الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة فرحات عباس

كلية العلوم قسم البيولوجيا

مقدمة لنيل شهادة الماجستير

في الميكروبيولوجيا التطبيقية

التأثير الضد ميكروبي والضد تأكسدي لمادة البروبوليس (العكبر)

من طرف: ابن الشيخ عمر

أمام اللجنة المتكونة من:

الرئيس: أ. قشي عبد الهادي	أستاذ التعليم العالي بجامعة فرحات عباس سطيف
المشرف: د. حـــرزالله داود	أستاذ محاضر بجامعة فرحات عباس سطيف
الأعضاء: د. عرعار لخميسي	أستاذ محاضر بجامعة فرحات عباس سطيف
د. زروق محمد ميهوب	أستاذ محاضر بجامعة فرحات عباس سطيف

- 2008 -

التشكرات

أحمد الله وأشكره الذي بفضله وعونه تم إنجاز هذا العمل

تشكراتي الخالصة للدكتور حرزالله داود على كل مساعداته وتوجيهاته القيمة طيلة إشرافه على هذا العمل.

أشكر الأستاذ قشي عبد الهادي على تشجيعاته

أتقدم بالشكر إلى أعضاء لجنة المناقشة الذين تفضلوا وقبلوا مناقشة هذا البحث الأستاذ قشي عبد الهادي والدكتور عرعار لخميسي والدكتور زروق محمد ميهوب الشكر الجزيل لكل من ساهم في إنجاز هذا العمل و أخص بالذكر علاء قديع موسى و عمي نور الدين وعمي محمد الطيب

كما أشكر والدي و زوجتي الذين لم يبخلوا علي بما أطلب.

الإهداء

إلى من جعل الله طاعتهما بعد طاعته (أمي و أبي) اللذين أزالا همي،

و قويا عزيمتي

إلى من أوصانا الله بالرفق بها زوجتي الغالية و التي أهداها الله لي كرفيق

أستيقظ بيقظتي و سهر بسهري

إلى إخوتي و أخواتي و أخص بالذكر أختي العزيزة لطيفة

كما أهدي هذا العمل المتواضع إلى أصدقائي عبد الناصر، كنزي، سفيان و

موسى

كما لا أنسى كل من عمي الطاهر عمي محمد الطيب و عمي نور الدين من

زودني بمادة البروبوليس

الفهرسة **الصفحة**

الجزء الأول: دراسة مرجعية /

مقدمة 1

1- نبذة تاريخية 2

1-2-تعريف البروبوليس 3

1-3-مصدره 3

1-4-الأهمية الاجتماعية و الاقتصادية 4

1-5-خصائص البروبوليس 5

1-5-1-الخصائص الفيزيائية 5

1-5-2-التركيب الكيميائي 6

1-6-الجانب البيوكيميائي للبروبوليس 14

1-7-النشاط البيولوجي للبروبوليس 15

1-7-1-النشاطية الضد ميكروبية للبروبوليس 15

أ-النشاطية الضد بكتيرية 15

ب-النشاطية الضد فطرية 18

ج- النشاطية الضد فيروسية 18

1-7-2-تأثير البروبوليس على الجهاز المناعي و الإلتهاب 20

1-7-3-تأثير البروبوليس على التسمم الخلوي 21

1-7-4-التأثيرات الجانبية للبروبوليس 21

1-7-5-دور البروبوليس في علاج السرطان 21

1-7-6-تأثير البروبوليس على التئآم الجروح 22

1-7-7-تأثير البروبوليس المخدر 22

1-8-استعمالات البروبوليس الطبية 22

1-9-كيفية حفظ البروبوليس 23

2- الخاصية الضد تأكسدية للبروبوليس 24
2-1- الإجهاد التاكسدي 24
2-1-1- الأنواع الأكسجينية النشطة ROS 25
2-2- تأثيرات الإجهاد التأكسدي 25
2-2-1- تأثيرات الأنواع الأكسجينية النشطة على الجزيئات البيولوجية 25
2-2-2- الأمراض التي تتدخل فيها الجذور الحرة 25
2-3- النظام المضاد للأكسدة 26
مضادات الأكسدة الكاسرة للسلسلة 26
مضادات الأكسدة الوقائية 27
2-4- عديدات الفينول و نشاطياتها الحيوية 27
2-4-1- عديدات الفينول 27
النشاطية الحيوية لعديدات الفينول 27
النشاطية الحيوية للفلافونويدات 28
ج- التأثير المضاد للأكسدة لعديدات الفينول 30
د- تأثير الفلافونويدات المضاد للأكسدة 30
الجزء الثاني: المواد و الطرق /
3-1- المواد 32
3-1-2- المواد البيولوجية 32
3-1-3- المواد الكيميائية 33
3-2- الإستخلاص 33
3-3- نشاطية المستخلص الإيثانولي المضادة للأحياء الدقيقة 36
3-3-1- اختبار نشاطية المستخلص الإيثانولي المضادة للبكتيريا 36
اختبار النشاطية التثبيطية للمستخلص الإيثانولي بطريقة الأقراص 36
اختبار النشاطية التثبيطية للمستخلص الإيثانولي بطريقة الآبار 37

ج- طريقة الإختبار 38
د- تحديد التركيز الأدنى المثبط CMI 40
ه- تحديد التركيز الأدنى القاتل CMB 41
3-3-2- اختبار نشاطية التثبيطية للمستخلص الإيثانولي المضادة للفطريات 43
3-4- الخاصية الضد تأكسدية لمادة البروبوليس 44
الجزء الثالث: النتائج 46
4-1- الإستخلاص /
4-2- نشاطية المستخلص الإيثانولي المضادة للأحياء الدقيقة 46
4-2-1- نشاطية المستخلص الإيثانولي المضادة للبكتيريا 46
النشاطية التثبيطية 46
التركيز الأدنى المثبط و التركيز الأدنى القاتل 49
4-2-2- نشاطية المستخلص الإيثانولي المضادة للفطريات 51
4-3- النشاطية الضد تأكسدية للبروبوليس 54
4-3-1- القدرة على إزالة الجذور الحرة (باستعمال الجذر الحر DPPH) 54
الجزء الرابع: المناقشة /
5-1- الاستخلاص 56
5-2- نشاطية المستخلص الإيثانولي المضادة للأحياء الدقيقة 57
5-2-1- نشاطية المستخلص الإيثانولي المضادة للبكتيريا 57
5-2-2- نشاطية المستخلص الإيثانولي المضادة للفطريات 60
5-3- النشاطية الضد تأكسدية للبروبوليس 61
5-3-1- القدرة على إزالة الجذور الحرة (باستعمال الجذر الحر DPPH) 61
الخاتمة 63
المراجع 65

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
1	أسماء أهم المركبات المعزولة من البروبوليس	11
2	المكونات المسؤولة عن مختلف النشاطيات البيولوجية للبروبوليس	13
3	الأمراض التي تتدخل فيها الجذور الحرة	27
4	التخافيف المستعملة لتحديد CMI المستخلص الإيثانولي بطريقة المزج (NCCLS)	43
5	أقطار مناطق التثبيط المسجلة مع عينات البروبوليس و مع المضاد الحيوي	52
6	التلركيز الأدنى المثبط و التركيز الأدنى القاتل لعينات البروبوليس	53
7	أقطار مناطق التثبيط للمستخلص الإيثانولي مع أنواع *Aspergillus*	55
8	التركيز المثبط لـ 50% من الجذر الحر DPPH	57

قائمة الأشكال

الشكل	العنوان	الصفحة
1	شكل عام للفلافونويدات	9
2	التراكيب الكيميائية لأهم المركبات المعزولة من البروبوليس	10
3	تأثير الجذور الحرة على الجزيئات البيولوجية	26
4	مراحل استخلاص البروبوليس و الحصول على المستخلص الإيثنولي	37
5	خطوات دراسة النشاطية التثبيطية للمستخلص الإيثانولي بطريقة الأقراص	39
6	خطوات دراسة النشاطية التثبيطية للمستخلص الإيثانولي بطريقة الآبار	40
7	خطوات تحديد التركيز الأدنى المثبط CMI	44
8	خطوات دراسة النشاطية التثبيطية للمستخلص الإيثانولي على الفطريات	45
9	خطوات دراسة النشاطية الضد تأكسدية للبوبوليس.	47
10	تأثير المستخلص الإيثانولي للبروبوليس على البكتيريا (1650 ميكروغرام/البئر)	51
11	تحديد التركيز الأدنى المثبط CMI بطريقة المزج المقترحة من طرف NCCLS	53
12	تأثير المستخلص الإيثانولي للبروبوليس على فطر *A.niger*	55
13	تأثير المستخلص الإيثانولي للبروبوليس على فطر*A.fumigatis*	56
14	تأثير المستخلص الإيثانولي للبروبوليس على فطر*A.flavus*	56
15	النشاطية الضد تأكسدية لمختلف عينات البروبوليس، الأسكوربات و BHT	58
16	الـ IC_{50} لمختلف عينات البروبوليس و الأسكوربات و BHT	58

قائمة المختصرات

DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
BHT	Butylate Hydroxytoluen
MHA	Mueller-Hinton
CMI	Concentration minimale inhibitrice
MHB	Mueller-Hinton broth
PSA	Potatoes Saccharose Agar
CMB	Concentration minimale Bactericide
CI	Concentration inhibitrice
ROS	Reactive Oxygen Species
EEP	Ethanol Extract of Propolis
WEP	Water Extract of Propolis
ESP	Extract standard of propolis
NCCLS	National committee for Clinical Laboratory standards
OS	Oxidative Stresse
NDV	Newcastle Disease Virus
HSV	Herpes Simplex Virus
HIV	Human Immunodeficiency Virus

مقدمة:

من بين المواد العلاجية العديدة التي تضعها الطبيعة تحت تصرفنا، تحتل منتجات خلية النحل مكانة هامة راجعة إلى خصائصها المتعددة، و فعاليتها في علاج أمراض مختلفة.

بعض هذه المنتجات تم التعرف عليه منذ عصور جد قديمة خاصة العسل، الشمع و البروبوليس، و منتجات أخرى كحبوب الطلع و الهلام الملكي و اللذان تم التعرف عليهما حديثا مقارنة بالمكونات الأخرى؛ إذ بدأ المتخصصون بالإهتمام بدراسة هذه المنتجات بشكل جاد.

يمثل علاج الأمراض باستعمال منتجات خلية النحل شكلا علاجيا يعرف باسم Apithérapie، معناه علاج الأمراض باستعمال منتجات مجنية، محولة أو مطروحة من طرف النحل و هي تحديدا في الوقت الراهن:

حبوب الطلع، العسل، الهلام الملكي، سم و شمع النحل و أخيرا البروبوليس.

من بين منتجات خلية النحل المذكورة اهتممنا بدراسة نشاطيتين بيولوجيتين هامتين منسوبتين للبروبوليس (المستخلص الإيثانولي للبروبوليس) و هما النشاطيتان الضد ميكروبية (بكتيرية و فطرية) و ضد تأكسدية (القدرة على إزالة الجذور الحرة) وهذا لما تمثله الميكروبات و الجذور الحرة من خطر بليغ يهدد صحة و اقتصاد الإنسان.

و قد شمل عملنا هذا دراسة أربع عينات من البروبوليس من الشرق الجزائري قصد المقارنة بينها من جهة و المقارنة بينها و بين البروبوليس من مناطق أخرى من العالم من جهة أخرى.

الجزء النظري

1-1- نبذة تاريخية:

تعتبر معرفة الإنسان للبروبوليس أحدث من معرفته للعسل لكنه كان معروفا عند قدماء المصريين حيث استعمله الكهنة، بعدها بقليل عرفه اليونانيون حيث أطلقوا عليه اسم البربوبوليس ومعناه PRO: قبل وPOLIS: المدينة أي عند مدخل الخلية كما اعتبره أرسطو في كتابه "تاريخ الحيوانات" علاجا للإصابات الجلدية مثل الجروح و التقرحات.

منذ القرن الأول قبل الميلاد قال عنه قدامى الأطباء اليونانيين أنه يخفف من الآلام العصبية و يشفي التقرحات و الخراريج و البثور المستعصية الشفاء (أحمد عصام، 1986).

أما في أوربا فلم يعرف استعماله إلا من خلال حرب البويرز(Boers) في جنوب إفريقيا في حوالي 1900 حيث عرفت طرق استعماله من خلال النتائج الجيدة في إطار خصائصه المطهرة والمساعدة على الالتئام و نمو الأنسجة واستعمل في مستشفيات الاتحاد السوفيتي سابقا "URSS" منذ 1969.

في أثناء الحرب العالمية الثانية عالج خندروس جرحى الحرب بالبروبوليس فلقد كان استعماله شائعا في إزالة الأثفان (مسمار اللحم) حيث تؤخذ قطعة من البروبوليس تسخن حتى تصبح لينة عجينية القوام حيث تطبق على شكل طبقة رفيعة فوق الثفن ثم تحاط برباط من الشاش حيث يمكن للثفن أن يسقط من جذوره خلال بضعة أيام و يؤكد أيوريش أن البروبوليس طبق بنجاح كبير في معالجة الجروح خلال الحرب الأهلية الروسية إلا أنه لم يمكن حينئذ تعميم استعماله لصعوبة الحصول على كمية كافية من نوعية جيدة من هذه المادة القيمة (Donadieu,1993) .

في روما استعمل البروبوليس من طرف الفيزيائيين القدامى في صنع كمادات كما سجل منذ 12قرن وصف أوربا لدواء مصنوع أستعمل في صنعه البروبوليس في علاج الفم، التهابات الحلق و تسوس الأسنان.

أما في العصر لحديث أعيد اكتشاف القيمة العلاجية للبروبوليس من خلال البحوث العلمية و التجارب المجراة في هذا الميدان (أرحيم، 2001).

1-2- تعريف البروبوليس (صمغ النحل أو العكبر):

هو عبارة عن مادة صمغية تجمعها شغالات النحل من براعم و قلف الأشجار كصمغ وهو المادة الأولية ثم تضيف لها الشغالة الشمع و غبار الطلع و إفرازاتها اللعابية وبالتالي مركبات أخرى في الأخير ما يسمى بالعبكر (Amoros *et al.,* 1992).

قد تجمع الشغالات مادة البروبوليس من حبوب اللقاح و يطلق على النوع اسم " بالم" ويستعمل النحل هذا النوع في صقل و تطهير العيون السداسية (النخاريب) المعدة لوضع البيض فيها (أرحيم، 2004).

1-3- مصدره:

- **بالنسبة للنحل:** يجمع البروبوليس من الإفرازات و النتاحات لبعض النباتات و من الصمغ الموجود على قلف الأشجار خصوصا الصنوبر،أهم الأشجار التي تحصل منها النحلة على البروبوليس هي: أشجار البلوط،، الصفصاف، الحور، البتولا، التنوب، القسطل الهندي ...إلخ. (Amoros *et al.,* 1992)
- **بالنسبة للإنسان**: يحصل الإنسان عليه بحث النحل على جمعه بوضع خشب خشن في الخلية لأنه سيقوم (أي النحل) بتغطيتها.

لهذا السبب ينشط النحل في جمع مادة البروبوليس في درجات حرارة معتدلة حيث تتوقف الكمية التي تجمعها السلالة على مدى احتياجها و على مدى قوتها .

أما في الجزائر يجمع النحل في شهري فيفري و مارس ويعاود نشاطه خلال شهري سبتمبر و أكتوبر.

يقوم صانعوا الخلايا بتنعيم خشب الخلايا ومن أجل جمع كمية كبيرة من البروبوليس يقوم بعض النحالين بوضع قطعة من الخشب تحتوي على تجاويف أو فراغات بدلا من إطار العسل، فيقوم النحل بملء هذه الفراغات بالبروبوليس و الذي يمكن حينئذ إزالته باستعمال شفرة أو سكين حادة.

(روت، 2003).

أما حديثا فتوجد وسائل خاصة لجمع البروبوليس و هي ما يعرف بمصائد البروبوليس وهي عبارة عن غطاء بلاستيكي يوضع بدل غطاء الصندوق يحتوي على مناطق دائرية تسمح بمرور الضوء، يقوم النحل بملئها بالبروبوليس لينزع هذا الأخير بعد وضع هذه المصائد في الثلاجة و بعدها تطوى يمينا و شمالا فيتساقط البروبوليس في شكل أقراص.

1- 4- الأهمية الاجتماعية و الاقتصادية:

أظهرت الدراسات العلمية القديمة منها والحديثة الأهمية الكبيرة للبروبوليس بالنسبة لمنتجه وهو النحل وكذا للإنسان .

