



جامعة كربلاء

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

الفعالية السمية الخلوية لجسيمات الفضة النانوية ( $AgNO_3$ ) والمستخلص الكحولي للعكبر على  
خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480)

رسالة مقدمة الى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل  
درجة الماجستير في علوم الحياة/ علم الحيوان

كتبت بواسطة:

كوثر نعمة نجم عبد السعدي

بإشراف:

أ.د. ياسمين خضير الغانمي

ذو الحجة/1443 هـ

تموز/2022 م

## بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿يَا أَيُّهَا الَّذِينَ آمَنُوا إِذَا قِيلَ لَكُمْ تَفَسَّؤُوا فِي الْمَجَالِسِ

فَأَفْسُؤُوا بِفَسْحِ اللَّهِ لَكُمْ وَإِذَا قِيلَ انشُرُوا فَانشُرُوا يَرْفَعِ اللَّهُ

الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ وَاللَّهُ بِمَا

تَعْمَلُونَ خَبِيرٌ﴾

صدق الله العلي العظيم

[المجادلة: 11]

### إقرار المشرف على الرسالة

نشهد ان اعداد هذه الرسالة (الفعالية السمية الخلوية لجسيمات الفضة النانوية (AgNo<sub>3</sub>) والمستخلص الكحولي للعكبر على خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480)) قد جرى تحت اشرافي في قسم علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة/ علم الحيوان.

التوقيع: 

الاسم: د. ياسمين خضير خلف الغانمي

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة كربلاء

التاريخ: 2022/ 8 / 14

### توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة الى التوصية اعلاه من الاستاذ المشرف، أُحيل هذه الرسالة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع: 

الاسم: د. نصير ميرزا حمزة

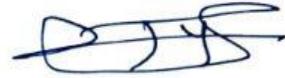
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة كربلاء

التاريخ: 2022/ 8 / 15

### إقرار المقوم اللغوي

أشهد إن هذه الرسالة الموسومة بـ (الفعالية السمية الخلوية لجسيمات الفضة النانوية ( $AgNO_3$ ) والمستخلص الكحولي للعكبر على خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480)) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية، وبذلك أصبحت مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

التوقيع: 

الاسم: د. علي كريم حميد، السعدي

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

الجامعة والكلية: كربلاء - التربية للعلوم الإنسانية

التاريخ: 2022 / 7 / 25

## إقرار لجنة المناقشة

نحن اعضاء لجنة المناقشة الموقعين أدناه نشهد بأننا قد اطلعنا على الرسالة الموسومة (الفعالية السمية الخلوية لجسيمات الفضة النانوية ( $AgNO_3$ ) والمستخلص الكحولي للعكبر على خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480)) المقدمة من قبل الطالبة (كوثر نعمه نجم) وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير قسم علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة كربلاء، وبعد اجراء المناقشة العلمية وجدنا انها مستوفية لمتطلبات الدرجة وعليه نوصي بقبول الرسالة بتقدير (إمتياز).

### رئيس لجنة المناقشة

التوقيع: 

الاسم: خالد حمدان عثوان

المرتبة العلمية: أستاذ

مكان العمل: جامعة بغداد/ كلية طب الاسنان

التاريخ: 2022/ 7 / 27

### المشرف

التوقيع: 

الاسم: ياسمين خضير خلف

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: جامعة كربلاء/ كلية التربية

للعلوم الصرفة

التاريخ: 2022/ 7 / 25

### عضو لجنة المناقشة

التوقيع: 

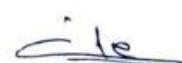
الاسم: رنا اياد غالب

المرتبة العلمية: أستاذ

مكان العمل: جامعة بابل/ كلية الطب

التاريخ: 2022/ 7 / 26

### عضو لجنة المناقشة

التوقيع: 

الاسم: لقاء حسون صكبان

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: جامعة كربلاء/ كلية التربية

للعلوم الصرفة

التاريخ: 2022/ 7 / 26

### مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

التوقيع: 

الاسم: حميدة عيدان سلمان

المرتبة العلمية: أستاذ

التاريخ: 2022/ 8 / 17

## الاهداء

الى من اعطاني ولم يزل يعطيني بلا حدود.. الى من رفعت رأسي عالياً افتخاراً به.. ادعو الله عز وجل ان يبقيك ذخراً لنا.. ولا يحرمننا ينابيع حبك وحنانك.. (والدي العزيز).

الى الملاذ الاكثر اماناً.. الى اقدس معاني الانسانية.. الى اعظم هبات الحياة.. (والدتي الحبيبة حفظها الله).

الى الغالي على قلبي رفيق دربي، شريك حياتي ونصفي الاخر.. (زوجي العزيز حفظه الله).

الى من وقفوا بجانبني في اشد المواقف صعوبة ولم يتركوني ابداً وكانوا سنداً وعضواً وسعادة في احزن اللحظات.. (اخوتي الاعزاء حفظهم الله).

الى من هن كتلة من الحنان تكفي لمأ كوني كله ومن لا تغير السنين معالم قلوبهن.. (اخواتي العزيزات حفظهن الله).

الى من هم حصاد عمري وسنيني وسبب فرحتي في هذه الحياة.. (ابنائي طالب وسراج وشهناز حفظهم الله).

الى قطع السكر ومن تأسر قلبي ابتسامتهم.. (ابناء اخوتي واخواتي حفظهم الله).

كذلك كل من دعا لي بصدق ومحبة وإيثار أهديهم ثمرة جهدي المتواضع هذا.

كوثر

## الشكر والتقدير

الحمد لله والشكر له كما ينبغي لجلال وجهه وعظيم سلطانه عدد خلقه ورضا نفسه وزنه عرشه ومداد كلماته على ان منّ عليّ بإنجاز هذه الدراسة والصلاة والسلام على افضل الخلق نبينا محمد وعلى اله وصحبه وسلم تسليماً كثيراً. اما بعد إن كانت كلمات الشكر تُسعف القائلين، فإنها تعجز أمام عظمة المواقف.

اتقدم بوافر الشكر والامتنان للسيد رئيس جامعة كربلاء المحترم الاستاذ الدكتور باسم خليل نايل السعيدي لإتاحة الفرصة لإكمال دراستي.

كما اتقدم ببالغ شكري وتقديري للسيد عميد كلية التربية للعلوم الصرفة الاستاذ الدكتورة حميدة عيدان سلمان المحترمة لجهودها المبذولة في دعم طلبة الدراسات العليا.

واتقدم بجزيل شكري وتقديري الى مشرفتي الاستاذ الدكتورة ياسمين خضير خلف الغانمي لما ابدته من جهود علمية واراء سديدة أغنت البحث ليظهر بالصورة الحالية.

كما اقدم شكري وامتناني الى رئاسة قسم علوم الحياة والمدرس سرمد مهدي كاظم والسيد رئيس قسم شؤون الديوان المدرس المساعد محمود شاكر هاشم لما قدموا من المساعدة والدعم. واتقدم بالشكر والعرفان لأختي المدرس المساعد علياء نعمه نجم لما قدمت لي من الدعم والمساعدة.

والشكر كل الشكر لأفراد أسرتي الذين ساندوني وشجعوني دائما لأصل الى ما انا عليه الان.

كوثر

## قائمة المحتويات

رقم الصفحة	الموضوع
iii	قائمة المحتويات
iii	قائمة الجداول
iii	قائمة الاشكال والصور
iii	قائمة المصطلحات
iii	قائمة المختصرات
xv	الخلاصة
1	الفصل الاول : المقدمة
1	1.1. المقدمة
3	2.1. هدف من الدراسة
5	2. الفصل الثاني : استعراض المراجع
5	1.2. سرطان القولون
6	2.2. العكبر وسرطان
8	3.2. التخليق الاخضر
9	4.2. منتجات الايض الثانوية والنباتات الطبية
10	5.2. النحل
10	6.2. تصنيف النحل الكرنولي
11	7.2. العكبر propolis
12	8.2. استخدامات العكبر الطبية
13	9.2. الخواص الفيزيائية للعكبر
15	10.2. الخواص الكيميائية للعكبر
16	11.2. الخواص الحيوية للعكبر
17	1.11.2. صحة الجلد والتجميل

18	2.11.2. طب الاسنان والتعقيم
18	3.11.2. مضاد التهاب
19	4.11.2. التأثيرات المناعية للعكبر
19	5.11.2. مضاد للبكتيريا
20	6.11.2. مضاد للفطريات
21	7.11.2. مضاد للأكسدة
21	8.11.2. مضاد للفايروسات
21	9.11.2. مضاد لمرض السكري
<b>22</b>	<b>3. الفصل الثالث: المواد وطرائق العمل</b>
22	1.3. المواد والاجهزة المستعملة
22	1.1.3. الاجهزة المستعملة
24	2.1.3. المواد الكيميائية
27	2.3. طرائق العمل
27	1.2.3. الكشف الكيميائي (الاستدلالي) للمركبات الموجودة في مستخلص العكبر الخام
27	1.1.2.3. تقدير الفلوريدات الكلية
28	2.1.2.3. تقدير الكلايكوسيدات الكلية
28	3.1.2.3. تقدير محتوى الفينولات الكلي
29	4.1.2.3. تقدير المحتوى الكلي للفلافون
29	5.1.2.3. تقدير المحتوى الكلي للتانين (الدباغيات)
30	6.1.2.3. إجمالي محتوى الصابونين
31	3.3. تحضير مستخلص العكبر الايثانولي
31	1.3.3. تحضير المحلول المائي لنترات الفضة
32	2.3.3. تحضير تراكيز مختلفة من العكبر
32	3.3.3. تحضير جسيمات الفضة النانوية
32	4.3.3. تقدير تراكيز جسيمات الفضة النانوية المحضرة لمحاليل جسيمات الفضة

	النانوية بالتخليق الاخضر
33	5.3.3. تنقية دقائق الفضة النانوية
33	4.3. تشخيص دقائق الفضة النانوية المحضرة
33	1.4.3. جهاز مقياس الامتصاص الذري الطيفي
33	2.4.3. التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء
34	3.4.3. مجهر القوة الذرية
34	5.3. المحاليل الخاصة بالزراعة النسجية
34	1.5.3. المضادات الحيوية
34	2.5.3. ببيكاربونات الصوديوم
34	3.5.3. المصل البقري الجنيني
34	4.5.3. الوسط الزراعي RPMI – 1640
35	5.5.3. محلول دارى الفوسفات الملحي
35	6.5.3. التربسين
35	7.5.3. الوسط الزراعي الخالي من المصل
35	8.5.3. تحضير صبغة (MTT) Methyl Thiazolyl Tetrazolium
36	6.3. الخط الخلوي السرطاني البشري SW480
36	1.6.3. خط الخلية والادامة
36	2.6.3. إذابة الخلايا
37	3.6.3. الحصاد وزراعة ثانوية لخط خلايا (SW480)
37	4.6.3. تجميد خط الخلية
38	5.6.3. إعداد الوسط الزراعي
39	6.6.3. وسط التجميد
39	7.3. التجارب
40	8.3. فحوصات السمية الخلوية
40	1.8.3. فحص MTT
40	1.1.8.3. المبدأ

41	2.1.8.3. طريقة العمل
42	2.8.3. فحص الكريستال البنفسجي لعد الخلايا وبقائها
42	9.3. اختبار المذنب
43	1.9.3. تحضير المحاليل
44	2.9.3. طريقة العمل
45	10.3. التحليل الاحصائي
46	4. الفصل الرابع: النتائج
46	1.4. الكشف الكيميائي للمركبات الموجودة في العكبر الخام HPLC
46	2.4. التخليق الحيوي لدقائق الفضة النانوية
48	3.4. تشخيص وتوصيف دقائق العكبر النانوية المحضرة بالتخليق الحيوي
48	1.3.4. جهاز مقياس الامتصاص الذري الطيفي (AAS)
49	2.3.4. التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء
50	3.3.4. الفحص بواسطة مجهر القوة الذرية
52	4.4. التأثيرات السمية لمستخلصات العكبر في خط خلايا سرطان القولون (SW480)
52	5.4. تأثير مستخلص العكبر الايثانولي في خط خلايا سرطان القولون (SW480)
57	6.4. تأثير مستخلص العكبر النانوي في خط خلايا سرطان القولون (SW480)
60	7.4. تأثير المستخلص العكبر الايثانولي على نسبة تحطم DNA
64	8.4. تأثير المستخلص العكبر النانوي على نسبة تحطم DNA
68	5. الفصل الخامس: المناقشة
68	1.5. التأثير السمي لمستخلص العكبر الايثانولي في خط خلايا سرطان القولون (SW480)
70	2.5. تأثير مستخلص العكبر النانوي في خط خلايا سرطان القولون (SW480)
71	3.5. تأثير مستخلص العكبر الايثانولي التثبيطي على نسبة تحطم DNA في خط خلايا سرطان القولون (SW480)
73	4.5. تأثير مستخلص العكبر النانوي التثبيطي على نسبة تحطم DNA في خط

	خلايا سرطان القولون (SW480)
74	5.5. المحتوى الكيميائي للعكبر
75	6.5. التخليق الحيوي لدقائق الفضة النانوية
77	7.5. التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء لمستخلصات العكبر
78	8.5. مجهر القوة الذرية
80	الاستنتاجات
81	التوصيات
82	المصادر العربية
83	المصادر الانكليزية
i-iii	الخلاصة باللغة الانكليزية

## قائمة الجداول

رقم الصفحة	موضوع
22	جدول (1-3) الاجهزة المستعملة
24	جدول (2-3) المواد الكيميائية
46	جدول (1-4) الكشف الكيميائي للمركبات الموجودة في العكبر الخام
60	جدول (2-4) تأثير مستخلص العكبر الايثانولي على نسبة تحطم الـ DNA
64	جدول (3-4) تأثير مستخلص العكبر الايثانولي على نسبة تحطم الـ DNA

## قائمة الأشكال

رقم الصفحة	المحتويات
11	شكل(2-1) النحل الكرنبولي
16	شكل(2-2) بعض الانشطة الحيوية للعكبر
19	شكل(3-2) التأثيرات المناعية للعكبر
26	شكل(1-3) تصميم التجربة
47	الشكل(1-4) الفرق في اللون بين نترات الفضة والمستخلص الايثانولي والمستخلص النانوي
47	الشكل(2-4) التراكيز الاربعة للمستخلص النانوي بعد مرور 120 ساعة
48	شكل(3-4) التخليق الحيوي لدقائق الفضة النانوية باستعمال المستخلص الايثانولي للعكبر (Propolis)
49	الشكل(4-4) المنحنى القياسي لتركيز محاليل نترات الفضة $AgNO_3$ لتحديد تركيز ايونات الفضة
50	شكل(5-4) التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء Fourier transform infrared للمستخلص الكحولي للعكبر
50	شكل(6-4) التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء Fourier transform infrared لجسيمات الفضة النانوية المحضرة بواسطة المستخلص الكحولي لنبات للعكبر
51	شكل(7-4): (أ) العمود الرقمي لمدى حجم AgNPs. للعكبر
51	(ب) صورة AFM ثنائية الابعاد من AgNPs. للعكبر
51	(ج) صورة AFM ثلاثية الأبعاد من AgNPs. للعكبر.
53	شكل(8-4) تأثير المستخلص الايثانولي للعكبر مقارنة بـ Control على خط خلايا سرطان القولون
53	شكل(9-4) خط خلايا سرطان القولون (SW480) السيطرة (غير المعاملة بالمستخلصات).

54	شكل(10-4) خط خلايا سرطان القولون (SW480) المعاملة بتركيز (31.25 µg/ml).
54	شكل(11-4) خط خلايا سرطان القولون (SW480) المعاملة بتركيز (62.5µg/ml).
55	شكل(12-4) خط خلايا سرطان القولون (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر الايثانولي عند تركيز (125 µg/ml).
55	شكل(13-4) خط خلايا سرطان القولون (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر الايثانولي عند تركيز (250 µg/ml).
56	شكل(14-4) خط خلايا سرطان القولون (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر الايثانولي عند تركيز (500 µg/ml).
56	شكل(15-4) خط خلايا سرطان القولون (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر الايثانولي عند تركيز (1000 µg/ml).
57	شكل(16-4) تأثير المستخلص النانوي للعكبر مقارنة بـ Control على خط خلايا سرطان القولون.
57	شكل(17-4) خط خلايا سرطان القولون (SW480) السيطرة (غير المعاملة بالمستخلصات).
58	شكل(18-4) خط خلايا سرطان القولون (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر النانوي عند تركيز (1%).
58	شكل(19-4) خط خلايا سرطان القولون (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر النانوي عند تركيز (3%).
59	شكل(20-4) خط خلايا سرطان القولون (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر النانوي عند تركيز (5%).
59	شكل(21-4) خط خلايا سرطان القولون (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر النانوي عند تركيز (7%).
61	شكل(22-4) خط خلايا سرطان القولون (SW480) السيطرة (غير المعاملة بالمستخلصات).

61	شكل(4-23) خط خلايا سرطان القولون (SW480) المعاملة بتركيز (31.25 µg/ml).
62	شكل(4-24) خط خلايا سرطان القولون (SW480) المعاملة بتركيز (62.5 µg/ml).
62	شكل(4-25) خط خلايا سرطان القولون (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر الايثانولي عند تركيز (125 µg/ml).
63	شكل(4-26) خط خلايا سرطان القولون (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر الايثانولي عند تركيز (250 µg/ml).
63	شكل(4-27) خط خلايا سرطان القولون (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر الايثانولي عند تركيز (500 µg/ml).
64	شكل(4-28) خط خلايا سرطان القولون (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر الايثانولي عند تركيز (1000 µg/ml).
65	شكل(4-29) خط خلايا سرطان القولون (SW480) السيطرة (غير المعاملة بالمستخلصات).
66	شكل(4-30) خط خلايا سرطان القولون (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر النانوي عند تركيز (1%).
66	شكل(4-31) خط خلايا سرطان القولون (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر النانوي عند تركيز (3%).
67	شكل(4-32) خط خلايا سرطان القولون (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر النانوي عند تركيز (5%).
67	شكل(4-33) خط خلايا سرطان القولون (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر النانوي عند تركيز (7%).

## قائمة المصطلحات

$\alpha$ - naphthylisothiocyanate	تلف الكبد الناجم عن الركود صفراوي
Alternative or Complementary medicine	الطب البديل او الطب المكمل
Anti-bacterial	مضاد للبكتيريا
Anti-diabetic	مضاد لمرض السكري
Anti-fungal	مضاد للفطريات
Anti-inflammatory	مضاد التهاب
anti-oxidant	مضاد للأكسدة
Anti-Viral	مضاد للفايروسات
bee bread	خبز النحل
Bee Glue	غراء النحل
bee pollen	حبوب لقاح النحل
bee venom	سم النحل
bee wax	شمع النحل
Beeswax Acid	حامض شمع العسل
Benign Tumor	الورم الحميد
Bio cosmetics	مستحضرات التجميل الحيوية
Caffeic acid phenethyl ester	حامض الكافيك إستر الفينيثيل
capping agent	مغلف عامل
Chrysin	الكريسين
clotrimazole cream	كريم كلوتريمازول
colon cancer	سرطان القولون
colorectal cancer	سرطان القولون والمستقيم
Dentistry	طب الاسنان

Electron paramagnetic	الرنين المغناطيسي الإلكتروني
Epidemiological data	البيانات الوبائية
Ethanolic Extract of Propolis	المستخلص الإيثانولي للعكبر
Hive Dross	كُدارة خلية النحل
immunosurveillance	المراقبة المناعية
Oncogenes	الجينات الورمية
polyphenols	متعدد الفينول
propolis	العكبر
Propolis Balsam	بلسم العكبر
Propolis Cera wax	شمع العكبر
Propolis Resin	راتنج العكبر
reducing agent	عامل المختزل
royal jelly	غذاء ملكات النحل
Russian Penicillin	البنسلين الروسي
Stabilizer agent	عامل مثبت
suburb	الضاحية او الطرف
Synthetic Beeswax	شمع العسل الاصطناعي
typhoid fever	حمى التيفود

## قائمة المختصرات

المختصر	الاسم الكامل
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
AAS	Atomic Absorption Spectroscopy
FT-IR	Fourier transform infrared spectroscopy
AFM	Atomic Force Microscope
CAPE	Caffeic acid phenethyl ester
EEP	Ethanolic extract of propolis
CRC	Colorectal cancer
FU5	fluorouracil-5
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
BRP	Brazilian red Propolis
CP	3Cisplatin
TPC	Total Phenolic Content
TFC	Total Flavonoid Content
ANIT	$\alpha$ -naphthylisothiocyanate
MTT	Methyl Thiazolyl Tetrazolium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute1640
PBS	Phosphate buffer saline
EDTA	Trypsin- Ethylenediaminetetraacetic acid
SFM	Serum Free Media
FBS	Fetal Bovine Serum
ELISA	ELISA microplate reader
CV	Crystal Violat
OSA	Canine Osteosarcoma Cells

## الخلاصة

اجريت هذه الدراسة لإيجاد العلاقة بين منتج الايض الثانوي العكبر وأخطر الأمراض التي تصيب الإنسان وهو السرطان باستخدام خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480). حيث هدفت الدراسة الى اختبار امكانية التأثير السمي للعكبر العراقي ضد خط خلايا سرطان القولون البشري. أجريت اختبارات الجسيمات النانوية واختبار الـ DNA في مختبرات دائرة البيئة وتكنولوجيا المياه التابعة لوزارة العلوم والتكنولوجيا، بينما أجريت الزراعة النسيجية واختبار السمية الخلوية وعد الخلايا في مركز الزراعة النسيجية Cell culture techniques في كلية الطب/ جامعة بابل امتدت من شهر ايلول (2021) حتى شهر كانون الثاني (2022).

تم الكشف الكيمائي للمركبات الموجودة في العكبر العراقي الخام بمحافظة كربلاء بأختبار High Performance Liquid Chromatography (HPLC) اذ وجد ان العكبر الخام يحتوي على مركبات الايض الثانوي مرتبة من اعلى نسبة الى الاقل (الفينول، الفلويد، الكلايكوسيد، التانين، الفلافون، الصابونين).

تم تحضير المستخلص الكحولي والنانوي للعكبر.

تم قياس الامتصاص الذري الطيفي لدقائق الفضة النانوية المحضرة حسب طريقة (AAS) Atomic Absorption Spectroscopy كانت التراكيز لمستخلص العكبر الايثانولي (1%، 3%، 5%، 7%) وقراءة الجهاز (200، 350، 500، 650) جزء في المليون على التوالي لجسيمات الفضة النانوية لمستخلص العكبر الكحولي.

تم التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء (Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy للمستخلص الايثانولي وقد ظهرت نطاقات امتصاص عند المدى (588، 667، 1634، 1958، 2028) سم<sup>-1</sup>. اما المستخلص النانوي للعكبر ظهرت نطاقات امتصاص عند المدى (588، 667، 1031، 1384، 1634، 1958، 2028، 2925) سم<sup>-1</sup>، تشير النطاقات الاهتزازية الممتدة الى المركبات المسؤولة عن حدوثها وبرزها مجاميع الفلافون وبالتالي يمكن اعتبارها المسؤولة عن التغطية الفعالة وتثبيت AgNPs .

حيث شخصت جسيمات العكبر النانوية بمجهر القوة الذرية (Atomic Force Microscope) بأجسام كروية الشكل بمتوسط حجم (70) نانومتر.

تم التحري عن التأثير السمي الخلوي والسمي الجيني للمستخلص الكحولي للعكبر ضد خط خلايا سرطان القولون البشري لفترة (24) ساعة من التعريض عند مستوى معنوية ( $p < 0.05$ ) باستعمال ستة تراكيز متسلسلة للمستخلص الايثانولي هي (31.25، 62.5، 125، 250، 500، 1000)  $\mu\text{g/ml}$  فكانت نسب التثبيط عالية مع نقصان كبير في عدد الخلايا السرطانية ونسب عالية لتحطم DNA باستعمال اختبار المذنب Comet assay، ووصل اعلى تثبيط عند تركيز 500، 1000  $\mu\text{g/ml}$ ، ازدادت السمية الخلوية والجينية بزيادة التركيز.

تم التحري عن التأثير السمي الخلوي والسمي الجيني للمستخلص النانوي ضد خط خلايا سرطان القولون البشري لمدة زمنية من التعريض (24) ساعة عند مستوى معنوية ( $p < 0.05$ ) باستعمال اربعة تراكيز متسلسلة للمستخلص النانوي هي (1%، 3%، 5%، 7%)  $\mu\text{g/ml}$  اظهرت النتائج ارتفاع نسب تثبيط الخلايا السرطانية مع نقصان كبير جداً في عدد الخلايا السرطانية ونسب تحطم DNA عالية جداً، بحيث اعلى نسبة تثبيط عند تركيز (5%، 7%)  $\mu\text{g/ml}$ ، وكان المستخلص النانوي بتركيز (1%) اعلى تأثيراً من تركيز (1000)  $\mu\text{g/ml}$  للمستخلص الكحولي، ازدادت السمية الخلوية والجينية بزيادة التركيز.

# **Chapter One: Introduction**

## 1. المقدمة

السرطان Cancer مرض خبيث يصيب خلايا وانسجة واعضاء الجسم ويسبب اختلال في وظائفها يتمثل بكتله من نسيج شاذ يتولد عن طفرات في الجينات الخلوية المتحكمة بنمو الخلايا وتسبب موتها يطلق عليها الجينات الطافرة او الورمية Oncogenes اول من اطلق اسم السرطان على الاورام الخبيثة في الجسم هو ابو القاسم خلف بن عباس الزهاوي (936-1013) مصطلح السرطان يستخدم لوصف انواع متعددة من الاورام الخبيثة ( Tumor, Malignant, Neoplasm) تتميز الاورام الخبيثة بقابليتها على الانتشار وغزو الخلايا والانسجة الطبيعية وتحطيم الخلايا الطبيعية ولها قابلية الانتشار بطاقة غير محدودة الى اجزاء اخرى من الجسم ولا تتوقف بانقطاع العوامل المسببة والمحفزة لنموها على العكس من الورم الحميد (Benign Tumor) الذي لا ينتشر الى اجزاء اخرى من الجسم (الموصلي, 2013). قد يصيب أي عضو من اعضاء جسم الانسان، تختلف جميعها اختلافاً كبيراً في طبيعتها وكيفية نشأتها وطرق انتشارها ونموها وكذلك في تشخيصها وطرق علاجها (الابرص, 2020).

يعد السرطان من بين الأسباب الرئيسية للمرض والوفيات في جميع أنحاء العالم حيث بلغ اجمالي حالات الاصابة في العالم (1931590) حالة، بنسبة (10%) والوفيات (935173) حالة، بنسبة (9.4%) لسنة 2020 (WHO,2020)

اما إجمالي حالات الاصابة بمرض السرطان في العراق قد بلغت (29023) و (31502) لسنتي 2017 و 2018 على التوالي اما وفيات الامراض السرطانية قد بلغت (7145) و (10293) لسنتي 2017 و 2018 على التوالي (MOH, 2020). مع زيادة معدل الإصابة بالسرطان في جميع أنحاء العالم لا تزال هناك حاجة حقيقية للاهتمام بتطوير عقاقير جديدة فعالة وتصميم علاجات مركبة ذات تأثيرات جانبية قليلة أو معدومة توفرها المواد الكيميائية النباتية التقليدية في الوقاية والعلاج الكيميائي ضد السرطان تتميز بقدرتها على بدء الموت المبرمج وتوقف دورة الخلية في الخلايا السرطانية (Vit et al., 2015) (مسعود, 2021) (Fridlender et al., 2015).

لذلك اتجه الباحثون الى طرق علاجية بديلة باستخدام المنتجات الطبيعية التي تحتوي على الكثير من المركبات الكيميائية ذات الفعالية العالية في علاج السرطان ولزيادة فعالية الجهاز

المناعي للمريض لمقاومة الامراض ولأنها تسبب آثارًا جانبية أقل من الأدوية العلاجية الكيميائية (Toreti et al., 2013) (Koosha et al., 2016) (Wargo et al., 2016) (Betancourt et al., 2015).

تلعب المركبات الايضية الثانوية للنبات دور لما تمتلكه من خصائص علاجية للسرطان عن طريق تأثيره على قتل أو ايقاف الخلايا السرطانية (Hakeemullah et al., 2020) يعد العكبر مادة طبيعية ذات مصدر نباتي مفيد جدًا في دراسات الطب البديل او الطب المكمل Alternative or Complementary medicine والطب الشعبي منذ القرن التاسع عشر (Czyszewska et al., ) (Olczyk et al., 2013) (Shubharani et al., 2014) (2016). وطب الأسنان والصيدلة، لاحتوائه على مجموعة واسعة من المركبات التي لها العديد من الأنشطة الحيوية (Berretta et al., 2020) (Stojanović et al., 2020).

يمتاز العكبر بقابليته الكبيرة على تثبيط الأورام السرطانية لاحتوائه على المركبات النشطة مثل حامض الكافيك إستر الفينيثيل (CAPE) Caffeic acid phenethyl ester وهو مركب حيوي يتميز بقدرته على بدء تحفيز مسارات عملية موت الخلايا المبرمج وتأثيرها على تكاثر الخلايا السرطانية، اما الكريسين Chrysin هو مادة فلاونويد ذات أهمية لتحديد الإشارة الجزيئية المتعلقة بالسرطان، نظرًا لأن الخلايا السرطانية تطور مقاومتها للأدوية المتعددة أثناء العلاج الكيميائي فالعكبر مركباته تعد علاجات بديلة للمواد الكيميائية المستخدمة في علاج السرطان (Sawicka et al., 2012) (Vit et al., 2015). لقد ثبت أن مكوناته سامة للخلايا السرطانية وتحفز موت الخلايا المبرمج في وقد تم العثور على مكونات أخرى للعكبر قادرة على منع تلف الخلايا السليمة وعدم حدوث الطفرات فيها أي تأثيرات وقائية للخلايا السليمة وإظهار خصائص مضادة للأكسدة والبكتيريا والالتهابات (Campoccia et al., 2021).

يمتاز العكبر بأحتوائه على اعلى مصدر للفينولات النباتية، الفلافونويد والأحماض الفينولية إذ تدعم الدراسات الوبائية Epidemiological data مفهوم أن الفينول ومتعدد الفينول في النظام الغذائي آمنة وغير سامة ولها آثار مفيدة طويلة الأمد على صحة الإنسان. يمتلك المستخلص الإيثانولي للعكبر ومادة متعدد الفينول polyphenols الموجودة فيه تأثيرات مناعية، وقائية، كيميائية ومضادة للأورام. إن تحفيز الموت المبرمج المرتبطة بعامل نخر الورم ( TRAIL /

(APO2L) هو عامل مضاد للسرطان ويؤدي بشكل انتقائي إلى موت الخلايا المبرمج للخلايا السرطانية وليس سامًا للخلايا السليمة. يلعب عامل نخر الورم دورًا مهمًا في المراقبة المناعية immune surveillance والدفاع ضد الخلايا السرطانية. ومع ذلك، نظرًا لمقاومة الخلايا السرطانية للموت المبرمج Apoptosis بواسطة عامل نخر الورم فمن المهم تطوير استراتيجيات جديدة للتغلب على هذه المقاومة. منها دور Ethanolic extract of propolis (EEP) ومتعدد الفينول polyphenols المعزول من العكبر انه يزيد موت الخلايا المبرمج للخلايا السرطانية الذي يسببه عامل نخر الورم (Szliszka & Krol, 2013).

يعد إدراج العكبر في الجسيمات النانوية وأفلام البوليمرات الحيوية ومصفوفة السكروز واعدًا أيضًا، على الرغم من الاختلافات في التركيب الكيميائي للعكبر من جميع أنحاء العالم، فإن جميعها تظهر نشاطًا مضادًا للأكسدة ودوائية مما يجعله منتجاً طبيعياً جذاباً يتم تضمينه في الأطعمة كمكون وظيفي (Irigoiti et al., 2021).

## 2.1. هدف الدراسة:

محاولة ايجاد بدائل طبيعية تستخدم في علاج الامراض السرطانية من خلال اختبار السمية الخلوية والجينية لمستخلصي العكبر ضد خلايا سرطان القولون البشري (SW480).

1. اجراء اختبار HPLC للعكبر الخام لمعرفة التركيب الكيميائي له.
2. تحضير المستخلص الايثانولي للعكبر وعمل 6 تراكيز متسلسلة لمعرفة تأثير التركيز.
3. تحضير مستخلص العكبر النانوي بطريقة التخليق الاخضر Green synthesis وعمل 4 تراكيز.
4. التأكد من تحول مستخلص العكبر الايثانولي الى مستخلص نانوي من خلال اجراء عدة اختبارات.

- استعمال جهاز الامتصاص الذري الطيفي
- التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء
- الفحص بواسطة مجهر القوة الذرية

5. تحضير خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480).
6. تعريض الخلايا السرطانية للتراكيز المحضرة من المستخلصين.

7. اجراء اختبار السمية الخلوية MTT
8. اجراء اختبار CV لعد الخلايا وبقاءها
9. اجراء اختبار المذنب Comet assay لمعرفة نسب تحطم الـ DNA بسبب تأثير المستخلصين الايثانولي والنانوي.

## 2. استعراض المراجع

### 1.2. سرطان القولون

سرطان القولون والمستقيم ثالث اكثر الامراض شيوعاً في العالم حيث بلغت في عام 2020 (1.93 مليون حالة) وثاني احد اكثر الوفيات شيوعاً في العالم حيث بلغت (935.000 حالة وفاة) (WHO,2020).

يشير سرطان القولون colon cancer والمستقيم عموماً إلى جميع الأورام الخبيثة التي تحدث في القولون والمستقيم (Shanmugam & Gurusamy, 2016). وثالث أكثر أنواع السرطانات شيوعاً في العالم عند كلا الجنسين بعد سرطان الرئة عند الرجال وسرطان الثدي والرئة عند النساء وكذلك السرطان الثالث القاتل من بين كل انواع الاورام الخبيثة (Engin, 2015) (Koosha et al., 2016) (al., 2017). حيث يتسبب في وفاة الآلاف سنوياً على الرغم من أن العلاج الكيميائي معروف بأنه علاج فعال لمكافحة سرطان القولون إلا أنه ينتج عنه آثار جانبية شديدة (Koosha et al., 2016). في السنوات الاخيرة وبعد اكتشاف العوامل المؤهبة المهمة وتجنبها لاتزال نسبة حدوث سرطان القولون ثابتة وفي تزايد في كثير من مناطق العالم (الابرص, 2020).

يبدأ سرطان القولون عندما تنحرف عملية الاستبدال الطبيعي للخلايا المبطنة حيث تحدث أخطاء في انقسام الخلايا المخاطية بشكل متكرر لأسباب غير مفهومة جيداً تخرج من أنظمة الاصلاح الخاصة بنا، تبدأ هذه الخلايا بالانقسام بشكل غير طبيعي وبدون تحكم تؤدي إلى نمو داخل القولون يسمى الاورام الحميدة. تختلف الاورام الحميدة من حيث النوع ولكن العديد منها عبارة سلائف لحالات سرطانية تنمو ببطء على مدار سنوات ولا تنتشر الأورام الحميدة الى موضع اخر، تؤدي الطفرات الجينية الإضافية إلى زعزعة استقرار الخلايا ويمكن أن تجعل الخلايا أكثر غرابة عندما تغير هذه الأورام السرطانية اتجاهها (تنمو من خلال الأنبوب بدلاً من منتصفه) وتغزو طبقات أخرى من الأمعاء الغليظة (مثل الطبقة تحت المخاطية أو الطبقة العضلية) فتتكون الزائدة السرطانية في معظم الحالات تكون هذه العملية بطيئة وتستغرق ما لا يقل عن 8 إلى 10 سنوات لتتطور من تلك الخلايا الشاذة المبكرة إلى سرطان صريح (Herbst, 2015).

يرتبط خطر الإصابة بهذا السرطان بالعادات الغذائية السيئة والتدخين والأمراض الالتهابية المعوية والأورام الحميدة والعوامل الوراثية والشيخوخة (Granados-Romero et al., 2017). وانخفاض ممارسة التمارين البدنية والسمنة (Koc et al., 2019).

السرطان بشكل عام وسرطان القولون والمستقيم بشكل خاص مرض معقد للغاية يجب علاجه ليس فقط بسبب قدرته على عدم تمييزه من قبل الجهاز المناعي ولكن أيضاً بسبب قدرته على الخلود والاستمرار في الانقسام إلى ما لا نهاية، يتوفر عدد من العلاجات لمرضى السرطان بما في ذلك أولئك المصابون بسرطان القولون والمستقيم حسب مرحلة السرطان ودرجة المضاعفات كل العلاجات لها معدل نجاح خاص بها وقيودها، تعتمد فعالية العلاج على معدل بقاء المرضى على قيد الحياة ومستوى التكرار (Mishra et al., 2013).

إن التشخيص المبكر لسرطان القولون عن طريق طرق الفحص والتقنيات الجراحية الجديدة سيؤدي إلى نتائج أفضل في معدلات البقاء على قيد الحياة (Koc et al., 2019).

تشمل العلاجات الرئيسية لسرطانات القولون والمستقيم في مراحله المتقدمة العلاج الكيميائي والعلاج الإشعاعي والعلاج الموجه والجراحي (Shanmugam & Gurusamy, 2016). بالإضافة إلى العلاج المناعي والعلاج بالمكملات الغذائية على الرغم من وجود العديد من الخيارات المتاحة لعلاج هذا السرطان إلا أن معدلات النجاح ليست مشجعة للغاية عند استخدامها وحدها حيث تظهر المضاعفات الثانوية في جميع هذه العلاجات تقريباً لتعظيم الآثار العلاجية في المرضى تعد الأساليب التجميعة ضرورية (Mishra et al., 2013).

