ; Dodet, 1991 ; Milane, 2004) .

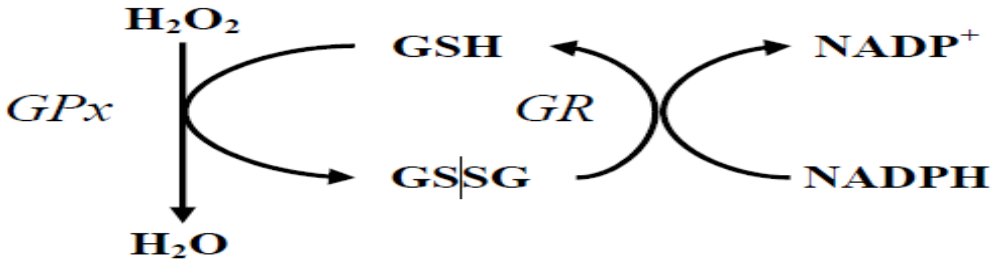
❖ **Catalase (CAT):** يحول هذا الإنزيم جزيئيتين من H_2O_2 إلى الماء والأكسجين.

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

(Favier, 2003; Milane, 2004; Borg and Reeber, 2008 ; Woold *et al*., 2003)

❖ **Glutathion peroxydase (Gpx)**

يتواجد في السيتوزول، الميتوكوندري، الشبكة الأندوبلازمية وفي النواة وفي أغلبية أنسجة الثدييات الموقع الفعال لهذا الإنزيم يحتوي على 4 ذرات سيلينيوم في شكل Sélenocysteine، يعمل على إزالة سمية بروكسيد الهيدروجين(H_2O_2) والهيدروبروكسيد اللبيدي (ROOH)، نشاط هذا الإنزيم مرتبط بوجود glutathion المختزل (GSH) كمعطي للإلكترون، جزيئيتين من glutathion المختزل (GSH) تؤكسد إلى glutathion ثنائي الكبريت (GSSG) الذي يتم اختزاله إلى 2GSH بتدخل إنزيم Glutathion Reductase الذي يستعمل المرافق الإنزيمي NADPH كمعطي للإلكترون كما في التفاعل التالي(Favier, 2003 ; Woold *et al*., 2003 ; Milane, 2004).



3-1-2- الأنظمة المضادة للأكسدة الخارجية

تعتبر كل المواد التي تمتلك القدرة على التقاط الإلكترون الحر عبارة عن مضادات أكسدة، حيث تعمل على تثبيط أو توقيف الجهد ألتأكسدي من خلال اقتناص الجذور الحرة.

. (Halliwell and Gutteridge, 2007 ; Halliwell and Gutteridge, 1999)

3-1-2-1- فيتامين E

عبارة عن مضاد أكسدة يذوب في الدهون يتميز بقدرته على التقاط الجذور الحرة مثل جدر البيروكسيد اللبيدي وهذا ما يساعد على توقيف نشاط الأكسدة الفوقية للبيدات في مرحلتها الأولى، الجزء النشط في جزيئة فيتامين E هي الوظيفة الفينولية المختزلة TH – التي تفقد بسهولة ذرة هيدروجين ويتحول إلى جذر (∝ - T) α–torophérol ، في حين جذر peroxyl يرجع إلى جزيئة hydroperoxyde كما في التفاعل التالي (Valko *et al*., 2007 ; Gardés *et al*., 2003)

.

$$RO_2 + \propto - TH \longrightarrow RO_2H + \propto - T$$

يلعب فيتامين C دور مهم في إرجاع فيتامين E المؤكسد وبالتالي تجديد مستمر لفيتامين E.

3-1-2-2- فيتامين C

يعتبر من مضادات الأكسدة القابلة للذوبان في الماء، دوره المهم كمضاد للجهد ألتأكسدي يتمثل في اقتناص الأشكال التفاعلية للأكسجين مثل hydroxyle، hydroperoxyl، peroxynitrite ..... إلخ (Gardés *et al*., 2003 ; Carr and Feri, 1999) .

3-1-2-3- الكاروتينويدات

تعتبر مواد كثيرة التنوع الغذائي كما أنها المصدر الرئيسي الغذائي للريتينول (طليعة فيتامين A) ، تلعب طلائع فيتامين A دور مهم كمضادات أكسدة من خلال التقاط الجذور الحرة مثل الأكسجين المفرد $^1O_2$، كما تلعب دور الحماية والوقاية ضد الأضرار التي تسببها الأشعة الفوق البنفسجية الضوئية (Chen *et al 2012*)، يرجع دورها المضاد للأكسدة لوجود تفاعل بين الجذور الحرة والروابط المزدوجة المتواجدة على طول السلسلة الغير المشبعة و التي تعمل كقانصات للجذور الحرة. كذلك تقوم بحماية الأغشية الكبدية ضد الأكسدة الفوقية للبيدات، كما تظهر أهمية كبيرة فيما يخص الخصائص المضادة للطفرات الجينية (Antimutagènes)

(Gradés *et al*, 2003 ; Milane, 2004, Deshpande *et al*., 1996)

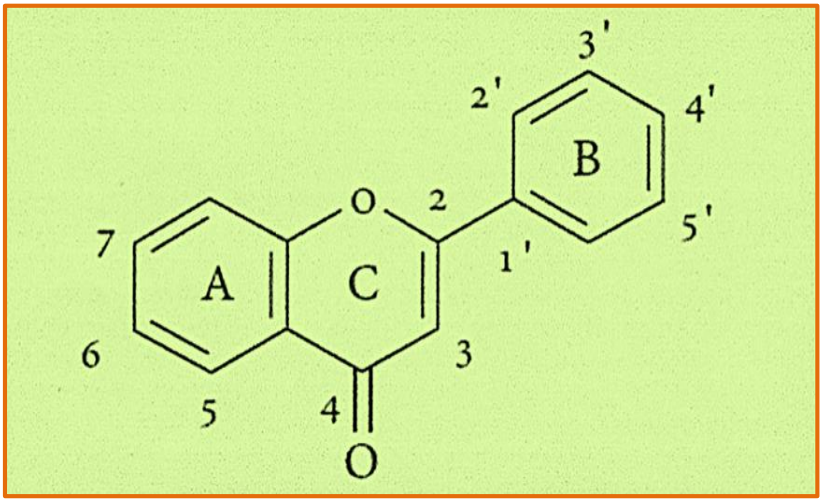
3-1-2-4- الفلافونويدات

تتواجد في كل النباتات الوعائية، في البكتيريا، في الفطريات و الأشنات وهي عبارة عن صبغات نباتية تنتشر في الأجزاء المختلفة للنبات من جذور، أزهار وأوراق، إلا أنها تتواجد بتركيز عالي في القسم

الهوائي، يرتفع تركيزها حسب تعرضها للشمس، وتتمركز بصفة عامة بالخلايا السطحية للأنسجة النباتية حيث تؤمن لها الحماية من الأشعة فوق البنفسجية UV الضارة، وتنسب إليها خاصية تلوين الأزهار الثمار و الأوراق. و قد تم استخراج و تحديد أكثر من 4300 فلافونويد طبيعيا من النبات (Bruneton, 1993 ; Wihem, 1998).

3-1-2-4-1- البنية الكيميائية للفلافونويدات

بنيتها الأساسية بسيطة نسبيا، تحتوي على 15 ذرة كربون موزعة على ثلاث حلقات، إذ تتكون من نواتين عطريتين A وB تجمعهما حلقة غير متجانسة تحتوي على عنصر الأوكسجين أي هي من الشكل C6-C3-C6، لذرات الكربون المشكلة للهياكل الفلافونويدية مصدرين: الحلقة A هي ناتجة عن تكاثف وحدات الخلات، أما الحلقة B مع ذرات الكربون 2، 3 و4 ناتجة عن مشتق حمض السينناميك، والشكل (11) يمثل الهيكل القاعدي للفلافونويدا (William, 2003).

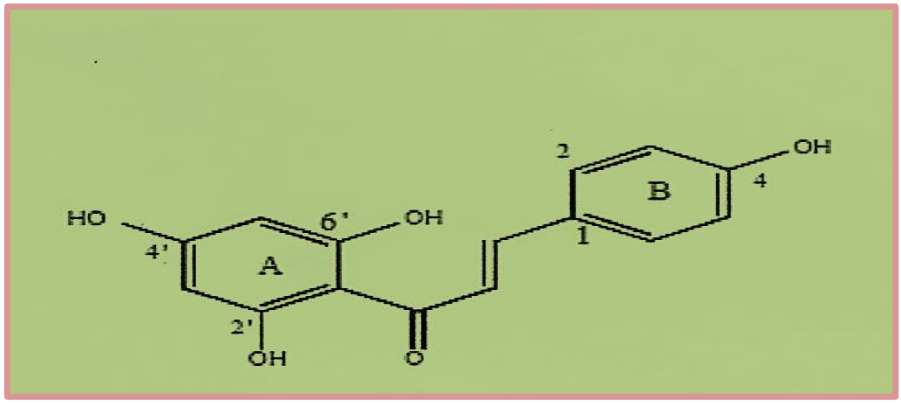


الشكل (11):الهيكل القاعدي للفلافونويدات (Bruneton, 1999)

3-1-2-4-2 تقسيم الفلافونويدات

تقسم الفلافونويدات إلى العديد من المجموعات وهذا اعتمادا على عدد ووضعية وطبيعة المستبدلات (مجاميع الهيدروكسيل الحرة، الميثيل والجليكوزيل) على الحلقتين A و B والحلقة المركزية C، أهمها flavone, flavonols ,flavanols, flavanones, dihydroflavanols ,isoflavones, isoflavanoneschalcones, aurones, anthocyanes تكون بشكل حر أو مرتبطة بسكر glycosides الشكل (12) موجودة بشكل عام في كل النباتات الوعائية تتمركز في عدة أعضاء كالجذور والأزهار وكذلك الأوراق، الثمار المختلفة (Bruneton, 1993).

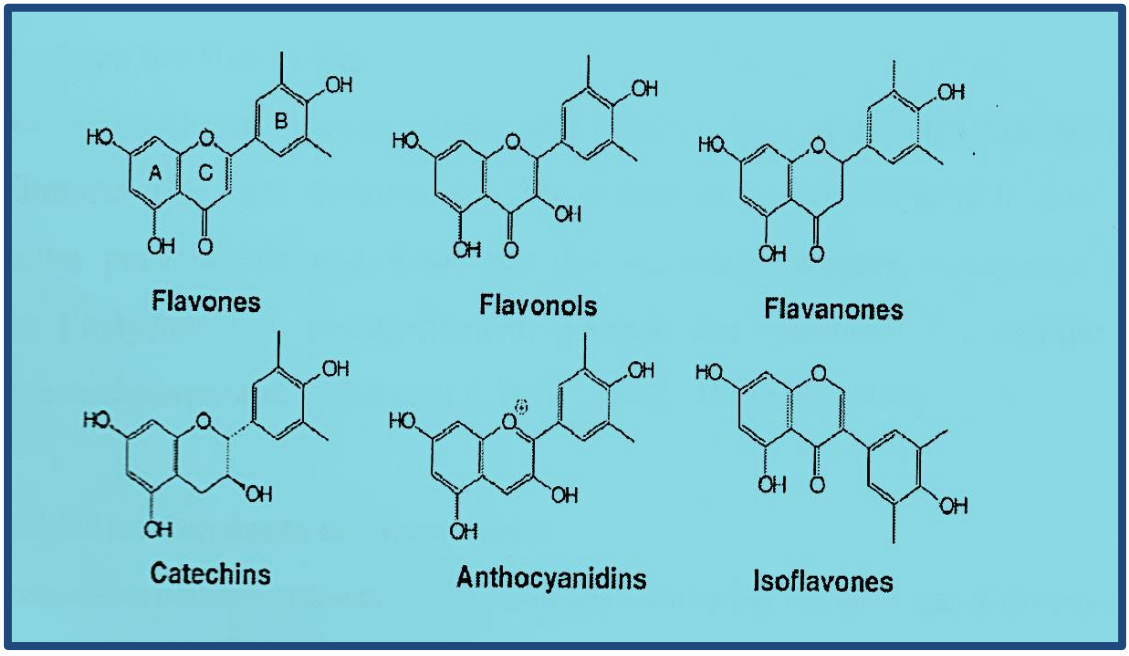
تؤدي اللافونويدات دور وقائي للنباتات اتجاه العديد من الفطريات والحشرات وأيضا حمايتها من الأشعة فوق البنفسجية. بناء المركبات الفلافونويدية يتم ابتداء من مركب مشترك هو tetrahydroxychalcone 4',2',4,6 الشكل(12) (Bruneton, 1999).



الشكل (12): بنية مركب 4, 6'4', 2', tetrahydroxychalcone

(Bruneton, 1999)

يتم أيض tetrahydroxychalcone 4',2',4,6' إلي مختلف أقسام الفلافونويدات تحت تأثير الأنزيمات، هذه الأقسام موضحة في الشكل(13) (Bruneton, 1999).



الشكل (13): أقسام الفلافونويدات ((Bruneton, 1999 ; Hollman, 2004).

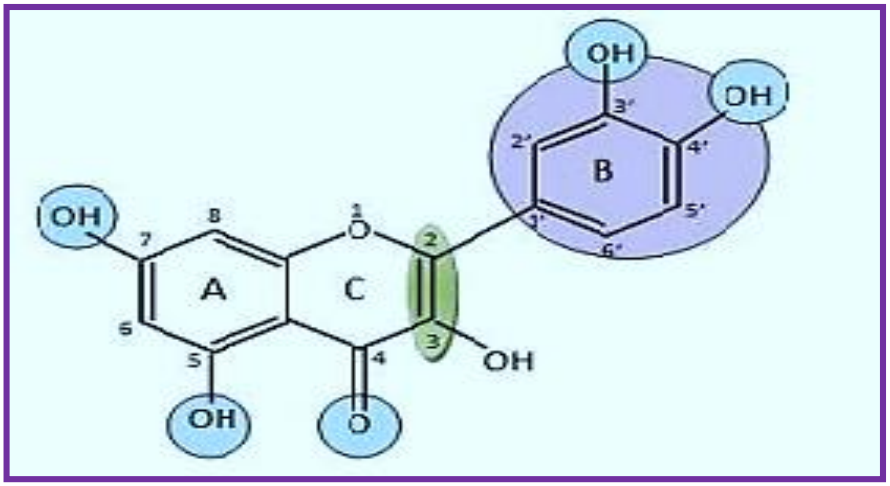
أكدت البحوث والدراسات العلمية التي أجريت على الحيوان أو مخبريا أن الفلافونويدات لها تأثيرات علاجية في كثير من الأمراض، حيث اعتبرت كمضادات أكسدة وهذا راجع لبنيتها الكيميائية، كما اعتبرت كمضادات للبكتيريا وللالتهاب (Martinez *et al*., 2010 ; Tunon *et al*., 2009). أثبتت البحوث التي أجريت من قبل Hooper (2008) أن الفلافونويدات تحمي من أمراض القلب والأوعية،

كذلك تلعب دور مهيم في حماية الجسم من أمراض السرطان، كما تؤكد النتائج العلمية التي توصل لها (Saif *et al*., 2009) دورها في حماية الجهاز العصبي من الأمراض المختلفة مثل أمراض التلف العصبي، كما اعتبرت كمضادات بكترية (Alvarez *et al*., 2008 ; Ahmad *et al*., 2000).

3 -1- 2- 5 الكرسيتين (Quercétine)

يعتبر الكرسيتين جزيء مهم من عائلة الفلافونويدات ينتمي إلي قسم flavonole تعتمد وظيفته المضادة للأكسدة على بنيته الكيميائية فوجود مجموعة الهيدروكسيل في الوضعية 3-OH من الحلقة C تمنح الفلافونويد قدرة كبيرة علي تثبيط الأكسدة الفوقية للبيدات، كما أن مجموعة الكربونيل في الموقع C4 و وجود الرابطة المزدوجة ما بين الكربون 2 و3 في الحلقة C يلعب دور مهم في النشاط المضاد للأكسدة ،كما تلعب مجموعة catechol في الحلقة B دورا مهيم في النشاط القانص للجذور الحرة، كما يزداد النشاط القانص لجذر الهيدروكسيل بارتفاع عدد مجاميع الهيدروكسيل في الحلقة B، بنية الكرسيتين و العناصر الأساسية للوظيفة المضادة للأكسدة موضحة في الشكل (14)

(Van Acker *et al*., 1996 ; Hollman, 2004 ; Ahmed *et al*., 2011)



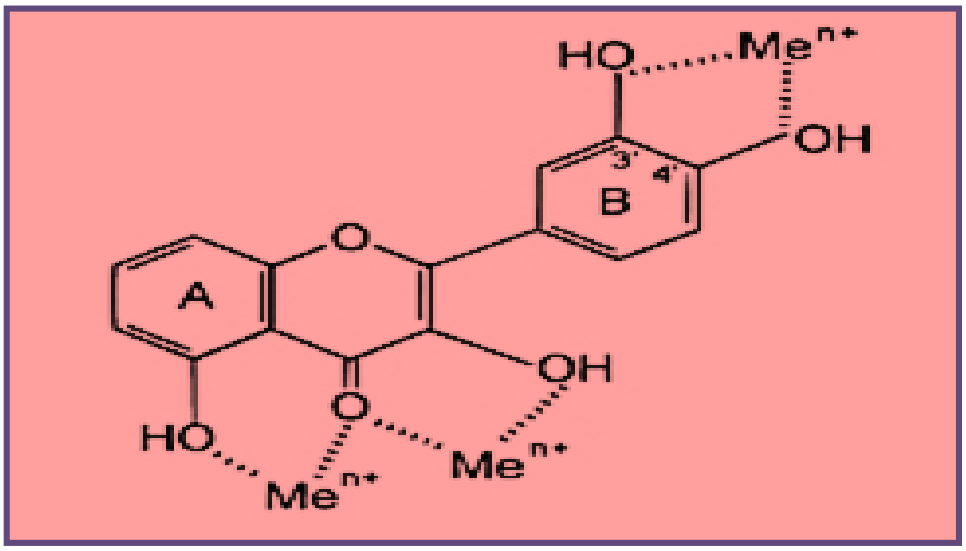
الشكل (14): البنية الجزيئية Quercétine والعناصر الأساسية للوظيفة المضادة للأكسدة (Cazarolli *et al*., 2008).

6-2-1-3 تأثير الفلافونويدا ت على إنتاج ل ROS

يمكن للأيونات المعدنية المتواجدة في أعضائنا مثل: الحديد والنحاس يمكنها أن تكون مصدرا لإنتاج الجذور الهيدروكسيلية الجد نشطة وذلك انطلاقا من النوع الأقل نشاطا H_2O_2 حسب تفاعل fenton.

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

تتميز الفلافونويدات بقدرتها على ربط المعقدات المستقرة مع الأيونات المعدنية وحينئذ لها قدرة تثبيط تفاعل Fenton وكذلك عرقلة إنتاج ROS. إذن تعتبر الفلافونويدات كرابط جيد لهذه الأيونات المعدنية ويمكن تلخيص المواقع لربط الأيونات المعدنية في الشكل(15) (Milane, 2004).



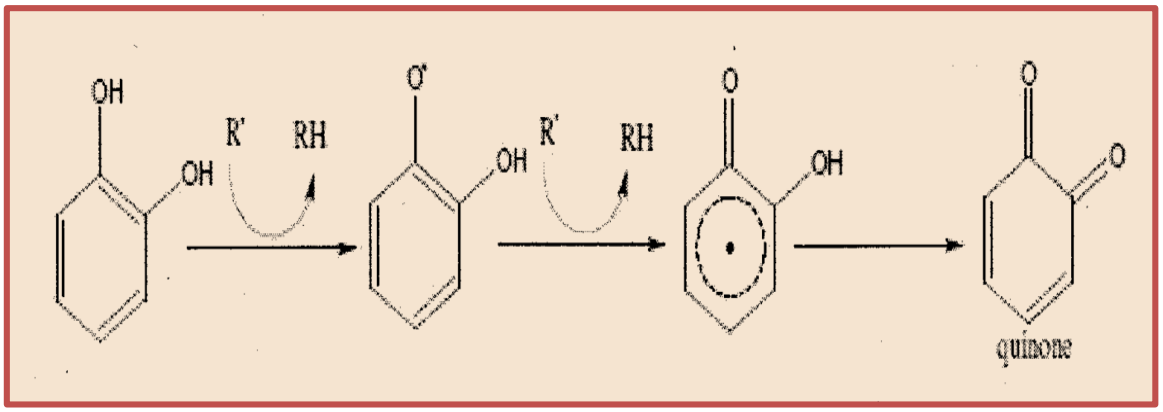
الشكل (15): الفلافونويدات ومواقعها المقترحة لربط الأيونات المعدنية (Me^{+n}) (Milane, 2004).

بالإضافة إلى ذلك الفلافونويدات قادرة على التقليل من الجذور المؤكسدة مثل: O_2°- و ROO° وذلك بنقل الهيدروجين كما هو موضح في التفاعل التالي.

$$FL\text{–}OH + R^\circ \longrightarrow FL\text{–}O^\circ + RH$$

يمكن للجذر (FL-O°) التفاعل مع جذور أخرى من أجل تشكيل بنية quinone المستقر هذا التفاعل مسؤول عن التأثير peroxydant للفلافونويدات الشكل(16).

(Scalbert *et al.*, 2005 ; Van Acker, 1996).



الشكل (16): اقتناص الجذور الحرة بواسطة الفلافونويدات (Van Acker, 1996).

4- السمية العصبية بواسطة الأكسدة التي تسببها الملوثات العضوية الدائمة

تشير الدراسات الحديثة أن التعرض للمبيدات يسبب الإجهاد الأوكسيدي بواسطة مجموعة الجذور الحرة المتشكلة وبالتالي تحريض أكسدة الدهون في أنسجة الثدييات، بالإضافة إلى أنها تعتبر من العوامل الرئيسية وراء تلف الخلايا العصبية في أمراض الجهاز العصبي كمرض Parkinson.

(Lee *et al*., 2012 ; Verrna *et al*., 2009). كما أشارت العدد من الدراسات لدور المبيدات والهيدروكربونات متعددة الحلقات في تأخر النمو داخل الرحم وأيضا عيوب النمو لاسيما النمو العصبي أثناء التعرض قبل الولادة وتعرض حديثي الولادة وهذا نتيجة الإجهاد الأوكسيدي بواسطة مجموعة الجذور الحرة المتشكلة بهذه المواد (Perera *et al*., 2009 ; Ahmed *et al*., 2000).

على سبيل المثال توصل Soltkin *et al* (2013) في دراساتهم إلى وجود علاقة مباشرة ما بين التعرض للمبيدات الحشرية مثل Chlorpyrifos وانخفاض حاصل للذكاء عند الأطفال بين 5 و 10 سنوات، وقد أظهرت الدراسات التجريبية العجز في سلوك وقدرات التعلم التي أجريت على الفئران المعرضين في الرحم أو عن طريق الرضاعة لأنواع مختلفة من الملوثات العضوية الدائمة كالمبيدات الكلوروعضوية والهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات، وهذا نتيجة انخفاض عدد الخلايا العصبية والأبعاد المورفولوجية لمناطق الدماغ المختلفة وزيادة معدل منحنى موت الخلايا العصبية بسبب تأثير الجذور الحرة الناتجة عن هذه المواد (Lee *et al*., 20013 ; Ahmad *et al*., 2008).

كما أفاد Paul *et al* (1995) إلى حالة الإجهاد التأكسدي الناجم عن تعرض جرذان التجارب بعد الولادة للأندوسلفان، إضافة لذلك يمكن أن يسبب التعرض للملوثات العضوية قبل وبعد الولادة أثارا مرضية متأخرة تصبح واضحة في سن البلوغ، على سبيل المثال يسبب تعرض فئران التجارب بعد الولادة لخليط من HAPs التوتر والقلق وخلل في القدرات المعرفية والحركية، يرافقه على المستوى

الجزيئي نقص الأيض وانخفاض نشاط Cytochrome oxydase وتغيرات التعبير الجيني على مستوى الاستنساخ (Crepeaux *et al.*, 2012; Gilbert *et al* 2013; Ahmad *et al*.,2003) .

الفصل الثاني

الوسائل والطرق المستعملة

الوسائل والطرق المستعملة

1- المواد المستعملة

1-1- المستخلص الخام لقشور البرتقال

استخدمنا في هذا الجزء قشور البرتقال المتحصل عليها من السوق المحلية، قمنا بعملية الاستخلاص حسب طريقة Bruneton (1993). التجفيف كان بطريقة طبيعية بعيدا عن أشعة الشمس والرطوبة. نضع 400غ من المسحوق في 4 ل من محلول (2 : 8 hydro-éthanolique) لمدة خمسة أيام، نرشح ونمرر المحلول المتحصل عليه في جهاز التبخير الدوراني، الجزء المتحصل عليه نعامله بجهاز lyophilisateur للحصول على المسحوق الخام.

1-2- الأندوسلفان و النفثالين: استخدمنا في التجارب الأندوسلفان والنفثالين التجارية

1-3- الكرسيتين والفيتامينات: تحصلنا على الكرسيتين من مؤسسة (Sigma-Aldrich) والفيتامينات من الصيدلة

1-4- حيوانات التجارب

استعمل في هذه الدراسة اناث الجرذان Albinos Wistar يتراوح وزنها ما بين 155 إلى 199 غرام. تم الحصول عليها من معهد باستور بالجزائر العاصمة و رعايتها في مستودع الحيوانات بكلية علوم الطبيعة و الحياة بجامعة جيجل. كانت الإضاءة في هذا المستودع طبيعية أما درجة الحرارة فتراوحت ما بين 22-24°م. قدم لها غذاء محضر من طرف الديوان الوطني لتغذية الأنعام بقصر البخاري. تركت الحيوانات قبل بدء التجربة لمدة 10 أيام للتأقلم في المستودع. وبعد ذلك تمت معاملة الحيوانات بمختلف المواد عن طريق الفم ولمدة 6 أيام وكان توزيع المجموعات الحيوانية كالاتي.

1-4-1- سمية Nap و END على الخلية العصبية لدي إناث الجرذان.

قسمت الجرذان المستعملة في هذه التجربة الي أربع مجموعات كل مجموعة مكونة من 6 حيوانات أي (n=6) حيث

- **المجوعة الشاهدة: (n=6)** حيث يتم اعطائها جرعة من زيت الزيتون 1مل.
- **المجموعة END: (n=6)** تعطي لها جرعة من END تقدر ب 2mg /kg .
- **المجموعة Nap: (n=6)**أعطي لهذه المجموعة بجرعة من Naphtalène بجرعة 50mg/kg.

❖ **المجموعة END+Nap:** (n=6) أعطي لهذه المجموعة جرعة من ال END، Nap وبمقدار 4 mg/kg و 50mg/kgعلى التوالي.

1-4-2- دراسة الدور الوقائي للكرسيتين (Quercétine) إتجاه الأثر السمي للأندوسلفان على الخلية العصبية.

قسمت حيوانات هذه التجربة الي ثلاث مجموعات كل مجموعة مكونة من 6 حيوانات أي (n=6) حيث

❖ **المجوعة الاولى الشاهدة Témoin**: وهي المجموعة الغير معاملة حيث يتم اعطائها 1 مل من زيت الزيتون.

❖ **المجموعة الثانية END :** و هي تلك المعاملة بمبيد الاندوسلفان بجرعة تقدر ب 2mg/kg.

❖ **المجموعة الثالثة END+Que:** تعامل هذه المجموعة بكل من الـ END وQue بجرعات 2 mg/kg و10 mg/kg على التوالي.

1-4-3- تقييم الأثر السمي للأندوسلفان والنفثالين على المعايير البيوكيميائية والمناعية للجهاز الدموي والدور الوقائي لكل من VitE, VitC, Quercétine والمستخلص الفينولي لقشور البرتقال.

قسمت الجرذان المستعملة في هذه التجربة إلى 8 مجموعات كل مجموعة مكونة من 6 حيوانات أي (n=6) حيث عوملت بمختلف المواد عن طريق الفم لمدة 8 أيام وفق المخطط التالي.

- المجوعة الاولى الشاهدة Témoin **:** ويتم اعطائها 1 ملل من زيت الزيتون.

- المجموعة الثانية END : عوملت بجرعة من Endosulfan تقدر ب 4ملغ /كلغ.

- المجموعة الثالثة Nap: عوملت بجرعة من Naphtalène تقدر ب 50 ملغ /كلغ.

- المجموعة الرابعة END+Nap : عوملت بجرعة من كل من Endosulfane و Naphtalène تقدر ب 4 ملغ/كلغ و50/كلغ على التوالي.

- المجموعة الخامسة END+ Nap+ VC :عوملت بالفيتامين C بجرعة 8.3 ملغ/كلغ وبعد 30 دقيقة عوملت ب Endosulfan و Naphtalène بجرعة 50 ملغ/كلغ و4 ملغ/كلغ على التوالي.

- المجموعة السادسة END+Nap+ VE: عوملت بالفيتامين E بجرعة 100ملغ/كلغ وبعد 30 دقيقة ب Endosulfane و naphtalène بجرعة 4ملغ/كلغ و50 ملغ/كلغ على التوالي.

- المجموعة السابعة END+Nap+ Que : عوملت بـ Quercetine بجرعة 10ملغ/كلغ وبعد 30 دقيقة ب Endosulfane و naphtalène بجرعة4 ملغ/كلغ و50ملغ/كلغ على التوالي.

- المجموعة الثامنة END+Nap+EXT: عوملت هذه المجموعة بالمستخلص النباتي بمقدار 100ملغ/كلغ وبعد 30 دقيقة ب Endosulfane وnaphtalène بجرعة4ملغ/كلغ و50ملغ/كلغ على التوالي.

2- الطرق المستعملة.

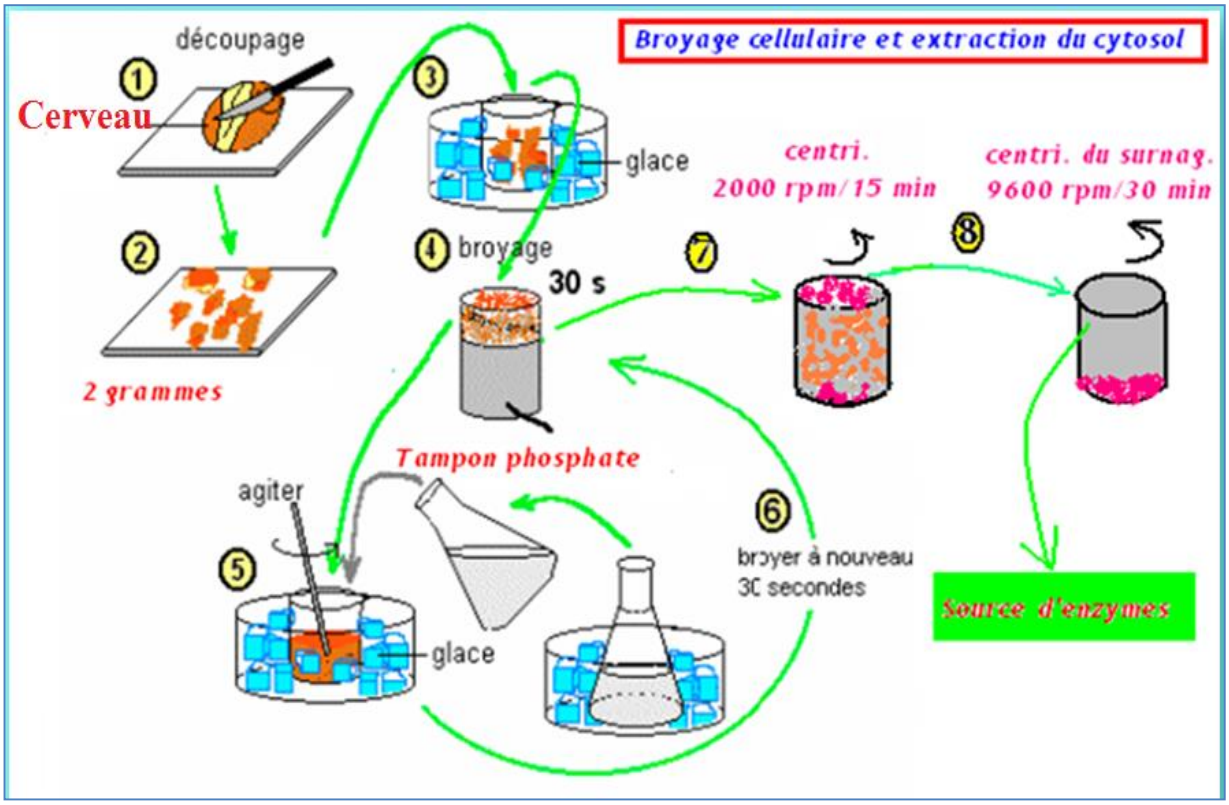
2-1- تشريح الحيوانات وأخذ عينات الأنسجة

في نهاية التجربتين الاولى و الثانية يتم تخدير و تشريح الحيوانات ثم نقوم نزع الدماغ بهدف تقدير مدى تأثير مختلف المعاملات على عناصر الجهد ألتأكسدي وقياس الإنزيمات المضادة للأكسدة .

2-2- طريقة الحصول على السيتوزول

يتم سحق 2غ من المخ مع 3أحجام من منظم الفوسفات KH_2PO4 (0.1M)، PH 7.4 تم نقوم بعملية الطرد المركزي للمسحوق الناتج بسرعة 2000 دورة خلال 15 دقيقة تحت درجة الحرارة 4°م، يسترجع الجزء الطافي ويخضع إلى الطرد المركزي بسرعة 9600 دورة/دقيقة لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة 4°م. تؤخذ الطبقة الطافية المتحصل عليها لقياس النشاط الإنزيمي والبروتينات السيتوزولية، والأكسدة الفوقية للبيدات (Iqbal, 2000).

طريقة الاستخلاص موضحة في الشكل (17).



الشكل (17): مراحل استخلاص سيتوزول الخلايا العصبية (Iqbal, 2000)

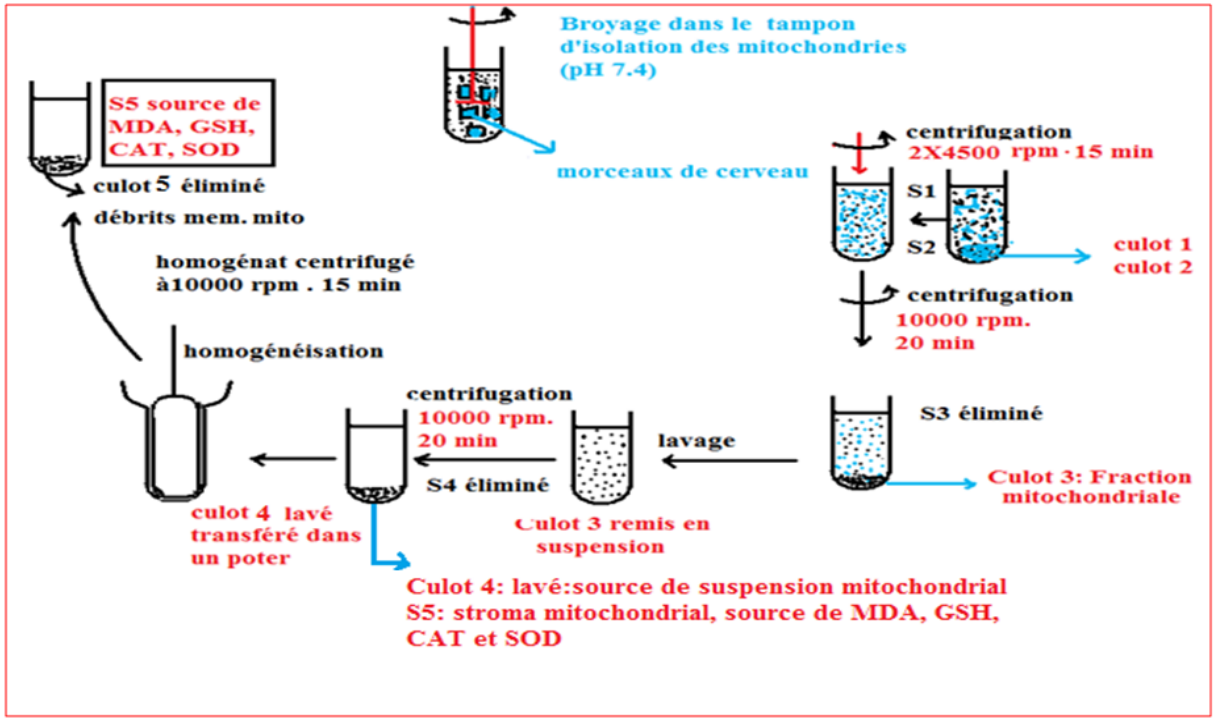
2-3- استخلاص الميتوكوندريات

تم استخلاص ميتوكوندريات الخلايا العصبية حسب طريقة (Rustin *et al.*, 1994) و(Fan *et al.*, 2000)، باختصار يتم استخراج مخ الجرذان بسرعة يغسل بواسطة محلول ملحي بارد 0,86% بهدف إبعاد كل من خضاب الدم وخلايا الدم الحمراء من أنسجة المخ، يقطع إلى قطع صغيرة وتوضع مباشرة في المحلول لمنظم (EDTA) المتكون من Tis-HCL 10mM، PH 7,4 ، 250 mM sucrose 0,5Mm ethylene diamine teta-acetic acid و يضاف إليه الألبومين المصلي 0,55%. بعد ذلك يتم سحق الأنسجة وإخضاع ناتج السحق إلى عملية الطرد المركزي ليغسل مرتين بالمحلول المنظم المذكور أعلاه ، يعلق مرة أخري بمنظم العزل والحصول على معلق من الميتوكوندريا. يتم استعمال جزء منها في دراسة تأثير END على الانتفاخ الميتوكوندري، وجزء يستعمل لاستخلاص الحشوة الميتوكوندرية .

2-4- استخلاص الحشوة الميتوكوندرية.

يتم استخلاص الحشوة المتوكندرية للخلايا العصبية انطلاقا من المعلق الميتوكندري المتحصل عليه في عملية استخلاص الميتوكندريا المذكورة أعلاه. حيث يتم تجميد المعلق الميتوكوندري فى المجمد عند - 20 °م ثم إخراجه ووضعه في درجة المختبر (24 – 22 °م) وإخضاعه للسحق بواسطة جهاز

Ultraturax بهدف إتلاف الأغلفة الميتوكوندرية مع إعادة هذه العملية عدة مرات ثم تخضع العينات إلى عملية الطرد المركزي وذلك لإبعاد أجزاء الأغلفة الحيوية واسترجاع الطبقة الطافية التي ستكون مصدر الإنزيمات المضادة للأكسدة CAT وSOD وكذلك مصدر MDA , GSH الشكل (18).



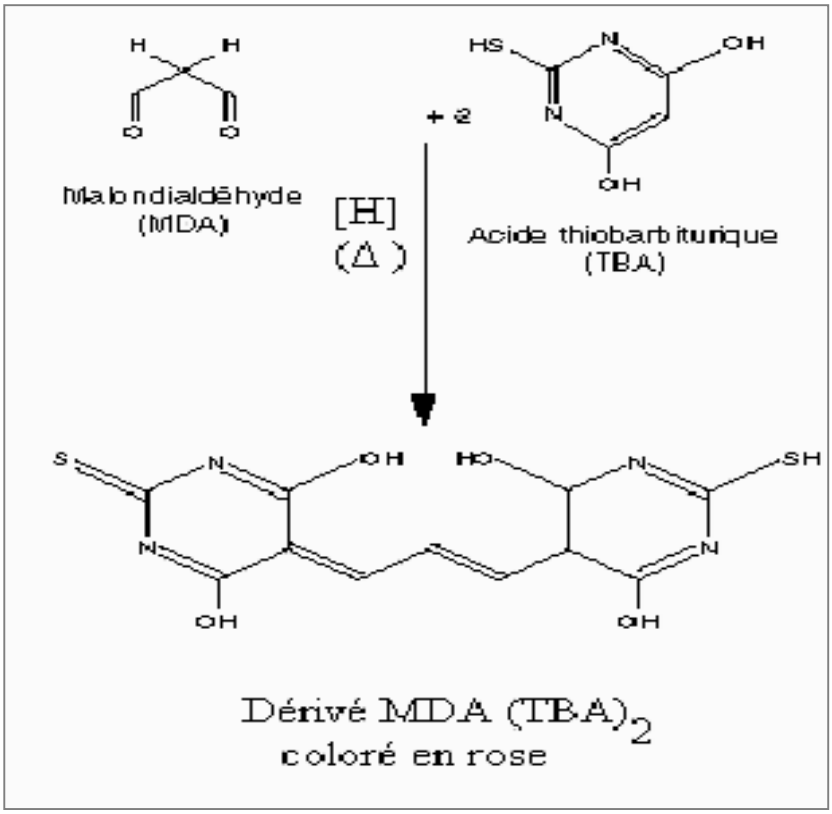
الشكل (18): استخلاص الحشوة الميتوكوندرية للخلايا العصبية

.(Fan *et al.*, 2000 ; Rustin *et al.*, 1994)

5-2- تقدير العوامل المؤشرة للتوتر الأوكسيدي في سيتوزول و ميتوكندريات الخلايا العصبية

1-5-2- تقدير تركيزMDA

يتم تقدير الأكسدة الفوقية للدهون في النسيج العصبي بقياس مستوي MDA حسب طريقة (Okhawa *et al.*, 1979) حيث تعتمد هذه الطريقة علي التقدير اللوني TBAR اذ تتفاعل جزيئهMDA مع جزيئيين من TBA في وسط حامضي PH: 2-3 ودرجة حرارة 100 درجة مئوية لمدة 45 دقيقة. حسب التفاعل الآتي:

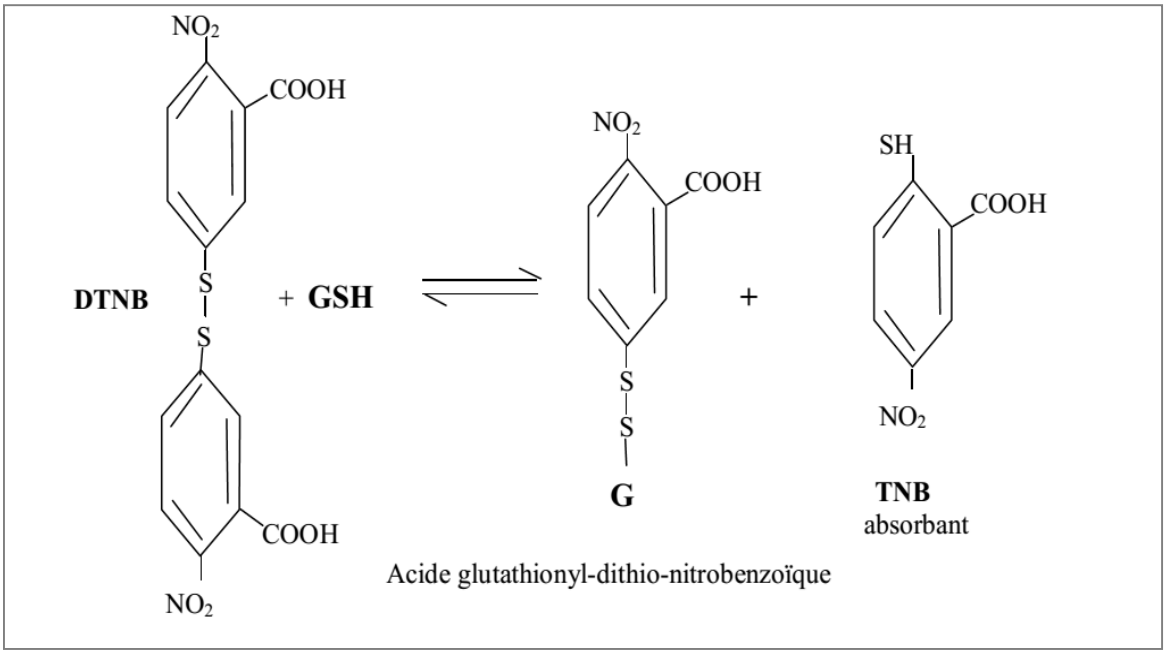


حيث يمكن استخلاص ناتج التفاعل بواسطة مذيب عضوي مثل كحول *n*-Butanol، و يمتص الناتج ذو اللون الوردي عند طول موجة 530 نانومتر(Okhawa *et al.*, 1979).