- **أهمية البروبوليس بالنسبة للنحل**: تعتبر أهميته كبيرة جدا بالنسبة لخلية النحل إذ يستعمله في أمور كثيرة منها:

- تضييق مداخل الخلايا في فصل الشتاء .
- لصق الإطارات الخشبية الخاصة ببيت النحل ببعضها البعض و في تثبيت الأقراص في سقوف الجحور التي يسكنها.
- تحنيط الآفات الحيوانية والحشرية التي تتسلل إلى داخل الخلية مثل: السحالي و الفئران والفراشات بعد قتلها عن طريق الوخز بآلة اللسع فتعمل على منعها من التحلل ثم يغطيها بطبقة من الشمع حتى لا تتحلل داخل الخلية (أرحيم، 2004).
- عزل الماء عن الخلية باستعماله في سد الشقوق.
- صقل و تنعيم الأجزاء الداخلية للخلية.
- طلاء الجدر الداخلية للعيون السداسية (النخاريب) الخاصة بالحضنة .
- يعتبر كمادة مطهرة للخلية من خلال تأثيره المضاد للجراثيم (روت، 2003).

- **أهميته بالنسبة للإنسان**: أما بالنسبة للإنسان فنظرا لتركيبة البروبوليس الغنية بالمواد الطبيعية الفعالة (تبعا للسلالة و منطقة الجني) ذات التأثير الجانبي الضعيف و الذي يكاد يكون مهملا فقد استفيد منه في علاج الكثير من الأمراض تبعا لخصائصه المتعددة فهو مانع

أو قاتل للبكتيريا حسب الأنواع كما انه ذو ضدية ملحوظة للفطريات و الخمائر وكذا الفيروسات.

- تأثيره المخدر حيث يفوق 3 إلى 4 مرات تأثير الكوكايين و أكثر من ذلك النوفاكبين إذا كان مستحضرا مع الزيوت الطيارة.
- مضاد للالتهاب بدرجة عالية جدا.
- تنشيط إعادة توالد الأنسجة.
- مضاد للروماتيزم و له تأثير لاكتساب المناعة عن طريق التنبيه المباشر للخلايا الأكولة و تكوين الأجسام المضادة أو بطريق غير مباشر بزيادة المقاومة.
- مضاد للتأكسد.

و سنتطرق لهذه العناوين بشيء من التفصيل (أرحيم، 2001).

من جهة أخرى يعتبر البروبوليس كمؤشر بيئي جد هام و كذا مؤشر للتلوث و هذا راجع لقدرته على تثبيت المعادن الثقيلة و ملوثات أخرى (Krell, 1996).

1-5-خصائص البروبوليس:

1-5-1- الخصائص الفيزيائية:

يتواجد البروبوليس في شكل مادة :

- ذات صلابة مختلفة تبعا لدرجة الحرارة: صلب و سهل التفتيت في الحرارة 15م°، يصبح رخوا و طيعا في حوالي 30م°، غروي أو صمغي في ما فوق 30م° و سائل نوعا ما في ما بين 60-70م° في المتوسط إلا أن نقطة الذوبان يمكن أن تذهب حتى 100م° و ما فوق.
- بتسخينه ببطء في حمام مائي ينقسم إلى جزأين أحدهما غرويا و الآخر سائلا.
- لونه مختلف بين الأصفر الفاتح و البني الداكن .
- غالبا ما يكون مذاقه لاذعا (فظا) و أحيانا مرا.

- رائحته مختلفة تبعا لمصدره، يملك عموما رائحة مقبولة .
- إذا أحرق إنبعثت منه رائحة شهية ترجع إلى الصمغيات العطرية التي يحتويها.
- قام كل من Jeanosn و Marchency في فرنسا بتبيين البنية الميكروسكوبية للبروبوليس باستعمال ميكروسكوب الكتروني ماسح.
- البروبوليس غير قابل للذوبان في الماء البارد لكنه قليل الذوبان في هذا الأخير باستعمال بعض الإجراءات (الماء الدافىء مثلا). قابل للذوبان بشكل جزئي في الأسيتون، الكحول، الأمنيوم، البنزن، الكلوروفورم، الايثر. (Donadieu, 1994).

1-5-2-التركيب الكيميائي:

كمادة طبيعية يتكون البروبوليس من مجموعة من المواد بصفة عامة هي مواد غروية و بلسم، شمع، زيوت طيارة و حبوب لقاح و آثار من بعض العناصر كالحديد، النحاس، المنغنيز، الزنك وغيرها من المعادن وقد وجد أن نسب هذه المواد تختلف من نوع لآخر و هذا راجع إلى اختلاف المصدر النباتي و الجغرافي، و قد ذكر أن البروبوليس يتكون من 149 عنصرا مختلفا منها 30 مادة فلافونويدية وهي تمثل القسم الأكبر من مكونات البروبوليس و نحو 14 عنصرا من مشتقات حمض السينامك و 12 من مشتقات حمض البنزويك و المركبات الأخرى: التربين و كحول السيسكوايتربين و بعض الكربوهيدرات . (Walker et Crane, 1987)

وقد قيل أنه غني بالدهون و الأحمـــاض العضــوية كما يحوي حامض التنيك، الفيتونسيدات، المضادات الحيوية بالإضافة لما يحتويه من الفيتامينات و خصوصا مجموعة الفيتامين B و طليعة الفيتامين أ "pro vit A" لأن حبوب الطلع تشكل من 5% إلى 10% من التركيب الكلي(عارف، 1998).

كما أظهرت التحاليل الإضافية قائمة هائلة من المكونات الغريبة كمركبات السينامين، الفينيلين، الكريسين، الايزالبين، الفلونجين، الأكاستين، الكامبيغريد، الرامنوسترين، البينوسيمبرين، البينوستوربين، حامض الكافنيك، التوكبسين وحامض الفيرونيك.

و التركيب الكيميائي للبربوليس معقد جدا إذ تختلف تركيبته و المواد المؤلفة له من خلية نحل لأخرى (عارف، 1998).

إلا أنه بصفة عامة يمكن تلخيص المكونات التي تتواجد نسبيا بصفة ثابتة و هي حسب Krell (1996):

- 45-55 % من المواد الراتنجية (صمغية).
- 25-35 % من الشمع.
- 10 % زيوت طيارة وأساسية.
- 5% مركبات متنوعة و معادن.
- 5 % حبوب الطلع.

ومن بين المكونات الأساسية و الأكثر دراسة لخصائصها نجد:

- **الأحماض الفينولية**:

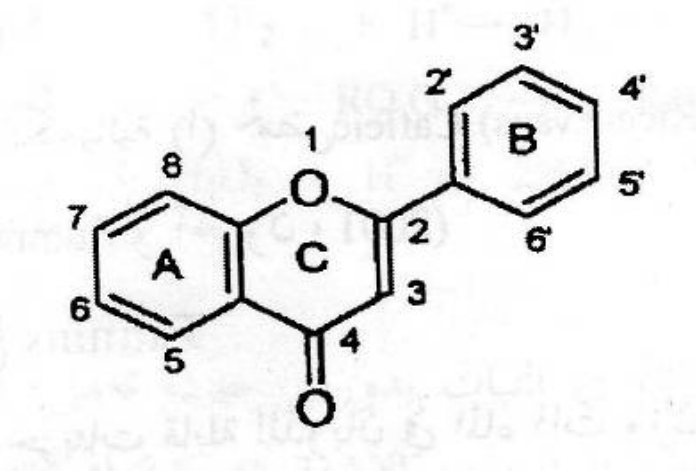
توجد الأحماض الفينولية بكثرة في الفواكه (Garcia-Viguera *et al.,* 1994) و في السيقان و الأوراق و الخضر (Morton *et al.,* 2000) و هي قابلة للذوبان في المذيبات العضوية القطبية (Bruneton, 1993). تنقسم الأحماض الفينولية إلى ثلاثة أقسام أحماض فينولية بسيطة و أحماض فينولية مشتقة من حمض البنرويك و أحماض فينولية مشتقة من حمض السيناميك، حيث يعتبر القسم الأول نادرا ما عدا Hydroquinone الذي يوجد في العديد من العائلات النباتية، بينما تنتشر الأحماض الفينولية المشتقة من حمض السيانيك بكثرة و يعتبر حمض Caffeic و حمض Ferulic الأقسام الرئيسية لها (Bruneton, 1993) أما الأحماض الفينولية المشتقة من حمض البترويك فهي عبارة عن مشتقات تحتوي على مجاميع الهيدروكسيل مثل حمض vanillic (Lilley et Haslam, 1988).

- **الفلافونويدات:**

بدأت دراسة الفلافونويدات سنة 1940 حيث وجد أن الآلاف من النباتات تحتوي على هذه المركبات أما عن العدد المكتشف فهو في تزايد كل سنة (Miller, 1996) حيث تم التعرف على أكثرمن5000 نوع من الفلافونويدات عند النباتات (Ververidis *et al.,*1998) و هي عبارة عن مركبات فينولية من أصل نباتي بحت، متواجدة بصفة عامة في النباتات، تكون أحد أكبر العائلات الصبغية الغير آزوتية، محرضة على التلوين (التصبيغ). نجدها في الإفرازات الراتنجية التي تحمي براعم النباتات، نجد منها في البروبوليس: Chrysine ,Pinocembrine Galangine و Quercétine أكثرها يملك خصائص مضادة للميكروبات و مضادة للتشنج.

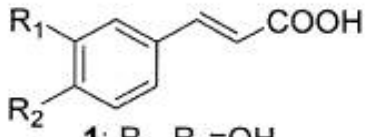
تمثل جزء كبير من المكونات غير الطاقوية من غذاء الإنسان توجد طبيعيا في النباتات والفواكه (Martinez-Florez *et al.,* 2002) و الشاي، و لها دور في إعطاء لون و نكهة هذه النباتات (Havsteen, 1983) و قد تكون مرتبطة بالسكريات على شكل (Glycoside) خاصة في الخلايا المحيطية للأوراق و بالتالي تضمن حماية الأنسجة من الأثر الضار للأشعة فوق البنفسجية (Bruneton, 1993) تتميز الفلافونويدات بهيكل كربوني ثلاثي الحلقات C_6-C_3-C_6 حلقتين من حمض البنزويك A و B و حلقة غير متجانسة أكسجينية (Markham, 1982) إنفتاح الحلقة الأكسجينية يميزchalcones بينما نجد في Aurones بالحلقة غير المتجانسة ذرتين من الكربون فقط (شكل1).

تختلف الفلافونويدات عن بعضها البعض حسب درجة عدم التشبع و طريقة إضافة الهيدروكسيل و المثيل و أيضا حسب نوع السكر المرتبط بها حيث تكون السكريات المرتبطة متجانسة أو غير متجانسة كما يمكن أن تكون الفلافونويدات غير سكرية (Markham, 1982) عادة ما تضاف مجاميع الهيدروكسيل في الموقع 3 و5 و 7 و3` و4` و5` و يمكن لبعض هذه المجاميع الهيدروكسيلية أن يضاف لها المثيل أو الأستيل أو الكبريت (KÜhnau, 1976).



شكل1: شكل عام للفلافونويدات (Hana *et al.,* 2003).

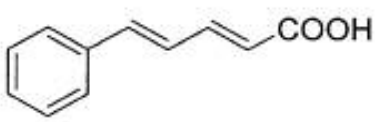
- **الفلافونات و الفلافونولات:** تحتوي هذه المركبات على رابطة زوجية بين C2-C3 بالإضافة لهذا فإن الفلافونول يملك مجموعة هيدروكسيل في C3، الفلافونويدات الممثلة للفلافون والفلافونول هي Apiginin و Quercetin (شكل2).
- **الفلافانونات و الفلافانونولات :** تتميز هذه المركبات بغياب الرابطة الزوجية C2-C3. يختلف الفلافانونول عن الفلافانونون بوجود مجموعة هيدروكسيل في الأولى، توجد هذه المركبات الفينولية على شكل آثار في النبات، و يمثل الـ Naringenin الفلافانونات و Taxifolin الفلافانونولات (الشكل2).



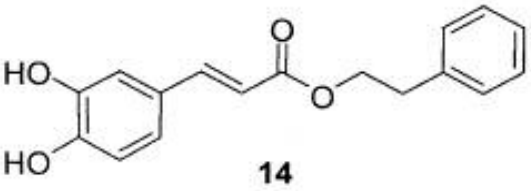
1: R_1, R_2=OH

2: R_1=H, R_2=OH

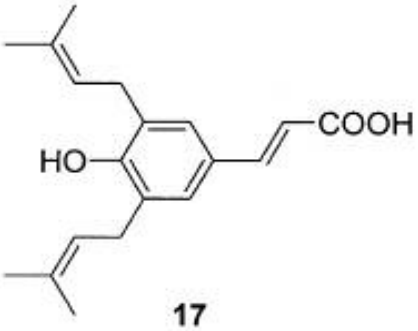
3: R_1, R_2=OCH_3



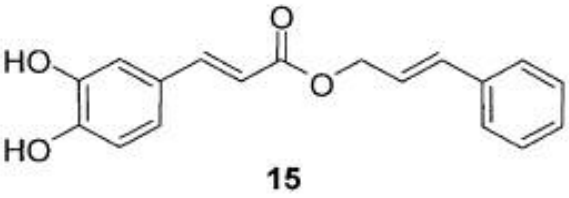
9



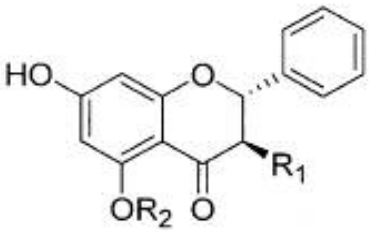
14



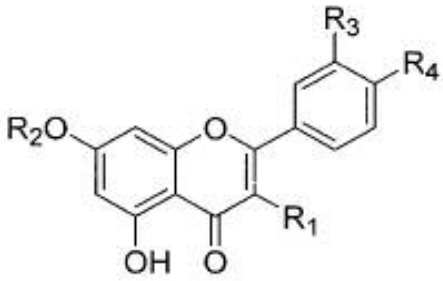
17



15



	R_1	R_2
5:	OH	CH_3
8:	OH	H
11:	H	H
13:	$OCOCH_3$	H



	R_1	R_2	R_3	R_4
4:	OH	H	OH	OH
6:	H	H	H	OH
7:	OH	H	H	OH
10:	H	H	H	H
12:	OH	H	H	H
16:	H	CH_3	H	H

شكل، 2 : التراكيب الكيميائية لمركبات معزولة من البروبوليس (Kumazawa *et al.,* 2003).

* أسماء هذه المركبات في الجدول1.

جدول، 1 : أسماء المركبات المعزولة من البروبوليس (Kumazawa *et al.,* 2003).

الرقم	اسم المركب
1	Caffeic acid
2	p-coumaric acid
3	3,4-dimethoxycinnamic acid
4	quercetin
5	pinobanksin 5-methyl ether
6	apigenin
7	kaempferol
8	pinobanksin
9	cinnamylideneacetic acid
10	chrysin
11	pinocembrin
12	galangin
13	pinobanksin 3-acetate
14	phenethyl caffeate
15	cinnamyl caffeate
16	tectochrysin
17	artepillin C.

إن تركيب البروبوليس مرتبط بمكان جنيه (أي بالغطاء النباتي له)حيث أظهرت عدة أبحاث أجريت في عدة مناطق من العالم أن إفرازات براعم أشجار الحور (*populus* sp) هي المصدر الرئيسي في أوربا و الصين (Bankova, 2000) بينما مصدره في البرازيل هو نبات: *Baccharis dracunculifolia* (Bankova, 2005). أما في الأورغواي فمصدره النباتي هو : *Eucalyptus globules, Polulus sp, Betula sp et Salix sp*. (Bonvehi, 2000).

و يعطي هذا التركيب الجد معقد لمادة البروبوليس الأهمية الكبرى في استعماله في ميادين متعددة ذات منفعة للإنسان(جدول2) (Bankova, 2005).