## 2.2. العكبر والسرطان

تمنع المركبات الموجودة في العكبر مسارات إشارات متعددة ضرورية لبدء السرطان وتطوره ومسارات موت الخلايا المبرمج الداخلية والخارجية من خلال المسارات المذكورة أعلاه يمكن أن يؤدي العكبر إلى موت الخلايا المبرمج وتوقف دورة الخلية وتقليل تكاثر الخلايا السرطانية وقابليتها للحياة والغزو والهجرة والمقاومة الكيميائية للخلايا السرطانية (Forma & Bryś, 2021) أظهر العكبر الذي تم جمعه من منطقة Varjavi في مقاطعة Maragheh بإيران تأثيراته المضادة للسرطان وإمكانية استخدامه كمكمل دوائي جديد لقتل خلايا سرطان القولون والمستقيم (CRC)

Okinawan عكبر أوكيناوان (Azarshinfam et al., 2021) Colorectal cancer Propolis ومكونه الرئيس nymphaeol-A مفيدة لمنع تكون الأوعية الدموية التي يسببها الورم السرطاني ويحفز موت الخلايا المبرمج (Tsuchiya et al., 2013).

تعد السمية الخلوية نشاطاً حيوياً شائعاً جداً للعكبر وبالتالي فهي مؤهلة كطريقة مفيدة في البحث عن مكونات العكبر ذات الإمكانيات المضادة للأورام (Fernandes-Silva et al., 2013). وتمت الإشارة الى العكبر المنتج من خمسة أنواع من النحل غير اللاسع موطنها إندونيسيا لها نشاط ملحوظ كمضاد سام ضد خمس انواع من الخلايا السرطانية البشرية HepG2، SW620، KATO-III، ChaGo-I و BT474 (Kustiawan et al., 2014).

تم استكشاف النشاط المضاد للسرطان للمستخلص الإيثانولي للعكبر (EEP) بتراكيز مختلفة من خلال اختبار التأثير السام للخلايا والمبرمج في خطوط الخلايا السرطانية المختلفة وهي سرطان الثدي البشري (MCF-7) وسرطان القولون البشري (HT-29) وسرطان القولون والمستقيم البشري الظهاري (Caco-2) والورم الميلانيني للفئران (B16F1) (Choudhari et al., 2013). كما ظهر للعكبر خصائص مضادة للسرطان مرتبطة بالنشاط التآزري لمكوناته الرئيسية وتتمثل في خليط متعدد الفينول باعتباره المحفز الأكثر فاعلية لموت الخلايا المبرمج في كل من المسار الداخلي والخارجي لخط الخلايا السرطانية الحرشفية للسان الإنسان (CAL-27) (Czyzewska et al., 2016).

يمكن أن ينتج العكبر البرازيلي الاحمر العديد من الأنشطة السامة للخلايا ضد خطوط الخلايا السرطانية القولونية كما أظهرت النتائج أنه يزيد من كفاءة فلورويوراسيل (FU5) 5-fluorouracil ويمكن أن يؤخذ في الاعتبار كعلاج مساعد لسرطان القولون والمستقيم (CRC) (Santos et al., 2019).

كما يمنع العكبر انتقال الظهارة الليمفاوية Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) لخلايا سرطان البنكرياس البشرية (PANC-1) لوجود مادة Caffeic acid phenethyl ester فيه (Chen et al., 2013).

أظهر العكبر تأثيراً ساماً للخلايا على خطوط خلايا سرطان الثدي عن طريق إحداث موت الخلايا المبرمج وزيادة في توقف دورة الخلية G2/M وكذلك تأخير قدرة الغزو للخلايا مما يجعله

مركبًا قويًا مضادًا للأورام مفيديًا في الوقاية الكيميائية أو العلاج من السرطان ( UĞURLU, 2013).

### 3.2. التخليق الأخضر

اجتذبت جسيمات الفضة النانوية في السنوات الاخيرة الكثير من الاهتمام لتطبيقاتها الواعدة في الكثير من المجالات مثل تطبيقات الطب الحيوي وأجهزة الاستشعار الحيوية والحماية من مضادات الميكروبات والحفز والالكترونيات وتخزين الطاقة وتوصيل الادوية والجينات. تعد جسيمات الفضة النانوية الان حلاً قابلاً للتطبيق بديلاً للمضادات الحيوية أو للإنتاج فهذه جديدة من المضادات لحل مشكلة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية (العبدلي, 2020).

يتميز نهج التخليق الحيوي لجسيمات عكبر الفضة النانوية AgNPs بالعديد من المزايا مثل توسيع النطاق العملية والجدوى الاقتصادية والطريقة الآمنة لإنتاج الجسيمات النانوية ويمكن استخدام AgNPs الحيوي كعامل علاجي لعلاج العديد من الأمراض المروعة للبشر (Priyadarshini et al., 2018).

مستخلص العكبر العراقي لجزيئات الفضة النانوية التي تحتوي على مكونات كيميائية تعمل كمعدلات للمناعة عن طريق زيادة نشاط الخلايا البلعمية لابتلاع البكتيريا (Taqi et al., 2020). اثبت ايضا ان منتج عكبر النحل البرازيلي الأحمر (BRP) Brazilian red Propolis المخلوق حيويًا بواسطة جسيمات الذهب النانوية يظهر أنشطة مضادة للالتهابات والأورام والأكسدة وميكروبات الامراض المعدية وكذلك يمتلك أعلى تأثير سام للخلايا السرطانية في المختبر (Botteon et al., 2021). كذلك كان تأثير العكبر النانوي المغلف بالكيوتوزان أكثر فعالية من العكبر بجرعة 30 ملغم/ كغم من وزن الجسم عن طريق الفم على تحسين الآثار الجانبية السلبية للسيسبلاتين (CP) 3Cisplatin وهو دواء يستخدم على نطاق واسع في علاج السرطان ويمتلك القدرة على تخفيف الآثار السلبية للشلل الدماغى (فقدان الشهية وفقدان الوزن والأضرار التأكسدية وموت الخلايا المبرمج) مع التغلب على الآثار الجانبية الخطيرة مثل تلف الكبد والكلى في الفئران (Seven et al., 2020).

تم اختبار النشاط المضاد للبكتيريا لجزيئات العكبر النانوي في حدود (80-150) نانومتر ضد الإشريكية القولونية (*E. coli*) والمكورات العنقودية الذهبية (*S. aureus*) وضد خطوط الخلايا السرطانية MCF-7 و PC3 و A375 و PANC-1 وتبين من خلال النتائج قدرته الكبيرة كمضاد للجراثيم وقتل الخلايا السرطانية (Jayakumar et al., 2012).

## 4.2. منتجات الايض الثانوية والنباتات الطبية

التأثيرات الواسعة والمتنوعة للنباتات الطبية تعتمد أساساً على مكوناتها الكيميائية النباتية بشكل عام إذ تنقسم المكونات الكيميائية النباتية للنباتات إلى فئتين بناءً على دورها في عمليات التمثيل الغذائي الأساسية، الى منتجات الايض الأولية والثانوية، تشارك منتجات أيض النبات الأولية في وظائف الحياة الأساسية لذلك فهي متشابهة إلى حد ما في جميع الخلايا الحية. اما منتجات الايض النباتية الثانوية هي نتاج مسارات فرعية، تمارس منتجات الايض الثانوية النباتية عملها على أهداف جزيئية تختلف من حالة إلى أخرى قد تكون هذه الأهداف عبارة عن إنزيمات أو عوامل نسخ أو حتى أحماض نووية (Hussein & El-Anssary, 2018).

تكتسب منتجات النحل مثل العسل honey وحبوب لقاح النحل pollen bee وخبز النحل bee bread وغذاء ملكات النحل royal jelly والعكبر propolis أهمية كغذاء وظيفي بخصائصها المغذية التي تساعد في حماية الصحة (Yucel et al., 2017)(Giri, 2018) وكذلك شمع النحل bee wax، وسم النحل bee venom. كما أن الآثار الجانبية المنخفضة له وزيادة الامتثال في ظل ندرة العوامل العلاجية الجديدة الفعالة وجدت الصناعة الدوائية مصدراً جديداً للمركبات العلاجية في المنتجات الطبيعية والأدوية العشبية لمعالجة المشكلات الصحية الحالية لدى الإنسان والحيوان وما هو واعد بشكل خاص بشأن هذه العوامل هو أنها تنتج آثاراً جانبية قليلة وتكون أكثر فعالية من حيث التكلفة من المركبات الاصطناعية. وهذا يعني توافراً أكبر لهذه العلاجات خاصة في البلدان الأقل تقدماً التي لا تستطيع تحمل تكاليف العلاجات باهظة الثمن. وبالتالي تحقيق أقصى قدر من التأثير العلاجي دون آثار جانبية. من بين المنتجات الطبيعية الأكثر استخداماً في الوقت الحاضر هو العكبر (Betancourt et al., 2015) Perchyonok, (2018).

## 5.2. النحل

هي تلك الحشرة ذات الفوائد العظيمة، حشرة اجتماعية تعيش في مجتمعات كبيرة في خلايا (لويريش, 2018). فقد كان الإغريق والرومان والمصريون القدماء على دراية بخصائص العكبر العلاجية واستخدموه على نطاق واسع كدواء (Kuropatnicki et al., 2013) (Więckiewicz et al., 2013). استخدم البشر قديماً منتج النحل الثانوي العكبر من أجل الصحة فقد عُرف بخصائصه المطهرة، يستخدمه النحل لتعقيم الخلية بشكل فعال وسد الشقوق والفجوات الصغيرة في الخلية وبنائها كذلك لحماية الخلية وتحنيط الحيوانات الصغيرة التي تموت في الخلية، كما استخدمه المصريون في التحنيط وحمل الجنود اليونانيون والرومان العكبر في ساحة المعركة للحد من العدوى (Morphology, 2018) (مسعود, 2021) (Alfahdawi, 2017) (Bankova et al., 2014). ولإصلاح وتنعيم الجدران الداخلية للخلية وكحاجز وقائي ضد الغزاة الخارجيين مثل الثعابين والسحالي وما إلى ذلك أو ضد تهديدات العوامل الجوية مثل الرياح والمطر وذلك لطبيعته الشمعية وخصائصه الميكانيكية (Wagh, 2013) (Giri, 2018). يتم جمعه من قبل نحل العسل أو العاملات التي وظيفتها البناء والترميم وحماية الخلية من براعم النباتات وقلف الأشجار مع إضافة افرازات لعابية وشمعية مع انزيمات ومواد راتنجية (Alfahdawi, 2018) (Tsuchiya et al., 2013) (Alfahdawi, 2017).

التغذية القسرية بالعكبر للنحل العامل، كمواد مضافه إلى النظام الغذائي لمدة قصيرة من الزمن تعدل حالة وظائف الاعضاء للنحل من خلال التأثير على الأجسام الدهنية والغدد البلعومية (Damiani et al., 2017).

## 6.2. تصنيف النحل الكرنولي

Kingdom: Animala المملكة الحيوانية

Phylum: Arthropoda مفصليّة الارجل

Class: Insecta الحشرات

Order: Hymenoptera غشائية الاجنحة



شكل (2-1) النحل الكرنيولي (خطاب & نوار, 2012)

## 7.2. العكبر propolis

الاسماء الشائعة للعكبر Propolis، Propóleo، غراء النحل Bee Glue (Sardana et al., 2013)(Al-hariri, 2014)(Al-Fahdawi, 2015)(Bankova et al., 2016)، عكبر النحل Bee Propolis، حامض شمع العسل Beeswax Acid، شمع العسل الاصطناعي Synthetic Beeswax، كُدارة خلية النحل Hive Dross، راتنج العكبر Propolis Resin، بلسم العكبر Propolis Balsam، البنسلين الروسي Russian Penicillin، شمع العكبر Propolis Cera wax (Alfahdawi, 2018).

تشتق Propolis من كلمة يونانية تعني الضاحية او الطرف suburb سميت بذلك لان من طبيعة النحل ان يصنع مدخل صغير يؤدي الى مدينة النحل او مملكته (لويريش, 2018). او انها وبنفس اللغة ايضا pro تعني في المقدمة ، polis تعني المدينة. وهذا المعنى (أمام المدينة) يناسب بشكل جيد دوره في حماية مستعمرة النحل (Bogdanov, 2016b).

والعكبر هو مركب راتنجي يتم جمعه من قشور الأشجار والبراعم للنباتات الطبيعية الحية المختلفة يخطها النحل العامل بالشمع والإنزيمات، مركبات الفلافونويد والفينولات والأحماض الفينولية وإستراتها وفلافوناتها والأحماض العطرية هي المركبات الرئيسية المسؤولة عن النشاط الحيوي للعكبر (Al-Fahdawi, 2015)(UĞURLU, 2013). ترتبط الخصائص الحيوية هذه بتركيبها الكيميائي وبشكل أكثر تحديداً بالمركبات الفينولية التي تختلف في تركيبها وتركيزها اعتماداً على منطقة الإنتاج والغطاء النباتي في المنطقة وتوافر المصادر لجمع الراتنجات النباتية كذلك التنوع الجيني لمملكة النحل والتقنية المستخدمة في الإنتاج والمناخ والموسم الذي يتم فيه إنتاج العكبر (Suleiman et al., 2021)(Campoccia et al., 2021). يحتوي على مركبات متطايرة بتراكيز منخفضة، لكن رائحته ونشاطها الحيوي الكبير يجعلها مهمة في توصيفه وتحديد أصله النباتي (Bankova et al., 2014).

## 8.2. استخدامات العكبر الطبية

عُرف العكبر على الأقل في 300 قبل الميلاد يستخدم في الطب التقليدي بسبب خصائصه الحيوية وتركيبته الكيميائية المعقدة والغنية للغاية (Wali et al., 2017) (Kuropatnicki et al., 2013)(Conti et al., 2013)(Tsuchiya et al., 2013)(Stojanović et al., 2020)(Wolska et al., 2019). فهو منتج طبيعي ذو إمكانات عالية للاستخدام في الاستهلاك البشري والاستخدامات الطبية (Mărghitaş et al., 2013) (Sardana et al., 2013)(King, 2017) (Alfahdawi, 2017). واستخدام العكبر كمطهر طبيعي وكذلك لاحتضان ببيض البط وكمكمل غذائي له أو أثناء حماية من حمى التيفود typhoid fever وتضميد جروحها علاوة على ذلك فقد ذكر أن العكبر له تأثير مخفض في معدل النفوق في دجاج التسمين وتأثير إيجابي على استهلاك الأعلاف الحية والاستفادة من العلف في الحيوانات وتأثير معوق على انقسام الخلايا البكتيرية ضد مسببات التهاب الضرع في الأبقار ولها تأثير منشط للخلايا البلعمية أثناء العدوى البكتيرية (Giri, 2018).

اقترح العديد من الباحثين استخدام تقنيات التغليف مثل التجفيف بالرش والذي يسمح بتحويل مستخلص العكبر الإيثانولي إلى مسحوق خالٍ من الكحول يسهل التعامل معه ومناسب لإدراجه في أنظمة الغذاء (Irigoiti et al., 2021).

تم تأكيد خصائصه المضادة للبكتيريا والالتهابات والفطريات والمطهرة والمخدرة والعلاجية فقد تم استخدامه بشكل فعال في علاج الأمراض الجلدية والحجارة وأمراض النساء وأمراض الانتكاس العصبي والتئام الجروح وعلاج الحروق والقروح (Kuropatnicki et al., 2013).

وبينت الدراسات السابقة الأرقام التقريبية لمكونات العكبر:

البروتينات: الحد الأقصى 1 غرام / 100 غرام

الكربوهيدرات: الحد الأقصى 1 غرام / 100 غرام

الدهون: الحد الأقصى 1 غرام / 100 غرام

(Bogdanov, 2016a).

في الوقت الحالي، يزداد استخدام العكبر في المستحضرات التي لا تستلزم وصفة طبية، ومستحضرات للتجميل الحيوية Bio cosmetics والأطعمة الوظيفية Functional foods (Bankova et al., 2014)(Kustiawan et al., 2014). وكمكمل طبيعي و آمن عن طريق الفم (Berretta et al., 2020)(King, 2017). يمكن استخدامه في مجال الصناعات الغذائية وتربية الحيوانات ومستحضرات التجميل (El-Guendouz et al., 2019). دور العكبر كعنصر غذائي وظيفي لا يزال هامشياً، قد تكون هذه الحقيقة بسبب الطعم القوي وغير المستساغ والذي يغير بشدة الخصائص الحسية له كمنتج غذائي (من المهم أن نتذكر أن اختيار طعام المستهلك مدفوع أساساً بالمذاق) وبسبب مكوناته المتغيرة والتي يصعب توحيدها واستخلاصها (Irigoit et al., 2021). (Toreti et al., 2013).

## 9.2. الخصائص الفيزيائية للعكبر

المحتوى المتنوع للعكبر مسؤول عن العديد من الخصائص الصحية الثمينة (Więckiewicz et al., 2013)(Šabanović et al., 2019). يختلف تكوين ورائحة ولون العكبر والخصائص الدوائية من خلية إلى أخرى اعتماداً على المصدر النباتي والموسم وأنواع النحل والظروف الجغرافية السائدة في الموقع الذي يجمع منه نحل العسل الراتنج (Wali et al., 2017). يتكون العكبر بصورة عامة من مواد نباتية (50%) والشمع (30%) والزيوت الأساسية

(10%) وحبوب اللقاح (5%)، ومواد أخرى مختلفة (5%) (Giri, 2018). وذكر (خطاب & نوار, 2012) انه يحتوي (55%) راتنجات (10%) زيوت عطرية (5%) شمع (5%) حبوب لقاح.

فالعكبر مادة طبيعية صمغية لزجة القوام مشتقة بشكل أساسي من الأشجار والشجيرات وبراعم الزهور وهي غنية بالشمع وحبوب اللقاح ولعاب النحل (Alfahdawi, 2017).

يوجد العكبر بالوان مختلفة كالأصفر، البني، البني المخضر، البني الداكن، الأخضر، الأحمر، الرمادي والأسود يختلف ملمسها وتركيبها اعتماداً على موقع خلايا النحل والنباتات المحلية (Alfahdawi, 2018)(Righi et al., 2013).

للعكبر رائحة عطرية مريحة واذا تم حرقة اصدر رائحة ممتعة جدا خليط من عدة مواد تشبه الراتنج risin like material ذات مذاق لاذع (Alfahdawi, 2018). لايدوب العكبر بصورة مباشرة في الماء ويدوب جزئياً في الاستون الكحولات، النشادر البترين، الكلوروفورم وثلاثي كلوروايثيلين او مزيج من مختلف هذه المذيبات، ذو قوام متغيره بتغير درجة الحرارة اذا سخن ببطئ في حمام مائي ينقسم الى قسمين طبقة تطفو على السطح وهو الشمع والطبقة الاخرى تسقط الى اسفل الوعاء ذات قوام لزج، صلب ويتفتت عند درجة 15 درجة مئوية، طري وقابل للتشكيل عند حدود درجة حرارة 30 درجة مئوية واذا تم تسخينه على النار لدرجة 45 درجة مئوية يفقد مفعوله العلاجي، وتقل خصائصه العلاجية عند تعرضه للهواء والضوء (Alfahdawi, 2018).

يجب استخلاصه بمذيبات مختلفة لاستخدامه في الفحوصات الحيوية، المذيبات الأكثر استخداماً للاستخلاص هي الإيثانول والميثانول والزيت والماء (Doğan et al., 2020). وأظهرت النتائج أن الماء المستخدم في عملية الاستخراج يستخلص أقل كمية من المركبات الفينولية للعكبر الخام، البروبيلين غليكول المرتبة الوسطى، اما الإيثانول يستخلص أعلى كمية، كما ان (التحريك، درجة الحرارة) تساهم في زيادة محتوى الاستخلاص من المركبات الفينولية (Ramauskiene et al., 2013). أن الإيثانول هو أفضل مذيب استخلاص يستخدم في استخلاص العكبر مقارنة بالماء. وأظهرت النتائج أن المستخلص الإيثانولي ينتج نسبة عالية من محتوى الفينول الكلي Total Phenolic Content (TPC) ومحتوى الفلافونويد الكلي Total Flavonoid Content (TFC) مقارنة بالماء. كما تم إثبات أن الحجم الأكبر من

المذيب لا يؤدي إلى قيم عالية من TPC و TFC والنسبة المثلث التي أنتجت نسبة عالية من الاستخلاص هي 1:10 (Mokhtar, 2019).

## 10.2. الخصائص الكيميائية للعكبر

تم تحديد حوالي 500 مركب للعكبر حتى الآن والتركيب الكيميائي الرئيس الموجود في العكبر هو مركبات الفلافونويد والتربينويد والفينول والإستر إلى جانب ذلك تم تحديد البوليفينول مثل فينيل بروبانويد phenylpropanoids والجالكون chalcone والتربينين terpenenes والكومارين coumarins والأحماض العطرية aromatic acids واستراتها ويعتبر العكبر واحدة من أغنى مصادر مركبات متعدد الفينول والفلافون والأحماض الفينولية ( Wali et al., 2017) (Czyzewska et al., 2016).

اثبتت بعض التجارب ان تخزينه لمدة طويلة لا يؤثر على كمية المركبات الكيميائية المكونه له ولا من فعاليتها المضادة للبكتريا (ربيعي, 2012). يتم تخزين العكبر الخام مجمداً لعدة سنوات في حاوية محكمة الغلق ولكن من الممكن أن تضع بعض الخصائص التأزرية للعكبر أثناء التجفيف بالتجميد. ويعود ذلك لأن العكبر مستقر تماماً. حيث ان العكبر ومستخلصاته تعمل كمادة حافظة معتدلة بسبب أنشطتها المضادة للأكسدة والميكروبات والتي تطيل العمر الافتراضي لبعض المنتجات. فمدة صلاحية المستخلص الإيثانولي للعكبر ثلاث سنوات بعد التعبئة أو المنتج الجاهز اما مخاليط العسل والعكبر سنتان بعد التعبئة (Bogdanov, 2016b).

على الرغم أنه يوفر العديد من الفوائد الطبية والصناعية لا يستعمل كباقي المنتجات الطبيعية لانه مادة صعبة الذوبان ويجب ان يستخلص بطرق علمية تحفظ المواد العلاجية فيه ويجب على المرء أن يتذكر قبل استخدامه أنه قد يؤدي إلى خطر الإصابة بالحساسية (Więckiewicz et al., 2013)(Sardana et al., 2013)(Alfahdawi, 2018). تشير الدراسات السابقة الى احتمال حدوث تفاعل تحسسي أثناء استخدامه، الحساسية من العكبر ليست ظاهرة شائعة ولكن هناك مجموعات أكثر عرضة للتوعية مثل النحاليين وأفراد أسرهم الذين هم أكثر عرضة للتلامس مع العكبر (Basista, 2013). يجب اتخاذ بعض الاحتياطات في حالة وجود مسببات الحساسية المرتبطة بمنتجات النحل وفي إيجاد الجرعة الصحيحة المأخوذة (Pasupuleti et al., 2017). كما أظهر العكبر أيضاً تأثيرات مضادة للحساسية مما يشير إلى إمكانية استخدامه كعامل مساعد في

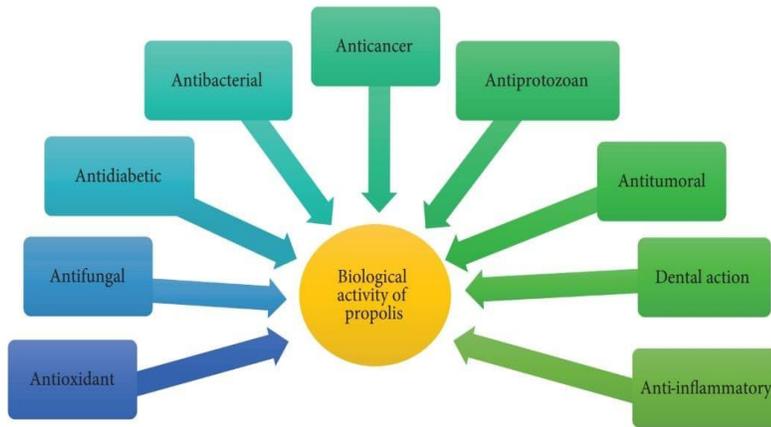
اللقاحات ويحدث هذا التأثير بوجود تراكيز عالية من العكبر أعلى من (300 ملغم/ مل) بينما في التراكيز المنخفضة ينعكس التأثير (Wolska et al., 2019).

تُعزى تأثيرات العكبر في إزالة الجذور الحرة وعوامل الأكسدة إلى المركبات الفينولية الموجودة في العكبر (الفانيليك، الكوماريك، الكافيين، الفيروليك) عند وصولها إلى سطح الجلد وبعد اختراق البشرة والأدمة يمكن أن تساهم في حماية الجلد من التأثير الضار للجذور الحرة تحت الأشعة فوق البنفسجية (Žilius et al., 2013).

ومركبات العكبر لها خصائص وقائية للقلب والأوعية الدموية ومضادات للأكسدة والتصلب والالتهابات ومضادة لتكوّن الأوعية السرطانية (Daleprane & Abdalla, 2013).

## 11.2. الخصائص الحيوية للعكبر

للعكبر نشاط مضادة للالتهابات والميكروبات والأكسدة وقد أكد العلم الحديث انه مضاد للبكتيريا، الفيروسات، الفطريات، الأورام، السمّة ومضاد للحساسية فضلاً عن لخصائصه المناعية (Barud et al., 2013) (Chylińska-Wrzos et al., 2017) (bbasi et al., ) (Šabanović et al., 2019) (Al-Fahdawi, 2015) (Al-hariri, 2014)(2018) (Bankova et al., 2016). وكذلك يستعمل مسكن للألم وقائي للجلد وملين (مسهل) ومضاد لمرض السكر (Wolska et al., 2019) (Więckiewicz et al., 2013).



شكل (2-2) بعض الانشطة الحيوية للعكبر (Pasupuleti et al., 2017)

يستخدم كذلك العكبر على نطاق واسع في علاج نزلات البرد والتسوس وأمراض الروماتيزم وأمراض القلب وعلاج الحروق والجروح ولسعات الصقيع ( Chylińska-Wrzos et al., 2017).

أظهرت المستخلصات المائية والكحولية للعكبر نشاطاً مضاداً للأكسدة وفعالية لمعظم الكائنات الحية الدقيقة وأنه آمن باستخدام فحوصات النواة الصغيرة micronucleus assays في المختبر وفي الجسم الحي كما استخدم لعلاج الجروح ذات الحالات المتدهورة التي لا تلتئم والمزمنة (Kucharzewsk et al., 2013)(Rocha et al., 2013). يظهر المستخلص الايثانولي للعكبر (EEP) خصائص مضادة للبكتيريا والفيروسات ومضاداً ايضاً للفطريات والسرطان (Czyzewska et al., 2016). ويحمي من تلف الكبد الناجم عن الركود الصفراوي (ANIT)  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate في الفئران بشكل أكثر فعالية من فيتامين E ( Nakamura et al., 2013).

## 1.11.2. صحة الجلد والتجميل

أثبت الباحثون البولنديون أن العكبر يحفز تجديد الأنسجة ويعمل كمضاد للأكسدة وله خصائص تحفيز قوية للمناعة ويؤثر على عمر الحيوانات من خلال إطالة اعمارهم ويحسن الوظائف الفكرية والحياتية لكبار السن (Andrzej et al., 2013).

يستفاد منه لعلاج افضل للأمراض وتحسين مستحضرات التجميل ولمكافحة الشيخوخة ( Silva et al., 2020). يعالج مسامير القدم اللحمية وذلك بتسخين قطعة رقيقة منه توضع عليه بواسطة ضماد بسيط وبعد مرور عدة ايام نلاحظ زوال المسمار اللحمي وانقلاعه من جذوره بالكامل (لويريش, 2018). يستخدم العكبر لعلاج وترميم الجروح والانسجة الملوثة بوقت اقل وفعالية اكثر كذلك لعلاج الحروق (Barud et al., 2013) (Bankova et al., 2016). أشارت دراسات الرنين المغناطيسي الإلكتروني Electron paramagnetic وجود تأثير إيجابي قوي للعكبر على محتويات الجذور الحرة في جروح الحروق (Olczyk et al., 2013).

العلاج بمرهم العكبر يزيد من فعالية ضمادات الضغط القصيرة لتقرحات الساق الوريدية المزمنة الصعبة الشفاء (Kucharzewski et al., 2013).

## 2.11.2. طب الاسنان والتعقيم

العكبر هو مادة فعالة تستخدم لعلاج أمراض مختلفة من تجويف الفم والأسنان بفضل ثراء مكوناتها الطبيعية (Abbasi et al., 2018) (Więckiewicz et al., 2013). يستعمل كمطهر للفم من الروائح والتعفن والتسوس يخلط مع الشمع ويمضغ كالعلكة ويبلع شيئاً فشيئاً وهي الطريقة السهلة لاستعماله (Alfahdawi, 2018) (خطاب & نوار, 2012). يساعد على التئام الجروح الجراحية (آلام الفم بعد الجراحة) ويعالج قناة الجذر وحساسية الأسنان (Al-Fahdawi, 2015) (Alfahdawi, 2017).

تم استخدامه للوقاية والعلاج من تسوس الأسنان وأمراض اللثة وإزالة البلاك كذلك لعلاج جذور الأسنان والتقويم (Sardana et al., 2013) (Šabanović et al., 2019) (Skaba et al., 2013). تنظيف الأسنان بمعجون أسنان يحتوي على العكبر فعالاً في الحد من تراكم البلاك وشدة نزيف اللثة (Suriamah et al., 2019).

## 3.11.2. مضاد التهاب

اكتسبت مستخلصات العكبر اهتمام المستهلكين والباحثين نظراً لتركيباتها الكيميائية الفريدة وخصائصها الوظيفية مثل نشاطها المضاد للالتهابات الذي يدعمه وجود الفلافونيدات في العكبر بشكل كبير (Hori et al., 2013) (Machado et al., 2012) (Yuan et al., 2013).

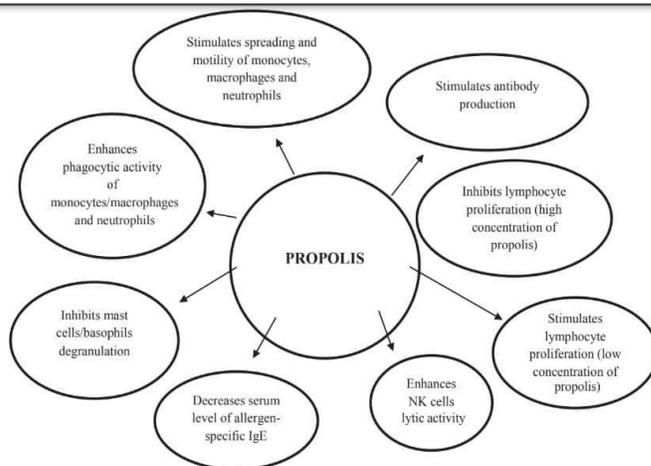
يتم إنتاج العكبر الجغرافي بواسطة نحل أصلي غير لاسع من مادة راتنجية للنباتات مضيئاً التربة أو الطين (Cinegaglia et al., 2013). أظهر المستخلص الكحولي والمائي للعكبر الجغرافي نشاطاً مضاداً لوزمة القدم وأشارت الدراسة انه يحتوي على مواد نشطة بيولوجياً واعدة ذات نشاط مضاد للالتهابات (Franchin et al., 2013).

للعكبر دور مضاد للالتهابات في الفئران من خلال تأثيراته المخففة للربو التحسسي عن طريق إزالة الجذور الحرة (El-Aidy et al., 2015).

## 4.11.2. التأثيرات المناعية للعكبر

أثبت ان للعكبر آثار في تنظيم المناعة وكمضادة للتهاب وتليف الرئة الناجم عن فيروس كورونا فهو يقلل من خطر متلازمة عاصفة السيتوكين cytokine storm وهو عامل رئيس للوفاة في مرض COVID-19 أظهر أيضاً نتائج واعدة كعامل مساعد في علاج العديد من الأمراض المصاحبة التي تشكل خطورة بشكل خاص على مرضى COVID-19 بما في ذلك أمراض الجهاز التنفسي وارتفاع ضغط الدم والسكري والسرطان، لايتفاعل العكبر مع الإنزيمات الرئيسية أو مع إنزيمات الكبد الرئيسية وفقاً للمعايير المعتمدة من قبل منظمة الصحة العالمية لذلك يمكن استخدامه بشكل متزامن مع الأدوية الرئيسية دون التعرض لخطر التقوية أو التثبيط (Berretta et al., 2020).

بالإضافة الى ان العكبر العراقي محفزاً مناعياً يزيد من الالتهام الذاتي للحفاظ على التوازن الخلوي بعد عدوى *Pseudomonas aeruginosa* (Jabir et al., 2017).



شكل (2-3) التأثيرات المناعية للعكبر (Wolska et al., 2019)

## 5.11.2. مضاد للبكتيريا

تعد مستخلصات العكبر من العوامل القوية المضادة للبكتيريا ويمكن استخدامها مع المضادات الحيوية (Okińczyc et al., 2020). يقلل المستخلص الإيثانولي للعكبر البولندي نمو بكتيريا *S. epidermidis* وقدرة تكوين الأغشية الحيوية قد تأثرت بشكل كبير بوقت التعريض

وتركيز المستخلص الايثانولي للعكبر المستخدم وكذلك التفاعلات بين هذه العوامل في المختبر (Wojtyczka et al., 2013).

له خاصية قتل الميكروبات من الفصيلة السبحية والعنقودية وبكتريا بيوسيانس وكولاى وميكروب التيفوس وتعالج بعض الامراض الجلدية الفطرية mycosis بمستخلصاته الغير كحولية (خطاب & نوار, 2012). العكبر يثبط البكتيريا موجبة الجرام وبدرجة أقل البكتيريا سالبة الجرام (Pobiega et al., 2017).

أظهرت دراسة (Okińczyc et al., 2021) ان العينات التي جمعت من 19 منطقة أوروبية آسيوية مختلفة بان العكبر مضاد قوي للجراثيم .

تشير الدراسات السابقة إلى إمكانية تطبيق جميع مستخلصات العكبر المنتج من خمس مناطق زراعية نموذجية في بولندا انها تمنع نمو البكتيريا المنقولة بالغذاء والفطريات الملوثة للأغذية وبذلك تستخدم لحماية الطعام من التلف البكتيري وفي المكافحة الحيوية لمسببات الأمراض المنقولة بالغذاء (Pobiega et al., 2019).

## 6.11.2. مضاد للفطريات

يحتوي العكبر على مركبات الفلافونويد المضادة للفطريات لذا يستخدم لأغراض مختلفة في الصناعات الدوائية والتجميلية والغذائية ومراكز العلاج بالنباتات (Giri, 2018). تم إثبات فعالية منتج العكبر كبديل علاجي طبيعي للإصابة بداء الفطريات الجلدية في الخيول وليس له آثار جانبية مقارنة بالأدوية التقليدية (Rodríguez et al., 2016).

يمنع العكبر نمو العفن (*Aspergillus and Penicillium*) والخميرة (*Candida*) (Pobiega et al., 2017). وله تأثير مضاد للفطريات المسببة لداء المبيضات المهلبي مشابه لكريم كلوتريمازول clotrimazole cream (Berretta et al., 2013).

للعكبر البرازيلي الأخضر نشاط مضاد للفطريات مشابه لعقار Miconazole في علاج التهاب الفم المصاحب للمبيضات حيث تناقصت مستعمرات *C. albicans* وقل التهاب الفم المصاحب للكانديدا *Candida* وبالتالي يمكن أن يكون بديلاً جيداً في علاج التهاب الفم الناتج عن المبيضات (Capistrano et al., 2013). يستخدم كمضاد للفطريات بالتطبيق الموضعي أظهر

أنه يقلل من حدوث السنخ الجاف والتهاب الفم السني المرتبط بالمبيضات يمكن أيضاً وضع معجون العكبر ليعالج الالتهاب الفطري للسنخ الجاف ويقلل بشكل تدريجي من الألم والالتهاب (AI- (Fahdawi, 2015)(Alfahdawi, 2017).

### **7.11.2. مضاد للأكسدة**

اثبتت العديد من الدراسات وأكدت القدرة العالية التي يتميز بها العكبر في الوقاية من حدوث الاجهاد التأكسدي بسبب احتوائه على المركبات الفينولية بصفة عامة والفلافونيدات بصفة خاصة والتي لها القدرة العالية على اقتناص وازالة الجذور الحرة والاسهام في اعادة بناء الاغشية الخلوية وهو مليء بالفيتامينات والمغذيات التي لها دور كبير في الحفاظ على صحة الجلد والبشرة (Morphology, 2018) (مسعود, 2021).

يمكن أن يؤدي الجمع بين العلاج بمضادات الأكسدة إلى تخفيف الآثار الجانبية للعلاج الكيميائي على الكريات البيض والكبد والكلية، وبالتالي زيادة تأثير العلاج الكيميائي عن طريق زيادة الجرعة (Doğan et al., 2020).

### **8.11.2. مضاد للفايروسات**

العكبر فعال في محاربة الفيروسات فهو مضاد حيوي ومطهر ومضاد للالتهابات ومسكن للإلام (Morphology, 2018)(Šabanović et al., 2019).

تم إثبات نشاط العكبر المضاد لفيروس شلل الأطفال وفيروس الأنفلونزا A و B والفيروسات المنقولة وفيروس نقص المناعة البشرية (Pobiega et al., 2017).

### **9.11.2. مضاد لمرض السكري**

تشير العديد من الدراسات فوائد العكبر للجروح الحاصلة نتيجة الإصابة بمرض السكري التي يصعب التئامها حيث يمكن أن يؤدي استخدامه إلى تسريع عملية الشفاء بشكل كبير حيث انه يمتاز بسهولة استخدامه وتكلفته القليلة وليس له أي آثار جانبية للمريض (Chylińska-Wrzos et al., 2017).