باختصار يؤخذ 0.5ml من السيتوزول أو حشوة الميتوكونديريا المتحصل عليهما سابقا تم يضاف 0.5ml TCA (20%) و1ml TBA (0.67%). يتم تسخين الخليط الناتج إلي 100°م لمدة 15 دقيقة، وبعد تبريده يضاف إليه 4ml من *n*-butanol، وتجرى عملية الطرد المركزي بسرعة 3000 دوره/دقيقة، تقرأ بعد الكثافة الضوئية للطبقة الطافية بواسطة جهاز Spectrophotomètre عند طول موجة 530 nm. يستعمل 1,1,3,3Tetraethoxypropane كمعيار بعد إماهته إلى Malon dialdéhyde . تحسب وحدة MDA بالنانومول / غ نسيج .

2-5-2- تقدير الـ Glutathion

يتم معايرة الـ GSH بطريقة (Ellman, 1959). تعتمد هذه الطريقة على أكسدة GSH بواسطة حمض 5,5 – Dithiobis-2-nitrobenzoique (DTNB) مما يؤدي إلى تشكل (TNB) Thionitrobenzoique. حيث يتميز هذا الأخير بلون شديد الاصفرار مما يسمح تقديره بواسطة جهاز Spectrophotomètre عند طول موجة 412 nm حسب التفاعل التالي:



يضاف 0.5ml من TCA (10%) إلى 0.5 ml من العينة (السيتوزول أو الحشوة الميتوكوندرية)، ترج لمدة 15الدقيقة. بعد ذلك يتم إخضاع الأنابيب لعملية الطرد المركزي لمدة 5 دقائق وبسرعة 2000 دورة/في الدقيقة.

يتم وضع في أنبوبة اختبار 0.1 ملل من محلول Ellman يضاف إليه 1.7 ملل من محلول المنظم الفوسفاتي و 0.2 ملل من الطبقة الطافية المحضرة مسبقا، تسجل الكثافة الضوئية بعد 5 دقائق من التفاعل عند طول موجة 412 نانومتر ضد أنبوب blanc محضر في نفس الشروط ويتم تشكيل منحني معياري ل GSH واستعماله لتحديد تركيز GSH النسيجي.

2-5-3- تقدير النشاط الإنزيمي للـ Catalase

يتم تقدير نشاط الـ Catalase في سيتوزول وحشوة ميتوكوندريا الخلايا العصبية، حسب طريقة (Clairborne, 1985) حيث تعتمد هذه الطريقة على انخفاض الامتصاصية عند طول موجة 240 نانومتر بسبب تفكك H_2O_2 حسب التفاعل الآتي:

يتم وضع 50µl من المصدر الإنزيمي (السيتوزول، الحشوة الميتوكوندرية) في أنبوبة اختبار،ويضاف إليه 2.95ml من محلول H_2O_2 بتركيز(19mMol/ml) محضر في المحلول المنظم الفوسفاتي (KH_2PO4, 0.05M, PH7). يتم متابعة تغير الامتصاصية على طول موجة 240 nm خلال الدقيقة الأول والثانية وذلك بأخذ قيمة الامتصاص الضوئي عند الزمن t0 تم بعد كل دقيقة . يتم حساب النشاط الأنزيم بالوحدة الدولية لكل دقيقة ولكل غرام بروتين (UI /min /g de protéine) حسب المعادلة الآتية :

UI /g= (2,3033/ T) X (1Og A1/A2)/g de protéine

A1 : الامتصاص عند الدقيقة الأولي. A2 : الامتصاص عند الدقيقة الثانية.

T: الفاصل الزمني .

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

2-5-4- تقدير نشاط أنزيم SOD

SOD عبارة عن بروتين معدني ذو نشاط أنزيمي، يمنع تشكل جذر الهيدروكسيل انطلاقا من أنيون فوق الأكسيد حيث يحفز تحويل $O^{\cdot}_2$ إلى H_2O_2 كما هو موضح في التفاعل التالي:

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

تم تقدير نشاط SOD في السيتوزول و الحشوة الميتوكوندرية حسب طريقة (Beauchamp and Fridovich, 1971) ، حيث تعتمد هذه الطريقة على قدرة هذا الأنزيم علي تثبيط تفاعل ما بين مركب nitroblue-tétrazolium (NBT) والأنيون $O_2^{\cdot-}$ الناتج عن التفاعل الضوئي ما بين O_2 و Riboflavin في وجود مانح للإلكترون مثل Méthionine كما في التفاعل الآتي:

Riboflvine + O_2 ⟶ $O^{\cdot}_2$

Superoxyde+NBT ⟶ Formazan

إذا فإرجاع NBT بواسطة $\bar{O}^{\cdot}_2$ إلى Formazan يمكن متابعته بواسطة قياس الامتصاصية الضوئية عند طول موجة 560nm وتعرف وحدة نشاط SOD بكمية الأنزيم التي بإمكانها تثبيط 50% من إرجاع NBT إلى Formazan. ولمعايرته يتم تحضير وسط تفاعلي يحتوي على 1مل من Cyanide de sodium NaCN (0.01M)، 0.1ml من محلول (NBT 0.176 mM) ، 1ml من EDTA (66Mm) و0.1 من محلول Riboflavine (0. 002Mm) والمحلول المنظم الفوسفاتي

(KH_2 PO_4 , PH 7. 2) ثم يضاف لهذا الوسط التفاعلي 5µl من عينة السيتوزول أو عينة الحشوة الميتكوندرية 0,1µl من محلول (Méthionin (1M.

يحضر أنبوب (contrôle) يحتوى على محلول منظم الفوسفات في نفس الظروف التجريبية لأنابيب العينات. يتم تعريض الأنابيب إلى أشعة ضوئية لمصباح شدته 15 Watts خلال 10دقائق ثم يتم قراءة الكثافة الضوئية للأنابيب عند طول موجة 560 nm باستعمال cuve من كوارتز، يحسب النشاط الأنزيمي SOD وذلك بحساب نسبة التثبيط .

$$\% \ d'inhibition = (DO_{contrôle} - DO_{échantillon} / DO_{contrôle}) \ x \ 100$$

يحسب النشاط الأنزيمي لـ (SOD (µl/ml بضرب نسبة التثبيط في 6,35 ويعبر عن النتائج عندئذ وحدة دولية/غ بروتين.

2-5-5- تقدير كمية البروتينات

تم معايرة البروتينات حسب طريقة (Lowry, 1951) والتي تعتمد علي تفاعلين كيميائيين. فالأول عبارة عن تفاعل Biuret حيث تتفاعل الروابط الببتيدية الموجودة في البروتين مع أيونات النحاس في وسط قاعدي أما الثاني فهو إرجاع المفاعل

(phosphomolybdique-phosphotungastique) (*Folin – ciocalteu*) بواسطة البروتين المعامل بأيونات النحاس.

يتم قياس الكثافة الضوئية للمادة اللونية الناتجة بعد التفاعلات المذكورة عند طول موجة 750nm ثم يتم حساب تراكيز البروتينات بـ mg/g tissu باستعمال المنحني المعياري Albumine sérum bovin (BSA) .

2-5-6- تقدير نشاط Glutathion S–transférase

تم تقدير نشاط هذا الأنزيم حسب طريقة (Habig *et al.*, 1974)، حيث تعتمد هذه الطريقة علي تعريض هذا الأنزيم لمادة تفاعل (CDNB) Chlorodinitro benzène التي تتفاعل مع العديد من أشكال أنزيم GST وGSH باختصار يتم تحضير خليط مشكل من 850µl Tampon phosphate (PH 6.5),(0.1M) و 50µl من CDNB (20Mm) ويحضن هذا الخليط لمدة 10د عند 37°م و يتم التفاعل عند إضافة لهذا الخليط 50µl من محلول GSH (20Mm) و50µl من عينة السيتوزول. تحضر أنبوبة شاهدة في نفس الظروف، تحتوي على المحلول المنظم الفوسفاتي. تقاس الكثافة الضوئية عند طول موجة 340nm كل دقيقة خلال 5 دقائق تحسب النتائج من العلاقة

$$K = (DO_{échantillon} - DO_{contrôl}) \times 100 / (9.6 \times 0.05)$$

2-5-7- دراسة الانتفاخ المتوكوندري

تم تقدير الأثر السمي للـ END على الانتفاخ الميتوكوندري حسب (Kristal *et al.*, 1996) وذلك بقياس الكثافة الضوئية للمعلق الميتوكوندري المتحصل عليه من النسيج العصبي مباشرة بعد استخلاصه بتركيز 1ملغ/مل وتحضينه في حجم نهائي 1.8مل من (EDTA) مضافا إليه 10.8ميكرولتر من Succinate (6Mm)، بعد 1 د من التحضين يضاف إليه (18 µl) من الأندوسلفان لحث الإنتفاخ الميتوكندري بتركيز (0-200-300-400 µM) لوحده أو مع الكرسيتين (200µM). يتم بعد ذلك قياس الكثافة الضوئية عند طول موجة 540nm باستعمال جهاز spectrophotomètre لكل دقيقة خلال 5 دقاق. (UV-vis mini 1240 spectrophotometere SHIMADZU, China).

2-6- أخذ عينات الدم

في نهاية التجربة الثالثة تم أخذ عينات الدم من الزاوية الإنسية للعين (retro-orbital-sinus) وهذا بعد صيام الجرذان لمدة 12سا حيث تؤخذ البلازما للمعايرة البيوكيميائية لكل من الجلوكوز، الكولسترول الكلي الجليسريدات الثلاثية، الكرياتنين واليوريا ومستوى كل من (Alanine Aminotransferase (ALT و (Aspartate Aminotransferas AST)، كما تؤخذ عينات أخرى من الدم وتوضع في أنابيب تحتوي علي المادة المانعة للتجلط اي الهيبارين (Tube héparines) لتقدير المعاير الدموية والمناعية (FNS)، التقدير الكلي للكريات الدموية البيضاء (Globule Blanes) والتقدير الكلي للمفاويات (Lymphocyte) والخلايا المناعية أحاديات النواة (Monocyte) والخلايا المناعية الحبيبية (Granolocyte) والخلايا المناعية القاعدية (Basophiles) والخلايا المناعية المعتدلة (Nitrophile) والخلايا المناعية الحامضة (Eosinophiles) وتقدير كريات الدم الحمراء والهيموغلوبين.

2-6- 1- تقدير الخلايا المناعية وكريات الدم الحمراء والهيموغلوبين

تم تقدير مجموع الخلايا المناعية و كرات الدم الحمراء و الهيموجلوبين باستعمال جهاز الهيموغرام L'appareil d'hémogramme بمخبر التحاليل بمستشفى الميلية ولاية جيجل.

2-6-2- تقدير المعايير البيوكيميائية

تم تقدير المعايير البيوكيميائية في مخبر التحاليل بمستشفى الميلية ولاية جيجل.

2-6-2-1 - تقدير تركيز الجلوكوز

تمت معايرة جلوكوز حسب طريقة Kaplan *et al* (1984) حيث يؤكسد أنزيم Glucose oxydase الجلوكوز إلى حمض Gluconique مع تكوين الماء الأكسجيني، يعمل إنزيم البيروكسيداز (peroxydase) على تنشيط أكسدة 4-Aminophenasone الموجود في محلول المعايرة في وجود الماء الأكسجيني لتكوين مركب Quinone أحمر اللون، تتناسب شدته مع تركيز الجلوكوز في العينة عند طول الموجة 505 نانومتر حسب المعادلات التالية:

$$\text{D-Glucose} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Glucose oxydase}} \text{Acide Gluconique} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{phenol} + \text{4-Aminophenazone} \xrightarrow{\text{Peroxydase}} \text{Quinone} + H_2O_2$$

نأخذ 10ميكروليترمن المصل ونضيف لها 1مل من مواد التفاعل المتكونة من Aminophenazone (10 u/l) و peroxydasse (1000 u/l) و Glucose oxydase (2,6mmol) بالإضافة Tampon Tris PH7 (100mmol/l) و phénol(0,3mmol) .

يحسب تركيز الجلوكوز بالمعادلة التالية

$$\text{Glucose (g/l)} = \frac{\text{D.O Echantillon}}{\text{D.O standard}} \text{ , n=1}$$

2-6-2-2- تقدير تركيز اليوريا

تم تقدير تركيز اليوريا باستعمال طريقة Balleterl et *al* (1961). يعامل المصل بإنزيم Urease فيتم تحرير الكاربونات والأمونيوم، تتفاعل أيونات الأمونيوم المتحررة مع Salicylate و Hypochlorite de sodium مشكلة معقد ملون بالأخضر تقرأ كثافته الضوئية عند طول الموجة 590نانومتر وفق المعادلة التالية .

$$\text{Urée} + H_2O_2 + \text{Urease} \longrightarrow 2NH_3 + CO_2$$

2-6-2-3- تقدير تركيز الكرياتينين

اعتمدنا في معايرة الكرياتينين على طريقة كل من Henry (1984) و(1972) Larsen التي يستعمل فيها حمض البكريك في الوسط القلوي حيث يتفاعل مع الكرياتنين مشكلا معقد ملون تقرأ كثافته عند طول الموجة 492nm.

2-6-2-4- تقدير تركيز الجليسيريدات الثلاثية

أتبعت الطريقة الأنزيمية اللونية لكل من (Fossati and Principe, 1982). تتم إماهة الجليسيريدات الثلاثية إلى غلسيرول وأحماض ذهنية حرة بتأثير إنزيم Lipoprotéine lipase. يتحول الجلسيرول إلى جليسيرول 3 فوسفات وADN بواسطة إنزيم Glycerol kinase وفي الخطوة الثالثة يتأكسد جليسيرول 3 فوسفات في وجود الأكسيجين تحت تأثير إنزيم Glycerol-3-phosphate oxidase إلى مركب ثنائي هيدروكسي أسيتون فوسفات و ماء أكسيجين . هذا الأخير تحت تأثير إنزيم peroxidase وفي وجود 4-Aminophenasone و p-chlorophenol يتحول إلى ماء وQuinone الوردي اللون ، تتناسب شدته مع تركيز الجليسريدات الثلاثية في العينة عند طول موجة 505 حسب المعادلات التالية :

$$\text{Triglycerides} + H_2O_2 \xrightarrow{\text{Lipoprotéine lipase}} \text{Glycerol} + \text{free fatty acids}$$

$$\text{Glycerol} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Glucerolkinase}} \text{Glycerol-3-phosphate} + \text{ADP}$$

$$\text{Glycerol-3-phosphate} + O_2 \xrightarrow{\text{Oxidase}} H_2O_2 + \text{Dihydroxyacetone phosphate}$$

$$H_2O_2 + \text{P-Chlorophenol} + \text{4-Aminophenazone} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{Quinone rose} + H_2O_2$$

2-6-2-5- تقدير النشاط الإنزيمي لكل من ALT (GPT) و AST (GOT)

2-6-2-5- 1 تقدير النشاط الإنزيمي لـ ALT(GPT)

تمت المعايرة حسب طريقة Bergmeyer *et al* (1978) وتم استخدم مواد التفاعل التالية: Tampon Tris PH 7.5 في درجة الحرارة 30 درجة مئوية، L- Alanine (500mmol/l) و ketoglutaric acid(15mmol/L)،NADH (0.18mml/L)،LDH (1200 u/L) ويتم التفاعل وفقا للمعادلات التالية :

$$\alpha\text{-ketoglutaric acid} + \text{L –Alanine} \xrightarrow{\text{GPT}} \text{L-Glutamic acid} + \text{pyruvic acid}$$

$$\text{Pyruvic acid} + NADH^+ + H^+ + \xrightarrow{\text{LDH}} \text{L- Lactic acid} + NAD^+$$

2-6-5-2- 2- تقدير النشاط الإنزيمي AST(GOT)

تمت المعايرة حسب طريقة Begmeyer *et al*(1978)باستخدام مواد التفاعل التالية:

محلول المنظم Tampon Tris (80 mmol/l)(PH 7.8) في درجة الحرارة 30 درجة مئوية aspartateL-(200mmol /l) ، NADH (0.18u/l) ، MDH (600u/l) و α -ketoglutarate (12mmol /l) ويتم التفاعل وفقا للمعادلات التالية :

Aspartate + α-ketoglutarate + GOT ⟶ Oxaloacetate + Glutamate

Oxloaceta+ $NADH^+$ +H^++MDH ⟶ MaLate +NAD^+

3- الدراسة الإحصائية

أعطيت النتائج علي شكل قيم متوسطة للمعاملات والانحراف المعياري و تم التقدير الإحصائي لمقارنة القيم المتوسطة للمعاملات باستعمال .Student test القيمة المحسوبة ل t بإمكانها تأكيد الاختلاف ما بين مختلف المجموعات والمجموعة الشاهدة مع خطر الخطأ.

p> 0 .05 = الفرق غير معنوي

0.01< P < 0.05= الفرق معنوي

0.001< p <0.01 = الفرق بمعنوية مرتفعة

p < 0.001 الفرق بمعنوية جد مرتفعة

وتم حساب هذه العناصر الإحصائية بتطبيق البرنامج *EXEL 6.0*

الفصل الثالث

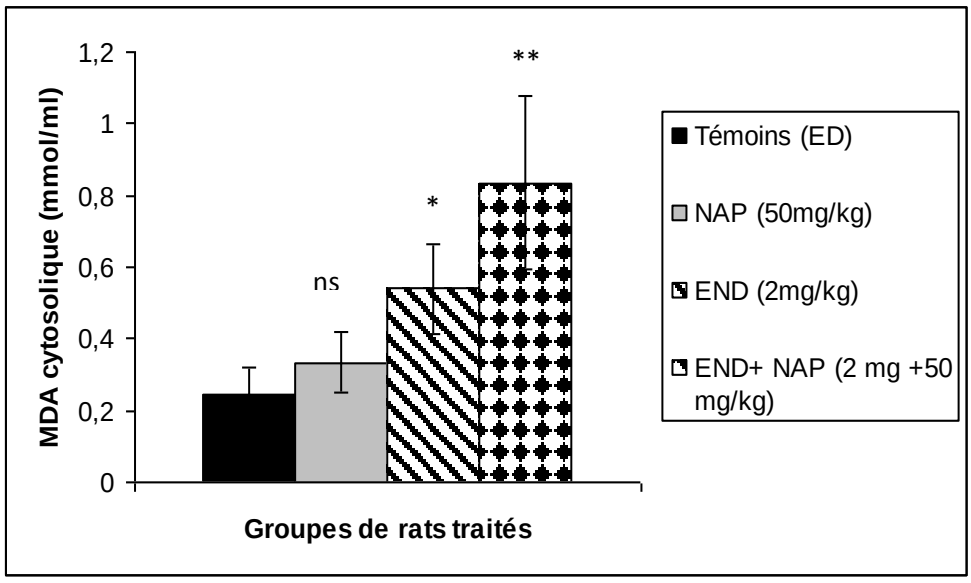
النتائج والمناقشة

النتائج والمناقشة

1- تقييم الأثر السمي لمختلف المعاملات على الإجهاد التأكسدي في سيتوبلازم الخلية العصبية.

1-1- تركيز MDA

تبين النتائج المدونة في الجدول (2) بأن المعاملات المختلفة أثرت تأثيرا متباينا على مستوى MDA في سيتوزول الخلية العصبية، حيث سجل ارتفاع غير معنوي عند مجموعة الحيوانات المعاملة بواسطة Naphtalène، وزيادة معنوية (P<0.05) ، (P<0.01) عند الجرذان المعاملة بواسطة الـEND وتلك المعاملة بكليهما END + Nap على الشكل (19)



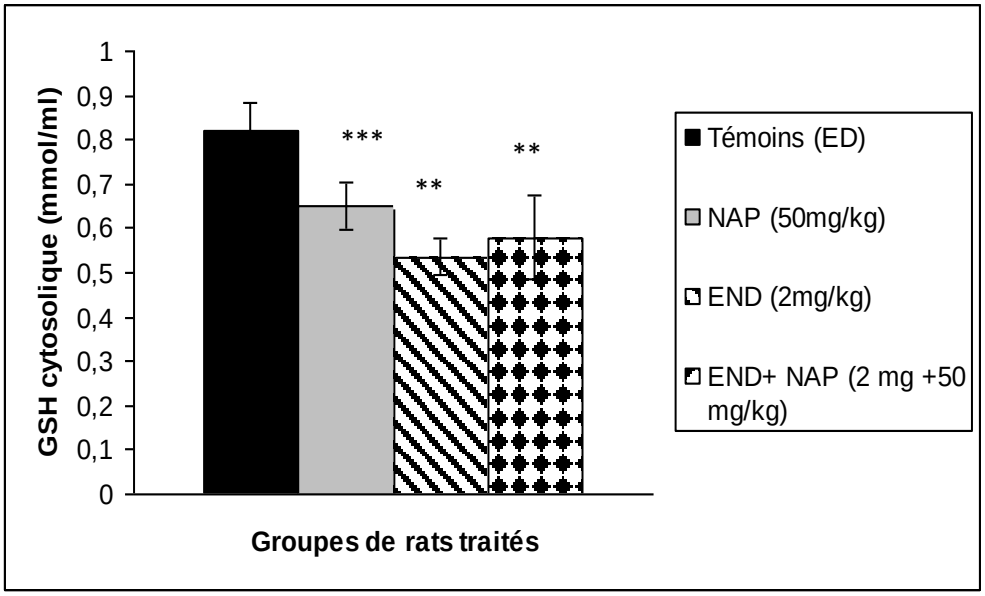
الشكل (19): تأثير مختلف المعاملات على قيمة MDA في سيتوزول الخلايا العصبية للجرذان.

القيم معبرا عنها بالمتوسط ± الانحراف المعياري، n=6 مقارنة متوسطات المعاملات بالشاهد و ذلك باستعمال اختبار *Student t . *P< 0.05 ; **P< 0.01*.

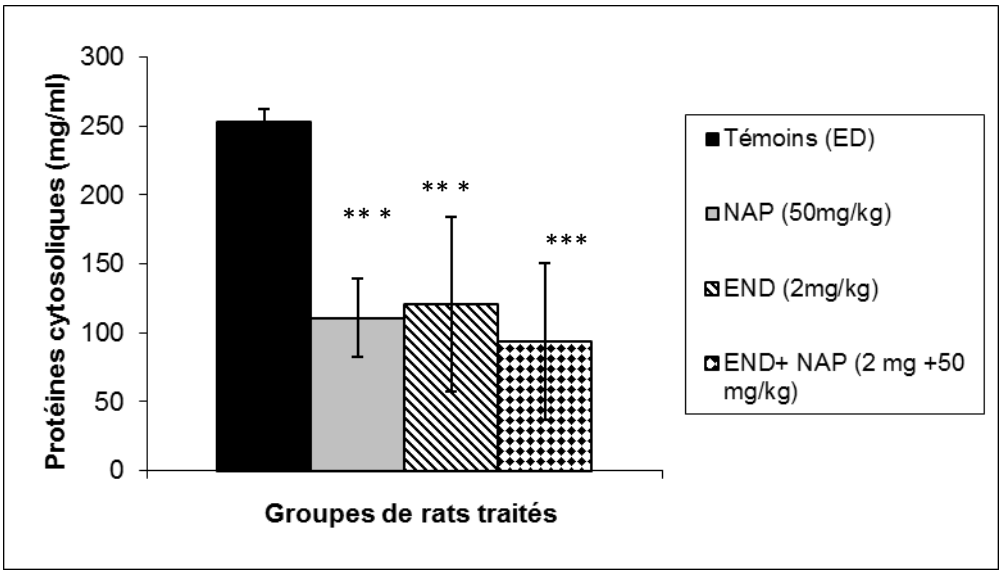
1-2- تركيزي GSH والبروتينات السيتوزولية

أدت المعاملات المختلفة الي زيادة معنوية متباينة في تركيز GSH في سيتوزول الخلايا العصبية مقارنة بالشاهد ، حيث لوحظ ارتفاع معنوي ($P<0.01$) و($P<0.001$) لدى الحيوانات المعاملة بالنفثالين ، و تلك المعاملة بالأندوسلفان، والأندوسلفان و النفثالين معا على الترتيب، الشكل (20).

بملاحظة النتائج المدرجة في الشكل رقم (21) تبين تأثر البروتينات السيتوزولية جراء المعاملة بتلك المواد السامة. حيث سجل انخفاض معنوي ($***P < 0.001$) في تركيزها لدى جميع المجموعات المعاملة بالأندوسلفان، النفثالين و النفثالين مع الأندوسلفان مقارنة بالمجموعة الشاهد.



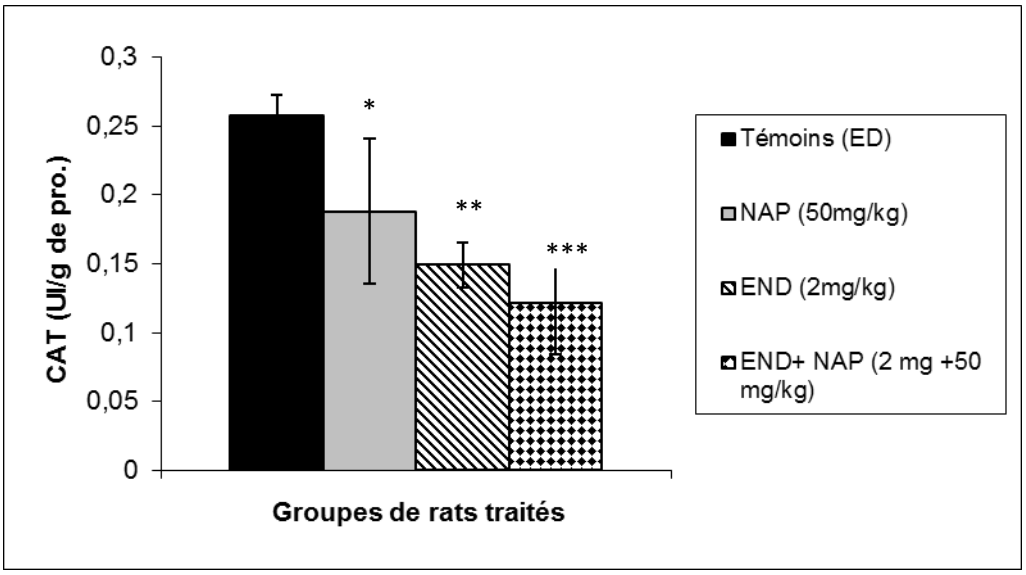
الشكل (20): تغيير تركيز GSH السيتوزولي في الخلية العصبية عند مختلف المجموعات الحيوانية القيم معبرا عنها بالمتوسط ± الانحراف المعياري، $n = 6$، مقارنة متوسطات المعاملات بالشاهد و ذلك باستعمال اختبار t Student . $***P<0.001$ ، $**P<0.01$.



الشكل (21): تغير تركيز البروتينات السيتوزولية في الخلايا العصبية عند مختلف المجموعات الحيوانية، القيم معبرا عنها بالمتوسط ± الانحراف المعياري، . n = 6، مقارنة متوسطات المعاملات بالشاهد ، باستعمال اختبار *t* Student ***$P<0.001$

1-3- نشاط إنزيم Catalase

سجل انخفاض معنوي (P< 0.05) في مستوي نشاط CAT عند المجموعة المعاملة بالنفثالين و (P<0.01) عند المجموعة المعاملة بالأندوسلفان، و (P<0.001) عند المجموعة المعاملة بالأندوسلفان زائد النفثالين مقارنة بالمجموعة الشاهدة الشكل (22).

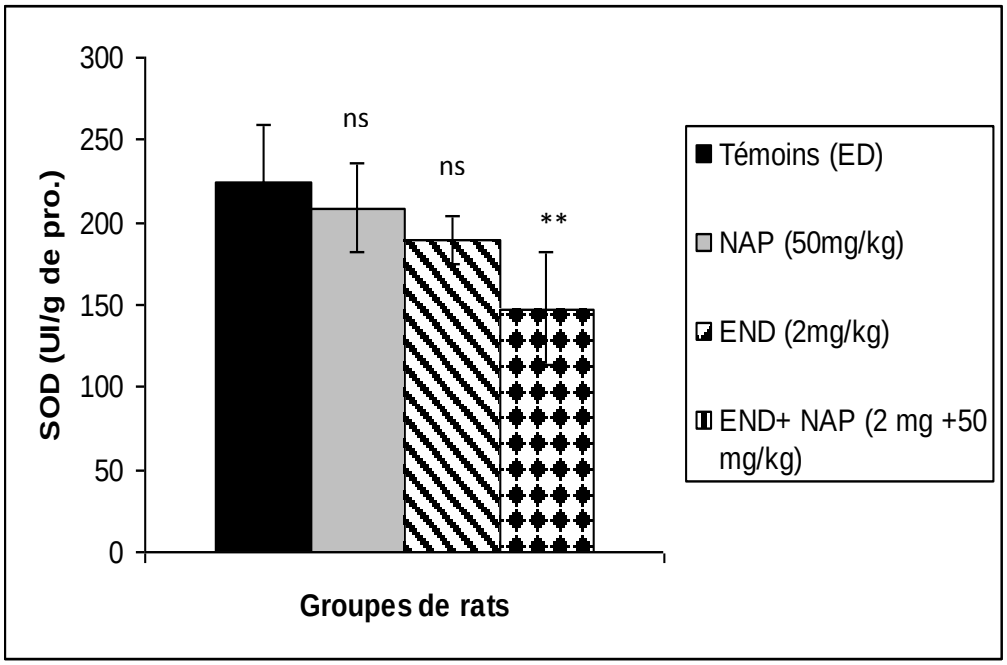


الشكل (22): تأثير المعاملات المختلفة علي نشاط أنزيم Catalase السيتوزولي في الخلايا العصبية.

القيم معبرا عنها بالمتوسط ± الانحراف المعياري، n = 6. مقارنة متوسطات المعاملات بالشاهد و ذلك باستعمال اختبار Student t، ***P < 0.001 ، ** P<0.01 ، * P<0.05.

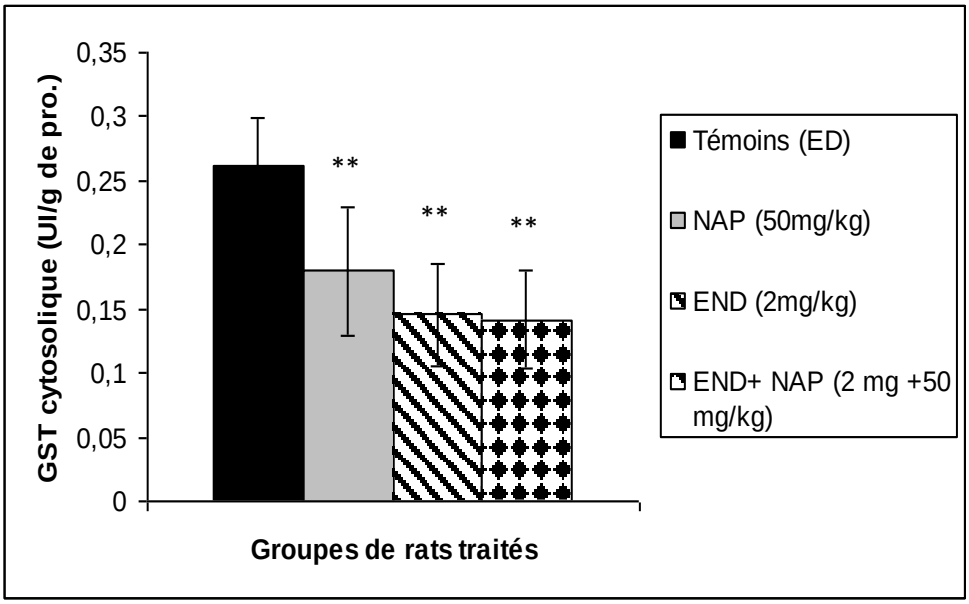
4-1- نشاط أنزيمي SOD و Glutathion S-Transférase (GST) .

يوضح الشكل (23) نتائج تقدير نشاط أنزيم SOD السيتوزولي في الخلايا العصبية عند مختلف المجموعات الحيوانية. اذ يلاحظ انخفاض غير معنوي عند مجموعتي END و NAP بقيم 208.7±27 UI/g و 188.8 ±14.503UI/g مقارنة بالمجموعة الشاهدة(224.8±34.154 UI/g) في حين انخفضت قيمة نشاط هذا الأنزيم بمعنوية عالية (P<0.01 **) عند المجموعة END+ Nap مقارنة بالمجموعة الشاهدة. في حين يلاحظ من خلال النتائج المدونة في الشكل (24) انخفاضا معنويا (P<0.01) في نشاط أنزيم GST السيتوزولي عند كل المجموعات الحيوانية المعاملة مقارنة بالمجموعة الشاهدة.



الشكل (23): تأثير المعاملات المختلفة علي نشاط أنزيم SOD السيتوزولي في الخلية العصبية.

القيم معبرا عنها بالمتوسط ± الانحراف المعياري، n = 6. مقارنة متوسطات المعاملات بالشاهد و ذلك باستعمال اختبار Student t . P < 0.01 ** ، غير معنوي Ns



الشكل (24): تغير نشاط GST السيتوزولي في الخلايا العصبية عند مختلف المجموعات الحيوانية .

مقارنة متوسطات المعاملات بالشاهد n = 6 . القيم معبرا عنها بالمتوسط ± الانحراف المعياري،
باستعمال اختبار Student t . ** P < 0.01

المناقشة

تشكل السمية العصبية بواسطة المواد السامة الخارجية بما في ذلك الأدوية، المبيدات والهيدروكاربونات متعددة الحلقات العطرية، سببا هاما للأمراض العصبية مثل مرض الـ Parkinson، التلف العصبي Neurodégénérescence ....إلخ. لقد أصبحت الآن الكثير من هذه المواد السامة معروفة بسميتها سواء المركبات الاصلية أو موادها الأيضية و ذلك من خلال احداثها للجهد التأكسدي. يكون هذا الاخير هو السبب الأساسي للعديد من المظاهر المرضية للعضوية، حيث يتم مهاجمة الجزيئات الكبرى مثل الـ ADN، البروتينات والدهون بواسطة الأشكال الأكسوجينية النشطة (ROS)، ينتج عن ذلك تغير في بنيتها الطبيعية بواسطة الأكسدة الفوقية للدهون، فقدان وظيفة البروتينات سواء كانت أنزيمية أو نواقل ومستقبلات غشائية وسيتوبلازمية، وكذلك إنتاج طفرات مختلفة على مستوى الـ ADN

أظهرت النتائج المتحصل عليها من خلال تقدير MDA السيتوزولي بعد تعريض المجموعات الحيوانية للأندوسلفان والنفثلين زيادة كبيرة في عملية الأكسدة الفوقية للدهون مما أدى إلى انخفاض سيولة الأغشية الحيوية مسببا بذلك فقدان حالة توازن التبادل الغشائي في الخلايا العصبية. فزيادة مستوى الـ ($\dot{O}_2$) الأنيون الأوكسيدي في السيتوبلازم يزيد من مهاجمته للروابط المزدوجة الموجودة في مختلف الأحماض الذهنية المشكلة أساسا للفوسفوليبيدات الغشائية. كما يهاجم البروتينات المشكلة لهذه الأغشية كالمستقبلات والبروتينات الناقلة مما يؤدي بالتأكيد إلي تشكل ثقوب ومسامات غير طبيعية في الأغشية الحيوية وبالتالي فقدان المحتوى البروتوبلازمي الخلوي.

توافق نتائج هذه الدراسة مع نتائج (Vuchetich et al., 1996) والتي تناولت معاملة الحيوانات بجرعة 100mg/kg من NAP عن طريق الفم وتأثيرها علي الجهاز العصبي، حيث بينت ارتفاع معنوي لناتج الأكسدة الفوقية MDA. ونفس النتائج توصل اليها (Omurtag *et al.*, 2000) بعد معاملة الفئران بنفس الجرعة لمدة 30 يوما. حيث أدت العاملة الي ارتفاع معنوي في MDA السيتوزولي مما أدى إلى غياب سيولة الغشاء وانحلال خلايا الجهاز العصبي، و ذلك عند استقلاب NAP بواسطة أنزيمات و تشكيل مواد أيضية مثل 1 ,4naphtoqiunone naphtalène 1,2 époxyde مع إنتاج كبير لـ H_2O_2 الذي أدى بدوره إلى زيادة كبيرة في لـ ROS داخل الخلايا العصبية و التي تعمل حتما علي أكسدة ADN و اللبيدات الغشائية وبالتالي موت هذه الخلايا.
(Baghi *et al.*, 2002; Sotchs *et al.*, 2002 ; Motandon, 2005).

تستعمل الخلية الحية أجهزة دفاع ضد التوتر التأكسدي، من بينها الببتيد الثلاثي GSH الذي يحتوي على مجموعة وظيفية هامة SH مضادة للأكسدة على مستوى متقدم من عملية الدفاع والحماية ضد زيادة نسبة لـ ROS الخلوي . (Morin *et al.*, 2001; Emre *et al.*, 2007)

يواجه GHS زيادة ROS- في الخلية بآليتين الأولى بارتباطه بالمركبات الوسيطة الإلكتروفيلية مثل المواد الأيضية لـ AHPs تحت تأثير أنزيم GST، أما الثانية من خلال تأثير تفاعلها مباشرة مع الدورات الحرة معطية الشكل المؤكسد GSSG. (Drignen, 2000; Smegne *et al.*, 2006)

أوضحت عدة دراسات حدوث انخفاض مستوى GSH الداخل خلوي في العديد من الخلايا المرضية مثل Parkinson, Alzheimer (Behl, 1998; Ebadi *et al.*, 1995). كما يلعب كل من GST و GSH دور مهم جدا في الحفاظ على التوازن بين محفزات الأكسدة ومضادات الأكسدة Prooxydant /Antioxydant في حالة تعرض الخلايا للإنتاج المفرط للأشكال الأوكسيجينة النشطة.

تشير دراسة (Smegne *et al.*, 2006) الي انخفاض معنوي للمحتوى الخلوي لـ GSH بعد 5 أيام من معاملة الحيوانات بمادة NAP، إضافة إلى نقص مستواه طبيعيا في الخلايا العصبية مقارنة بالأعضاء الأخرى (Drignen, 2000). نفس النتيجة توصل اليها (Emre *et al.*, 2007)، حيث لاحظوا انخفاض تركيز GSH العصبي بعد معاملة الحيوانات بجرعة 200mg /Kg من Benzopyrene.

نفس النتائج توصل اليها (Omurtage, 2010) في كل من المخ، الرئة و الكليتين بعد معاملة الفئران بمادة NAP. وأرجع هذا الانخفاض للسمية الشديدة الناتجة عن بعض المواد الأيضية ل NAP خاصة Naphtoquinone و Naphtodiol ، اللذان يثبتان بواسطة أجهزة نزع السمية مسببة بذلك زيادة استهلاك واستنزاف GSH من الوسط السيتوزولي (Vravaidya, 2004).

كما أوضحت دراسة قام بها Pasten, 2007 بأن المرضى اللذين يعانون من مرض Alzheimer تحتوي خلاياهم العصبية على مستوى منخفض من GSH.

يعتبر GSH مهم جدا خلال الطور الثاني من عملية نزع السمية للمواد الدخيلة السامة. اذ يتدخل في نقل ونزع السمية للعديد من المواد الداخلية والخارجية (Ibrahim, 2008). كما يلعب دورا مهما في الدفاع بالتخلص من المواد السامة الإلكتروفيلية الدخيلة وموادها الأيضية بشكل معقدات مرتبطة - GSH (GSH Conjugués) ((Smeeyn *et al.*, 2000 ; Chen *et al.*, 2010). كما يقوم GSH بوظائف أخرى مثل التخلص من سمية المواد الناتجة عن الأكسدة الفوقية للبيدات (Shechan, 2001).

تظهر نتائج هذه الدراسة انخفاض معنوي في نشاط أنزيم GST عند كل المجموعات الحيوانية المعاملة بالمواد السامة المستعملة مقارنة بالمجموعة الشاهدة، ويمكن إرجاع هذا الانخفاض الي تشكل مواد فعالة خلال التحول الأيضي لهذه المواد مثل الألسينات Alcène ومشتقات الإيبوكسيد والهيدروبيروكسيد العضوية التي تعتبر مواد تفاعل لأنزيم GST . تشير نتائج هذه الدراسة الي انخفاض نشاط أنزيم GST عند معاملة اناث الجرذان بجرعة 50mg/Kg من النفثالين لمدة خمسة أيام. توافق هذه

النتائج مع ما وصل إليه (Kiruthiga et al., 2007) عند دراسة تأثير Benz pyrène على خلايا الدم الحمراء حيث لوحظ انخفاض كبير في نشاط أنزيم.