Propolis type	Antibacterial activity	Antiinflammatory activity	Antitumor activity	Hepatoprotective activity	Antioxidant activity	Allergenic action
European (poplar type)	Flavanones, flavones, phenolic acids and their esters (14)	Flavanones, flavones, phenolic acids and their esters (15)	Caffeic acid phenethyl ester (16)	Caffeic acid, ferulic acids acid, caffeic acid phenethyl ester (15)	Flavonoids, phenolic and their esters (15)	3,3-Dimethylallyl caffeate (14)
Brazilian (*Baccharis* type)	Prenylated *p*-coumaric acis, labdane diterpenes (15)	Unidentified (15)	Prenylated *p*-coumaric acids, clerodane diterpenes, benzofuranes (15)	Prenylated *p*-coumaric acis, flavonoids, lignans, caffeoyl quinic acids (15)	Prenylated *p*-coumaric acis, flavonoids (15)	Not tested
Cuban	Prenylated benzophenones (17)	Not tested	Prenylated benzophenones (13)	Unidentified (15)	Prenylated benzophenones (13)	Not tested
Taiwanese	Not tested	Not tested	Prenylated flavanones (42)	Not tested	Prenylated flavanones (42)	Not tested

جدول، 2:المكونات المسؤولة عن مختلف النشاطيات البيولوجية لمختلف أنواع البروبوليس

1-6- الجانب البيوكيميائي للبروبوليس:

يملك البروبوليس نشاطيات صيدلانية مختلفة حيث وجد Giurgia و آخرون (1981) أن إدخال 20مغ من وزن المستخلص النموذجي للبروبوليس (ESP) لكل 100غ دجاج مدة 15 يوما، كل يوم، يخفض من مجموع البروتينات البلازمية و الغاماغلوبينات التي يحتويها.

من خلال هذه النقطة يمكن القول بأن البروبوليس يملك تأثير بنائي (Anabolique) و يحفز التطور المناعي، كما قد قيل أن إدخال 20غ من مستخلص البروبوليس عند الدجاج مدة 15 يوم، كل يوم، يغير من تركيز الكولسترول في الدم، transaminase، بروتينات كلية و الأحماض الأمينية كما يحفز كذلك الجهاز المناعي.

في دراسة أخرى وجد Giurgia و آخرون (1982) أن تغذية الدجاج بمستخلص البروبوليس أعطت زيادة معتبرة في مستوى البروتينات المصلية و إنخفاض طفيف في مستوى الغلايكوجين.

يملك البروبوليس خاصية ضد ميكروبية حيث درس Amoros و آخرون (1994) مخبريا نشاطية 3-métylbut-2-enyl caféat ضد فيروس herpes فوجدوا أن هذا المركب و الذي يعتبر مكون ثانوي في البروبوليس، يخفض تصنيع الحمض النووي الفيروسي بـ 32 مرة ما يؤدي إلى تناقص عدد الفيروسات، كما قال عنه آرحيم (2001) أنه يملك خصائص مضادة لعدد كبير من الميكروبات سواء في العضوية أو مخبريا (*in vivo* أو *in vitro*).

كما قال أنه يملك تأثيرا لاكتساب المناعة عن طريق التنبيه المباشر للخلايا الأكولة و تكوين الأجسام المضادة، و ثبت أنه يساعد في تكوين الأنسجة و اللحم الجديد (أرحيم، 2001).

1-7- النشاط البيولوجي للبروبوليس:

يملك البروبوليس العديد من النشاطيات البيولوجية حيث وجد Haldon و آخرون (1980) أن البروبوليس يسرع من عمليات تخليق و نمو الأنسجة خصوصا الأنسجة العظمية كما أثبت Strehl و آخرون (1994) أن المستخلص المائي للبروبوليس (WEP) يحفز الوظائف المضادة للإلتهاب مثل المضادات الحيوية أين يثبط المستخلص المائي للبروبوليس أنزيم DHR (dihydrofolate réductase)، و أعزوا ذلك إلى أحد مكوناته وهو حمض الكافييك.

1-7-1- النشاطية الضد ميكروبية للبروبوليس:

أثبتت الدراسات منذ أواخر 1940 النشاطية الضد ميكروبية للبروبوليس ض مجموعة واسعة من البكتيريا و الفطريات و الخمائر و الفيروسات.

أ- النشاطية الضد بكتيرية:

درس Charnyak (1976) نشاطية البروبوليس القاتلة للبكتيريا حيال 20 نوعا من *Staphylococcus* ، 10 أنواع من *Streptococcus* و 10 أنواع من *E.coli* باستعمال تراكيز من البروبوليس بين 1.25 و 5مغ/مل، فتحصل على نشاطية تثبيطية قوية ضد 25 نوع بكتيري مجرب كما تحصل Grecianu و Enciu (1976) على نشاطية ضد بكتيرية واسعة النطاق للبروبوليس ضد الأنواع الموجبة الغرام مقارنة بالنشاطية المحدودة بالنسبة للأنواع السالبة الغرام.

جرب Grange و Davey (1990) أيضا مستخلص البروبوليس على 21 نوع بكتيري فظهرت حساسية البكتيريا الموجبة الغرام بما فيها بكتيريا السل بشكل واضح بينما أظهرت العصيات السالبة الغرام حساسية محدودة.

حضرShub و آخرون (1978) مستخلص إيثانولي لـ 18 عينة من البروبوليس من مناطق مختلفة من الإتحاد السوفياتي سابقا وباستعمال طريقة التخفيف في الآغار تمكن من تثبيط نمو كل من*Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus* في تراكيز بين 125-500 ميكروغرام/مل و لم يتمكن من تثبيط كل من *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeraginosa* حتى باستعمال تراكيز أكبر من 1مغ/مل.

بين Malimon و آخرون (1980) العلاقة بين محتوى المستخلص الكحولي للبروبوليس من البوليفينولات و النشاطية الضد ميكروبية للبروبوليس ضد الـ 8035 *Bacillus cereus*

حيث كانت 91% من حالات المحتوى العالي من البوليفينولات (59% أو أكثر) مرتبطة بنشاطية ضد ميكروبية معتبرة.

طبق Glinnik و Gapanovich (1981) محلول كحولي للبروبوليس 10% (10بروبوليس/100مل كحول) لعلاج إلتهابات الأذن، الأنف و الحنجرة (عند الإنسان)

فحصل على مفعول علاجي جد عالي و نتيجة لذلك يفضل استعمال هذا المحلول الكحولي للبروبوليس في علاج هذه الأمراض.

درس Shub و آخرون (1981) تأثير البروبوليس على 106 أنواع من *S.aureus* فأظهر جميعها حساسية لتراكيز بين 0.5 و 1مغ/مل، كما أبدت الأنواع المقاومة للمضادات الحيوية (benzyl/penicillin، tetracycline و erythromycin) حساسية للبروبوليس و أبدى البروبوليس أثر تعاوني عند مزجه بأي من المضادات الحيوية المستعملة ضد الأنواع المقاومة لها.

و أكدت هذه النتائج أيضا أن النشاطية الضد ميكروبية للبروبوليس راجعة إلى المحتوى العالي من الفلافونويدات.

تم عزل ثلاث مركبات ضد ميكروبية من البروبوليس البرازيلي و تم تعريفها كالتالي:

3-prenyl - 4-dihydrocinnamoloxycinnamic acid ،3,5 diprenyl-4-hydroxycinnamic acid و2,2dimethyl -6- carboxyethenyl- 2H-1benzopyran

و سجلت نشاطيتهم الضد ميكروبية بتحديد التركيز الأدنى المثبط (ميكروغرام/مل) ضد *Bacillus cereus* و هي: 15.6، 31.3 و 125 ميكروغرام/مل، وضد *Enterobacter erogenous* و هي: 31.3، 62.5 و 125 ميكروغرام/مل و ضد *Arthroderma benhamiae* و هي: 15.6، 7250 و 62.5 ميكروغرام/مل.

تؤكد هذه النتائج النشاطية العالية التي أظهرها المركب الأول و الذي ظهر أنه أحد أفضل المكونات الضد ميكروبية للبروبوليس البرازيلي. (Aga *et al.*,1994).

ذكر Takasi و آخرون (1994) أن البروبوليس يثبط نمو البكتيريا عن طريق إعاقة الإنقسام الخلوي، يحدث هذا خلال تشكيل (pseudo-multicellular Streptococci) إضافة إلى ذلك يخرب البروبوليس السيتوبلازم، الغشاء السيتوبلازمي و الجدار الخلوي و يحدث تحلل جزئي للبكتيريا كما يثبط تصنيع البروتينات.

وقد أثبت أن آلية تأثير البروبوليس على الخلية البكتيرية جد معقدة ولا يمكن قياسها على أي مضاد حيوي.

نشر Grochowski و آخرون (1996) أبحاثهم على 64 فأر بها حروق تم إحداثها إصطناعيا باستعمال *P. aeruginosa* بعد 24 ساعة تعالج الفئران التابعة للفوج التجريبي (أ) يوميا بمرهم

بروبوليس 3% يحتوي على زيت الصويا و زبدة منزوعة الماء (dehydrated) و دهن لحم الخنزير طازج منزوع الماء و شمع النحل، تركت الفئران التابعة للفوج التجريبي (ب) كشواهد دون معالجة.

بالنسبة للفوج (أ) ظهر شفاء كلي عند 85% من الفئران بعد مدة حضن بين 7 و 13 يوم.

بالنسبة للفوج (ب) ظهر الشفاء عند 84 من الفئران بعد 14-18 يوم، بينما مات أربع فئران خلال هذه الفترة.

إن تشكل نخر (تسوس) الأسنان راجع إلى تلراكم و استعمار الكائنات الدقيقة الفموية و إطراحاتها الخارجية (عديدات السكاكر) التي تصنعها إنطلاقا من السيكروز بواسطة Glucosyltransferases (GTFs) التابع لـ *Streptococcus mutans* .

أظهر المستخلص الإيثانولي للبروبوليس من مناطق مختلفة من البرازيل القدرة على تثبيط كل من نشاطية GTFs و نمو *Streptococcus mutans* و أظهرت أفضل العينات من حيث القدرة على تثبيط الإنزيم و نمو البكتيريا امتلاك تراكيز مرتفعة من Pinocembrine **و** galangine**.** (Park *et al.,* 1998)

أثبت Ikeno و آخرون (1991) أن البروبوليس يملك نشاط ضد ميكروبي ضد *S. sobrinus* و *S. cricetus* و يثبط كل من: تصنيع الغليكان الغير قابل للإنحلال في الماء و نشاطية الـ GTFs مما يؤدي الى عدم ظهور تسوس الأسنان عند الجرذان، حيث نتج عن تلقيحها بـ *S. sobrinus* إصابة نصفهم تقريبا بالتسوس، بينما كانت نسبة التسوس في الأسنان ضعيفة عند الجرذان التي أعطيت البروبوليس.

كما تم التأكد أن البروبوليس لا يملك أي أثر سام على نمو الجرذان تحت الظروف التجريبية.

ب- النشاطية المضادة للفطريات:

عالج Kovalik (1979) 12مريضا بين 35 و 62 سنة يعانون من التهاب الجيوب المزمن و الذي تتسبب فيه خميرة *Candida albicans*.

دراسة حساسية هذه الخمائر للبروبوليس مخبريا أظهرت حساسية 8 حالات من بين 12 حالة.

عولج المرضى باستعمال مستحلب البروبوليس (كحول-زيت) بمعدل 2-4مل كل يوم فظهر التحسن بعد يومين من العلاج بمستحلب البروبوليس و تحسن واضح بعد 5 الى 8 أيام أما الشفاء فظهر بعد 10 الى 17 يوم.

درس Cizmarik و Trupl (1976) النشاطية التثبيطية للبروبوليس ضد *Aspergillus sulphureus* و ضد أنواع أخرى من الفطريات و الخمائر، فثبط المستخلص الأيثنولي للبروبوليس 60 نوعا من الخمائر و 38 نوعا من الفطريات. كما تمكن Starzyk و آخرون (1977) باستعمال مستخلص البروبوليس بتراكيز معينة من تثبيط التريكوموناز المهبلية كليا و من قتل حميع الأشكال النشطة من الطفيليات خلال 24 ساعة.

أظهر المستخلص الإيثانولي للبروبوليس نشاطية قوية ضد الأوليات هذا ما أكده Higashi و De Castro (1994) من خلال الدراسة التي أجرياها باستعمال عدة أنواع من البروبوليس على Trypanosoma cruzi و تفالها مع الخلية المضيفة.

ج- النشاطية الضد فيروسية:

للتعرف على أهم نتائج نشاطية مستخلص البروبوليس ضد فيروسات HSV، تم إجراء عدة اختبارات على الأحياء و كذا في المختبر من أجل المقارنة: ففي المخبر يضاف مستخلص البيروبوليس إلى خلايا حية (VERO) في أوقات مختلفة و بتراكيز معلومة أثناء و بعد الإصابة بفيروسات HSV-1 أما على الأحياء فيلاحظ تأثير مستخلص البروبوليس على مواليد جديدة لفئران مصابة وعلى أرانب في طور الإصابة بفيروس HSV-1 وقد لوحظت النتائج التالية:

- **في المخبر**: 0.5% من مستخلص البروبوليس يثبط 50% من الأصابة بـ HSV-1 وهذا دليل غير مباشر على التفاعل القوي بين مستخلص البروبوليس و سطح الخلايا **الحية**، لكن ليس هناك تفاعل مباشر مع HSV-1.

يكون تأثير البروبوليس التثبيطي هاما عندما يضاف قبل أو أثناء الإصابة، أما عند استعمال نسبة 10% من مستخلص البروبوليس حيث يضاف بعد ساعتين من الإصابة فإنه يعطي حماية بـ 80-85%.

- **على الأحياء:** في تركيز أقل من 5% يمنع البروبوليس ظهور و تطور الأعراض المحلية و الإصابة بـHSV-1 عند الفئران وإصابة قرنية عين الأرانب بـHSV-1.

مما سبق يمكن الاستخلاص بأن فعالية النشاط الضد فيروسي للبروبوليس ضد الإصابة بفيروس HSV-1 في المخبر وعلى الأحياء يحتمل أنها تتطلب منع ادمصاص الفيروس على الخلايا المضيفة أو تثبيط الخطوات الداخلية أثناء دورة تضاعف الفيروس.

(Huleihel *et al.,* 2002).

لإظهار نشاطية البروبوليس على فيروس NDV الذي ينقسم إلى عدة سلالات هي: Hitchner B_1, Clone30, Lasota, D-F, Comarove و Virulent، تم ادخال السلالات المختلفة لهذا الفيروس لمدة 9-10أيام في جنين بيض الدجاج ثم مقارنة متوسط الإصابة في وجود و غياب البروبوليس بتخافيف مختلفة من سلالات الفيروس.

و قد لوحظ أن متوسط الإصابة ينخفض بشكل ملحوظ في وجود البروبوليس إذا ما قورن بغيابه، مما يدل على قدرته على خفض الإصابة بالنسبة لجميع السلالات المختبرة، لكن يكون تأثير البروبوليس أكثر فعالية بالأخص في حالة السلالتين Lasota و Clone30.

من جهة أخرى فإن البروبوليس لم يحدث تغييرا في لون وميوعة البيض، ربما ترجع هذه النتائج إلى طبيعة البروبوليس الذي يذوب في المحلول المائي و ليس له تأثير ضار على الجنين.

رغم أن هذه النتائج لا تظهر بوضوح أي مكون من مكونات البروبوليس الذي يدخل في النشاطية ضد فيروس NDV و لا الآلية التي تحدث، إلا أنها قدمت معلومات جديدة عن نشاطية البروبوليس ضد هذا الفيروس.(Hegazi *et al.,* 1993).

أظهر حمض المرونيك و الذي عزل بكميات كبيرة (1.5غ) يظهر نشاطية هامة ضد HIV، كما أظهر حمض Betulonic نشاطية معتبرة ضد نفس الفيروس، في حين أن حمض Anwuaeizonic لم يوقف تضاعفه.

لمعرفة نشاطية بعض مشتقات التربينات الثلاثية، قام الباحثون بإحداث تعديل على مستوى روابط تربينويدين: حمض Betulonic و حمض Oleanolic للحصول على أكثر قوة و فعالية

ضد عوامل الإيدز حيث تمت أسترة مجموعة 3β-Hydroxy للحمضين مما أعطى مشتقات ذات نتائج أحسن ضد HIV. و تم بنفس الطريقة تعديل حمض Moronic و ذلك لإنتاج الأستر (3,3 dimethylsuccinyl)، مع ذلك الفعالية ضد HIV للمركبين تنقص نسبيا بالنقارنة مع الحمض الأب. (Junko *et al.,* 2001).