### 3. المواد وطرائق العمل

#### 1.3. المواد والاجهزة المستعملة

##### 1.1.3. الاجهزة المستعملة:

جدول (1-3) الاجهزة المستعملة في الدراسة الحالية

المنشأ Origin	الشركة المصنعة Company	الاجهزة Device	ت
England	Prestige medical	الموصدة Autoclave	1
Germany	Hettich	جهاز الطرد المركزي Centrifuge	2
England	Griffin	جهاز تقطير Distiller	3
Korea	Lab.tech	فرن كهربائي Electric oven	4
Switzerland	Mettler	ثلاجة -20 درجة مئوية Freezer	5
Germany	Memmert	حاضنة Incubator	6
Japan	T.C Meiji techno	مجهر الطور المقلوب Inverted microscope	7
Korea	Labtech	كابينة معقمة Laminar air flow cabinet	8
Germany	Scotech	محرك مغناطيسي magnetic stirrer	9
Turkey	Arcelik	ثلاجة Refrigerator	10
England	Denely	هزاز Shaker	11
Korea	Labtech	ميزان الكتروني حساس Sensitive electronic balance	12
Germany	Kottermann	مازج Vortex	13
England	Minilyotrap	حمام مائي Water bath	14

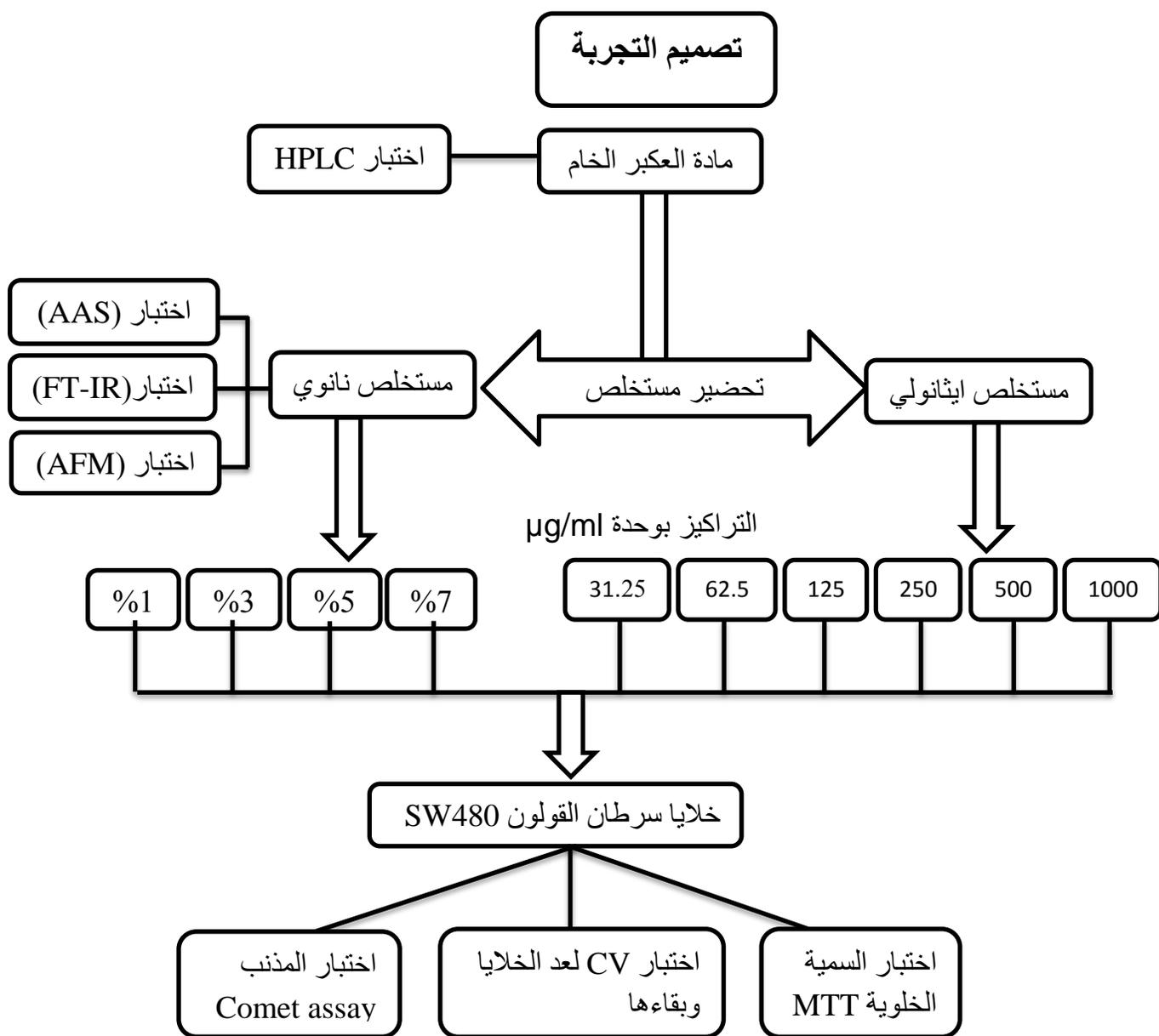
Japan	National	Warming صفيحة ساخنه Blender	15
Spain	Model	جهاز الاليزا ELISA microplate reader	16
Japan	Shimadzu	Atomic Absorption جهاز Spectrophotometer	17
Japan	IRPrestige-21	AFTIR جهاز	18
Japan	Shimadzu	UV-1650pc جهاز	19
Japan	Shimadzu	مقياس الطيف الضوئي للأشعة فوق البنفسجية UV / VIS 1600A	20
Japan	SHIMADZU	مقياس الطيف الضوئي للأشعة فوق البنفسجية (UV-1800)	21
China	/	خلاط كهربائي	22
China	/	جهاز استخلاص مستمر (Soxholet)	23
USA	THERMO	Oven فرن	24
China	/	مجفف	25
USA	THERMO	الحاضنة	26
USA	THERMO	حمام مائي	27
USA	Cole-parmer	التراسونك نوع بروب	28
York New	Minsonix incorporated	التراسونك Ultrasonic	29
USA	Vanox	مجهر الفلورسنت	30
USA	Olympus	power supply مجهز طاقة	31
China	Dell	جهاز حاسوب	32
Holland	Labinco	هيتز	33
Germany	Marck	TLC glass plates لوح زجاج	34

### 2.1.3. المواد الكيميائية

جدول (2-3) المواد الكيميائية التي تم استخدامها في الدراسة الحالية

المنشأ Origin	الشركة المصنعة Company	المواد الكيميائية Chemicals	ت
USA	Sigma	MTT(3-(4,5-Dimethylthiazole-2- yl)- 2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) dye powder	1
USA	Sigma	Crystal violet صبغة الكريستال البنفسجية	2
USA	Promega	De-ionized water ماء منزوع الأيونات	3
England	GCC	ثنائي ميثيل سلفوكسيد (DMSO) Dimethyl sulfoxide	4
UK	Gibco	الوسط الزراعي Roswell Park Memorial Institute1640 (RPMI-1640) powder medium	5
Spain	Scharlau	Ethanol ايثانول	6
Germany	Troge Medical	Gentamycin جنتاميسين	7
USA	Sigma	Hepes buffer	8
USA	Sigma	L-glutamine	9
USA	Clever	Liquid nitrogen نيتروجين سائل	10
USA	Sigma	محلول الفوسفات الملحي العازل (PBS) Phosphate buffer saline	11
England	BDH	Sodium bicarbonate بيكربونات الصوديوم	12
UK	Gibco	Trypsin- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) powder	13

Germany	SIGMA	حامض الهيدروليك	14
England	GCC	الكوروفورم Chloroform	15
England	DBH	هيدروكسيد الصوديوم (1 نورمال)	16
Germany	SIGMA	(Atropine) القياسية	17
Germany	SIGMA	محلول فوسفات phosphate buffer	18
China	/	محلول BCG solution BCG	19
French	BIOSOLVE	ميثانول	20
French	BIOSOLVE	حامض البيكريك	21
England	DBH	هيدروكسيد الصوديوم	22
England	DBH	سيكيوريسايد Securidaside	23
Germany	SIGMA	حامض الكالليك (galic acid)	24
Germany	SIGMA	كاشف فولن (Folin-Ciocalteu reagent)	25
England	DBH	كلوريد الألومنيوم	26
Germany	SIGMA	الروتين (Rutin)	27
IRAQ	محلي	ماء مقطر	28
Germany	SIGMA	نترات الصوديوم	29
England	DBH	كلوريد الحديدك	30
Germany	SIGMA	كلوريد الصوديوم Sodium chloride	31
Germany	SIGMA	محلول الكلوتين	32
Germany	SIGMA	محلول ايثانول مائي	33
French	BIOSOLVE	اينيل ايثر	34
Germany	SIGMA	البيوتانول العادي	35
Germany	SIGMA	محلول كلوريد الصوديوم المائي (NaCl)	36
Iraq	Iraq center	مصل البقر الجنيني Fetal Bovine Serum	37
Germany	Alfa Aesar	نترات الفضة Silver nitrate	38



شكل (1-3) يوضح تصميم التجربة

## 2.3. طرائق العمل

### جمع وتحضير عينة العكبر

تم جمع مادة العكبر قيد الدراسة من أماكن مختلفة في محافظة كربلاء.

### 1.2.3. الكشف الكيميائي (الاستدلالي) للمركبات الموجودة في مستخلص العكبر

#### الخام

### 1.1.2.3. تقدير المحتوى الكلي للقلويدات

#### الاستخلاص:

اتبعت طريقة (Evans, 2002) حيث تم طحن (20) غم من مادة العكبر ثم استخلاصها بالميثانول لمدة (24) ساعة بجهاز استخلاص مستمر (Soxholet). تم تقليب المستخلص وتبخير الايثانول على مبخر دوار تحت ضغط مفرغ عند درجة حرارة (45) درجة مئوية لضمان جفاف المستخلص.

للكشف عن وجود القلويدات في النماذج حيث استعملت طريقة method Dragendroff's (دراجندوف) والتي تنص على استخلاص العينية كحوليا بالـ (Soxholet) واخذ (1) مل من المستخلص يضاف له (0.5) مل من حامض الهيدروليك (10%) وبضع قطرات من كاشف Dragon drop's حيث ظهور الراسب دليل على وجود القلويدات.

اتبعت طريقة (Ajanal et al., 2018) لمعرفة تركيز القلويدات المقدمة حيث يتم اخذ (1) مل من المستخلص ويضاف له (10) مل من الكلوروفورم وتعديل الحامضية الى (7) باستعمال هيدروكسيد الصوديوم NaOH واحد نورمال. يحضر منحنى معايرة من مادة (Atropine) القياسية تحضر عدة تراكيز وتقاس على طول موجي (470) نانوميتر.

#### المنحني القياسي

تم قياس (0.4، 0.6، 0.8، 1 و 1.2) مل من محلول (Atropine) القياسي بدقة وتم نقل الاقسام إلى مسارات اقمام مختلفة. ثم تم أخذ (5) مل من محلول فوسفات phosphate buffer

pH (4.7) و (5) مل من محلول Bromocresol Green solution (BCG) ورج الخليط مع المستخلص باستخدام (1، 2، 3، 4) مل من الكلوروفورم. ثم جمعت المستخلصات في قنينة حجمية سعة (10) مل ثم تم تخفيفه لضبط المحلول باستخدام الكلوروفورم. تم قياس امتصاص المركب في الكلوروفورم عند طيف قدره (470) نانوميتر في مقياس الطيف الضوئي للأشعة فوق البنفسجية (SHIMADZU UV-1800) مقابل الفراغ المحضر على النحو الوارد أعلاه ولكن بدون (Atropine).

### 2.1.2.3. تقدير المحتوى الكلي للكلايكوسيدات

قدرت الكلايكوسيدات الكلية حسب (Tofighi et al., 2016) اخذ (10) غم من النموذج وخلطة مع (80%) ميثانول ويترك لمدة (24) ساعة بدرجة حرارة الغرفة. بعدها يؤخذ (10) مل من المستخلص ويضاف له (5) مل من كاشف Baljet's والمحضر انياً المُحضر حديثاً ((95) مل من حامض البيكريك (1%) + (5) مل من هيدروكسيد الصوديوم (10%). بعد ساعة، تم تخفيف الخليط باستخدام (20) مل من الماء المقطر وتم قياس الامتصاصية عند (495) نانوميتر بواسطة مقياس الطيف الضوئي Shimadzu UV /VIS 1600A. لإعداد المنحني القياسي، أعدت (10) مل من تراكيز مختلفة (12.5-100) ملغم/ لتر من Securidaside. تم حساب الكلايكوسيد الكلي من التكرارات الثلاثية على شكل نسبة مئوية.

### 3.1.2.3. تقدير المحتوى الكلي للفينولات

#### تحضير العينة

حسب (Study et al., 2017) جفف النموذج في الظل في درجة حرارة الغرفة لمدة (24) ساعة، ثم طحن إلى مسحوق ناعم في خلاط كهربائي. اخذ منه (5) غم ووضع في جهاز (Soxholet) واستخلص مع (300) مل إيثانول عند (50-55) درجة مئوية لمدة (3-4) ساعات. رشح المستخلص من خلال ورقة ترشيح واتمان رقم (1)، وركز المستخلص باستخدام المبخر الدوار تحت ضغط منخفض عند (40) درجة مئوية. وزن المستخلص بعد عملية التركيز (2.6) غم وتم تخزينه في (4) درجات مئوية في فلاسك تخزين لحين إجراء التحليل.

تم الكشف عن الفينولات الكلية باستخدام حامض الكاليك (gallic acid) وكاشف فولن (Folin-Ciocalteu reagent) والتي تنص على اخذ (150) مايكروليتر من المستخلص الكحولي مع (500) مايكروليتر من كاشف فولن ويضاف لها (1.5) مل من كربونات الصوديوم (20%) تمزج جيداً ويكمل الحجم النهائي الى (10) مل وبعد ساعتين من التفاعل تسجل قيمة الامتصاصية على طول موجي (765) نانوميتر. يتم حساب تركيز الفينولات الكلية بالنسبة لمنحني المعايرة لحامض الكاليك وبوحدات (ملغم/ غرام وزن جاف).

### 4.1.2.3. تقدير المحتوى الكلي للفلافون

تم تحديد المحتوى الكلي للفلافون حسب طريقة (Baba & Malik, 2015) للمستخلص الخام بواسطة طريقة قياس كلوريد الألومنيوم بوجود مادة الروتين (Rutin)، (50) مايكروليتر من المستخلص الخام للعكبر مع (1) مل من الميثانول و (4) مل من الماء المقطر ثم يضاف لها (0.3) مل من محلول نترات الصوديوم (20%) و (0.3) مل من محلول كلوريد الألمنيوم (20%) ويوضع المزيج في الحاضنة لمدة (10) دقائق بعدها يضاف (2) مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم (1) مولاري يضاف الى الخليط الكلي ويكمل الحجم الى (10) مل ماء مقطر. تسجل امتصاصية النموذج على طول موجي (510) نانوميتر. يتم حساب تركيز الفلافون الكلي بالنسبة لمنحني المعايرة لمادة الروتين وبوحدات (ملغم/ غرام وزن جاف).

### 5.1.2.3. تقدير المحتوى الكلي للتانين (الدباغيات)

قدر المحتوى الكلي للتانين حسب طريقة (Abdelkader et al., 2014) والتي تتضمن اخذ (2) غم من النموذج ويضاف له مزيج من الميثانول والماء بنسبة (20:80) واخذ (2) غم من النموذج ويضاف له مزيج من الميثانول والماء بنسبة (20:80) ثم يضاف له (5) مل من كلوريد الحديدك ويوضع المزيج في حمام مائي لمدة (20) دقيقه (اللون الاخضر الداكن هو دليل على وجود التانين)، يؤخذ (1) مل من المستخلص ويضاف له (2) مل من كلوريد الصوديوم (20%) ويخلط مع محلول الكلوتين (1%). تسجل قيمة الامتصاصية لمنحني المعايرة لمادة التانين في مقياس الطيف الضوئي للأشعة فوق البنفسجية Shimadzu UV /VIS 1600A. على طول موجي (540) نانوميتر بعدها يتم قراءة امتصاصية النموذج وتستخرج النسبة المئوية للتانين.

### 6.1.2.3. تقدير الصابونين الكلي

حسب طريقة (Ezeabara et al., 2014) قدر المحتوى الكلي للصابونين. تم تجفيف العينة بالهواء في المختبر عند درجة حرارة الغرفة لمدة يوم واحد. تم بعد ذلك سحق العينات المجففة بالهاون والمدقة قبل طحنها إلى مسحوق ناعم باستخدام مطحنة يدوية.

#### التحديد النوعي للصابونين

تم وصف الاختبارات النوعية التي تم إجراؤها بإيجاز على النحو التالي: في أنبوب اختبار تم رج (0.5) غم من المستخلص بالماء. تم أخذ رغوة مستقرة كدليل على وجود الصابونين.

#### التحديد الكمي للصابونين

تم تحديد محتوى الصابونين في العينات بطريقة الاستخلاص المزدوج الجاذبية. تم خلط وزن مُقاس (5) غم لمسحوق العينة مع (50) مل من محلول إيثانول مائي (20٪) في قنينة. يسخن الخليط في حمام مائي لمدة (90) دقيقة عند (55) درجة مئوية، ثم تمت تصفيته من خلال ورق ترشيح Whatman (رقم 42). تم استخلاص المتبقي باستخدام (50) مل من الإيثانول بنسبة (20٪) وصُب كلا المستخلصين معًا وتم تقليل المستخلص المجمع إلى حوالي (40) مل عند (90) درجة مئوية ونقله إلى قمع فصل حيث تمت إضافة (40) مل من إيثيل إيثر ورجها بقوة. تم إعادة الاستخلاص عن طريق التقسيم بشكل متكرر حتى تصبح الطبقة المائية صافية في اللون. تم استخلاص الصابونين مع (60) مل من البيوتانول العادي. تم غسل المستخلصات المجمعة باستخدام (5٪) من محلول كلوريد الصوديوم المائي (NaCl) وتبخيرها حتى تجف في طبق تبخير تم وزنه مسبقًا. تم تجفيفها عند (60) درجة مئوية في الفرن وإعادة وزنها بعد التبريد في مجفف. تم تكرار العملية مرتين أخريين للحصول على متوسط. تم تحديد محتوى الصابونين الكمي وحُسب كنسبة مئوية من العينة الأصلية على النحو التالي:

$$\text{نسبة الصابونين} = 100 \times \frac{W2 - W1}{Wt. \text{ للعينة}}$$

$$W1 = \text{وزن طبق التبخير}$$

$$W2 = \text{وزن طبق التبخير} + \text{العينة}$$

### 3.3. تحضير مستخلص العكبر الايثانولي

اتبعت طريقة (Shameem et al., 2017) باستخدام ميزان رقمي حساس، تم وزن (50) جرام من العكبر ووضع في قنينة حرارية مع (500) مل من الإيثانول المطلق (99٪)، ثم يترك لمدة (48) ساعة.

تم وضع القنينة ليلاً مع التقليب المغناطيسي المستمر، وبعد ذلك تم طرد الخليط (2500) دورة في الدقيقة لمدة (10) دقائق. تم تمرير المادة الطافية عبر ورق ترشيح Whatman وترك طوال الليل، وبعد ذلك وضع المستخلص في الفرن عند (40-45) درجة مئوية، وتم وزن المستخلص وإذابته بكمية مناسبة من الإيثانول من أجل الحصول على تركيز المخزون النهائي (1000) ميكروغرام/ مل والتي تم تعقيمها باستخدام مرشح ميليبور (0.22) ميكرومتر. للحصول على تركيز المخزون (1000 ميكروغرام/ مل).

### 1.3.3. تحضير المحلول المائي لنترات الفضة

اتبعت طريقة (النعمي, 2018). حضر المحلول المائي لنترات الفضة وكما يأتي: الوزن الجزيئي لنترات الفضة  $AgNO_3$  :

$$( Ag=107.87 , N=14 , O=16 ) = 107.87 + 14 + (16*3) = 169.87$$

بذلك فان الكتلة المولارية لنترات الفضة = 169.87 غم.

لذلك فان 1000 مل من محلول 50 ملي مول نترات الفضة يحتوي على :

$(50*169.87) / 1000 = 8,4935$  غم من نترات الفضة يتطلب اضافته الى (1000) مل من الماء منزوع الأيونات للحصول على محلول (50) ملي مول من نترات الفضة.

ولتحضير (1) ملي مول من نترات الفضة نأخذ (0.0162) غم من نترات الفضة يتم إذابتها في (100) مل من الماء منزوع الأيونات، سخن المحلول عند درجة حرارة (60) م لمدة (10) دقائق مع التحريك ثم يبرد ليصبح جاهزاً.

### 2.3.3. تحضير تراكيز مختلفة من العكبر

تم تحضير تراكيز مختلفة من العكبر وهي (1%، 3%، 5%، 7%) عن طريق اذابة (1 و 3 و 5 و 7) غم من المستخلص الجاف للعكبر على التوالي في 100 مل من الكحول (الايثانول).

### 3.3.3. تحضير جسيمات الفضة النانوية

تم تحضير جسيمات الفضة النانوية من تراكيز مستخلص العكبر الكحولي (الايثانول) حسب (ALNUAIMI1 et al., 2019) مع بعض التعديلات.

تم تقطير خمسة مل من كل مستخلص في (95) مل من محلول نترات الفضة (1) ملي مولر تحت ظروف الموجات فوق صوتية تبلغ (100) وات وتردد (42) كيلو هيرتز.

ثم بعد صوتته (استخدام للموجات الصوتية) لمدة (20) دقيقة، تم تقليب المحاليل عند (800) دورة في الدقيقة عند (25) درجة مئوية لمدة (30) دقيقة، تم تخزين العينات في زجاجات داكنة عند (25) درجة مئوية لمدة (24) ساعة.

بعد مرور (24) ساعة، تمت تنقية خليط التفاعل باستعمال جهاز الطرد المركزي لمدة (10) دقائق عند (10000) دورة في الدقيقة للحصول على الراشح الصافي.

تم تخزين العينات النهائية في زجاجات داكنة وخلال (5) ايام تم ملاحظة تغيير لون المحاليل من اللون (الابيض) الى لون (الرصاصي الفاتح) للجسيمات النانوية الفضية للعكبر يشير هذا التغيير في اللون الى تكوين جسيمات الفضة النانوية.

### 4.3.3. تقدير تراكيز جسيمات الفضة النانوية المحضرة لمحاليل جسيمات الفضة

#### النانوية بالتخليق الاخضر

تم تحديد تراكيز جسيمات الفضة النانوية بعد استقرار التغيير اللوني لكل من المحاليل المحضرة باستعمال جهاز مقياس الامتصاص الذري الطيفي (AAS)

### 5.3.3. تنقية دقائق الفضة النانوية

حسب طريقة (ALNUAIMI1 et al., 2019). وضع المحلول الحاوي على دقائق الفضة النانوية والمحضر في الفقرة (3.3.3). بأنابيب اختبار مضببه ثم وضع بجهاز النبذ المركزي المبرد بسرعة (10000) دورة/ دقيقة ولمدة (10) دقائق، بعد انتهاء المدة تم التخلص من الراشح وجمع وغسل الراسب في الماء المقطر الخالي من الايونات ثم اضيف له الماء المقطر ووضع بجهاز النبذ المركزي وبسرعة (10000) دورة/ دقيقة ولمدة (10) دقائق، وكررت العملية (3) مرات حتى اصبح الراشح خالي من اي لون وحفظ لحين الاستعمال .

### 4.3. تشخيص دقائق الفضة النانوية المحضرة

درست بعض صفات الجسيمات النانوية المحضرة في مختبرات دائرة البيئة والمياه التابعة لوزارة العلوم والتكنولوجيا تم استخدام ثلاث طرق لتشخيص مستخلص العكبر النانوي في هذه الدراسة وكالاتي:

### 1.4.3. جهاز مقياس الامتصاص الذري الطيفي (AAS)

#### Atomic Absorption Spectroscopy

حيث يتم الكشف عن كمية ايونات (Ag). اذ ان معدل تناقص ايونات الفضة دليل على تحول  $(Ag^+)$  الى  $(AgO^0)$  (Choudhary et al., 2015).

### 2.4.3. التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء (FTIR)

#### Fourier transform infrared spectromete

حسب طريقة (Bobbu et al., 2016) لتحديد المجاميع الفعالة التي يتكون منها مستخلص العكبر إذ ان هذه المجاميع الفعالة تعمل كمواد مغلقة ومختزلة ومثبتة لجسيمات الفضة النانوية. حضرت النماذج عن طريق ترسيب قطرة من كل نموذج على شريحة زجاجية وجففت بدرجة حرارة (60) درجة سيليزية في داخل الفرن الكهربائي لمدة (30) دقيقة، ثم تحضر على شكل عجينة مع مادة سائلة عالية اللزوجة مثل زيت البرافين النوجول (Nujol) ثم توضع كمية بسيطة من هذه العجينة بين قرصين من بروميد البوتاسيوم KBr لتكون طبقة رقيقة جداً وتفحص بجهاز (Fourier transform infrared).

### 3.4.3. مجهر القوة الذرية (AFM) Atomic force microscopy

حسب طريقة (Kaman & Dutta, 2019) لتحديد شكل وحجم جسيمات الفضة النانوية، تم وضع غشاء رقيق للعينة من الجسيمات النانوية على شريحة زجاجية بإسقاط 100 مايكروليتر من العينة على الشريحة، وتم السماح لها بالجفاف لمدة 5 دقائق. ثم تم مسح الشرائح ضوئياً باستعمال AFM.

### 5.3. المحاليل الخاصة بالزراعة النسيجية:

حضرت المحاليل حسب طريقة (Freshney,2000) الخاصة بالزرع النسيجي.

### 1.5.3. المضادات الحيوية

اذيبت محتويات عبوة Benzyl penicillin سعة (1000000) IU في (5) مل من الماء المقطر، ثم اخذ منه (0.5) مل واطيف الى (1) لتر من الوسط الزراعي وحفظ في درجة حرارة (-20) درجة مئوية.

اما عبوة streptomycin سعة (1) غم فتم اذابتها في (5) مل من الماء المقطر ثم اخذ منه (0.5) مل واطيف الى (1) لتر من الوسط الزراعي وخزن في درجة حرارة (-20) درجة مئوية.

### 2.5.3. بيكاربونات الصوديوم (NaHCO<sub>3</sub>) Sodium bicarbonate

حضرت من اضافة (100) مل من الماء المقطر الى (4.4) غم من (NaHCO<sub>3</sub>) عقم بالموصدة بدرجة حرارة (121) درجة مئوية لمدة (15) دقيقة ثم حفظ في درجة حرارة (4) درجة مئوية.

### 3.5.3. المصل البقري الجنيني (FBS) Fetal Bovine Serum

استخدم مصّل العجل البقري الجنيني Fetal Bovine Serum وثبط حرارياً بدرجة حرارة (56) درجة مئوية لمدة (30) دقيقة ومن ثم تم اضافته للوسط الزراعي.

### 4.5.3. الوسط الزراعي RPMI – 1640

### Rosswell Park Memorial Insitute – 1640

نوب (10.43) غم من مسحوق الوسط الزراعي RPMI – 1640 في (900) مل من الماء منزوع الايونات بعدها اضيف محلول بيكاربونات الصوديوم ومحاليل المضادات الحيوية المحضرة سابقاً بمقدار (0.5) مل يعدل الاس الهيدروجيني الـ (PH الى 7.2) ثم اضيف مصّل الدم البقري

الجينيبي (100) مل ورشح الوسط الزراعي بمرشح ذي ثقوب (0.45)  $\mu\text{M}$  ثم (0.22)  $\mu\text{M}$  للتخلص من البكتيريا، اكمل الحجم الى (1) لتر بأضافة الماء منزوع الايونات ووزع على قناني زجاجية نظيفة ومعقمة ووضعت في الحاضنة بدرجة حرارة (37) درجة مئوية للتأكد من عدم تلوثها لحين الاستعمال (Yasseen, 1990).

### 5.5.3. محلول دارئ الفوسفات الملحي

حضر بإذابة (1) قرص من PBS في (500) مل من الماء منزوع الايونات مع التحريك المستمر على محرك مغناطيسي بدرجة حرارة الغرفة ويعدل الاس الهيدروجيني (PH الى 7.2) ويتم التعقيم عن طريق الموصدة ويحفظ المحلول لحين الاستعمال.

### 6.5.3. التربسين

يتم تحضيره بإذابة (1) غم من مسحوق التربسين في (100) مل الماء منزوع الايونات، في درجة حرارة الغرفة ثم ضبط درجة الحموضة الى (PH الى 7.2)، عقم بمرشح ذي ثقوب بقطر (0.45)  $\mu\text{M}$  ثم (0.22)  $\mu\text{M}$  ويتم حفظه بدرجة حرارة (-20) درجة مئوية.

### 7.5.3. الوسط الزراعي الخالي من المصل

يحضر (SFM) بنفس الطريقة المذكورة في الفقرة (4.5.3) ولكن بدون اضافة المصل للوسط الزراعي.

### 8.5.3. تحضير صبغة (MTT) Methyl Thiazolyl Tetrazolium

تمت اذابة (0.5) غم من مسحوق صبغة MTT في (100) مل من محلول PBS للحصول على تركيز (5) ملغرام/ مل ثم عقم المحلول بالترشيح من خلال مرشح ذي ثقوب بقطر (0.22) mM ثم (0.45) mM وتوضع بزجاجيات معقمة ومعتمة وتخزن عند (4) درجة مئوية (Meerlo, et al. 2011).

### 6.3. الخط الخلوي السرطاني البشري SW480

استعمل خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480) تم شراؤه من LONZA Biologics (Slough) المملكة المتحدة تم الحصول عليه في فلاسكات مجمدة من مركز الزراعة النسيجية في كلية الطب/ جامعة بابل.

تم تنمية الخط في الوسط الزراعي (RPMI - 1640) المجهز بمصل البقر الجنيني (10%).

#### 1.6.3. خط الخلية والادامة

تم فحص الخلايا يومياً تحت مجهر مقلوب للتأكد من عدم وجود تلوث مع تبديل الوسط الزراعي (RPMI) كل يومين إلى ثلاثة أيام اعتماداً على تغير لون الوسط. تم الحفاظ على الخلايا في وسط مكمل بنسبة 10% من المصل وتم حفظها عند (37) درجة مئوية في حاضنة. وعند تكون الطبقة الاحادية الكاملة Confluent monolayer عوملت الخلايا بمحلول التربسين وذلك لتهيئة الحصول على المزرعة الثانوية subculture. بعد أن حققت الخلايا تكاثر أكثر من 80% تم زرعها في وسط زرع (Freshney, 2012).

#### 2.6.3. إذابة الخلايا

حسب طريقة (Luhur et al., 2019) تم أخذ أنبوب اختبار مجمد واحد من الخلايا المجمدة من بنك النيتروجين السائل وتم إذابته في حمام مائي (37) درجة مئوية. يتم إزالة الأنبوب من الماء قبل ذوبانه تماماً وتم مسحها بكحول الايثانول (70%) لغرض تعقيمه دون تأخير او توقف تم اخذ محتوى الأنبوب من الخلايا في الكابينة الخاصة وتوضع الخلايا في أنبوب طرد مركزي بلاستيكي بحجم (15) مل يحتوي على (10) مل من وسط النمو الزراعي. تم إجراء الطرد المركزي عند (800) دورة في الدقيقة لمدة (10) دقائق بعدها يتم التخلص من السائل وتبقى الخلايا في قعر الأنبوب. يتم إضافة (5) مل وسط زرع اخر الى الخلايا المترسبة في قعر الأنبوب مع مصل البقر الجنيني (10%) وتم نقله إلى فلاسك حجم (25) مل ويوضع في التبريد عند (37°C) ويتم استبدال الوسط الزراعي في اليوم التالي.

### 3.6.3. الحصاد وزراعة ثانوية لخط خلية (SW480)

الحصاد هو تقنية تستخدم الإنزيم المحلل للبروتين (التريبسين) لفصل وتصنيف الخلايا أحادية الطبقة الملتصقة من قاعدة قنينة الاستنبات. يتم ذلك عندما تحتاج الخلايا إلى الحصاد من أجل عد الخلايا والزراعة الثانوية لخط الخلية. تم تنفيذ هذا الإجراء على النحو الآتي:

- 1- عندما يصل نمو الخلية إلى طبقة أحادية (في المرحلة الأسية) يتم التخلص من الوسط الزرعى.
- 2- ثم تم غسل الخلايا بـ (3) مل من محلول PBS الدافئ.
- 3- تمت إضافة حوالي (1-2) مل من محلول التريبسين EDTA الدافئ لتغطية الطبقة الأحادية مع تحريك خفيف لفلاسك المزروعة (4-5) مرات لغمر الخلايا.
- 4- تم إعادة الفلاسك إلى الحاضنة عند (37) درجة مئوية للسماح للخلايا بالانفصال عن السطح الداخلي للفلاسك (يعتمد طول المدة الزمنية على خط الخلية ولكن يحدث هذا عادة في غضون 10-2 دقائق). تجنب الإفراط في التريبسين الذي يمكن أن يلحق الضرر الشديد بالخلايا فمن الضروري فحصها كل بضع دقائق.
- 5- تم فحص الخلايا باستخدام مجهر مقلوب للتأكد من فصل جميع الخلايا وتعليقها بمجرد انفصال الخلايا (قد تتطلب هز الفلاسك من جانب إلى آخر) وبعض وسط المزرعة يضاف إليها (FBS) (5-10%) (سوف يقوم FBS بإلغاء تنشيط التريبسين).
- 6- باستخدام الخلايا المعلقة هذه يتم نقل حجم الخلايا المطلوب إلى فلاسكات جديدة، يجب بعد ذلك استكمال هذه الفلاسكات بالحجم المطلوب بوسط الاستنبات وترك الخلايا للتجدد والاستقرار في الحاضنة عند (37) درجة مئوية حتى صباح اليوم التالي، تكرر هذه العملية حسب ما تتطلبه خصائص النمو لخط الخلية (Phelan & May, 2017).

### 4.6.3. تجميد خط الخلية

تم تجميد مصدر خطوط الخلايا عند (-180) درجة مئوية في قنينة النيتروجين السائل وفقاً للبروتوكول التالي:

1. تم أخذ قنينة زراعة الأنسجة أحادي الطبقة بالقرب من المرحلة الأسيية وغسلها مرتين باستخدام (5) مل من PBS ثم تمت إضافة (3) مل من التربسين الدافئ EDTA.
2. تم تحضين الفلاسك عند (37) درجة مئوية حتى تنفصل طبقة الخلية ويتم مساعدة الخلايا على التفكك في خلايا مفردة عن طريق التحريك الخفيف على جوانب الفلاسك.
3. تم نقل محتوى القنينة إلى أنبوب بلاستيكي معقم للطرد المركزي بسعة (15) مل. تم إجراء الطرد المركزي عند (800) دورة في الدقيقة لمدة (10) دقائق.
4. تم صب المادة الطافية وإعادة تعليق حبيبات الخلية بـ (1) مل من وسط التجميد ونقلها إلى فلاسك مجمدة معقمة سعة (1.5) مل.
5. تُحفظ الفلاسك لمدة (10) دقائق في درجة حرارة الغرفة وتُنقل إلى (-80) درجة مئوية لتجميد عالي لمدة (24) ساعة ثم تخزينها لمدة طويلة في مجمدة النيتروجين السائل ( Yang et al., 2019).

### 5.6.3. تحضير الوسط الزراعي

تم تحضير الوسط السائل من وسط مسحوق بطريقة دليل المنتج الحيوي الأمريكي على النحو التالي:

تم إذابة (10.4) غم من مسحوق الوسط الزراعي RPMI مع محلول الهريس، L- الكلوتافين والفينول الأحمر في حوالي (900) مل من الماء منزوع الأيونات في قنينة حجمية.

تمت إضافة (2) جم من مسحوق بيكربونات الصوديوم و (80) ملغم Gentamycin مع التحريك المستمر يقترب الحجم من حوالي لتر واحدة ويتم تعديل درجة الحمضية للوسط إلى (7.4) باستخدام مقياس الأس الهيدروجيني يكمل الحجم إلى (1000) مل عن طريق إضافة الماء منزوع الأيونات. تم التعقيم بواسطة مرشح Nalgene Filter (0.45) ثم (0.22) مايكروليتر. خزن الوسط في (4) درجة مئوية لحين الاستعمال (Şahin et al., 2018).

### 6.6.3. وسط التجميد

تم تحضير (10) مل من محلول المخزون من المكونات التالية: (6) مل من الوسط الخالي من المصل، (3) مل من مصل بقري جنيني، (1) مل (DMSO) يضاف قطرة قطرة مع الخلط. تم تخزين المخزون عند (20) درجة مئوية بين الاستخدامات (Meleady & Connor, 2006).

### 7.3. التجارب

#### التجربة رقم 1:

تم اختبار تأثير مستخلص العكبر الايثانولي على خط الخلايا SW480 في (24) ساعة من وقت التعريض ولستة تراكيز متسلسلة (31.25، 62.5، 125، 250، 500، 1000) µg/ml. تم زرع ثلاث حفر لكل تركيز في سبعة أعمدة من طبق الزرع النسيجي (96) حفرة لخلايا سرطان القولون البشري SW480 بتركيز (10\*5)

تم اعتبار رقم 1 كمجموعة سيطرة، وكل واحد من الستة المتبقية

تعرضت مكررات الأعمدة إلى (200) مايكروليتر من كل من سلسلة تراكيز مستخلص العكبر الايثانولي (31.25، 62.5، 125، 250، 500، 1000) µg/m. ثم حضنت لمدة (24) ساعة. بعد انتهاء التعريض تغسل الحفر بـ (200) مايكروليتر من محلول PBS. تم تقييم تأثير مستخلص العكبر على نمو خط خلايا سرطان القولون البشري SW480 بواسطة اختبار صبغة MTT.