أظهرت النتائج بأن المعاملة بكل من END وNap يؤشران على أهمية البحث واكتشاف احتمال وجود فعل تعاوني Synergisme بين هاتين المادتين الكيمائيتين و تأثيرهما السمي العصبي. حيث بينت نتائج هذه الدراسة وجود الفعل التعاوني بين هاتين المادتين السامتين بعد معاملة الحيوانات بهما. وذلك من خلال اتساع تأثيرها السام على الخلايا العصبية وزيادة انخفاض العوامل المضادة للأكسدة أو ارتفاع العوامل المؤشرة لوجود التوتر التأكسدي (MDA). كما أوضحت العديد من الدراسات وجود هذا الفعل التعاوني بين خليط NAP وأيونات Cu^{+} عندما أعطيت إلى الأسماك حيث اتضح وجود فعل تعاوني في زيادة التوتر التأكسدي نتيجة انخفاض نجاعة الأنظمة المضادة للأكسدة تحت تأثير سمية HAP.

يلعب إنزيم Catalase دورا أساسيا في تفكيك H_2O_2 إلى ماء و أوكسجين (Racheo and Gousesa, 2009). اذ تؤدي إزالته حتما من الوسط الخلوي إلى اتلاف الخلايا العصبية واستسقاء في المخ وهذا راجع لدوره المهم كمضاد للأكسدة (Ahmed *et al*., 2011).

تشير نتائج هذه الدراسة الي انخفاض غير معنوي في نشاط أنزيم Catalase عند الجرذان المعاملة بـ NAP . وهذا يتوافق مع نتائج دراسية توصل إليها باحثين آخرين عندما معاملة الحيوانات ب HAP (Ambuslvan, 2007; Kiruthiga *et al*., 2007; Oto *et al*., 2010). ويفسر هذا الانخفاض باستنزاف هذا الأنزيم عند قيامه بتفكيك كميات كبيرة من H_2O_2 والمنتجة أثناء أيض المواد السامة الخارجية (Xenobiotics).

اتضح حسب دراسات مسبقة بأن التوتر للتأكسدي أثر كبير على البروتينات حيث يفقدها البنية الطبيعية مما يؤدي إل فقدانها وظيفتها الحيوية في الخلية. من بين هذه التغيرات نذكر تجزئة البروتينات وأكسدة السلاسل الجانبية للأحماض المشكلة لها بالإضافة إلى فقدان طبيعتها ووظيفتها أساسا.

(Barbara *et al*., 1997).

تشير نتائج هذه الدراسة إلى انخفاض غير معنوي لمجموعة البروتينات السيتوزولية عند الحيوانات المعاملة ب NAP . فبالرغم عدم وجود دراسات مرجعية تخص تقدير البروتينات السيتوزولية في الخلايا العصبية، الا أن هناك أبحاث أخرى أجريت على الخلايا الكبدية للجرذان . حيث عوملت بتراكيز مختلفة من 0 mg/Kg إلى 50 mg/Kg خلال 24 ساعة، فأدت إلى انخفاض كبير للمحتوى السيتوزولي للبروتينات (Choi, 2007).

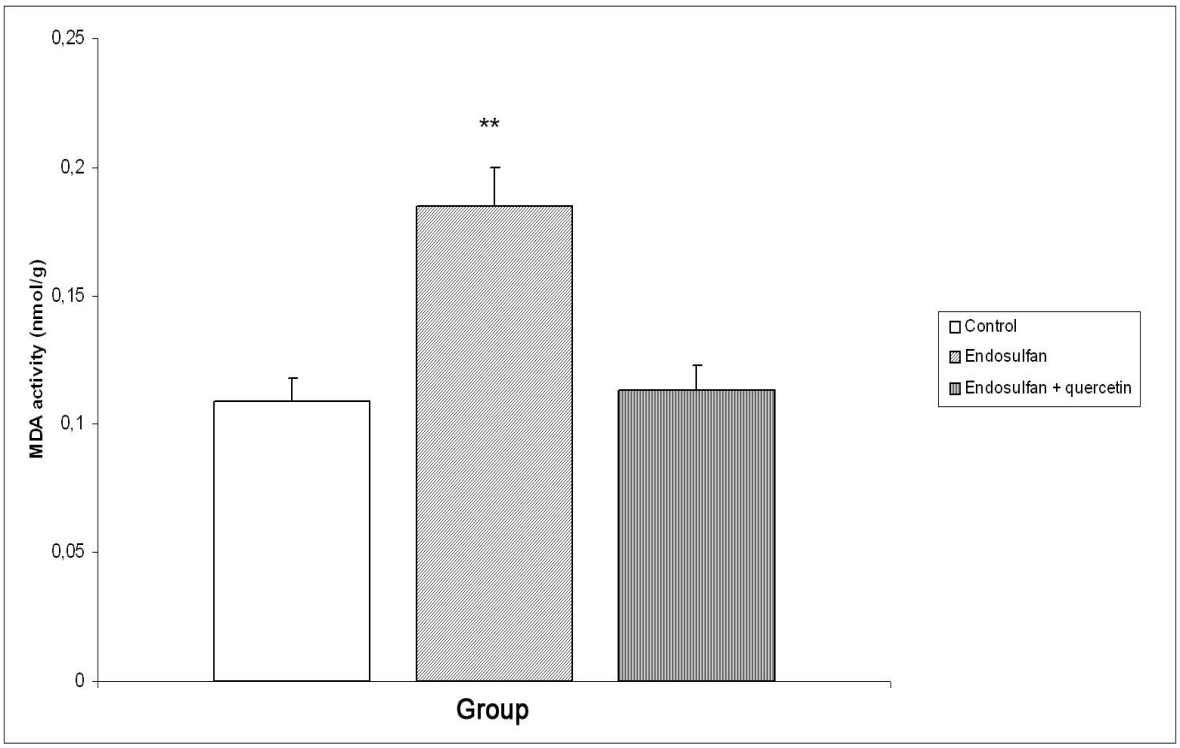
تشير نتائج مؤشرات التوتر التأكسدي إلى انخفاض معنوي ($P < 0.001$ ** ، $P < 0.01$**) لنشاط أنزيمي SOD وCAT علي الترتيب في السيتوزول عند المجموعات الحيوانية المعاملة بمختلف المواد السامة. لهذين الأنزيمين دور هام جدا في إزالة الأشكال الأكسوجينية النشطة، حيث يعملان معا لإزالة كل من أنيون فوق الأكسيد $\dot{O}_2$ و H_2O_2 بكيفية متكاملة (Altuntas *et al*., 2002). يرجع انخفاض هذين الأنزيمين إلى زيادة كبيرة في إنتاج لـ ROS في سيتوبلازم الخلايا العصبية بعد معاملة الحيوانات ب END أوNap أو بكليهما معا. تهاجم هذه الجذور الحرة الجزيئات البروتينية مما يفقدها بنيته النشطة بالإضافة إلى إمكانية استهلاكها نتيجة نشاطها الكبير المضاد لهذه الجذور.
.(Kalender *et al*., 2004; El-Hossary, 2000)

أوضحت دراسة مماثلة أجريت على عضلة القلب عند الجرذان المعاملة بـ 2mg/Kg Endosulfan عن طريق الفم لمدة 6 أسابيع، انخفاض معنوي لكل من CAT و SOD (Kalender *et al*., 2004) . وتوصلت دراسة أخرى إلى نفس النتائج في كل من الكبد والكلية والجنين والمخ عندما عوملت اناث الجرذان لمبيد ال Chlorpyrifos بجرعة 20mk/Kg ابتداء من اليوم السادس إلى غاية اليوم الخامس عشر من الحمل. حيث أدت المعاملة الي زيادة كبيرة في نشاط أنزيم SODوCAT بالإضافة إلى ارتفاع في مستوى MDA (Zama, 2007).

2- دراسة الدور الوقائي Quercétine اتجاه الأثر السمي END في ميتوكوندريات الخلايا العصبية

2-1- تقدير الأكسدة الفوقية للبيدات

يلاحظ من خلال النتائج المتحصل عليها في تقدير MDA كمؤشر نهائي للأكسدة الفوقية للدهون زيادة جد معنوية ($p < 0,01$) بقيمة (0,185±0,015nM /g) عند الجرذان المعاملة بـ ENDمقارنة بالمجموعة الشاهدة (0,109 ± 0,009 nM / g) بينما لم يتغير معنويا مستوى الـ MDA عند المجموعة المعاملة بكل من الـ Que END (0,113±0,0010) nM/g) الشكل(25)

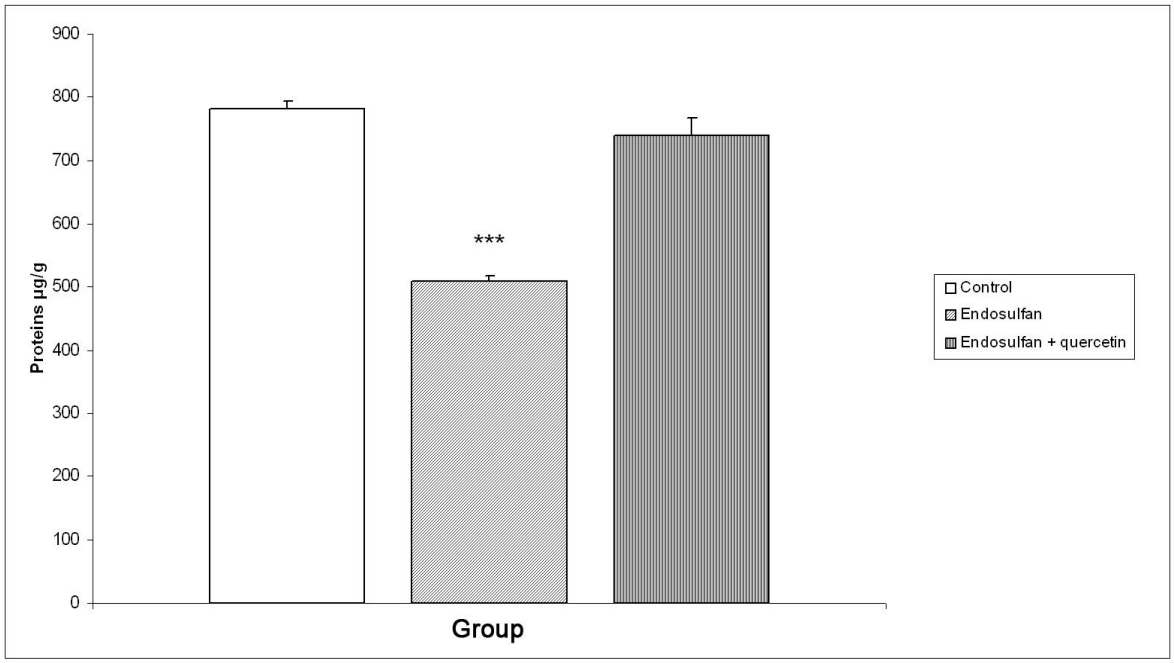


الشكل (25): تأثير END على مستوى MDA الميتوكوندري والفعل الوقائي Que.

القيم معبر عنها بالمتوسط± الانحراف العياري. n=6 مقارنة متوسطات المعاملات بالشاهد و ذلك باستعمال اختبار Student t **P<0.01.

2-2-تقدير البروتينات

نلاحظ انخفاض معنوي ($p<0.001$) في بروتينات الحشوة الميتوكوندرية عند المجموعة المعاملة بالأندوسلفان، بينما لم نسجل اختلاف معنوي عند المجموعة المعاملة بالكرسيتين والأندوسلفان مقارنة بالمجموعة الشاهدة الشكل (26).

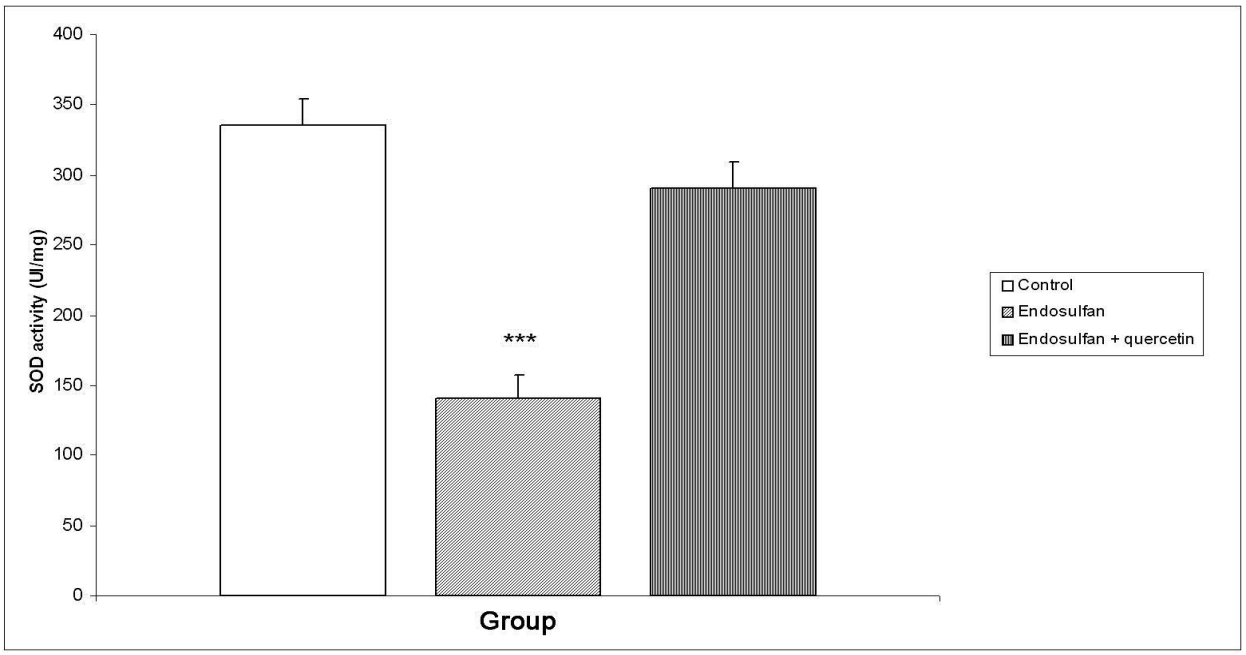


الشكل (26): تأثير END على مستوى البروتينات الميتوكوندرية عند الجرذان والفعل الوقائي Que.

القيم معبر عنها بالمتوسط± الانحراف العياري. n = 6 مقارنة متوسطات المعاملات بالشاهد و ذلك باستعمال اختبار Student t. $***P < 0.001$ الفرق بمعنوية جد مرتفعة.

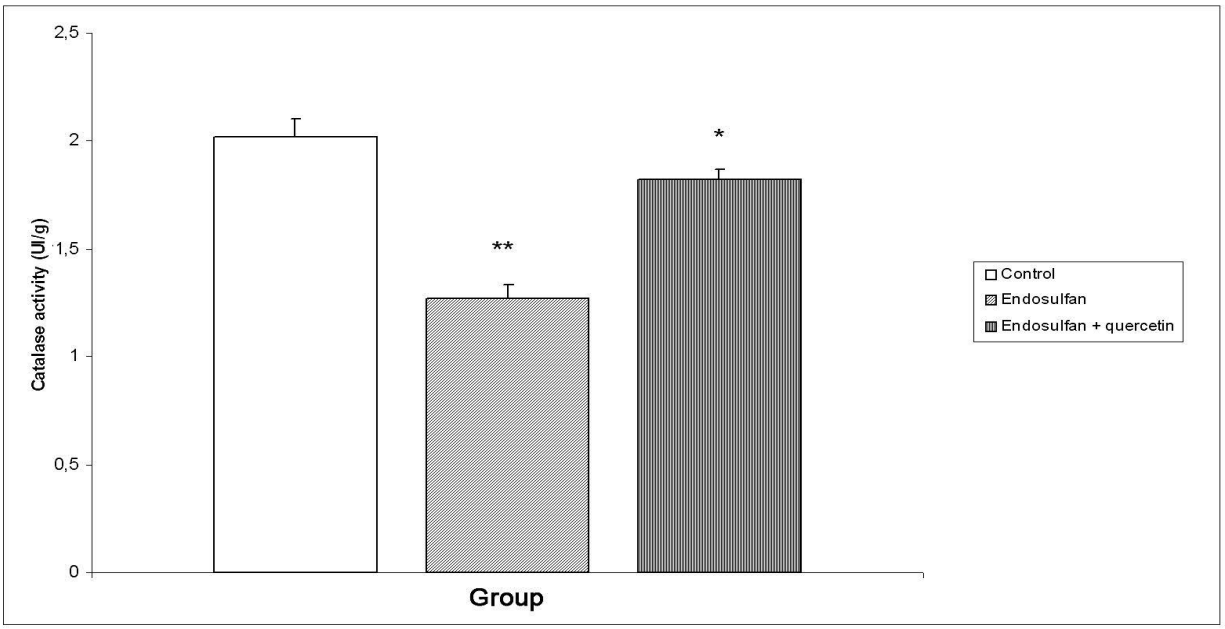
2-3- تقدير نشاط الأنزيمات المضادة للأكسدة CAT, SOD.

بينت النتائج المدونة في الشكلين (27 و 28) أن معاملة الحيوانات بالأندوسلفان أدت الي انخفاض معنوي (P< 0 ,001) في نشاط أنزيمي CAT وSOD مقارنة بالحيوانات الشاهد. في حين سجل ارتفاع معنوي النشاط عند الجرذان المعاملة بـ END + Que مقارنة بحيوانات المجموعة المعاملة ب الأندوسلفان



الشكل (27): تأثيرEND على مستوى Mn-SOD الميتوكوندري والدور الوقائي Que.

القيم معبر عنها بالمتوسط± الانحراف العياري. n=6 مقارنة متوسطات المعاملات بالشاهد و ذلك باستعمال اختبار Student t. $***P < 0.001$ الفرق بمعنوية جد مرتفعة.

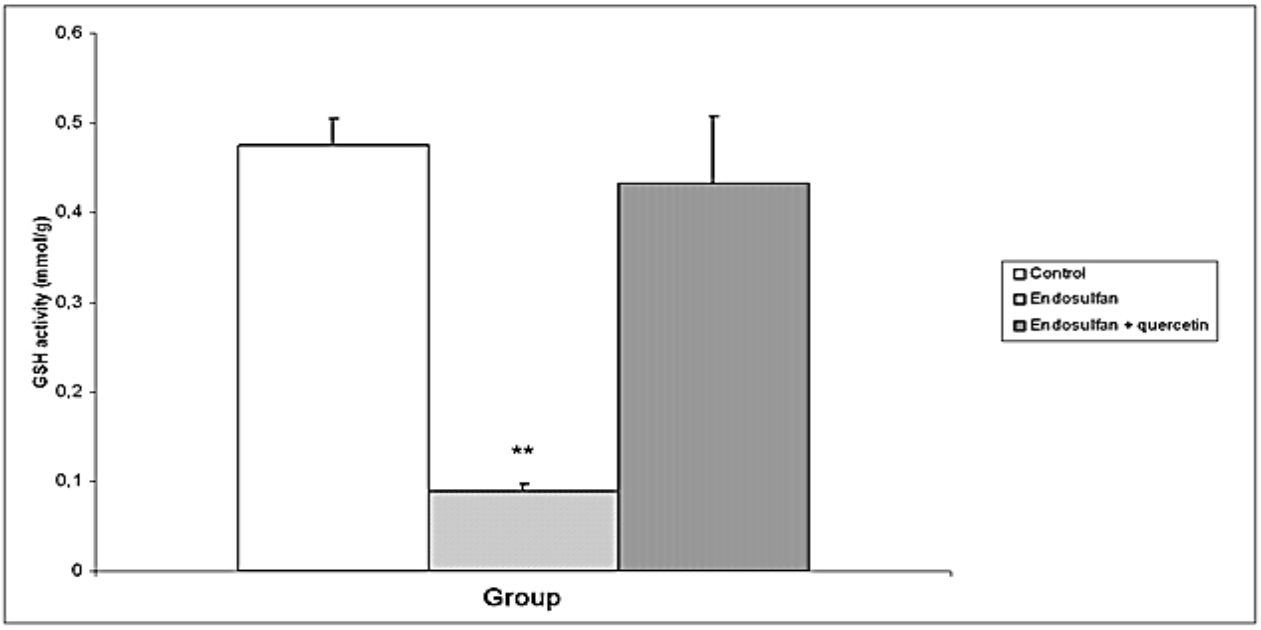


الشكل (28): فعل END على النشاط الإنزيمي CAT والفعل الوقائي Que .

القيم معبر عنها بالمتوسط± الانحراف العياري. n=6 مقارنة متوسطات المعاملات بالشاهد و ذلك باستعمال اختبار Student t. $*P < 0.05$ القرق معنوية $**P<0.01;$ الفرق بمعنوية مرتفعة.

4-2- تقدير GSH

أظهرت النتائج المبينة في الشكل رقم 29 نقص حاد في مستوى GSH الميتوكندري للخلايا العصبية لدى الحيوانات المعاملة بالأندوسلفان، حيث أعطت نتائج تقدير هذا المؤشر المضاد للأكسدة انخفاض معنوي (P< 0 ,01) حيث قدر ب (0 ,088±0,09nM/g) مقارنة بالحيوانات الغير معاملة أي الشاهد (0,475±0,02nM /g) ومن جهة أخرى أظهرت نتائج المجموعة المعالجة Que انخفاض غير معنوي (0,074nm /g ± 0,433) مقارنة بالشاهد. كما سجل ارتفاع معنوي في حيوانات المجموعة المعاملة بالكرستين و الأندوسلفان مقارنة بتلك المعاملة بالأندوسلفان. بمعني ظهور الدور الوقائي للكرستين



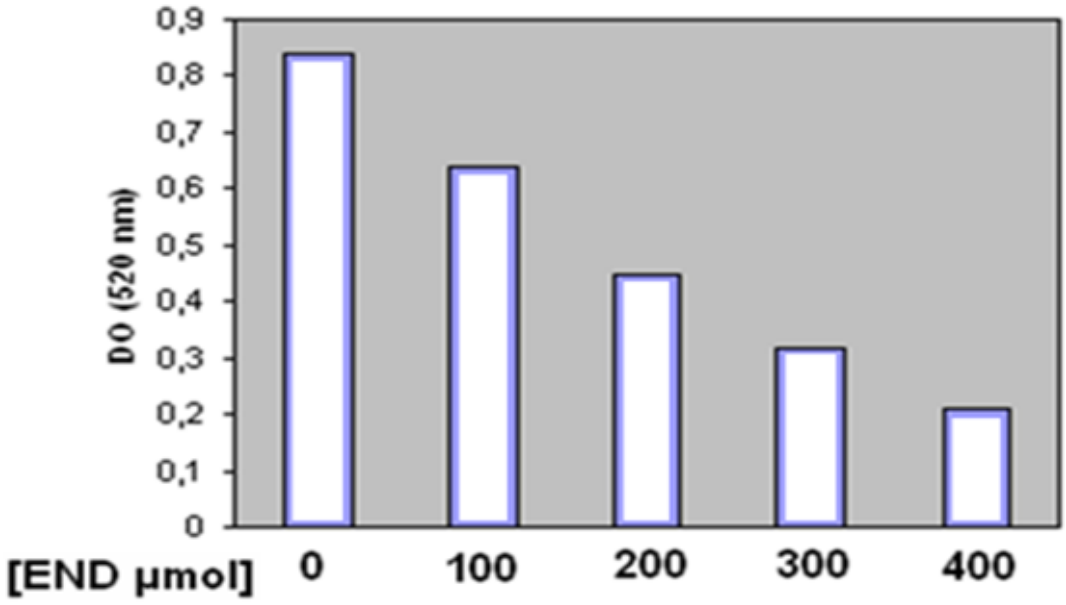
الشكل (29): الفعل السمي END على GSH الميتوكوندري والدور الوقائي Que .

القيم معبر عنها بالمتوسط± الانحراف العياري. n=6 مقارنة متوسطات المعاملات بالشاهد و ذلك باستعمال اختبار Student t. ****P<0.001;* الفرق بمعنوية جد مرتفعة.

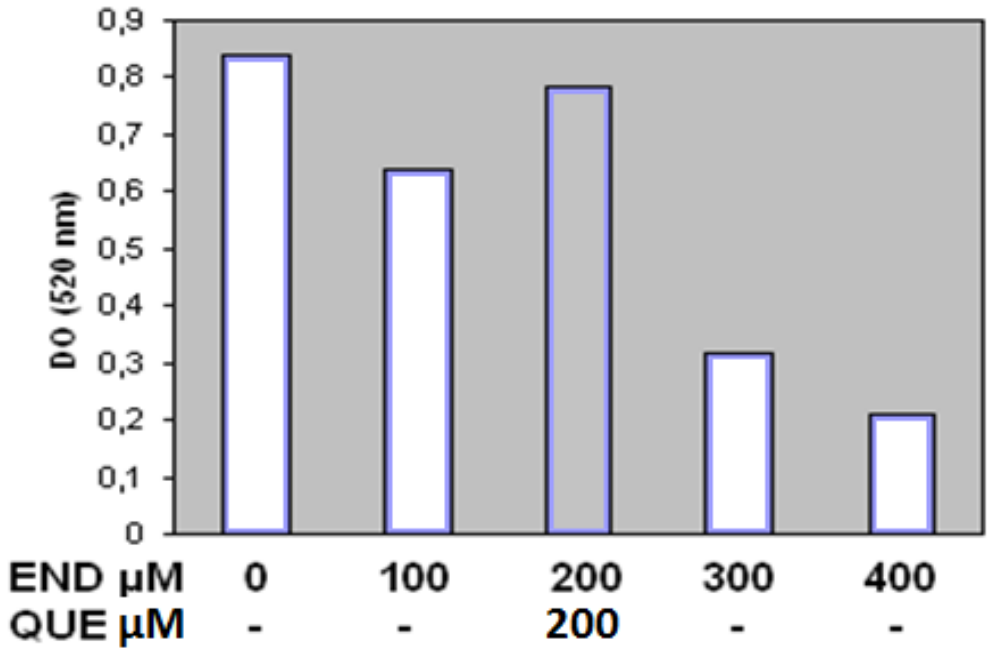
5-2- نتائج تقدير عملية الانتفاخ الميتوكوندري

إن تقييم الانتفاخ الميتوكندري في الأنبوب كان بهدف معرفة فعل END على النفاذية الغشائية للميتوكوندريا وإمكانية فقدان هذه الأخيرة لتكاملها الجزيئي والوظيفي .حيث أظهرت نتائج قياس الامتصاصية الضوئية للمعلق الميتوكوندري انخفاضا مستمرا ويتناسب تناسبا عكسيا مع التراكيز المتزايدة لـ END في الغشاء الميتوكوندري الشكل (30)، مما يبين زيادة الانتفاخ الميتوكوندري بدلالة

هذه التراكيز المتزايدة للمبيد، بالمقابل أظهرت النتائج المدرجة في الشكل رقم (31) الدورالوقائي للكرسيتين.



الشكل(30): يوضح نتائج تقدير عملية الانتفاخ الميتوكوندري الأندوسولفان



الشكل (31): يوضح نتائج تقدير عملية الانتفاخ الميتوكوندري الأندوسولفان + الكرسيتين

المناقشة

تعرف المبيدات على أنها كل مادة كيميائية سامة موجهة للوقاية، إتلاف أو إبعاد كل العوامل النباتية والحشرية المضرة بالمحاصيل الزراعية أثناء زراعتها ونقلها أو تخزينها. لقد عرفت هذه المبيدات نجاحا كبيرا لدى الفلاحين حيث أعطت زيادات كثيرة في الإنتاج والمردود الفلاحي .

لكن من جهة أخرى تعتبر المبيدات عبارة عن مواد سامة ليس فقط للحشرات والنباتات الضارة المستعملة ضدها لكن يتعدى ذلك لكائنات أخرى ليست مستهدفة في هذه الحلقة وهي كل الكائنات المستهلكة لهذه المواد الفلاحية مثل الحيوانات والإنسان. ففي الكثير من الأحيان، تكون هذه المواد جد سامة وخطيرة على حياتهم، نموهم وتكاثرهم. بمعني يمكن اعتبارها الملوثات الأساسية للبيئة ومصدر لمواد ملوثة دقيقة للهواء والتربة والماء، كما اعتبرها القائمين على حماية البيئة الخطر الكبير الذي يهدد العالم (JaWich, 2006) .

توجد العديد من المبيدات تحت اسم مواد Cancérogènes, Mutagènes et Reprotoxique (MCR) وبالتالي تكون سبب في انتشار العديد من الأمراض السرطانية والتشوهات الخلقية والأمراض العصبية المختلفة والضعف المناعي والعقم عند الإنسان (Sauborn *et al*., 2004).

تشكل المركبات الفينولية المتعددة مجموعة من الجزيئات المنتشرة بكثرة في المملكة النباتية. ويتميز أغلب هذه المواد بالعديد من النشاطات البيولوجية والدوائية نتيجة للخواص المضادة للأكسدة و التسرطن التي تميز الكثير منها حسب العديد من نتائج الدراسات العلمية (Bruneton, 1999).

تهدف هذه الدراسة الي تقييم مدى سمية الـ END الذي يعتبر مادة عضوية دائمة على الجهاز العصبي عند حيوانات التجارب وخاصة أثاره السامة على التكامل الجزيئي والوظيفي للخلايا العصبية هذا من جهة، و من جهة ثانية، اختبار الفعالية الوقائية لأحد متعددات الفينولات مثل Quercètine المعروف بنشاطه المضاد للجهد التأكسدي في الكثير من البحوث العلمية (Kebieche, 2009) . أما بخصوص الجرعة المستعملة لهذا المبيد، لقد أجريت دراسات استكشافية بخصوص نسبة الـ END في الكثير من الخضروات التي تباع للمستهلكين في الأسواق في ولاية جيجل (نتائج البحث لم تنشر بعد) حيث أظهرت هذه الدراسة تواجد الـ END بتركيز 2mg\kg. اعتبرنا هذا المستوى من تركيز الـ END نموذجا في دراستنا هذه حتى نقرب طريقة بحثنا من الواقع البيئي الذي نعيش فيه و نتعرض لجرعات حقيقية من هذه الملوثات، وبهدف الوقاية من الآثار السامة لهذا المبيد استعملنا الـ Quercètine بتركيز 10mg\kg.

أظهرت نتائج تقدير مؤشر الأكسدة الفوقية للدهون زيادة كبيرة لهذه الأكسدة على مستوى ميتوكوندريات الخلايا العصبية مما يفيد باعتبار هذا المبيد منتج للجذور الحرة الأوكسيجينية وخاصة

جذر الـOH° الذي يهاجم الروابط الثنائية للأحماض الذهنية المشكلة للجليسروفوسفوليبييدات الغشائية للميتوكوندرية. في الكثير من البحوث، اعتبرت الأكسدة الفوقية للدهون آلية أساسية في السمية الناتج عن المبيدات خاصة منها الكلوروعضوية (Organochlorés) المحبة للدهون، مما يسمح لها بالتواجد في الأوساط الذهنية وخاصة في الجهاز العصبي الذي يعتبر عضو دهني بامتياز بسبب ارتفاع نسبة تواجد الدهون في مكوناته (Lee *et al*., 1991; Kalender *et al*., 2004) . تعتبر ظاهرة الأكسدة الفوقية للبيدات من بين العوامل المسببة للتلف الغشائي واتساع الثقب الغشائية مما يفقد ميتوكوندريات الخلايا العصبية تكاملها ونجاعة وظائفها. لقد بينت العديد من الدراسات بأن التعرض المزمن للمبيدات الكلوروعضوية يسبب ارتفاع الجهد التأكسدي نتيجة للإنتاج الكبير للجذور الحرة الأوكسيجينية المسببة لتلف الخلايا العصبية. يؤدي هذا حتما الي ظهور بعض الأمراض العصبية مثل Parkinson والزهايمر فقدان الذاكرة، الانهيار العصبي ...الخ. (Llorca *et al*., 2004; Tiffany- Castigliani, 2006) .

أيضا معاملة اناث الجرذان بـالأندسلفان بجرعة (13mg /kg) أدت الي تأثر البنية المرفولوجية للكلية بسبب تآكل الأغشية السيتوبلازمية والميتوكوندرية (Cagar *et al*., 2003) .

كما بينت نتائج هذه الدراسة تأثر أنظمة الدفاع ضد الجهد التأكسدي ابتداء من الببتيد الثلاثي GSH الذي يعتبر الجزيء الهام في أجهزة الدفاع الداخل خلوي ضد الجذور الحرة الأكسوجينية. حيث يعمل على إزالة الجذور الحرة والمواد الأيضية الفعالة التي تستهلك القدرة الإرجاعية للـ GSH بالإضافة إلى كونها مادة تفاعل لبعض الإنزيمات المضادة للأكسدة. لقد سجل انخفاض جد معنوي في ميتوكوندريا الخلايا العصبية للجرذان المعاملة بالـ END مما يبرر زيادة الأكسدة الفوقية للدهون من خلال زيادة مستوى الـ MDA (Dorval and Hontela, 2003). توافق نتائج هذه الدراسة، ابحاث الكثير نذكر منها(Kalendar *et al*., 2004 و Zama *et al*., 2007).

أيضا أظهرت نتائج هذه الدراسة انخفاض جد معنوي في معدلات الأنشطة الأنزيمية لكل من SOD وCAT في الحشوة الميتوكوندرية للخلايا العصبية عند الجرذان المعاملة بالـ END مما يشير إلى فقدان التوازن بين مضادات الجهد التأكسدي والعوامل المنتجة له (Prooxydant / antioxydant) . علما بأن هذين الأنزيمين يعملان مع بعضهما البعض حيث نجد أن الـ SOD يقوم بتحويل $O^{\cdot}_2$إلى H_2O_2 والـ CAT يقوم بتفكيك هذا الأخير إلى H_2O وO_2 (Altuntas *et al*., 2002) .أدت معاملة الجرذان بواسطة الـ END الي انخفاض معدل نشاط الإنزيمين بسبب الإنتاج المكثف للجذور الحرة، و التي تحث علي تغيير البنية الجزيئية للعديد من الجزيئات الحيوية داخل الميتوكوندري مثل البروتينات الناقلة للإنزيمات وكذلك البروتينات النووية بالإضافة إلى بنية الدهون الغشائية والأحماض النووية

(El-Hassany, 2000). توافق نتائج هذه الدراسة مع النتائج التي توصل إليها العديد من الباحثين. فمعاملة الجرذان بجرعة 2mg/kg من الـ END عن طريق الفم لمدة 6 أسابيع أدت الي انخفاض نشاط هذين الأنزيمين في الخلايا العضلية للقلب. كما أن معاملة اناث الجرذان بمبيد فوسفوعضوي Chlorpyriphos بجرعة 20ملغ/كلغ ابتداء من اليوم السادس إلى اليوم الخامس عشر من الحمل، أظهرت انخفاض جد معنوي في مستوى GSH و نشاط أنزيم SOD بالإضافة إلى ارتفاع مؤشر الأكسدة الفوقية للدهون MDA (Zama *et al*., 2007).

كما سجل انخفاض جد معنوي لمستوى البروتينات في حشوة الميتوكوندريا للخلايا العصبية للجرذان المعاملة بواسطة الـEND يعلل ذلك بانخفاض النشاط الأنزيمي للعديد من الأنزيمات العاملة على مواجهة الفعل المنتج للجذور الحرة الأكسوجينية، مما يؤدي إلى استهلاكها أو تخريبها بهذه الجذور. كما أوضحت نتائج هذه الدراسة الدور الوقائي للـ Que أي قدرة هذا المركب الفينولي على الحماية الخلوية ضد السمية الخلوية والميتوكوندرية من خلال منع زيادة الـ MDA الميتوكوندري عند الجرذان المعاملة بواسطة الـ Que + END. ونفس الأثر المانع لانخفاض مؤشرات التوتر التأكسدي , SOD CAT, GSH التي تعمل على حماية الخلية العصبية وعضياتها من التلف الخلوي وبالتالي الحفاظ على تكاملها الجزيئي والوظيفي .

فعند معاملة المعلق الميتوكوندري بإضافة تراكيز مختلفة من الـ END ، لوحظ انخفاضا كبيرا في الامتصاصية الضوئية. مما يؤكد بدخول كميات كبيرة إلى الميتوكوندريا بعد فقدانها لأنظمة التبادل خاصة اتساع الثقوب الكبيرة النافذة للماء والأملاح وكذلك الجزيئات البيولوجية الأخرى المتوسطة الحجم مثل Cytochrome c ، يؤدى هذا إلى فقدان تكاملها الوظيفي في الخلايا العصبية مما يسمح بحدوث آليات أخرى مميتة للخلايا مثل ظاهرة الموت المبرمج.

(Shi *et al*., 2004; Assefa *et al*., 2005; Franco *et al*., 2009)

كما يؤدي إضافة الـ Que مع الـ END الي المعلق الميتوكوندري إلى عدم انخفاض الامتصاصية الضوئية وهذا مما يؤكد بعدم حدوث أو تثبيط الانتفاخ الميتوكوندري. فلكون الـ Que عامل وقائي ضد إنتاج الـ ROS بالتالي منع انفتاح الثقوب الكبيرة الموجودة في أغشية الميتوكوندريا والتي تعمل على تأمين النفادية الميتوكوندرية، وبالتالي حماية تكاملها البنيوي والوظيفي في الخلايا العصبية.

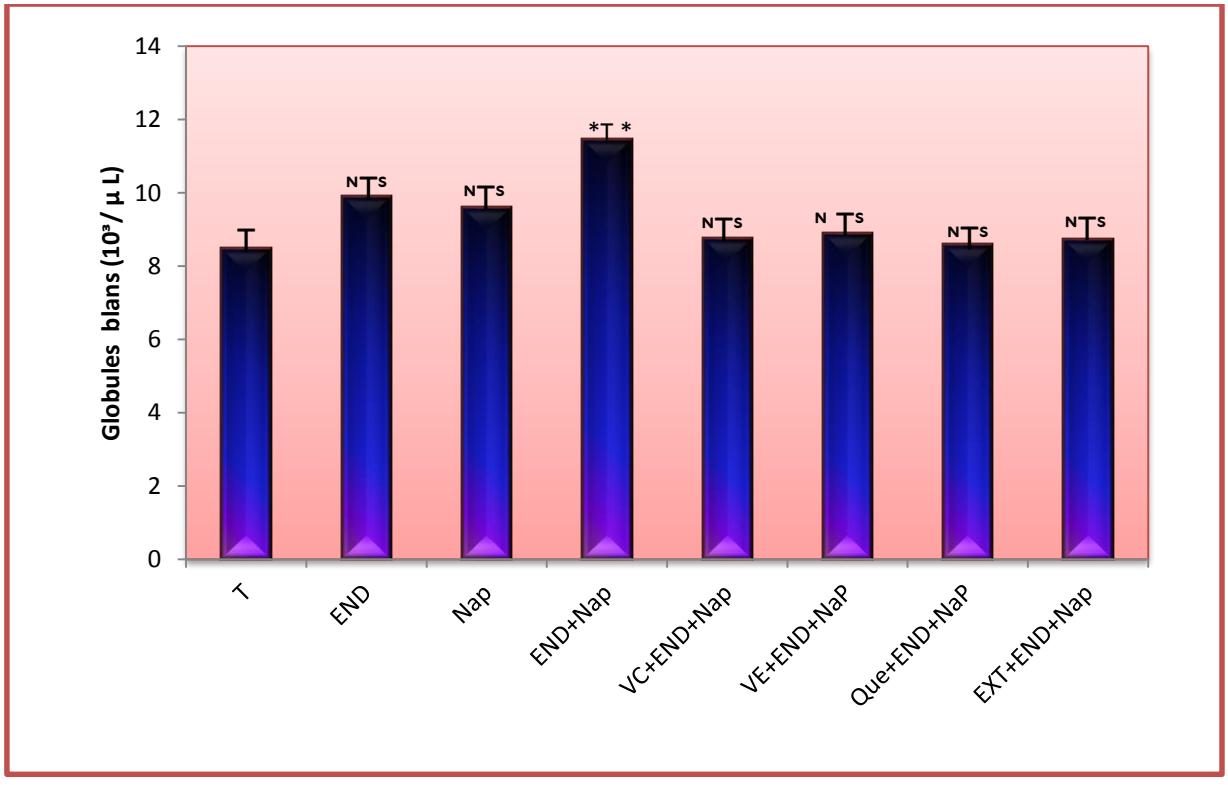
(Choi *et al*., 2003).

3- تأثير الأندوسولفان (END) والنفثالين (NAP)، فيتامين Vit.C، فيتامين Vit.E، الكرسيتنQuer ومستخلص قشور البرتقال (EXT) على الخلايا المناعية، كرات الدم الحمراء الهيموغلوبين و المعايير البيوكيميائية.

3-1- الخلايا المناعية

3-1-1- العدد الكلي لكريات الدم البيضاء

لوحظت زيادة معنوية ($P<0.001$) في عددا لكريات البيضاء عند الجرذان المعاملة بالأندوسلفان والنفثالين معا (Nap+END) مقارنة بالشاهد، في حين سجل ارتفاع غير معنوي عند مجموعتي الفئران المعاملة بالأندوسلفان (END) والمعاملة بالنفثالين (Nap) مقارنة بالشاهد ، كما ظهر جليا الدور الوقائي لكل من Vit.E، Vit.C ، Que ومستخلص قشور البرتقال عند الجرذان المعاملة بهذه المواد ومركبي الأندوسلفان والنفثالين (END+Nap) حيث سجل ارتفاع غير معنوي مقارنة بالشاهد الشكل (32).