يمكن للبروبوليس أن يؤثر على الفيروس سواءا قبل إندماجه بالخلية المضيف أو أثناء تضاعفه داخلها و يتم ذلك بعدة آليات نذكر منها:

- تحصين الغشاء الخلوي للخلية المضيف بواسطة الفلافونيدات من خلال تثبيط تشكيل الفوسفوغليسيريدات التي تشارك في إندماج الفيروس على غشائها الخلوي.
- تثبيط إندماج الغشاء الفيروسي مع الليزوزومات.
- تتتثبيط الفيروس و ذلك بالإحاطة بمحفظته البروتينية.
- تثبيط الإستنساخ العكسي في الفيروسات ذات ARN.
- حث إنزيمات النيكلياز لمهاجمة الجينوم الفيروسي و توقيف التركيب الحيوي لبروتينات الفيروس.(Havsteen, 2002)

1-7-2- تأثير البروبوليس على الجهاز المناعي و الإلتهاب:

العديد من البحوث و الدراسات أظهرت مدى تأثير البروبوليس و مركباته على الجهاز المناعي، حيث وجد أنه يحفز تمايز الخلايا اللمفاوية و البائية (LB et LT) و يؤدي إلى إنتاج الانترلوكينات 1 و 2 (IL-2,IL-1) (Soares *et al.,* 2001).

كما أن هناك تأثير للبروبوليس على انتاج الأجسام المضادة و هذا ما وضحه Soares و آخرون(2001) في دراستهم التي أجريت على خلايا طحال الفئران.

تمت عدة دراسات على بعض مكونات البروبوليس لمعرفة تأثيرها على بعض الإلتهابات ففي حالة مرض انتفاخ الأرجل يعمل كل من EEP (100الى600مغ/كغ) و CAPE (10الى60مغ/كغ) على خفض حجم الأرجل المتورمة، كما يسببان كذلك خفض كمية Exsudat المسببة لإلتهاب الرئة، أما في حالة إلتهاب المفاصل فإن حقنها يؤدي إلى زوال

تدريجي للمرض و العكس بالنسبة للـ Galangine و EEP الخالي من الـ CAPE ليس لها أي تأثير على الأمراض السابقة (Borrelli *et al.,* 2002).

1-7-3- تأثير مستخلصات البروبوليس على التسمم الخلوي:

بينت التجارب التي أجراها Beyer و Melzig ..(2005) على خلايا الإنسان المزروعة أن تأثير البروبوليس في حالة تسممها بـ Hypoxanthine أو Xanthine oxidase يختلف حسب مستخلص البروبوليس فلاحظوا أن المستخلص الإيثانولي يملك تثبيط قوي لهاتين المادتين (حوالي 60-80%) و كذلك مستخلص الأسيتات الإيثيلي للبروبوليس في حين يوجد تأثير ضعيف في حالة المستخلص المائي للبروبوليس.

1-7-4- التأثيرات الجانبية لبعض مكونات البروبوليس:

أجريت عدة تجارب في مخابر بالبرازيل أدت إلى ملاحظة تأثيرات جانبية لبعض مكونات البروبوليس فوجد أن المستخلص الإيثانولي للبروبوليس EEP يسبب زيادة تحرير الهستامين المسؤول عن الحساسية، هذا في حالة تركيزه العالي (300ميكروغرام/مل) و ليس له أي تأثير عندما يكون بتركيز منخفض (3-100ميكروغرام/مل) (Hausen *et al.,* 1987).

وجد أيضا أن CADME (1-1 dimithyl allyl caffeic acid ester) يملك مفعول توليد الحساسية، كما أن اتحاد الفلافونويدات مع بعض البروتينات الكبيرة الحاملة لها كالألبومين ينتج عنه استجابة مناعية ضدها (مناعة ذاتية) (Ruiz et Gomes, 2000).

1-7-5- دور البروبوليس في علاج السرطان:

يمكن أن تكون WEP (Water Extract of Propolis) أدوات واعدة في التحكم في نمو الأورام، خصوصا النماذج الورمية المخبرية و ذلك بالمسلك الشفوي لأنه أسهل مسلك للتحكم في سرطان الرئة للفئران.

أدت المعاملة بالمركب المزدوج لـ WEP (المتحصل عليه من كرواتيا و البرازيل) و Polyphenolic على أنثى فأر بتركيز مرتفع (أكثر من 50مغ/كغ) عبر الفم بعد 2سا من حقن

EAT (Ehrlich Ascites Tumor) إلى زيادة عدد البالعات الكبيرة في غشاء فجوة البطن و استرجاع نشاطيتها ضد الورم و تقليل عدد خلايا PMN (Polymorphonuclear) (Orsolic *et al.,* 2005).

كما بين إعطاء جرعات مختلفة من WEP و Polyphenolic بالمسلكين الوريدي و الشفوي لسهولة استعمالهما، وقاية وعلاج لنمو الورم MCa (Mammary Carcinoma) (Orsolic *et al.,* 2003).

1-7-6- تاثير البروبوليس على التئام الجروح:

اظهر البروبوليس انه يملك تأثيرا محفزا على الميتابوليزم الخلوي وتكوين الكولاجين وفي نفس الوقت يعالج البشرة في وقت قياسي (Ghisalbert, 1972)

كما ذكر Iorich (1984) أن هذه الخصائص ترجع إلى فلافونويد الغالانجين وهو مكون من مكونات البروبوليس.

1-7-7- تاثير البروبوليس المخدر:

يعتبر البروبوليس بمكوناته مخدر جد قوي. كما بينت الأبحاث أن هذا الصمغ مخدر ثلاث مرات اكبر من الكوكايين و52مرة أكثر من البروكايين في الدراسات المجراة على الأرانب. يرجع التأثير المخدر إلى البينوسامبرين و حمض الكافييك.

كما استعملت الخصائص المخدرة للبروبوليس من طرف الناس منذ قرون وخصوصا في حالات الآلام الشديدة للأسنان (Strehl *et al* 1994)

1-8- استعمالات البروبوليس الطبية:

يتم استعمال البروبوليس تبعا لشدة المرض و أعراضه حيث يؤخذ وحده أو مع العقاقير اللازمة ويساعد على الشفاء من الأمراض التالية:

1-أمراض القلب والأوعية الدموية.

2- ضد الأنيما وتصلب الشرايين.

3- ضد التهابات الأنف و الأذن والحنجرة للحالات الحادة المزمنة وحالات نتانة الأنف برائحة كريهة والتهاب الجيوب الأنفية.

5- حالات الربو التي لا تستجيب للعقاقير الطبية العادية تشفى غالبا في ثمانية أيام.

6- الإلتهابات الحادة والمزمنة للقصبات والشعب الهوائية.

7- يستخدم كعلاج مكمل في حالة الدرن الرئوي و أزمات القصبة الهوائية.

9- في أمراض الجهاز الهضمي.

10- مطهر للفم وعلاج لضعف اللثة والأسنان والتهاب غشاء الفم المتقرح مرض القلاع (بثور في الفم واللسان) و تعفن الحلق.

11- آلام الأسنان وخاصة بعد الخلع.

12- التهاب بعض قرحات المعدة والأمعاء.

14- التهاب القولون المختلفة.

15- أمراض الحوصلة الصفراوية والتهاب المرارة الحاد.

16- أمراض الجهاز البولي وخاصة التهابات الكلى والحالب والبروستاتا عند الرجال و التريكوموناس المهبلي عند النساء.

17- كافة الأمراض الجلدية.

18- علاج للأمراض العصبية والنفسية ويرفع من القدرة المناعية عند الإنسان (أرحيم، 2001).

1-9- كيفية حفظ البروبوليس:

لايتطلب عمليات خاصة لحفضه ولكن يفضل إما وضعه في أوعية غير منفذة للضوء محكمة الغلق بعيدا عن الحرارة (حتى لا يلين متحولا إلى قوام المرهم) ويعتقد أن تخزينه لفترة طويلة لا يؤثر في تركيبه الكيماوي أو مفعوله الحيوي ولكن يفضل للإستعمالات الطبية أن يكون طازجا (أرحيم، 2001).

2- الخاصية الضد تـأكسدية للبروبوليس:

2-1-الإجهاد التأكسدي:

يعرف الإجهاد التأكسدي Oxidative Stresse (OS) بأنه تغيرات خلوية و نسيجية تسببها جزيئات مؤكسدة وهو ناتج عن اختلال التوازن بين طلائع المؤكسدات المنتجة للأنواع الأكسيجينية النشطة ROS وجذور أخرى ومضادات الأكسدة AntiOxidante (AO) (Dalton *et al.,* 1999)

2-1-1- الأنواع الأكسجينية النشطة ROS:

اكتشفت الجذور الحرة في المواد البيولوجية منذ أقل من50سنة (Drog, 2002) و الجذر الحر هو كل ذرة أو مجموعة ذرات أو جزيئة تملك إلكترون أو عدة إلكترونات حرة في مدارها الخارجي (Sen, 1995) حيث أي جذر حر يحتوي على أكسجين ينتمي لمجموعة ROS(McDermontt, 2000) هذا الأكسجين الذي يعتبر جزيء ضروري للكائنات الهوائية إذ بواسطته يتم الحصول على الطاقة لكن الثمن الذي تدفعه هذه الكائنات غالي إذ تقوم خلاياها بإرجاع جزء من هذا الأكسجين إلى مستقلبات سامة هي ROS المتمثلة في جذر H_2O_2 و جذر الهيدروكسيل والأكسجين المهيجO^1 (Mitchell *et* Gutteridge, 1999) وجذر أكسيد النيتروجينNO (Mc Cord,2000) وهيدروكسيل الكلورHOCL (Cohen *et al.,* 1982).

رغم وجود العديد من الجذور الحرة في العضوية منها الكبريتية و النتروجينية و الفوسفورية و الكربونية إلا أن ROS هي الأكثر سيادة و قوة (Lehucher-Michel *et al.,* 2001)

2-2- تأثيرات الإجهاد التأكسدي:

تقوم ROS بالعديد من الأدوار الفيزيولوجية فهي ضرورية لبعض الإنزيمات في مركزها النشط للقيام بنشاطها التحفيزي مثل Ribonucleotide reductase كما تلعب دور في نقل الإشارة الخلوية و الدفاع عن الجسم ضد الأجسام الغريبة، إلا أن الإنتاج المفرط لهذه الجزيئات يلحق أضرار ببعض الجزيئات البيولوجية مثل DNA و اللبيدات بما في ذلك

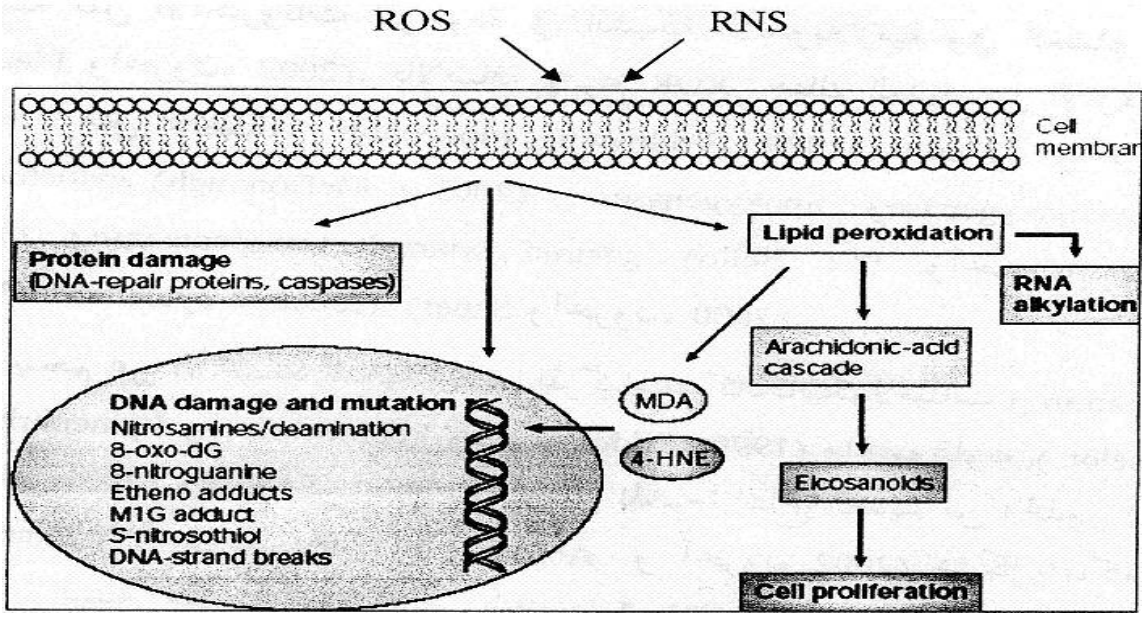
الكلسترول الغشائي و الأحماض الدسمة الحرة و الغشائية و الجزيئات الكبيرة في السائل خارج خلوي و الكولاجين و حمض Hyaluronique (Lehucher-Michel *et al.,* 2001)، كما يمكن لـ ROS أن تلعب دور في تطور بعض الأمراض مثل أمراض القلب، ارتفاع الضغط الدموي، حوادث المخ الوعائية وتعقيدات عند مرضى السكري (Chen *et al.,* 2002)

2-2-1-تأثيرات الأنواع الأكسجينية النشطة على الجزيئات البيولوجية :

تعتبر الأنواع الأكسجينية ذات نشاطية عالية لأن إلكتروناتها غير مستقرة و هذا ما يسمح لها بالتفاعل مع إلكترونات جزيئات أخرى معطية جذور جديدة بدورها تتفاعل مع جزيئات أخرى (Clarkson *et* thmpson, 2000) إذ بإمكان هذه الجذور التفاعل مع لبيدات الأغشية و DNA و البروتينات (Dean *et* Davies, 1997) (شكل3)

2-2-2- الأمراض التي تتدخل فيها الجذور الحرة:

إن التغيرات التي يمكن أن تحدثها الأنواع الأكسجينية النشطة للعديد من الجزيئات البيولوجية يمكن أن تؤدي إلى تغيرات في شكل و وظيفة و نمو الخلية (Halliwell, 1994) إذ ثبت تدخلها في العديد من الإصابات (جدول3).



شكل3: تأثير الجذور الحرة على الجزيئات البيولوجية (Hussain *et al.,* 2003)

جدول3: الأمراض التي تتدخل فيها الجذور الحرة

الأمراض	المراجع
الأضرار الناتجة عن الإفقار و إعادة الإحتقان الإلتهاب الحساسية أمراض المناعة الذاتية أعراض الألم التنفسي الحاد التصلب الشرياني، بعض السرطانات ارتفاع ضغط الدم داء السكري التهاب المفاصل الرئوي الروماتيزمي الموت العصبي في المخ مرض Alzheimer وParkinson	(McCord,1985) (Miller *et al.,* 1992) (Marc et Blaiche, 1997) (Halliwell *et* Gutteridg, 1999) (Till *et al.,* 1991) Rosenson, 2004) (Inci *et al.,* 2003) (Touyz *et* Schiffrin, 2004) (Aruoma, 1997) (Basta *et al.,* 2004) (Garcia-Estrada *et al.,* 2003) (Zhu *et al.,* 2004)

2-3- النظام المضاد للأكسدة:

يمكن تعريف مضادات الأكسدة بأنها أي مادة موجودة بتركيز ضعيف مقارنة مع تركيز المادة القابلة للأكسدة والتي تسمح بوقاية هذه الأخيرة من التأكسد بصورة معتبرة (Halliwell *et* Gutteridge, 1999).

تقسم مضادات الأكسدة حسب آلية عملها إلى قسمين هما:

أ- مضادات الأكسدة الكاسرة للسلسلة:

تملك بعض الجزيئات خصائص مضادة للأكسدة أغلبها مصدرها غذائي تتفاعل بتبادل أو ربط الإلكترونات الحرة و هي قادرة على تثبيط ROS بعمليات الأكسدة و الإرجاع و أهم هذه الجزيئات فيتامين E (Kuhn, 2003) و فيتامين C (Chen *et al.,* 2002) و بيتا كاروتين (Aruoma, 1998) و الفلافونويدات (Gupta *et al.,* 2000) و المواد الكبريتية و العناصر المعدنية (Lehucher-michel *et al.,* 2001). إن هذه الجزيئات الصغيرة المضادة للأكسدة تضم مجموعتين مجموعة تذوب في الدهون و مجموعة تذوب في الماء إذ تتواجد الأولى في الأغشية الخلوية

و البروتينات الدهنية، بينما الثانية نجدها في السوائل مثل الدم و السوائل خارج خلوية (clark, 2000) أين تكون المضادات الوقائية غائبة أو متوفرة بكميات جد صغيرة (Mc dermontt, 2000).