#### التجربة رقم 2:

تأثير مستخلص العكبر النانوي على خط الخلايا SW480 في (24) ساعة من وقت التعريض. تم زرع ثلاث حفر مكررة في خمسة أعمدة من طبق الزرع النسيجي (96) حفرة لخلايا SW480 بتركيز (10\*5)

تم اعتبار رقم 1 كمجموعة سيطرة، وكل واحد من الستة المتبقية

تعرضت مكررات الأعمدة إلى (200) مايكروليتر من كل من سلسلة تراكيز مستخلص العكبر النانوي (1%، 3%، 5%، 7%) ميكروغرام/مل. ثم حضن الطبق مرة واحدة لمدة (24) ساعة.

بعد انتهاء التعريض تغسل الحفر بـ (200) مايكروليتر من معقم PBS. تم تقييم تأثير مستخلص العكبر النانوي على نمو خط الخلية SW480 بواسطة اختبار MTT.

### التجربة رقم 3:

تأثير مستخلص العكبر الكحولي ومستخلص العكبر النانوي على خط الخلية SW480 خلال (24) ساعة من زمن التعريض.

تم إجراء نفس التجربة (1 و 2) بنفس الحالة والتركيز ولكن في قنينة زراعة الأنسجة (25) سم<sup>2</sup> بدلاً من طبق (96) حفرة لجمع cell pellet للدراسة الجينية بطريقة المذنب Comet assay.

### 8.3. فحوصات السمية الخلوية:

#### 1.8.3. فحص MTT:

#### 1.1.8.3. المبدأ Principle:

الغرض العام من اختبار MTT هو قياس حيوية الخلايا في إنتاجية عالية نسبيًا طبق (96 حفرة) دون الحاجة إلى حساب تفصيلي للخلايا وبالتالي فإن الاستخدام الأكثر شيوعًا هو تحديد السمية الخلوية للعديد من الأدوية بتراكيز مختلفة.

مبدأ اختبار MTT هو أن يكون نشاط بيوت الطاقة mitochondria للخلايا وبالتالي فإن الزيادة أو النقصان في عدد الخلايا الحية ترتبط ارتباطًا خطيًا بنشاط mitochondria. ينعكس نشاط mitochondria للخلايا من خلال تحويل ملح tetrazolium الأصفر الباهت (صبغة MTT) إلى بلورات formazan أرجوانية داكنة بواسطة NADH والتي يمكن إذابتها للقياس المتجانس وبالتالي يمكن اكتشاف أي زيادة أو نقصان في عدد الخلايا الحية عن طريق قياس تركيز formazan المنعكس في الكثافة البصرية (الامتصاصية) باستخدام جهاز ELISA عند طول موجي (570) نانوميتر كلما كان المحلول أعمق زاد عدد الخلايا الحية والنشطة أيضًا (Meerlo et al., 2011).

### 2.1.8.3. طريقة العمل Procedure (Meerlo et al., 2011):

- 1- في نهاية زمن تعريض الخلايا للمستخلصات تمت إزالة الوسط الزرعى من الحفر ثم غسل الخلايا بمحلول PBS تم إجراء تقييم لتحويل formazan.
  - 2- تمت إضافة حجم (1.2) مل من محلول MTT (5) ملغم/ مل إلى الوسط الزرعى (10.8) مل للحصول على التركيز النهائى (0.5) ملغم/ مل. ثم تمت إضافة (200) مايكروليتر من المحلول الناتج في كل بئر.
  - 3- تم حضن (طبق 96) لمدة (3) ساعات عند (37) درجة مئوية حتى تظهر بلورات formazan الأرجوانية داخل الخلايا تحت المجهر المقلوب.
  - 4- تمت إزالة المادة الطافية وإضافة (100) مايكروليتر من DMSO في كل حفرة لإذابة بلورات formazan الناتجة.
  - 5- تم حضن الطبق عند درجة حرارة الغرفة لمدة (30) دقيقة حتى تتحلل الخلايا وتنوب البلورات الأرجوانية.
  - 6- تم قياس الامتصاصية بواسطة قارئ ELISA microplate عند طول موجي (570) نانوميتر. يجب طرح قراءة الامتصاصية للفراغ من جميع العينات. يجب بعد ذلك تقسيم قراءات الامتصاصية من عينات الاختبار على تلك الخاصة بعينات السيطرة ومضروبة في (100) أي معادلة قياس الامتصاصية لإعطاء النسبة المئوية لبقاء الخلايا أو موتها.
- تشير قيم الامتصاصية الأكبر لعينة السيطرة إلى تكاثر الخلايا، بينما تشير القيم الأقل إلى موت الخلية أو تثبيط تكاثرها. تم حساب النسبة المئوية لحيوية الخلية أو النسبة المئوية للتثبيط بالصيغة التالية:

$$\text{النسبة المئوية للحيوية} = \frac{A.T - A.B/A.C}{A.B} \times 100$$

حيث، T.A = امتصاص الخلايا المعالجة بالمستخلصات.

$$B.A = \text{امتصاص الفراغ (متوسط فقط).}$$

C.A = امتصاص السيطرة (غير المعالجة).

النسبة المئوية للتثبيط = 100 - النسبة المئوية للبقاء

### 2.8.3. فحص صبغة الكريستال البنفسجي لعد الخلايا وبقائها

يستخدم اختبار الكريستال البنفسجي (CV) Crystal Violat لتحديد الكثافة الضوئية لنمو الخلية في كل حفرة من لوحة microtiter، باستخدام قارئ Elisa microplate تم فحص الاوساط في صباح اليوم التالي من الخلايا المزروعة في فلاسك زراعة الأنسجة (25 سم<sup>2</sup> تحت المجهر المقلوب، تغسل الخلايا مرتين بإضافة (5) مل من محلول PBS ويتم فصلها باستخدام التريسين والطررد المركزي عند (1500) دورة في الدقيقة لمدة (5) دقائق.

تم زرع هذه الخلايا المتزايدة بشكل أسي في طبق (96) حفرة جيداً (50000 خلية/ حفرة) وحضنت عند (37) درجة مئوية لمدة (24) ساعة للتثبيت، عولجت جميع الخلايا بتراكيز مختلفة من مستخلص العكبر الكحولي ومستخلص العكبر النانوي، ثم حضنت لمدة (24) ساعة عند (37) درجة مئوية قبل العد. بعد نهاية قياس السمية الخلوية يتم التخلص من وسط الحفظ مع مادة الاختبار وغسل الحفر بـ (100) مايكروليتر من PBS البارد بواسطة ماصة آلية ثم تم إصلاح الزراعة الخلوية بنسبة (10%) من الفورمالين المخزن لمدة (20) دقيقة عند درجة حرارة الغرفة. تم التخلص من محلول التثبيت وإضافة (100) مايكروليتر من محلول الكريستال البنفسجي المائي بنسبة (0.1%) إلى كل بئر. تم تحضين العينات في درجة حرارة الغرفة لمدة (20) دقيقة مع الرج اللطيف بعد ذلك تم غسل الألواح عن طريق الغمر في ماء الحنفية المتدفق لمدة (15) دقيقة، تركت الألواح لتجف في الهواء وقراءة الامتصاصية بقارئ ELISA microplate عند طول موجي (570) نانومتر (Feoktistova et al., 2016).

### 9.3. اختبار المذنب

اختبار المذنب Comet assay يستعمل هذا الاختبار لقياس مقدار الضرر في جزيئة الـ DNA استعمل برنامج (Soft wear) لأجراء القياسات المختلفة لكل عينة.

### 1.9.3. تحضير المحاليل

يجب ان تكون الكواشف المحضرة عليها علامات تميزها عن غيرها ويتم اعدادها قبل الاستعمال مباشرة ويجب استعمال قفازات وبدلات المختبر عند استعمال أي مادة كاشفة مزج 1XPBS مع 10XBPS مع الماء الايوني لتجهيز هذا المركب وحفظت بدرجة حرارة الغرفة

1- Lysis solution محلول التحلل لتحضير اكثر من عشرة شرائح زجاجية نموذجين في كل شريحة (40) مايكروليتر.

2- وهلام المذنب Comet LMAgarose يحضر الهلام الخاص بالفحص ويستعمل لمرة واحدة عند تحضيره ويتم اذابة الهلام بوضع العلبة في حمام مائي من (90-100) م° لمدة (5) دقائق او حتى ذوبان الهلام مع ازالة غطاء العلبة من اجل السماح للهلام بالتمدد نتيجة الحرارة بعد ذلك تم وضع الهلام في حمام مائي لخفض درجة حرارته والاحتفاظ هذه الدرجة لحين اتمام تحضير العينة.

3- محلول التصبيغ المحضر SYBER green staining solution إن الكمية المذابة المخزونة من هذه المادة تبقى صالحة للاستعمال لعدة اسابيع اذا ما خزنت على درجة (4) م° في الظلام.

a- XSYPER Green ml(1000) مع DMSO ml(1)

b- المحلول المنظم TE P=7.5

4- محلول منع التلاشي (اختياري) يحضر في حالة حدوث تلاشي اختفاء في العينات نمزج (500) ملغم من Phenulenedi aminedi hydro chloride مع 1XPBS (4.5) ملغم حتى الذوبان في انبوبة بحجم (10) مل.

5- محلول فك التفاف التحلزن القاعدي Alkaline unwinding solution عند تحضير هذا المحلول يتوجب الحذر وارتداء القفازات في كل (50) مل من هذا المحلول يوجد (4.0) غم من NaOH و(250) مايكروغرام EDTA و(200) ملغم من dH<sub>2</sub>O

يحرك حتى اتمام عملية الذوبان ترتفع درجة حرارة المحلول ثم يترك حتى يكون بدرجة حرارة الغرفة قبل الاستعمال.

6- تحضير محلول الترحيل الكهربائي القاعدي لاختبار المذنب ويحفظ في التبريد بدرجة (4) درجة مئوية.

### 2.9.3. طريقة العمل

اتبعت طريقة (Khawar et al., 2011) للكشف عن تلف الحامض النووي في العينات كما يلي:

1. اضافة (1%) الاكاروز (NMPA) على السلايدات وتركها تجف عند (37) درجة مئوية.
2. بمجرد تجميد (NMPA) يتم تخفيف (80) مايكروليتر من المستخلص بـ (80) مايكروليتر من  $1 \times 10^1$  محلول Phosphate buffer مخزون.
3. يضاف الى أنبوب الطرد المركزي الدقيق الذي يحتوي على حجم متساوي (160) مايكروليتر من الاكاروز منخفض نقطة الانصهار (LMPA، 37 درجة مئوية). (يعني نسبة المستخلص مع الـ Buffer جزء واحد مقابل جزء واحد من الاكاروز منخفض نقطة الانصهار).
4. تم وضع الخليط من الجل (LMPA) والمستخلص فوق الشرائح المطلية مسبقاً بـ (NMPA).
5. تم وضع غطاء الشريحة بعناية فوق الشريحة بحيث يتم تكوين طبقة موحدة فوق طبقة (NMPA) لتجنب حدوث فقاعات الهواء.
6. تم حفظ الشرائح فوق كيس ثلج لتصلب الجل لمدة (10-15) دقيقة.
7. بعد ذلك، تمت ازالة الغطاء بعناية، وأضيف (100) مايكروليتر من (LMPA) فوق طبقة خليط الهلام.
8. تم وضع غطاء جديد وحفظه مرة أخرى فوق كيس ثلج لتصلب الجل لمدة (10-15) دقيقة.
9. تمت ازالة الغطاء، وتم غمس الشريحة في محلول (Lysis Buffer) وتبريدها لمدة (24) ساعة.
10. بعد التحلل عند (4) درجة مئوية، تم السماح للحامض النووي بالانفكاك تحت الظروف القلوية تم السماح للشرائح بالبقاء في المحلول القلوي البارد (4) درجات مئوية (درجة الحامضية > 13) لمدة (20) دقيقة لفك خيوط الحامض النووي وظهور (ALS) (فك القلوي).
11. تم اجراء الترحيل الكهربائي لمدة (20) دقيقة تحت ظروف المحلول القلوي تحت التبريد (4) درجات مئوية عند (280) مللي امبير و(24) فولت (~0.74) فولت/ سم.

12. يتم سحب الشرائح بلطف من محلول الترحيل الكهربائي القلوي ووضعاها على محلول التصيغ.

13. بعد ذلك، تم غمر الشرائح بعناية ثلاث مرات باستخدام محلول Buffer (PH 7.5) لمدة (5) دقائق لكل شريحة. بعد التحييد، تم تلوين الشرائح باستخدام محلول صبغة ايثيديوم برومايد او صبغة الاكريدين البرتقالية.

14. يتم تصوير مذنبات الحامض النووي باستخدام مجهر الفلورسنت، قيست اطوال الذيل باستخدام برنامج (Image J (NIH Soft wear MD USA))، تم تحليل مجموعة (100) خلية تم اختيارها عشوائياً لكل شريحة.

15. تم تقييم تلف الحامض النووي عن طريق حساب طول الذيل المذنب لكل خلية، وتم تقييم متوسط طول الذيل.

### 10.3. التحليل الاحصائي

تم استعمال برنامج التحليل الاحصائي (SPSS.V.28) للكشف عن تأثير عوامل الاختلاف في معايير الدراسة. استخدم اختبار Least Significant Difference (LSD) الاقل فرقاً معنوياً للمقارنة بين التراكيز.

## 4. النتائج

### 1.4. الكشف الكيميائي للمركبات الموجودة في العكبر الخام بطريقة (HPLC)

اظهرت نتائج الدراسة الحالية عند الكشف الكيميائي عن المركبات الموجودة في العكبر العراقي الخام الموجود في محافظة كربلاء عن وجود المركبات الموضحة في الجدول (1-4) والتي شملت المحتوى الكلي لكل من (الفينول، القلويد، الكلايكوسيد، التانين، الفلافون، الصابونين) مرتبة على التوالي من الأعلى الى الأقل وبالنسب أدناه.

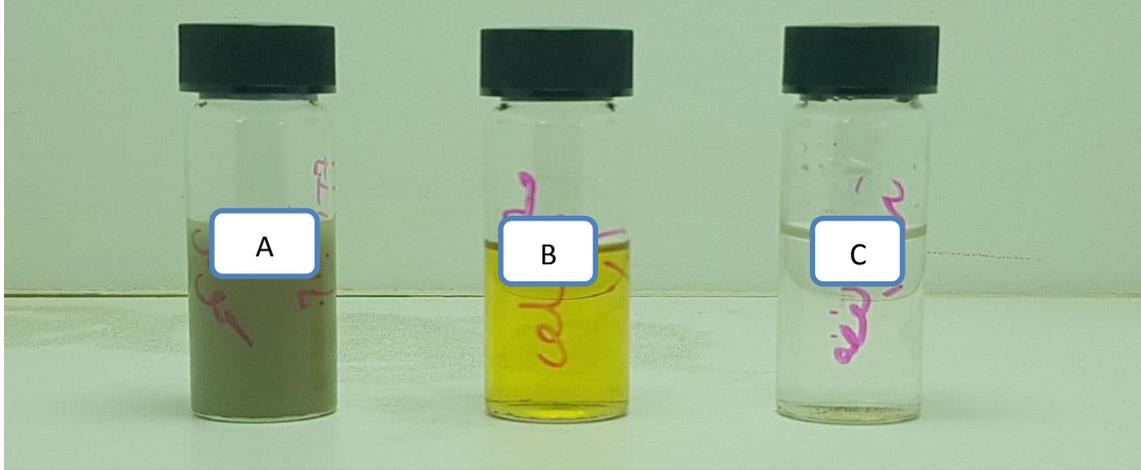
جدول (1-4) الكشف الكيميائي للمركبات الموجودة في العكبر الخام بطريقة HPLC

No	Name	Concent.
1	Total phenolic content ( mg Gallic / gm )	25.5
2	Total flavonoid content ( mg Rutin / gm )	2.9
3	Total glycoside content %	6.5
4	Total alkaloid content %	12.3
5	Total tannin content %	4.6
6	Total saponins content %	0.9

### 2.4. التخليق الحيوي لدقائق الفضة النانوية

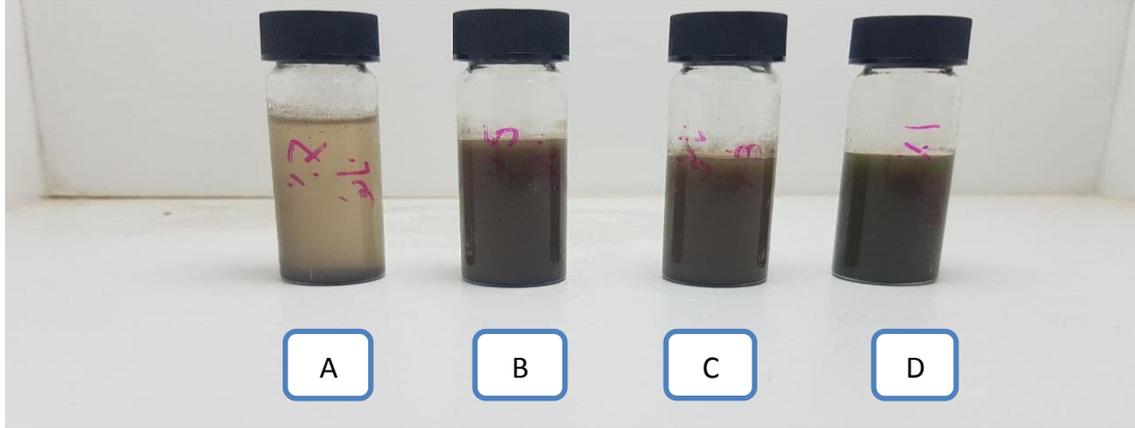
أظهرت نتائج الدراسة الحالية باستعمال مستخلص العكبر الايثانولي بإضافة محلول نترات الفضة بتركيز (1) ملي مولر وجود تغيرات لونية مقارنة مع المحلول الذي يحوي على مستخلص العكبر بدون محلول نترات الفضة  $AgNO_3$  هذه التغيرات اللونية تدرجت من اللون (البنّي) لتستقر الى اللون (الرمادي الفاتح)، الشكل (1-4)

استغرقت عملية التغير اللوني (120) ساعة عند درجة حرارة (25) م° الشكل (2-4)



الشكل (1-4) الفرق في اللون بين نترات الفضة والمستخلص الايثانولي والمستخلص النانوي

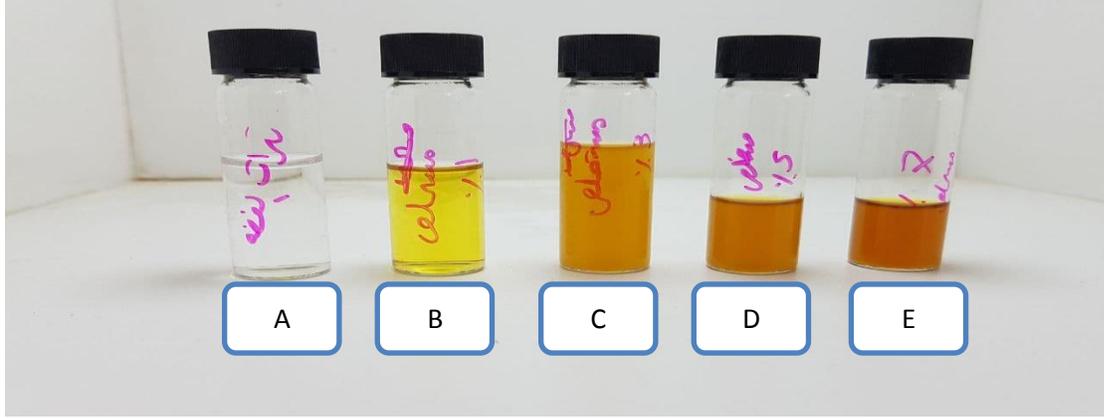
- A. مستخلص العكبر النانوي
- B. مستخلص العكبر الايثانولي
- C. نترات الفضة



الشكل (2-4) التراكيز الاربعة للمستخلص النانوي بعد مرور 120 ساعة

- A. مستخلص العكبر النانوي بتركيز 7%
- B. مستخلص العكبر النانوي بتركيز 5%
- C. مستخلص العكبر النانوي بتركيز 3%
- D. مستخلص العكبر النانوي بتركيز 1%

وقد تم تحضير اربعة تراكيز من المستخلص النانوي وهي (1%، 3%، 5%، 7%) على التوالي وكما مبين بالشكل (3-4).



شكل (3-4) التخليق الحيوي لدقائق الفضة النانوية بإستعمال المستخلص الايثانولي للعكبر (propolis)

A. نترات الفضة

B. مستخلص العكبر الايثانولي بتركيز 1%

C. مستخلص العكبر الايثانولي بتركيز 3%

D. مستخلص العكبر الايثانولي بتركيز 5%

E. مستخلص العكبر الايثانولي بتركيز 7%

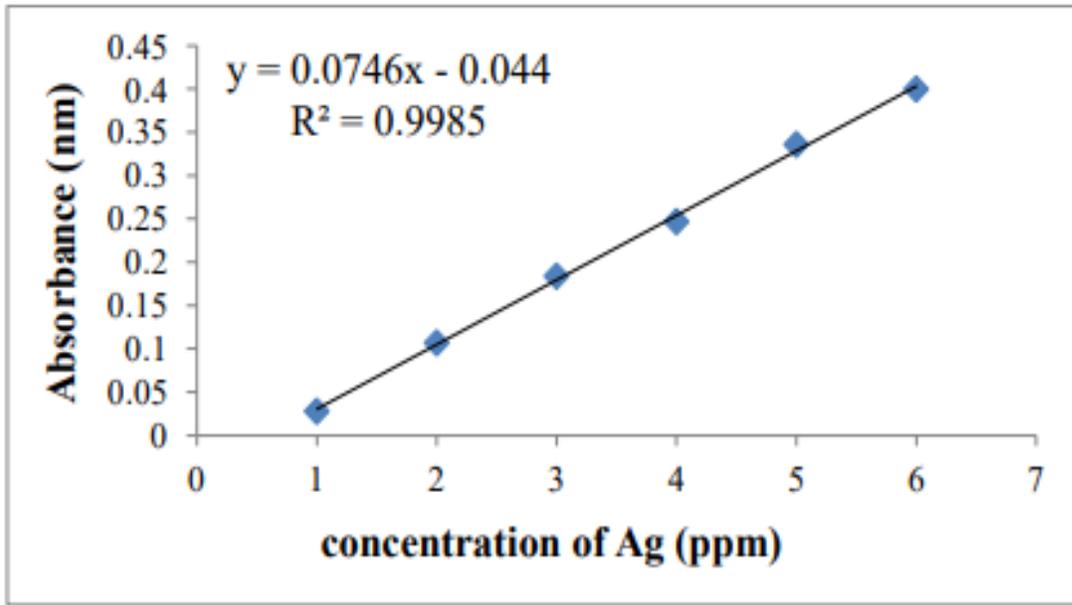
### 3.4. تشخيص وتوصيف دقائق العكبر النانوية المحضرة بالتخليق الحيوي

تم استخدام ثلاث طرائق لتشخيص مستخلص العكبر النانوي وهي:

#### 1.3.4. جهاز مقياس الامتصاص الذري الطيفي (AAS)

### Atomic Absorption Spectroscopy

حضرت تراكيز مختلفة من نترات الفضة ( $AgNO_3$ ) (1،2،3،4،5،6) ملي مولر في ماء منزوع الايونات واستخدمت كمعيار تم من خلاله الحصول على منحنى المعايرة، شكل (4-4). كانت التراكيز لمستخلص العكبر الايثانولي (1،3،5،7%) وقراءة الجهاز (200، 350، 500، 650) جزء في المليون لجسيمات الفضة النانوية لمستخلص العكبر الكحولي.



الشكل (4-4) المنحنى القياسي لتركيز محاليل نترات الفضة  $AgNO_3$  لتحديد تركيز ايونات الفضة

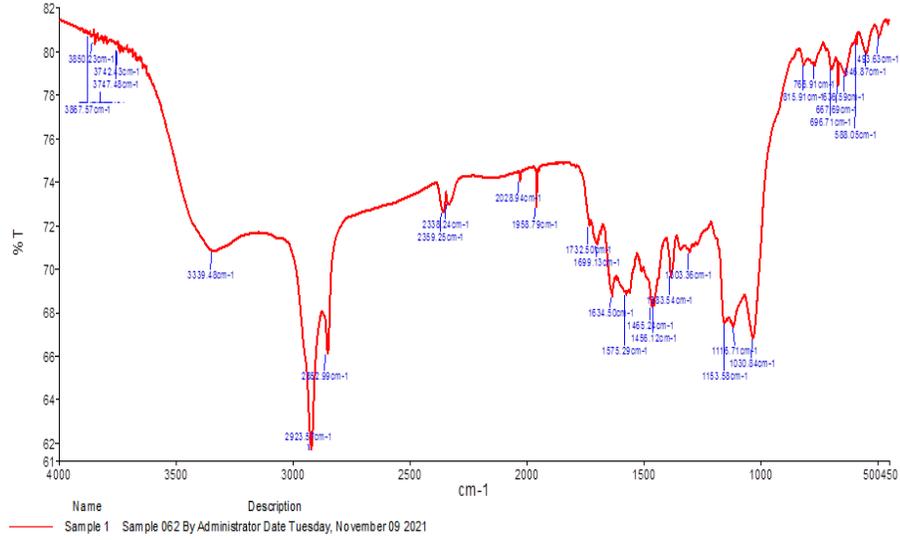
#### 2.3.4. التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء

بينت نتائج الدراسة الحالية ظهور العديد من المنحنيات والتي تدل على وجود الاواصر بين

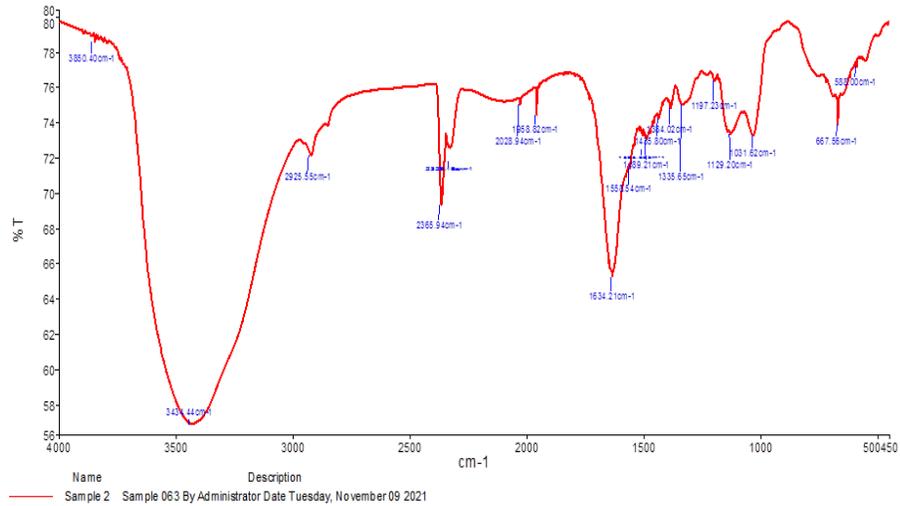
المستخلص الكحولي للعكبر والجسيمات النانوية شكل (4-5)

أثبت التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء للمستخلص الايثانولي للعكبر في وضع الانعكاس الكلي المخفف والمدى الطيفي من 450-4000 سم<sup>-1</sup> بدقة 4 سم<sup>-1</sup> وجود نطاقات امتصاص عند المدى (588، 667، 1634، 1958، 2028)سم<sup>-1</sup>

اما المستخلص النانوي للعكبر فقد أثبت التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء وجود نطاقات امتصاص عند المدى (588، 667، 1031، 1384، 1634، 1958، 2028، 2925) سم<sup>-1</sup>. تشير النطاقات الاهتزازية الممتدة الى المركبات المسؤولة عن حدوثها وابرزها مجاميع الفلافون وبالتالي يمكن اعتبارها المسؤولة عن التغطية الفعالة وتثبيت AgNPs .



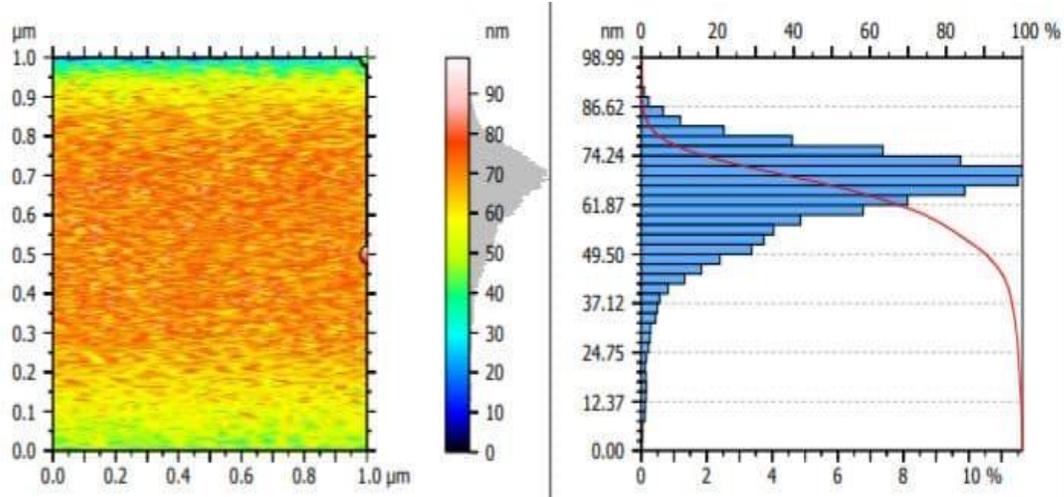
شكل (4-5) التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء Fourier transform infrared للمستخلص الكحولي للعكبر



شكل (4-6) التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء Fourier transform infrared لجسيمات الفضة النانوية المحضرة بواسطة المستخلص الكحولي لنبات للعكبر

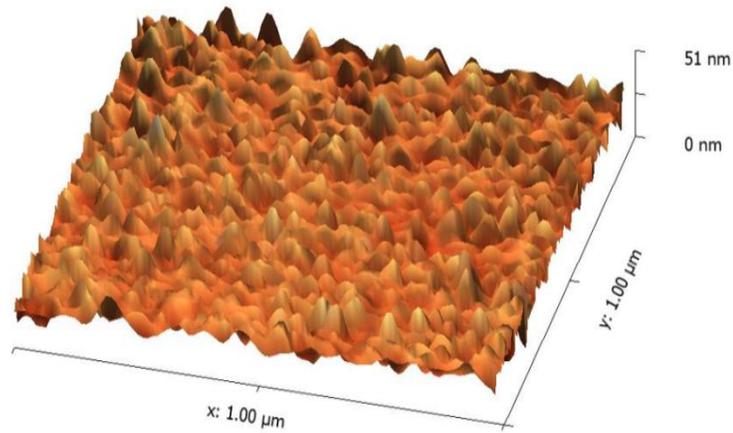
### 3.3.4. الفحص بواسطة مجهر القوة الذرية

أظهرت نتائج الدراسة الحالية لعملية الكشف عن طبيعة سطح دقائق النانوية المتخلقة والتي بينت خشونة السطح الجسيمات النانوية فضلا عن شكل وحجم الدقائق المتخلقة ومدى نكتلتها وكما في الشكل (4-7).



(أ)

(ب)



(ج)

شكل (4-7): (أ) العمود الرقمي لمدى حجم AgNPs للعكبر

(ب) صورة AFM ثنائي الأبعاد من AgNPs للعكبر

(ج) صورة AFM ثلاثية الأبعاد من AgNPs للعكبر.

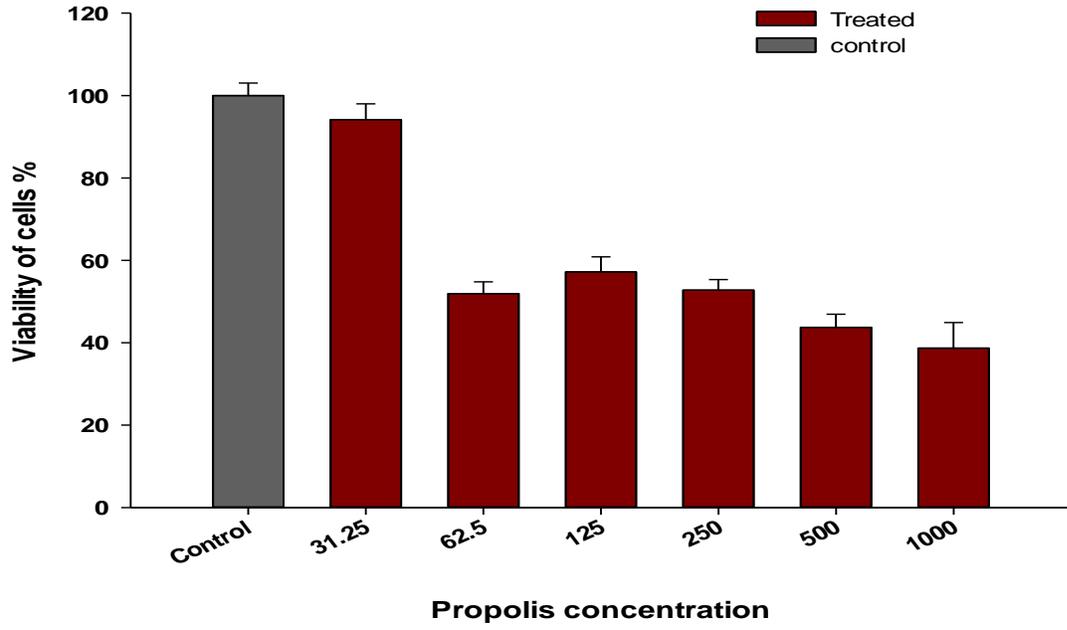
أظهرت نتائج تحليل AFM كلاً من العرض ثنائي الأبعاد وثلاثي الأبعاد لمستخلص العكبر النانوي ان جسيمات العكبر النانوية كانت كروية الشكل مفردة أو متجمعة تتراوح اقطارها بين (65.09 - 72.48) نانومتر بمتوسط حجم (70) نانوميتر.

#### 4.4. التأثيرات السمية لمستخلصات العكبر في خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480)

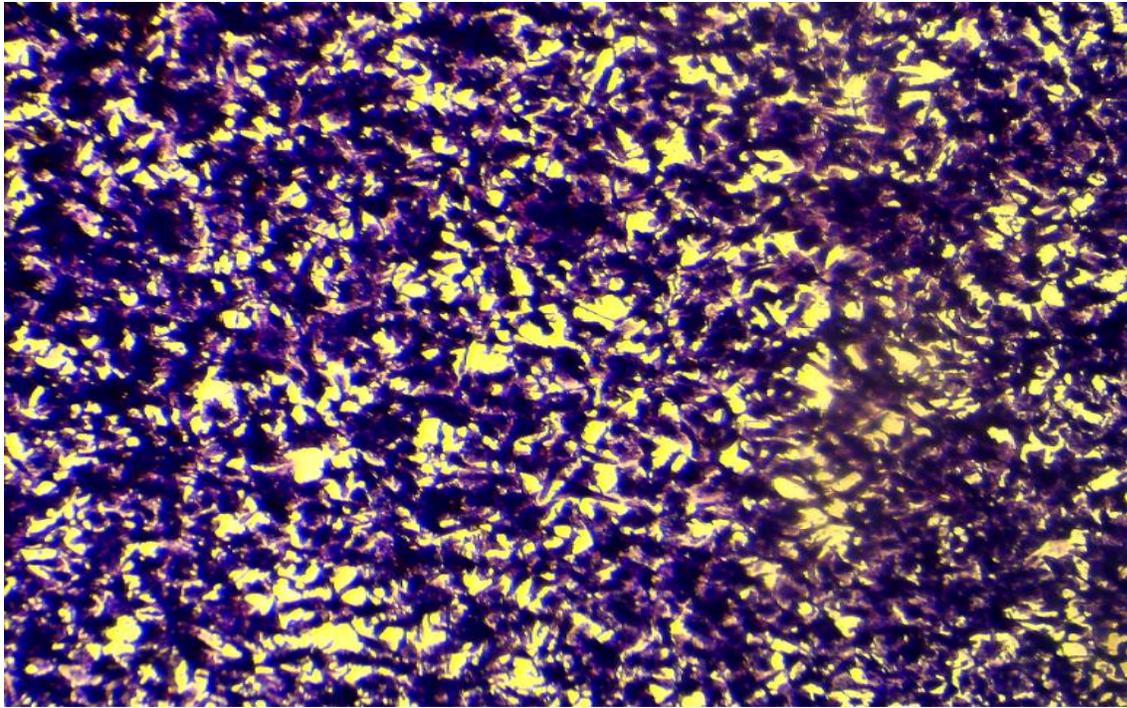
بينت نتائج الدراسة الحالية وجود تأثير سمي خلوي لمستخلصي العكبر الايثانولي والنانوي بأستعمال ستة تراكيز متسلسلة للمستخلص الايثانولي هي (1000، 500، 250، 125، 62.5، 31.25) ملغم/ مل واربعة تراكيز متسلسلة للمستخلص النانوي هي (7%، 5%، 3%، 1%) ملغم/ مل لمدة زمنية من التعريض (24)، ساعة حيث حسبت السمية اعتماداً على حساب معدل النسبة المئوية لتثبيط الخلايا (Inhibition Rate) بعد تعريض الخلايا لمستخلص العكبر الايثانولي ومقارنته بالسيطرة استخدمت صبغة MTT لصبغ الخلايا الحية ثم قيست الكثافة الضوئية عند الطول الموجي (550) نانوميتر.