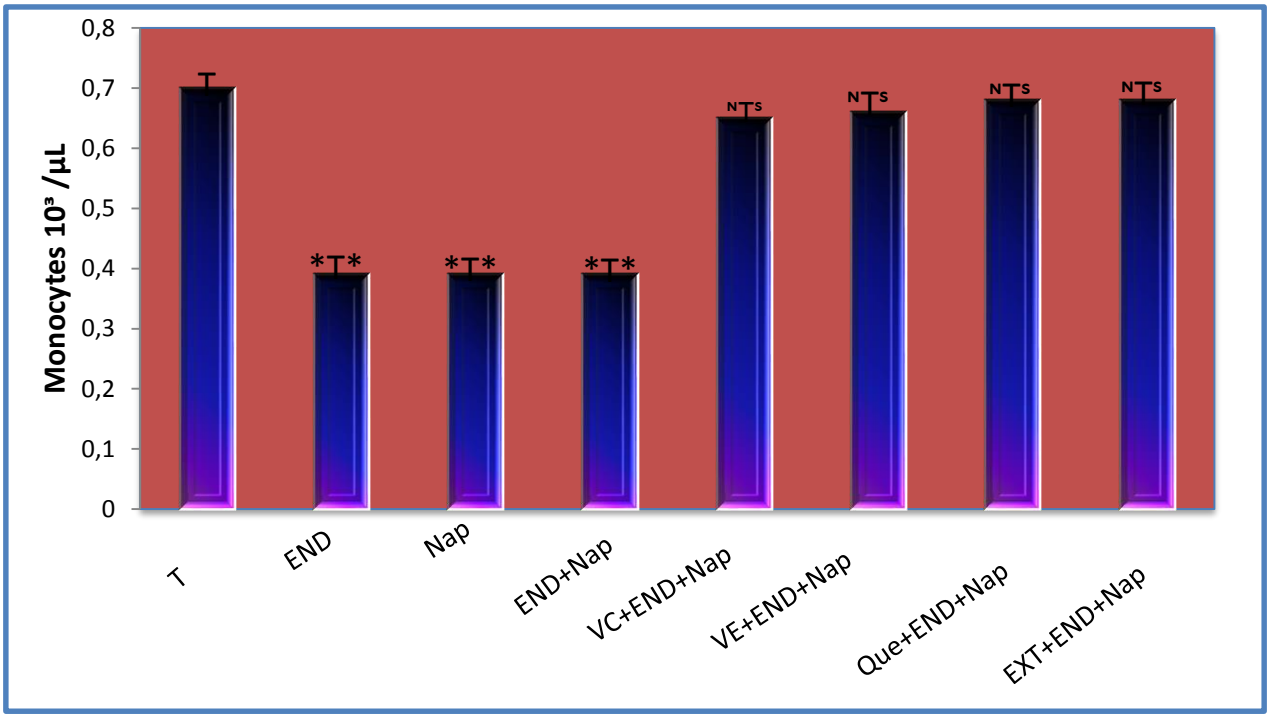


الشكل (32): تأثير الأندوسولفان والنفثالين، فيتامين C، فيتامين E والكرسيتن والمستخلص النباتي على العدد الكلي للكريات البيضاء. القيم معبر عنها بالمتوسط± الانحراف العياري. n=6 مقارنة متوسطات المعاملات بالشاهد و ذلك باستعمال اختبار Student t. $P < 0.01$** ns غير معنوي.

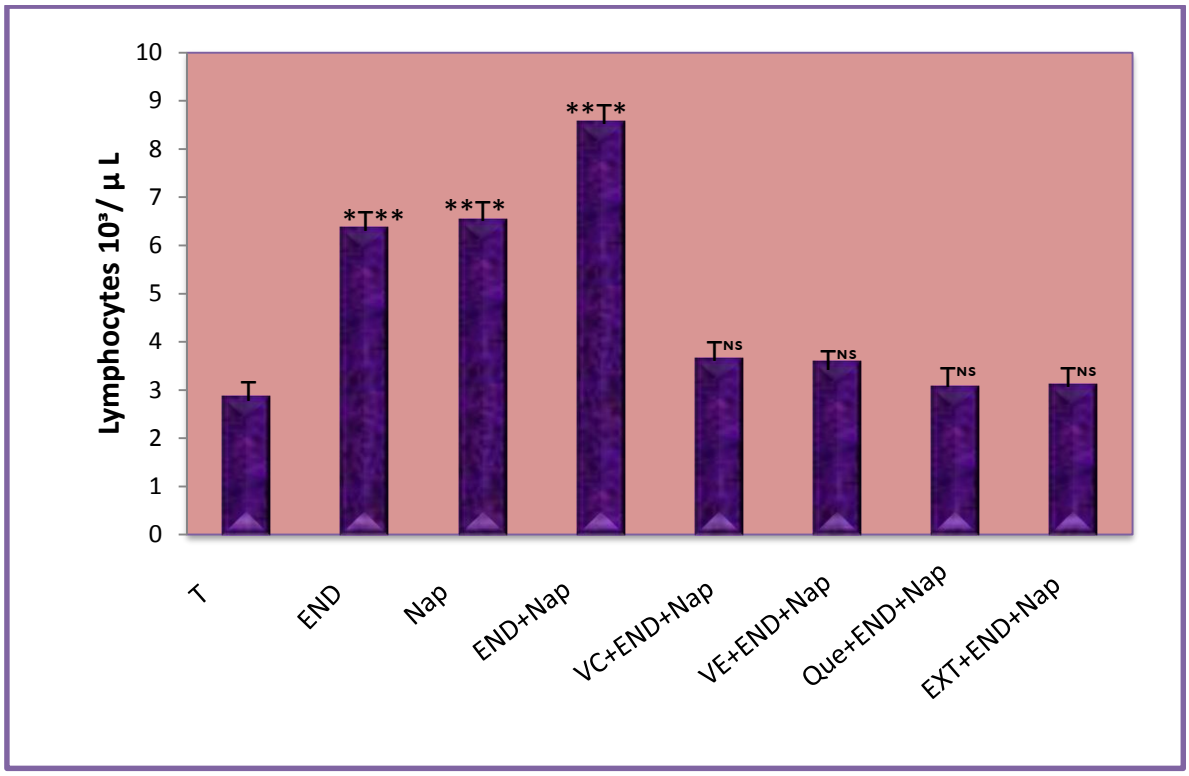
3-1-2- الكريات البيضاء أحادية النواة (monocyte) واللمفويات

أدت معاملة الجردان بالأندوسلفان (END)، النفثالين (Nap) و النفثالين +الأندوسلفان إلي انخفاض معنوي ($p<0.01$) في عدد كريات الدم البيضاء أحادية النواة مقارنة بالشاهد. في حين لم يلاحظ أي تغيير معنوي في عدد هذه الخلايا عند المجموعات المعاملة بـ VitC+END+Nap ،VitE+END+Nap،Que+END+Nap، EXT+END+Nap مقارنة بالشاهد الشكل (33) .

كما لوحظت زيادة معنوية ($p<0.001$) في عدد اللمفاويات عند المجموعات المعاملة ((END+Nap، Nap)) و(END) مقارنة بالشاهد. في حين سجل ارتفاع غير معنوي عند المجموعات المعاملة ب ((Vit.C+END+Nap)،(Vit.E+END+nap)، (Que+END+Nap)، (EXT+END+Nap)) مقارنة بالشاهد الشكل (34).



الشكل(33): تأثير الأندوسولفان END والنفثالينNAP ، فيتامين VC ، فيتامين V E والكرسيتن Que ومستخلص قشور البرتقال EXT على عدد الكريات البيضاء أحادية النواة. القيم معبر عنها بالمتوسط± الانحراف العياري. n=6 مقارنة متوسطات المعاملات بالشاهد و ذلك باستعمال اختبار Student t. $^{**}P < 0.01$ ns غير معنوي.



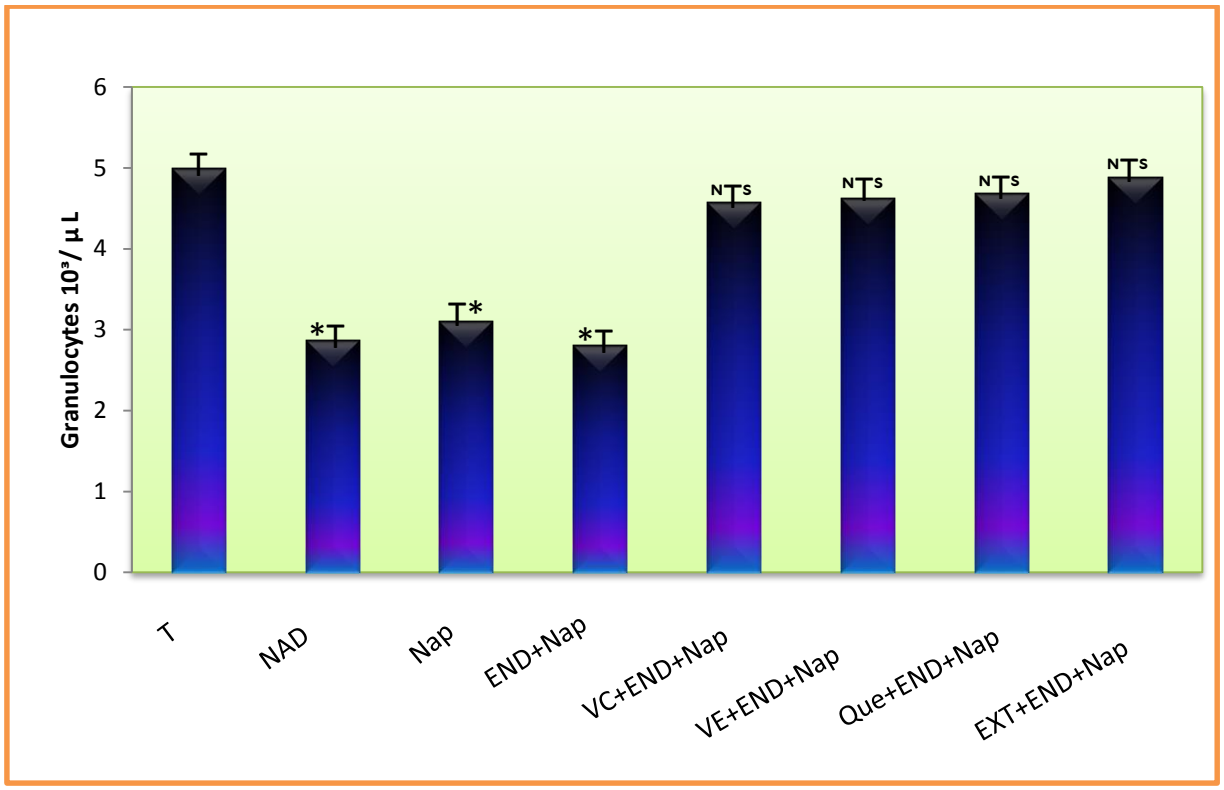
الشكل (34): تأثير الأندوسولفان END والنفثالينNAP ، فيتامين Vit.C ، فيتامين Vit.E والكرسيتن Que ومستخلص قشور البرتقال EXT على عدد اللمفاويات. القيم معبر عنها بالمتوسط± الانحراف المعياري. n=6 مقارنة متوسطات المعاملات بالشاهد و ذلك باستعمال اختبار Student t.

P<0.001 ***، ns غير معنوي.

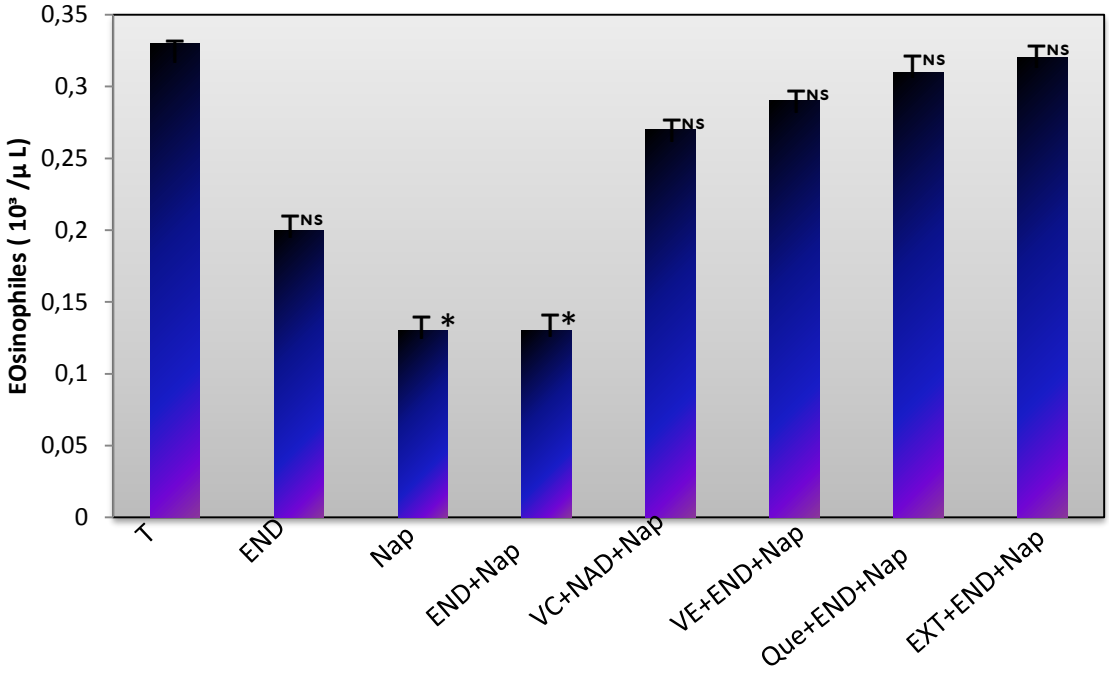
3-1-3- كريات الدم البيضاء االحبيبية (Granulocyte) والحامضة

أوضحت النتائج المدونة في الشكل (35)، والذي يمثل تأثير مختلف المعاملات علي عدد كرات الدم البيضاء االحبيبية (Granulocyte) انخفاضا معنويا ($p<0.05$) في عدد هذه الخلايا مقارنة بالشاهد (T) ،في حين لوحظ انخفاض غير معنوي بالنسبة للمجموعات المعاملة بتلك المركبات اضافة الي أحد الفيتامينات أو الكرستين أو المستخلص النباتي.

أدت معاملة الجرذان بالنفثالين بجرعة (50ملغ/كلغ) ولأندوسلفان زائد النفثالين بجرعتي (4ملغ/كلغ + 50ملغ/كلغ) إلى انخفاض معنوي ($p<0.01$) في عدد كرات الدم البيضاء الحامضية مقارنة بالمجموعة الشاهد. كما لوحظ الدور الوقائي للفيتامينين C وE والكرسيتين والمستخلص النباتي عند مجموعات الجرذان المعاملة بهذه المواد قبل معاملتها ب (END+Nap) حيث لم نسجل أي اختلاف معنوي في عدد هذه الخلايا مقارنة بمجموعة الحيوانات الشاهد الشكل(36).



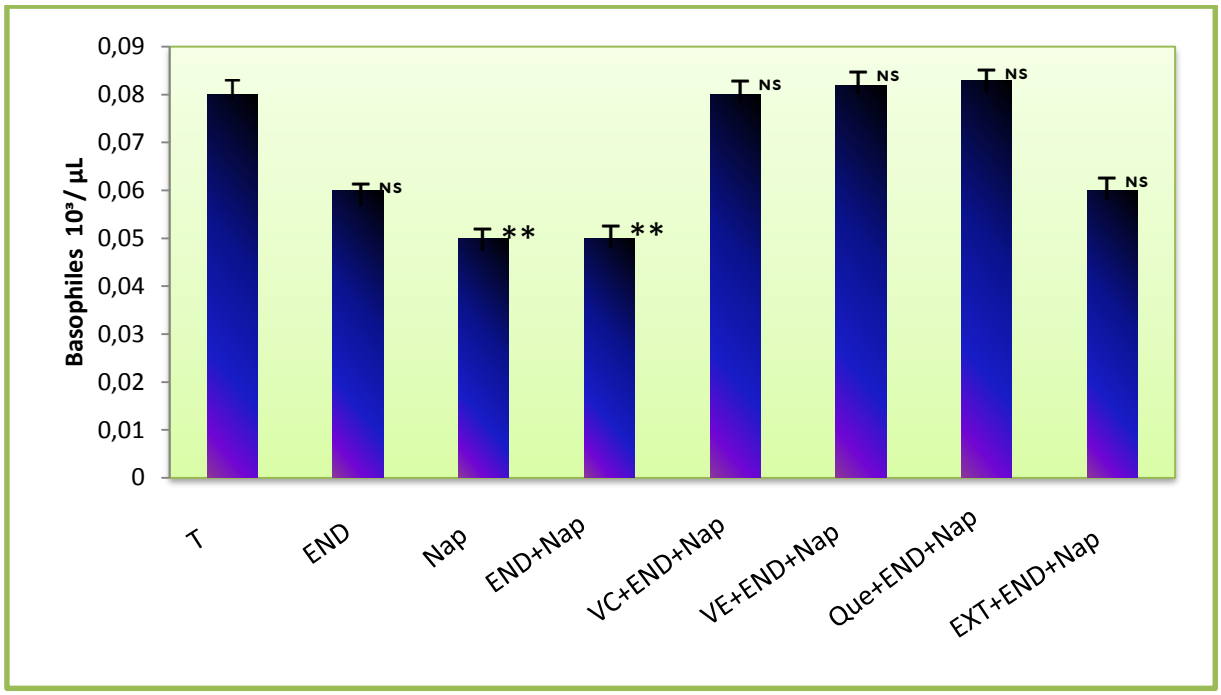
الشكل(35): تأثير الأندوسولفان END والنفثالينNAP ، فيتامين Vit.C ، فيتامين Vit.E والكرسيتن Que ومستخلص قشور البرتقال EXT على عدد الخلايا البيضاء االحبيبية. القيم معبر عنها بالمتوسط± الانحراف المعياري. n= 6 مقارنة متوسطات المعاملات بالشاهد و ذلك باستعمال اختبار Student t. * $P<0.05$ ، ns غير معنوي.



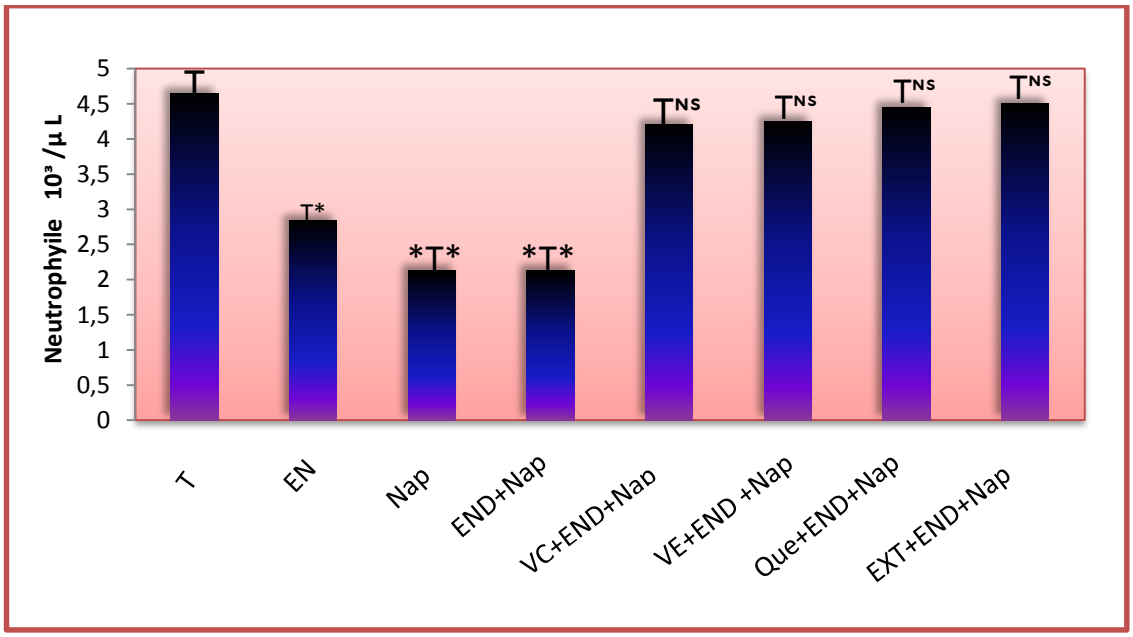
الشكل(36): تأثير الأندوسولفان END والنفثالينNAP ، فيتامين Vit.C ، فيتامين Vit.E والكرسيتن Que ومستخلص قشور البرتقال EXT على عدد الخلايا البيضاء الحامضية. القيم معبر عنها بالمتوسط± الانحراف المعياري. n=6 مقارنة متوسطات المعاملات بالشاهد و ذلك باستعمال اختبار Student t. $P<0.05$ * ، ns غير معنوي.

3-1-4- الخلايا القاعدية و الخلايا المتعادلة

لوحظ انخفاض معنوي في عدد الخلايا القاعدية عند مجموعتي الجرذان المعاملة بالنفثالين (Nap) بجرعة (50ملغ/كلغ) و المعاملة بالأندوسلفان زائد النفثالين بجرعتي (4ملغ/كلغ +50ملغ/كلغ) ($p<0.01$) مقارنة بالشاهد، في حين لم يسجل أي اختلاف معنوي في المجموعات التي أعطي لها كل من الفيتامين C والفيتامين E والكرسيتين والمستخلص النباتي قبل معاملتها بالاندوسلفان و النفثالين. وهذا ما يوضح الدور الوقائي لمثل تلك المركبات المضافة (37). أيضا أدت نفس المعاملة السابقة و المجموعة المعاملة بالأندوسلفان إلى انخفاض معنوي ($p<0.001$) و ($p<0.05$) علي التوالي في عدد الخلايا المناعية المتعادلة مقارنة بالشاهد الشكل (38).



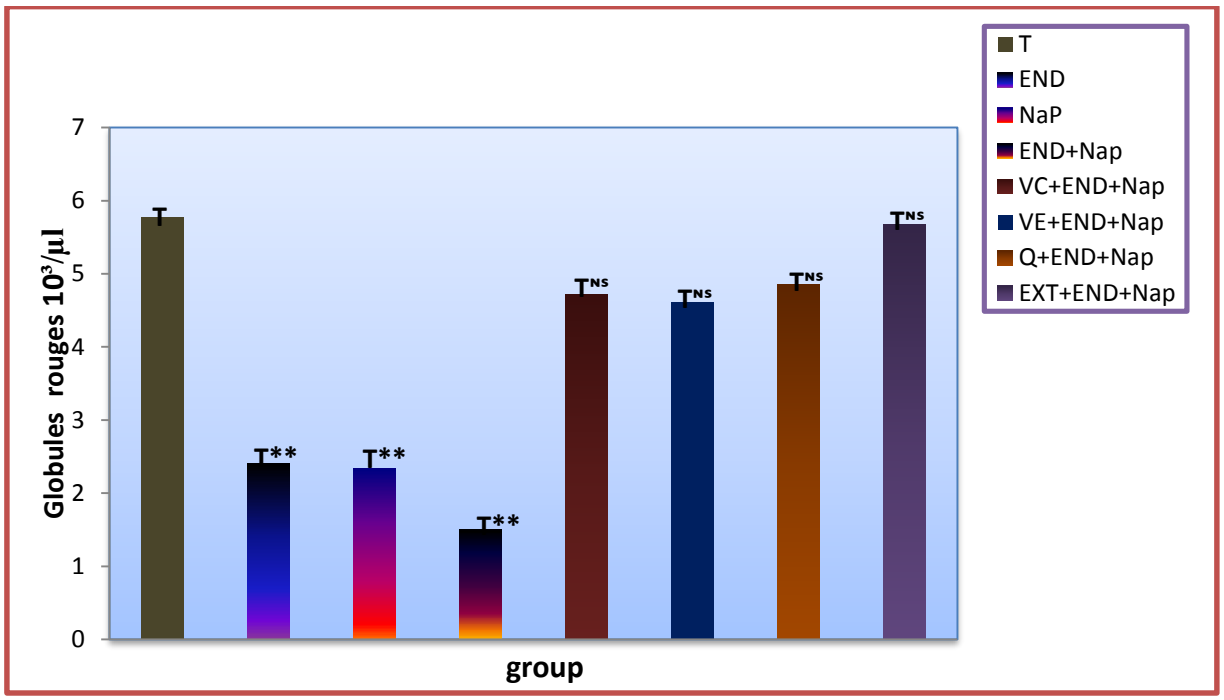
الشكل (37): تأثير الأندوسولفان END والنفثالينNAP ، فيتامين Vit.C ، فيتامين Vit.E والكرسيتن Que ومستخلص قشور البرتقال EXT على عدد الخلايا البيضاء القاعدية. القيم معبر عنها بالمتوسط± الانحراف المعياري. n=6 مقارنة متوسطات المعاملات بالشاهد و ذلك باستعمال اختبار Student t. **p<0.01، ns غير معنوي.



الشكل (38): تأثير الأندوسولفان END والنفثالينNAP ، فيتامين Vit.C ، فيتامين Vit.E والكرسيتن Que ومستخلص قشور البرتقال EXT على عدد الخلايا البيضاء المتعادلة. القيم معبر عنها بالمتوسط± الانحراف المعياري. n=6 مقارنة متوسطات المعاملات بالشاهد و ذلك باستعمال اختبار Student t. **p<0.01، * p<0.05 ns: غير معنوي.

3-2- كريات الدم الحمراء

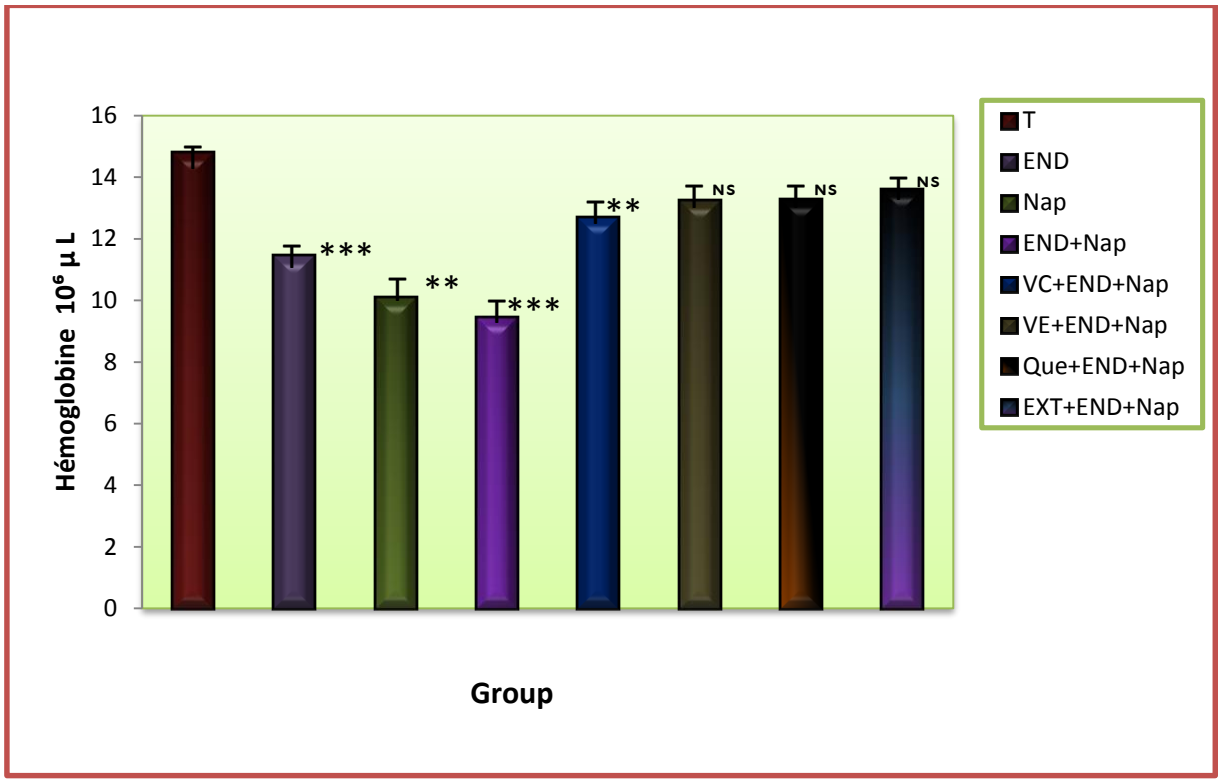
أدت العاملة بمختلف المواد السامة إلى انخفاض معنوي($p<0.01$) في عدد كريات الدم الحمراء مقارنة بالشاهد. غير أن المعاملة بالفيتامينين C، E والكرسيتين والمستخلص النباتي قبل إعطاء المركبين معا (الأندوسلفان والنفثالين) لم يؤثر معنويا علي عدد كريات الدم الحمراء مقارنة بالشاهد الشكل (39).



الشكل(39): تأثير الأندوسولفان END والنفثالينNAP، فيتامين Vit.C، فيتامين Vit.E والكرسيتن Que ومستخلص قشور البرتقال EXT على عدد كرات الدم الحمراء. القيم معبرا عنها بالمتوسط ± الانحراف المعياري. n=6 مقارنة متوسطات المعاملات بالشاهد و ذلك باستعمال اختبار Student t. $**p<0.01$، ns: غير معنوي.

3-3- الهيموغلوبين

لوحظ اختلاف بمعنوية جد مرتفعة في تركيز هيموغلوبين الدم عند المجموعات المعاملة بالأندوسلفان وخليط النفثالين والأندوسلفان مقارنة بالشاهد ($P<0.001$) بينما المعاملة بالنفثالين أدي إلى انخفاض تركيز الهيموغلوبين بمعنوية مرتفعة ($P<0.01$)، كما لوحظ الدور الوقائي لفيتامين C وE والكرسيتين والمستخلص النباتي حيث لم نسجل أي اختلاف معنوي في تركيز الهيموغلوبين مقارنة بالمجموعة الشاهدة الشكل(40).

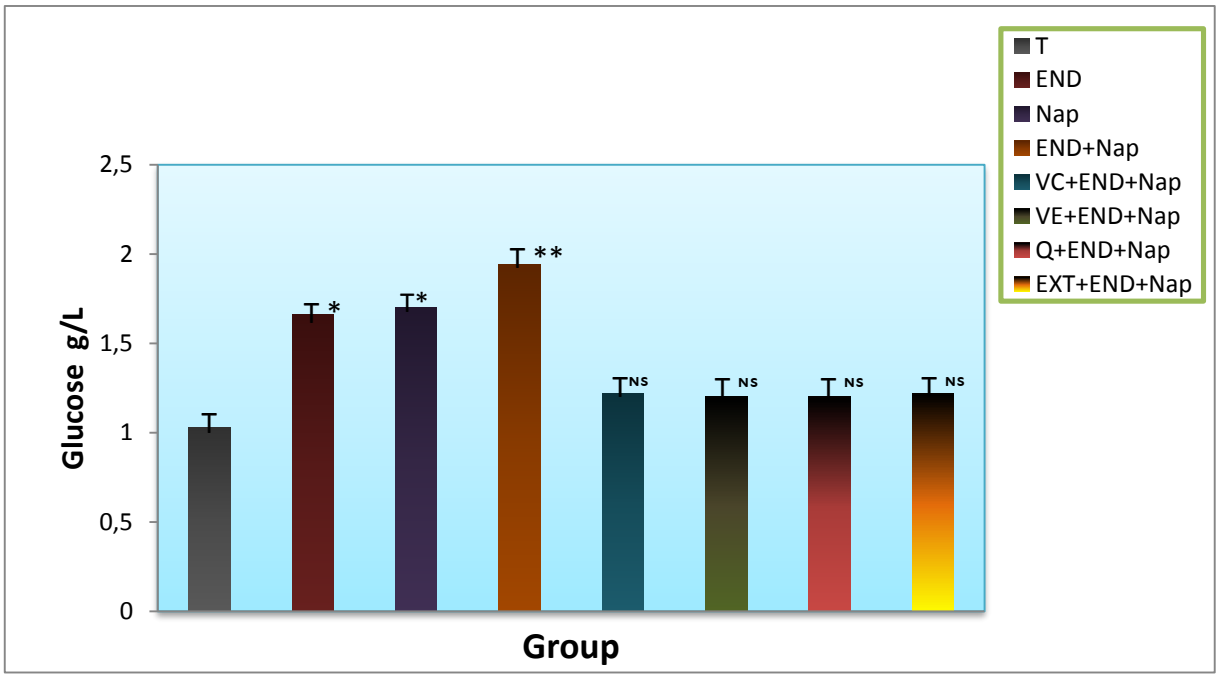


الشكل(40): تأثير الأندوسولفان END والنفثالينNAP ، فيتامين Vit.C ، فيتامين Vit.E والكرسيتن Que ومستخلص قشور البرتقال EXT على هيموغلوبين الدم. القيم معبر عنها بالمتوسط± الانحراف المعياري. n=6 مقارنة متوسطات المعاملات بالشاهد وذلك باستعمال اختبار Student t. **p<0.01 ، ***p<0.001 ، ns : غير معنوي.

3-4- المعايير البيوكميائية

3-4-1- تركيز الجلوكوز

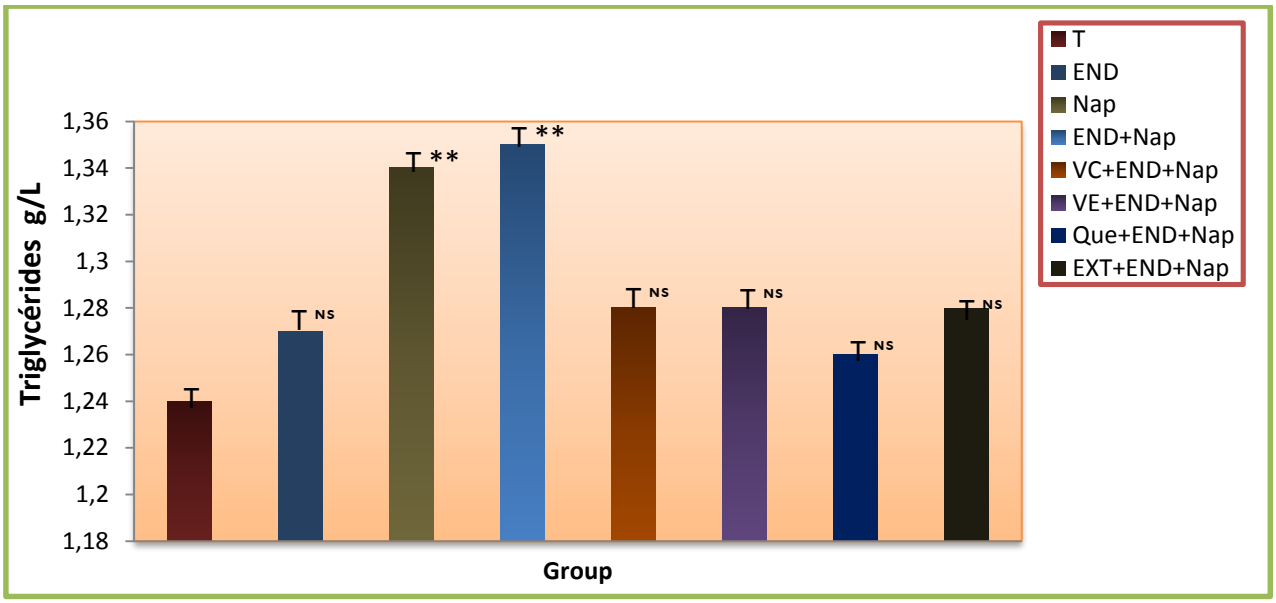
أدت المعاملة بالأندوسلفان، النفثالين و بالأندوسلفان والنفثالين معا إلي زيادة معنوية (p<0.05). و(p<0.01) في تركيز جلوكوز الدم علي الترتيب وذلك مقارنة بالشاهد. غير أن المعاملة ببكل من الفيتامينين E وC والكرسيتين والمستخلص النباتي اظهرت دورا وقائيا بحيث لم تسجل أي اختلاف معنوي في تركيز جلوكوز مصل الفئران مقارنة بالشاهد الشكل (41).



الشكل(41): تأثير الأندوسولفان END والنفثالينNAP ، فيتامين Vit.C ، فيتامين Vit.E والكرسيتن Que ومستخلص قشور البرتقال EXT على تركيز جلوكوز الدم. القيم معبر عنها بالمتوسط± الانحراف المعياري. n=6 مقارنة متوسطات المعاملات بالشاهد وذلك باستعمال اختبار Student t. ***p<0.001 ، *p<0.05 ، ns: غير معنوي.

3-4-2- تركيز الغليسيريدات الثلاثية

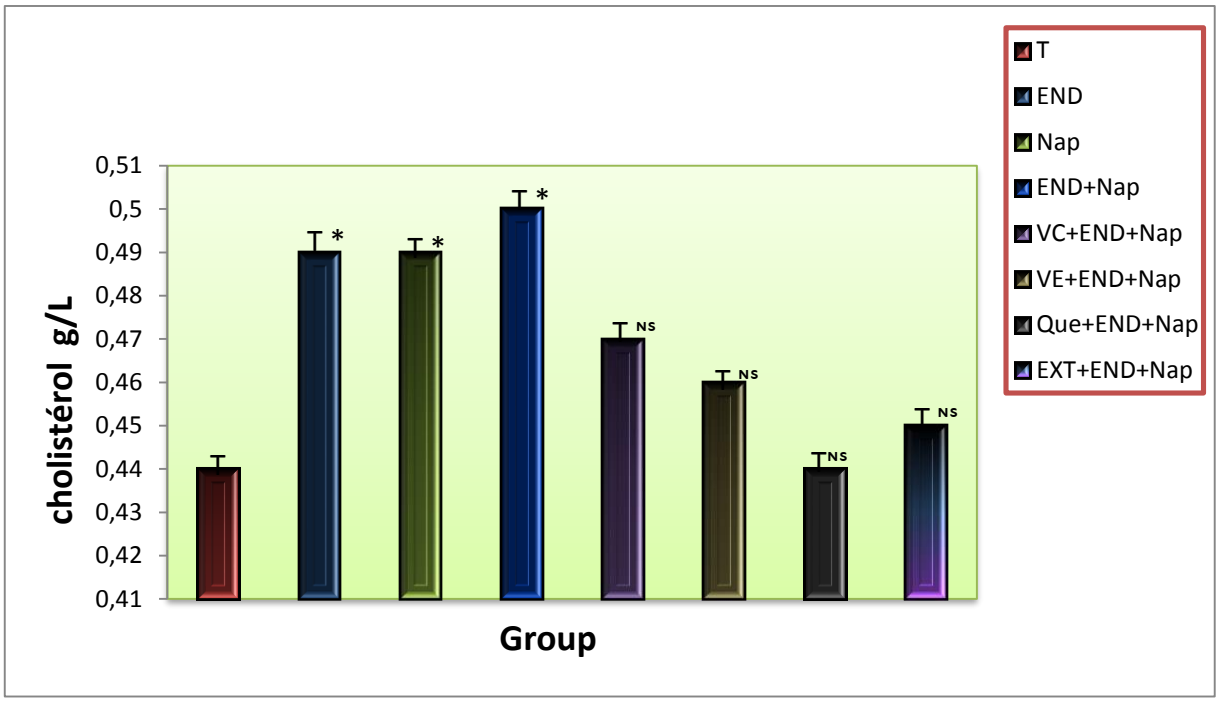
سجلت زيادة معنوية (P<0.01) في تركيز الغليسريدات الثلاثية في مصل دم الجرذان عند مجموعتي الفئران المعاملة بالنفثالين والمعاملة بالنفثالين والأندوسلفان معا مقارنة بالشاهد. كما ظهر جليا الدور الوقائي للفيتامينين ، الكرسيتين و المستخلص النباتي عند المجموعات المعاملة بهذه المواد قبل إعطائها الاندوسلفان والنفثالين (42).



الشكل (42): تأثير الأندوسولفان END والنفثالين NAP ، فيتامين Vit.C ، فيتامين Vit.E والكرسيتين Que ومستخلص قشور البرتقال EXT على تركيز الغليسيريدات الثلاثية. القيم معبر عنها بالمتوسط± الانحراف المعياري. n=6 مقارنة متوسطات المعاملات بالشاهد وذلك باستعمال اختبار Student t. **$p<0.01$، ns : غير معنوي.

3-4-3- تركيز الكوليسترول

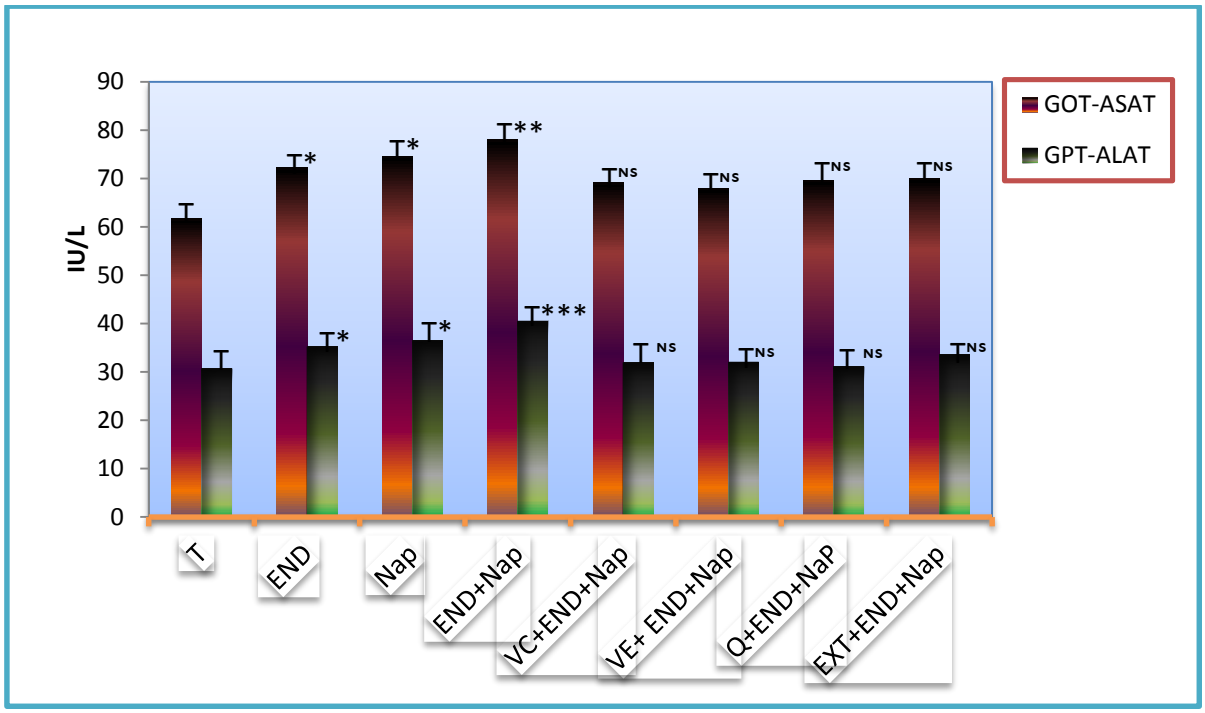
أظهرت النتائج المدونة في الشكل (43) المعاملة بالاندوسلفان (4 ملغ/كلغ) وبالنفثالين (50 ملغ/كلغ) وأيضا بالأندوسلفان والنفثالين معا زيادة معنوية ($p<0.05$)في تركيز الكولسترول مقارنة بالشاهد. كما برز الدور الوقائي لكل من الفيتامين C ، الفيتامين E ، الكرسيتين ومستخلص قشور البرتقال اتجاه التأثير السمي لتلك المواد السامة..



الشكل(43): تأثير الأندوسولفان END والنفثالينNAP ، فيتامين Vit.C ، فيتامين Vit.E والكرسيتن Que ومستخلص قشور البرتقال EXT على تركيز الكوليسترول. القيم معبر عنها بالمتوسط± الانحراف المعياري. n=6 مقارنة متوسطات المعاملات بالشاهد وذلك باستعمال اختبار Student t. $p<0.05$**، ns : غير معنوي.