ب- مضادات الأكسدة الوقائية Preventive antioxidant:

مضادات الأكسدة الوقائية هي إنزيمات تقوم بإزاحة الجذور الحرة قبل أن تبدأ سلسلة الأكسدة (Goodeyear-Bruch *et* Pierce, 2002) و تعتبر جهاز دفاع داخل خلوي مضاد للجذور الحرة جد مهم. من بين الإنزيمات الرئيسية المضادة للأكسدة هي Catalase (CAT) و Superoxid dusmutase (SOD) و Glutathionperoxidase (GHS-Px) (Shackelford *et al.,* 2000).

2-4-عديدات الفينول و نشاطيتها الحيوية:

2-4-1-عديدات الفينول:

تعرف المركبات الفينولية على أنها مستقلبات ثانوية ذات أوزان جزيئية مرتفعة متوزعة بكثرة في المملكة النباتية (Haslam, 1993) و تتميز بنيتها الأساسية بوجود حلقة أو عدة حلقات عطرية مرتبطة مباشرة بعدة مجاميع هيدروكسيلية حرة أو مرتبطة بوظيفة أخرى مثل أستر أو إيثر(Harbone, 1994) ، تضم عديدات الفينول الأحماض الفينولية والدباغ و الفلافونويدات هذه الأخيرة التي تمثل القسم الأكبر منها (Havsteen, 1983).

أ- النشاطية الحيوية لعديدات الفينول:

لعديدات الفينول نشاطية بيولوجية متنوعة منها النشاطية المضادة للبكتيريا و تثبيط الإنزيمات كما تملك خصائص مضادة للطفرات الوراثية و نشاطية مضادة للسرطان (Fujiki *et al.,* 1999) بالإضافة إلى هذا فقد وجد أن استهلاك الشاي الغني بعديدات الفينول يحمي من أمراض الأوعية القلبية و من أكسدة LDL(Bravo, 1998)، حيث بينت دراسات حديثة أن حمض الفوليك يخفض من Homocysteine الذي يعتبر عامل خطر في مرض

الشريان القلبي و يحسن من وظيفة الطلائية الداخلية لدى المصابين بهذا المرض (Doshi *et al.,* 2001).

ب-النشاطية الحيوية للفلافونويدات:

تقوم الفلافونويدات بدور كبير في المملكة النباتية ليس فقط كأجزاء ملونة لكن أيضا كمثبطات لإنزيمات و طلائع المواد السامة، كما تحمي من أخطار الأشعة فوق البنفسجية و تعمل كعوامل مرجعة و ملتقطات للمعادن الضارة بالنبات، كما تتدخل الفلافونويدات في عملية التركيب الضوئي و نقل الطاقة و عمل هرمونات النمو (Di Carlo *et al.,* 1999)، أما بالنسبة للإنسان فتعتبر مركبات مهمة في غذائه رغم أنها ليست عناصر مغذية (Aisling-Aherne *et* Brien, 2002) و يرجع ذلك لخصائصها الحيوية و نشاطياتها الصيدلانية الواسعة (Middleton *et al.,* 2000) .

تعتبر الفلافونويدات مواد حماية للأوعية الدموية و مضادة للسرطان (Di Carlo *et al.,*1999) ، إذ ثبت أن الكثير منها مثبطة لمولدات السرطان لدى العديد من الحيوانات (Murakami *et al.,* 1992) و مثبطة للإنزيمات و مضادة للقرحة المعوية و المعدية بحماية هذه الأعضاء من المواد المسببة للقرحات (Di Carlo *et al.,* 1999) و قد بينت الدراسات أن العلاج بتناول مستخلصات من الفلافونويدات أبدى تأثيرا جيدا في حماية المعدة و ذلك عن طريق زيادة محتواها من المخاطية و ارتفاع جزئي في البروتينات و Hexosamines.(Alarcon *et al.,* 1994) بينت دراسات أخرى أن للفلافونويدات نشاطية مضادة لتسمم الكبد (Di Carlo *et al.,*1999) و مضادة للحساسية (Demo *et al.,*1998)، إذ بإمكان بعض الفلافونويدات أن تثبط إنتاج الوسائط الإلتهابية مثل البروستاغلوندينات (Middleton *et* Kandaswami, 1992) كما افترض أنها تثبط الإنزيمات المحفزة لرفع كمية الهستامين (Di Carlo *et al.,*1999)، و ثبت أيضا أن هذه المركبات تملك نشاطية مضادة للإلتهاب (Demo *et al.,*1998)، كما لوحظ أن للفلافونويدات نشاطية مضادة للفطريات (cushnie *et* lamb, 2005) و البكتيريا (Xu *et al.,* 2000) و الفيروسات (Russo *et al.,*2000) و لها أيضا أثر مخفض لنسبة السكر في الدم عند الحيوانات المصابة

بالسكري (Ong *et* Khoo, 1996) و دور في حماية الجهاز العصبي من الإجهاد التأكسدي (Schroeter *et al.,* 2001).

إن علاقة الفلافونويدات و تأثيرها على الجهاز المناعي غير واضحة حيث وجد أن تراكيز كبيرة من الفلافونويدات تثبط عمل اللمفاويات بينما التراكيز الدنيا منها تحفز الجهاز المناعي لدى المصابين بأمراض نقص المناعة. رغم أن العديد من الأبحاث تشجع استعمال الفلافونويدات في الطب إلا أن هذا لم يتم بعد بشكل واسع، ربما لأسباب منها أن الفلافونويدات لم تظهر نشاطية حيوية بارزة كما أن البعض منها خاصة catechin أبدى تأثيرات جانبية مثل التحلل الدموي الداخل وعائي الحاد (Salama *et* Mueller-Eckhardt, 1987) و الفشل الكلوي نتج عن إستعمال Quercetin (Di Carlo *et al.,*1999) كما ثبت أن البعض منها يتسبب في طفرات و/أو تعمل كطلائع مؤكسدة، وبإمكانها التداخل مع بعض الطرق الحيوية المهمة إذ تتفاعل مع cytochromes P450(CYPs) و monooxygenases و مواد خارجية مثل الأدوية و مولدات السرطان و مواد داخلية مثل الستيرويدات مما يؤثر على هذه الإنزيمات بطرق مختلفة، كما يمكنها أيضا أن تنشط العوامل المسببة للسرطان و/ أو تؤثر على استقلاب الأدوية عن طريق تحفيز CYPs (Hodek *et al.,* 2002) .

تحمي العضويات الهوائية نفسها من ROS بأنظمة إنزيمية و مزيحات كيميائية قادرة على إزالة هذه الجذور عن طريق مضادات أكسدة كاسرة للسلسلة و مضادات أكسدة وقائية (Kuhn, 2003) من بين المضادات الكاسرة للسلسلة عديدات الفينول، فمن المعروف أن الخصائص الصيدلانية للفلافونويدات و الدباغ و الأحماض الفينولية تعزى لنشاطيتها المضادة للأكسدة فالأحماض الفينولية مثلها مثل الفلافونويدات تعتبر مضادات أكسدة قوية حيث تقوم بالتقاط ROS و الأنواع الآزوتية النشطة (Morton *et al.,* 2000) .

العديد من المركبات الفينولية تتفاعل مع الجذور الحرة بمنح هذه الأخيرة ذرة هيدروجين منتجة بذلك مركبات أكثر ثباتا (DeGroot *et* Rauen, 1998) و/ أو تقوم بربط الأيونات المعدنية مثل الحديد Fe و النحاس Cu (Rice-Evans, 1995)

ج- التأثير المضاد للأكسدة لعديدات الفينول:

يمكن أن تتضمن الآلية المضادة للأكسدة تثبيط تشكل الأنواع الأكسجينية النشطة سواءا بتثبيط الإنزيمات أو التقاط آثار المعادن التي تتدخل في إنتاج الجذور الحرة أو بإزاحة الأنواع النشطة أو تنظيم أو حماية الدفاع المضاد للأكسدة (van Acker *et al.,* 1996) إذ ترتبط مدى فعالية النشاطية المضادة للأكسدة لعديدات الفينول بعدد مجاميع الهيدروكسيل (Pulido *et al.,* 2000) حيث يمكن لعديدات الفينول أن تتعامل كعوامل مرجعة و مزيحة للجذور الحرة (Hanasaki *et al.,* 1994).

د- تأثير الفلافونويدات:

تؤثر المركبات الفلافونويدية في الأوساط المائية مثل فيتامين C أو في الأوساط الدهنية مثل فيتاميت E ويرتبط هذا التأثير بخصائصها القطبية أثناء امتصاصها و كيفية استقلابها و أشكالها البنيوية .

تتدخل الفلافونويدات بكل سهولة في عمليات الأكسدة و الإرجاع داخل الخلية و خارجها و ترتبط قوتها المضادة للأكسدة بقدرتها على التفاعل مع الجذور الحرة (Rice-evans, 1998)، فقد ثبت أنها قادرة على التفاعل مع $^{\cdot}OH$ (Hanasaki *et al.,* 1994) و جذر $ROO^{\cdot}$ (Dugas *et al.,* 2000) و HOCL (Firuzi *et al.,* 2004) و مثبطة لإنتاج $^{\cdot}ONOO^{-}$ (Haenen *et al.,* 1997) و مزيحة للأكسجين المهيج $^{1}O_2$ (Bravo, 1998) و $^{\cdot}O_2^{-}$ (Gryglewski et Robak, 1988) حيث أن نشاطية إزاحة $^{\cdot-}O_2$ متناسبة مع قدرة الفلافونويدات على إرجاع Cu^{2+} (Furuno *et al.,* 2002).

في دراسة قام بها (De Giovani *et* De Souza, 2004) على التأثير المضاد للأكسدة لكل من Catechine و Galagin و Rutin و Quercetin وجد أن التأثير الإزاحي لهذه الفلافونويدات مجتمعة يكون أكثر فعالية من تأثير كل فلافونويد لوحده و افترض أن هذه الفعالية العالية ترجع لإمتلاك مركز إضافي لإزاحة $^{\cdot-}O_2$ ، كما بينت نتائج دراسة أخرى أن لحمض الأسكوربيك تأثير تآزري مع الفلافونويدات و بإمكانه أن يحميها من الهدم التأكسدي (Zhu *et al.,* 2002).

دراسات مخبرية بينت أن للفلافونويدات القدرة على عرقلة تحول حمض Ascorbate إلى dehydroascorbate و ذلك بإلتقاطها للنحاس و بعض آثار المعادن التي تحفز أكسدة حمض الأسكوربيك، آلية أخرى ترتكز على قدرة الفلافونويدات على العمل كمستقبلات للجذور الحرة أثناء تشكلها و التي تعتبر المرحلة الأهم لأكسدة حمض الأسكوربيك (Harper *et al.,* 1969)، كما يمكنها أن ترفع من امتصاص حمض الأسكوربيك و استقراره و إرجاع dehydroascorbate إلى ascorbate (Wilson et Hughes, 1977)، بالمقابل يمكن لحمض الأسكوربيك أن يرجع Quercetin المأكسد بالأيونات المعدنية مثل Cu^{2+} و التي بإمكانها أن تؤكسد flavonols في الأوساط المائية (Middleton *et al.,* 2000) كما يمكن لتراكيز ضعيفة من حمض الأسكوربيك أن تحمي Quercetin من الأكسدة الذاتية مما يدل على أن حمض الأسكوربيك يستطيع أن يقي الفلافونويدات من الأكسدة داخل الأغذية وبالتالي يسمح بالمحافظة على البنية الفراغية للفلافونويدات في الكائن الحي (Middleton *et* Drzewiecki, 1993) من الواضح أن Querctin مزيح فعال للجذور الحرة لكن myricetin أكثر قوة إزاحية منه، و بالمقابل يعتبر Kaempferol مزيح فعال جدا رغم احتوائه على مجموعة هيدروكسيل واحدة في الحلقة B و ربما يعود هذا لتواجد الرابطة الزوجية C_2-C_3 و مجموعة OH في الموقع 3 و مجموعة OXO-4 في الحلقة C (Alexandrakis *et al.,*1999).

المواد و الطرق

3-1- المواد:

3-1-2- المواد البيولوجية:

أ- مادة البروبوليس:

أجريت هذه الدراسة على أربع عينات من البروبوليس من أربع مناطق مختلفة من ولاية سطيف هي على الترتيب:

- بني عزيز(1).
- عموشة.
- سطيف (بوعواجة).
- بني عزيز (2)

حديثة الجني (محصول 2007) في شكلها الخام .

ب- الأحياء الدقيقة المختبرة:

ب-1- الأنواع البكتيرية:

Escherichia coli, Salmonella typhi, Bacillus subtulis, Klebsiella pneumoniae, Serratia spp *Citrobacter spp, Pseudomonas* spp*, Staphylococcus aureus* (مخبر علم الأحياء الدقيقة بقسم البيولوجيا لجامعة سطيف).

ب-2- الأنواع الفطرية:

Aspergillus niger,Aspergillus flavus، *Aspergillus fumigatus* (مخبر علم الأحياء الدقيقة بقسم البيولوجيا لجامعة سطيف).

3-1-3- المواد الكيميائية:

أ- **(DPPH) 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl** (Fluka) و كذلك الـBHT و حمض الأسكوربيك (الفيتامين C).

ب- **المذيبات:**

- الإيثانول 100% الذي تم تخفيفه إلى 70% باستعمال الماء المقطر(VWR international) .

ج- **أوساط الزرع:**

- وسط Mueller-Hinton آغار(MHA)(Fluka) .
- وسط Mueller-Hinton مرق(MHB).
- وسط PSA لتنمية الأنواع الفطرية.

3-2- الاستخلاص:

3-2-1- مرحلة الإذابة:

يستعمل من أجل إذابة البروبوليس الايثانول 70% وذلك وفق الطريقة المقترحة من طرف Murat و آخرون (2003) مع بعض التعديل.

توزن 2.5غ من البربوليس الخام المجمد و تقطع قطعا صغيرة و توضع في50مل من الإيثانول (70%) و تترك في الظلام مدة ثلاثة أيام مع الرج بمعدل 10 دقائق يوميا، بعدها تنزع الـ 50مل الأولي من الكحول و التي قد ذاب فيها جزء من البروبوليس الخام لتحفظ في الظلام و تستبدل بـ 50مل أخرى من الإيثانول قصد إذابة ما تبقى من البروبوليس الخام (للحصول على أكبرمردود) و تترك هي الأخرى في الظلام مدة يومين مع الرج بمعدل 10دقائق يوميا، ثم يخلط المزيج للحصول على 100مل من المستخلص الايثانولي المخفف (EEP).

3-2-2- مرحلة التصفية:

بعد نزع قطع البروبوليس الصغيرة من EEP الخام يصفى هذا الأخير عبر شاش (مصفاة) لنزع الجسيمات الصغيرة، بعدها يخضع لعملية الطرد المركزي (4000 دورة/الدقيقة لمدة 20 دقيقة) لنزع ما تبقى من الرواسب و بالتالي الحصول على مستخلص صافي (رائق).

3-2-3- مرحلة التبخير:

توضع العينات في جهاز التبخير الدوار (Rotavapeur) تحت حرارة 45م° من أجل تبخير الإيثانول (المذيب) و تركيز العينة. نتحصل في كل مرة على ناتج صمغي شديد الالتصاق يزال بالايثانول حيث يضاف الايثانول بحذر (1مل في كل مرة حتى يزال الصمغ نهائيا) و يحسب الوزن الصافي لتقدير المردود.

و يمكن تلخيص مراحل الاستخلاص في الشكل(5).

شكل، 5: مراحل استخلاص البروبوليس و الحصول على المستخلص الإيثانولي.

3-3- نشاطية المستخلص الإيثانولي المضادة للأحياء الدقيقة:

بعد استخلاصنا للبروبوليس و الحصول على المستخلص الايثانولي "EEP" حاولنا دراسة نشاطية هامة من النشاطيات التي نسبت إليه وهي تلك المتعلقة بفعله المضاد للأحياء الدقيقة؛ حيث اختبرنا فعله التثبيطي على بعض الأنواع البكتيرية و الفطرية.

و بصفة عامة يتم تقييم نشاطية أي مادة كيميائية أو طبيعية، كمستخلصنا هذا مثلا، على الأحياء الدقيقة بنوعين من الدراسة؛ نوعية و كمية .

تتمثل الدراسة النوعية في اختبار حساسية الكائن الدقيق للمادة المضادة له، لهذا الغرض تستعمل العديد من الطرق و التقنيات؛ أهمها تلك التي تعتمد على انتشار المادة المختبرة داخل وسط الزرع الصلب و الطريقة المستعملة بشكل واسع في ذلك هي طريقة الأقراص.