#### 5.4. تأثير مستخلص العكبر الايثانولي في خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480)

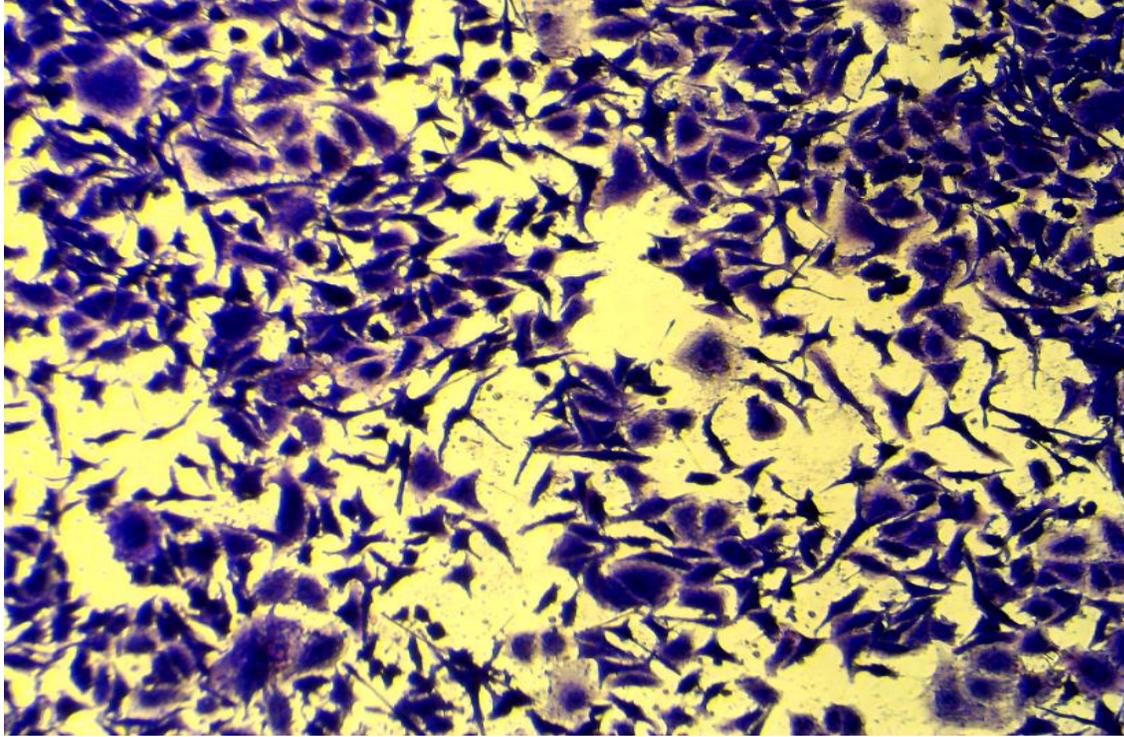
اظهرت نتائج الدراسة الحالية شكل (4-8) تأثير المستخلص الكحولي للعكبر في خط خلايا سرطان القولون، ان اعلى نسبة للتثبيط كانت عند (1000) و(500)  $\mu\text{g/ml}$  عند مستوى معنوية ( $p < 0.05$ ) بينما كانت اقل نسبة تثبيط عند (31.25)  $\mu\text{g/ml}$ .



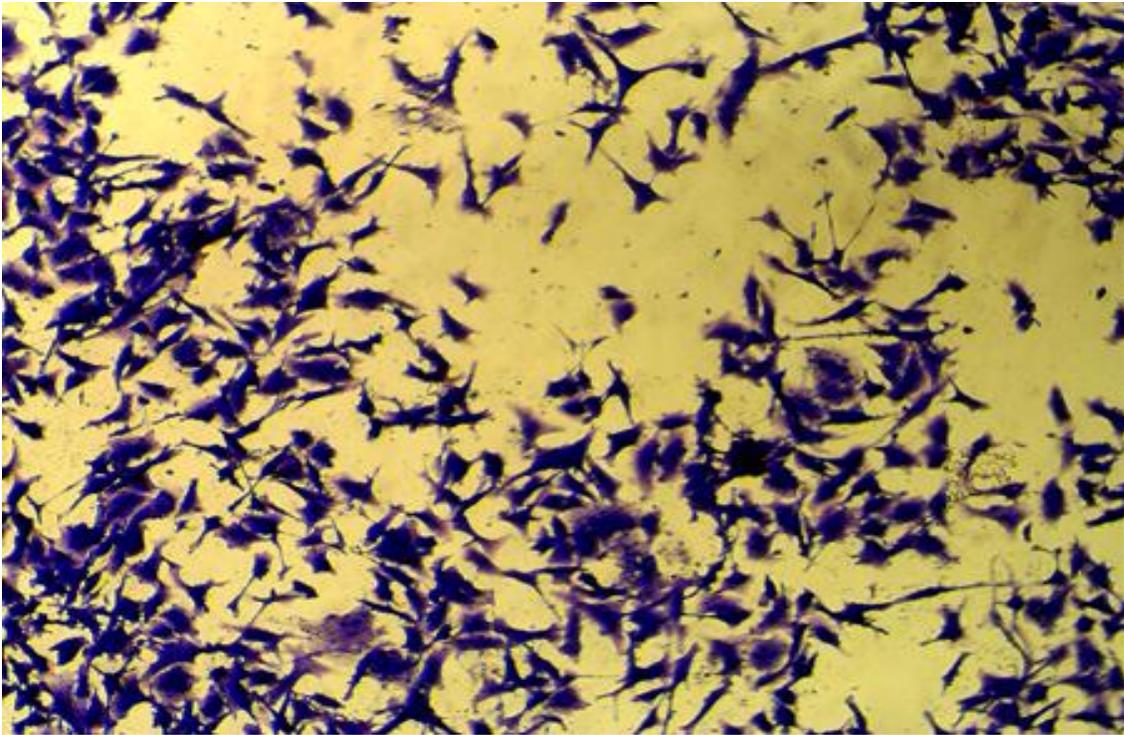
شكل (8-4) تأثير المستخلص الايثانولي للعكبر مقارنة بـ Control على خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480)



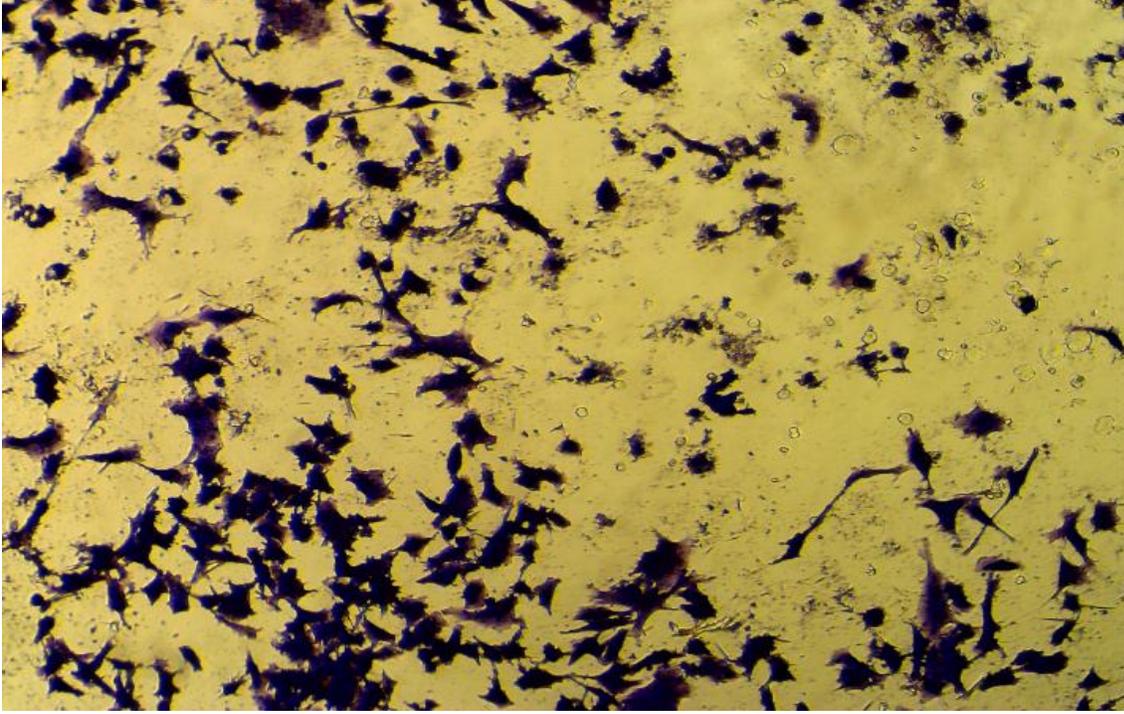
شكل (9-4) خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480) السيطرة (غير المعاملة بالمستخلص).



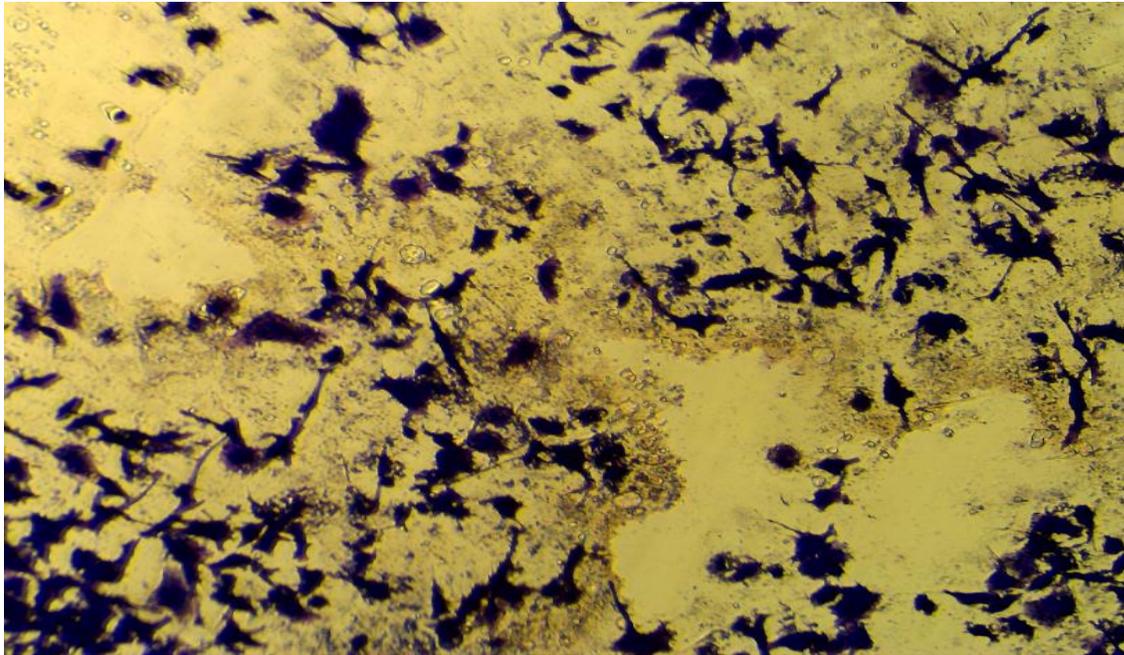
شكل (10-4) خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480) المعاملة بتركيز (31.25 µg/ml).



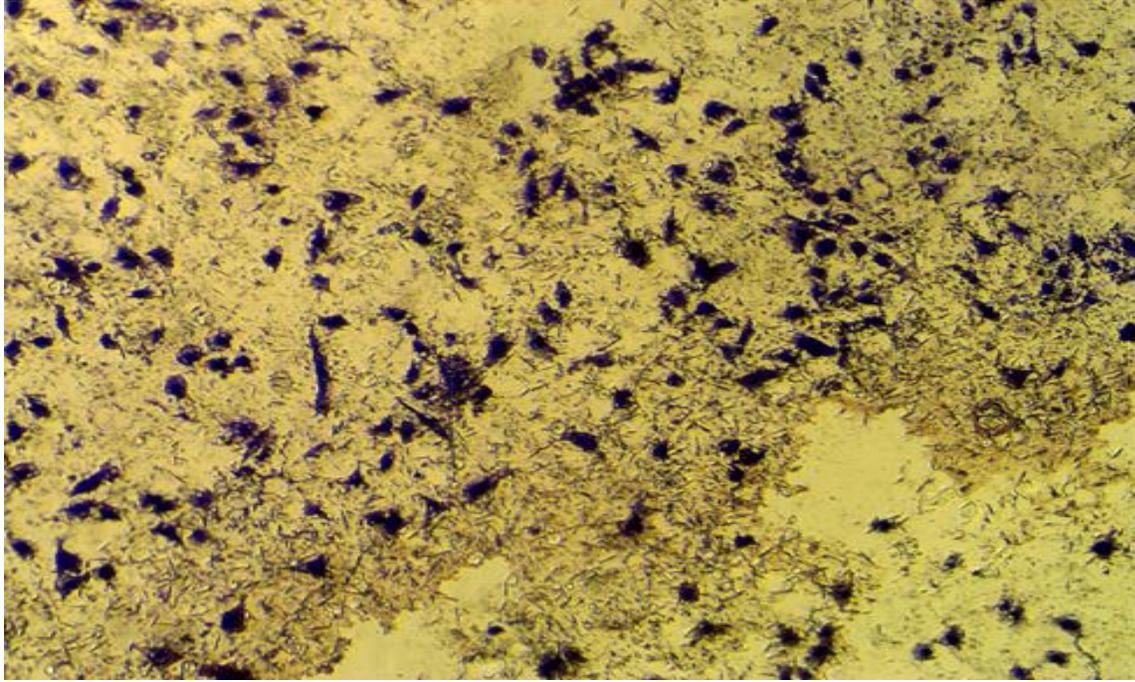
شكل (11-4) خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480) المعاملة بتركيز (62.5µg/ml).



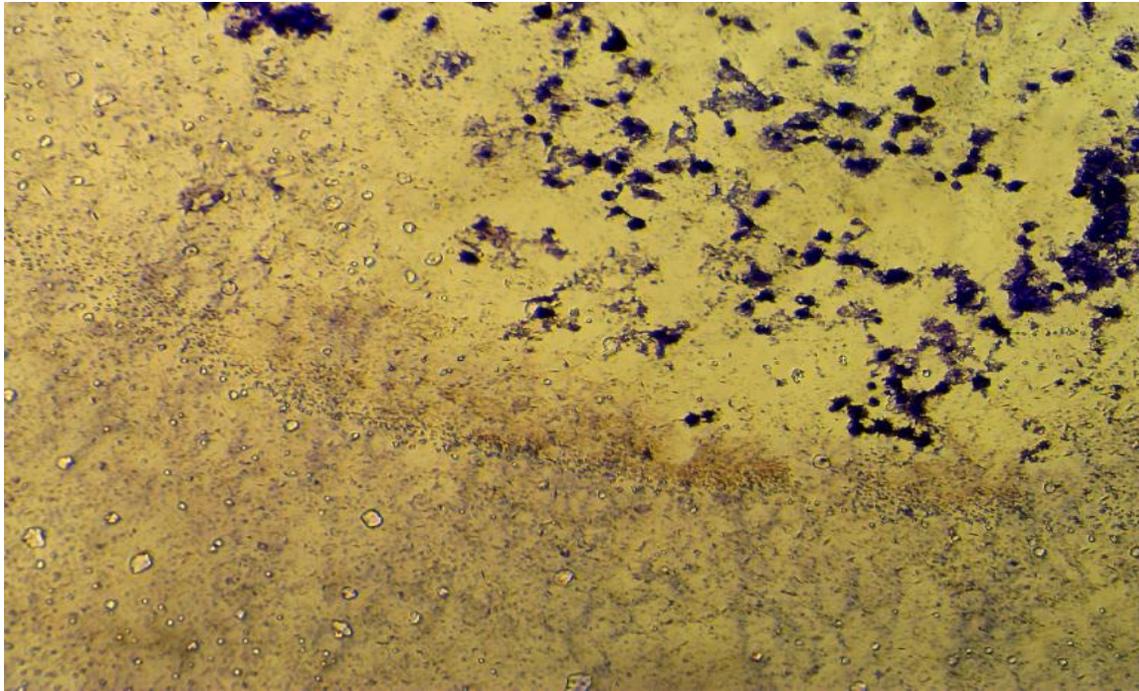
شكل (12-4) خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر الايثانولي عند تركيز (125 µg/ml).



شكل (13-4) خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر الايثانولي عند تركيز (250 µg/ml).



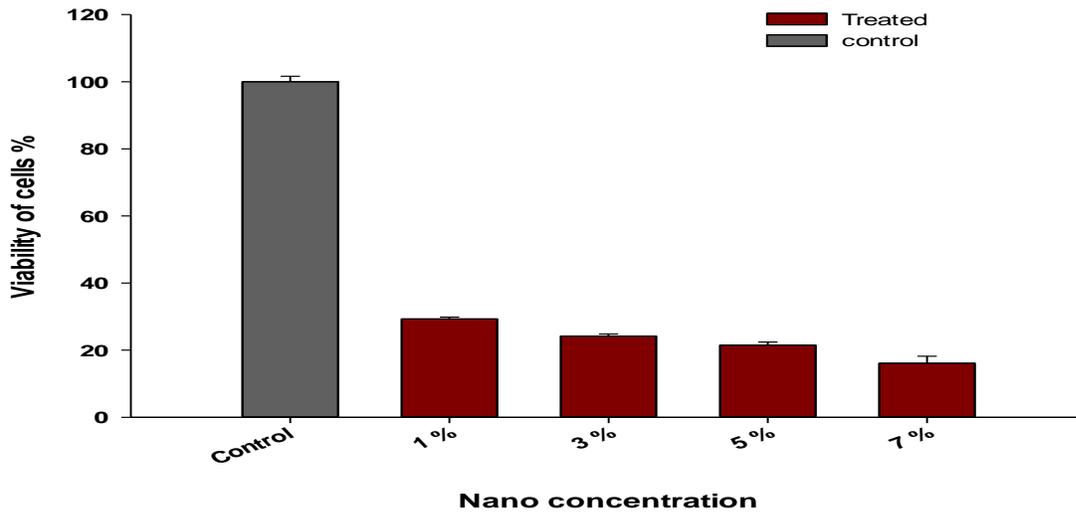
شكل (14-4) خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر الايثانولي عند تركيز (500 µg/ml).



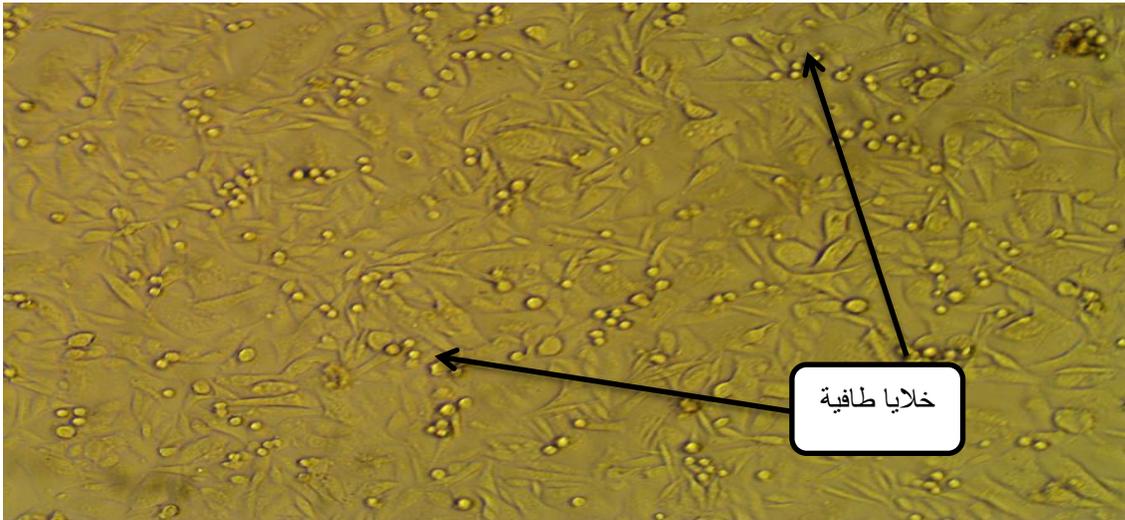
شكل (15-4) خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر الايثانولي عند تركيز (1000 µg/ml).

## 6.4. تأثير مستخلص العكبر النانوي في خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480)

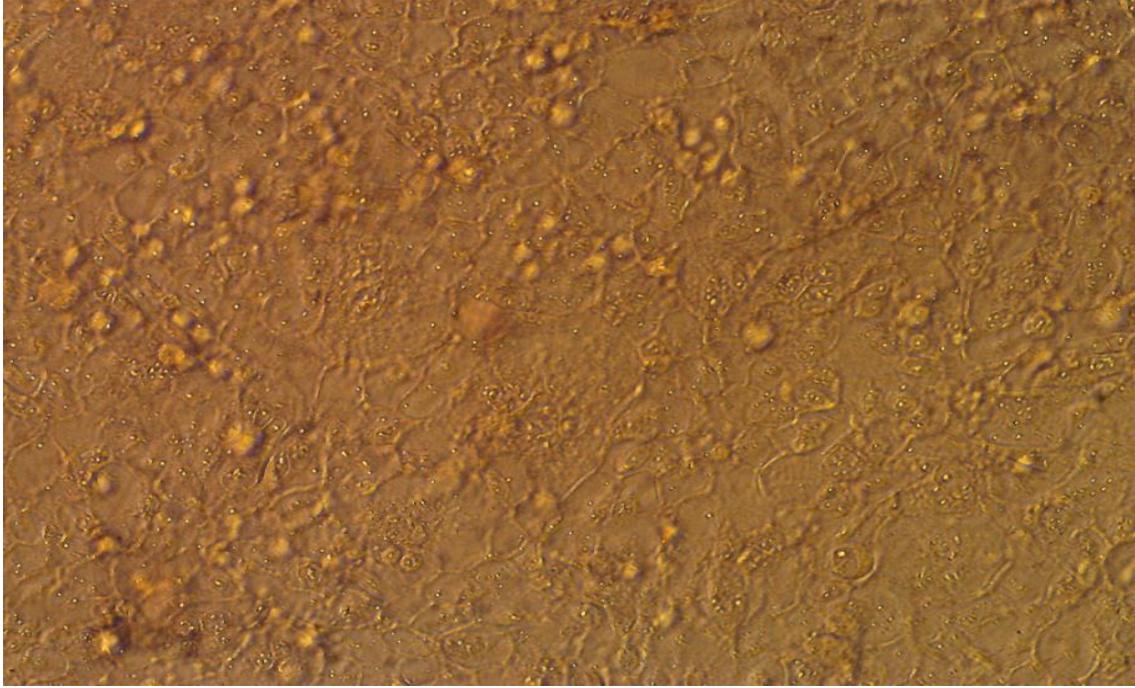
بينت نتائج الدراسة الحالية شكل (4-16) تأثير المستخلص النانوي للعكبر في خط خلايا سرطان القولون، ان اعلى نسبة للتثبيط كانت عند (7%) و(5%) عند مستوى معنوية ( $p < 0.05$ ) بينما كانت اقل نسبة تثبيط عند (1%).



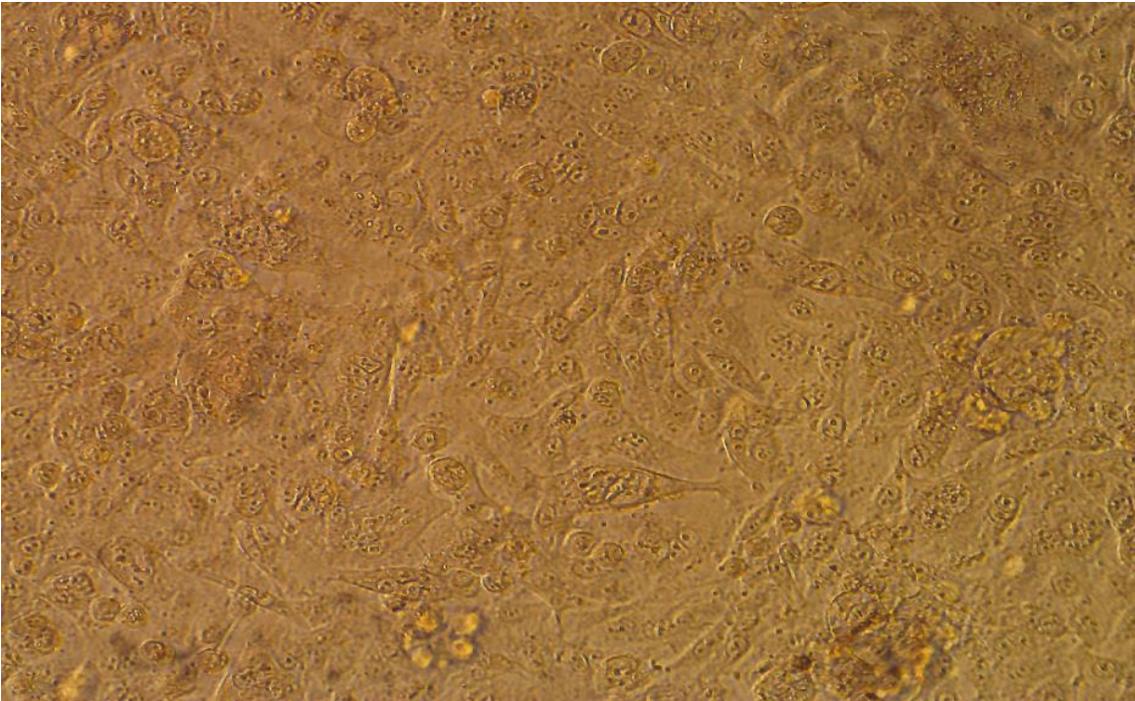
شكل (4-16) تأثير المستخلص النانوي للعكبر مقارنة بـ Control على خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480).



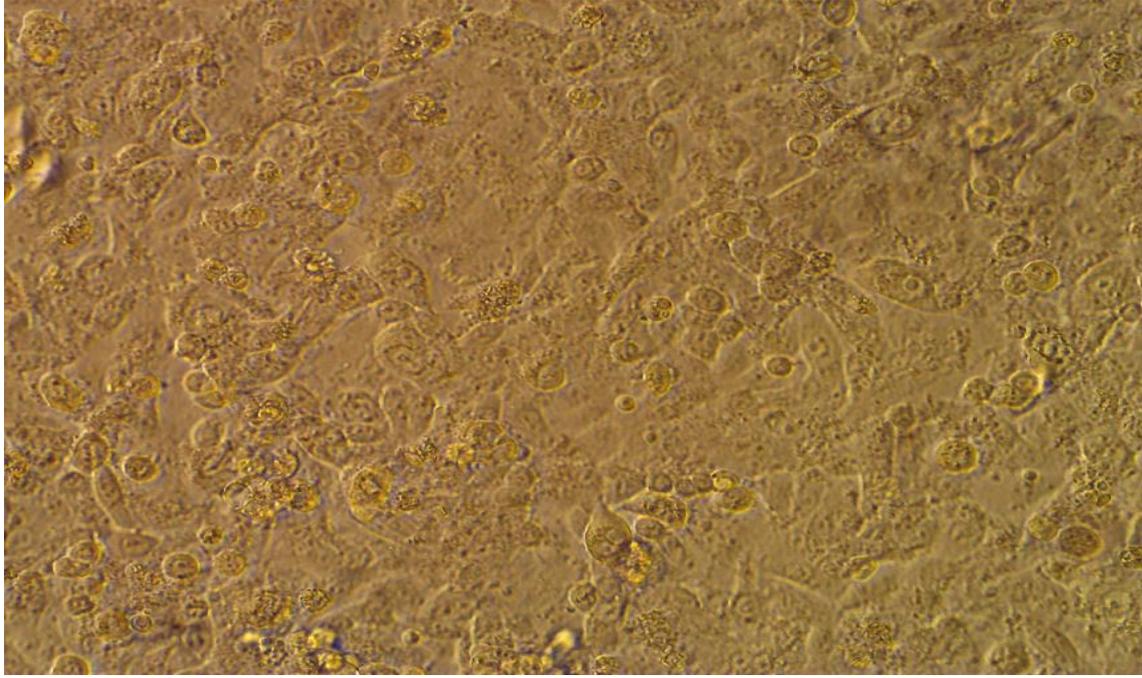
شكل (4-17) خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480) السيطرة (غير المعاملة بالمستخلص).



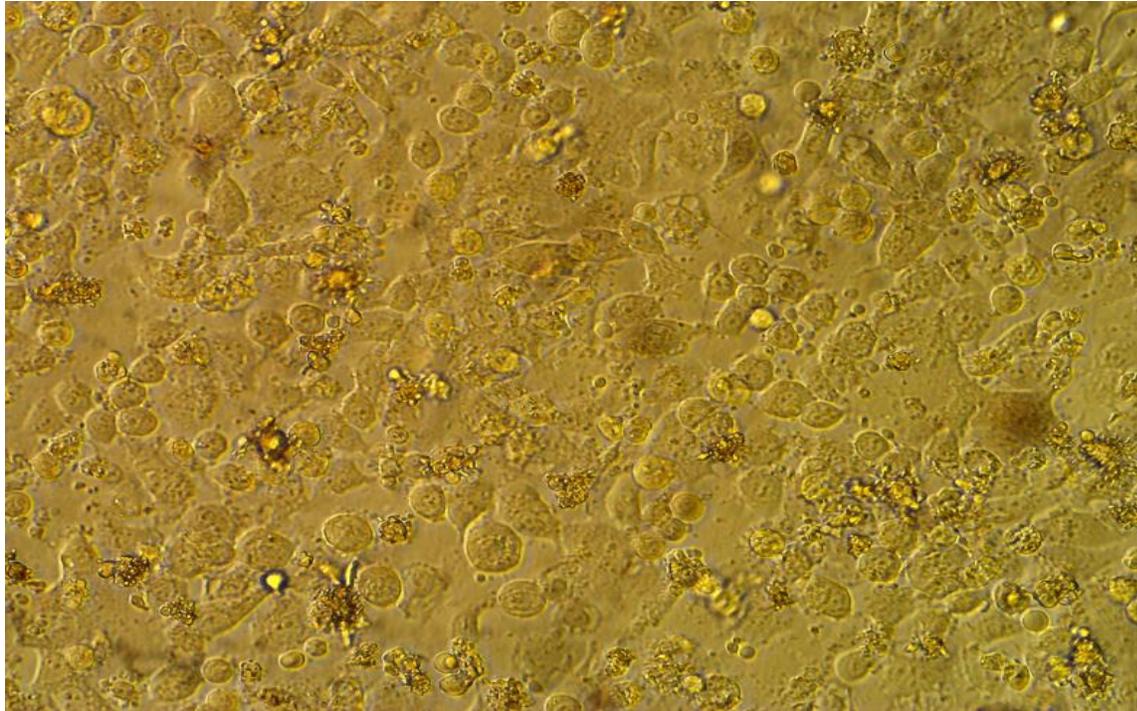
شكل (4-18) خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر النانوي عند تركيز (1%).



شكل (4-19) خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر النانوي عند تركيز (3%).



شكل (20-4) خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر النانوي عند تركيز (5%).



شكل (21-4) خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر النانوي عند تركيز (7%).

#### 7.4. تأثير المستخلص العكبر الايثانولي على نسبة تحطم DNA

اظهرت نتائج الدراسة الحالية ارتفاع معنوي عند مستوى ( $P < 0.05$ ) في نسبة تحطم الـ DNA بأستعمال اختبار المذنب Comet assay حيث كانت نسبة التحطم عالية في التراكيز (500، 250، 1000)  $\mu\text{g/ml}$  بينما كانت نسبة التحطم متوسطة في التركيز (125)، (62.5)  $\mu\text{g/ml}$  وكانت نسبة التحطم قليلة في التركيز (31.25)  $\mu\text{g/ml}$  مقارنة بالسيطرة.

جدول (2-4) تأثير مستخلص العكبر الايثانولي على نسبة تحطم الـ DNA

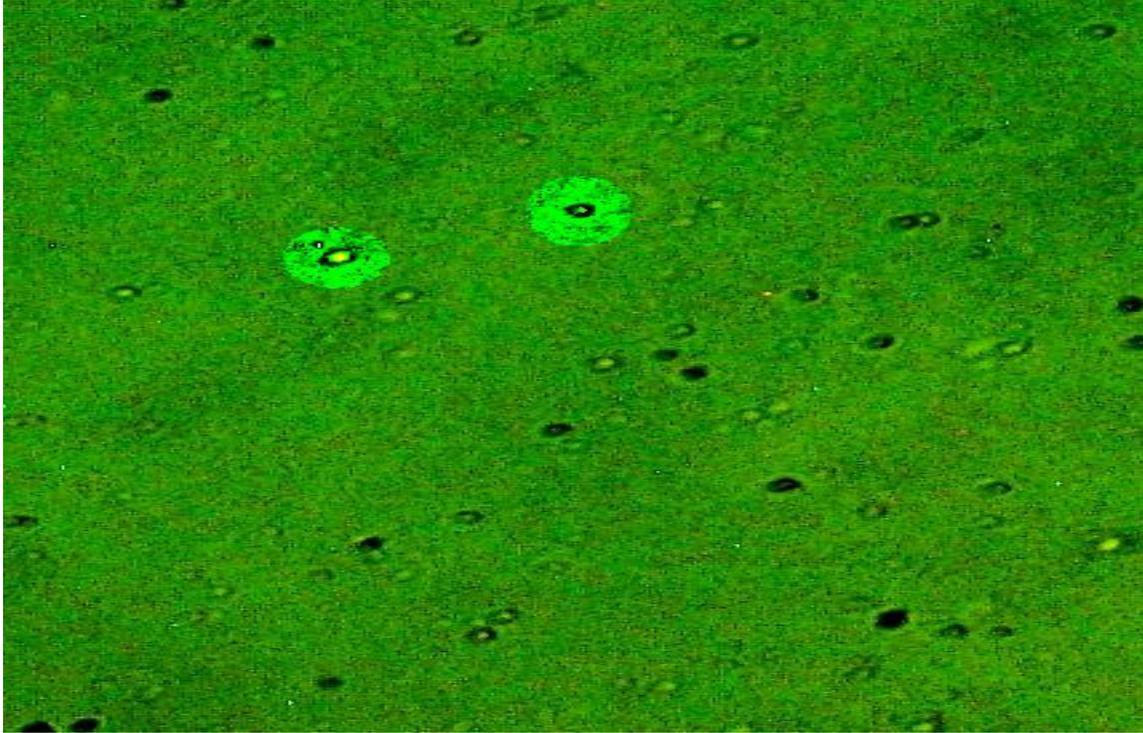
التراكيز	Mean	L/W	No. $\pm$ SE	P% $\pm$ SE
السيطرة	84.96	1	50 $\pm$ 0.45	100 $\pm$ 0.45
31.25	66.32	1.19	2 $\pm$ 0.68	4 $\pm$ 0.68
62.5	78.229	1.19	3 $\pm$ 0.13	6 $\pm$ 0.13
125	150.983	1.3	3 $\pm$ 0.34	6 $\pm$ 0.34
250	56.86	1.5	6 $\pm$ 1.50	12 $\pm$ 1.50
500	77.21	1.5	8 $\pm$ 0.18	16 $\pm$ 0.18
1000	48.97	1.6	14 $\pm$ 2.31	28 $\pm$ 2.31

Mean: متوسط عدد الخلايا التالفة والغير تالفة

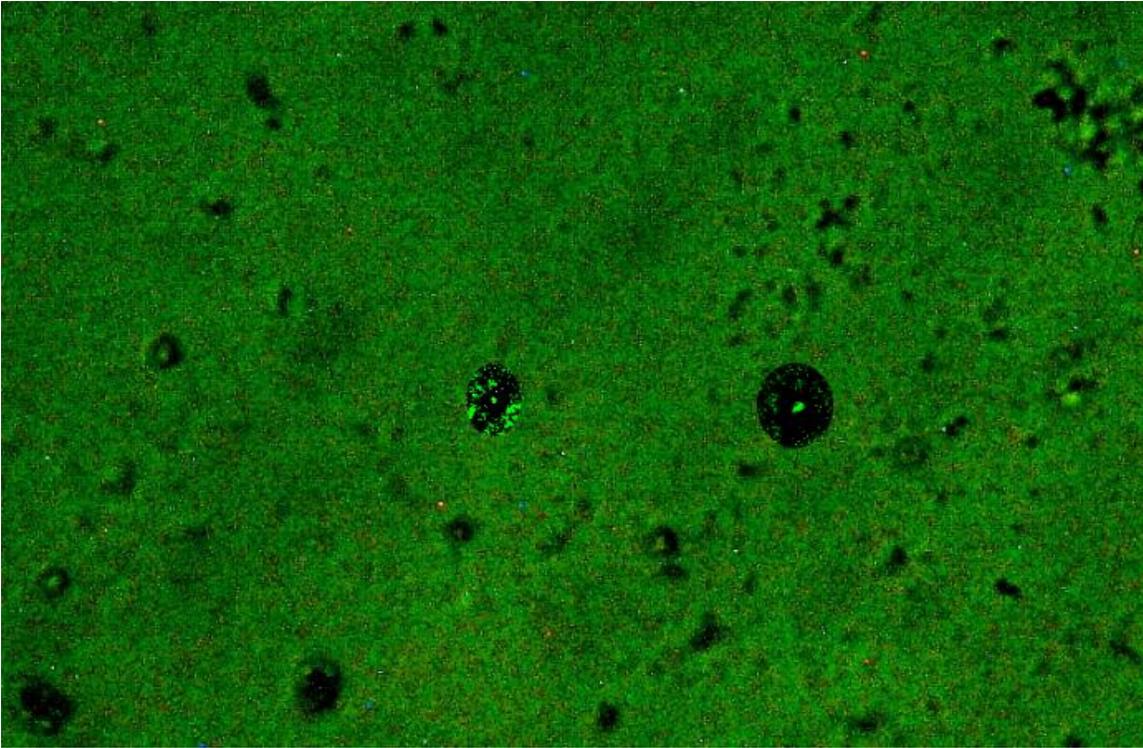
No.  $\pm$  SE: عدد الخلايا التالفة في العينة  $\pm$  الخطأ القياسي

P%  $\pm$  SE: النسبة المئوية للخلايا التالفة في العينة  $\pm$  الخطأ القياسي

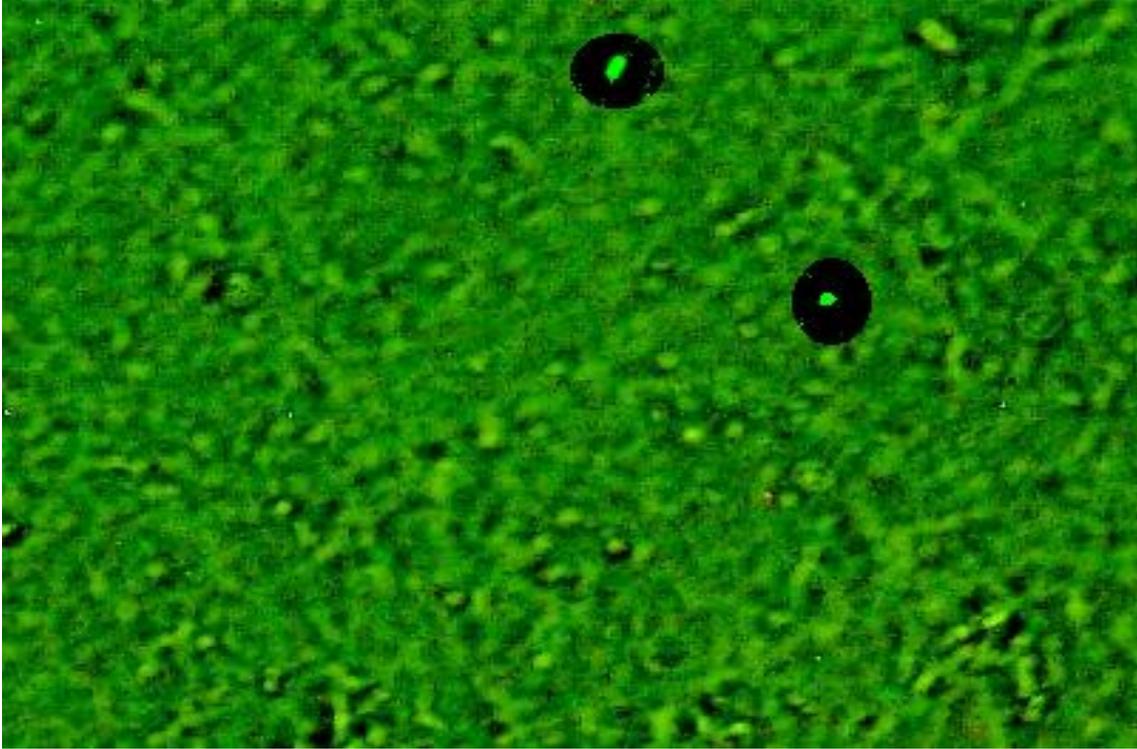
L/W: طول الخلية/ عرض الخلية



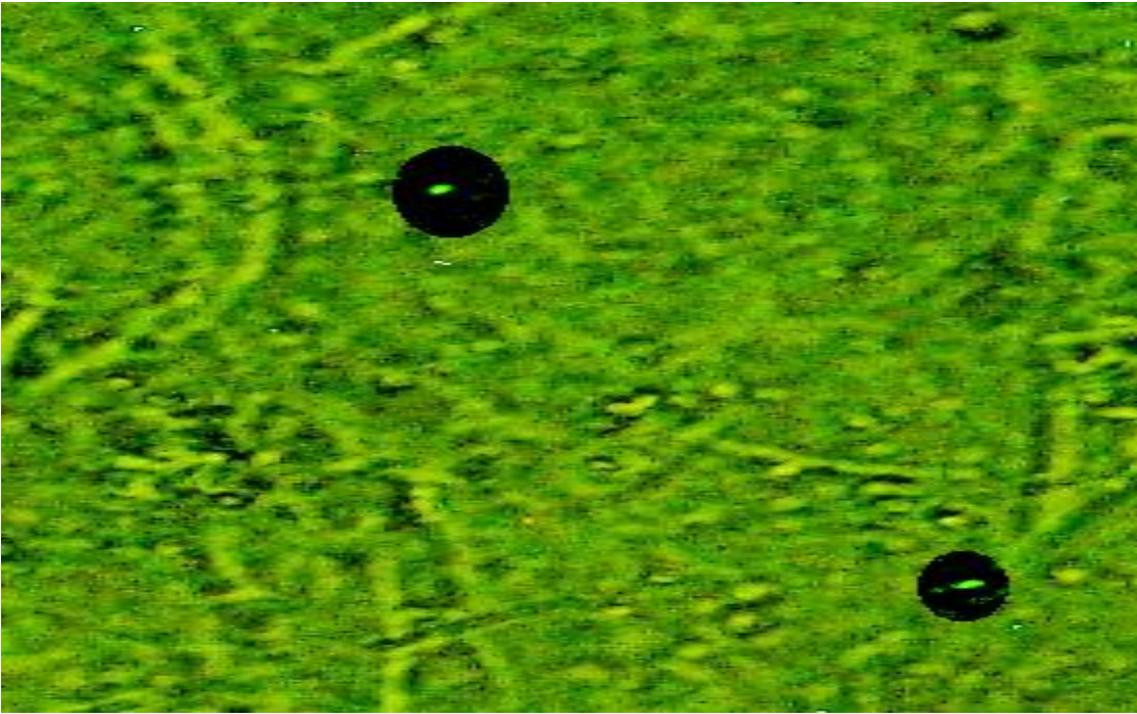
شكل (22-4) خط خلايا سرطان القولون (SW480) السيطرة (غير المعاملة بالمستخلص).