3-4-4- نشاط إنزيمي AST و ALT

أدت معاملة الجرذان بالأندوسلفان والنفثالين معا ب (4ملغ/كلغ + 50ملغ/كلغ) إلى زيادة معنوية ($p<0.001$)، ($P<0.01$) في مستوي نشاط ALT وAST علي التوالي مقارنة بالشاهد. في حين سجلت زيادة معنوية ($p<0.05$) في مستوي نشاطهما لدى جرذان المجموعة المعاملة بالأندوسلفان وتلك المعاملة بالنفثالين. غير أن المعاملة المسبقة بالفيتامين C ، الفيتامين E ، الكرسيتين ومستخلص قشور البرتقال أعطت نتيجة ايجابية اتجاه سمية تلك المركبات السامة و بالتالي أبرزت دورها الوقائي، بحيث لم يسجل أي فرق معنوي في مستوى نشاط هذين الأنزيمين لدى حيوانات المجموعات المعاملة بكل من المواد السامة و المواد الاخرى الوقائية، الشكل (44) .

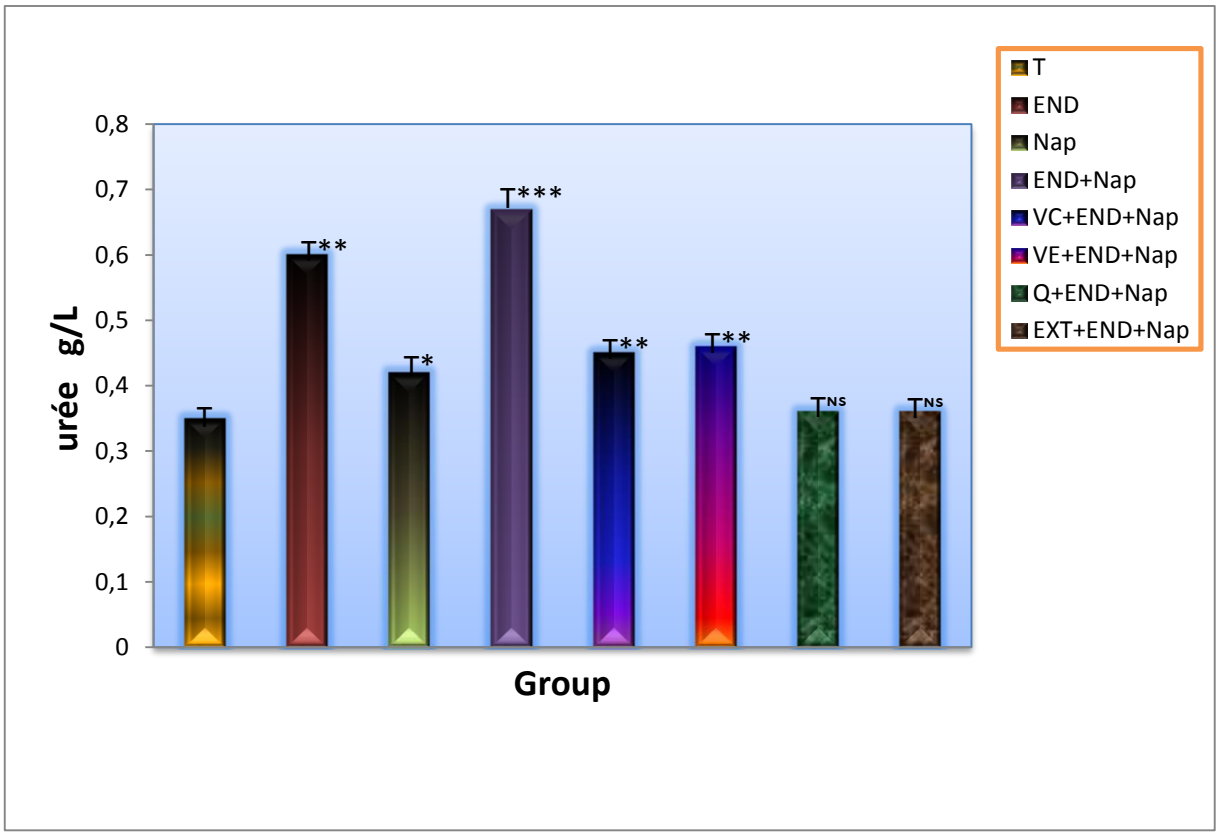


الشكل(44): تأثير الأندوسولفان END والنفثالينNAP ، فيتامين Vit.C ، فيتامين Vit.E والكرسيتن Que ومستخلص قشور البرتقال EXT على نشاط أنزيمي GOT, GPT . القيم معبر عنها بالمتوسط± الانحراف المعياري. n=6 مقارنة متوسطات المعاملات بالشاهد وذلك باستعمال اختبار Student t.

***p<0.001، **p<0.01، *P<0.05، ns : غير معنوي.

3-4-5- تركيز اليوريا

سجلت زيادة معنوية (P<0.001)، (p<0.01) و(p<0.05) في تركيز اليوريا عند الجرذان المعاملة بالأندوسلفان والنفثالين معا، بالأندوسلفان و بالنفثالين علي التوالي وذلك مقارنة بالشاهد. في حين أن المعاملة المسبقة بالفيتامين C والفيامين E لم تظهر دورا وقائيا حيث سجل ارتفاع معنوي(p<0.001) في تركيزا ليوريامقارنة بالشاهد، غير أن المعاملة بالكرسيتين والمستخلص النباتي فأعطت دورا وقائيا حيث لم نسجل أي اختلاف معنوي في تركيز اليوريا عند هذه المجموعات مقارنة بالشاهد الشكل (45).

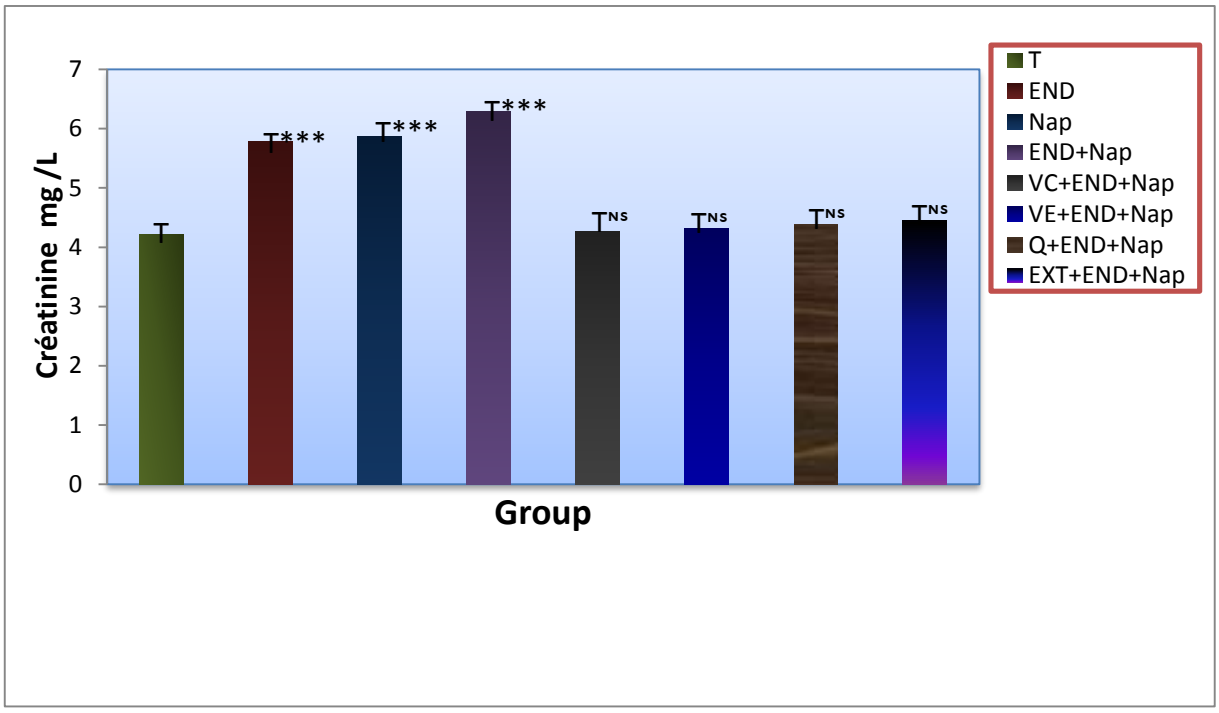


الشكل (45): تأثير الأندوسولفان END والنفثالينNAP ، فيتامين Vit.C ، فيتامين Vit.E والكرسيتن Que ومستخلص قشور البرتقال EXT على تركيز اليوريا. القيم معبر عنها بالمتوسط± الانحراف المعياري. n=6 مقارنة متوسطات المعاملات بالشاهد وذلك باستعمال اختبار Student t.

***p<0.001، **p<0.01، *P<0.05، ns: غير معنوي.

3-4-6- تركيز الكرياتينين

أدت معاملة الجرذان بالأندوسلفان والنفثالين والأندوسلفان والنفثالين معا إلى زيادة معنوية (P<0.001) في تركيز كرياتنين مصل الدم مقارنة بالحيوانات الغير معاملة، غير أن مجموعات الجرذان المعاملة بالفيتامينين C و E والكرسيتين والمستخلص النباتي قبل إعطائها الأدوسلفان والنفثالين معا فلم تؤثر علي تركيز الكرياتينين مقارنة بمجموعة الشاهد الشكل (46).



الشكل (46): تأثير الأندوسولفان END والنفثالينNAP ، فيتامين Vit.C ، فيتامين Vit.E والكرسيتن Que ومستخلص قشور البرتقال EXT على تركيز اليوريا. القيم معبر عنها بالمتوسط± الانحراف المعياري. n=6 مقارنة متوسطات المعاملات بالشاهد وذلك باستعمال اختبار Student t.

***p<0.001، ns : غير معنوي.

المناقشة

تعتبر الملوثات العضوية الدائمة مركبات عضوية طبيعية أو من صنع الإنسان، وهي تقاوم التحلل الضوئي والكيميائي والبيولوجي، تتميز بقلة الذوبان في الوسط المائي وبسرعة الذوبان في الأوساط الذهنية مما يؤدي إلى ما يعرف بالتراكم الإحيائي في الأنسجة الذهنية للكائنات الحية

(Ruzzin, 2012). يمكن لهذه الملوثات أن تؤدي إلى تأثيرات خطيرة و طويلة الأجل على البيئة والصحة العامة للكائنات الحية بما فيها الإنسان (Tartu *et al*., 2014).

تنقسم الملوثات العضوية الدائمة الى عدة أقسام بناءا على أسس معينة و محددة، فعلى أساس الثبات في البيئة لفترات طويلة تندرج مجموعة من الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات كالنفثالين وبعض المبيدات كالأندوسولفان. كما تحدث التسمم للكائنات الحية، اذ صنفت من قبل وكالة حماية البيئة للولايات المتحدة (USEPE) كمركبات تسبب أثارا مرضية على صحة الإنسان. كما صنفت كمواد مسببة للسرطان من قبل المركز الدولي لأبحاث السرطان (Straif *et al*., 2005).

تعتبر الفلافونويدات من متعددات الفينول، والتي تلعب أدوارا بيولوجية هامة كمضادات الأكسدة، مضادة للبكتيريا، مضادة للالتهاب وللحساسية كما تحمي الجسم من مجموعة من الأمراض كالسرطان ومرض السكري وأمراض الأوعية القلبية والأمراض المناعية ،كما تثبط الأكسدة الفوقية للبيدات في المرحلة الأولية باقتناصها لجذر الهيدروكسيل

(Saja *et al*., 1995 ; Pandey and Rizvi, 2009 ;Cook and Samman, 1996).

تحتوي أغذيتنا على مضادات للأكسدة كالفيتامينات. يتمركز بعضها في الجزء المائي من الجسم أي مضادات أكسدة قابلة للذوبان في الماء مثل vitamine C والبعض الأخر في الجزء الذهني، مضادات أكسدة ليبيدية كالفيتامين vitamine E. (Valko *et al*., 2006). يعتبر هذان الفيتامينان مضادات الأكسدة لقدرتهما على اقتناص الأشكال النشطة للأوكسجين مثل جذر الهيدروكسيل ، الأكسجين المفرد ،جذر فوق الأكسيد ، ثاني أكسيد النتروجين، جذرالنتروكسيد و pesoxynitrite.....الخ

(Carr and Frei,1999; Halliwell, 1994; Packer, 1991; Magnin, 1992)

تهدف هذه الدراسة الي تقييم مدي تأثير الأندوسولفان والنفثالين والتي تعتبر من المبيدات العضوية الدائمة على الجهاز الدموي والمناعي وبعض المعايير البيوكيميائية هذا من جهة، ومن جهة أخري تقييم الدور الوقائي لـ vitamine E وvitamine C و Quercètine ومستخلص قشور البرتقال اتجاه السمية المحرضة بواسطة الأندوسلفان و النفثالين معا وذلك من خلال معاملة الجرذان بتلك المواد.

أظهرت نتائج هذه الدراسة، زيادة معنوية في التقييم الإجمالي لكريات الدم البيضاء و العدد الإجمالي للمفاويات لدى الجرذان المعاملة بالمبيدين مقارنة بالشاهد. كما بينت تلك النتائج انخفاض معنوي في العدد الإجمالي للخلايا البيضاء أحادية النواة و الخلايا البيضاء االحبيبية لدى المجموعة المعاملة بالأندوسلفان و النفثالين معا مقارنة بالشاهد.

بسبب التغيرات التي يسببها النفثالين للجهاز المناعي عند الإنسان، صنف كمادة سامة من قبل (NTP)National Toxicology program . تم هذا التصنيف علي أساس المعطيات المتاحة والتجارب العلمية التي أجريت على حيوانات التجارب، إناث وذكور فئران (B6C3F1)، حيث عوملت بالنفثالين بجرعة 157mg /m³ لمدة 10أسابيع، فأدت المعاملة الي ارتفاع العدد الإجمالي للخلايا البيضاء (leucocytes) في الدم (NTP, 1992a). وهذا يدعم نتائج دراستنا.

كما بينت الدراسات العلمية المتقدمة والتي أجريت على فئران التجارب أن الأندوسلفان شديد السمية اثر المعاملة عن طريق الفم والاستنشاق ، ويعتبر مادة كيميائية سامة لجميع الأنظمة الحية، حيث يسبب السمية الدموية والمناعية، كما أنه سام للكلي، الغدد الصماء والجهاز العصبي

(Extonet, 1993; Silva *et al*., 2010). فالنتائج التي تم التوصل اليها تتوافق مع أعمال (Aderson *et al*., 1995) والتي بينت أن التعرض للهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات والمبيدات يسبب انخفاضا في مستويات المصل المناعي ويحث على زيادة تشكل الكريات الدم البيضاء (leucocytes) .

تؤدي الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات والمبيدات إلى ضعف واختلال النظام المناعي الخلطي والخلوي (Morgane *et al*., 2002)، حيث تنتقل الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات بسرعة باتجاه الأعضاء المختلفة للحيوان عن طريق الدم والأوعية اللمفاوية. وهذا يرجع لخاصيتها المحبة لدهون والتي تسهل لها اختراق الأغشية البلازمية مما يؤدي إلي ارتباطها مع الجزيئات الكارهة للماء وانتقالها داخل الخلايا. كما تسبب إتلاف الأغشية البلازمية للخلايا وأغشية العضيات الخلوية السيتوبلازمية كالميتوكندريا، وذلك عن طريق الجذور الأوكسجينية المتشكلة نتيجة تأثير موادها الأيضية السامة (Trantini, 2009).

أدت المعاملة بالأندوسلفان والنفثالين معا بجرعتي (4ملغ/كغ + 50ملغ/كغ) على التوالي الى ارتفاع معنوي ($P<0.001$) في العدد الإجمالي للخلايا اللمفاوية. تتوافق هذه النتائج مع نتائج دراسة (Lehmann, 2002). اذ أظهرت معاملة اناث و ذكور جرذان التجارب بالنفثالين وبجرعة

25ملغ/كلغ ولمدة 10 أيام زيادة معنوية في عدد الخلايا اللمفاوية على مستوي الغدة التيموسية (Thymus) والعقد اللمفاوية. نفس النتيجة توصل اليها (Chen *et al*., 2007).

أكدت نتائج دراسة (Muller and Halliday, 1987) أن الاستجابة المناعية تتم نتيجة دخول النفثالين إلى الجسم سواء عن طريق الاستجابة المناعية الخلوية (lymphocyte T) أو الاستجابة المناعية الخلطيه (lymphocyte B). حيث تتشكل الخلايا اللمفاوية T وB على مستوي نخاع العظام الذي يعتبر مسئولا عن تشكل مكونات الدم (Benlhani *et al*., 1987).

كما تبين من أعمال Jerina ومساعده (1970)، وكذلك من أعمال Wilson وآخرون (1996) كذلك فالنفثالين مادة سامة للخلايا المناعية البيضاء أحادية النواة وذلك بسبب انخفاض الأنظمة المضادة للأكسدة وزيادة إنتاج الجذور الأوكسيجنية الحرة، حيث تؤثر نواتج أيض النفثالين السامة علي الجهاز المناعي ، اذ تحفز عملية أيض النفثالين بواسطة cytochrome P450 التي تؤدي إلى إنتاج مواد وسطية (époxyde). يحدث لهذه المواد عملية التحلل المائي بواسطة إنزيم époxyde hydrolase مما يؤدي إلى إنتاج مركب naphtoquinone. يعتبر هذا الأخير مادة سامة جدا للجهاز المناعي والدموي.

تؤدي معاملة الجرذان بالنفثالين الى إنتاج الجذور الحرة وانخفاض الأنظمة المضادة للأكسدة ،حيث تؤثر هذه الجذورالحرة الأوكسجنية على الفسفولبيدات والبروتينات الغشائية للخلايا المناعية.

(Paller *et al*., 1992 ; Sener, 2000) . تتوافق هذه النتائج مع نتائج دراستنا هذه، حيث لوحظ انخفاض معنوي في عدد الخلايا الدموية البيضاء أحادية النواة بما في ذلك الحمضية والقاعدية والمعتدلة وهذا عند المجموعات المعاملة بالأندوسلفان والنفثالين مقارنة بالشاهد. كما بينت دراسة أخرى

أجريت على مستنبتات البالعات الكبيرة (macrophages) مع النفثالين، أن هذا الأخير يحث على تشكيل و ارتفاع أيون superoxyde وانخفاض مستوى glutathion مما يؤدي الي موت الخلايا

(Bagchi *et al*., 2001).

أتضح من خلال العديد من الدراسات حول أثار سمية الملوثات العضوية الدائمة (POPs) كالمبيدات والهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات بأن هذه المواد بإمكانها أن تحدث سمية خطيرة على العضوية مثل اضطرابات عصبية وأمراض مستعصية وخطيرة كالسرطان والسكري (Rekha, 2005).

كما يفقد الإنسان الكثير من قدراته المناعية عند تعرضه للمبيدات والهيدروكاربونات (LNE, 2008).

بالإضافة إلى ذلك، أدت معاملة الجرذان بالأندوسلفان و النفثالين معا بجرعتي (4ملغ/كغ +50ملغ/كغ) إلى انخفاض معنوي ($p<0,01$) و($p<0,001$) في عدد كرات الدم الحمراء وهيموغلوبين علي الترتيب مقارنة بالشاهد.

تبين أن الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات يمكن أن تسبب فقر الدم السرطاني النخاعي ، اذ تعمل علي تثبيط تشكل كرات الدم الحمراء والبيضاء و تسبب تنسج نخاع العظام (Hypoplasie médullaire) المسئول عن تشكيل كرات الدم الحمراء ،و تحلل الهيموغلوبين بفعل سمية الملوثات العضوية الثابتة (Desctes *et al*., 1992).

أدت معاملة جرذان التجارب بالأندوسلفان بعد الولادة الى حدوث الإجهاد التأكسدي (Paul *et al*., 1995)، إضافة الى ذلك فالتعرض للملوثات العضوية الدائمة قبل وبعد الولادة يمكن أن يسبب أثارا مرضية متأخرة، تصبح واضحة في سن البلوغ، على سبيل المثال تعرض فئران التجارب بعد الولادة لخليط من HAPs يسبب التوتر والقلق وخلل وضعف في القدرات المعرفية والحركية، وأمراض في الجهاز الدموي يرافقه على المستوى الجزيئي نقص الأيض وانخفاض نشاط Cytochrome oxydase وتغيرات التعبير على مستوي الاستنساخ.

(Crepeaux *et al*., 2012; Gill *et al*., 2013).

تبين النتائج المتوصل اليها، الدور الوقائي لكل من vitamine C، vitamine E، Quercétine ومستخلص قشور البرتقال، حيث لم نسجل اختلاف معنوي بالنسبة للعدد الإجمالي لكريات الدم البيضاء، الخلايا االحبيبية، القاعدية، الحامضية، المتعادلة، الخلايا البيضاء أحادية النواة واللمفاويات وكما لم يسجل اختلاف معنوي في عدد كرات الدم الحمراء وهذا عند الجرذان المعاملة بهذه المواد قبل معاملتها بالأندوسلفان والنفثالين معا بجرعتي (4 ملغ/كلغ 50ملغ/كغ على التوالي) مقارنة بالشاهد.

تعتبر هذه المواد مضادات للأكسدة، تهاجم الأشكال النشطة للأكسجين الناتجة عن سمية النفثالين ونواتج أيضه وبالتالي تقلل من أثارها السام على الجسم. من بين هذه المواد، فيتامين C و الذي يعتبر أهم مضادات الأكسدة القابلة للذوبان في الماء على مستوي السوائل البيولوجية وبين الخلايا القادرة على التداخل مع الغشاء السيتوبلازمي بإعطائه إلكترون لجذر tocopheroxyl كما يعمل على إقتناص الأشكال النشطة للأكسجين كالأكسجين المفرد، الهيدروكسيل(May, 1999; Carr and Frie, 1999) .

وحسب أبحاث(1999)Carr and Frei فأهم الخصائص التي تجعل فيتامين C مضاد أكسدة فعال، هي قلة تفاعل جذوره (جذر الأسكوربيل) المتشكلة خلال اقتناص الأشكال النشطة للأكسجين والنيتروجين. وذلك نتيجة تحول جذر الأسكوربيل بسرعة إلي أسكوربات بواسطة عملية Dusmutase

المعتمدة علي NADH في وجود Glutathion أو الإنزيمات المعتمدة على Glutathion مثل Glutaredoxin, Oxidreductase, Dehydroascorbate, Glutathion Dehydrogenase والإنزيمات المعتمدة علي NADPH مثل

Thioredoxin Reductase (Selenoenzyme). كما يعمل فيتامين E على إخماد نشاط الجذور الحرة على مستوي الأغشية في مرحلتها الأولى، بالإضافة إلى هذا يتميز بنشاطه علي الجذور الليبيدية Alcoxyl وجذور Hydroperoxy (Bermnd, 1997).

بينما تعتمد الوظيفة المضاد للأكسدة لفلافونويدات المستخلص النباتي والكرسيتين على بنياتها الكيميائية. فوجود مجاميع الهيدروكسيل يجعل منها مثبط جيد للأكسدة الفوقية لليبيدات الغشائية التي تسببها الجذورالتفاعلية الأوكسيجنية على مستوي الأغشية الخلوية. توافق هذه النتائج أبحاث

(Kim *et al*., 2012) والتي أبرزت دور الفلافونويدات والمستخلصات النباتية الغنية بمتعدد الفينولات في الوقاية من التوتر التأكسدي. كما بينت دراسة أخرى (Ouali *et al*., 2007) دور hespéridine

(فلافونويد ينتمي إلى قسم flavanone)، اذ يقي من التوتر التأكسدي ويتصدى لظهور التشوهات الجنينية لدى الجرذان المصابة بالسكري من خلال تحفيز نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة.

كما أن معاملة الجرذان بالأندوسلفان (4ملغ/كغ) ، بالنفثالين (50ملغ/كغ) وبالأندوسلفان و بالنفثالين معا تسببت في زيادة معنوية في تركيز الجلوكوز في دم الجرذان مقارنة بالشاهد. يمكن تفسير هذه الزيادة في تركيز الجلوكوز بالتأثير السمي للأندوسلفان والنفثالين على خلايا البنكرياس التي تفرز الأنسولين المخفض لنسبة سكر الدم. حيث بينت دراسة (Yan, 2010) بحدوث توتر تأكسدي محرض بمبيد كلوروعضوي و المتمثل في chlorpyrifos على مستوي الخلايا B للبنكرياس نتيجة لزيادة إنتاج اللأشكال الأكسجينية النشطة و التي تهاجم فوسفوليبيدت أغشية الخلايا البنكرياسية مما يؤدي إلي ارتفاع الأكسدة الفوقية لليبيدات الغشائية.

تتطابق هذه النتائج، مع نتائج (Kamath and Rajini, 2007) ، و التي تؤكد التأثير السمي للمركبات العضوية الدائمة علي الخلايا البنكرياسية . كما تسبب المركبات العضوية الدائمة ارتفاع إنتاج ROS على مستوي البنكرياس مما يؤدي إلي مهاجمة الفوسفوليبيدات والبروتينات الغشائية للخلايا البنكرياسية و بالتالي يحدث خلل في إفراز الأنسولين المخفض لمستوي جلوكو ز الدم (Orabi *et al*., 2013).

أتضح من خلال دراستنا الدور الوقائي للفيتامينين C، E، الكرسيتين ومستخلص قشور البرتقال اتجاه التأثير السمي للنفثالين ومبيد الأندوسلفان. حيث لم يسجل اختلاف معنوي في تركيز جلوكوز دم الجرذان المعاملة بهذه المواد والأندوسلفان مع النفثالين. توافق هذه النتائج أبحاث كل من (Kebieche *et al*., 2011) و (Ouali *et al*., 2007) و التي تبين دور الكرسيتين والفلافونويدات المستخلصة من النباتات في تخفيض مستوي سكر الدم والوقاية من التوتر لتأكسدي، والتسمم الكبدي والكلوي. كما أن بعض متعددات الفينول قادرة على تعديل المسارات الرئيسية لأيض الكاربوهيدرات التي تتغير عادة خلال الإصابة بالداء السكري وبالتالي تعيد توازن الجلوكوز الكبدي. كما تؤثر الفينولات علي استهلاك الجلوكوز المحيطي في الأنسجة الحساسة والغير حساسة للأنسولين. بالإضافة الى ذلك، أكدت الكثير من الدراسات خارج العضوية أن متعددات الفينول مثل quercétine تحسن من استهلاك الجلوكوز المرتبط بالأنسولين على مستوي الخلايا العضلية والذهنية وذلك عن طريق تنشيط نواقل الجلوكوز GLUT4 في الغشاء البلازمي عن طريق تحفيز مسار AMP-activated protein kinase (Bahhadoran *et al*., 2013).

تقي مضادات الأكسدة الفعالة من التأثيرات السلبية للأشكال الأكسوجينية النشطة وبالتالي تقلل من الأكسدة الفوقية لليبيدات الغشائية للعديد من الأعضاء كالكبد والدماغ ومشيمة الجنين المحرض بمختلف المواد عند الجرذان الحوامل: (Kim *et al*. 2012).

بالإضافة إلى ذلك أدت المعاملة بالنفثالين والأندوسلفان إلى تغيرات بيوكميائية علي مستوي الكبد تتجلي في الزيادة المعنوية في الأنزيمات الكبدية (ALT, AST) عند الجرذان المعاملة بالأندوسلفان والنفثالين مقارنة بالشاهد. ويفسر ذلك بحدوث الموت الموضعي للخلايا الكبدية وانحلالها بسبب التأثيرالسمي للأندوسلفان والنفثالين مما يؤدي إلي تحرر هذه الإنزيمات في مصل الدم. توافق هذه النتائج ما توصل اليه (Orabi *et al*., 2013)، حيث أدت معاملة الجرذان بخليط من الملوثات العضوية (POPs) الي زيادة في الإنزيمات الكبدية (ALT, AST) بسبب تمزق الأغشية الخلوية نتيجة الأكسدة الفوقية لليبيدات بفعل التوتر التأكسدي المحفز بخليط الملوثات العضوية. كما أدي إلى ذلك الي ارتفاع معدل MDA السيتوزولي عند الجرذان المعاملة بهذا الخليط . تتوافق هذه النتائج مع أبحاث أخرى والتي تبين ارتفاعا للإنزيمات الكبدية مجتمعة مع ارتفاع الأكسدة الفوقية لليبيدات الغشائية للخلايا الكبدية نتيجة معاملة الجرذان بالنفثالين، الأندوسلفان، والبنزو(a) بيرين (Gulden *et al*., 2005; Saravanan *et al*., 2010) وكذلك نتائج بحث Emre *et al*., 2014 والتي تؤكد الارتفاع المعنوي للإنزيمات الكبدية في مصل ا لدم. كما تسبب معاملة الجرذان بمبيد chlorpyrifos لمدة 28 يوم إتلاف وموت الخلايا الكبدية مما أدي إلى زيادة الإنزيمات علي مستوي المصل. (Heikar *et al*., 2012).

كما تبين النتائج حدوث ارتفاع معنوي ($p<0,05$) و ($p<0,01$) في مستوي الكولسترول الكلي والجلسريدات الثلاثية لدى الحيوانات المعاملة بالأندوسلفان والنفثالين مقارنة بالشاهد. يؤدي غياب الأنسولين إلي ارتفاع تحلل الدهون مما يتسبب في ارتفاع الكولسترول الكلي في الدم وتراكمه في الكبد، كما يعمل على زيادة تحلل البروتينات ومنع تشكلها (Zhang et al., 2000; Kente and Reddy, 2013). كما أدت معاملة الجرذان بمبيد chlorpyriphos بجرعة 30ملغ/كغ إلي حدوث تلف كبدي وارتفاع الكولسترول والغليسريدات الثلاثية (Kente and Reddy).

من جهة أخري اتضح من معاملة الجرذان بالكرسيتين والفيتامينين C,E ومستخلص قشورالبرتقال، الدور الوقائي لهذه المواد حيث لم يسجل اختلاف معنوي في مستوي الكولسترول والجليسريدات الثلاثية عند الجرذان المعاملة بالأندوسلفان والنفثالين.

كما سجل ارتفاع معنوي ($p<0,01$) لمستوي اليوريا والكرياتينين لدى الحيوانات المعاملة بالأندوسلفان والنفثالين معا مقارنة بالشاهد. وهذا ما يؤكد سمية المبيدات العضوية الدائمة علي الجهاز البولي حيث تؤدي إلي حدوث اختلال في الوظيفة الكلوية بسبب تأثير هذه المواد علي الكبيبة الكلوية. بسبب التوتر التأكسدي بفعل الجذور الحرة على الأغشية الفوسفوليبيدية للخلايا الكبدية وهذا يؤدي لحدوث الأكسدة الفوقية للبيدات الغشائية وهذا ما أكده Mohajeri and Abdollahi (2010) أثناء معاملة الجرذان بمبيدات organophosphorés و carbames حيث أدي إلي حث التوتر الأكسيدي على مستوي الجهاز البولي.

الفصل الرابع

الاستنتاج

الاستنتاج

تعتبر المبيدات الكلورية كالأندوسلفان (END) والهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات (HAPs) مواد سامة حيث تسبب الكثير من الأمراض المستعصية والمزمنة، وغالبا ما يتعرض الإنسان إلى العديد من هذه المواد السامة، مما تؤدي إلى حدوث أثار ضارة بصحته، حيث تكون درجة هذا الضرر مرتبطة بالجرعة، بالإضافة إلى عوامل أخرى مثل الامتصاص، توزيع هذه المواد، قدرة ارتباط المادة السامة (المبيد والهيدروكربون) بالجزيئات البيولوجية وأيضا طرحها. كما أكدت الكثير من الأبحاث العلمية ارتباط الأمراض بما فيها الأمراض العصبية كمرض الزهايمر والبركنسون بالجهد التأكسدي الناتج عن اختلال التوازن ما بين مضادات ومحفزات الأكسدة.

لذا تهدف هذه الدراسة إلى تقييم الفعل السمي للجهد التأكسدي للأندوسلفان والنفثالين في سيتوبلازما الخلية العصبية، حيث تم قياس مستوى الإنزيمات المضادة للأكسدة GSH, CAT, SOD GST والبروتينات السيتوزولية وأيضا MDA الناتج عن فوق الأكسدة الليبيدية. بينت النتائج الأثر السمي لكل من الاندوسلفان والنفثالين على الجهاز العصبي واتضح ذلك من خلال الزيادة المعنوية في مستوى ال MDA السيتوزولي، مما أكد حدوث الأكسدة الفوقية للفوسفوليبيدات الغشائية للخلايا العصبية والناتجة عن ارتفاع الجهد التأكسدي مما أدى إلى تلف البنية الغشائية للخلايا العصبية. كما سجل انخفاض معنوي في مستويات النظام المضاد للأكسدة و المتمثل في GSH,CAT SOD، وذلك نتيجة لتنشيط الآليات المسؤولة عن إنتاج الأشكال الأكسجينية النشطة وتثبط النظام المضاد للأكسدة.

أيضا تشير نتائج هذه الدراسة الي انخفاض معنوي في مستوى البروتينات السيتوزولية لدى الحيوانات العاملة بالمبيدين مقارنة بالحيوانات الغير معاملة أي الشاهد. بالإضافة الي ذلك، بينت نتائج هذه الدراسة، الفعل التعاوني ما بين END و Nap ويتجلى هذا في الزيادة المعنوية في مستوى الـ MDA لدى المجموعة المعاملة بلأندوسلفان و الأخرى المعاملة بالنفثالين والانخفاض المعنوي لدى المعاملة بالأندوسلفان و النفثالين معا.

كذلك أوضحت نتائج هذه الدراسة، التأثير السمي للأندوسلفان (END) على ميتوكوندريا الخلايا العصبية، يتجلى ذلك في انخفاض مستوى مضادات الأكسدة (CAT , SOD ,GSH)، أي حدوث اختلال في وضع الأكسدة والاختزال في تلك العضية النشطة. فسجل انخفاض معنوي ($P<0.01$) و($P<0.001$) في مستوى كل من CAT, GSH و SOD علي الترتيب مقارنة بالشاهد. وهذا ما يؤكد التأثير السمي للأندوسلفان (END) بجرعة 2 ملغ/ كغ على وضعية الأكسدة والاختزال على مستوي ميتوكوندريا الخلايا العصبية بسبب زيادة إنتاج الأشكال الأوكسجينية النشطة (ROS).

ويمكن تفسير الانخفاض الكبير لمضادات الأكسدة بزيادة الأكسدة الفوقية لليبيدات الغشائية لميتوكندريا الخلايا العصبية، والتالي زيادة مستوى ال MDA في الحشوة الميتوكندرية، مما يشير إلى

فقدان التوازن ما بين مضادات الجهد التأكسدي والعوامل المنتجة له. كما أظهرت النتائج انخفاض معنوي لمستوى البروتينات في حشوة ميتوكوندريا الخلايا العصبية للجرذان نتيجة لانخفاض النشاط الإنزيمي المضاد للجذور الحرة الأوكسيجينية مما أدى إلى تخريبها.

أيضا، سجل انخفاضا كبيرا في الكثافة الضوئية للمعلق الميتوكندري، و ذلك راجع لفقدان أنظمة المبادلات على مستواها بسبب اتساع الثقوب، مما سمح بدخول الماء والأملاح والجزيئات البيولوجية للخلايا وبالتالي موتها. حيث تعتبر ظاهرة ارتفاع مستوى الأكسدة الفوقية لليبيدات من بين العوامل المسببة للتلف الغشائي واتساع الثقوب الغشائية. أدى ذلك إلى فقدان بنية وتكامل ووظائف ميتوكوندريا الخلايا العصبية.

كما تبين هذه النتائج الدور الوقائي للكرسيتين اتجاه السمية العصبية المحفزة بالأندوسلفان وذلك بالحد من زيادة مستوى الـ MDA الميتوكوندري لدى الجرذان المعاملة بواسطة الـ Que + END. كما يعمل على منع انخفاض مضادات التوتر التأكسدي SOD , CAT, GSH و التي تعمل على حماية الخلية العصبية و عضياتها من التلف الخلوي وبالتالي الحفاظ على تكاملها الجزيئي والوظيفي. فمن خلال النتائج، اتضح أن Que عاملا وقائيا ضد إنتاج الـ ROS وبالتالي منع انفتاح الثقوب الكبيرة الموجودة في أغشية الميتوكوندريا. علما بأن تلك الثقوب تعمل على تأمين النفاذية عبر أغشية الميتوكوندريا بمعنى حماية التكامل البنيوي والوظيفي للخلايا العصبية.

كذلك تشير نتائج هذه الدراسة الي تِأكيد التأثير السمي للنفثالين والأندوسلفان علي الخلايا المناعية والجهاز المناعي، وذلك من خلال زيادة العدد الإجمالي لكرات الدم البيضاء. تعزى هذه الزيادة الي الارتفاع المعنوي ($p<0,001$) في عدد الخلايا اللمفاوية لدى الجرذان المعاملة بالأندوسلفان والنفثالين كل على حدا والمعاملة بالأندوسلفان والنفثالين معا. ويمكن تفسير هذه الزيادة بإثارة الجهاز المناعي بتلك المواد السامة. كما أدت معاملة الجرذان بتلك الاخيرة الي انخفاض معنوي($p<0,05$) في عدد كرات الدم البيضاء الحبيبية ، الحامضية و ($p<0,01$) بالنسبة للقاعدية، والمتعادلة. يستنتج من ذلك التأثير السام للأندوسلفان والنفثالين علي خلايا الدم البيضاء. كما أنها سامة لكرات الدم الحمراء وهيموغلوبين الدم، و يتجلى ذلت في الانخفاض المعنوي ($p<0,01$) و ($p<0,001$) لكل منهما علي التوالي .

بينت نتائج تقييم المعايير البيوكميائية ارتفاعا معنويا ($p<0,01$)، ($p<0,001$) في نشاط الإنزيمات الناقلة لمجموعة الآمين الكبدية (ALT,AST) على التوالي ، والتي تعتبر كمؤشر لتلف الخلايا الكبدية مما فسر التأثير السام للأندوسلفان والنفثالين علي الكبد. كما علل الأثر السمي لهذه المواد علي الجهاز البولي بالزيادة المعنوية ($p<0,001$) المسجلة في مستوي اليوريا و كرياتينين مصل الدم على و ذلك لدى الحيوانات المعاملة بالنفثالين والأندوسلفان. كما أ كدت نتائج الدراسة البيوكميائية علي حدوث خلل في العمليات الأيضية للجلوكوز ،الغليسريدات الثلاثية و الكلسترول و تجلى ذلك من

خلال الارتفاع المعنوي($p<0,001$)، ($p<0,01$)، ($p<0,05$) على التوالي في مستوي تلك المواد لدى الحيوانات المعاملة بالنفثالين والأندوسلفان مقارنة بالشاهد. فتغيير تلك المعايير تؤكد الأثر السمي لهذه المبيدات على كل من الكبد والبنكرياس.

كما نستنتج الدور الوقائي لكل من فيتامينين E و C و الكرسيتين بالإضافة إلي مستخلص قشور البرتقال. حيث لم يسجل اختلاف في المعايير المدروسة عند المجموعات المعاملة بهذه المواد إضافة إلى معاملتها بالأندوسلفان والنفثالين مقارنة بالشاهد.

الاستنتاج العام

تبين من خلال نتائج دراسة سمية النفثالين (50 ملغ/كغ) والأندوسلفان (4ملغ/كغ)، (2ملغ/كلغ) على الجهاز العصبي، الانخفاض المعنوي في مستوى الجزيئات المشكلة للجهاز المضاد للأكسدة سواء ذات الطبيعة الأنزيمية (SOD، CAT، GST) أو غير أنزيمية (GSH) وكذلك البروتينات. كما سجل ارتفاعا معنويا في مستوي الأكسدة الفوقية لليبيدات، في سيتوزول وحشوة ميتوكوندريا الخلايا العصبية. بالمقابل، فقد أبدي الكرسيتين دورا وقائيا ضد التو ثر التأكسدي المحرض بالأندوسلفان.

أيضا، بينت نتائج هذه الدراسة، زيادة الانتفاخ الميتوكوندري. حيث تم قياس الكثافة الضوئية للمعلق الميتوكوندري، و سجل انخفاضا مستمرا ومتناسبا تناسبا عكسيا مع التراكيز المتزايدة للأندوسلفان. مما أوضح زيادة الانتفاخ الميتوكوندري، بسبب تلف البنية الغشائية الناتج عن التأثير السام للأندوسلفان. بينما أتضح من خلال النتائج الدور الوقائي للـ Que (200µm) اتجاه الأثر السمي لأندوسلفان. أذ عمل علي التقليل أو منع حدوث الانتفاخ الميتوكوندري.

كما اتضح من خلال نتائج دراسة سمية الأندوسلفان (4ملغ/كغ) والنفثالين (50ملغ/كغ) على الجهاز الدموي والمناعي، ارتفاع معنوي ($p<0,001$) ، ($p<0,01$) في عدد الخلايا اللمفاويات والعدد الكلي لخلايا الدم البيضاء على التوالي ، وانخفاض معنوي في عدد الخلايا المناعية الحبيبية (القاعدية، الحامضية، المتعادلة) وأحادية النواة مقارنة بالشاهد. في حين أثبتت النتائج الدور الوقائي للكرسيتين، مستخلص قشور البرتقال، فيتامين C.

المراجع

Adenne. (2004). Les micro polluants métallique dans les boues résiduaires des stations d'épuration uraines P : 44-48.

Aderson C., Hehr A., Robbins R., Athar M., Mukhtar H., Elmets C A. (1995). Besois metabolic induction of contact hypersensitivity to immunotoxic polyaromatic hydrocarbons J. Immunol. 155, 3530-3537.

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

A**gritox. (2007).** Note de réévalutin R E V. 13éme evaluation préliminaire des risques et de la valeurs de l'endonsulfan. Canade.

Ahmad M., Pacheco MA., Santos. (2003). Naphthalene-induced differential tissue damage association with circulating fish phagocytes induction Ecotoxicol. Environ. Saf., 54, pp. 7-15.

Ahmad T., Hamid M., Fatima HS. , Chand SK. , Jain M., Athar S., Raisuddin. (2000). Induction of hepatic antioxidants in freshwater fish *(Channa punctatus Bloch)* is a biomarker of paper mill effluent exposure. Biochim. Acta, 1523, pp. 37-48.