أما الدراسة الكمية فتتمثل في تقدير التركيز الأدنى المثبط CMI و التركيز الأدنى القاتل CMB للمادة المختبرة (Belaiche, 1979).

يعرف الـ CMI على أنه أصغر تركيز من المادة المختبرة الذي يثبط كل نمو مرئي للكائن الدقيق، أما الـ CMB فهو التركيز الأدنى الذي يقتل 99.99%من الكائن المختبر (Marmonier, 1987).

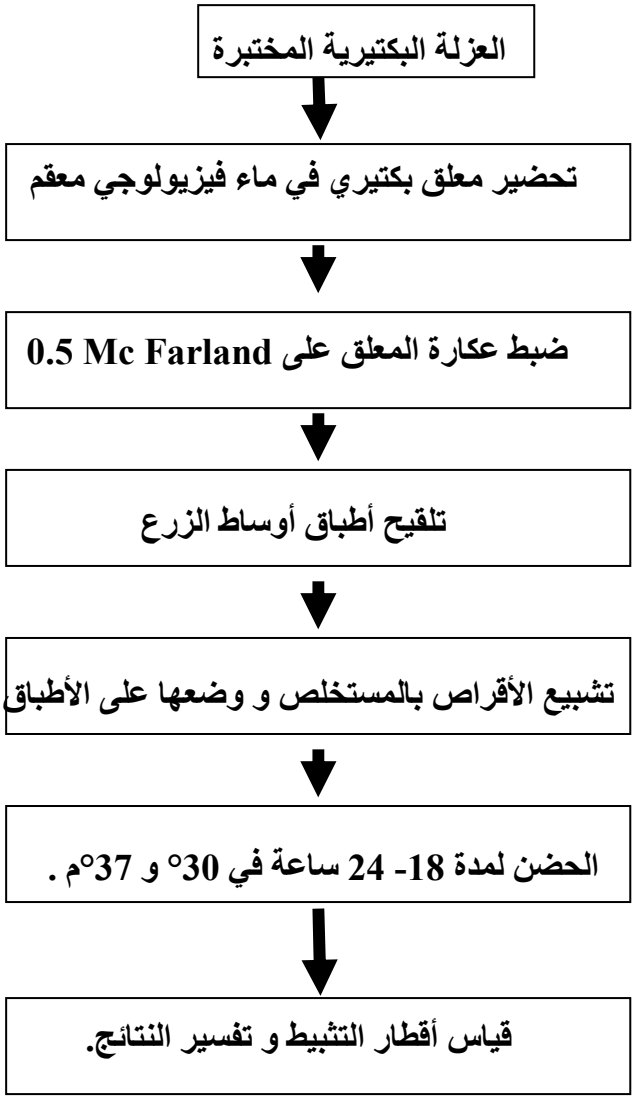
3-3-1- اختبار نشاطية المستخلص الايثانولي المضادة للبكتيريا:

تم في بداية الأمر اختبار حساسية الأنواع البكتيرية لجميع عينات المستخلص الايثانولي بطريقة الأقراص و كذا بطريقة الآبار و بعد ثبوت ايجابية هذين الاختبارين بظهور حساسية السلالات المختبرة للمستخلص تجرى دراسة كمية بتقدير الـCMI و الـ CMB و مقارنة الحساسية مع بعض المضادات الحيوية.

أ- اختبار النشاطية التثبيطية للمستخلص الايثانولي بطريقة الأقراص:

لاختبار النشاطية التثبيطية للمستخلص الايثانولي على الأنواع البكتيرية تم إتباع طريقة الأقراص المقترحة من طرف: NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) الخاصة باختبار المضادات الحيوية مع استبدال المضادات الحيوية بالمستخلص الايثانولي.

لمعرفة مدى اختلاف التأثير على البكتيريا باختلاف العينة المدروسة؛ اختبرت النشاطية التثبيطية لأربع عينات مختلفة من البروبوليس من منطقة سطيف بنفس الطريقة.
و يمكن تلخيص خطوات هذه الدراسة في الشكل (6):



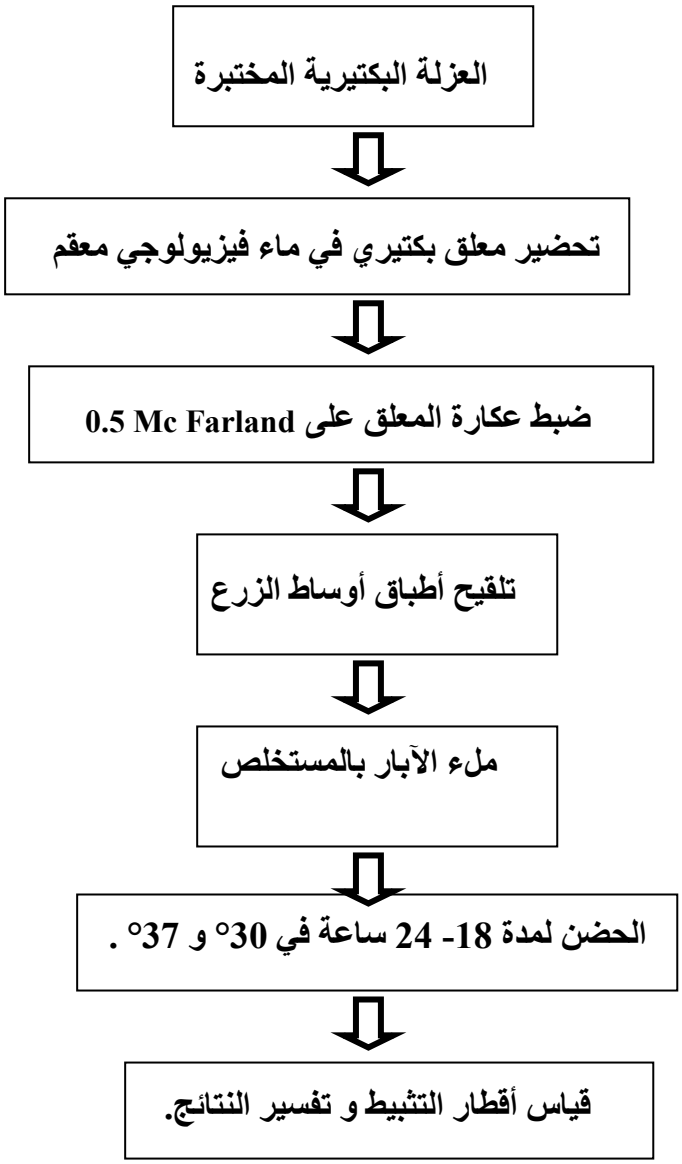
شكل، 6: خطوات دراسة النشاطية التثبيطية للمستخلص الإيثانولي على البكتيريا بطريقة الأقراص.

ب- اختبار النشاطية التثبيطية للمستخلص الايثانولي بطريقة الآبار:

استعملنا من أجل دراسة الحساسية البكتيرية للمستخلص الايثانولي أيضا طريقة الآبار و التي لا تختلف كثيرا عن طريقة الأقراص حيث تعوض الأقراص في هذه الطريقة بآبار

تحفر في وسط الزرع، بعد زرع البكتيريا عليه، ذات أقطار 8مم بواسطة ثاقب فليني معقم، تملأ هذه الأخيرة بالمستخلص الايثانولي.

و تتبع فيها نفس خطوات طريقة الأقراص حسب الشكل (7) :



شكل، 7: خطوات دراسة النشاطية التثبيطية للمستخلص الإيثانولي على البكتيريا بطريقة الآبار.

ج- طريقة الإختبار:

لإجراء هذين الاختبارين يستعمل وسط الزرع Mueller-Hinton مع جميع الأنواع البكتيرية المختبرة.

يصب الوسط في أطباق بتري ذات قطر 9سم بسمك 4مم (بمعدل 20 مل في العلبة)، ثم تترك الأطباق في انتظارتصلبها من أجل الزرع عليها.

بعدها يتم تحضير اللقاح أو المعلق البكتيري (متجانس) انطلاقا من مزرعة بكتيرية حديثة عمرها بين 18 إلى 24 ساعة في ماء فيزيولوجي معقم، بعدها تضبط العكارة على 0.5 Mc Farland (10^8 وحدات مشكلة لمستعمرات CFU/مل) و ذلك بقياس كثافته الضوئية أي المعلق في طول الموجة 620 نانومتر و ضبطها بين 0.08 و 0.1 (بإضافة الماء الفيزيولوجي إذا كانت فوق 0.1 و بإضافة مستعمرات بكتيرية إذا كان دون 0.8) و يجب أن يستعمل هذا اللقاح خلال 15 دقيقة الأولى من تحضيره.

يغمس ماسح قطني معقم (écouvillon) في المعلق البكتيري ثم يمسح به على كامل الوسط الجاف بشكل خطوط متلاصقة مع تكرير العملية ثلاث مرات و ذلك بتدوير الطبق 60° في كل مرة.

ج-1- بالنسبة لطريقة الأقراص:

بواسطة ملقط معقم يتم وضع أقراص ورق الترشيح المعقمة الخاصة باختبار المضادات الحيوية من نوع (Becton & Sparks) بواسطة ملقط معقم على سطح الطبق المزروع بعد أن يتم تشبيعها بـ 10 µل من المستخلص الايثانولي (أي بمعدل 100µغ في القرص) لجميع العينات؛ يوضع في كل علبة إضافة إلى المستخلص الايثانولي أقراص شاهدة على الاختبار السلبي تحمل الايثانول 70% وحده.

كما أجريت الدراسة على أقراص للمضاد Gentamicin للمقارنة.

ج-2- بالنسبة لطريقة الآبار:

بواسطة ثاقب فليني معقم تحفر على سطح الوسط المزروع آبار ذات أقطار8مم، ثم تملأ هذه الأخيرة بـ 60µل من المستخلص الايثانولي لجميع العينات .

يحفر في كل علبة إضافة إلى الآبار الحاوية على المستخلص الايثانولي آبار شاهدة على الاختبار السلبي تحمل الايثانول 70% وحده (Tepe *et al.*,2005) .

تحضن الأطباق بدرجة حرارة 37°م (ماعدا الـ *Bacillus* تحضن في 30°م) لمدة 18إلى 24 ساعة.

يتم قياس أقطار مناطق التثبيط حول كل قرص (أو بئر)، ثم يتم تقدير نشاطية المستخلص الايثانولي. حيث يمثل القطر من 8 – 14 تثبيطا ضعيفا و القطر من 14 – 20 ملم تثبيطا متوسطا أما القطر الأكبر من 20 ملم فيمثل تثبيطا كبيرا (Duraffourd *et al.,* 1990).

د- تحديد التركيز الأدنى المثبط CMI:

د-1- في وسط سائل:

استخدمت فيها طريقة التخفيف المضاعف Two Fold حسب الشكل (8) حيث تنطلــق من تركيز 27.5ملغ/مل لكل عينة (أي بمعدل 2750 µغ في الأنبوب) تم تحضيره في أنبوب صغير بمزج 0.2 ملل من EEP مع1.8ملل من مرق Mueller-Hinton ثم يلقح بـ 20 µل من لقاح مخفف (يحوي حوالي 10^5 وحدة مشكلة لمستعمرات/مل) انطلاقا من لقاح ذو كثافة 0.5 Mc Farland.

يؤخذ 1ملل من الأنبوب الأول بعد الخلط الجيد له ويضاف إلى أنبوب ثاني يحوي 1ملل من الوسط الملقح ومن هذا الأخير يؤخذ 1ملل أيضا و يضاف إلى أنبوب ثالث يحوي 1ملل من الوسط الملقح وهكذا حتى التخفيف السادس للـ EEP ويؤخذ منه 1ملل ويرمى حتى نتحصل في الأخير على1 ملل في كل الأنابيب.

موازاة مع ذلك يحضر أنبوب شاهد من أجل المقارنة يحوي 1ملل من الوسط الملقح خالي من EEP. تحضن الأنابيب في37م° (ما عدا *Bacillus* 30م°) مدة 18-24 ساعة ثم يلاحظ التعكر بالمقارنة مع الأنبوب الشاهد لتعيين الأنبوب الموافق CMI و يمكن تلخيص خطوات CMI في الوسط السائل في الشكل (8).

د-2- في وسط صلب:

لتحديد CMI للمستخلص الإيثانولي على وسط صلب تم إتباع طريقة المزج المقترحة من طرف NCCLS و التي تستخدم عادة لتحديد CMI المضادات الحيوية.

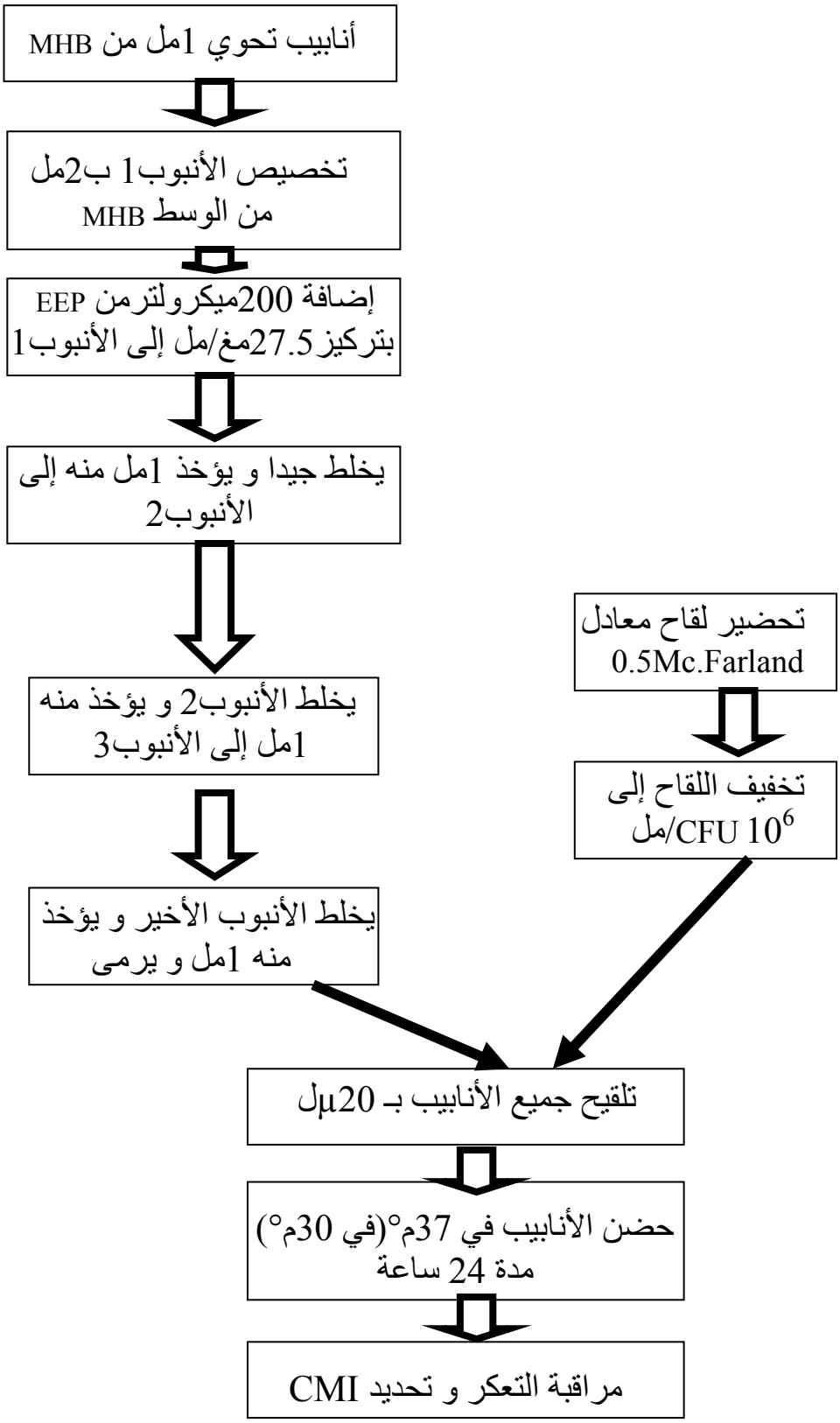
تعتمد هذه الطريقة على مزج المستخلص الإيثانولي مع وسط Mueller-Hinton بالطريقة الموضحة في الجدول4، و بعد تصلب الوسط يتم نزع الرطوبات الزائدة منه ثم تزرع الأنواع البكتيرية على سطحه بشكل خطوط متوازية باستعمال إبرة زرع معقمة انطلاقا من معلقات بكتيرية كثافتها حوالي 0.5 Mc Farland، تحضن الأطباق في 37م° (30م° بالنسبة لـ *Bacillus*) لمدة 18-24ساعة وبعد انتهاء مدة الحضن تفحص لأجل تحديد CMI لكل نوع مختبر حيث يعتبر التركيز الذي لا يظهر عليه النمو هو التركيز الموافق لـ CMI .