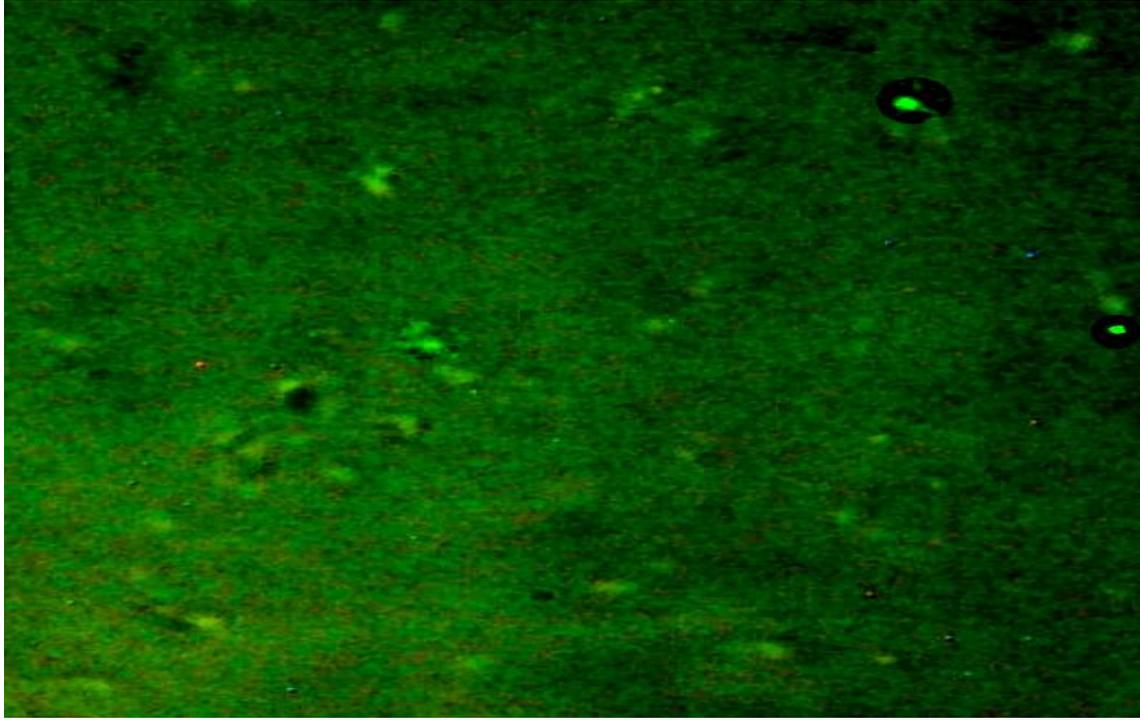
شكل (23-4) خط خلايا سرطان القولون (SW480) المعاملة بتركيز (31.25 µg/ml).



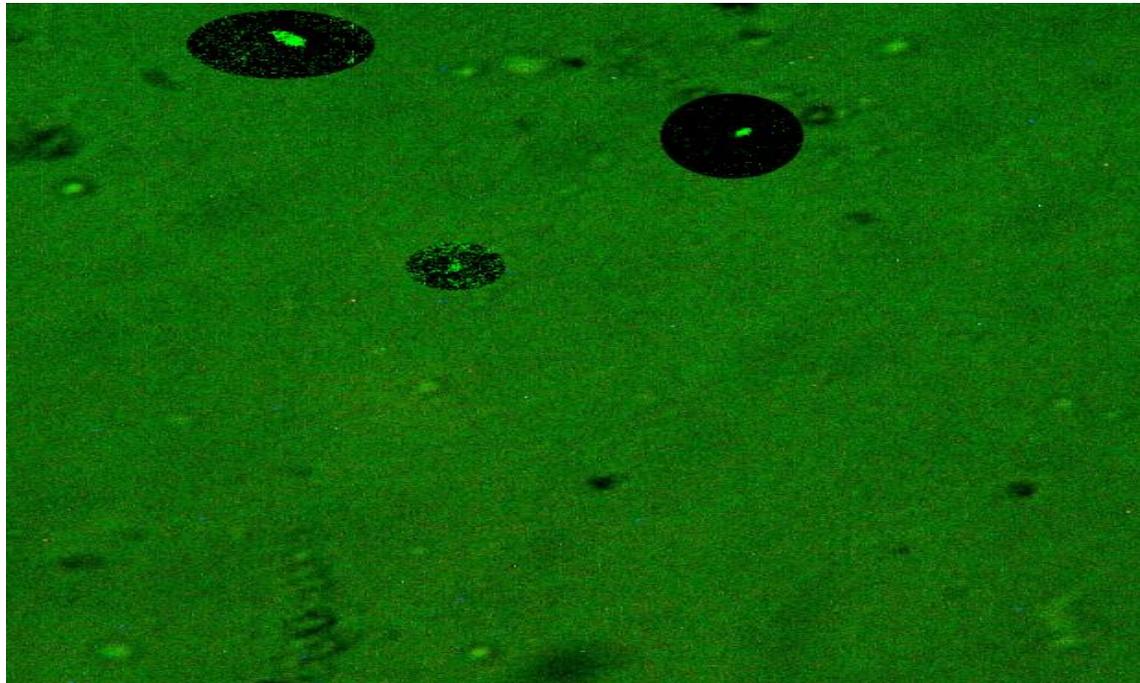
شكل (24-4) خط خلايا سرطان القولون (SW480) المعاملة بتركيز (62.5 µg/ml).



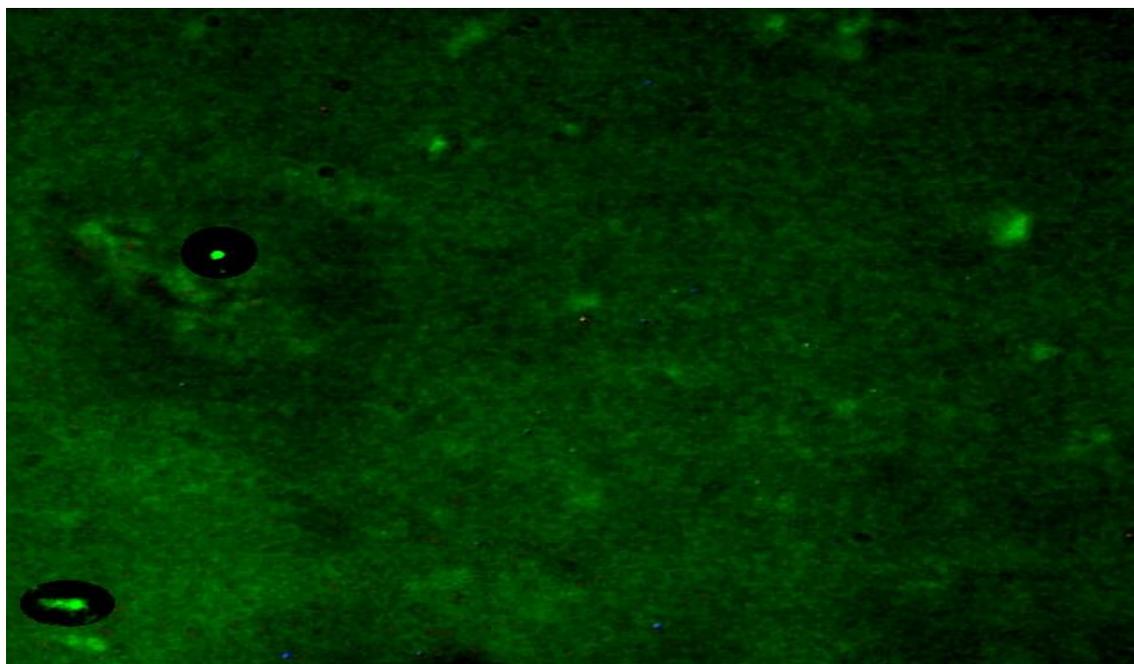
شكل (25-4) خط خلايا سرطان القولون (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر الايثانولي عند تركيز ( 125 µg/ml).



شكل (26-4) خط خلايا سرطان القولون (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر الايثانولي عند تركيز ( 250 µg/ml).



شكل (27-4) خط خلايا سرطان القولون (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر الايثانولي عند تركيز ( 500 µg/ml).



شكل (28-4) خط خلايا سرطان القولون (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر الايثانولي عند تركيز ( 1000  $\mu\text{g/ml}$ ).

#### 8.4. تأثير المستخلص العكبر النانوي على نسبة تحطم DNA

بينت نتائج الدراسة الحالية ارتفاع معنوي عند مستوى ( $P < 0.05$ ) في نسبة تحطم الـ DNA بأستعمال اختبار المذنب Comet assay حيث كانت نسبة التحطم عالية في التراكيز (7%، 5%) بينما كانت نسبة التحطم متوسطة في التركيز (3%) وكانت نسبة التحطم قليلة في التركيز (1%) مقارنة بالسيطرة.

جدول (3-4) تأثير مستخلص العكبر الايثانولي على نسبة تحطم الـ DNA

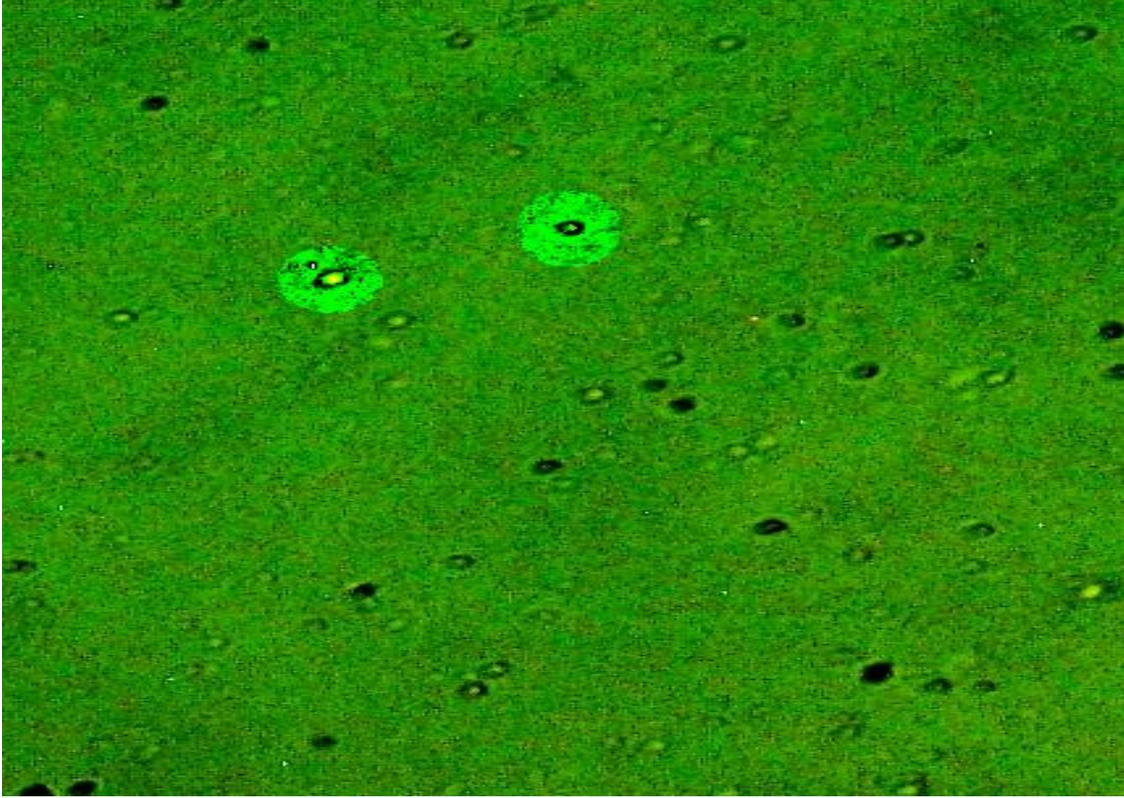
التراكيز	Mean	L/W	No. $\pm$ SE	P% $\pm$ SE
السيطرة	84.96	1	50 $\pm$ 0.45	100 $\pm$ 0.45
1%	37.50	1.9	14 $\pm$ 1.02	28 $\pm$ 0.47
3%	34.40	2.2	14 $\pm$ 0.47	28 $\pm$ 0.47
5%	145.80	2.2	17 $\pm$ 0.79	34 $\pm$ 0.79
7%	67.30	2.8	21 $\pm$ 0.18	42 $\pm$ 0.18

Mean: متوسط عدد الخلايا التالفة والغير تالفة

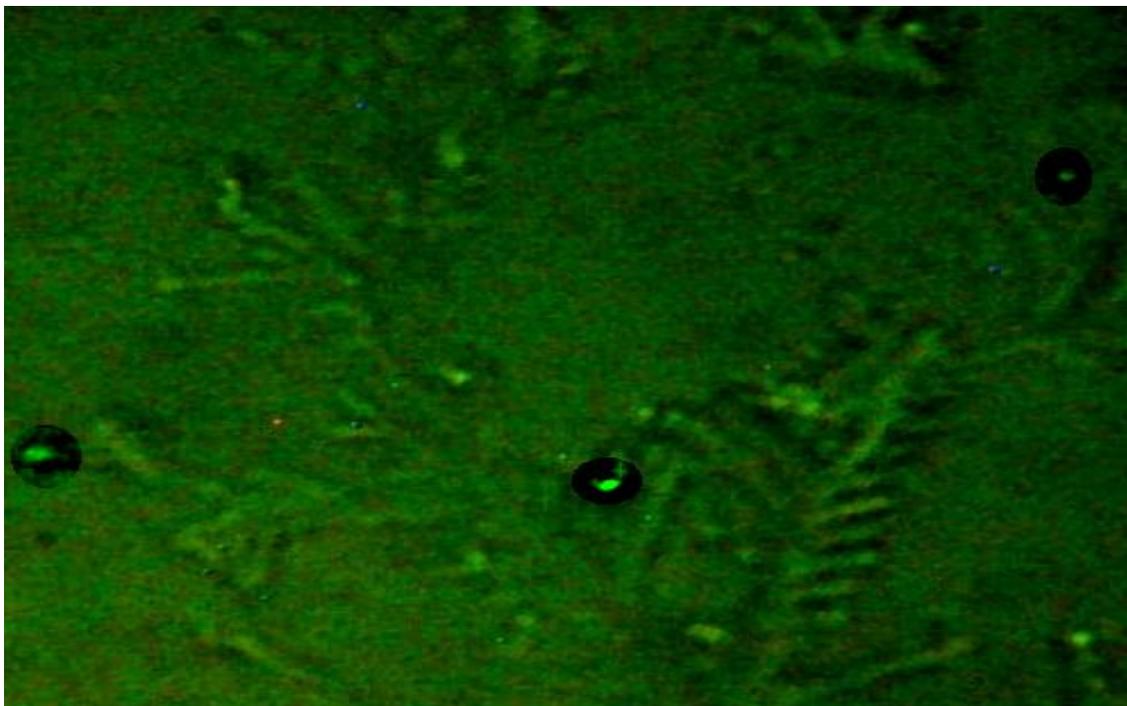
No.± SE: عدد الخلايا التالفة في العينة ± الخطأ القياسي

P%+ SE: النسبة المئوية للخلايا التالفة في العينة ± الخطأ القياسي

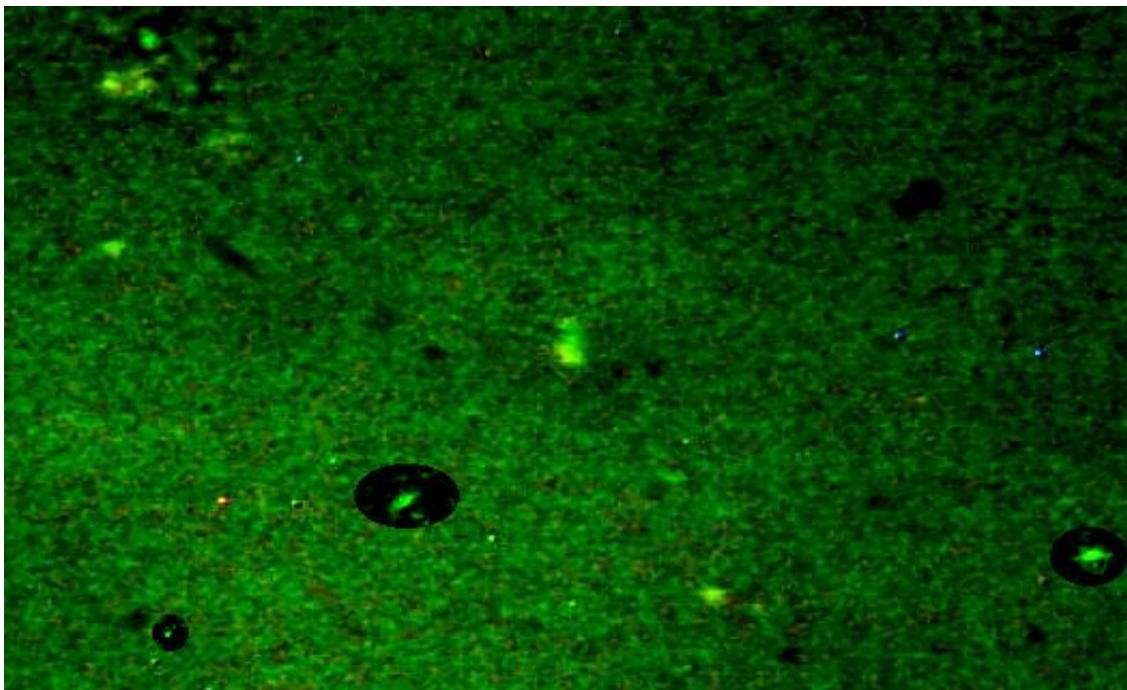
L/W: طول الخلية/ عرض الخلية



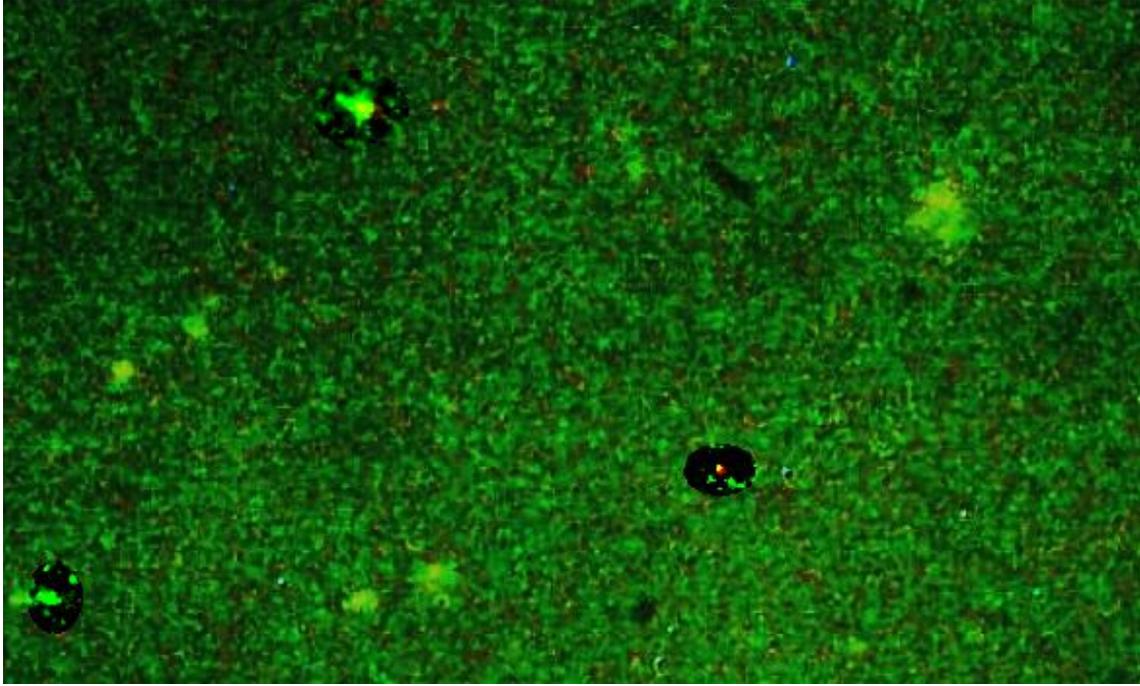
شكل (29-4) خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480) السيطرة (غير المعاملة بالمستخلص).



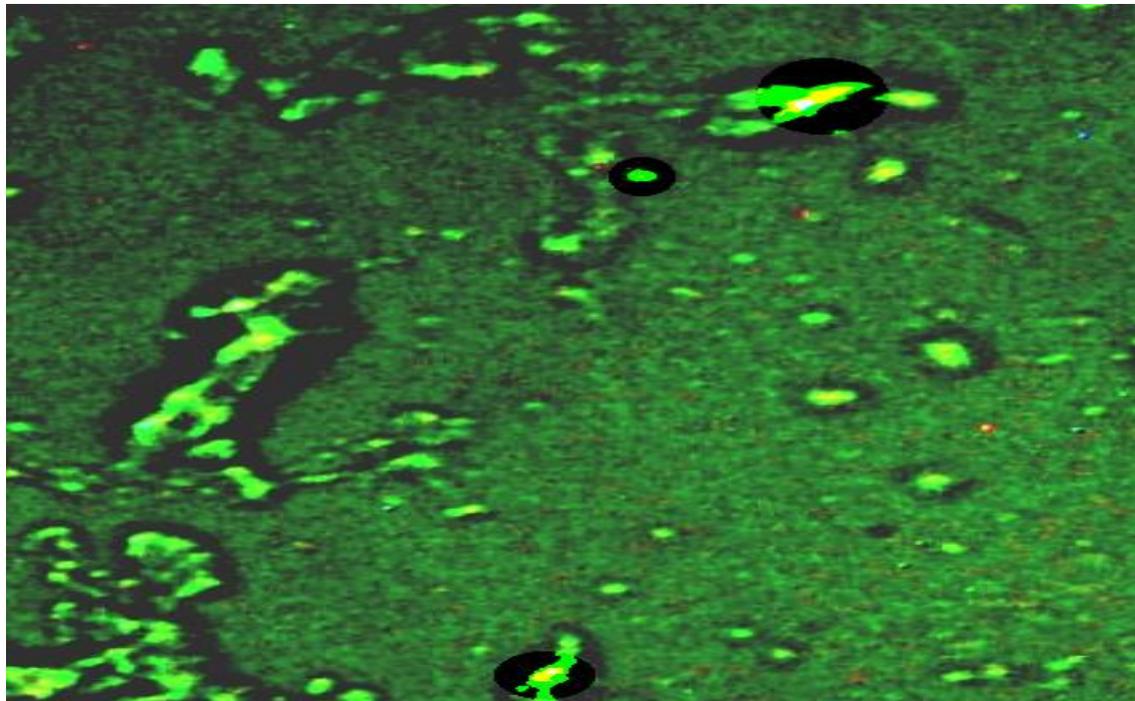
شكل (30-4) خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر النانوي عند تركيز (1%).



شكل (31-4) خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر النانوي عند تركيز (3%).



شكل (4-32) خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر النانوي عند تركيز (5%).



شكل (4-33) خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480) المعاملة بمستخلص العكبر النانوي عند تركيز (7%).

## 5. المناقشة

هناك وعي متزايد بالتأثير الضار للمنتجات الاصطناعية المستخدمة في مجالات مختلفة على صحة الإنسان ومن حيث الاهتمام المتجدد بخصائص المنتجات الطبيعية بما في ذلك منتجات النحل ومنها العكبر الذي يعد مصدر للمركبات الطبيعية ذات الإمكانيات الحيوية والدوائية الهائلة والقدرة على الوقاية والعلاج من العديد من الأمراض (El-Guendouz et al., 2019). وبذلك اختير العكبر Propolis كونه واحداً من منتجات الايض الثانوي الطبيعية المتوفرة ويمتلك خواصاً طبية متعددة فضلاً عن احتوائه على عدد من المكونات التي لها تأثيراً مضاداً للخلايا السرطانية. تم إجراء العديد من الدراسات حول استخدام العكبر أو مكوناته الفعالة في علاج السرطان، لقد لوحظ أن استخدامه لم يسبب آثاراً جانبية في الدراسات خارج الجسم (*in-vitro*) وداخل الجسم (*in-vivo*) (Doğan et al., 2020).

فهو مصدر غني بالمركبات النشطة حيويًا ويمنع تكاثر الخلايا السرطانية وتولدها وانتقالها ويحفز موت الخلايا المبرمج فضلاً عن تأثيره على الورم ومقاومة الأدوية المتعددة للسرطانات (Forma & Bryś, 2021).

### 1.5. التأثير السمي لمستخلص العكبر الايثانولي في خط خلايا سرطان القولون (SW480)

بينت دراسة (Bonamigo et al., 2017) ان المستخلصات الإيثانولية للعكبر بتراكيز مختلفة تكون نشطة حيويًا وواعدة للسيطرة على تكاثر الخلايا السرطانية والأمراض المرتبطة بالإجهاد التأكسدي واتفقت هذه النتيجة مع الدراسة الحالية.

كما اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Wieczyńska et al., 2017) حيث احتوت المستخلصات الإيثانولية للعكبر على أعلى محتوى إجمالي للفينول وفعالية عالية عند التراكيز الأعلى ضد مرض السرطان وفي نفس الوقت آمنة على الخلايا الطبيعية.

إذ اظهر مستخلص العكبر الإيثانولي لسبعة انواع من النحل تأثيرات سمية خلوية على خطوط الخلايا السرطانية MCF-7 و HeLa و Caco-2 (Arung et al., 2021) وهذا يتفق مع الدراسة الحالية.

اشار (Utispan et al., 2017) ان هنالك نشاط سام للمستخلصات الكحولية للعكبر من النحل غير اللاسع *Trigona Sirindhornae* ضد خطوط خلايا سرطان الرأس والعنق الأولية والنقيلة في الانسان وهذا يتفق مع الدراسة الحالية.

واتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Choudhari et al., 2013) حيث أظهر الفحص المجهرى الضوئي ومجهر القوة الذرية لعكبر النحل الهندي بعد العلاج بـ 250 ميكروغرام/ مل بمستخلص العكبر الايثانولي لمدة 24 ساعة ادت الى الحد من نمو الخلايا السرطانية بنسبة 50٪ في جميع خطوط الخلايا السرطانية التي تم استخدامها وهي MCF-7 (سرطان الثدي البشري)، HT-29 (سرطان القولون البشري)، Caco-2 (سرطان القولون والمستقيم البشري الظهاري) و B16F1 (الورم الميلانيني للفئران) إذ عملت تلك المستخلصات على حث الخلايا السرطانية على موت الخلايا المبرمج وبالتالي موت جميع خطوط الخلايا السرطانية.

بينت دراسة (Soltaninejad et al., 2020) ان المستخلص الايثانولي للعكبر الايراني هو خليط طبيعي مضاد للسرطان قادر على الحد من تكاثر ثلاث انواع من خلايا سرطان الثدي البشري MDA-MB-231، SKBR و MCF-7 والحث على توقف دورة حياة الخلية وإلى موت الخلايا المبرمج فيها واتفقت مع نتائج الدراسة الحالية.

كما اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه (Turan et al., 2015) والتي بينت أن مستخلص العكبر الكحولي التركي مصدر جيد لمضادات الأكسدة وعامل طبيعي مضاد للأورام قادر على الحد من تكاثر الخلايا السرطانية لخطوط خلايا سرطان الثدي والكبد والقولون وعنق الرحم والبروستات.

كما اشار (Azarshinfam et al., 2021) الى امكانية استخدام الكبسولات التي تحتوي على العكبر الايراني عن طريق الفم كمكملات علاجية في علاج سرطان القولون والمستقيم ولقتل خلاياه بالاشتراك مع أو بدون طبقات الهيدروكسيد المزدوج (LDH) النانوية NPs في خط خلايا (HT-29) نظرًا للتأثيرات الإيجابية لمستخلص العكبر على الخلايا السرطانية وقلة الآثار الجانبية يزيد هذا المستخلص من التعبير الجيني Bax pro-apoptotic ويقلل من التعبير الجيني المضاد للخلايا (Bcl-2) ويؤدي إلى موت الخلايا المبرمج وهذا يتفق مع الدراسة الحالية.

واتفقت نتائج الدراسة الحالية مع ما جاء به (Reis et al., 2019) والتي اجريت على الخلايا السرطانية لخط سرطان القولون (HCT-116) أظهرت جميع المستخلصات الإيثانولية للعكبر

المحضرة بالطريقة التقليدية واخرى بطريقة التعرض للموجات فوق الصوتية تثبيطاً أعلى من 90% بينما بالنسبة لخطي سرطان الدم (HL-60) وسرطان البروستات (PC3) كان الحد الأدنى للتثبيط 80%.

كان للعكبر الجغرافي المذاب في 70% ايثانول تأثير مضاد للسرطان وسام على اورم الخلايا العظمية الخبيثة (Canine Osteosarcoma Cells (OSA) للكلاب في المختبر (Cinegaglia et al., 2013) وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية.

## 2.5. تأثير مستخلص العكبر النانوي في خط خلايا سرطان القولون (SW480)

بينت نتائج الدراسة الحالية ان للمستخلص النانوي للعكبر تأثيراً تثبيطياً واضحاً في خط خلايا القولون (SW480). حيث اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Hasan et al., 2016) (Tan et al., 2021) في ان المستخلص العكبر النانوي بتركيز قليل كان ذو فعالية عالية ضد خطوط الخلايا السرطانية.

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Nascimento et al., 2016) والتي بينت ان الخاصية المضادة للسرطان في مستخلص العكبر النانوي تعود إلى وجود مركبات الفلافونويد التي تمنع تطور دورة الخلايا السرطانية وتكاثرها ونمو الورم وبالتالي تثبيطه وتسبب توقف دورة الخلية وموت الخلايا المبرمج حيث كشفت هذه الدراسة عن إمكانات جزيئات العكبر النانوية في علاج السرطان وامكانية استعماله بديلاً جيداً عن المواد المستخدمة ضد السرطان.

أظهر (Seven et al., 2021) إمكانية استعمال مستخلص العكبر الأحمر النانوي لتحضير أشكال جرعات دوائية مختلفة في العلاج ضد أمراض خطيرة كالسرطان وهذا ما اتفقت معه الدراسة الحالية.

اشار (Jiang et al., 2020) إلى أن المستخلص الإيثانولي للعكبر الصيني لمدة تعريض 24 ساعة يمنع بشكل انتقائي انتشار خلايا سرطان المعدة البشري (SGC-7901) عن طريق موت الخلايا المبرمج وتوقف دورة الخلية في المرحلة S مع زيادة إنتاج أنواع الأوكسجين التفاعلية (ROS) وتقليل وظائف غشاء الميتوكوندريا وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية.

اتفقت الدراسة الحالية مع (Hasan et al., 2016) حيث كان تأثير العكبر النانوي nanopropolis بجرعة 32 ميكروغرام/ مل والعكبر الكحولي بجرعة 233 ميكروغرام/ مل هو نفسه في تقليل حجم الورم وتضيق الجروح التي يسببها الورم والقضاء على الخلايا السرطانية، اتضح أن هناك علاقة بين حجم الجسيمات النانوية والمواد الممتصة على شفاء السرطان وأكدت الدراسة أن العكبر النانوي بتركيز صغير (جرعة 32 ميكروغرام/ مل) كان فعالاً للغاية في علاج أورام الغدد الثديية وسرطان الثدي لدى الفئران المختبرية نوع virgin sprangue-dawley.

### **3.5. تأثير مستخلص العكبر الايثانولي التثبيطي على نسبة تحطم DNA في خط خلايا سرطان القولون (SW480)**

يعد علاج السرطان مهماً مع التطور في مجالات التكنولوجيا الطبية يوفر ظهور العديد من الأدوية المستهدفة والعلاج المناعي خيارات عديدة لعلاج السرطان تم طرح مفهوم العلاج المركب في أبحاث السرطان للاستفادة من الجمع بين علاجين أو أكثر مع آليات مختلفة بهدف الاستفادة من التأثيرات التآزرية وإنقاذ المرضى غير المستجيبين للعلاجات الفردية (Wang et al., 2022).

أن تلف الحامض النووي DNA هو عامل اساسي في الحد من تطور السرطان وانتشاره، تخلق اضرار الحامض النووي كسر غير طبيعي في النوكليوتيدات nucleotide مما يتسبب في كسر إحدى سلاسل الحامض النووي أو كلاهما وبذلك تزداد احتمالية حدوث طفرات (Alhmoud et al., 2020). تلف DNA يغير تسلسل النوكليوتيدات وبالتالي ويؤدي إلى اختلال التعبير عن البروتينات التي تؤثر على وظائف الخلية الطبيعية وتكون مصادر تلف DNA اما داخلية أو خارجية (Srinivas et al., 2019) وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية.