Ahmed A., Khan MM., Hoda N., Haza SS., Khan MB., Javed H., Ishrat T., Ashafaq M., Ahmad MD., MM. And Islam F. (2011). Querctin protects against oxidative stress associated damages in arat model of transient cerebral ischemia and reperfusion. *Neuroche. Res.*

Ahmed R S., Seth V., Pasha S T., Banerjee B D. (2000). Influence of dietary ginger (*Zingberofficinalis* Rosc) on oxidative stress induced by malathion in rats. *Food and Chemical Toxicology*,38 : 443-450.

Ahmed S., Passos J F., Birket M J., Beckmann T et al. (2008). Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress J Cell Sci 121 : 1046-1053.

Albert R E., Miller M L., Cody T., Andringa A., Shukla R., Baxter C S. (1991). Benzo(a) pyréne-induced skin damage and tumor promotion in the mouse. Carcinogenesis Jul : 12(7) : 1273-80.

Altuntas I.,Delibas N., Dogue D K., Ozmen S., Gultekin F. (2002). Role of reactive oxygen species in prganophosphate insecticide phosalone toxicity in erythorocytes in vitro. *Toxicology in vitro*, 17 ; 153-157.

Alvares S L., Valdes B., Zaobornyj T., Boveris A. (2003). Oxygen dependence of mitochondrial nitric oxide synthase activity, Biochem. Res. Commun, 305 : 771-775.

Ambuselvan C., Vijayavel K. and Balasubramanian M P. (2007). Protective effect of operculina uirpethum against 7,12-dimethyl benzo(a) anthracene induced oxidative stress with reference to breast cancer in axperimental rats. *Chemico. Biological interactions, 168 : 229-236.*

Amiel-Tison C., and Gosselin J. (2010). Pthologie neurologique périnatale et ses conséquence, pp : 5-13.

Andeson C., Hehr A., Robbins R., Hssan R., Athar M., Mukhtar H., Elmets CA. (1995). Besois metabolic induction of contact hypersensitivity to immunotoxic polyaromatic hydrocarbons J. *Immunol*.155, 3530-3537.

Assefa Z., Van Laethem A., Gamyn M., Agostinis P. (2005). Ultraviolet radiation induced apoptosis in keratinocytes : on the role of cytosolic factors. Biochim Biophys Acta 1755 : 90-106.

ATSDR. (1995). Update-Toxicological profile for naphthalene. Final update. U.S. Department of Health and Human Services. U. S. Public Service, Atlanta,GA.

ATSDR. (2000). Toxicological profile for Endosulfan. Atlanta, Georgia, pp : 181.

Auberval N. (2010). Prévention du stress oxidant dant le diabéte et ses complications par des antioxydants d'origine naturelle. *Thése de doctorat de l'université de Strasbourg*, pp :52-53.

Avissar N., Whitin J C., Allen P Z. (1989). Plasma selenium-dependent glutathioneperoxidase. J.Biol. Chem., 2 : 15850-15855.

Bagchi D., Balmoori J., Bagchi M., Ye X., Williams CB and Stohs SJ. (2002). Comparative effects of TCDD, endrin, naphtalene and chromium (VI) on oxidative and tissue damage in the liver and brain tisues of mise. *Toxicology, 175 : 73-78.*

Bagchi M. , Bagchi D., Balmoori J., Ye X., Stohs S J (1998). Naphthalene-induced oxidative stress and DNA damage in cultured macrophage J774A.l cell. Free Rad. Biol. Med, (25) : 137-143.

Bagchi M.,Blmoori J., Ye X., Bagchi D., Ray SD., Stohs S J. (2001). Protective effect of melatonin on naphtalene-induced oxidative stress and DNA damage in cultured macrophage J774A.1 Cells. Mol. Cellular Biochem. 221, 49-55.

Bahhadoran Z., Mirmiran P. and Azizi F. (2013). Dietary Polyphyenols as potential nutraceuticals in management of diabetes : a review Journal of Diabetes & Metabolic Disorders, 12 :43.

Balleterl W G., Bushman C J., Tidwell PW. (1961). Anal. Chem. 33, 592.

Barbara S., Brlett S. and Eart R. (1997). Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *Jornal of biological chemistry, 272 : 20313-20316.*

Barouki R. (2006). Stress Oxdant et Vieillissement, MEDECINE/SCIENCES (m/s), 22(3) : 266-272.

Beauchamp, Cand Fridovich, I. (1971). Assay of superoxide dismutase. Anal Biochem, 44 : 276-87.

Behl C. (1998). Alzheimer's disease and oxidative stress : inplication for novel therapeutic approaches. *Progress in neurobiology, 57 :301-323.*

Benlhani M., Bachir D., Belobes S., Smaili F. (1987). Hématologie office des publication universitaires 22-74.

Bergendi L., Benes L., Durackova Z., Fereneik M. (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. Life Science. 65(Issues) : 1865-1874.

Bermnd P. (1997). Vitamine E. Therapeutic, 8(4).25-202-10.

Bocard C. (2006). Marées noires et sols polluées par des hydrocarbures (enjeux environnementaux et traitement des pollutions). Edition techni p /Paris/p :11.

Boffeta P., Jourenkova N., Gustavsson P. (1997). Cancer risk from Occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. P :444-472.

Bonnard N. (2005). Fiche toxicologigue. Institu National de Recreche et de sécurité (inrs) , paris /p : 3.

Bonnefont-Rousselot D Jaudon M C Issad B., Cacoub P., Congy F., Jardel C Delattre J., Jacobs C. (1997). Antioxidant status of elderly chronic renal patients treated by continuous ambulatory peritoneal dialysis. Nephorol Dial Transplant, 12 : 1399-1405.

Borg J M.,Rceber A.(2008). Biochimie métaboique,Ellipses , Fance, pp : 257-269.

Bosetti C Boffetta p.(2007). Vecchia C. Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbon and urinary tract cancers : a quantitative review to 2005, Ann oncol Mar ; (3) 431-46.

Bouchon C., Lemoine S. (2003). Niveau de contamination par les pesticides de chaine trophique des milieux marins. *Cotier de la Guadeloupe et recherche de bio marqueurs de génotoxici, université des Antillus et de la Gyane Guadeloupe, p* : 30.

Bourbia Ait Hamlet S. (2013). Evaluation de latoxicité de mixtures de pesticides sur un bioindicateur de la pollution des sols *Helix aspersa. Thèse de doctorat de l'université* Badji Mokhtar, P :110.

Briefert C., Perraand. (2003). Chimie d'environnement, P :244-245-246.

Brigon J M. (2006). Données technico-économique sur les substances, 2éme édition, *technigue et documentation, Lavoisier*, P : 200-211-213-268-315-319.

Brofert C.,Perraud. (2003). Chimie d'environnement , p : 244-245-246.

Brown L A.,Khousbouei H., Goodwin J S., Irvin-Wilson CV., Ramesh A., Seng L Callister M M., Jiant G C T., Aschner M., Hood D B. (2007). Down-regulation of early ionotrophic glutamate receptor subunit developmentale expression as a mechanism for

observed plasticity deficits following gestational exposure to benzo(a)pyréne. Neurotoxicology, 28 :965-978.

Bruneton J. (1993). Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. *La voisier TEC et DOC*, Paris, 2eme édition : 268,270.

Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. *La Voisier TEC et DOC*, Paris. 2éme édition. P.268-277.

Çagar Y., Kaya M., Belge E., Mete U O. (2003). Utrastructure evaluation of the effect of Endosulfant on mice kidney. Histology and Histopathology, 18 :703-708.

Callister M., Maguire M., Ramesh A., Aimin Q., Liu S., Khoshbouei H., Aschner M., Ebner F F., Hood D B. (2008). Prenatalexposure to benzo(a)pyrene impairs later-life cortical neuronal functin. Neuro Toxicology, 29(5) : 846-854.

Carr A C and Frei B. (1999). Toward a new recomended dietary allownance for vitamine C based on antixodant and health effects in human. The American of Clinical Nutrition, 69(6) : 1086-1107.

Cazarolli L H., Zanatta L., ALberton E H., Figuredo M S., Folado M S., Folador P.,Damazio R G., Pizzolatti M G., and Silva F R. (2008). Flavonoids : Prospective drug candidates *Mini Rev Med Chem*. 8 : 1429-1440.

Charles A., Janemay., Panltravers., Mark J., Shlamchik. (2003). Immunologie Biologie 2eme ed Francaise . p : 55, 312, 313.

Chen C., Tang Y., Jiang X., Qi Y., Cheng S., Qiu C. (2012). Early postnatal benzo(a)pyrene exposure in Sprague-Dwley rats causes persistent neurobehavioral impairment that emerge postanatally and continue into adolescence and adulthood, ToxicolSci,125 : 248-261.

Chen J., Falcomer R., Tracy BL. (2007). Prelimirary results of naphtalene in Ottawa homes, Can J Res P.

Chen M R., Tsai P J Wang YF. (2008). Assessing and dermal exposures and their resultant health-rsks for Workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) contained in oil mists in a fastener manufacturing industry, Environment international Oct ; 34(7) : 971-5.

Chen Y., An H., Ao L., Sun L., Liu W.,Zhou Z., Wang Y., and Cao J. (2010). The combined toxicity of didutyl phtatte and benzo(a)pyrene on the reproductive System of mal Sprague dawley rats *in vivo.*

Chevallier A. (2012). Etude du rôle du recepteur aux hydrocarbures aromatiques ou AhRdansle développement et l'homéostasie du systéme nerveux de la souris C57BL/6J, « thése de doctorat » Human health and pathology. Université Rene Descartes-Paris V,pp : 1-151.

Choi E. (2003). Antioxidative effects of hesperetin Science, 82 : against 7,12-dimethylbense(a)anthracene-induced oxidative stress in mice. Life 1059-1064.

Choi H., Rauh, V., Garfinkel R., Tu Y., Perera FP. (2008). Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and risk of intrauterine growth restriction. Environ Health Perspect, 116 : 658-65.

Christe H L., Nguyen A T., Pedersen F D., Damkier H H. (2013). Na+ dependent acid-base transporters in the choroid plexus ; insisghts from slc4 and slc9gene detetin studies. Front Physiol,pp : 304.

Clairborne A. (1985). Catalase activity, In : Greenwald RA. (Ed), CRC handbook of methods for oxygen radical research, *CRC Press. Boca.Ratom.* FL., PP : 283-284.

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

Cooke N C and Samman S. (1996). Flavonoids- chemistry, metabolism, cardio protectiveeffects and dietry sources. Nutritional Biochemistry, 7 : 66-76.

Crepeaux G., Kremarik P B.,Sikahayeva N.,Rychen G Soulimani R., Schroeder H. (2012). Schroeder, Late effects of a perinatal exposure to a 16 PAH mixture : Increase of anxiety-related behaviours and decrease of regional brain metabolism in adult male rats, Toxicolo Lett,vol,211 : 105-113.

Crossman A R., Neavy D. (2004). Neuroanatomie, *coordination scientifigue de l'édition française ellsivier*, P : 2-211-14.

Curtin J.F., Donovan M ., Cotter TG.(2002) .Regulation and measurement of oxidative stress . in Appoptosis J immunol. Methode,265,p.49-72

Dalsenter. (1999). Reproductive Effects of Endosulfan on Male Offspring of Rats Exposed During Pregnancy and Lactation. Human and Experimental Txicology. 18 :583-589.

Davies M J. (2003). Singet oxygen-mediated damage to protein and its consequences – Biochen Biophys, Res commun, vol 305(3).pp : 761-770.

Deb N., Das S. (2013) A Review of Chlorpyrifos Toxicity in Fish. *Curr*. *Worid Environ*. 8(1) :77-84.

Dejonckheere W., Steuraut W. and Kips R H. (1975). Pesticide residues in strawberries, *toxicol Appl pharmacol*. P : 58-63.

Descotes J., François T., Patrick F. (1992) L'urgence en toxicologie, P.174, 175, 181.

Deshapande SS., Deshpande U S., Salunkhe D K. (1996). Nutrition and health aspects of food antioxidants. In Mdhavi D L., S S., Salunkhe D K. Food antioxidants, Technological, Toxicological, and Health perspectives. Ed. Macel Dekker, Inc. New York. Basel. Hong Kong : 362-411.

Desport J C and Couratier P. (2002). Stress oxydant et maladies neurodégénératives Oxydative stress in neurodegenerative diseases, Edition, scientifigues et médicales Elsevier SAS, 16 : 253-259.

Dlton T.P., Shertzer H. G., Puga A.(2002). Regulation of gene expression by reactive oxygen , signalling, 14, p, 879.

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

Doonaert B Pichard A.(2003). Hydrocarbures Aromatique polycyclique (HAPs). Rapport final. ETSC : INE RIS 2003.

Dorval et Hontela. (2003). Role of glutathion redox cycle and catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout (oncorlynchus mykiss), *elsevier, san diego*, vol :1922, n :2, p :191-200.

Dphid M. (2005). Immunologie Aide mémoire illustré 4eme éd anglaise. P : 22, 24, 25.

Drignen R. (2000). Metabolism and function of glutathione in brain. Progress in neubiology, 62 :642-671.

Droge W. (2002). Free radicals in physiological control of cell function . Review. 82 :47-95.

Durand JL., Buby WF., Lafleur., Penman BW.Crespi C L. (1996). Human cell mutagenicity of oxygenated , nitrated and unsubstituted polycyclyc aromatic hydrocarbon associated with urban aerosols.Mutat Res Dec 20 ; 371(3-4) : 123-57.

Dutta K., Ghosh D., Nazmi A., Kumawat K L., Basu A A. (2010). Common Carcinogen Benzo(a)pyrine Causse Neuronal Death in Mouse via Microglial Activation. PLOS ONE, 5(4) : 1-14.

Ebadi M., Srinivasan S. and Bxi MD. (1995). Oxidative stress and antioxidant therapy in parkinson's disease. Disease. *Prog Neurobiol*., 48 :1-19.

Edelahi M C. (2004). Contribnution à l'étude de dégradation in situ des pesticides par procédés d'oxydation avancée faisant intervenir le fer : application in situ des pesticides par procédés d'oxydaion avancée faisant intervenir le : application aux herbicides phényl urées, thése de doctorat de l'univesité de Marne-la-vallé.

EFSA. (2008). Findings of the EFSA Data Collection on polycyclic aromaic hydrocarbons in food Areport from the Unit of Data Collection and Exposure on a request from the European Commission.

EFSA. (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbons in food-Scientific opinion of the panel on contaminants. In the food chain The EFSA Journal ; 724 :1-114.

Einar A Diesel B., Desor F., Feidt C., Bouayed J., kiemer A Soulimani R. (2012). Neurodevelopmentale and behavioral toxicity via lactational expure to the sum of six

indicator non-dioxin-like-polychlorinatedbiphenyls (6NDL-PCBs) in mice, Toxicolo,299 : 44-54.

El-Bakouri H. (2006). Développemen de nouvelles technigues de détermination des pesticides et contribution à la réduction de leur inpact sur les eaux par utilisation des substances organigues naturelles, thése doctorale, Tanger, 5p.

El-Bakouri H., Morillo J., Usero J., Ouassini A. (2008). Endosulfan sulfate sorption on naturale organic substances. Water Environment Research, 80 :609-616.

Ellmane GL. (1959). Tissue sulfhydryl groups. Arch Biochem Biophys 82 : 70-77.

El-mrabet K., Charlet P., Lalère B. (2008). Les pesticides, Laboration national de métrologie et d'essais.

Emre M H., Aktay G., Polat A., Ozturk F. (2014). Effects of Benzo(a)pyrene and Ethanol on Morphology and Antioxidant status and Transaminases in Rat Liver. *Medicine science*. 3(1) : 1054-106.

Emre M H., Aktay G., Polat A., Vardt N. (2007). Effects of benzo(a)pyrene and etanol on oxidative stress of brain , lung tissues and lung morphology in rats. Chin. J. physiol, 50 : 143-148.

ENEP Chemicals. (2009). Regionally hased assessment of persistent toxicsubstances-Antrarctica regional repot. Geneve : United naions Environnement programme.

EPA. (2004). Pesticides Industry sale and usage, Market estimates 2000-2001.

EPA. (2009). Registering Pesticides.

Eric E., Pascal C. (2006). Immunologie. Ellipses Edition Maketing S A, RUE Bargue. 75740 Paris cedex P : 18.

Fan Q Huang CG., Jin Y., Feng B., Miao H., Li W. (2005). Effects of shark hepatic stimulator substance on the function and antioxidant capacity of live mitochondriain ananimal model of acute liver injury. Acta Biochim Biophys Sin 37 :507-514.

Fattach N. (2010). Les polluant organiques persistants. Thèse de doctorat de *l'université de mohammed* V Souissi, P : 154.

Favier A .(1998). Stress oxydant et mécanismes cellulaire : effet délétères des radicaux libres et défense antioxidants. Deuxième colloque international:élemonts traces radicaux libres etpathologie oxidatives. Monastir-tunisie-17-18 April.

Favier A. (2003) . le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans **la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Rev.** *L'actualité chimique – novembre*, p : 108- 115.

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

Franco R., Sanchez-Oleo R., Reyes EM., Panayiotidis MI. (2009). Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis : menage a trois. Mutat Res 674 : 3-22.

Gabet S.(2004). Remobisation d'hydrocarbures Aromatique. Thèse de doctorat de l'université de limoges , P : 171.

Gamet-Payrastre L. (2008). Contaminants alimentaires et cibles cellulair : exenple des pesticides. Physiologie Env, pp : 44.

Gardés – Albert M., Bnnefont-Rousselot D., Abedin zadeh Z., JOr D.(2003). Espèces réactives de l'oxygène : commet l'oxygène peut-il devenir toxique ? l'actualité chimique, - novembre – décembre,N°96.

Garman R H., Fis AS Jortner B S Jensen K., Hardisty J., Claudio L., Ferene S. (2001). "Methods to identify and characterizedevelopmental neurotoxicity for human bealth risk assessment", Environ Heaith perspect, 109-100.

Garrtner RR. , Theriault GP. (2002). Risk bladder cancer in foundry Workers : ameta – analysis. Occipational and environmental medicine Oct; 59(10) :655-63.

Gerhard R. (1993). Métabolisme des végétaux physiologie et biochimie, **Française, pp : 333-337.**

Germain E., Bonnet P., Aubourg L., Grangeponte M C., Chajès V., Bugnoux P. (2003). Anthracycline-induced cardiac toxicity is not increased by dietary omega-3 fatty acids. Pharmacological Research 47 : 111-117.

Germansky, M., Jamall, I S. (1988) Organe-specific effects of naphthalene on tissue peroxidation, glutahtione peroxidases and superoxide dismutase in the rat. Arch. Toxicol. 61, 480/483.

Gilbert, J D and Bonnefoy M. (2013). Stress oxydant et maladie d'Alzheimer. **Springer-**verlag paris , pp : 175-193.

Gill S., Bowers W., Nakai J S., Yagmimas Al., Mueller R., Andpulido O.,(2013) "Effects of Environmentally Relevant Mixtures of Persistent Organic Pollutants on the Developmental on the Developmental Neurobiology in Rats", Toxicologic pathologic, 41 : 38-47.

Gouzy A and Brignon, JM. (2006). Endosulfan. INERIS, PP :1-18.

Gradés-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D. (2003). Espèces réactives de l'oxygéne : Comment l'oxygéne peut-il devenir toxique, L'actualité chimique,- novembre-décembre :91-96.

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

Gulden Z. Omurtage F., Arbak S., Uslu B., et al. (2005). Protective effect of aqueous garlic extract againt naphtalene-induced oxidative stress in mice. *Pharmacy and pharmacology*,57 : 623-630.

Habig WH., pabst MJ., Jakoby WB. (1974). Glutathion –S transferase, the first enzymatic step in mercaturic acid formation. *J Biol., Chem*., 249 :7130-7139.

Halliwell B. (1992). Reactive oygen species and the centrale nevous sstem J. Neurochem ; 59 : 1609-1623.

Halliwell B. (1994). Free radical, antioxidants and human disease : curiosity, cause or consequence. Lancet, 344 : 721-724.

Halliwell B., Cross C E. (1994). Oxygen –derived species : their relation to human disease and environmental stress. *Environ. Health parps*. 102 (Suppl. 10) :5-12.

Halliwell B., Gutteridge J M C. (1999). Free radicals in biology and medicine, 3th ed. *Oxford* ; Clarendone PRESS ; 22.

Halliwell B., Gutteridge J M C.(2007). Free Radicals in Biology and Medicine 4th ed. *Oxford* university Press, PP : 20-31.

Halliwell B.(2006). Oxidative stress and neurodegeneration : where are we now ? journal of Neurochemistry, 97(6) : 1634-1658.

Hauss F. (2006). Composés hybrides resvératrol /alcanols : Modulateurs de l'activation microglial et inducteurs de la différenciation cellulaire (thése de doctorat). Universite Louis pasteur de Strasbourg, pp : 1-208.

Heikar M T., El-Sherbiny M., Sohair A., et al. (2012). Antioxidant effect of selenium on hepatotoxicity induced by chlorpyrifos in male rats. *Int J pham Sci.,* 4(4) : 603-609.

Heny JB. (1984). Clinical Diagnosis and management 17édition , Saaudersublishe.

Hollman P C H., Devries J H M., Valeeven S D., Mengelers M J B. et Katan M B. (1995). Adsorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers Amer J : clin Nutr, 62.P : 1276-1282.

Honda T., Kiyozumi M., Kojima S. (1990). Alkylnaphthalene.XI. pulmonary toxicity of naphthalene, 2-methylnaphthalene, and isopropylnaphthaiene.XI. Pulmonary toxicity of naphthalene, 2-methylnaphthalene, and isopropylnaphthalenes in mice. Chem. Phem. Pharm. Bull. 38, 3130-3135.

Hooper L., Kroon P A., Rumm E B.,Cohm J S Harvey I., Le comu K A., Ryder J J., Hall W L and Cassidy A. (2008). Flavonoids –rich foods, and cardiovascular risk : a meta-analysis of randomized Trials Am. Jclim nutr, 88 : 38-50.

IARC. (1996). Polynuclear aromatic com pounds, part 1 : Chemicale, environmental and experimental data.

Ibrahim M M., Fjaere E., Lock E J., Naville D., Amlund H. (2011). Chronic Consumption of Farmed Salmon Containing Persistent Organic Pollutants Causes Insulin Resistance and Obesity in Mice. Plos one, (9) : 10.

Ibrahim SS. (2008). Protective effect of hesperidin, a citruse bioflavonoid, on diabetes induced brain damage in rats. *J Appl. Sci. Res*., 4 : 84-95.

Iqbal M., Som DS., Yasumasa O., Masayoshi F. and Shigero O. (2003). Dietary Supplementation of curcumin enhances antioxidant and phae II metabolising enzymes in male mice : possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Pharmacology and toxicology*, 92 : 33-38.

Jacgues B., André R. (2008). Biochimie Métabolique, 2éme edition Ellipses Edion Marketing S A 32 rue Bargue 7540 Paris cedex 15, PP : 257-258.

Jager J.,Rakovic M .(1974). Suplphur – dioscide – induced qualitative change in polycyclic aromatic hydrocarbons adsobed on solid carriers – Jouranal of hygien .epidemiologu and immunology ; 18(2) : 137-43.

Janway., Charles A., Paul Travers., Mark Walport Marki J., Shlamchik. (2003). Immunologie Biologie eme éd Francaise. P :6,7, 8.

Jawich D. (2006). Etude de la toxicite de pesticides vis-à-vis dedeux genres de levures : approche cintique et moléculaire. *Thèse de doctorat de l'université de Saint Joseph*, p : 112.

Jerina D M., Daly J W., Wtkop., Zaltzman-Nirenberg P., Udenfriend S. (1970). 1,2-Naphthalene oxide as intermediate in the microsomal hydroxylation of naphthalene Biochemistry 9,147-156.

Jessen K., (2004). Glial cells. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 36 : 1861-1867.

Juricek L and Coumoul X. (2014). Allimentation , pesticide et pathologies neurologiques. Published by Elsevier Masson SAS, 49 : 74-80.

Kalendar S., Kalendre Y., Oguta AU., Zunhisarcikli M., Durk D., Acikoz F. (2004). Endosulfan induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats : the protective effecte of vitamin E.

Kamath V., Rajini P S. (2007). Altered glucose homeostasis and oxidative inpairment in pancreas of rats Subjected to dimethoate intoxication. *Toxicology*, 231 :137-146.

Kante K. and Reddy CS. (2013). Anti diabetic activity of Dolichos lablab (seeds) Streptozotocin-Nicotinamide induced rats. Life Sciences. 60,667-679.

Kaplan L A. (1984). Glucose. Chem the C V. Mosby CO. Lous. Toronto. 1032-1036.

Kebieche M., (2009). Activit biochimique des extraits flavonoidiques de la plante *Ranunculus repens L* : effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicit induite par l'Epirubicine. *Thèse de doctorat de l'université de Mentouri*, p : 124.

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

Kim J., Ramesh T and Kim S. (2012). Protective effects of Chysanthemi Flos extract against streptozotocin-induced oxidative damage in diabetic mice. Jornal of Medicinal plant Research,6(4) : 622-630.

Kiruthiga PV.,Shafreen RB., Pandian SK., Arum S., Govindus and Devi KP. (2007). Protective effect of silymarin on erythrocyte haemolysate againt benzo(a) pyrene and rxogenous reactive (H_2O_2) induced oxidative stress. Chemephere, 68 : 1511-1518.

Kolanjiappana K., Manoharana S., Kayaivizhi M. (2002). Measurment of erythtrocyte lipids, peroxidation, antioxidation, antioxidant and osmotic fragility in cervical cancer patients. Clinica Chimica Acta, 326 :143-149.

Kortenkamp A. (2008). Low dose mixture effects of endocrine disrupters : implication for risk assessment and epidemioogy. Int J Androl, 31 : 233-240.

Kovalkovicova N., Pistl J., Csank T., Pollakova. (2013). Proliferation and LDH Leakage in Cell Cultures of Animal and Insect Origin Exposed to Insecticide Endosulfan. Kafkas Univ V et Fak Derg., 19(3) : 433-437.

Kristal BS., Park BS., Yu BP. (1996). 4-hydroxynonénal est un puissant inducteur de la transition de perméabilité mitochondriale. J Bio Chem 193 :265-275.

Lafon D., Pichard A., Bisson M.(2000). Evaluation du danger toxicologiquedu fioul rejeté sur les cotes . Institut National de L'Environnement Industriel et des Risques / P : 15.

Larsen K. (1972). Clin, Chim, Acta pp 66, 209.

Lasram M M. , Dhouib L B., Bouzid K., Beladjhmid N. (2014). Association of inflammatory response and oxidative injury in the pathogenesis of liver steatosis and insulin resistance following subechronie exposure to malathion in rats. *Environnementale toxicology and pharmacology*. 38 : 542-553.

Le Moullec Y., Allard F., Casellas C., Deroubaix P., Fuillet B., Henry E., Wallet F., Zmirou-Navier, D., Rousselle C. (2012). Valeurs repères d'aide à la gestion dans l'air des espaces clos-Le naphtalène. Haut conseil de la santé publique, Paris.

Lee J E., Bak J H., Shin I C., Koh H C. (2012). Reactive oxygen species regulated mitochondria-mediated apoptosis in PC12 Cells exposed to chlorpyrifos. Toxicol Appl Pharmacol, 263(2) : 62-148.

Lee J., Huang M S., Yang I C., Lai T C., Wang J L., pang V F., Hsiao M., Kuo M Y. (2008). Essential roles of caspases and their upstream regulators in rotenone induced apoptosis. Biochem Biophys Res Commun, 371(1) : 33-38.

Lee J., koo N., Min D B. (2004). Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Food Science and Food Safety*, 3 :21-33.

Lee S E., Woong C Y., ho-Mo H., Son J., et al. (2013). Endosulfan Induced Biomarkers in Japanese Rice Fish (Oryzias latipes) analyzed by SELDI-TOF-MS. *Int. J.Biol. Sci*., 9(4) :343-349.

Lee W J., Blair A., Hoppin J A., Lubin J H., Rusiecki J A., Sandler D p. , Dosemeci M., Alavanja M C R. (1991). Cancer incidence among pesticide applicators exposed to chlorpyrifos in the Agriculture Health Study. J Natl Cancer Inst, 96(23) : 9-1781.

Lefelevre G. (2003).chimie des hydrocarbures. Edition techni, paris /p : 13, 24,53.

Lehmann I., Rehwagen M., Diez U., Seiffart A ., Richter M. (2002). The infuence of naphtalene exposure to volatile organic compounds on the immunitair system profile of cells. Environ Toxicol ; 17 : 203-10.

Lerbours A. (2009). Caractérisation des effets de l'uranium chez le poisson zébré Daniorerio Mécanismes de stresse , neurotoxité et métabolisme (thèse).université de provençaux – Marseille , pp : 1-224.

Levéne R L. (2002). Camboml modified proteins in cellular régulation aging, and disease. Free Radic, Biol, Med, 32,PP : 790-796.(s.l.).

Livingstone DR. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species prroduction and oxidative damage in aguatic organisms. Mar. Pollut. Bull., pp. 656-666.

Llorca PM. , Cheren I. , Brousse G., Schawn R. (2004). Alimentary or toxic –in duced psychiatric disorders, *EMC-psychiatric*, p :195.

LNE : Laboratoir national de métrologie et d'essais, Janvier 2008. Paris, P : 1-2-3-4-6-7.

Lowry OH., Rosegrough NJ., Farr AL and Randall RJ. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of biology and Chemistry.* 193 : 265-275.

Lumièr B., Seqiun JJ. , Guern C., Guyonnet D., Baranger. P. H. (2001). Guid sur le comportement des polluants dans les sols et les nappes. P : 29-28.

Lundstedt S., White PA., Lemieux CL., Lynes KD., Lambert IB., Oberg L.,et al.(2007). Sources, Fate, and toxic hazards of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at PAH-contaminated sites Ambio Sep ; 36(6) : 475-85.

Lw R.,Biscayal J. (1994).polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)- problems and progress in sampling , analysing and interpretation ,29,pp :235-241.

Lyras L., Cains NJ., Jenner A. (1997). An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, DNA in brain from patients with Alzheimers, disease Neurochem,2061-2069.

Magalhacs J P., Church G M. (2006). Cells dis coresfire emploging reactive oxygen in development and consequences for aging, experimental gerantology 41, PP : 1-10. (s.l.)

Magnin P. (1992). Les Vitamines. Presse Universitaires de France. P73-104.

Maric C. (2007). Recherche de nouveaux biomarqueurs d'exposition aux hydrocarbures polycycliques aromatique à travers l'tude des lésions de l'ADN chez l'homme , Grenoble : université Joseph Fourier 2007

Marieb E M. (2000). Biologie humaine anatomi et physiologie, -6éme édition Deboeck univesirté, pp : 206-218.

Martin F. (2003). Vannin-1, un nouveau régulateur moléculaire du stress oxydant et de l'nflammation. *Thèse de Doctorat de l'Université de la Méditérranée, centre de l'immunologie. De Marceill-Luminy* NCERM U136-CNRS MR6102, pp. 17-19.

Martin. , Seamus J., peter J., Delves Dennis R . burton. , Ivan M.Roitt. (2008). Fondements de l'inmmulogie, 7eme éd anglise p : 37,38.

Martinez Ouschoorn U E., Blliet R M., Rivadeneir D B., Chiavarina B., Pavlides S., Wang C., Whitaker-Menezes D., Daumer K M., Lin Z., Wikewicz A K., Flomenberg N., Howell A., Pestell R G., Knudsen E S Sotgia F. and lisanti M P. (2010). Oxidative stress in cancer associated fibroblasts drives tumor-stroma co-evolution : anew paradigm for undérstanding tumor metabolism, the field effed and genonic inslability in cancer cells cycle : 93256-3276.

Mastrangelo G., Fadda E., Marzia V.(1996). Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man .Environ Health perspect ; 104(11) : 1166-70.

Mates J M., Perez-Gomez C., Nunez de Castro I. (1999). Antioxidan enzyms and human diseases, Clin Biochem, 32 :595-603.

May. JM. (1999). Is ascorbic acid an antioxidant for plasma membrane, The Faseb Journal, 13 : 995-106.

Menon B., Ramalingam K., Kumar RV. (2012). Oxidative stress in patients with epilepsy is independent of antiepileptic drugs. Seizure, 21 : 780-784.

Milane H.(2004). La quercétine et ses dérivés : Molécules à caractère prooxydant au capteurs de radicaux libres. Etudes et applications thérapeutique .thése de doctorat de l'université de louis pasteur. PP.13-36.

Miller KP., Romos KS.(2001). Impact of cellular metabolism onthe biological effects of benzo (a) pyréne and related hydrocarbons. Drug metabolism reviews Feb ;33(1)-35

Mohajeri S k., Abdollahi M. (2010). Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates : Asystematic. *Human and Experimental Toxicology,* 30(9) :1119-1140.

Monaco J T., Weller S C., Ashton F M., (2002). Herbicide registration and environmental inpacte. In Weed Science : Principles and Practices.

Montandon F. and Picot A. (2005). Connaissances générales sur la toxicochimie : Application à une famille de polluants :les hydrocarbures.IHIE-CNAM, Paris, 390p.

Moody RP., Nadeau B., Chu I. (1995). In vivo and in vitro dermal absorption of benzo (a) pyrène in rat , giunea pig . human and tissue –cultured skin J *Dermatol sci Jan* ; 9(1) : 48-58.

Morin D., Thiery H., Spedding M., Tillement JP. (2001) Mitochondria as target for antischemic drugs J Physiol pharmacol., 13 :22-67.

Muller HK., Halliday GM. (1987). Sensibilisation par cancérogène induit par la peau des cellules de langerhans déficientes active spécifique à long vécu cellules suppressive à la fois pour l'immunité cellulair et humoral. Cell Immunol. 109,206-221.

Murray N(2008). Biologie végétalle structures fonctionnement, écologie et biotechnologies, Pearson Education France.p : 152,153.

Negraia G. (2010). Ipanpacte éto toxicologigues des hydrocarbues monoaromatigue dans l'envionnement au Canada. Univesité de Sherbrooke. Canada/P 29.

Nikolaou K., Masclet P., Mouvier G.(1984). Sources and chemical reactivity of polynuclear aromatic hydrocarbon in the atmosphere- acritical review.

NTP, 1999a. National Toxicology program 1992a Toxicology and Carcinogenesis studies of naphtalene – Research Triangle park : (NC). *Techmicale Report 410, NIH Publication.*

Odile J and Pastre C. (2005). Intérêt de la supplementation en antoxydant dans l'alimentation des carnivores domestigues. Université paul-Sabatier de Toulouse, pp : 1-116.

Odin I., Nathan N. (2005). Anesthésiques halogénés. Elsevier SAS, France /p : 91.

Okhawa H.,Ohishi N. and Yagi K. (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Analytical Biochemistry*, 95 :351-358.

Olanow C.W. (1993) .trends in neuro sc.,16, p.439-444.

OMS :organisation mondiale de la santé **(1965).** Food and agriculture organisation of the United Nations.

OMS. (1956). Organisation mondiale de la santé, Food and agriculture organization of the United Nations.

Omurtag GZ., Guranlioglu FD., Sehirli O., Arbak S., Aslu B., Gedik N. and Sener G. (2000). Protective effect of aqueous garjic extract against naphtalene induced oxidative stress in mice –*J. of pharmacy and pharmacology*, 57 :623-630.

Orabi S H., Elbialy B E., et Shawky SM. (2013). Ameliorating and Hypoglycemic Effects of Zine against Acute Hepatotoxic Effect OF Chlorpyrifos. *Global Veterinaria*, 10(4) :439-446.

Oto G., Ekin S., Ozdemir H., Yasar S., Levent A., Ismet B. and Kaki B. (2010). Plantagomajor protection effects on antioxidant status aftre administration of 7,12 dimethyl benzo(aa)anthracene in rats. *Asian Pacific J Cancer Prev*., :531-535.

Ouali K., Trea F., Toumi L., Bairi A., Maurel D., Guellati M A. (2007). L'hespéridine un antioxydant flavonoide qui diminue le stress oxydatif et prévient les malformation fœtales au cours du diabéte gestationnel expérimentale. Phytothérapie, 5 : 204-209.

Packer P. (1991). Protective role of vitanine Ein biological systemes. AMJ. Clin. Nut. 53 : 1050S-5S.

Paller M S.,PatterM. (1992). Protective effects of glutathion, glycine, or alanine in an in vitro model of renal anoxia J Am Soc. Nephrol. 2,1338-1344.

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

Paul V., Balasubalaraniam E., Kazi M. (1994). The neurobehavioural toxicity of endosulfan in rats : a serotonergie involvement in learning impairment, Eur Pharmacol, 3(1) : 1-7.

Pein F., Vassal G., Sakiroglu C., Tournade M F., Lemerle J. (1995). Aspects pédiatriques de la toxicité cardiaque des anthracyclines et implications pratiques pour sa prévention**. Archives** *pédiatriques.* 1995 : 2(10) : 988-999.

Pennetier C. (2008). Intéraction entre insecticide non-pyrétronoides et répulsifs pour la lutte contre Anophelesgambiae : Mécanismes, efficacité et impact sur la selection de la résistance, thése de doctorat en biologie des population et Ecologie, Université Montpellier I, 45P.

Perera F P., Li Z., Whyatt R., Hoepner L., Wang S., Camann D V R. (2009). "Prenatal Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure and Child IQ at Age 5 Years" 5 pediatrics, pp : 125-202.

Peter P. (2003). Le système immunitaire, éd 7 eme , rue Jacquemont F-75017 Paris rue des Minimes 39, B-100 Bruxelles-Francaise. P : 1.

Petit F., Goff P., Cravedi J P., Valotaire Y., Pakdel F. (1997). Two Complementary bioassays for screning the estrogenic potency of xenobiotics : recombinant yeast for trout estrogen receptor and trout epatocyte cultures. J Mol Endocrin, 19(3) : 35-321.

Philippe L. (2007). Immunologie gernel 8eme . Immunologie gernel 8eme éd Francaise. P : 113,114.8.

Pincemail J ., Siquet., chappelle J.P .(2000). Evaluation de la concentration plasmatique en antioxydant anticorps contre les LD oxydées et homocystéines dans un échantillon de la population liégeoise. *Ann Biol chin* .58, p. 178-185.

Pitts J N., Jr.,Vauwenberghe KA ., Grosjean D., Schmid JP., Fit DR., Belser WL, *et al*.(1978). Atmospheric reaction of polycyclic aromatic hydrocarbons : Facile formation of mutagenic nitro derivatives . science (Neyork, Ny Nov 3) ; 202 (4367) : 515- 9.

Pouget J P., Douki T., Richard M J., Cadet. (2000). DNA damage induced in cells bygamma and UVA radiations as measured by HPLC / GC –MS, HPLC – EC and comet assay. *Chemical Research* in toxicology ; 13 : 541- 9.

Ravanan P., Rouch C., d'Hellencourt CT. (2008). Influence de l'obesité sur les phénomènes neurodegeneratifs. Springer, 3 : 27-32.

Reichl., Jochen., Monik. , Barbara H., Ines-C., Gilly., Helmut K., Berhar L., Harald M., Ladislans S., Thomas Z.(2004). Guid Pratique de toxicology 2eme éd allemand. p : 94.

Rekha chemical health and Safety, May/June 2005.

Richard D and Orsal D. (2007). Neurophysiologie organaisation et fonctionnement du systéme nerveux-3éme edition. Dunod-Paris.

Rocher. (2004). Lutte chimique contre les champignons pathogènes des plantes : évuluation de la systémiephloémiènne de nouvelles molécules a effet fongicide et d'activateurs de réaction de déefense, thése doctorat, Université de poitiers,151p.

Rustin P., Chrétien D., Bourgeron T., Gérard B., Rotig A., Munnich A. (1994). "Biochemical and molecular investigation in respiratory chain deficiences". Clin chem Acta, 288 : 35-51.

Ruzzin J. (2012). Public health concen behind the expousure to persistent organic pollutants and the risk of metabolic diseases. Ruzzin BMC *public Health*, p :2-8.

Saif M W., Tytler E., Lansigan F., Brown D M. and Husband AJ. (2009) . Flavonoids, phenooxodiol and anovel agent, triphendiol , for the treatment of pancreaticobilliary cancer ; Expert opin Investig Drugs-18 :469-479.

Saja A., Scalease M., Lanza M. , Marzullo D., Bonina F and Castelli F. (1995). Flavonoids as antioxidant agents importance of their interaction with biomembrane. FREErADIC Biol Med, (19) : 481-486.

Salas VM., Burchiel S W. (1998). Apoptisis in Daudi human Bcells in response to polycyclic aromatic hydrocarbons. Toxicol Appl Pharmacol Aug ; 151(2) : 367-76.

Saravanan T S., Rajesh P., Sundaramoorthy M. (2010). Studies on effects of chronic exposure of endosulfan to Labeo rohita.Journal of Environmental Biology, 31(5) : 755-758.

Saunders C R., Das S K., Ramesh A. (2006). Benzo(a)pyrene-induced acute neurotoxicity in the F-344 rat : role of oxidative stress. J Applt Toxicol, 26 : 427-38.

Scalbet A., Williamson G. (1989). Dierty intake and bioavaibility of polyphenols. J : Nutrn ? 130,P : 273-285.

SCF (2002). Option of the scientific committee on the risks to human health of polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food (SCF/ CNTM/PAH/ 29)Final), 4December 2002.

Sener G., Sehirli AO., Ayanoglu-Dulger, G. (2003c). Melatonin protects against mercury (II)-induced oxidative tissue damage in rat. Pharmacol. Toxicol. 93,290-296.

Sener G., Sehirli AO., Lu-Du lger, G., (2003b). Protective Effectes of melatonin, vitamine E and N-acetylcysteine against acetaminophen toxicity in mice : A comparative study. J Pineal Res. 35, 61-68.

Sep-oct ; 27(5) : 415-22.

Servais S. (2004). Altération mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'onze : effet de l'âge et d'une Supplémentassions en oméga – thèse de doctorat de l'université Claude Bernard de Lyon 1, France : 19-35,138.

Sharma M., Pillai KK., Anwer T., Najmi AK., Haque SE.and SultnaY. (2010) protective effect of Silymarin Streptozotocin.induced diabetic dysipidaemia in rats. Orientapharmacy and Experimenta Medicine. 10(3), 1-8.

Shechane D Meade G., Foley UM. And Dowd CA. (2001). Structure, function and evolution of glutathion transferase : Implication for classification non mammalian members an ancient enzyme superfamily. *J Bioch.* , 360 :1-16.

Sheu H., Lee W., Lin S., Fang G., chang H., et you W. (1997). Particle-bound PAH content in ambient air. Environ pollut. 96(3) :82-369..