جدول، 4: التخافيف المستعملة لتحديد CMI المستخلص الإيثانولي بطريقة المزج(NCCLS)

تراكيز الـ EEP	2500 µغ/مل	2000 µغ/مل	1700 µغ/مل	850 µغ/مل	425 µغ/مل
أطباق بتري ذات قسمين	1مل من EEP بتركيز25مغ+ 9مل من MHA	1مل من EEP بتركيز20مغ+ 9مل من MHA	1مل من EEP بتركيز17مغ+ 9مل من MHA	0.5 من EEP بتركيز17مغ+9.5مل من MHA	0.5 منEEP بتركيز8.5مغ+ 9.5مل من MHA

ه- تحديد التركيز الأدنى القاتل CMB:

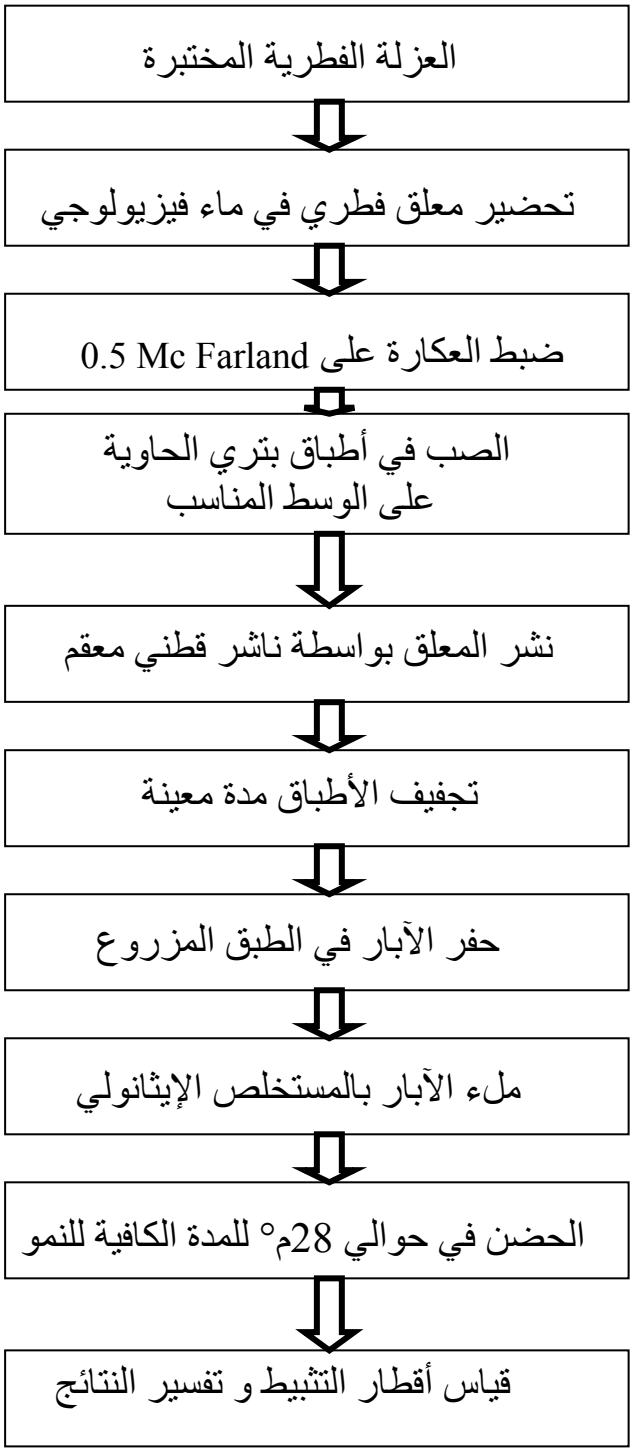
يتم تحديد التركيز الأدنى القاتل CMB بعد إعادة زرع تركيز CMI و التراكيز التي تليه المحصل عليها في وسط سائل على وسط Mueller-Hinton الصلب على شكل خطوط متوازية. تحضن الأطباق في 37م° لمدة 18-24 ساعة (ما عدا *Bacillus* في 30م°).و بعد انتهاء مدة الحضن تفحص حيث لا يوجد نمو فالتركيز الموافق له هو CMB .



شكل، 8: خطوات تحديد التركيز الأدنى المثبط **CMI**

3-3-2- إختبار نشاطية المستخلص الإيثانولي EEP المضادة للفطريات:

اقتصرت دراستنا لنشاطية EEP المضادة للفطريات على الدراسة النوعية فقط حيث قمنا باختبار حساسية الأنواع الفطرية المختارة تجاه EEP باستعمال تقنية الآبار أيضا بطريقة لا تختلف كثيرا عن تلك المستعملة مع البكتيريا و يمكن تلخيصها في الشكل (9).



شكل، 9: خطوات دراسة النشاطية التثبيطية للمستخلص الإيثانولي للبروبوليس على الفطريات.

3-4- الخاصية الضد تأكسدية لمادة البروبوليس:

تم دراسة نشاطية هامة من النشاطيات التي نسبت إلى المستخلص الإيثانولي للبروبوليس وهي تلك المتعلقة بفعله المضاد للأكسدة؛ أو بالأحرى فعله المزيح للجذور الحرة حيث اختبر مدي إزاحته للجذور الحرة مع كل من العينات الأربع وتقدير التركيز المثبط لـ 50% (CI_{50}) من الجذر الحرDPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) .

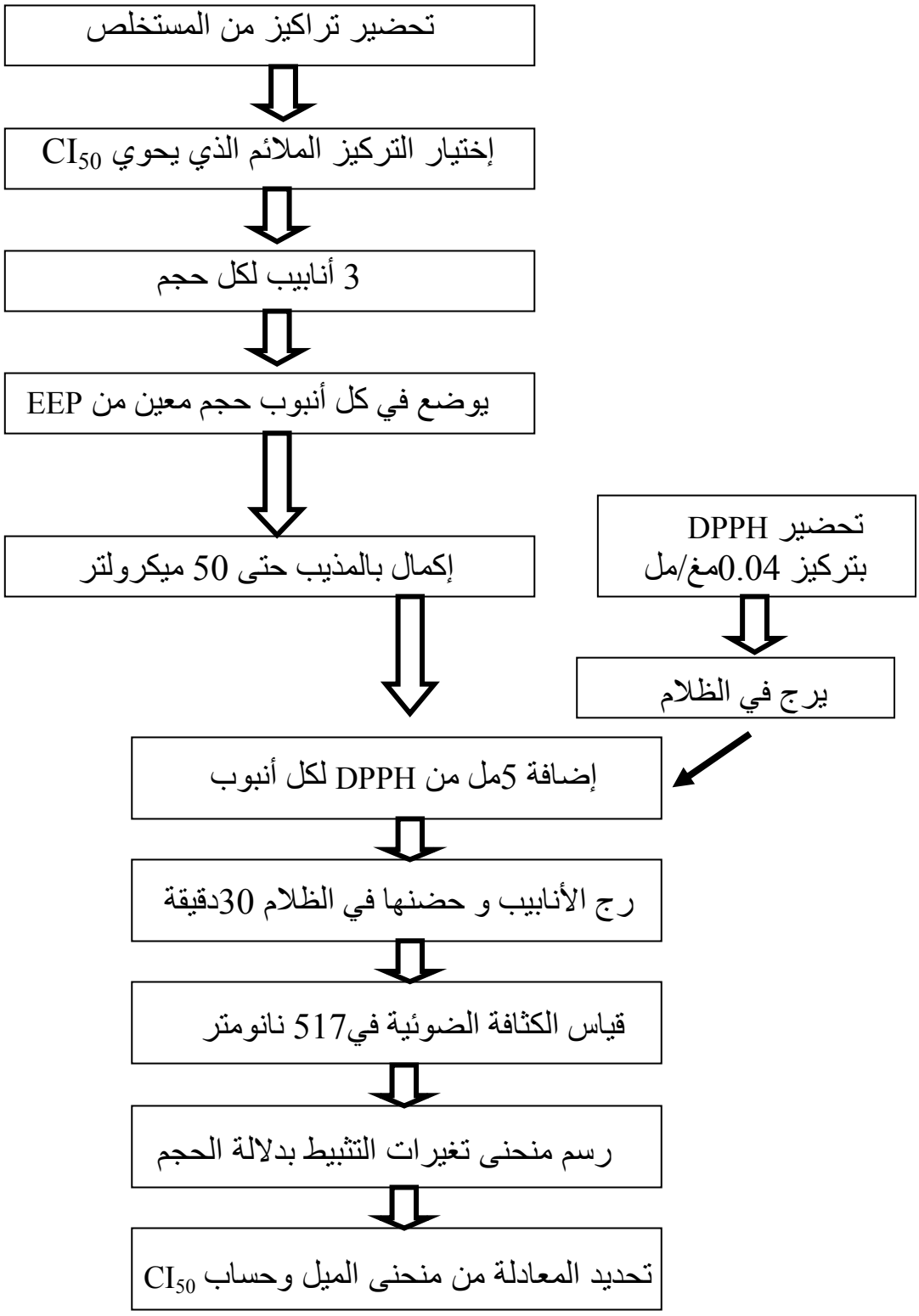
كما استعمل كشواهد ايجابية على إزاحة الجذور الحرة كل من BHT (Btylated Hydroxytolune) و حمض الأسكوربيك (فيتامين C).

1-4-3- طريقة العمل:

- يتم تحضير المستخلصات بتراكيز معينة، ثم اختيار التركيز الملائم الذي يحتوي على مجال CI_{50} أي تثبيط 50% من الجذر الحر DPPH.
- توضع أنابيب لكل حجم بحيث نضع في كل أنبوب حجم معين من العينة المدروسة (تصاعديا) و نكمل الحجم إلى 50 µل بالمذيب.
- يحضر محلول DPPH بتركيز 4مغ/100مل في حوجلة و يوضع في الظلام حتى حين استعماله.
- يضاف 5 مل من محلول DPPH لكل أنبوب، ترج الأنابيب و تحضن في الظلام لمدة 30 د.
- بعد مرور 30د تقاس الكثافة الضوئية D.O في طول الموجة 517 نانومتر دون نسيان الشواهد و التي تحوي 50µل من المذيب مع 5 مل DPPH و التي تقاس قبل الحضن و بعده. استعمل من أجل هذه الدراسة الـ EEP بتركيز 3مغ/مل بالنسبة لجميع العينات و 1مغ/مل مع كل من حمض الأسكوربيك و BHT .
- تسجل النتائج في جدول خاص و تحسب النسبة المئوية للتثبيط بالعلاقة:

$$I_{\%} = \frac{\text{القيمة عند الصفر - القيمة الملاحظة}}{\text{القيمة عند الصفر}}$$

- رسم منحنى تغيرات التثبيط بدلالة الحجم ثم استخراج منحنى الميل لكل منحنى وبالتالي الحصول على معادلة المستقيم و التي يمكن من خلالها تحديد CI_{50}. (Tepe *et al.*,2005)



شكل، 10: خطوات دراسة النشاطية الضد تأكسدية للبروبوليس.

النتائج

4-1- الإستخلاص:

تم الحصول على سائل غروي شديد الإلتصاق ذو رائحة مميزة و ذو لون متماثل بالنسبة للعينات الأربع وهو اللون البني المصفر ما عدا العينة 2 و التي ظهر لونها مائلا إلى الخضرة، وكانت الأوزان النهائية للعينات المتحصل عليها على التوالي ع$_1$=370ملغ، ع$_2$=510ملغ، ع$_3$=800ملغ، ع$_4$=420ملغ.

انطلاقا من الوزن المستعمل في هذه التجربة و هو 2.5غ من جميع العينات يمكن تقدير المردود المتحصل عليه بـ 32% كأعلى مردود بالنسبة للعينة (3) تليها العينة (2) بمردود 20.4% ثم العينة (4) بمردود 16.8% وأخيرا العينة (1)بمردود 14.9% .

4-2- نشاطية المستخلص الإيثانولي المضادة للأحياء الدقيقة:

4-2-1- نشاطية المستخلص الإيثانولي المضادة للبكتيريا:

أ- النشاطية التثبيطية:

أدى تشبيع أقراص ورق الترشيح بـ 10µل/قرص من المستخلص الإيثانولي بالنسبة لطريقة الأقراص أي بمعدل 275µغ /القرص أو بـ 60µل/البئر من المستخلص الإيثانولي بالنسبة لطريقة الآبار أي ما يعادل 1650µغ / البئر إلى تثبيط متفاوت بين الضعيف و الواضح و حتى المنعدم بين السلالات البكتيرية المختبرة.

وكانت شدة هذا التثبيط متناسبة بشكل طردي مع تركيز المستخلص الإيثانولي المستعمل (بين طريقة الأقراص و الآبار). حيث لوحظ في طريقة الأقراص و هي الحاملة للتركيز الضعيف حساسية منعدمة مقارنة بطريقة الآبار الحاملة للتركيز الأعلى.

كما كانت هذه الحساسية مختلفة من نوع بكتيري لآخر و متباينة بوضوح بين البكتيريا السالبة و الموجبة الغرام ومتباينة أيضا من عينة بروبوليس لأخرى.

مع العلم أن الإيثانول المستعمل في التخفيف لم يكن له أي تأثير تثبيطي على كل الأنواع المختبرة إذ أن تشبيع أقراص الترشيح بـ 10µل أو الآبار بـ 60 µل منه لم يؤد إلى حدوث أي تثبيط.

سجل اختلاف واضح بين الأنواع السالبة الغرام للمستخلص الإيثانولي فأظهر نوع واحد منها حساسية له، بينما كانت جميع الأنواع الأخرى مقاومة، وهذا بالنسبة لجميع العينات.

النوع السالب الغرام الوحيد الذي أبدى حساسية للمستخلص الإيثانولي للبروبوليس هو *E.coli* حيث نتج عنه أقطار تثبيطية تراوحت بين 10ملم بالنسبة للعينة(1) و(3)، 11ملم بالنسبة للعينة (2) و 12.5ملم بالنسبة للعينة(4) وهذا باستعمال طريقة الآبار (شكل 11).

أما بالنسية لطريقة الأقراص فلم يسجل أي حساسية (عند التركيز 275 µغ/قرص) و هذا مع جميع الأنواع المختبرة و مع جميع العينات أيضا (جدول5).

الأنواع *S. typhi, K. pneumoniae, Serratia spp, Citrobacter spp, Pseudomonas spp* لم تبد أي حساسية تجاه المستخلص الإيثانولي للبروبوليس سواء بالنسبة لطريقة الأقراص أو بالنسبة لطريقة الآبار وهذا بالنسبة لجميع العينات (جدول5).

على عكس التباين الذي سجل في حساسية الأنواع السالبة الغرام للمستخلص الإيثانولي للبروبوليس أبدت كل الأنواع الموجبة الغرام المختبرة وهي *B. subtulis, S. aureus* حساسية واضحة للمستخلص الإيثانولي حيث سجل قطر تثبيط مساو لـ 13.5مم بالنسبة لـ *S. aureus* باستعمال العينة (1)، و 13مم بالنسبة للعينة (2)، و 12.5مم بالنسبة للعينة(3)، وأخيرا 12.5بالنسبة للعيتة(4). تم الحصول على هذه النتائج باستعمال طريقة الآبار.

سجل عند استعمال بكتيريا *B. subtulis* قطر تثبيطي أكبر منه وهو على التوالي 15مم بالنسبة للعينة (1)، 16مم بالنسبة للعينة (2)،13مم بالنسبة للعينة (3) و14مم بالنسبة للعينة (4) و هذا دائما بالنسبة لطريقة الآبار(جدول5).