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Al-Faifi et al., 2017) حيث بينت من خلال اختبار السمية الخلوية MTT وتقييم السمية الجينية باستخدام اختبار المذنب، أظهر كلا اختباري السمية نتائج سمية كبيرة، ففي اختبار المذنب أظهر المستخلص الميثانولي تأثيرات سامة جينية ضد خط خلايا سرطان الثدي البشري (MCF-7) وخط خلايا البروستات (PC3) كذلك خط خلايا سرطان الكبد البشري (HEPG2) وزيادة النسبة المئوية لتلف DNA مع زيادة وقت تعريض الخلايا للمستخلص الكحولي.

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Cannan & Pederson, 2017) والتي بينت ان العوامل السامة للجينات Genotoxic agents تسبب تغيرات هيكلية في DNA عن طريق تعطيل الروابط التساهمية بين النيوكليوتيدات مما يمنع التضاعف الدقيق للجينوم.

ذكر (Montoro et al., 2012) أن التراكيز العالية من مستخلص العكبر الايثانولي لها تأثير خلوي وسمي للجينات في المختبر على الخلايا الليمفاوية المحيطية البشرية فقد قلل بشكل كبير من مؤشر الانقسام Mitotic Index ومؤشر الانتشار Proliferation Index وأثر بشكل كبير على معدلات تبادل الكروماتيدات الشقيقة Sister chromatid exchange وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Somaida et al., 2020) التي اوضحت من خلال تقييم السمية الجينية باستخدام اختبار المذنب القلوي comet assay للمستخلصات النباتية لكل من نبات Imperata cylindrical، Echinops giganteus، Xylopia aethiopica و Dorstenia psilurus انها تعمل على ايقاف تكاثر الخلايا لجميع خطوط الخلايا السرطانية المختبرة HeLa، MDA-MB-231، A549، HepG2، U-87، SK-OV-3 و HL60 مع زيادة السمية بزيادة التركيز ووقت التعريض.

يستخدم المستخلص الإيثانولي للعكبر الأخضر البرازيلي لأغراض وقائية لخلايا الثدييات بعد تعريضها لمطفر أظهرت النتائج انخفاضاً كبيراً في تلف DNA وتعطيل المطفر قبل أن يتفاعل معه وبالتالي كانت مركبات الفينول والفلافونويد الموجودة في المستخلص بصفقتها كاسحات للجذور الحرة قادرة على التفاعل مع المطفر والتقاط الجذور الحرة التي يمكن أن تلحق الضرر بالحمض النووي (Roberto et al., 2016) وهذا يتفق مع الدراسة الحالية.

يُظهر مركب Pinobanksin-3-acetate هو فلافونويد طبيعي موجود بشكل شائع في العكبر وبطريقة تعتمد على الوقت والجرعة نشاطاً قوياً مضاداً للسرطان ضد خلايا سرطان القولون البشري (SW480) في المختبر والتي يمكن أن تُعزى جزئياً إلى تثبيط تكاثر وتحريض موت الخلايا المبرمج في الخلايا السرطانية من خلال التنظيم الأعلى up-regulation والتنظيم السفلي downregulation للجينات المتعددة multiple genes المشاركة في موت الخلايا المبرمج الخلوي والحركة الخلوية cytokinetics وتسرطن القولون والمستقيم colorectal

(Amet et al., 2015) Calcium signaling وإشارات الكالسيوم carcinogenesis وهذا اتفق مع نتائج الدراسة الحالية.

لا تتفق الدراسة الحالية مع دراسة (Aliyazicioglu et al., 2011) التي بينت ظهور انخفاضاً معنوياً في تلف الحمض النووي الناجم عن بيروكسيد الهيدروجين  $H_2O_2$  كمحفز لتلف الحمض النووي في الاوساط المعالجة بالمستخلص الايثانولي للعكبر التركي كمادة وقائية ويعزى ذلك الانخفاض الى النشاط المضاد للأكسدة للمكونات الفينولية الموجودة في العكبر. كما أكد (Aydin et al., 2018) ان للعكبر تأثيراً وقائياً ضد السمية الخلوية cytotoxicity والسمية الجينية genotoxicity على خطوط الخلايا الليفية البشرية السليمة.

أكد (Abutaha, 2020) ان لمستخلص العكبر ومكونه الرئيس 3-ميثيل-4 أيزوبروبيل فينول (29.44%) تأثير سام للخلايا ضد خطوط الخلايا السرطانية البشرية المختلفة من خلال تحريض موت الخلايا المبرمج وتوقف دورة الخلية في مرحلة G0 /G1 تشير هذه النتائج إلى إمكانات مستخلص العكبر كعلاج للسرطان وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية حيث ان المكون الرئيس للعكبر العراقي بمحافظة كربلاء مادة الفينول.

#### **4.5. تأثير مستخلص العكبر النانوي التثبيطي على نسبة تحطم DNA في خط خلايا سرطان القولون (SW480)**

يُظهر العكبر تأثيراً كيميائياً قوياً أو مضاداً لأنواع مختلفة من السرطان نظراً لوجود العديد من المكونات النباتية التي تساهم في عدة عمليات واليات منها موت الخلايا المبرمج، السمية للخلوية، إيقاف دورة الخلية، التأثير المضادة للنقائل، المضادة للغزو ، ومضاد لتكوّن الأوعية الدموية، سمية للجينات و مضادة للطفرات إلى جانب تأثيراته المضادة للأكسدة ومعدلة للمناعة ومضادة للالتهابات وامكانية استخدامه كعامل مساعد في علاج مختلف أنواع السرطان إلى جانب أدوية العلاج الكيميائي (Chiu et al., 2020).

تتمثل التأثيرات الرئيسية المضادة للسرطان للمواد الوقائية الكيميائية في تثبيط الامتصاص والتغيرات في تنشيط وإلغاء تنشيط المادة المسرطنة وحجب ارتباطها بالحمض النووي أو إصلاح الحمض النووي الطافر تشمل التأثيرات العلاجية الكيميائية الأخرى تثبيط تكاثر الخلايا السرطانية

عن طريق تحفيز موت الخلايا المبرمج وتثبيط تطور الورم من خلال تعزيز النشاط المضاد لتولد الأوعية الدموية (Ledo-fernandes et al., 2015).

تُظهر الأغشية الحيوية لبعض الفطريات الناضجة المعالجة لمدة 48 ساعة باستخدام مستخلص العكبر الايثانولي النانوي المحضر بالتخليق الحيوي باستعمال نترات الفضة اختفاء المصفوفة خارج الخلية وظهور خيوط متعرجة قليلاً مقارنة بالأغشية غير المعالجة مما يثبت خصائصه المضادة للفطريات (Kischkel et al., 2020).

تم استثمار العديد من الجهود في اكتشاف المؤشرات الحيوية لجزيئات DNA و RNA و mRNA و aptamers والجزيئات الحيوية الأيضية والإنزيمات والبروتينات للتشخيص المبكر لسرطان القولون التي يمكن أن توفر تقنية استشعار حساسة ومنخفضة التكلفة باستخدام المواد النانوية (Kaya et al., 2022).

## 5.5. المحتوى الكيميائي للعكبر

استناداً لما اظهرته نتائج الدراسة الحالية عند الكشف التمهيدي عن المركبات الفعالة للعكبر الخام اتضح ان اغلب مركباته الكيميائية لها دور فعال في تثبيط نمو الخلايا السرطانية وانها تساهم معاً بقتل الخلايا السرطانية بفعالية عالية نتيجة تأزرها مع بعضها البعض. يمثل اختبار HPLC تقنية تحليلية موثوقة لتوصيف مركبات الفينول تم التحقق من دقتها وأنها مناسبة ويوصى بها للعينات ذات الاصل النباتي (Deseva et al., 2020)

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Sulaiman et al., 2011) حيث تم جمع عينات الدراسة (العكبر) من مواقع جغرافية مختلفة في العراق (بغداد ودهوك والموصل وصلاح الدين) حيث كانت نسبة الفينولات هي الاعلى بينما اختلفت نسبة بقية المكونات مع الدراسة الحالية اعتماداً على منطقة الإنتاج، الغطاء النباتي فيها، توافر المصادر لجمع الراتنجات النباتية وكذلك التنوع الجيني لمملكة النحل، المناخ والموسم الذي يتم فيه إنتاج العكبر.

أكد (El-Seedi et al., 2022)(Zabaiou et al., 2017) الى ان مركبات الفينول والفلافون ومشتقات التربين هي المركبات الرئيسية المسؤولة عن النشاط الحيوي والخصائص العلاجية في العكبر وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية.

اشار (Wieczorek et al., 2022) الى انه مركبات الفلافونويد والفينولات وتعد من المركبات التي يمكن من خلالها توحيد التركيب الكيميائي للعكبر الأوروبي وتقييم جودته ومستحضراته.

اوضحت دراسة (Oladele et al., 2017) ان الفلافونيدات (Flavonoid) من المركبات الفعالة التي لها القدرة على علاج امراض مختلفة واهمها السرطان لان هذه المركبات تمتلك مقاومة عالية للجذور الحرة ومواد مضادة للأكسدة وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية.

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Koosha et al., 2016) والتي جمعت بين الدراسات المخبرية *vitro* والحيوية *vivo* وحول خصائص الفلافونويد المضادة لسرطان القولون وقدرتها على أن تكون بديلاً فعالاً لأدوية العلاج الكيميائي في علاج سرطان القولون.

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Szliszka et al., 2012) التي بينت ان المركبات الفينولية التي توجد بشكل طبيعي في العكبر تعمل على تحسس *sensitizes* الخلايا السرطانية المقاومة للموت المبرمج وتزيد من نشاط موتها المبرمج في خط خلايا سرطان القولون البشري.

اشار (Moheisen, 2021) (Hołderna-Kędzia, 2020) أن مركبات الفلافونويد تساهم في مقاومة أمراض الإنسان فهي تعمل كعوامل مضادة للتشنج وذات نشاط مضاد للبكتيريا والأكسدة، واقية للكبد واقية من الملاريا ولها تأثيرات سامة ضد خطوط الخلايا السرطانية البشرية كسرطان الثدي، الرئة، القولون والبروستات، الاورام الليفية الخبيثة، الاورام الدماغية الخبيثة، الجلد ، الدم وسرطان القولون البشري، تأثيراتها متعددة على الخلايا السرطانية فمركب الفلافونويد مضاد لتكاثر الخلايا السرطانية حيث تعوق دورة الخلية وتثبط تكوين الأوعية كذلك تحفيز موت الخلايا المبرمج وتعطيل المواد المسرطنة وتقليل مقاومة الأدوية المضادة للسرطان وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية.

ذكر (Alday et al., 2016) أنه تمت دراسة التركيب الكيميائي والأنشطة العلاجية للعكبر التي تم جمعها من شمال امريكا (بما في ذلك أمريكا الوسطى ومنطقة البحر الكاريبي) وأمريكا الجنوبية كما أكدت العديد من الدراسات السابقة ان العينات الجغرافية للعكبر التي تم تحليلها تختلف او تتشابه فيما بينها ويعزى ذلك الى اختلاف اماكن جمعها ومصدرها النباتي والتنوع البيئي.

## 6.5. التخليق الحيوي لدقائق الفضة النانوية

الجسيمات النانوية ذات أهمية كبيرة نظراً لأدوارها الرئيسية وتطبيقاتها في الحياة اليومية مثل المحفزات، أجهزة الاستشعار، أنظمة توصيل الأدوية والجينات، العوامل المضادة للبكتيريا والفطريات كذلك عوامل معالجة المياه، برزت تقنية التخليق الحيوي مؤخراً في المجالات الطبية

وبصورة خاصة علاج السرطان بتقنية النانو ولتجنب الاعراض الجانبية للأدوية التقليدية بما ان الخلايا السرطانية تعاني من خلل في نظام موت الخلايا المبرمج وبذلك تستمر بالزيادة، الانتشار ومقاومة العديد من الادوية ان اهداف العلاج بالنانو هو رفع الكفاءة العلاجية للدواء والتغلب على مقاومة الخلايا له والتي تعد عقبة في علاج السرطان (الراوي, 2017). هناك حاجة إلى نظام توصيل جيد للأدوية المستخدمة في علاج أمراض الإنسان والحيوان، احد المشاكل الرئيسية التي تساهم في انخفاض كفاءة توصيل الدواء هي انخفاض تراكيز الدواء وقصر مدة بقاءه في الموقع الخلوي والتشريحي، أظهرت أنظمة التوصيل النانوية الذكية قدرة غير عادية في التغلب على العديد من الحواجز التشريحية والوظيفية وايصال الأدوية إلى المواقع المستهدفة وبالتالي انتاج أدوية ذات فعالية عالية بأثار الجانبية قليلة (Venditti, 2017).

اتفقت نتائج دراستنا الحالية مع (Choudhary et al., 2015) الى ان التغيير اللوني للتعليق الغرواني عند التخليق الحيوي يؤكد تكون جسيمات الفضة النانوية للمستخلص.

وافقت نتائج الدراسة الحالية مع (Taha et al., 2019) (Al-Shmgani et al., ) (2017) (Kischkel et al., 2020) (Priyadarshini et al., 2018) حيث ان حدوث التغيرات اللونية دليل على تكوين الجسيمات النانوية للعكبر وظهور هذا اللون يعود الى استثارة البلازمون السطحي لجسيمات الفضة النانوية المتكونة، تظهر خاصية رنين بلازمون السطح Surface plasmon resonance في أسطح بعض المعادن وهي نتيجة الحركة الجماعية للإلكترونات الحرة الموجودة بالجسيم النانوي عند سقوط الضوء عليها ويتغير فيها اتجاه حركة الإلكترونات مع الزمن بنفس تذبذب الموجة الكهرومغناطيسية الضوئية الساقطة. توجد هذه الخاصية بشكل واضح في الذهب والفضة والنحاس (شرط ان تكون المادة النانوية غرويه) في منطقة الضوء المرئي وهي المسؤولة عن تغير ألوانها عند وصول هذه العناصر لحجم النانو ولها العديد من الخصائص والتطبيقات تعتمد هذه الخاصية على حجم الجسيم وشكله والوسط الموجود به الجسم.

كما اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Gulati et al., 2018) حيث ان عملية التخليق الحيوي لدقائق الفضة النانوية باستعمال مستخلصات العكبر الكحولية تعزى الى قدرة المركبات الكيميائية الفعالة الموجودة في العكبر على إختزال ايونات الفضة لتحويلها الى دقائق نانوية والقدرة على الاتحاد الايوني أو الالكتروستاتيكي بين المجاميع الفعالة الموجودة في مستخلص العكبر مع أيونات الفضة وتجميعها لتحويلها الى فضة بحجم نانوي فضلا عن قدرة المركبات على السلوك كعامل

مثبت Stabilizer agent والذي يثبت حجم الدقائق النانوية المشكّلة بإيقاف عملية الاختزال وتجميع الدقائق عند حدّ معين.

أشار (Tran et al., 2013) ان العامل المختزل reducing agent الذي يقوم باختزال الايونات في عملية التخليق الحيوي يكون معتمدا على الجزيئات المنتجة من قبل (النباتات، الطحالب، الفطريات والبكتريا ) وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية.

بينت الدراسة الحالية لتحليل طيف FTIR ان مجاميع الفلافون احد المكونات الفعالة للمستخلص الايثانولي، حيث اكد (Vaseghi et al., 2017) ان قدرة الاختزال الحيوي bio-reduction process للمستخلصات ذات الاصل النباتي تعتمد على العديد من المكونات الفعالة مثل التربينويدات والسكريات المتعددة ومتعدد الفينول والسكريات المختزلة والبروتينات والأحماض الأمينية. كانت مجموعات الكربونيل من بقايا الأحماض الأمينية والبروتينات المرتبطة بدقائق الفضة النانوية مسؤولة عن تثبيت وتغطية الجسيمات.

## 7.5. التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء لمستخلصات العكبر

يعد التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء هو أداة قوية لتحديد أنواع الروابط الكيميائية في جزيء ما عن طريق انتاج طيف امتصاص الأشعة تحت الحمراء الذي يشبه البصمة الجزيئية.

بينت الدراسة الحالية اجراء التحليل الطيفي بواسطة الاشعة تحت الحمراء للحصول على معلومات حول الروابط الكيميائية والبنية الجزيئية للمواد على سطح الجسيمات النانوية وتحتوي على الجزيئات الحيوية التي يكون لها دور في تقليل ايونات الفضة وتغليف الجسيمات النانوية يشير تحليل طيف FTIR في دراستنا الى ان مستخلص العكبر يحتوي على اواصر كيميائية وتراكيب جزيئية من المواد على سطح الجسيمات النانوية وهذه الجزيئات الحيوية تلعب دور في اختزال ايونات الفضة وتغليف الجسيمات النانوية. حيث اتفقت الدراسة الحالية مع ( Gulati et al., 2018) في ظهور قمم عدة في الطيف وهي تدل على ان المواد المكونه للعكبر قد تم تحميلها على الفضة النانوية كما ان المواد الفعالة في العكبر لها آليات عمل الاول هي عملية اختزال ايونات الفضة وتحويلها الى الفضة النانوية والثاني تعمل على زيادة استقرارية المادة و ثم التغليف حيث يحافظ على الفضة النانوية من التراكم الذي يتسبب بكون حجمها وتحافظ عليها من عملية الاكسدة عند الخزن.

أشار (Tan et al., 2021) الى أن مستخلص العكبر يحوي على مواد مغلفة capping agent ومثبتة stabilizer agents ومختزلة reducing agents متمثلة بالمحتويات النشطة حيويًا في العكبر والتي تسببت في تكوين الجسيمات النانوية بنجاح وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية.

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Al-Shmgani et al., 2017) حيث ان المستخلصات الكحولية للعكبر تميزت بأنها غنية بالمركبات الفعالة التي تساهم في عملية الاختزال الحيوي لمحلول نترات الفضة وإنتاج الدقائق النانوية وكونها مصدر غني بالمواد المغلفة capping agents والمثبتة للجسيمات النانوية، هذا ينافس الطرق الكيميائية والفيزيائية التي تستعمل مواد سامة ومضرة ومكلفة.

بينت الدراسة الحالية ان مجاميع الفلافون من أكثر المجاميع الفعالة التي اشتركت في عملية الاختزال الحيوي وفق ما أشارت اليه قيم التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء.

كما بينت نتائج الدراسة الحالية عند مقارنة نتائج FTIR للمحلول الحاوي على دقائق الفضة النانوية مع FTIR للمستخلص الكحولي للعكبر لوحظ ظهور بعض الاواصر واختفاء البعض الاخر، حيث انخفض مستوى الامتصاصية ويعزى ذلك الى استهلاكها كعامل مغلف capping agent اثناء عملية التخليق وبذلك يعد المستخلص النانوي اكثر فعالية ويعود ذلك لوجود قمم امتصاص ومجاميع فعالة اكثر من المستخلص الايثانولي حيث اتفقت الدراسة الحالية مع (الموسوي, 2020).

وعلى الرغم من أن عينات العكبر من مواقع مختلفة تمتلك خصائص فيزيائية متشابهة إلا أن تركيبها الكيميائي مختلف لأنه يعتمد على مكان ووقت وطريقة الجمع ونباتات الأصل (Becerra et al., 2019) وبذلك لا تتطابق نتائج Ftir للدراسات السابقة.

## 8.5. مجهر القوة الذرية

يستعمل لتحديد تضاريس السطح وخشونة الجسيمات النانوية من خلال صور ثنائية الأبعاد وثلاثية الأبعاد (Youssef et al., 2019). الجسيمات متناهية الصغر هي نفسها الجسيمات النانوية ويتراوح حجمها بين (1-100) نانومتر. يتراوح حجم الجسيمات الدقيقة بين (100-2500) نانومتر اما الجسيمات الخشنة يتراوح بين (2500-10000) نانومتر (Seven et al., 2018).

بينت الدراسة الحالية لتحليل AFM كلاً من العرض ثنائي الأبعاد وثلاثي الأبعاد لمستخلص العكبر النانوي ان الجسيمات النانوية كانت كروية الشكل، مفردة أو مجموعة حيث اتفقت نتيجة الدراسة الحالية مع (Priyadarshini et al., 2018) (Korbekandi et al., 2012) ان الجسيمات النانوية الفضية المُصنَّعة كانت كروية الشكل متفرقة او مجموعة بحجم أقل من (100) نانوميتر تحت مجهر القوة الذرية.

اتفقت نتيجة الدراسة الحالية مع (Nascimento et al., 2016) حيث كانت جسيمات العكبر الاحمر البرازيلي ذات شكل أملس كروي.

اشار (Al-Shmgani et al., 2017) ان جسيمات الفضة النانوية المصنعة من مستخلص أوراق *C. roseus* كانت بلورية ذات حبيبات يتراوح قطرها بين (10 و 88) نانوميتر بمتوسط حجم يبلغ حوالي (49) نانوميتر تحت مجهر AFM اتفقت مع نتائج الدراسة الحالية في حجم الجسيمات النانوية اقل من (100) نانومتر واختلفت معها من ناحية شكل الجسيمات المصنعة.

أظهرت دراسة (Khan et al., 2019) أن تكون الشكل والحجم وتوزيع الجسيمات النانوية يعتمد على الخصائص الفيزيائية والكيميائية مثل درجة الحرارة والوقت ودرجة الحمضية. حيث يلعب حجم وشكل الجسيمات النانوية دوراً مهماً في تحديد الخواص الفيزيائية والكيميائية والحيوية لتلك الجسيمات (Singh et al., 2014).

أكد (Reis et al., 2019) أن التركيب الكيميائي يختلف باختلاف منطقة أخذ العينات.

## الاستنتاجات Conclusions

1. اعلى مادة كيميائية موجودة في العكبر العراقي بمحافظة كربلاء هي مادة الفينول تليها القلويد ثم الكلايكوسيد، التانين، الفلافونويد والصابونين على التوالي.
2. حدوث تأثيرات خلوية ووراثية بزيادة تركيز المستخلص الايثانولي والنانوي.
3. سبب مستخلصي العكبر الايثانولي والنانوي حدوث تأثيرات خلوية متمثلة بتنشيط النمو ونقصان عدد خلايا سرطان القولون وحدث تأثيرات وراثية متمثلة بالتشوهات الكروموسومية وتطل الـ DNA بحسب تركيز المستخلصات.
4. يعد تركيز 1% ملغم/ مل من مستخلص العكبر النانوي اكثر تأثيراً من تركيز 1000 ملغم/ مل للمستخلص الايثانولي من حيث السمية الخلوية والسمية الوراثية.
5. التركيز الامثل لمستخلص العكبر الايثانولي الذي سبب السمية الخلوية ضد خط خلايا سرطان القولون البشري تركيز 1000 ملغم/ مل.
6. التركيز الامثل لمستخلص العكبر النانوي الذي سبب السمية الخلوية ضد خط خلايا سرطان القولون البشري تركيز 7% ملغم/ مل.
7. التركيز الامثل لمستخلص العكبر الايثانولي الذي سبب السمية الجينية ضد خط خلايا سرطان القولون البشري تركيز 1000 ملغم/ مل.
8. التركيز الامثل لمستخلص العكبر النانوي الذي سبب السمية الجينية ضد خط خلايا سرطان القولون البشري تركيز 7% ملغم/ مل.

## التوصيات Recommendations

1. زيادة الدراسات حول العكبر للاستفادة من آثاره العلاجية الواعدة.
2. توحيد التركيب الكيميائي للعكبر للتغلب على مشكلة ارتباط تركيبه الكيميائي بموقع جمعه، ونباتاته والتي تعد عقبة رئيسية أمام الاستخدام الأوسع للعكبر في صناعة المستحضرات الصيدلانية وصناعة الأغذية.
3. دراسة تأثير العكبر على خطوط سرطانية اخرى.
4. العكبر مادة فعالة ذات اثار علاجية واسعة يجب مراعاة خواصها قبل البدء باستخلاصها.
5. تحضير نوع اخر من المستخلص النانوي للعكبر.

## المصادر العربية

- . House of Wisdom 2.0 Press, الدليل الشامل حول السرطان, م. ق. (2020). an imprint of Ideas Beyond Borders.
- الراوي, ن. ن. ر. (2017). دراسة تأثير جسيمات الفضة النانوية على بعض الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي. جامعة الانبار / كلية العلوم.
- العبدلي, م. ج. ن. (2020). التصنيع الحيوي لجسيمات الفضة النانوية بأستعمال بكتريا *Burkholderia cepacia* وتقييم فعاليتها ضد بكتريا *Pseudomonas aeruginos* و *Staphylococcus aureus*. الكوفة.
- الموسوي, ن. ج. د. (2020). تقويم كفاءة جزيئات الفضة النانوية AgNPs المنتجة من العسل المحلي في تثبيط نمو الفطر *Fusarium verticillioides* و انتاج سم الفيومنزين FB1. uniersity of kufa.
- الموصللي, أ. د. م. ا. (2013). نباتات طبية مضادة للسرطان. دار ابن الاثير للطباعة والنشر - جامعة الموصل - العراق.
- النعيمي, م. ث. ع. ا. (2018). تأثير فطر *Metarhizium anisopliae* وجسيمات الفضة النانوية المصنعة بواسطته في تطور خنفساء الحبوب الشعرية *Trogoderma granarium*. جامعة بغداد.
- خطاب, أ. د. م. م. & نوار, د. ا. ا. (2012). تربية النحل ومنتجاته (التكنولوجيا الحيوية لمنتجات نحل العسل). المشروع القومي لمكافحة امراض النحل وافاته.
- ربيعي, ع. ا. (2012). المساهمة في دراسة الفعالية المضادة للاكسدة لمستخلصات بروبوليس جنوب الجزائر بالطرق الكيمائية والكهروكيميائية. (Issue September 2012)
- كذلك, م. م. (2018). المرجع الشامل في تربية النحل والملكات و انتاج العسل.
- لويريش, ن. (2018). النحل والناس. منشورات الهيئة العامة السورية للكتاب وزارة الثقافة - دمشق.
- مسعود, ه. (2021). تأثير مستخلص العكبر على الاجهاد التأكسدي والموت الخلوي الكبدي والكلوي الناتج عن المعادن الثقيلة. 2. Uniersity Mustapa Ben Boulaid - Banta

## المصادر الاجنبية

- Abbasi, A. J., Mohammadi, F., Bayat, M., Gema, S. M., Ghadirian, H., Seifi, H., Bayat, H., & Bahrami, N. (2018). Applications of Propolis in Dentistry: A Review. *Ethiopian Journal of Health Sciences*, 28(4), 505–512. <https://doi.org/10.4314/ejhs.v28i4.16>
- Abdelkader, M., Ahcen, B., Rachid, D., Hakim, H., & Materiel, A. P. (2014). Phytochemical Study and Biological Activity of Sage (*Salvia officinalis* L.). *International Scholarly and Scientific Research & Innovation*, 8(11), 1253–1257.
- Abutaha, N. (2020). Apoptotic potential and chemical composition of jordanian propolis extract against different cancer cell lines. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(6), 893–902. <https://doi.org/10.4014/jmb.1905.05027>
- Ajanal, M., Gundkalle, M. B., & Nayak, S. U. (2018). Estimation of total alkaloid in Chitrakadivati by UV - Spectrophotometer. *Ancient Science of Life*, 31(4), 2–5. <https://doi.org/10.4103/0257-7941.107361>
- Al-Fahdawi, I. H. (2015). Potential Indication of Propolis in Treatment of Oral Infection for Denture Wearers. *Journal of Dentistry, Oral Disorders & Therapy*, 3(3), 01–03. <https://doi.org/10.15226/jdodt.2015.00146>
- Al-Faifi, Z. I. A., Masrahi, Y. S., Aly, M. S., Al-Turki, T. A., & Dardeer, T. (2017). Evaluation of cytotoxic and genotoxic effects of *Euphorbia triaculeata* forssk. Extract. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 18(3), 771–777. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.3.771>
- Al-hariri, M. T. (2014). Potential antioxidant benefits of Propolis : Recent Review. *Free Radicals and Antioxidants.*, 9102–2347, 328–331.
- Al-Shmgani, H. S. A., Mohammed, W. H., Sulaiman, G. M., & Saadoon, A. H. (2017). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Catharanthus roseus* leaf extract and assessing their antioxidant, antimicrobial, and wound-healing activities. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 45(6), 1234–1240.

<https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1220950>

- Alday, E., Navarro-Navarro, M., Garibay-Escobar, A., Robles-Zepeda, R., Hernandez, J., & Velazquez, C. (2016). Advances in Pharmacological Activities and Chemical Composition of Propolis Produced in Americas. In *Beekeeping and Bee Conservation – Advances in Research*(pp.99–151). <https://doi.org/10.5772/63145>
- Alfahdawi, I. (2017). Effect of Propolis on Fungal Infection for Denture Wearers and Dry Scket. *Tikrit Journal for Dental Sciences*, 5, 3339.
- Alfahdawi, I. (2018). Honey and propolis and their medicinal benefits (Issue June). <https://www.researchgate.net/publication/322233607>.
- Alhmoud, J. F., Woolley, J. F., Al Moustafa, A.-E., & Malki, M. I. (2020). DNA Damage/Repair Management in Cancers. *Cancers*, 12(1050), 1–22. <https://doi.org/10.3390/cancers12041050>
- Aliyazicioglu, Y., Demir, S., Turan, I., Cakiroglu, T., Akalin, I., Deger, O., & Bedir, A. (2011). Preventive and protective effects of turkish propolis on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage in foreskin fibroblast cell lines. *Acta Biologica Hungarica*, 62(4), 388–396. <https://doi.org/10.1556/ABiol.62.2011.4.5>
- ALNUAIMI1, M. T., HAMDAN, N. T., ABDALRAHEEM, E., & ALJANABI3, Z. Z. (2019). Biodegradation of malathion pesticide by using Silver bio-nanoparticles of *Bacillus licheniformis* extracts. 20, 79–84.
- Amet, M., Abudula, A., Akela, A., Sheng, L., Ababaikeri, B., Maimaiti, A., Takigchi, Y., Yamaguchi, T., & Rahman, Y. (2015). Anticancer activity of propolis flavonoid pinobanksin-3-acetate against human colon cancer in vitro. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 7(2), 45–55. <https://doi.org/10.12692/ijb/7.2.45-55>
- Andrzej, K. K., Szliszka, E., Kłósek, M., & Król, W. (2013). The beginnings of modern research on propolis in Poland. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 6. <https://doi.org/10.1155/2013/983974>
- Arung, E. T., Ramadhan, R., Khairunnisa, B., Amen, Y., Matsumoto, M., Nagata, M., Kusuma, I. W., Paramita, S., Sukemi, Yadi, Tandirogang, N., Takemoto, N., Syafrizal, Kim, Y. ung, & Shimizu, K. (2021). Cytotoxicity effect of honey, bee pollen, and

propolis from seven stingless bees in some cancer cell lines. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(12), 7182–7189.  
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.017>

Aydin, Z. U., Akpinar, kerem E., Hepokur, C., & ERDÖNMEZ, D. (2018). Assessment of toxicity and oxidative DNA damage of sodium hypochlorite, chitosan and propolis on fibroblast cells. *Brazilian Oral Research*, 32, 1–8. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0119>

Azarshinfam, N., Tanomand, A., Soltanzadeh, H., & Rad, F. A. (2021). Evaluation of anticancer effects of propolis extract with or without combination with layered double hydroxide nanoparticles on Bcl-2 and Bax genes expression in HT-29 cell lines. *Gene Reports*, 23, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101031>

Baba, S. A., & Malik, S. A. (2015). Determination of total phenolic and flavonoid content , antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. *Journal of Taibah University for Science*, 9(4), 449–454.  
<https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.11.001>

Bankova, V., Popova, M., & Trusheva, B. (2014). Propolis volatile compounds: Chemical diversity and biological activity: A review. *Chemistry Central Journal*, 8(1), 1–9.  
<https://doi.org/10.1186/1752-153X-8-28>

Bankova, V., Popova, M., & Trusheva, B. (2016). New emerging fields of application of propolis. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 35(1), 1–11.  
<https://doi.org/10.20450/mjcce.2016.864>

Barud, H. D. S., De Araújo Júnior, A. M., Saska, S., Mestieri, L. B., Campos, J. A. D. B., De Freitas, R. M., Ferreira, N. U., Nascimento, A. P., Miguel, F. G., Vaz, M. M. D. O. L. L., Barizon, E. A., Marquele-Oliveira, F., Gaspar, A. M. M., Ribeiro, S. J. L., & Berretta, A. A. (2013). Antimicrobial Brazilian propolis (EPP-AF) containing biocellulose membranes as promising biomaterial for skin wound healing. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 10.  
<https://doi.org/10.1155/2013/703024>

- Basista, K. (2013). Allergy to Propolis in Beekeepers-A Literature Review. *Occupational Medicine & Health Affairs*, 01(01), 8–11.  
<https://doi.org/10.4172/2329-6879.1000105>
- Becerra, T. B., Calla-poma, R. D., Requena-mendizabal, M. F., & Millones-gómez, P. A. (2019). Antibacterial Effect of Peruvian Propolis Collected During Different Seasons on the Growth of *Streptococcus Mutans*. *The Open Dentistry Journal*, 13, 327–331.  
<https://doi.org/10.2174/1874210601913010327>
- Berretta, A. A., De Castro, P. A., Cavalheiro, A. H., Fortes, V. S., Bom, V. P., Nascimento, A. P., Marquele-Oliveira, F., Pedrazzi, V., Ramalho, L. N. Z., & Goldman, G. H. (2013). Evaluation of mucoadhesive gels with propolis (EPP-AF) in preclinical treatment of candidiasis vulvovaginal infection. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 18.  
<https://doi.org/10.1155/2013/641480>
- Berretta, A. A., Silveira, M. A. D., Cónдор Capcha, J. M., & De Jong, D. (2020). Propolis and its potential against SARS-CoV-2 infection mechanisms and COVID-19 disease. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 131(August), 16.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110622>
- Betancourt, N. T., García-Contreras, L., & Sánchez, T. A. C. (2015). Propolis in Dogs: Clinical Experiences and Perspectives (A Brief Review). *Open Journal of Veterinary Medicine*, 05(01), 11–17.  
<https://doi.org/10.4236/ojvm.2015.51002>
- Bobbu, P., Netala, V. R., Aishwarya, S., Reddy, I. R. M., Kotakadi, V. S., & Tartte, V. (2016). Rapid synthesis of silver nanoparticles using aqueous leaf extract of *Achyranthes aspera* and study of their antimicrobial and free radical scavenging activities. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(5), 341–346.
- Bogdanov, S. (2016a). Propolis: biological properties and medical applications. In *The Propolis Book*, Chapter 2 (pp. 1–42).
- Bogdanov, S. (2016b). Propolis: Origine, Production, Composition. In *The Propolis Book* (Issue June, pp. 1–21).
- Bonamigo, T., Campos, J. F., Alfredo, T. M., Balestieri, J. B. P., Lima

- Cardoso, C. A., Paredes-Gamero, E. J., De Picoli Souza, K., & Santos, E. L. dos. (2017). Antioxidant, Cytotoxic, and Toxic Activities of Propolis from Two Native Bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2017/1038153>
- Botteon, C. E. A., Silva, L. B., Ccana-Ccapatinta, G. V., Silva, T. S., Ambrosio, S. R., Veneziani, R. C. S., Bastos, J. K., & Marcato, P. D. (2021). Biosynthesis and characterization of gold nanoparticles using Brazilian red propolis and evaluation of its antimicrobial and anticancer activities. *Scientific Reports*, 11(1), 17. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81281-w>
- Campoccia, D., Ravaioli, S., Santi, S., Mariani, V., Santarcangelo, C., De Filippis, A., Montanaro, L., Arciola, C. R., & Daglia, M. (2021). Exploring the anticancer effects of standardized extracts of poplar-type propolis: In vitro cytotoxicity toward cancer and normal cell lines. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 141, 10. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111895>
- Cannan, W. J., & Pederson, D. S. (2017). Mechanisms and Consequences of Double-strand DNA Break Formation in Chromatin. *HHS Public Access*, 231(1), 1–34. <https://doi.org/10.1002/jcp.25048>
- Capistrano, H. M., De Assis, E. M., Leal, R. M., Alvarez-Leite, M. E., Brener, S., & Bastos, E. M. A. F. (2013). Brazilian green propolis compared to miconazole gel in the treatment of Candida - associated denture stomatitis. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 6. <https://doi.org/10.1155/2013/947980>
- Chen, M. J., Shih, S. C., Wang, H. Y., Lin, C. C., Liu, C. Y., Wang, T. E., Chu, C. H., & Chen, Y. J. (2013). Caffeic acid phenethyl ester inhibits epithelial-mesenchymal transition of human pancreatic cancer cells. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 7. <https://doi.org/10.1155/2013/270906>
- Chiu, H.-F., Han, Y.-C., Shen, Y.-C., Golovinskaia, O., Venkatakrishnan, K., & Wang, C.-K. (2020). Chemopreventive

and Chemotherapeutic Effect of Propolis and Its Constituents: A Mini-review. *Journal of Cancer Prevention*, 25(2), 70–78.  
<https://doi.org/10.15430/jcp.2020.25.2.70>

Choudhari, M. K., Haghniaz, R., Rajwade, J. M., & Paknikar, K. M. (2013). Anticancer activity of Indian stingless bee propolis: An in vitro study. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 10.  
<https://doi.org/10.1155/2013/928280>

Choudhary, M. K., Kataria, J., Cameotra, S. S., & Singh, J. (2015). A facile biomimetic preparation of highly stabilized silver nanoparticles derived from seed extract of *Vigna radiata* and evaluation of their antibacterial activity. *Applied Nanoscience*, 6(1), 105–111. <https://doi.org/10.1007/s13204-015-0418-6>

Chylińska-Wrzos, P., Lis-Sochocka, M., & Jodłowska-Jędrych, B. (2017). Use of propolis in difficult to heal diabetic wounds. Short review. *Polish Journal of Public Health*, 127(4), 173–175.  
<https://doi.org/10.1515/pjph-2017-0037>

Cinegaglia, N. C., Bersano, P. R. O., Araújo, M. J. A. M., Búfalo, M. C., & Sforcin, J. M. (2013). Anticancer effects of geopropolis produced by stingless bees on canine osteosarcoma cells in vitro. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 6.  
<https://doi.org/10.1155/2013/737386>

Conti, B. J., Búfalo, M. C., Golim, M. D. A., Bankova, V., & Sforcin, J. M. (2013). Cinnamic acid is partially involved in propolis immunomodulatory action on human monocytes. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 7.  
<https://doi.org/10.1155/2013/109864>

Czyzewska, U., Siemionow, K., Zareba, I., & Miltyk, W. (2016). Proapoptotic activity of propolis and their components on human tongue squamous cell carcinoma cell line (CAL-27). *PLoS ONE*, 11(6), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157091>

Daleprane, J. B., & Abdalla, D. S. (2013). Emerging roles of propolis: Antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. In

Hindawi publishing corporation Evidence-based Complementary and Alternative Medicine (Vol. 2013, p. 8).  
<https://doi.org/10.1155/2013/175135>

Damiani, N., Porrini, M. P., Lancia, J. P., Álvarez, E., Garrido, P. M., Domínguez, E., Gende, L. B., & Eguaras, M. J. (2017). Effect of propolis oral intake on physiological condition of young worker honey bees, *apis mellifera* L. *Journal of Apicultural Science*, 61(2), 193–202. <https://doi.org/10.1515/JAS-2017-0023>

Deseva, I., Koleva, E., & Mihaylova, D. (2020). Hplc determination of twelve polyphenols: Application in wine analysis. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 32(October), 120–126.