Shi H., Hudson LG., Liu K J. (2004). Oxidativve stress and apoptosis in metal ion induced carcinogenesis. Free Radic Bio Med 37 : 582-593.

Silva M H., Beauvais, S L. (2010). Human health risk assessment of endosulfan. I : Toxicology and hazard indentification. Regul. Toxicol. Pharmacol, 56 : 4-17.

Silva M H., Carr W C., Beauvais, S., Gee J., Pfeifer K., Schreir J p. (2008). Endosulfan risk characterization document, 12 : 22-39.

Singal P K., Petkau A., Gerrad J M. (1988). Free Radicals in health and disease Mol. Cell. Biochem. 121-122.

Slotkin T A., Seidler F J. (2010). Benzo(a)pyréne impairs neurodifférention in **PC12 cells. Brain Res Bull, 80 :17-2.**

Slotkin T A., Seidler F J., Ryde I T., Yanai J. (2013). Developmental neurotoxiceffects of chlorpyrifos on acetylcholine and serotonin pathways in an avian model. Neurotoxicol Teratol, 30 : 433-439.

Smeyne M., Boyd J., Shepherd KR., Jiao y., Pond BB., Halter M., Wolf R., Henderson C. and Smeyne RJ. (2006). GST experssion mediates dopaminergig neuron sensibility in experimentale parkinsonism. PNAS.,104 : 1977-1982.

Stockholm (2001). La convention de stockholm sur les polluants organique persistants, *Genève*.

Stockholm. (2007). Programme des nations unies pour l'environnement, Genéve.

Stohs S J., Ohia S ; and Bagchi D. (2002). Naphthatene toxicity and antioxidant nutrients. Toxicology, 180 : 97-&05.

Stotkin T A., Card J and Seidler F J. (2013). Adverse Benzo(a)pyrene Effects on Neurodifferentation Are Altered by Othe Neurotoxicant Coexposures : Interaction With Dexamethasone, Chlorpyrifos, or Nicotine in PC12 Cell. Environ Perspect, 121 : 825-831.

Straif K., Baan R., Grosse Y., Secretan B., El Ghissassi F., Cogliano V. (2005).carcinogenicety of polycyclic aromatic hydrocarbons éd : 6,931-2.

Szezlik A., Szezlik J., Galuszka Z., Musial J., Kolarzyk E and Targosz D.(1994). Humoral immuno Suppresion in men exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and related carcinogens in polluted environments . Environmental health perspectives, Mar ; 102(3) :302-304.

Tarantina A. (2009).la modulation de la génotoxicité des HAPs en mélange, p : 77 -80.

Tartu S., Angelier F., Herzke D., Moe B., et al. (2014). The stress of being contaminated, Adrenocortical function and reproduction in relation to persistent organic pollutants in female black legged kittiwakes. *Science of the Total Environment*, 476(477) : 553-560.

Tebbens BD., Thomas JF., Mukai M. (1966).Fate of arenas in corpoted with airborn sool . *Amirican indutrial hygiene Association Jouranal*

Thannikal V J., Fanburg B L. (2000). Reactive oxygen species in cell signalling. *Am. J. physiol.* 279 : L1005-L1028.

Tiffany-Castiglioni E., Hong S., Qian Y., Taney Y., Donnelley K C., (2006). In vitro models for assessing neurotoxicity of mixtures, *elsevier*, P : 3.

Tillement JH. (2001). Protection in vitro des fonctions mitochondriales cérébrales par E-resveratrol. Dans es états d'anoxie suivie de réoxygénation. Bull.Acad Med., 185(8) : 1429-1445.

Tokiwa H., Sera N., Nakashima A., Nakashima K., Nakashima Y., Shigematu N. (1994). Mutagenic and carcinogenic Significance and the possible of lung cancer by nitro aromatic hydrocarbons in particulat pollutants – Environmental health perspectives oct ;102 suppl 4 : 107-10.

Tomlin C. (1994). The pesticide manual, *incorporating the agrochemicals handbook.*P : 171-172.

Tunon M J., Gampos and Gonzales-Gallego J. (2009). Paentia of flavonoids as anti – inflammatory agents : modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways. Eur Drug Meab-10 : 256-271.

Ullah S., Jalil M., Zorrieh Z. (2014). A Review of Pesticides Induced Toxicity in Fish Adv. Anim. Vet. Sci., 3(1) : 40-57.

UNEP Chemicals. (2002). Egionally based assessment of persistent toxic substances-Antarctica regional eport. Geneva : United Environment Programme.

UNEP Chemicals. (2009). Egionally based assessment of persistent toxic substances-Antarctica regional eport. Geneva : United Environment Programme.

UNEP : Programme des nations unies pour l'environnements, organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, **(2008).**

USEPA. (1984). Review and evaluation of the evidence for cancer associated with air pollution. Arlington : U.S. Environmental Protection Agency 1984 Contract No : EPA-450/5-83-006R.

USEPA. (1993). Provisional guidance for quidance for quantitative risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons. Cincinnati : United State Environmental Proecion Agency 1993.

Valko M. , Rhodes C J., Moncol J., Izakovie M., Mazur M. (2006). Free radicals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interaction, 160 (Issue1). 1-40.

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

Van Acker S A B E., Van den Berg D J., Tromp M N J L., Griffioen D H., Van Bennekom W P., Van der Vijgh W J F., Bast A. (1996). Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids, Free Rad. Biol. Med. 20 :331-342.

Vanrooy JG., Bodelier- BadeM M.,Jongeneelen FJ.(1993). Estimation of individual dermal and respiraory uptake of poly cyclic aromatic hydrocarbons in 12 coke oven Workers. British journal ol industrial medicine Jul ; 50(7) :623-32.

Verrna R S. Mehta A., Srivastava N. (2009). Comparative sudies on chlorpyrifos and methyl parathion induced oxidative stress in different parts of rats brain : Attenuation by antioxidant vitamins. Pestic Biochem physiol, 95(3) : 152-8.

Vlietiurk A J.(2007). Chloropurifos-induced oxidative stresse and tissue damage in the liver, brain and fetus in pregnant rats : the protective role of the butanolic extratct of *paronychia argentea L*, indian journal of pharmacology, vol 39, No : 145-150.

Vonsonntag C. (1987). Enzumes (chap. 14), The Chemical Basis of Radiation iology, Taylor & Francis, Londres, p, 429.

Vuchetich P J., Bagechi M., Hassoun EA., EA., Tang L. and Stohs SJ. (1996). Naphthalene-induced oxidative stress in rats and the protective effects of vitamin E succinate. *Free. Rad. Bio. Med*., 21 :577-590.

Warmley D D chirwa, Nayyar T S Wu J., Johnson S., Brown L. A. (2004). Inhaled benzo(a)pyrene inpairs long-term potentiation in the Fl generation rat dentategyrus. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 50 : 715-21.

Wessel N. (2010). Etude des voies de bioactivation du benzo(a)pyrene et du fluoranthène ches la sole. Commune (Solea solea) : Profil métabolique et génotoxicité. These de doctorat de l'unversité de Nantes, P : 247.

Wihem N. (1998). Botanique générale, éditeur de Boeck , Bruxeles,p : 361.

William GH. (2003). Physiologie : Molécules et Métabolisme, éditeur de Boeck, Bruxeles, p : 268,280.

Wilson AS., Davis CD., Williams DP., Buckpitt AR.,Pirmohamed M., Park Bk . (1996). Characterization of the toxi metabolite(s) of naphtaène. Toxicology 114,233-242.

Wisternik R. (2014). Moduation of cell viability oxidative stress, calcium homeostasis, and voltage-and ligand- gatedion channes as common mechanisms of action of (mixture of) non-dioxin-like polychlorinatedbiphenyls and polybrominateddiphenyl ethers , Environ Scipolut Res Int, Vol.10,pp : 6373-83.

Wood ZA., Poole LB. And Karplus PA.(2003). Peroxiredoxin evolution and the reguation of hydrogen Peroxide Signaing. Science. 300(5619) : 650-30.

Wornat M., Ledesma E., Sandrowitz A. (2001). Polycyclic Aromatic hydrocarbons identified in soot extracts from domestics cool- burning stoves of Henan provinces , china, pp :4174-4179.

Xue W., Warshawsky D.(2005). Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage : areviex . toxical Appl pharmacol Aug 1 ; 206(1) : 73-93.

Yan Z. (2010). Characterization of chlorpyrifos toxicity on the pancreatic beta cell line rinm5f *Thése de doctorat de l'université de science medical*,p : 126.

Yang SK. (1988).stereo selectivity cyto p450 Isozymes and epoxide hydrolase in the metabolisme of polycyclic aromatic hydrocarbons.Biochem pharmacol ; 37 : 61-7

Zama D., Meraihi Z., Tebibel S., Benayssa w., Benayache F., Benayache S., Vilietiurk A J. (2007). Chloropurifos-induced oxidative stress and tissue damage in the liver, kidney, brain and fetus in pregnant rats : the protective role of the butanolic extract of *paronychia argentea L, indian journal of pharmacology*, vol 39, NO : 3, P : 145-150.

Zayed J., Panisset M., Mergler D. (2003). Systéme nerveux. In :Environnement et santé publique-Fondements et pratiques, pp : 699-712.

Zhang HM., Nie JS., Wang F.,Shi YT., Zhang L. Antonucci A. liu H J., Wang J., Zhang Q.L., Wang L P., Song J. , Xue CE., Gioacchino MD and Niu Q. (2008). Effectes of benzo(a)pyrene on autonomic nervous system of coke oven workers. *J occup. Health*, 50 :308-316.

الملخص

الملخص

تناولت هذه الدراسة التأثير الوقائي لبعض المركبات النشطة بيولوجيا (فيتامين C و E والكرسيتين، المستخلص الفينولي لقشور برتقال *Citrus Sinensis* اتجاه الأثر السمي لأحد للهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات (Naphtalène) ومبيد كلوري (Endosulfan)علي الجهاز العصبي والمناعي، ولهذا الغرض خصص التركيب التجريبي الأول لدراسة التأثير السمي لـEndosulfan (2ملغ/كغ) وNaphtalène (50ملغ/كغ) في سيتوبلازم الخلايا العصبية عند جرذان التجارب. التركيب التجريبي الثاني خصص لدراسة وضع الأكسدة والاختزال في ميتوكوندريات الخلية العصبية تحت تأثير سمية Endosulfan والوقائي للكرسيتين على جرذان التجارب، حيث المجموعة الأولى اعتبرت شاهدة، بينما المجموعة الثانية (END) عملت بمبيد Endosulfan بجرعة (2ملغ/كغ) والمجموعة الثالثة عملت بال Quercétine (10ملغ/كلغ) وEndosulfan (2ملغ/كلغ). كما قمنا بتقدير الأثر السمي للأندوسلفان والوقائي للكرسيتين على الانتفاخ الميتوكندري وذلك بقياس امتصاصية عينات المعلق الميتوكندري المتحصل عليه من النسيج العصبي.

أما فيما يخص التركيب التجريبي الثالث خصص لدراسة التأثير السمي للأندوسلفان (4ملغ/كغ) والنفثالين (10مغ/كغ) والفعل الوقائي لفيتامين Quercétine C, E, والمستخلص الفينولي لقشور البرتقال *Citrus Sinensis* على الجهاز الدموي والمناعي والمعايير البيوكيميائية للدم على جرذان التجارب.

تشير نتائج دراسة وضع الأكسدة والاختزال في سيتوبلازم الخلية العصبية إلى حدوث خلل في مستوي مضادات الأكسدة، يتجلى في الانخفاض بمعنوية مرتفعة في مستوي CAT, SOD, GST, GSH، كما تؤكد الدراسة حدوث الأكسدة الفوقية للمبيدات الغشائية وهذا يتضح من خلال ارتفاع مستوي MDA بمعنوية عند المجموعة المعاملة بـEndosulfan وبمعنوية جد مرتفعة عند المجموعة المعاملة بـEndosulfan وNaphtalène في نفس الوقت. كما سجل انخفاض مستوي لبروتينات السيتوزولية وهذا مقارنة بالمجموعة الشاهدة.

أظهرت نتائج دراسة وضع الأكسدة والاختزال في حشوة الميتوكندري انخفاض بمعنوية جد مرتفعة لمستوى SOD والبروتينات، وانخفاض بمعنوية مرتفعة لكل من CAT,GSH بينما ارتفع MDA بمعنوية مقارنة بالشاهد يؤكد هذا الارتفاع الجهد ألتأكسدي والأكسدة الفوقية للأغشية الفوسفوليبيدية للميتوكندريات الخلايا العصبية، في حين المعاملة بالكرسيتين أظهر الفعل الوقائي للأثر السمي لـEndosulfan.

أظهرت نتائج قياس امتصاصية المعلق الميتوكوندري انخفاض مستمر وتناسب عكسي مع التراكيز المتزايدة للأندوسلفان في الغشاء مما يبين زيادة الانتفاخ الميتوكندري بسبب اتساع الثقوب الغشائية، في حين تبين الدور الوقائي للكرسيتين المضاف مع الأندوسلفان مما يفيد عدم الانتفاخ الميتوكندري.

اتضحت سمية END وNap علي الجهاز الدموي والمناعي من خلال الارتفاع بمعنوية عالية في التقييم الكلي لكريات الدم البيضاء واللمفاويات عند المجموعة المعاملة ب END وNap معا وانخفاض بمعنوية وبمعنوية مرتفعة لعدد لـgranulocyte وmonocyte على التوالي، كما تبين التأثير السمي على الكريات الدموية الحمراء والهيموغلوبين حيث انخفضت بمعنوية عالية وجد عالية على التوالي.

كما تشير النتائج المتوصل لها أنEND وNap مواد سامة للكبد والجهاز البولي والبنكرياس وهذا من خلال الارتفاع المعنوي للإنزيمات الكبدية TGO-AST وTGP-ALT وارتفاع مستوي اليوريا والكرياتينين والغليسريدات الثلاثية والكولسترول والجلوكوز مقارنة بالمجموعة الشاهدة. كما تبين الدور الوقائي لكل من VC، VE ، Quercétine والمستخلص الخام لقشور البرتقال *Citrus Sinensis*.

Résumé

La toxicologie environnementale est, de nos jours, devant un grand défi surtout qu'elle s'adresse à l'étude d'impact des polluants toxique sur l'organisme vivant des populations générales, contrairement à la toxicologie professionnelle ou pharmacologique qui visent des groupes limités dans leurs milieux professionnels et médicaux avec une approche diagnostique et thérapeutique bien connue. En effet, beaucoup de matrices biologiques alimentaires sont contaminés par des pesticides, des hydrocarbures aromatiques polycycliques et des métaux lourds avec des micros concentrations négligeables au quotidien mais qui s'accumulent en chronique de par leur solubilité dans les différents organes.

La présente étude porte sur l'effet préventif de quelques composés bioactifs tels que la vitamine C, la vitamine E, la quercétine et l'extrait phénolique du zeste d'orange *Citrus Senensis,* contre l'impact toxique d'un hydrocarbure aromatique polycyclique, le Naphtalène et l'endosulfan, pesticide organochloré, sur le cerveau et le systèmes immunitaire. Les résultats obtenus ont montré une variation significative du statut redox neuronal tant cytosolique que mitochondrial. En effet, l'endosulfan et de naphtalène administrés seuls ou en mixture aux doses respectives de 2 mg /kg et 50 mg /kg, a montré une perturbation de l'équilibre Prooxydant/Antioxydant dans les compartimentations cellulaires étant donné qu'ils ont causé une chute significative du niveau de GSH, GST, SOD et CAT cytosolique chez le rat traité par ces composés chimiques. Les résultats de ces travaux ont montré également une augmentation significative du MDA cytosolique et une réduction hautement significative du niveau protéique cytosolique a été également enregistré comparativement au groupe contrôle.

Par ailleurs, les résultats de ces travaux ont signifié une diminution très significative de l'activité enzymatique mitochondriale de la SOD et de la CAT parallèlement à une chute du taux de GSH. Par contre, une peroxydation accrue a été enregistrée via l'augmentation significative du MDA stromacale, suite à l'exposition des animaux à l'endosulfan seul à la dose de 2 mg/kg, témoignant ainsi d'une perte de l'intégrité des membranes mitochondriales. A l'inverse, l'administration de la quercétine (10 mg/kg) associée à l'endosulfan (2 mg/kg) a pu prévenir cette toxicité neuro-mitochondriale chez les rats. L'étude *in vitro* de l'intégrité mitochondriale a montré, en présence des concentrations croissantes de l'endosulfan, une diminution de l'absorbance des suspensions mitochondriales, démontrant ainsi que les mitochondries subissent une entrée massive de l'eau via l'ouverture des pores géants mitochondriaux en causant leur gonflement. Par contre, les tubes contenant l'endosulfan et la

quercétine ont affiché une absorbance comparable au tube contrôle, ce qui renseigne sur le maintien intacte de l'intégrité mitochondriale ne permettant pas ce gonflement.

Cette étude a montré également un effet toxique sur les systèmes immunitaires et sanguins à travers une augmentation très significative du nombre global des cellules lymphocytaires chez les groupes de rats traités par la mixture endosulfan et le naphtalène. Il a été constaté aussi que dans cette même étude, une réduction respective significative et très significative des granulocytes et des monocytes. L'évaluation de certains paramètres biochimiques du sang a fait apparaitre une déficience de la fonction du foie, rénale et pancréatique via l'augmentation significative des enzymes transaminasiques dans le sang (TGO et TGP), du cholestérol, des triglycérides, de l'urée, de la créatinine et de la glycémie comparativement au groupe contrôle. Parallèlement, les substances bioactives utilisées dans ces études, ont prévenu la survenue de ces perturbations dans la fonction de ces organes chez les animaux exposés à ces produits organiques persistants. En conclusion, à partir des résultats de la présente étude, il ressort que l'endosulfan et le naphtalène sont pourvus d'un pouvoir neurotoxique et immuno-modulateur à des doses environnementales, que ce soient administrés en individuel ou associés chez le rat. Par ailleurs, il apparait que ces produits organiques persistants modifient significativement la fonction hépatique et rénale.

Les Mots Clés :
Hydrocarbure, Endosulfan, Naphtalène, Pesticides, Système nerveux, Systèmes immunitaires, L'extrait phénoliquedu zeste d'ronge, Vitamine C, Vitamine E, Quercétine, Mitochondrie, Stress oxydative

Abstract

Environmental toxicology is nowadays facing a great challenge especially as it is addressing to study the impact of toxic pollutants on the living organism of the general population, in contrast to professional pharmacology or toxicology which target limited groups in their professional and medical milieu with well-known diagnostic and therapeutic approaches. Indeed, many food biological matrixes are contaminated with pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals with very little concentrations that we consider such negligible daily doses but which could accumulate with the time because their solubility in different organs. This study focuses on the preventive effect of some bioactive compounds such as vitamin C, vitamin E, quercetin and phenolic extract from orange peel *Citrus Senensis*, against the toxic impact of a polycyclic aromatic hydrocarbon, the naphthalene and endosulfan, as organochlorine pesticide on brain and immune systems. The results showed a significant change in neuronal redox status in cytosol and brain mitochondria. Indeed, endosulfan and naphthalene administered alone or in mixture at the respective doses of 2mg / kg and 50 mg / kg, showed a disturbance in the balance prooxidant / antioxidant in cell compartmentalization since they caused a significant fall in the level of GSH, GST, SOD and CAT cytosolic rats treated with these chemicals. The results of these studies have also shown a significant increase in MDA cytosolic and a highly significant reduction of cytosolic proteins level was also recorded compared to the control group. Furthermore, the results of this work have showed a very significant decrease in mitochondrial enzymatic activity of SOD and CAT parallel to fall of GSH rate. Increased peroxidation was recorded via the significant increase in mitochondrial MDA following animal exposure to endosulfan alone at a dose of 2 mg / kg, reflecting a loss of integrity mitochondrial membranes. Conversely, the administration of quercetin (10 mg / kg) associated with endosulfan (2mg / kg) was able to prevent this neuro-mitochondrial toxicity in rats. The *in vitro* study of the mitochondrial integrity showed, in the presence of increasing concentrations of endosulfan, a decrease in absorbance of mitochondrial suspensions, demonstrating that mitochondria were received massive internalization of water via the opening giant mitochondrial pores (MPTP), causing them to swell. Inversely, the tubes containing endosulfan and quercetin showed similar absorbance to the control tube, which provides information on the maintenance of intact mitochondrial integrity which not allowed undergoing this swelling.

This study also showed a toxic effect on the immune and blood systems through a very significant increase in the overall number of lymphocytic cells in rats of groups treated with

the mixture endosulfan and naphthalene. It was also found that in the same study, a significant and very significant respective reduction in granulocytes and monocytes rates. The evaluation of some blood biochemical parameters did appear impairment of liver function, kidney and pancreas via the significant increase in transaminases enzymes in the blood serum (TGO and TGP), cholesterol, triglycerides, urea, creatinin and blood glucose compared to the control group. Meanwhile, bioactive substances used in these studies, warned the occurrence of these disturbances in the function of these organs in animals exposed to these persistent organic products. In conclusion, the results of this present study showed that endosulfan and naphthalene have neurotoxic power and immunomodulator effect in environmental doses which have been administered individually or associated in rats. Moreover, it appears that these persistent organic products significantly alter liver and kidney function.

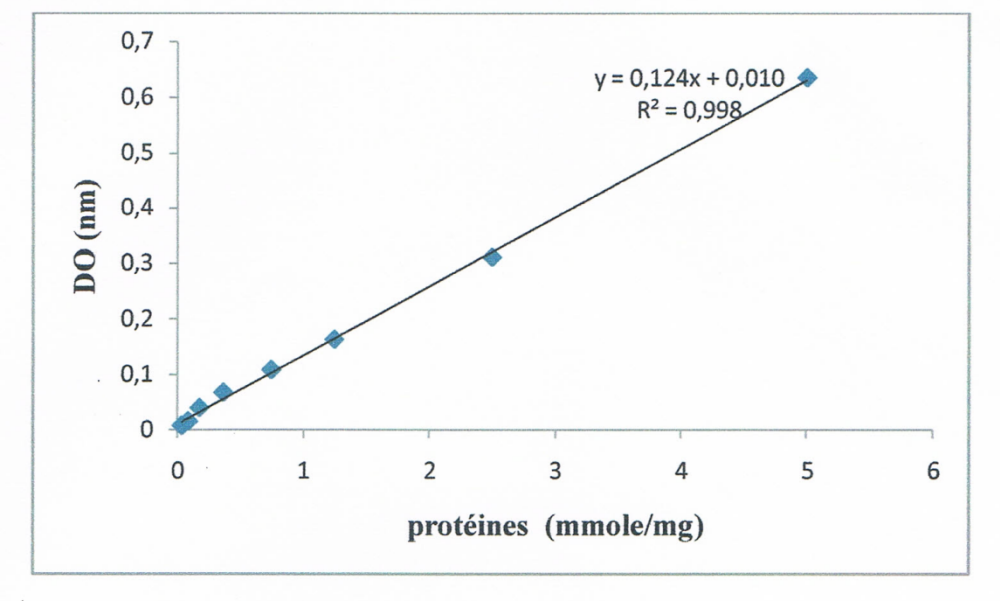
Key words:
Hydrocarbons, Endosulfan, Naphtalène, Pesticides, immune Systems, VitaminC, Vitamine E, henolic extract from orange, Quercétine, Mitochondrie, Oxidtive stress

الملحق

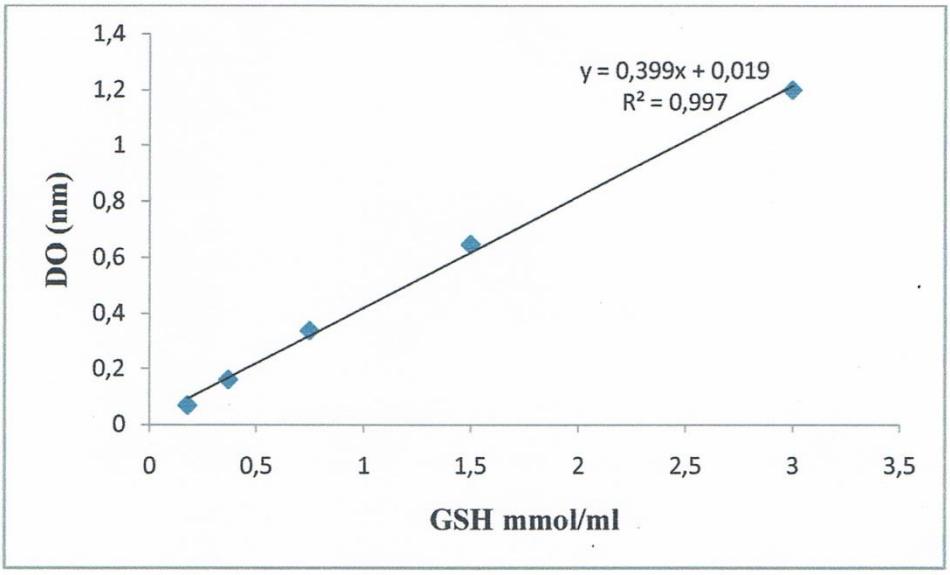
الملحق

الوضع التصنيفي لنبات البرتقال

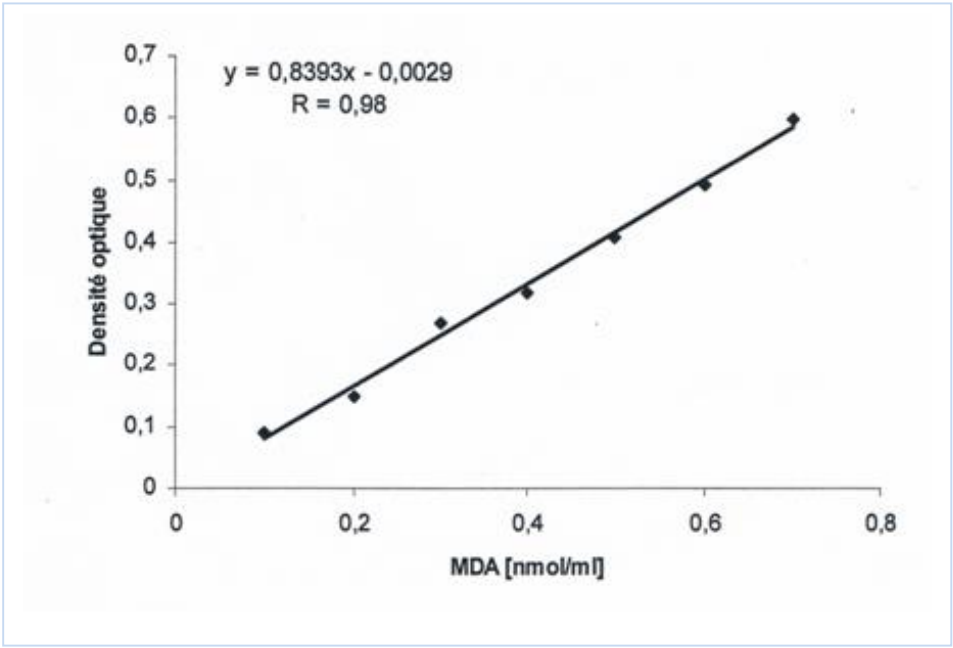
Régne	Plantae
Division	Magnoliopphta
Classe	Magnliopsida
Ordre	Sapindales
Famille	Rutaceae
Genre	Citrus
Espèce	*Citrus sinensis*



الشكل (1): المنحنى القياسي للبروتينات باستعمال sérum albumine bovine كمعيار (متوسط ثلاث مكررات)



الشكل (2): المنحنى القياسي لـ Glutathion مع DTNB (متوسط ثلاث تكرارات)



الشكل (3): المنحنى القياسي لـ MDA مع TBA (متوسط ثلاث تكرارات)

المنشورات العلمية

Oxidative stress and brain mitochondria swelling induced by endosulfan and protective role of quercetin in rat

Zhoura Lakroun, Mohamed Kebieehe, Asma Lahouel, Djamiia Zama, Freaerique Desor & Racliid Soulimani

Environmental Science and Pollution Research

ISSN 0944-1344

Environ Sci Pollut Res
DOI 10.1007/s11356-014-3885-5

Springer

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag Berlin Heidelberg. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Springer

Author's personal copy

Environ Sci Pollut Res
DOI 10.1007/s11356-014-3885-5

RESEARCH ARTICLE

Oxidative stress and brain mitochondria swelling induced by endosulfan and protective role of quercetin in rat

Zhoura Lakroun · Mohamed Kebieche · Asma Lahouel · Djamila Zama · Frederique Desor · Rachid Soulimani

Received: 19 July 2014 /Accepted: 18 November 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract The neurological damages resulted by endosulfan poisoning is not completely elucidated, especially in cellular organelles such as mitochondria. In the present study, the pro¬ oxidant effect of endosulfan on brain mitochondria was first investigated. Gavages of endosulfan into rats at the dose of 2 mg/kg induced oxidative stress in this organelle since it provokes a significant reduction of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione (GSH) level. In addition, a significant increase in mitochondria swelling and malondialdehyde (MDA) levels were observed in neuronal mitochondria, indicating clearly an intense peroxidation with¬ in mitochondria. Second, the protective effect of quercetin (QE) (10 mg/kg) against endosulfan-induced oxidative stress in mitochondria was also assessed. Indeed, the pretreatment of rats with QE protects brain mitochondria from oxidative stress, lipid peroxidation, and mitochondria swelling induced by endosulfan. The activities of antioxidant enzymes and the mitochondrial content of GSH and MDA were returned to control values. Thus, although endosulfan can have neurotox¬ ic effects in brain rats, this toxicity can be prevented by quercetin.

Keywords Endosulfan · Brain mitochondria · Pro-oxidant effect · Mitochondrial swelling · Quercetin · Rat

Responsible editor: Philippe Garrigues

Z. Lakroun · M. Kebieche (El) · A. Lahouel
Laboratory of Molecular and Cell Biology (BMC), University of Jijel, Jijel, Algeria
e-mail: kebiechemohammed@yahoo.fr

Z. Lakroun · D. Zama
Department of Animal Biology, University of Mentouri 1, Constantine, Algeria

M. Kebieche · F. Desor · R. Soulimani
Laboratory of Food Neurotoxicology and Bioactivity, University of Metz, Metz, France

Published online: 28 February 2015

Introduction

Endosulfan (END) is an organochlorine insecticide belonging to the cyclodiene subgroup. This compound has been widely used for its broad spectrum insecticide/acaricide since its introduction in the 1950s. Exposure to endosulfan mainly occurs through ingestion of contaminated food, but also hap¬ pens via inhalation or dermal contact (WHO 2002; Silva and Gammon 2009). This xenobiotic induces neurotoxicity in insects by binding and blocking the CF channel linked to the y-amino-butyric acid (GABAa) receptor at synapses, resulting in uncontrolled excitation (Silva and Beauvais 2010). Subsequently, END is a persistent organic pollutant and has shown a large environmental ubiquity, persistence, and toxicity (ATSDR. 2013; Sunitha et al. 2012)..As a result, it is now banned for sale and use in Europe and has been proposed to be listed for a global ban under the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPRC-4 2008). Nevertheless, endosulfan is still in use in several coun¬ tries, including North Africa, where it is detected in fruits and vegetables at 1.20 mg/kg (Zerouali et al. 2005). However, higher levels have also been found, reaching 4 mg/kg in tomatoes harvested in Jijel (Algeria, unpublished results).

Human organism produces oxygen free radicals and other reactive oxygen species (ROS), as by-products through nu¬ merous physiological and biochemical processes, such as cellular metabolism (respiratory burst and enzyme reactions) which confers free radicals to the cellular environment. Adding to that is the human exposure to pollutants such as polycyclic aromatic hydrocarbons and pesticides. The most common reported cellular free radicals are superoxide ($O_2^{\cdot}$), hydroxyl ($OH^{\cdot}$), and nitric monoxide ($NO^{\cdot}$). Even some other molecules like hydrogen peroxide (H_2O_2) and peroxynitrite ($ONOCF$) are not free radicals; they are reported to generate free radicals through various chemical reactions (Halliwell 2006; Uttara et al. 2009; Kebieche et al. 2009).

Author's personal copy

Overproduction of free radicals can cause an imbalance in cellular redox status producing oxidative damage to biomolecules (lipids, proteins, and DNA). At the same time, antioxidants, such as glutathione, arginine, citrulline, taurine, creatine, selenium, zinc, vitamin E, vitamin C, vitamin A, and polyphenols, help to regulate the generated ROS. The antiradical system is further supported with antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, and glutathione peroxidase, that exert synergistic actions in removing free radicals (Mytilineou et al. 2002; Uttara et al. 2009).

The brain is particularly susceptible to oxidative stress because of its high 02 consumption, its lipid-rich constitution, and its limited amount of antioxidant capacity (Halliwell 2006; Ng et al. 2009). There is substantial evidence that oxidative damage and mitochondrial dysfunction play a central role in different cell death pathways, leading to either apoptosis or necrosis which is the origin of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's diseases (Cassarino and Bennett 1999; Emerit et al. 2004; Uttara et al. 2009). This report describes the impact of endosulfan on the brain mitochondria redox status and mitochondrial permeability transition pore (MPTP) and determines also if lipid-soluble antioxidants, such as quercetin (QE), are useful to protect endosulfan toxicity in rats.

Materials and methods

Chemicals

The majority of chemicals were procured from Sigma-Aldrich, Germany. Assay kits for enzymes were purchased from Biomerieux, and endosulfan was purchased from Pharmacia, St. Quentin in Yvelines, France.

Animal maintenance

Male albino Wistar rats (body weight 220-280 g), originally from the Pasteur Institute in Algiers, Algeria, were used in these experiments. Rats were bred in our animal facility in stainless metallic cages. The room housing the rats was temperature controlled (average of 22 1 C, 50-60 % relative humidity) and kept under a daily 12 h light/dark cycle. Rats were fed food and water ad libitum. Fasted rats were deprived of food for at least 16 h, but were allowed free access to water. Rats were adapted for 1 week before the indicated treatments. All experimental assays were carried out in conformity with international guidelines for the care and use of laboratory animals.

Animal treatment protocol

The animals were grouped as follows: Group 1, control rats: Rats were administered 1 ml of olive oil per os (p.o.) daily for 6 days. Group 2, endosulfan-treated: Rats were administered 1 ml of endosulfan at 2 mg/kg in olive oil per os (p. o.) daily for 6 days. Group 3, preventative group: Rats were administered 1 ml of QE (10 mg/kg)+endosulfan (2 mg/kg) in olive oil p.o. daily for 6 days.

Preparation of mitochondria matrix fraction

Mitochondrial matrix (stroma) was prepared by applying the method described by Fan et al. (2005) and Rustin et al. (1994). Briefly, brains were quickly removed and washed with 0.86 % cold saline to completely drain all the red blood cells, chopped into small pieces, and placed into ice-cold isolation buffer for mitochondria (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 250 mM sucrose, 0.5 m methylene diamine tetra-acetic acid (EDTA), and 0.5 % bovine serum albumin). After being homogenized, the homogenate was centrifuged at 750 g for 10 min. Next, the supernatant was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C. Mitochondrial pellets were washed twice with isolation buffer and then resuspended in the same buffer solution. The mitochondrial matrix was extracted from freshly prepared mitochondria by freezing and defrosting with repeated homogenization in order to burst mitochondria. After centrifugation at 10,000 rpm for 10 min, the supernatant was the source of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), and malondialdehyde (MDA). Protein estimation was performed by the method of Lowry et al. (1951).

Biochemical evaluation of MDA, GSH, CAT, and SOD in rat brain mitochondria

MDA levels in the mitochondria were evaluated using the method of Ohkawa et al. (1979). MDA amounts are expressed as nanomoles per gram of brain and were calculated using a standard curve prepared under the same conditions with a solution of 1, 1, 3, 3-tetraethoxypropane that produces MDA after hydrolysis. Levels of GSH were assessed using Ellman assay (1959). The GSH amounts were calculated using a standard curve of GSH and were expressed in millimoles per gram. Mitochondrial CAT assessment was performed by using the method of Clairbome (1985). This assay is based on the disappearance of H202 at 25 °C in the presence of mitochondrial enzyme source. Mitochondrial Mn-SOD assessment was performed by Beauchamp and Fridovich (1971) technique. The enzymatic activity was calculated in terms of international unit per milligram of protein.

Author's personal copy

In vitro mitochondria swelling essay

The assessment of mitochondria swelling is realized upon mitochondrial suspension according to the method of Kristal et al. (1996), with modification. Briefly, a mitochondrial suspension is used at 1 mg/ml and incubated in total volume of 1.8 ml of breathing buffer added to 10.8 p.1 of succinate (6 mM). After 1 min of incubation, 18 p.1 of different concentrations of endosulfan (0-200 to 300-400 pM), associated or not with QE (200 pM), is added to induce mitochondria swelling. A decrease of the absorbance at 540 nm is monitored by spectrophotometry (UV-vis mini 1240 spectrophotometer SHIMADZU, China) every minute during 5 min.

Statistical analysis

The numerical and graphical results are presented as meani standard error (SE). The significance of the difference between two treatment groups was verified by the Student's t test The degree of statistical significance was set at a level of $P<0.05$. Statistical calculations were carried out using the Statviews 4.5 statistical package (Abacus Concept, Int.) and the Excel 6.0 (Microsoft, Inc.).

Results

Assessment of in vivo lipid peroxidation in brain mitochondria

Levels of MDA, the last product of lipid peroxidation caused by oxidative stress, were assessed in brain mitochondria of different groups of rats. MDA values were significantly increased (/*<0.01) in brain mitochondria (0.185±0.015 nM/g) in the endosulfan-treated group compared to the normal control (0.109±0.009 nM/g). However, no significant difference was recorded between the normal group and the preventive group (0.113±0.010 nM/g) (Fig. 1).

Assessment of antioxidant enzymes in brain mitochondria, CAT, and Cu/Zn-SOD

The administration of endosulfan caused a highly significant (PC0.001) decrease of CAT and Cu/Zn-SOD (1.270±0.66 and 140.637Ü9.184 IU/mg), respectively, in rats when compared to the control group (2.018±0.083 and 335.307i 19.184 IU/mg) successively. On the other hand, the protective treatment of animals with QE (10 mg/kg) and endosulfan normalized clearly the cellular content of these antioxidant enzymes in brain mitochondria (1.819i0.015 and 290.835i 18.998 IU/mg) in order compared to the levels contained in normal controls (Figs. 2 and 3).

GSH evaluation

The GSH-reduced levels were significantly decreased (PcO.Ol) in brain mitochondria (0.088±0.09 mM/g) compared to the control group (0.475±0.029 mM/g). At the same time, there was no different between normal group and preventive group (0.433±0.074 mM/g) (Fig. 4).

Mitochondria swelling essay

This in vivo essay showed a proportional relationship between elevation of mitochondria swelling and endosulfan concentrations (Fig. 5) with strong correlation (r=0.98). By contrast, when endosulfan (200 p.M) is associated with quercetin

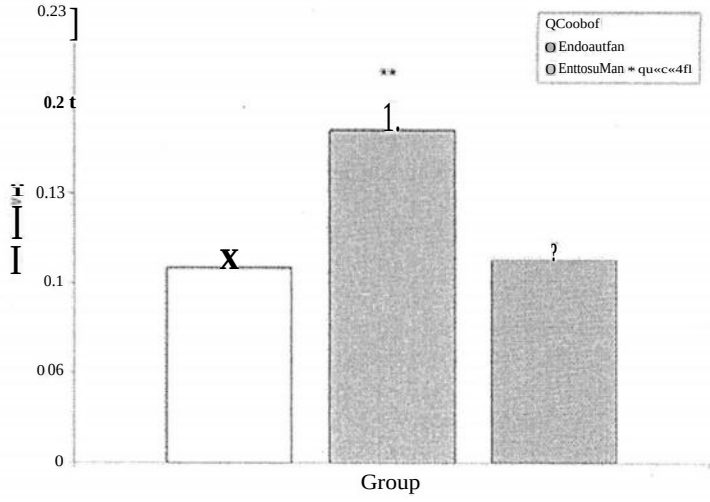


Fig. 1 Effect of endosulfan treatment on brain mitochondria level of MDA in rats and protective role of QE. Values are mean±S£ (n=5). **f><0.01 as compared to normal control

Author's personal copy

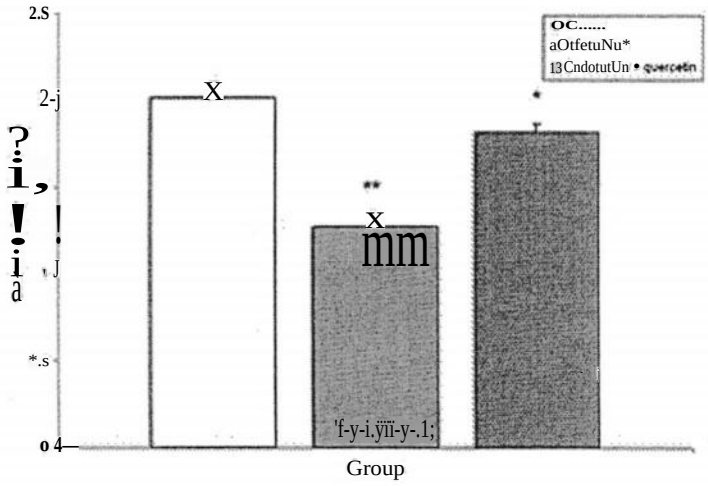


Fig. 2 Effect of endosulfan treatment on brain mitochondria level of CAT in rats and preventive role of QE. Values are meaniSE (n=5). **/><0.01, */'<0.05 as compared to normal control

(200 pM) in the same tube, mitochondria swelling was very low and reduced by half (56 %) (Fig. 6).

Discussion

The objective of the current study was planned with an aim to investigate the effect of acute endosulfan exposure on homeo¬stasis redox in rat brain mitochondria, oxidative stress gener¬ation, and its implication in lipid peroxidation and mitochon¬drial swelling. GSH depletion can enhance oxidative stress and may also increase the levels of excitotoxic molecules; both types of action can initiate cell death in distinct neuronal populations (Jaswinder and Christopher 1997; Uttara et al. 2009). In the present study, the mitochondrial preparation from the rat brain treated with endosulfan demonstrated sig¬nificant decrease in mitochondria GSH uptake, and on the other hand, mitochondrial GSH was increased when the ani¬mals were treated preventatively with QE. This result may be due to de novo GSH synthesis or GSH regeneration following ROS neutralization by the phenolic compound. In this study, because of their high reactivity and short life, the ROS has been analyzed indirectly in vivo by measuring the changes in antioxidases including SOD and CAT. Reduced activity of SOD and CAT was observed in mitochondria when endosul¬fan was administered to rats. This abnormality in the rate of different antioxidants might be the result of intense ROS generation induced by endosulfan administration in brain mitochondria, which in turn might cause an increase in malondialdehyde, as a result of enhanced lipid peroxidation (Silva and Beauvais 2009). Thus, environmental toxicants can directly attack the mitochondria, inducing the generation of ROS, which can further induce the depletion of antioxidant defenses and mediate other oxido-reduction reactions that promote mitochondrial damage, ROS formation, and

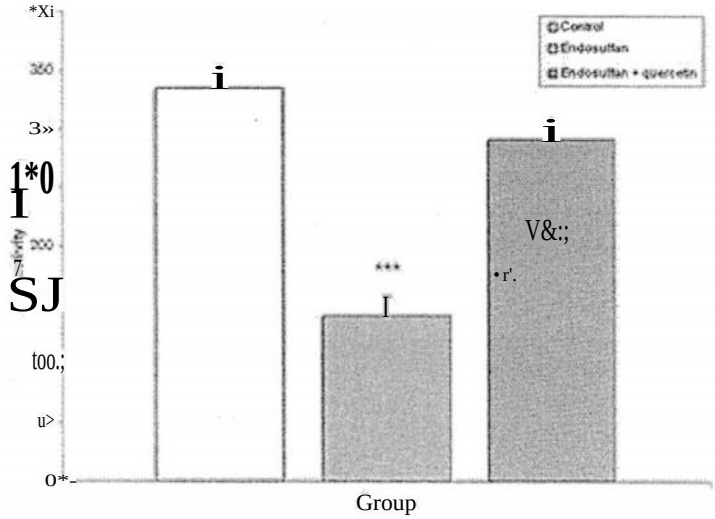


Fig. 3 Effect of endosulfan treatment on brain mitochondria level of SOD in rats and preventive role of QE. Values are meaniSE (n=5). ***/,<0.001 as compared to normal control

Author's personal copy

further investigations are essential to elucidate the precise mechanisms of endosulfan injury upon brain cells and if there is an obvious possibility to be excitotoxic molecule. Recently, much attention has been focused on the protective biochem¬ ical functions of naturally occurring antioxidants such as flavonoids to prevent neurodegenerative diseases in men. It would be interesting, thus, to determine the mechanism by which QE protects brain mitochondria against ROS and nor¬ malizes its swelling and regulates MPTP opening to prevent the incidence of neurodegenerative diseases in the general population.

References

Ahmed S, Passos JF, Birket MJ, Beckmann T et al (2008) Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress. J Cell Sci 121:1046-1053

Assefa Z, Van Laethem A, Garmyn M, Agostinis P (2005) Ultraviolet radiation induced apoptosis in kératinocytes: on the role of cytosolic factors. Biochim Biophys Acta 1755:90-106

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Register) (2013) Daft toxicological profile for endosulfan. U.S. Department of health and human services. http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp41.pdf

Beauchamp C, Fridovich I (1971) Assay of superoxide dismutase. Anal Biochem 44:276-287

Cassarino DS, Bennett JP (1999) An evaluation of the role of mitochon¬ dria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in ncurodegeneration. Brain Res Rev 29:1-25

Choi YJ, Kang JS, Park JH et al (2003) Polyphenolic flavonoids differ in their antiapoptotic efficacy in hydrogen peroxide treated human vascular endothelial cells. J Nutr 133:985-991

Clairbome A (1985) Catalase activity. In: Greenwald RA (ed) CRC handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press, Boca Raton, pp 283-284

Di Monte DA, Chan P, Sandy MS (1992) Glutathione in Parkinson's disease: a link between oxidative stress and mitochondrial damage? AnnNeurol 32:111-115

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

Emerit J, Edeas M, Bricaire F (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. Biomed Pharmacol 58:39-46

Fan Q, Huang CG, Jin Y, Feng B, Miao H, Li W ct al (2005) Effects of shark hepatic stimulator substance on the function and antioxidant capacity of liver mitochondria in an animal model of acute liver injury. Acta Biochim Biophys Sin 37:507-514

Ferrali M, Signorini C, Ciccoli L ct al (2000) Protection of erythrocytes against oxidative damage and autologous immunoglobulin G (IgG) binding by iron chelator fluor-benzoyl-pyridoxa! hydrazone. Biochem Pharmacol 59:1365-1373

Franco R, Sanchcz-Olea R, Reyes-Reyes EM, Panayiotidis MI (2009) Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: menage a trois. Mutât Res 674:3-22

Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodcgencration: where are we now? J Neurochem 97:1634-1658

Jaswindcr SB, Christopher AS (1997) Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuro¬ nal death. Brain Res Rev 25:335-358

Kaur P, Radotra B, Minz RW, Gill KD (2007) Impaired mitochondrial energy metabolism and neuronal apoptotic cell death after chronic dichlorvos (OP) exposure in rat brain. Neurotoxicology 28:1208-1219

Kebicche M, Lakioun Z, Lahouel M, Bouayed J, Meraihi Z, Souliman R (2009) Evaluation of epirubicin-induced acute oxidative stress tox¬ icity in tat liver cells and mitochondria, and the prevention of toxicity through quercetin administration. Exp Toxicol Pathol 61:161-167

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

Kristal BS, Park BK, Yu BP (1996) 4-hydroxynonénal est un puissant inducteur de la transition de perméabilité mitochondriale. J Biol Chem 271:6033-6038

Lowry OH, Rosegrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265-275

Merad-Boudia M, Nicole A, Santiard-Baron D, Saille C, Ceballos-Picot I (1998) Mitochondrial impairment as an early event in the process of apoptosis induced by glutathione depletion in neuronal cells: rele¬ vance to Parkinson's disease. Biochem Pharmacol 56:645-655

Mytilineou C, Kramer BC, Yabut GA (2002) Glutathione depletion and oxidative stress. Parkinsonism Relat Disord 8:385-387

Ng CH, Mok SZ, Koh C, Ouyang X, Fivaz ML, Tan EK, Dawson VL, Dawson TM, Yu F, Lim KL (2009) Parkin protège contre LRRK2 G2019S induite mutant-dopaminergique neurodégénérescence chez la drosophile. J Neurosci 29:11257-11262

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. Anal Biochem 95:351-358

POPRC (2008) Fourth meeting of the persistent organic pollutants review committee. Geneva, Switzerland 13-17 October, http://chm.pops.int/TheConvention/POPsReviewCommittee/Meetings/POPRC4/ResponsesonAnnexEEndosulfan/tabid/460/Default.aspx

Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG et al (1995) The relative antiox¬ idant activities of plant derived polyphcnolic flavonoids. Free Radie Res 22:375-383

Rustin P, Chretien D, Boutgeron T, Gerard B et al (1994) Biochemical and molecular investigation in respiratory chain deficiencies. Clin Chem Acta 228:35–51

Sechi G, Delcdda MG, Bua G, Satta WM et al (1996) Reduced intravenous glutathione in the treatment of early Parkinson 's disease. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 20: 1159-1170

Shi H, Hudson LG, Liu KJ (2004) Oxidative stress and apoptosis in metal ion induced carcinogenesis. Free Radie Biol Med 37:582-593

Silva MH, Beauvais SL (2009) Human health risk assessment of endo¬ sulfan. I: toxicology and hazard identification. Regul Toxicol Pharmacol 56:4-17

Silva MH, Gammon D (2009) An assessment of the developmental, reproductive, and neurotoxicity of endosulfan. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol 86:1-28

Sunitha S, Murthy K, Mahmood R (2012) Characterization of endosulfan and endosulfan sulphate degradation by strains of Pseudomonas putida. Int J Environ Sci 3:859-869

Uttara B, Singh AV, Zamboni P ct al (2009) Oxidative stress and neuro¬ degenerative diseases: a review of upstream and downstream anti¬ oxidant therapeutic options. Current Neuropharmacology 7:65-74

WHO (2002) International programme on chemical safety (DPCS). Environmental Health Criteria, vol 79. World Health Organization, Geneva, p 58

Zerouali E, Salghi R, Hormatallah Belkhcir Hammouti A, Bazzi L, Zaafarani Z (2005) Pesticide residues in tomatoes grown in green¬ house in Souss Massa Valley in Morocco and dissipation of endosul¬ fan and deltamethrin. Fresenius Environmental Bulletin 15:267-271

ÊÊSSlÿi International Research Journal of Earth Sciences ISSN 2321-2527
XSii?/ Vol. 3(1), 1-8, January (2015) Int. Res.J. Earth Sci.

Preventive Role of quercetin against Non-enzymatic Peroxidation and Oxidative stressin Brain Mitochondria induced by Endosulfan in Rat

Kebieche M.1*, Lakroun Z1., Lahouel A.1, Zaama D2., Rouabhi R3. and Fetoui H.4
'Laboratory of Cellular and Molecular Biology, University of Jijelijel, ALGERIA
department of animal biology, University of Mentouri 1, ALGERIA
department of Biology, University of Tebessa, ALGERIA
4Laboratory of Toxicology-Microbiology Environmental and Health, University of Sfax, TUNISIA

Available online at: www.isca.in, www.isca.me
Received1*1 2014, revised [111] 2014, accepted [rd] 2014

Abstract

Endosulfan (END) is still in use in north-Africa although it has large environmental ubiquity and toxicity.The non-enzymatic peroxidation and redox status in rat brain mitochondria after END toxicity have not been sufficiently investigated. In the present study, wefirst investigated the pro-oxidant effect of END on brain mitochondria and its effect upon lipid peroxidation in this organelle. Gavages of END into rats at a dose of 4 mg/kg induced oxidative stress in brain mitochondria, so it provoked a statistically significant reduction of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH) levels and proteins. Significant increase in malonedialdehyde (MDA) levels – an indicator of lipid peroxidation – was observed in neuronal mitochondria. Second, the protective effect of quercetin (QE) (5mg/kg) against endosulfan-induced non-enzymatic peroxidation in the same organelle was also investigated. Indeed, the pretreatment of rats with QE protected brain mitochondria from oxidative stress and membrane modification. This treatment conserves the integrity of mitochondrial membranesfollowing the inhibition of lipid peroxidation. Thus, QE works through the prevention of mitochondrial membrane perforation and the antioxidant defense system of brain mitochondria.

Keywords: Endosulfan, brain mitochondria, redox status, quercetin, lipid peroxidation, preventive effect..

Introduction

Endosulfan is an organochlorine insecticide belonging to the cyclodiene subgroup. It is composed of a mixture of two stereoisomers: a and p-endosulfan, in the ration of 70/30. This compound has been widely used for its broad spectrum insecticide/acaricide since its introduction in the 1950s, but little information is available concerning the volumes of production. As an indication, it was estimated that 10,000 metric tons were produced worldwide in 198412. Nowadays, this rate remains comparable3. Subsequently, END has shown a large environmental ubiquity, persistence and toxicity4'5. As a result, it is now banned for sale and use in Europe (EU Directive 2005/864/EC) and has been proposed to be listed for a global ban under the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants3. Nevertheless, END is still in use in several countries, including north-Africa, where it has been detected in fruits and vegetables at 1.20 mg/kg6. However, higher levels have been found, reaching 4 ppm in tomatoes harvested in Jijel (Algeria, unpublished results).

Exposure to endosulfan mainly occurs through ingestion of contaminated food, but also happens via inhalation or dermal contact4. Due to its liposolubility7, this xenobiotic accumulates in human tissues8, including brain9, where it is able to cross the blood-brain barrier. Exposure of the unborn and the new-born is also observed since END is able to cross the placental barrier10 and is lactationally transferred through the lipid phase of breast milk11. Overstimulation of the central nervous system is the major characteristic of END poisoning. The most important reported symptoms are the induction of epileptic seizures, focal motor seizures, unconsciousness, agitation, disorientation and an increase in anxiety12. The neurological damages resulting from END poisoning can be permanent. This xenobiotic induces neurotoxicity by binding and blocking the Cl" channel linked to the y-amino-butyric acid (GABAA)-receptor at synapses, resulting in uncontrolled excitation13. Increase in serotonin concentrations in the cerebrum and midbrain regions have been also enlightened after oral administration in male rats14. In addition, it has been shown that END exerts oxidative stress in vivo when administered at low doses, in several tissues, including cerebral tissue15.

The oxidative stress, as a pathological condition, is defined as a state of imbalance reached whenthe production of potentially destructive reactive oxygen species (ROS), that are products of normal and aberrant cell metabolism, exceeds the capacity of detoxification systems, leading to cell damage induced by the interaction of ROS with cellular constituents. Mitochondria are considered to be the major ROS producers, the free radicals being formed during the enzymatic cascades of the oxidative phosphorylation16.

As the brain is particularly susceptible to oxidative stress because of its high O2 consumption, its lipid-rich constitution and its limited amount of antioxidant capacity[17, 18] and because substantial evidence that mitochondrial dysfunction and oxidative damage may play a critical role in the pathogenesis of neurodegenerative disease such as Alzheimer's and Parkinson's disease or multiple sclerosis19'20, we were interested in assessing the pro-oxidant activity of END and its implication upon non-enzymatic per oxidation in brain mitochondria and to determine if quercetin (QE), a well-known anti-oxidant compound, could exert a protective effect in vivo against sub-acute END toxicity. Indeed, according to Heijnen et al. and Kebieche et al. works[21,22], QE is the most active scavenger of ROS and reactive nitrogen species due to the presence of two pharmacophores within the molecule. More, it is one of the most widely distributed polyphenolic flavonoids, highly abundant in food and beverage sources (broccoli, lettuce, apples, tomatoes, onions, tea and coffee). The estimation of daily consumption has been set at about 25-50 mg/day23, and QE has been shown to be safe and effective at relatively low dosages24.

To achieve this aim, END was orally administered for one week to a first group of rat while and a second group was treated with END in association with QE, after that malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), proteins levels as well as superoxide dismutase (Mn-SOD) and catalase (CAT) activities are assessed in the rat brain mitochondrial matrix and compared to a control group.

Material and Methods

Chemicals: The majority of chemicals were procured from Sigma Aldrich, Germany. Endosulfan was purchased from Pharmacia, St. Quentinin Yvelines, France.

Animal maintenance: Male Wistar albinosrats (body weight 220-280g) were originally from the Pasteurinstitutein Algiers, Algeria, were use din these experiments. Ratswerebred in our animal facility in stainless metallic cages. The room housing threats was temperature controlled (average of 22 °C, 50-60% relative humidity) and kept underadailyl2h light/darkcycle. Rats were fed food and water ad libitum. Rats were adapted for lweëk be fore the indicated treatments. All experimental assays were carried out in conformity with international guidelines for the care and use of laboratory animals.

Animal treatment protocol: The animals were grouped as follows:Gro«/;7, control rats: ratswereadministeredlmlof olive oil peros daily for 6 days.Group2, Endosulfan treated: rats were administered 1ml of endosulfan at 4 mg/kg in olive oil, per os daily for 6 days.Group3, preventative group-, rats were administered 1ml of QE (5mg/kg) + endosulfan (4 mg/kg) in olive oil, p.o daily for 6 days.

Preparation of mitochondria matrix- fraction: Mitochondrial matrix was prepared by applying the method described by Rustin et al.25: Brains were quickly removed and perfused with 0.86% cold saline to completely drain all the red blood cells, chopped into small pieces and placed into ice-cold isolation buffer for mitochondria (lOmM tris-HCl, pH 7.4, 250 mM Sucrose, 0.5m Methylene diamine tetra acetic acid (EDTA) and 0.5% bovine serum albumin). After being homogenized, the homogenate was centrifuged first at 2000 rpm for 20 min to eliminate cell membrane fragments. The supernatant obtained was centrifuged at 10,000 rpm forlO min at 4°C. Mitochondrial pellets were washed twice with and then resuspended in isolation buffer. The mitochondrial matrix was extracted from freshly prepared mitochondria by freezing and defrosting with repeated homogenization in order to burst mitochondria. After centrifugation atlOOOO rpm forlO min, the supernatant was the source of CAT, SOD, GSH and MDA. Protein estimation was performed by Lowry method26.

Biochemical evaluation of MDA, GSH, Proteins, CAT and SOD in rat brain mitochondria: MDA levels in the mitochondria were evaluated as follows27. First, 0.5 ml of mitochondria matrix fraction was added to 0.5ml of trichloroacetic acid (TCA) (20%) and 1ml of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (0.67%). The mixture was placed in boiling water. The tubes were moved to an ice-bath, received 4ml of n-butanol and were centrifuged at 3000 rpm forl5 min. The optical density of the supernatant was then assessed at 532 nm (UVmini 1240 UV-vis spectrophotometer SHIMADZU, China). MDA amounts are expressed as nmol/g of brain and were calculated using a standard curve prepared under the same conditions with a solution of 1, 1, 3, 3-tetraetoxypropane that produces MDA after hydrolysis.

Levels of GSH were assessed using Ellman assay28. Then, 50 pi of the cytosol fraction were diluted in10 ml df phosphate buffer (0.1M, pH 8.0). Twenty microliter of 5, 5'-dithiobis 2-nitro-Benzoicacid (0.01M) (DTNB) was added to 3ml of the mixture dilution. Afterl5 min, the absorbance of thionitrobenzoic acid (TNB) produced after oxidation of GSH by DTNB was evaluated at 412 nm against a blank prepared by TCA (5%) under the same conditions. The GSH amounts were calculated using a Standard curve of GSH, and were expressed in mmol/g.

Mitochondrial CAT assessment was performed by Clairbome29 method. This assay is based on the disappearance of H202 at 25°C in the presence of mitochondrial enzyme source. Briefly, the assay mixture contained 1ml of phosphate buffer (KH2P04 0.1 M, pH 7.2), 0.975 ml of freshly prepared H202 (0.091 M) and 0.025 ml of the enzymatic source. The absorbance was measured at 240nm each minute, for 2 min. The enzymatic activity was calculated in terms of IU/mg of protein.

Mitochondrial Mn-SOD assessment was performed by Beauchamp and Fridovich30 technique. The assay mixture contained 2ml of reactive milieu (cyanide of sodium10'2 M, NBT solution 1.76xl0'4, EDTA 66mM, methioninlO'2M and riboflavin 2 pM, pH 7.8) and 5 mL of the enzymatic source

(Mitochondrial matrix). This solution mixture was exposed to a 15W lamp for 10 min to induce the photoreaction of riboflavin and 02. The reduction of NBT by a superoxide anion on formazan was measured Spectrophotometrically at 560nm. The enzymatic activity was calculated in terms of IU/mg of protein.

Statistical analysis: The numerical and graphical results are presented as mean ±standard error (SE). The significance of the difference between two treatment groups was verified by the Student's t-test. The degree of statistical significance was set at a level of $p < 0.05$. Statistical calculations were carried out using the Statviews 4.5 statistical package (Abacus Concept,Int) and the Exel 6.0 (Microsoft,Inc.).

Results and Discussion

Mitochondria, as a primary site of cellular energy generation and oxygen consumption represent itself a likely target for END poisoning. Therefore, the objective of the current study was planned with an aim to investigate the effect of acute END exposure on homeostasis redox in mitochondria brain in rats, oxidative stress generation and its implication in non-enzymatic lipid peroxidation.

In this study, assessment of in vivo lipid peroxidation in brain mitochondria through MDA levels in control group, END-treated group and preventive group were significantly increased ($p < 0.05$) in brain mitochondria (0.150 ± 0.016 nmol/g) in the END-treated group compared to the normal control (0.124 ± 0.002 nmol/g). However, no significant difference was recorded between the normal group and the preventive group (0.121± 0.011 nmol/g), (figure-1). Lipid peroxidation at the level of the mitochondria impairs mitochondrial metabolism and induction of the Mitochondrial Pore Transition Permeability (PTP). In previous studies, cytochrome c which is bound to the inner mitochondrial membrane by an association with the anionic phospholipid cardiolipin has been shown to be released via oxidation of cardiolipin during apoptosis which precedes its release to the cytosol31.

In present study, GSH level, such as non-enzymatic antioxidant, was significantly reduced ($p < 0.01$) in brain mitochondria in END-treated group (0.068 ± 0.043nmol/g) compared to the control group (0.435 ± 0.147 nmol/g). In the same time, there was no different between normal group and preventive group (0.344+ 0.074 nmol/g), (figure-2).Regarding the decrease of this tripeptide, which constitutes the first line of defense against free radicals, is possibly due to its action against the ROS generation in the END-treated group but the increase of GSH level in preventive group may be due to de novo GSH synthesis or GSH regeneration following ROS neutralization by the quercetin. The previous studies have showed that GSH is a potentially important link between oxygen radical production and mitochondrial damage, because of the scavenging activity of this tripeptide against accumulation of oxygen radicals and its decrease in the brains of parkinsonian patients22,32,33.

Proteins assessment in brain mitochondria is shown in figure-3. The global value of these proteins was significantly decreased in END-treated group ($p < 0.01$) compared to the proteins level in control group (454.212 ± 37.780 pg/g; 707.372 ± 30.27 pg/g of tissue) successively. Moreover, these reduces values observed in the intoxicated group with END are normalized in the preventive group (727.372 ± 73.37 pg/g of brain tissue). Assessment of antioxidant enzymes, CAT and Cu/Zn-SOD is shown in Table-1. The administration of END to animals caused a highly significant ($p < 0.01$) decrease in CAT and Cu/Zn-SOD levels (150.84 ± 35.9 Ul/mg and (0.994 ± 0.299 Ul/mg) respectively when compared to the control group (352.4 ± 23.5 Ul/mg and 1.932 ± 0.325 Ul/mg) successively. On the other hand, the treatment of animals with QE (5mg/kg) and END normalized the cellular content of these antioxidant enzymes in brain mitochondria (260.34 ± 32.4 Ul/mg and 1.636 ± 0.359 Ul/mg in order, compared to the levels contained in normal controls. Because of their high reactivity and short life, ROS, in this study, have been analysed indirectly in vivo by measuring the changes in antioxidases including SOD and CAT. SOD catalyses the dismutation of 02 Radicals into H202 and 02. In parallel, CAT decomposes H202 into 02 and H20. The reduction of these antioxidases explains the intense production of superoxide anion in the respiratory chain following the probable alteration in its electron transport system. This abnormality in the rate of different antioxidants might have resulted from intense ROS generation induced by endosulfan administration in brain mitochondria34,35, which in turn might have caused an increase in malondialdehyde, as a result of enhanced lipid peroxidation. Thus, acute organochlorine exposure has the potential to disturb cellular antioxidant defence system and alterations in lipid membrane of brain mitochondria. In previous studies, researchers have largely demonstrated, through different mechanisms, alterations in the redox status induced by environmental stressors. Indeed, environmental toxicants can attack the mitochondria directly causing intense production of ROS which can therefore deplete antioxidant defences and mediates other redox reactions that promotes oxidative stress36. Environmental stressors can also induce oxidative stress by mediating a variety of reactions through different metabolic pathways such as those mediated by detoxifying enzymes. These phenomena have a crucial impact on the mitochondria damage and its integrity in the cell37'38. It is conceivable therefore that regardless of whether oxidative stress or mitochondrial damage represents the initial insult, these toxic mechanisms may both contribute to neuronal degeneration via changes in glutathione levels38ÿ*0. In the current study, the treatment of animals with QE maintained the normal content of GSH, SOD and MDA. Therefore, QE showed really antioxidant properties against ROS observed during animal exposition to endosulfan brain injury and traduced consequently its cytoprotective effects. In our previous studies, the same results were obtained when rats were administered by QE to prevent hepatotoxicity against oxidative stress induced by epirubicin22.

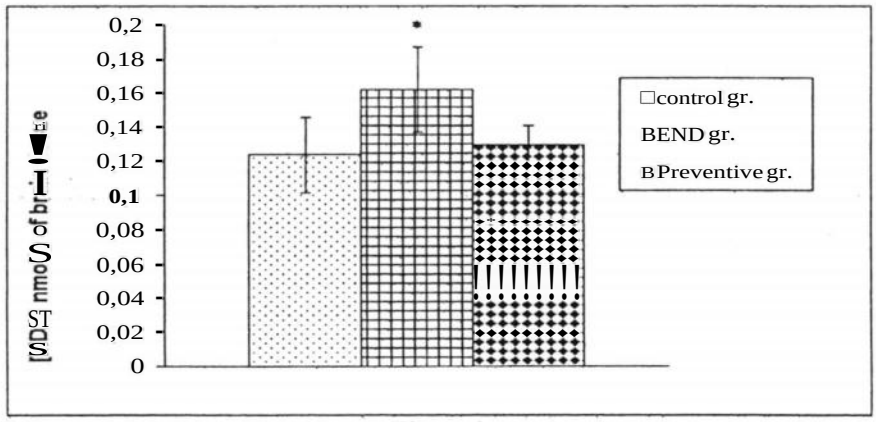


Figure-1
Effect of endosulfan treatment on brain mitochondria level of MDA, in rats and preventive role of QE. Values are mean ± S.E. (n=5). * P< 0.05 as compared to normal control

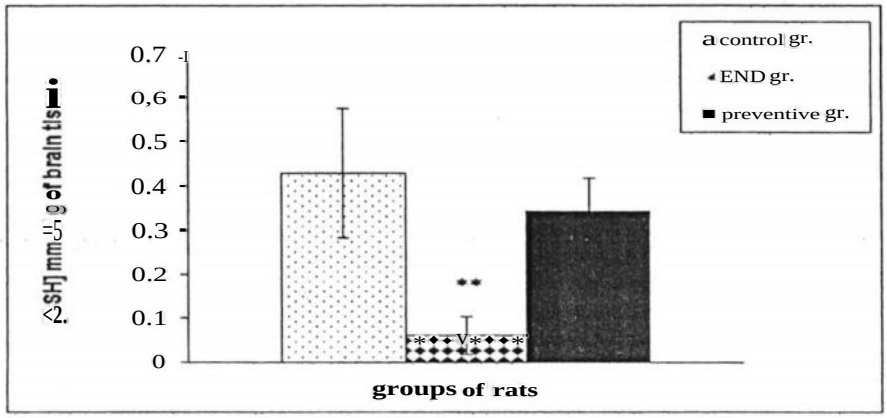


Figure-2
Effect of endosulfan treatment on brain mitochondria level of GSH, in rats and preventive role of QE. Values are mean ± S.E. (n=5). ** P< 0.01 as compared to control group

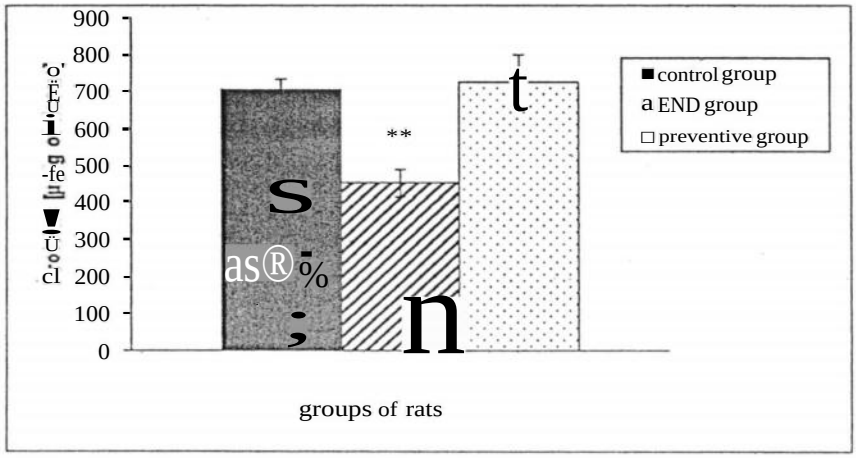


Figure-3
Effect of endosulfan treatment on brain mitochondria level of proteins, in rats and preventive role of QE. Values are mean ± S.E. (n=5). ** P< 0.01 as compared to control group

Table-1
Enzymatic activities of SOD and CAT in brain mitochondria in different rat groups

Parameters / Rats	Antioxidases activity	
	SOD	CAT
Control group (lml of olive oil)	352.4 ±23.5	1.932 ±0.325
Endosulfan group (4mg/kg in olive oil)	150.84 ±35.9**	0.994 ± 0.299*
Preventive group (END4 mg/kg+ QE 5mg/kg in olive oil)	260.34 ± 32.4	1.636 ±0.359

Values are mean ± S.E. (n=5). ** P< 0.01 and * P< 0.05 as compared to control group

Conclusion

In summary, this is in vivo experiment to demonstrate that END has oxidative stress and non-enzymatic peroxidation effect in experimental rats. Redox status imbalance was showed by increasing of antioxidant systems (SOD, CAT, GSH) and intense peroxidation indicated by MDA elevation in rats receiving END. QE has a protective effect against the damage following END brain injury in rats. The oxidative stress and lipid peroxidation were normalized and brain mitochondria were significantly protected following QE administration I association with the pesticide. However, further investigations are essential to elucidate the precise mechanisms of END, its impact upon mitochondrial integrity and respiratory function. The mechanisms of QE prevention against brain injury of END must also be deeply investigated.

References

1. World Health Organization (WHO)., The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2000-2002. World Health Organization, International Program on Chemical Safety/Inter-Organization Program for the Sound Management of Chemicals, Geneva (2002)
2. Silva M.H. and Gammon D., An assessment of the developmental, reproductive and neurotoxicity of endosulfan, Birth Defects Research Part B-Developmental and Reproductive Toxicology, 86(1),1-28 (2009)
3. POPRC (Fourth meeting of the Persistent Organic Pollutants Review Committee), Geneva, Switzerland 13 - 17 October (2008)
4. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Register). Toxicological Profile for Endosulfan, September 2000. Available at: http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles Ap41.pdf. (2014)
5. Sunitha S., Murthy V.K. and Mahmood R., Degradation of Endosulfan by Mixed Bacterial Cultures Enriched from Endosulfan Contaminated Soils of Southern India, International journal of bioscience, biochemistry and bio¬informatics, 2(1), 31-35, DOI: 10.7763/IJBBB(2012)
6. Zerouali E., Salghi R., Hormatallah Belkheir Hammouti A., Bazzi L. and Zaafarani Z., Pestide residues in tomatoes grown in greenhouse in Souss Massa Valley in Marocco and dissipation of endosulfan and Deltanethrin,. Fresenius Environmental Bulletin, 15(4), 267-271(2006)
7. DeLorenzo M.E, Taylor L.A, Lund S.A, Pennington P.L., Strozier E.D. and Fulton M.H. Toxicity and Bioconcentration Potential of the Agricultural Pesticide: Endosulfan in Phytoplankton and Zooplankton, ArchEnviron. Contam. Toxicol., 42, 173-181(2002)
8. Hernandez F., Pitarch E., Serrano R., Gaspar J.V. and Olea N., Multiresidue determination of endosulfan and metabolic derivatives in human adipose tissue using automated liquid chromatographic cleanup and gas chromatographic analysis, Journal of Analytical Toxicology, 26(2), 94-103 (2002)
9. Chan, M.P., Mohd, M.A. Analysis of endosulfan and its metabolites in rat plasma and selected tissue samples by gas chromatography-mass spectrometry, Environ. Toxicol.,20, 45-52(2005)
10. Torres M.J., Folgoso C.C., Reche F.C., Velasco A.R. and Garcia I.C., Organochlorine pesticides in serum and adipose tissue of pregnant women in Southern Spain giving birth by cesarean section, Sci Total £nvircm372(l),32-8(2006)
11. Cerrillo I., Granada A., Lopez-Espinosa M.J., Olmos B., Jimenez M. and Cano A. et al. Endosulfan and its metabolites infertile women, placenta, cord blood and human milk, Environ Res,98,233-9(2005)
12. Durukan P., Ozdemir C., Coskun R., Ikizceli I., Esmaoglu A., Kurtoglu S. and Guven M., Experiences with endosulfan mass poisoning in rural areas, Eur J Emerg Med., 16(1), 53-6. doi: 10.1097/ MEJ.0b013e3283088e2b (2009)
13. Silva M.H. and Beauvais S.L., Human health risk assessment of endosulfan. I: Toxicology and hazard identification, Regulatory Toxicology and Pharmacology, 56: p.4–17(2010)
14. Paul V., Sheela S., Balasubramaniam E., Kazi M. Behavioural and biochemical changes produced by repeated oral administration of the insecticide endosulfan in immature rats, Indian J Physiol Pharmacol, 37, 204–8 (1993)
15. Bebe F.N. and Panemangalore M., Exposure to low doses of endosulfan and chlorpyrifos modifies endogenous antioxidants in tissues of rats. J. Environ. Sci. Health B., 38, 349-63 (2003)

16. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M. and Telser J., Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, Int. J. Biochem. Cell Biol.,39, 44-84(2007)

17. Ng C.H., Mok, S.Z., Koh, C., Ouyang, X., Fivaz ML, Tan E.K., Dawson V.L., Dawson T.M., Yu F. and Lim K.L., Parkin protects against LRRK2 G2019S mutant-induced dopaminergic neurodegeneration in Drosophila, J. Neurosci. 29(36), 11257-11262 (2009)

18. Halliwell B., Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?, Journal of Neurochemistry, 91, 1634-1658 (2006)

19. Beal M.F., Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Ann Neurol, 38,357-366 (1995)

20. Cassarino D.S. and Bennett J.P., An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. Brain Research Reviews, 29(1), 1-25 (1999)

21. Heijnen C.G., Haenen G.R. , Oostveen R.M., Stalpers E.M. and Bast A., Protection of flavonoids against lipid peroxidation : the structure activity relationship revisited, In Free Radical Research, 36, 575-581(2002)

22. Kebieche M., Lakroun Z., Lahouel M., Bouayed J., Meraihi Z. and Souliman R., Evaluation of epirubicin-induced acute oxidative stress toxicity in rat liver cells and mitochondria, and the prevention of toxicity through quercetin administration, Experimental and Toxicologic Pathology, 61, 161-167(2009)

23. Formica J.V. and Regelson W., Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids, Food Chem Toxicol, 33 (12), 1061-1080 (1995)

24. Utesch D., Feige K., Dasenbrock J., Broschard T.H., Harwood M., Danielewska-Nikiel B. and Lines T.C., Evaluation of the potential in vivo genotoxicity of quercetin, Mutation Research/Genetic Toxicology and EnvironmentalMutagenesis, 654, 38–44 (2008)

25. Rustin P, Chre' tien D, Bourgeron T, Ge' rard B, Rotig A and Munnich A., Biochemical and molecular investigation in respiratory chain deficiencies, Clin Chem Acta, 228, 35-51(1994)

26. Lowry O.H., Rosegrough N.J., Fan- A.L. and Randall R.J., Protein measurement with the folin phenol reagent, J Biol Chem.,193,265-75 (1951)

27. Ohkawa H., Ohishi N. and Yagi K., Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction, Anal Biochem., 95, 351-8 (1979)

28. Ellman GL., Tissue sulfhidryl groups, Arch Biochem Biophys, 82, 70-7(1959)

29. Clairbome A., Catalase activity. In: Greenwald RA, editor. CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. Boca Raton, FL: CRC Press, 283-4 (1985)

30. Beauchamp C. and Fridovich I., Assay of superoxide dismutase, Anal Biochem, 44, 276-87 (1971)

31. Ott M., Gogvadze V., Orrenius S. and Zhivotovsky B., Mitochondria, oxidative stress and cell death, Apoptosis, 12, 913-922 (2007)

32. Di Monte D.A., Chan P. and Sandy M.S., Glutathione in Parkinson's disease: a link between oxidative stress and mitochondrial damage?. Ann Neurol., 32, (SI) S111-S115 (1992)

33. Sechi G., Deledda M. G., Bua G., Satta W.M., Deiana G.A., Pes G.M. and Rosati G., Reduced intravenous glutathione in the treatment of early Parkinson 's disease, Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 20(7), 1159-70 (1996)

34. Kaur P., Radotra B., Minz R.W. and Gill K.D., Impaired mitochondrial energy metabolism and neuronal apoptotic cell death after chronic dichlorvos (OP) exposure in rat brain, Neurotoxicology, 28, 1208-1219(2007)

35. Ahmed T., Tripathi A.K., Ahmed R.S, Das S., Suke S.G., Pathak R., Chakraboti A. and Banerjee B.D., Endosulfan-induced apoptosis and glutathione depletion in human peripheral blood mononuclear cells: attenuation by N-acetylcysteine, J Biochem Mol Toxicol., 22, 299-304 (2008)

36. Assefa Z., Van Laethem A., Garmyn M. and Agostinis P., Ultraviolet radiationinduced apoptosis in kératinocytes: on the role of cytosolic factors, Biochim Biophys Acta,1755, 90-106 (2005)

37. Song Y., Liang X., Hu Y.,Wang Y., Yu H. And Yang K., p,p-DDE induces mitochondria mediated apoptosis of cultured rat Sertoli cells, Toxicology,253, 53-61(2008)

38. Franco R., Sanchez-Olea R., Reyes-Reyes E.M. and Panayiotidis M.I., Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Menage a Trois. Mutât. Res.,614, 3-22 (2009)

39. Merad-Boudia M., Nicole A., Santiard-Baron D., Saille C. and Ceballos-Picot I., Mitochondrial impairment as an early event in the process of apoptosis induced by glutathione depletion in neuronal cells: relevance to Parkinson 's disease . Biochem Pharmacol, 56(5), 645-55 (1998)

40. Weber J., Halsall C.J., Muir D., Teixeira C., Small J., Solomon K., Hermanson M., Hung H. and Bidleman T., Endosulfan, a global pesticide: a review of its fate in the environment and occurrence in the Arctic, Sci. Total Environ.,408 (15), 2966-2984(2010)

الاسم: زهورة
اللقب: لقرون

تخصص علم التسمم والصيدلة

العنوان

دراسة الدور الوقائي لبعض المركبات النشطة بيولوجيا اتجاه
الأثر السمي للمبيدات والهيدروكربونات على الجهاز العصبي والمناعي عند الجرذان

الملخص

تناولت هذه الدراسة التأثير الوقائي لبعض المركبات النشطة بيولوجيا (فيتامين C و E والكرسيتين، المستخلص الفينولي لقشور برتقال *Citrus Sinensis* اتجاه الأثر السمي لأحد للهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات (Naphtalène) ومبيد كلوري (Endosulfan)علي الجهاز العصبي والمناعي، ولهذا الغرض خصص التركيب التجريبي الأول لدراسة التأثير السمي لـEndosulfan (2ملغ/كغ) وNaphtalène (50ملغ/كغ) في سيتوبلازم الخلايا العصبية عند جرذان التجارب. التركيب التجريبي الثاني خصص لدراسة وضع الأكسدة والاختزال في ميتوكوندريات الخلية العصبية تحت تأثير سمية Endosulfan والوقائي للكرسيتين على جرذان التجارب، حيث المجموعة الأولى اعتبرت شاهدة، بينما المجموعة الثانية (END) عملت بمبيد Endosulfan بجرعة (2ملغ/كغ) والمجموعة الثالثة عملت بال Quercétine (10ملغ/كلغ) وEndosulfan (2ملغ/كلغ). كما قمنا بتقدير الأثر السمي للأندوسلفان والوقائي للكرسيتين على الانتفاخ الميتوكندري وذلك بقياس امتصاصية عينات المعلق الميتوكندري المتحصل عليه من النسيج العصبي.

أما فيما يخص التركيب التجريبي الثالث خصص لدراسة التأثير السمي للأندوسلفان (4ملغ/كغ) والنفثالين (10مغ/كغ) والفعل الوقائي لفيتامين Quercétine C, E, والمستخلص الفينولي لقشور البرتقال *Citrus Sinensis* على الجهاز الدموي والمناعي والمعايير البيوكيميائية للدم على جرذان التجارب.

تشير نتائج دراسة وضع الأكسدة والاختزال في سيتوبلازم الخلية العصبية إلى حدوث خلل في مستوي مضادات الأكسدة، يتجلى في الانخفاض بمعنوية مرتفعة في مستوي CAT, SOD, GST, GSH، كما تؤكد الدراسة حدوث الأكسدة الفوقية للمبيدات الغشائية وهذا يتضح من خلال ارتفاع مستوي MDA بمعنوية عند المجموعة المعاملة بـEndosulfan وبمعنوية جد مرتفعة عند المجموعة المعاملة بـEndosulfan وNaphtalène في نفس الوقت. كما سجل انخفاض مستوي لبروتينات السيتوزولية وهذا مقارنة بالمجموعة الشاهدة.

أظهرت نتائج دراسة وضع الأكسدة والاختزال في حشوة الميتوكندري انخفاض بمعنوية جد مرتفعة لمستوى SOD والبروتينات، وانخفاض بمعنوية مرتفعة لكل من CAT,GSH بينما ارتفع MDA بمعنوية مقارنة بالشاهد يؤكد هذا الارتفاع الجهد ألتأكسدي والأكسدة الفوقية للأغشية الفوسفوليبيدية للميتوكندريات الخلايا العصبية، في حين المعاملة بالكرسيتين أظهر الفعل الوقائي للأثر السمي لـEndosulfan.

أظهرت نتائج قياس امتصاصية المعلق الميتوكوندري انخفاض مستمر وتناسب عكسي مع التراكيز المتزايدة للأندوسلفان في الغشاء مما يبين زيادة الانتفاخ الميتوكندري بسبب اتساع الثقوب الغشائية، في حين تبين الدور الوقائي للكرسيتين المضاف مع الأندوسلفان مما يفيد عدم الانتفاخ الميتوكندري.

اتضحت سمية END وNap علي الجهاز الدموي والمناعي من خلال الارتفاع بمعنوية عالية في التقييم الكلي لكريات الدم البيضاء واللمفاويات عند المجموعة المعاملة ب END وNap معا وانخفاض بمعنوية وبمعنوية مرتفعة لعدد لـgranulocyte وmonocyte على التوالي، كما تبين التأثير السمي على الكريات الدموية الحمراء والهيموغلوبين حيث انخفضت بمعنوية عالية وجد عالية على التوالي.

كما تشير النتائج المتوصل لها أنEND وNap مواد سامة للكبد والجهاز البولي والبنكرياس وهذا من خلال الارتفاع المعنوي للإنزيمات الكبدية TGO-AST وTGP-ALT وارتفاع مستوي اليوريا والكرياتينين والغليسريدات الثلاثية والكولسترول والجلوكوز مقارنة بالمجموعة الشاهدة. كما تبين الدور الوقائي لكل من VC، VE ، Quercétine والمستخلص الفينولي لقشور البرتقال *Citrus Sinensis*.

الكلمات المفتاحية

المبيدات، الهيدروكاربونات، الأندوسلفان، النفتالين، الجهاز العصبي، الجهاز المناعي، الأثر الوقائي والسمي، المستخلص الخام لقشور البرتقال، فيتامين C، فيتامين E، الكرستين، الميتوكوندريات، الإجهاد التأكسدي.

المقررة: أستاذة التعليم العالي زعمة جميلة