Doğan, H., Silici, S., & Ozcimen, A. A. (2020). Biological Effects of Propolis on Cancer. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 8(3), 573–579.  
<https://doi.org/10.24925/turjaf.v8i3.573-579.2939>

El-Aidy, W. K., Ebeid, A. A., Sallam, A. E. R. M., Muhammad, I. E., Abbas, A. T., Kamal, M. A., & Sohrab, S. S. (2015). Evaluation of propolis, honey, and royal jelly in amelioration of peripheral blood leukocytes and lung inflammation in mouse conalbumin-induced asthma model. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(6), 780–788. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.11.005>

El-Guendouz, S., Lyoussi, B., & Miguel, M. G. (2019). Insight on Propolis from Mediterranean Countries: Chemical Composition, Biological Activities and Application Fields. *Chemistry and Biodiversity*, 16(7), 1–62. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900094>

El-Seedi, H. R., Eid, N., Abd El-Wahed, A. A., Rateb, M. E., Afifi, H. S., Algethami, A. F., Zhao, C., Al Naggar, Y., Alsharif, S. M., Tahir, H. E., Xu, B., Wang, K., & Khalifa, S. A. M. (2022). Honey Bee Products: Preclinical and Clinical Studies of Their Anti-inflammatory and Immunomodulatory Properties. *Frontiers in Nutrition*, 8(January), 1–19.  
<https://doi.org/10.3389/fnut.2021.761267>

Engin, O. (2015). Colon Polyps and the Prevention of Colorectal Cancer. In *Medicinski arhiv* (Vol. 56, Issue 1 Suppl 1).  
<https://doi.org/10.1016/b978-1-4160-6168-7.00011-x>

- Evans, W. C. (2002). *Trease and Evans Pharmacognosy*. 15th edition. Edinburgh, Saunders.
- Ezeabara, A. C., Okeke, C. U., Aziagba, B. O., Llodibia, C. V., & Emeka, A. N. (2014). Determination of Saponin Content of Various Parts of Six Citrus Species Determination of Saponin Content of Various Parts of Six Citrus species. *International Research Journal of Pure & Applied Chemistry*, 4(1), 137–143.
- Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Protocol Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 343–346.  
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>
- Fernandes-Silva, C. C., Freitas, J. C., Salatino, A., & Salatino, M. L. F. (2013). Cytotoxic activity of six samples of Brazilian propolis on sea urchin (*Lytechinus variegatus*) eggs. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 4. <https://doi.org/10.1155/2013/619361>
- Forma, E., & Bryś, M. (2021). Anticancer Activity of Propolis and Its Compounds. *Nutrients*, 13(8), 2594.  
<https://doi.org/10.3390/nu13082594>
- Franchin, M., Da Cunha, M. G., Denny, C., Napimoga, M. H., Cunha, T. M., Bueno-Silva, B., Matias De Alencar, S., Ikegaki, M., & Luiz Rosalen, P. (2013). Bioactive fraction of geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases neutrophils migration in the inflammatory process: Involvement of nitric oxide pathway. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 9.  
<https://doi.org/10.1155/2013/907041>
- Freshney, R. I. (2012). *Animal Cell Culture Guide*. In Atcc.  
[www.atcc.org](http://www.atcc.org)
- Fridlender, M., Kapulnik, Y., & Koltai, H. (2015). Plant derived substances with anti-cancer activity: From folklore to practice. *Frontiers in Plant Science*, 6(OCTOBER), 1–9.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00799>
- Giri, V. V. (2018). OPPORTUNITIES OF THE USE OF PROPOLIS IN ANIMAL BREEDING. *International Journal of Current Innovation*

Research, 4(4), 1137–1140. <https://doi.org/10.24327/IJCIR>

Granados-Romero, J. J., Valderrama-Treviño, A. I., Contreras-Flores, E. H., Barrera-Mera, B., Herrera Enríquez, M., Uriarte-Ruíz, K., Ceballos-Villalba, J. C., Estrada-Mata, A. G., Alvarado Rodríguez, C., & Arauz-Peña, G. (2017). Colorectal cancer: a review. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 5(11), 4667. <https://doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20174914>

Gulati, S., Sachdeva, M., & Bhasin, K. K. (2018). Capping agents in nanoparticle synthesis: Surfactant and solvent system. *AIP Conference Proceedings*, 1953, (030214-1)-(030214-4). <https://doi.org/10.1063/1.5032549>

Hakeemullah, H., Anwar, M., Khan, J., Inayatullah, I., Khan, N., & Hakeem, A. (2020). Anticancer Studies of Extracts and Fractions of *Hertia Intermedia*. *Al-Nahrain Journal of Science*, 23(1), 43–46. <https://doi.org/10.22401/anjs.23.1.06>

Hasan, A. E. Z., Mangunwidjaja, D., Sunarti, T. C., Suparno, O., & Setiyono, A. (2016). Antibreast cancer activity of nanopropolis Indonesia on induced mammary gland tumor by dmba in virgin sprague-dawley rats. *Biotropia*, 23(1), 35–41. <https://doi.org/10.11598/btb.2016.23.1.473>

Herbst, M. C. (2015). Fact Sheet on Testicular Cancer. In *Cancer Association of South Africa (CANSA)* (Issue February). <https://doi.org/10.13140/2.1.3134.8008>

Hołderna-Kędzia, E. (2020). Przeciwnowotworowe działanie składników propolisu. Cz. 2. Związki flawonoidowe. *Postępy Fitoterapii*, 21(4). <https://doi.org/10.25121/pf.2020.21.4.250>

Hori, J. I., Zamboni, D. S., Carrão, D. B., Goldman, G. H., & Berretta, A. A. (2013). The inhibition of inflammasome by Brazilian propolis (EPP-AF). *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 11. <https://doi.org/10.1155/2013/418508>

Hussein, A. R., & El-Anssary, A. A. (2018). Plants Secondary Metabolites: The Key Drivers of the Pharmacological Actions of Medicinal Plants. In *Herbal Medicine* (pp. 11–30).

- Irigoiti, Y., Navarro, A., Yamul, D., Libonatti, C., Tabera, A., & Basualdo, M. (2021). The use of propolis as a functional food ingredient: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 115, 297–306.
- Jabir, M. S., Sulaiman, G. M., Taqi, Z. J., & Li, D. (2017). Iraqi propolis increases degradation of IL-1 $\beta$  and NLRC4 by autophagy following *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Microbes and Infection*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.10.007>
- Jayakumar, R., Ramya, C., Kumar, P. T. S., Snima, K. S., Lakshmanan, V.-K., & Nair, S. V. (2012). In vitro Anti-cancerous and Anti-microbial Activity of Indian Propolis Nanoparticles. *Journal of Nanopharmaceutics and Drug Delivery*, 1(2), 150–156. <https://doi.org/10.1166/jnd.2013.1004>
- Jiang, X. Sen, Xie, H. Q., Li, C. Q., You, M. M., Zheng, Y. F., Li, G. Q., Chen, X., Zhang, C. P., & Hu, F. L. (2020). Chinese Propolis Inhibits the Proliferation of Human Gastric Cancer Cells by Inducing Apoptosis and Cell Cycle Arrest. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2020/2743058>
- Kaman, P. K., & Dutta, P. (2019). Synthesis, characterization and antifungal activity of biosynthesized silver nanoparticle. *Indian Phytopathology*, 72(1), 79–88. <https://doi.org/10.1007/s42360-018-0081-4>
- Kaya, S. I., Ozcelikay, G., Mollarasouli, F., Bakirhan, N. K., & Ozkan, S. A. (2022). Recent achievements and challenges on nanomaterial based electrochemical biosensors for the detection of colon and lung cancer biomarkers. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 351. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130856>
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908–931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
- Khawar, A., Bhatti, I. A., Q.M.Khan, A.I.Khan, M.R.Asi, & T.Ali. (2011). Evaluating the in-vitro antibacterial effect of Iranian propolis on oral microorganisms. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10(2), 363–368.

<https://doi.org/10.22037/ijpr.2011.967>

King, D. (2017). Kangaroo Island Propolis [Sydney].  
<https://ses.library.usyd.edu.au/handle/2123/17080>

Kischkel, B., De Castilho, P. F. D., De Oliveira, K. M. P., Rezende, P. S. T., Bruschi, M. L., Svidzinski, T. I. E., & Negri, M. (2020). Silver nanoparticles stabilized with propolis show reduced toxicity and potential activity against fungal infections. *Future Microbiology*, 15(7), 521–539. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0173>

Koc, A. M., Celik, S. U., & Akyol, C. (2019). Colon Cancer. In *Intechopen* (pp. 1–26).

Koosha, S., Alshawsh, M. A., Yeng, L. C., Seyedan, A., & Mohamed, Z. (2016). An association map on the effect of flavonoids on the signaling pathways in colorectal cancer. *International Journal of Medical Sciences*, 13(5), 374–385.  
<https://doi.org/10.7150/ijms.14485>

Korbekandi, H., Iravani, S., & Abbasi, S. (2012). Optimization of biological synthesis of silver nanoparticles using *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 87(7), 932–937. <https://doi.org/10.1002/jctb.3702>

Kucharzewsk, M., Kubacka, S., Urbanek, T., Wilemska-Kucharzewska, K., & Morawiec, T. (2013). Stan scheller: The forerunner of clinical studies on using propolis for poor and chronic nonhealing wounds. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 5. <https://doi.org/10.1155/2013/456859>

Kucharzewski, M., Kózka, M., & Urbanek, T. (2013). Topical treatment of nonhealing venous leg ulcer with propolis ointment. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 5.  
<https://doi.org/10.1155/2013/254017>

Kuropatnicki, K. A., Szliszka, E., & Krol, W. (2013). Historical aspects of propolis research in modern times. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 11. <https://doi.org/10.1155/2013/964149>

- Kustiawan, P. M., Puthong, S., Arung, E. T., & Chanchao, C. (2014). In vitro cytotoxicity of Indonesian stingless bee products against human cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(7), 549–556.  
<https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014APJTB-2013-0039>
- Ledo-fernandes, B. M., Cruz, A. P., Marinho, S. A., Cristiano, J., Glória, R., & Lopes-rocha, R. (2015). Propolis, Chemoprevention and Use of Animals in Experimental Research: A Critical Review. *International Journal of Cancer Research*, 49(2), 1729–1746.
- Luhur, A., Klueg, K. M., Roberts, J., & Zelhof, A. C. (2019). Thawing, culturing, and cryopreserving drosophila cell lines. *Journal of Visualized Experiments*, 2019(146), 1–12.  
<https://doi.org/10.3791/59459>
- Machado, J. L., Assunção, A. K. M., Da Silva, M. C. P., Reis, A. S. Dos, Costa, G. C., Arruda, D. D. S., Rocha, B. A., Vaz, M. M. D. O. L. L., Paes, A. M. D. A., Guerra, R. N. M., Berretta, A. A., & Nascimento, F. R. F. Do. (2012). Brazilian green propolis: Anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012(February 2014), 10.  
<https://doi.org/10.1155/2012/157652>
- Mărghitaș, L. Al, Dezmirean, D. S., & Bobiș, O. (2013). Important developments in romanian propolis research. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 9. <https://doi.org/10.1155/2013/159392>
- Meerlo, J. Van, Kaspers, G. J. L., & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: The MTT assay. In *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* (2nd ed., Vol. 731, Issue July 2015, pp. 237–245).  
[https://doi.org/10.1007/978-1-61779-80-5\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-80-5_20)
- Meleady, P., & Connor, R. O. (2006). General Procedures for Cell Culture. In *CELL AND TISSUE CULTURE: ASSORTED TECHNIQUES* (3rd ed., pp. 13–20).
- Mishra, J., Drummond, J., Quazi, S. H., Karanki, S. S., Shaw, J. J., Chen, B., & Kumar, N. (2013). Prospective of colon cancer treatments and scope for combinatorial approach to enhanced

cancer cell apoptosis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 86(3), 232–250.  
<https://doi.org/10.1016/J.CRITREVONC.2012.09.014>

MOH. (2020). *Environmental Statistics for Iraq Health Indicators 2019* (pp. 1–62).

Moheisen, H. M. (2021). Antitumor Activities of Flavonoids and Their Biological Activities on Human Health. *Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences*, 3(1).  
<https://doi.org/10.26389/ajsrp.h230119>

Mokhtar, S. U. (2019). Comparison of total phenolic and flavonoids contents in Malaysian propolis extract with two different extraction solvents. *International Journal of Engineering Technology and Sciences*, 6(2), 1–11. <https://doi.org/10.15282/ijets.v6i2.2577>

Montoro, A., Soriano, J. M., Barquinero, J. F., Almonacid, M., Montoro, A., Verdú, G., Sahuquillo, V., Villaescusa, J. I., & Sebastià, N. (2012). Assessment in vitro of cytogenetic and genotoxic effects of propolis on human lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 50(2), 216–221.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.10.053>

Morphology, T. C. (2018). *BEEHIVE ALCHEMY Projects and recipes using honey, beeswax, propolis, and pollen to make soap, candles, creams, salves, and more (DIGITAL ED)*. Quarto Publishing Group USA Inc.

Nakamura, T., Ohta, Y., Ohashi, K., Ikeno, K., Watanabe, R., Tokunaga, K., & Harada, N. (2013). Protective effect of Brazilian propolis against liver damage with cholestasis in rats treated with  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013(14). <https://doi.org/10.1155/2013/302720>

Nascimento, T. G., Silva, P. F. da, Azevedo, L. F., Rocha, L. G. da, Porto, I. C. C. de M., Moura, T. F. A. L. e, Basílio-Júnior, I. D., Grillo, L. A. M., Dornelas, C. B., Fonseca, E. J. da S., Oliveira, E. de J., Zhang, A. T., & Watson, D. G. (2016). Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity.

Nanoscale Research Letters, 11(1), 1–16.  
<https://doi.org/10.1186/s11671-016-1517-3>

Okińczyc, P., Paluch, E., Franiczek, R., Widelski, J., Wojtanowski, K. K., Mroczek, T., Krzyżanowska, B., Skalicka-Woźniak, K., & Sroka, Z. (2020). Antimicrobial activity of *Apis mellifera* L. and *Trigona* sp. propolis from Nepal and its phytochemical analysis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 129(February), 10.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110435>

Okińczyc, P., Widelski, J., Szperlik, J., Żuk, M., Mroczek, T., Skalicka-Woźniak, K., Sakipova, Z., Widelska, G., & Kuś, P. M. (2021). impact of plant origin on eurasian propolis on phenolic profile and classical antioxidant activity. *Biomolecules*, 11(1), 1–18. <https://doi.org/10.3390/biom11010068>

Oladele, A., Adebowale, J., & Bamidele, O. (2017). Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Brown and Yellow Varieties of Tigernut (*Cyperus esculentus* L.). *Nigerian Food Journal*, 35(1), 51–59.  
<https://www.ajol.info/index.php/nifoj/article/view/162722>

Olczyk, P., Ramos, P., Bernas, M., KatarzynaKomosinska-Vassev, Stojko, J., & Pilawa, B. (2013). Application of electron paramagnetic resonance spectroscopy to comparative examination of different groups of free radicals in thermal injuries treated with propolis and silver sulphadiazine. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 11. <https://doi.org/10.1155/2013/851940>

Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., & Gan, S. H. (2017). Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 21.  
<https://doi.org/10.1155/2017/1259510>

Perchyonok, T. (2018). From propolis to designer biomaterials for the applications in the veterinary medicine: copazan herbal gel with beepolis and wound healing in vitro. *Advances in Tissue Engineering & Regenerative Medicine*, 4(1), 4–10.  
<https://doi.org/10.15406/atroa.2018.04.00069>

Phelan, K., & May, K. M. (2017). Mammalian cell tissue culture.

Current Protocols in Human Genetics, A.3G.1-A.3G.22.  
<https://doi.org/10.1002/cphg.41>

- Pobiega, K., Gniewosz, M., & Kraśniewska, K. (2017). Antimicrobial and antiviral properties of different types of propolis. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 589, 69–79.  
<https://doi.org/10.22630/zppnr.2017.589.22>
- Pobiega, K., Kraśniewska, K., Przybył, J. L., Bączek, K., Żubernik, J., Witrowa-Rajchert, D., & Gniewosz, M. (2019). Growth biocontrol of foodborne pathogens and spoilage microorganisms of food by Polish propolis extracts. *Molecules*, 24(16), 1–17.  
<https://doi.org/10.3390/molecules24162965>
- Priyadarshini, J. F., Sivakumari, K., Selvaraj, R., Ashok, K., Jayaprakash, P., & Rajesh, S. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles from propolis. *Research Journal of Sciences, Bioinformaticsm Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 4(23), 23–36. <https://doi.org/10.26479/2018.0404.02>
- Ramanauskiene, K., Inkeniene, A. M., Petrikaite, V., & Briedis, V. (2013). Total phenolic content and antimicrobial activity of different lithuanian propolis solutions. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 5. <https://doi.org/10.1155/2013/842985>
- Reis, J. H. de O., Barreto, G. A., Cerqueira, J. C., Anjos, J. P. dos, Andrade, L. N., Padilha, F. F., Druzian, J. I., & Souza, B. A. M. (2019). Evaluation of the antioxidant profile and cytotoxic activity of red propolis extracts. *PLOS ONE*, 14(7), 1–27.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219063>
- Righi, A. A., Negri, G., & Salatino, A. (2013). Comparative chemistry of propolis from eight brazilian localities. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 14. <https://doi.org/10.1155/2013/267878>
- Roberto, M. M., Matsumoto, S. T., Jamal, C. M., Malaspina, O., & Marin-Morales, M. A. (2016). Evaluation of the

genotoxicity/mutagenicity and antigenotoxicity/antimutagenicity induced by propolis and *Baccharis dracunculifolia*, by in vitro study with HTC cells. *Toxicology in Vitro*, 33, 9–15.  
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.02.005>

Rocha, B. A., Bueno, P. C. P., Vaz, M. M. D. O. L. L., Nascimento, A. P., Ferreira, N. U., Moreno, G. D. P., Rodrigues, M. R., Costa-Machado, A. R. D. M., Barizon, E. A., Campos, J. C. L., De Oliveira, P. F., Acésio, N. D. O., Martins, S. D. P. L., Tavares, D. C., & Berretta, A. A. (2013). Evaluation of a Propolis Water Extract Using a Reliable RP-HPLC Methodology and In Vitro and In Vivo Efficacy and Safety Characterisation Bruno. Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013, 11.  
<https://doi.org/10.1155/2013/670451>

Rodríguez, I. del S. F., Monteagudo, M. M., Orozco, A. L., & Sánchez, T. A. C. (2016). Use of Mexican Propolis for the Topical Treatment of Dermatomycosis in Horses. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 06(01), 1–8.  
<https://doi.org/10.4236/ojvm.2016.61001>

Šabanović, M., Saltović, S., Mujkić, A. A., Jašić, M., & Bahić, Z. (2019). Impact of Propolis on the Oral Health. *Balkan Journal of Dental Medicine*, 23(1), 1–9. <https://doi.org/10.2478/bjdm-2019-0001>

Şahin, Ş. H. T., Mesut, B., & Özsoy, Y. (2018). Applications of cell culture studies in pharmaceutical technology. *Acta Pharmaceutica Scientia*, 55(3), 63–79.  
<https://doi.org/10.23893/1307-2080.APS.05519>

Santos, D. A. dos, Munari, F. M., Frozza, C. O. da S., Moura, S., Barcellos, T., Henriques, J. A. P., & Roesch-Ely, M. (2019). Brazilian red propolis extracts: study of chemical composition by ESI-MS/MS (ESI+) and cytotoxic profiles against colon cancer cell lines. *Biotechnology Research and Innovation*, 3(1), 120–130.  
<https://doi.org/10.1016/j.biori.2019.02.001>

Sardana, D., Indushekar, K., Manchanda, S., Saraf, B. G., & Sheoran, N. (2013). Role of propolis in dentistry: Review of the literature. *Focus on Alternative and Complementary Therapies*,

18(3), 118–125. <https://doi.org/10.1111/fct.12034>

Sawicka, D., Car, H., Borawska, M. H., & Nikliński, J. (2012). The anticancer activity of propolis. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 50(1), 25–37.

<https://doi.org/10.5603/FHC.2012.0004>

Seven, P. T., Seven, I., Gul Baykalir, B., Iflazoglu Mutlu, S., & Salem, A. Z. M. (2018). Nanotechnology and nano-propolis in animal production and health: an overview. *Italian Journal of Animal Science*, 17(4), 921–930.

<https://doi.org/10.1080/1828051X.2018.1448726>

Seven, P. T., Seven, I., Karakus, S., Mutlu, S. I., Arkali, G., Sahin, Y. M., & Kilislioglu, A. (2020). Turkish Propolis and Its Nano Form Can Ameliorate the Side Effects of Cisplatin, Which Is a Widely Used Drug in the Treatment of Cancer. *Plants*, 9, 22.

Seven, P. T., Seven, I., Karakus, S., Mutlu, S. I., Kaya, S. O., Arkali, G., Ilgar, M., Tan, E., Sahin, Y. M., Ismik, D., & Kilislioglu, A. (2021). The in-vivo assessment of Turkish propolis and its nano form on testicular damage induced by cisplatin. *Journal of Integrative Medicine*, 19(5), 1–9.

<https://doi.org/10.1016/j.joim.2021.08.002>

Shameem, S. A., Ganai, B. A., Rather, M. S., & Khan, K. Z. (2017). Chemical composition and antioxidant activity of *Viscum album L* . growing on *Juglans regia* host tree in Kashmir , India. *International Journal of Research in Science and Engineering*, 06(01), 921–927.

Shanmugam, N., & Gurusamy, V. (2016). Colorectal cancer and its management: Review. *Scigen Journal of Science and Technology*, 1(January 2015), 6.

Shubharani, R., Sivaram, V., & Kishore, B. R. (2014). In-vitro cytotoxicity of Indian bee Propolis on cancer cell lines. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 5(4), P698–P706.

Silva, M. V. da, de Moura, N. G., Motoyama, A. B., & Ferreira, V. M. (2020). A review of the potential therapeutic and cosmetic use of propolis in topical formulations. *Journal of Applied*

Pharmaceutical Science, 10(1), 131–141.  
<https://doi.org/10.7324/JAPS.2020.101018>

- Singh, N., Saha, P., Rajkumar, K., & Abraham, J. (2014). Biosynthesis of silver and selenium nanoparticles by *Bacillus* sp. JAPSK2 and evaluation of antimicrobial activity. *Der Pharmacia Lettre*, 6(1), 175–181.
- Skaba, D., Morawiec, T., Tanasiewicz, M., Mertas, A., Bobela, E., Szliszka, E., Skucha-Nowak, M., Dawiec, M., Yamamoto, R., Ishiai, S., Makita, Y., Redzyna, M., Janoszka, B., Niedzielska, I., & Król, W. (2013). Influence of the toothpaste with brazilian ethanol extract propolis on the oral cavity health. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 12.  
<https://doi.org/10.1155/2013/215391>
- Soltaninejad, V., Kazemipour, N., Yaghoobi, M. M., & Pardakhty, A. (2020). Ethanolic extract of propolis from Kerman area triggers apoptosis and arrests cell cycle in three human breast cancer cell lines MDA-MB-231, SKBR and MCF-7. *Journal of Kerman University of Medical Sciences*, 27(2), 120–133.
- Somaida, A. cytotoxicity of four cameroonian plant extracts on different cancer cell linesed, Tariq, I., Ambreen, G., Abdelsalam, A. M., Ayoub, A. M., Wojcik, M., Dzoyem, J. P., & Bakowsky, U. (2020). Potent Cytotoxicity of Four Cameroon Plant Extracts on Different Cancer Cell Lines. *Pharmaceuticals*, 13(357), 1–19.  
<https://doi.org/10.3390/ph13110357>
- Srinivas, U. S., Tan, B. W. Q., & Vellayappan, B. A. (2019). ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biology*, 25(101084), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084>
- Stojanović, S., Najman, S. J., Bogdanova-Popov, B., & Najman, S. S. (2020). Propolis: Chemical Composition, Biological and Pharmacological Activity – a Review. *Acta Medica Medianae*, 59(2), 108–113. <https://doi.org/10.5633/amm.2020.0215>
- Study, S., Eddine, L. S., & Ridha, O. M. (2017). phytochemical screening , in vitro antioxidant and antibacterial activity of rumex vesicariusl l . extract. *laouini and ouahrani*, 18(4), 367–376.

- Sulaiman, G. M., Sammarrae, K. W. A., Ad'hiah, A. H., Zucchetti, M., Frapolli, R., Bello, E., Erba, E., D'Incalci, M., & Bagnati, R. (2011). Chemical characterization of iraqi propolis samples and assessing their antioxidant potentials. *Food and Chemical Toxicology*, 49(9), 2415–2421.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.06.060>
- Suleiman, J. B., Bakar, A. B. A., & Mohamed, M. (2021). Review on bee products as potential protective and therapeutic agents in male reproductive impairment. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 11, p. 22). <https://doi.org/10.3390/molecules26113421>
- Suriamah, N., Lessang, R., & Kemal, Y. (2019). Effectiveness of toothpaste containing propolis, tea tree oil, and sodium monofluorophosphate against plaque and gingivitis. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 11(1), 114–116.  
<https://doi.org/10.22159/ijap.2019.v11s1.AR172>
- Szliszka, E., & Krol, W. (2013). Polyphenols isolated from propolis augment TRAIL-induced apoptosis in cancer cells. In *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* (Vol. 2013, p. 10). <https://doi.org/10.1155/2013/731940>
- Szliszka, E., Zydowicz, G., Janoszka, B., Dobdsz, C., Kowalczyk-Ziomek, G., & Krol, W. (2012). Genotoxicity of metal nanoparticles: Focus on in vivo studies. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 63(2), 133–145.  
<https://doi.org/10.2478/10004-1254-63-2012-2213>
- Taha, Z. K., Hawar, S. N., & Sulaiman, G. M. (2019). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles from *Penicillium italicum* and its antioxidant, antimicrobial and cytotoxicity activities. *Biotechnology Letters*, 41(8–9), 899–914.  
<https://doi.org/10.1007/s10529-019-02699-x>
- Tan, G., ilk, S., Foto, F. Z., Foto, E., & Saglam, N. (2021). Antioxidative and antiproliferative effects of propolis-reduced silver nanoparticles. *Advances in Nano Research*, 10(2).  
<https://doi.org/10.12989/anr.2021.10.2.139>
- Taqi, Z. J., Abdul-wahed, H. E., Al-saadi, H. K., & Jabir, M. S. (2020). Potential activity of silver nanoparticles synthesized by Iraqi

propolis on phagocytosis. AIP Conference Proceedings, 020104(March), 1–6.

Tofighi, Z., Ghazi, N., Hadjiakhoondi, A., & Yassa, N. (2016). Determination of cardiac glycosides and total phenols in different generations of *Securigera securidaca* suspension culture. *Research Journal of Pharmacognosy (RJP)*, 3(2), 25–31.

Toreti, V. C., Sato, H. H., Pastore, G. M., & Park, Y. K. (2013). Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 13. <https://doi.org/10.1155/2013/697390>

Tran, Q. H., Nguyen, V. Q., & Le, A. T. (2013). Silver nanoparticles: Synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 4(3), 1–22. <https://doi.org/10.1088/2043-6262/4/3/033001>

Tsuchiya, I., Hosoya, T., Ushida, M., Kunimasa, K., Ohta, T., & Kumazawa, S. (2013). Nymphaeol-a isolated from okinawan propolis suppresses angiogenesis and induces caspase-dependent apoptosis via inactivation of survival signals. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 9. <https://doi.org/10.1155/2013/826245>

Turan, I., Demir, S., Misir, S., Kilinc, K., Mentese, A., Aliyazicioglu, Y., & Deger, O. (2015). Cytotoxic effect of Turkish propolis on liver, colon, breast, cervix and prostate cancer cell lines. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 14(5), 777–782. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v14i5.5>

UĞURLU, D. (2013). Effects of Biological Compound Turkish Propolis Extract on Breast Cancer Cells. BILKENT UNIVERSITY IN.

Utispan, K., Chitkul, B., & Sittichai Koontongkaew. (2017). Cytotoxic Activity of Propolis Extracts from the Stingless Bee *Trigona Sirindhornae* Against Primary and Metastatic Head and Neck Cancer Cell Lines. *Asian Pac J Cancer Prev*, 18(4), 1051–1055. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.4.1051>

Vaseghi, Z., Nematollahzadeh, A., & Tavakoli, O. (2017). Green

methods for the synthesis of metal nanoparticles using biogenic reducing agents: A review. *Reviews in Chemical Engineering*, 34(4), 1–31. <https://doi.org/10.1515/revce-2017-0005>

Venditti, I. (2017). Morphologies and functionalities of polymeric nanocarriers as chemical tools for drug delivery: A review. *Journal of King Saud University - Science*, 31(3), 1–44. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.10.004>

Vit, P., Huq, F., Barth, O., Campo, M., Pérez-Pérez, E., Tomás-Barberán, F., & Santos, E. (2015). Use of Propolis in Cancer Research. *British Journal of Medicine and Medical Research*, 8(2), 88–109. <https://doi.org/10.9734/bjmmr/2015/16216>

Wagh, V. D. (2013). Propolis: A wonder bees product and its pharmacological potentials. Hindawi Publishing Corporation *Advances in Pharmacological Sciences*, 2013, 11. <https://doi.org/10.1155/2013/308249>

Wali, A. F., Mushtaq, A., Rehman, M. U., Akbar, S., & Masoodi, M. H. (2017). Bee Propolis ( Bee ' S Glue ): a Phytochemistry Review. *Journal of Chemical Research*, 4(4), 5–9. <https://doi.org/10.22159/jcr.2017v4i4.20135>

Wang, Y., Duan, M., Peng, Z., Fan, R., He, Y., Zhang, H., Xiong, W., & Jiang, W. (2022). Advances of DNA Damage Repair-Related Drugs and Combination With Immunotherapy in Tumor Treatment. *Frontiers in Immunology*, 13(854730), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.854730>

Wargo, J. A., Reddy, S. M., Reuben, A., & Sharma, P. (2016). Monitoring immune responses in the tumor microenvironment. *Current Opinion in Immunology*, 41, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.05.006>

Więckiewicz, W., Miernik, M., Więckiewicz, M., & Morawiec, T. (2013). Does propolis help to maintain oral health? Hindawi Publishing Corporation *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 8. <https://doi.org/10.1155/2013/351062>

Wieczorek, Piotr Paweł, Hudz, N., Yezerka, O., Horcinova-Sedlackova, V., Shanaida, M., Korytniuk, O., & Jasicka-Misiak, I. (2022). Chemical Variability and Pharmacological Potential of Propolis

Pharmaceutical Products. *Molecules*, 27(1600), 1–28.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules27051600>

- Wieczyńska, A., Wezgowiec, J., Więckiewicz, W., Czarny, A., Kulbacka, J., Nowakowska, D., Gancarz, R., & Wilk, K. A. (2017). Antimicrobial activity, cytotoxicity and total phenolic content of different extracts of propolis from the west pomeranian region in Poland. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 74(2), 715–722.
- Wojtyczka, R. D., Kępa, M., Idzik, D., Kubina, R., Kabała-Dzik, A., Dziedzic, A., & Wąsik, T. J. (2013). In vitro antimicrobial activity of ethanolic extract of polish propolis against biofilm forming staphylococcus epidermidis strains. Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013, 11. <https://doi.org/10.1155/2013/590703>
- Wolska, K., Górską, A., Antosik, K., & Ługowska, K. (2019). Immunomodulatory effects of propolis and its components on basic immune cell functions. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81(4), 575–588.  
<https://doi.org/10.36468/pharmaceutical-sciences.548>
- Yang, T., Peng, J., Shu, Z., Sekar, P. K., Li, S., & Gao, D. (2019). Determination of the membrane transport properties of jurkat cells with a microfluidic device. *Micromachines*, 10(832), 1–12.  
<https://doi.org/10.3390/mi10120832>
- Youssef, F. S., El-Banna, H. A., Elzorba, H. Y., & Galal, A. M. (2019). Application of some nanoparticles in the field of veterinary medicine. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 7(1), 78–93.  
<https://doi.org/10.1080/23144599.2019.1691379>
- Yuan, J., Lu, Y., Abula, S., Hu, Y., Liu, J., Fan, Y., Zhao, X., Wang, D., Liu, X., & Liu, C. (2013). Optimization on preparation condition of propolis flavonoids liposome by response surface methodology and research of its immunoenhancement activity. Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013, 8.  
<https://doi.org/10.1155/2013/505703>

- Yucel, B., Topal, E., & Kosoglu, M. (2017). Bee Products as Functional Food. In *Superfood and Functional Food - An Overview of Their Processing and Utilization* (p. 22). <https://doi.org/10.5772/65477>
- Zabaiou, N., Fouache, A., Trousson, A., Baron, S., Zellagui, A., Lahouel, M., & Lobaccaro, J. A. (2017). Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. *Chemistry and Physics of Lipids*, 207, 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.04.005>
- Žilius, M., Ramanauskiene, K., & Briedis, V. (2013). Release of propolis phenolic acids from semisolid formulations and their penetration into the human skin in vitro. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 7. <https://doi.org/10.1155/2013/958717>

## Summary

This study was conducted to find the relationship between the by-product of propolis metabolism and the most dangerous human disease, which is cancer, using the human colon cancer cell line (SW480). The study aimed to test the possibility of the toxic effect of Iraqi propolis against the human colon cancer cell line. Nanoparticle tests and DNA testing were conducted in the laboratories of the Department of Environment and Water Technology of the Ministry of Science and Technology, while tissue culture, cytotoxicity testing and cell counting were conducted in Cell culture techniques at the College of Medicine/University of Babylon from September (2021) to January (2022).

The chemical detection of the compounds found in Iraqi raw propolis in Karbala governorate was carried out by (HPLC) High Performance Liquid Chromatography test, as it was found that raw propolis contains secondary metabolites arranged from highest to lowest ratio (phenol, alkaloid, glycoside, tannin, flavone, saponin).

The alcoholic and nano-extract of propolis was prepared.

The atomic absorption spectroscopically of silver nanoparticles prepared according to Atomic Absorption Spectros (AAS) method was measured. The concentrations of ethanolic propolis extract were (1%, 3%, 5%, 7%) and the device read (200, 350, 500, 650) ppm on Sequence of silver nanoparticles of alcoholic propolis extract.

Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) of the ethanolic extract was performed, and absorption bands appeared at the range (588, 667, 1634, 1958, 2028)  $\text{cm}^{-1}$ . As for the nano-extract of propolis, absorption bands appeared at the range (588, 667, 1031, 1384, 1634, 1958, 2028, 2925)  $\text{cm}^{-1}$ . The extended vibrational bands refer to the compounds responsible for its occurrence, most notably the flavonoid groups, and therefore can be considered responsible for effective coverage and stabilization AgNPs.

Where the propolis nanoparticles were diagnosed by Atomic Force Microscope (AFM) with spherical objects with an average size of (70) nanometers.

The cytotoxic and genotoxic effect of alcoholic extract of propolis against human colon cancer cell line was investigated for a period of (24) hours of exposure at a significant level ( $p < 0.05$ ) using six sequential concentrations of the ethanolic extract (31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000)  $\mu\text{g/ml}$ , the inhibition rates were high with a significant decrease in the number of cancer cells and high rates of DNA breakage using Comet assay test, The highest inhibition was reached at a concentration of 500 and 1000  $\mu\text{g/ml}$ , the cytotoxicity and genetics increased with increasing concentration.

The cytotoxic and genotoxic effect of the nano-extract against human colon cancer cell line was investigated for a period of exposure (24) hours at a significant level ( $p < 0.05$ ) using four sequential

concentrations of the nano-extract (1%, 3%, 5%, 7%).  $\mu\text{g/ml}$  The results showed a high percentage of inhibition of cancer cells with a very large decrease in the number of cancer cells and very high rates of DNA breakage, so that the highest percentage of inhibition was at a concentration of (5%, 7%)  $\mu\text{g/ml}$ , and the nano extract was at a concentration of (1%). More effective than the concentration of (1000)  $\mu\text{g/ml}$  of the alcoholic extract, the cytotoxicity and genetics increased with increasing concentration.



University of Kerbala

College of Education for pure science

Department of Biology

**Cytotoxic activity of silver nanoparticles (AgNo<sub>3</sub>) and alcoholic extract of propolis on human colon cancer cell line (SW480)**

A thesis Submitted to the council of the college of Education for Pure Science University of Kerbala in partial fulfillment of requirement for the degree of Master of Biology- Zoology

Written by:

Kawther Neamah Najm Al-saady

Supervised by:

Prof.Dr.Yasemin Khudiar Alghanimi

1443 B.C.

2022 A.D.