جدول، 5: أقطار مناطق التثبيط (بالملم) المسجلة مع عينات البروبوليس و المضاد Gentamicine

أقطار مناطق التثبيط بالملم									
Gentamicine	تركيز المستخلص الإيثانولي للبروبوليس (ميكروغرام /القرص أو البئر)								
	1650 ميكروغرام/البئر				275 ميكروغرام/القرص				
	ع4	ع3	ع2	ع1	ع4	ع3	ع2	ع1	
									الأنواع G^-
24	12.5	10	11	10	6	6	6	6	*E.coli*
18	8	8	8	8	6	6	6	6	*Klebsiella*
17	8	8	8	8	6	6	6	6	*Pseudomonas*
17	8	8	8	8	6	6	6	6	*Salmonella*
22	8	8	8	8	6	6	6	6	*Citrobacter*
24	8	8	8	8	6	6	6	6	*Serratia*
									الأنواع G^+
22	12.5	12	13	13.5	6	6	6	6	*Staphylococcus*
23	14	13	16	15	6	6	6	6	*Bacillus*

- الأقطار المسجلة متضمنة لقطر البئر (8ملم) و قطر القرص (6ملم).

ب- التركيز الأدنى المثبط و التركيز الأدنى القاتل:

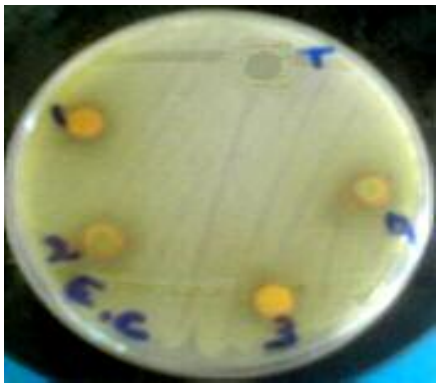
تم حساب CMI لـ *E.coli, B. subtulis, S. aureus* فقط لأن باقي الأنواع لم تظهر أي حساسية تجاه المستخلص الإيثانولي.

طبقت كل من طريقة المزج على وسط صلب و طريقة التخفيف المضاعف لحساب تركيز المستخلص الإيثانولي للبروبوليس الأدنى المثبط، فقدر بـ 2000 µغ/مل بالنسبة لبكتيريا *S. aureus* وهذا مع كل من العينتين 2 و3 أما بالنسبة للعينتين 1 و 4 ففاقت 2500 µغ/مل، بينما كانت في حدود 1375 µغ/مل بالنسبة لكل من بكتيريا *E.coli, B. subtulis* و هذا مع العينة الأولى فقط، بينما قدرت بـ 2000µغ/مل لهذين الأخيرين مع باقي العينات ما عدا ما سجل بالنسبة للـ *E.coli* مع العينة 4 إذ قدر CMI بـ 2500 µغ/مل (جدول6).

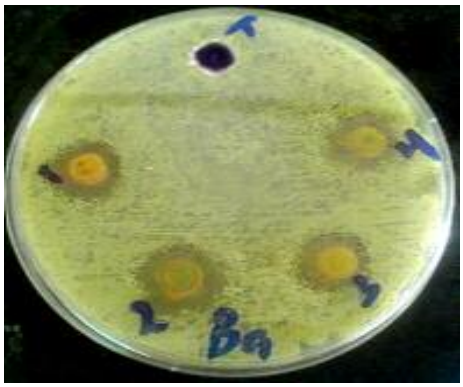
وقد تم التأكد من هذه النتائج بطريقة التخفيف المضاعف و التي تم من خلالها أيضا تقدير التركيز الأدنى القاتل CMB حيث تم الحصول على 2750 µغ/مل بالنسبة *S. aureus* مع جميع عينات البروبوليس المستعملة، وكان الإختلاف بالنسبة لـ *E.coli* و *B. subtulis* اللتين قدر فيهما بـ 1375 µغ/مل فقط مع العينة (1) و 2750 µغ/مل مع باقي العينات (الجدول6).

جدول، 6: التركيز الأدنى المثبط و التركيز الأدنى القاتل لعينات البروبوليس

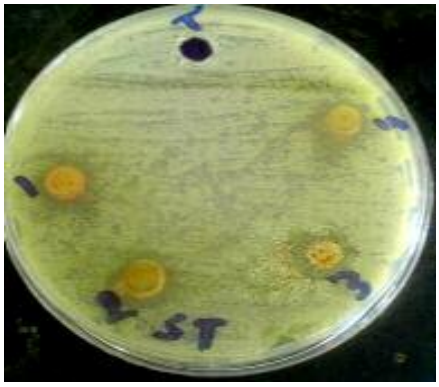
البكتيريا / الأختبار	التراكيز المثبطة و القاتلة بالميكروغرام/مل											
	S.aureus				*E.coli*				*B.subtulis*			
	ع1	ع2	ع3	ع4	ع1	ع2	ع3	ع4	ع1	ع2	ع3	ع4
CMI	2500	2000	2000	2500	1375	2000	2000	2500	1375	2000	2000	2000
CMB	2750	2750	2750	2750	1375	2750	2750	2750	1375	2750	2750	2750



طبق1

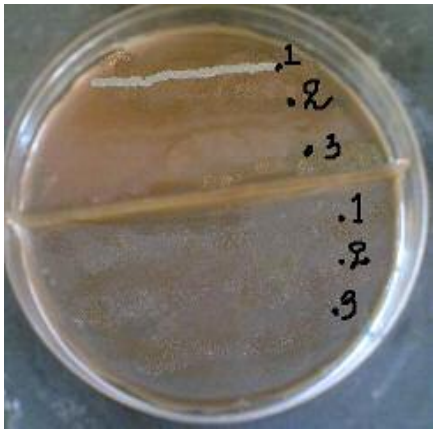


طبق2

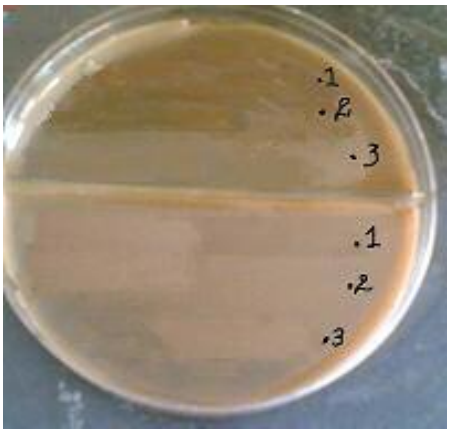


طبق3

شكل، 11 :تأثير المستخلص الإيثانولي للبروبوليس (1650µغ/البئر)على كل من *E.coli* (طبق1)، *B.subtulis* (طبق2)، *S.aureus* (طبق3).



(أ)



(ب)

شكل، 12: تحديد التركيز الأدنى المثبط بطريقة المزج المقترحة من طرف (NCCLS)
(ا) التركيز 2000µغ/مل مع ع1 وع2 أما (ب) التركيز 2500 µغ/مل مع ع2 و ع3.
1- *S.aureus* 2- *E.coli* 3- *B.subtulis*

4-2-2- نشاطية المستخلص الإيثانولي للبروبوليس المضادة للفطريات:

وجد أن المستخلص الإيثانولي للبروبوليس يملك فعالية تثبيطية معتبرة ضد جميع الأنواع الفطرية المختبرة على الرغم من تفاوتها من نوع فطري لآخر، كما أن هذه الفعالية متناسبة طردا مع التركيز المختبر. لم يكن للإيثانول المستعمل للتخفيف أي تأثير تثبيطي على جميع الأنواع الفطرية المختبرة.

لوحظ أن الحساسية معتبرة مع كل من الفطرين *A.fumigatus* و*A.Niger* تجاه المستخلص الإيثانولي، حيث لوحظت أكبر حساسية بالنسبة للنوع *A.Niger* باستعمال تراكيز مختلفة من عينة البروبوليس الأولى و سجل أكبر قطر تثبيطي 30مم باستعمال تركيز 1650 µغ /البئر.

تلي العينة الأولى العينة الثانية من حيث قوة التثبيط ، بتسجيل قطر قطر 21.5ملم باستعمال التركيز 1650 µغ /البئر (الشكل13).

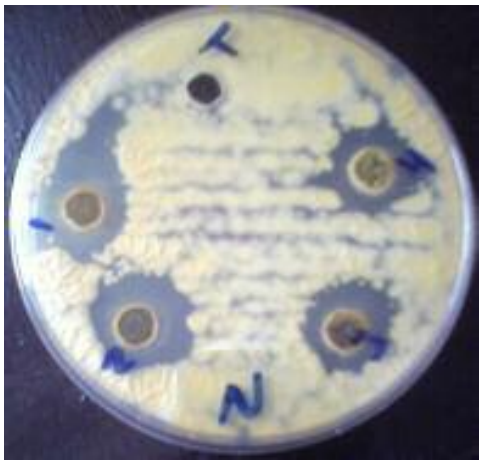
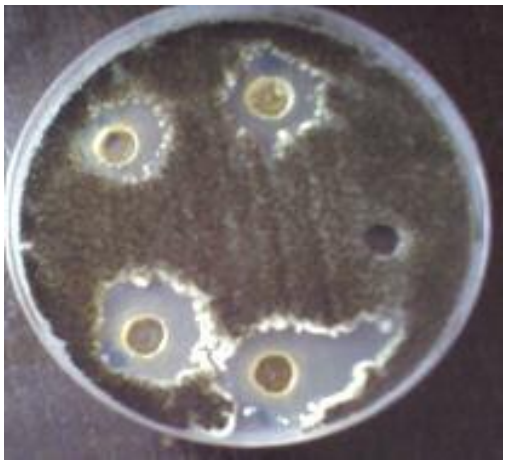
لم تختلف الحساسية بالنسبة للنوع *A. fumigatus* إلا أن هذا الأخير أثرت عليه العينة الثانية بشكل واضح، حيث سجل قطر 15.5ملم مع أضعف تركيز مستعمل (275 µغ /البئر)، تليها العينة الأولى بتسجيل قطر 13.5ملم مع نفس التركيز (الشكل13).

و سجل قطر تثبيط مع أكبر تركيز (1650 µغ /البئر) بقطر 22.5ملم مع العينة الثانية تليها 21ملم مع العينة الأولى.(جدول7)

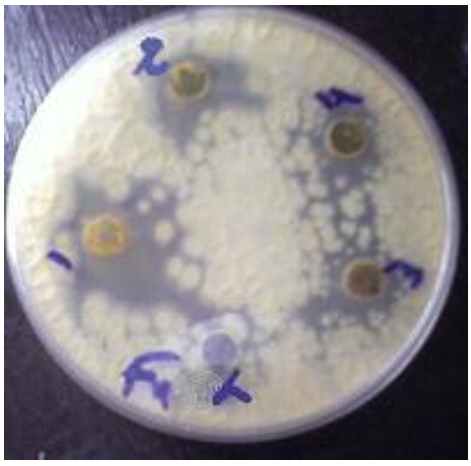
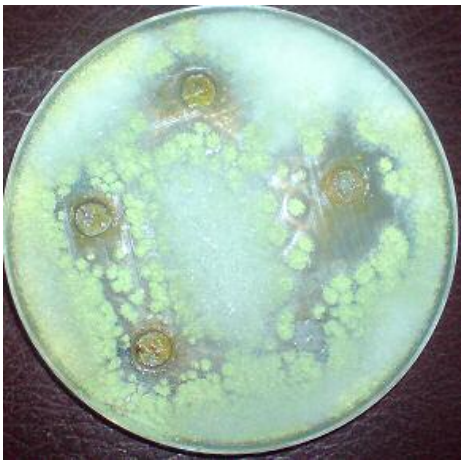
أظهر النوع *A.flavus* مقاومة للمستخلص الإيثانولي مقارنة بالنوعين الأولين؛ إلا أنه أبدى حساسية متوسطة، حيث سجل أكبر قطر تثبيطي 17.5ملم مع العينة الثالثة باستعمال تركيز 1650 µغ/البئر و تتناقص الحساسية بتناقص التركيز، حيث لم يسجل إلا 9ملم مع العينة الثانية باستعمال التركيز 275 ميكروغرام/البئر (الأشكال15،14،13) (جدول7).

جدول، 7: أقطار مناطق التثبيط للمستخلص الإيثانولي مع أنواع *Aspergillus*.

	أقطار مناطق التثبيط بالملم											
التركيز / النوع	275 µغ/البئر				550 µغ /البئر				1650 µغ /البئر			
	ع1	ع2	ع3	ع4	ع1	ع2	ع3	ع4	ع1	ع2	ع3	ع4
A.niger	**15.5**	**15.5**	**12**	**12.5**	**17**	**15**	**14.5**	**16**	**30**	**21.5**	**18**	**18.5**
A.fumigatis	**13.5**	**15.5**	**12**	**13.5**	**17**	**21.5**	**20**	**14**	**21**	**22.5**	**19**	**17**
A.flavus	**12**	**11**	**9**	**11.5**	**11**	**12**	**11**	**10.5**	**15.5**	**16.5**	**17.5**	**15.5**

شكل6: تأثير المستخلص الإيثانولي للبروبوليس (1650µغ/البئر) على فطر *A.niger*

شكل7: تأثير المستخلص الإيثانولي للبروبوليس (1650µغ/البئر) على فطر *A.fumigatis*.

شكل8:تأثير المستخلص الإيثانولي للبروبوليس (1650µغ/البئر)على فطر *A.flavus*.

4-3-النشاطية الضد تأكسدية للبروبوليس:

4-3-1- القدرة على إزالة الجذور الحرة (باستعمال الجذر الحر DPPH):

تعتبر نشاطية إزالة الجذور الحرة للمادة المضادة للأكسدة أنها راجعة إلى قابليتها لمنح الهيدروجين، تم استعمال طريقة ترتكز على إرجاع DPPH (جذر حر مستقر) تتحدد بتغير في لونه من البنفسجي (الحالة الجذرية) إلى الأصفر (الحالة المستقرة) وفق المعادلة التالية:

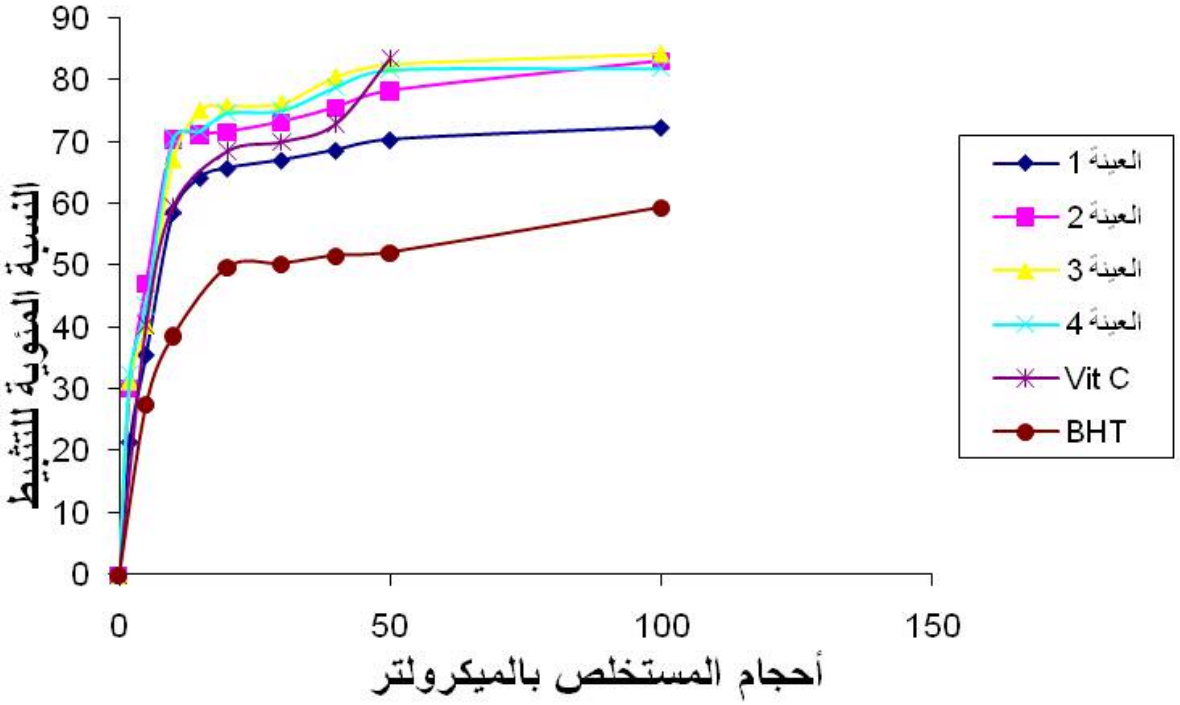
$$Z^* + AH \rightarrow ZH + A^*$$

حيث *Z هو جذر الـ DPPH و AH هو الجزيئة المعطية لذرة الهيدروجين.

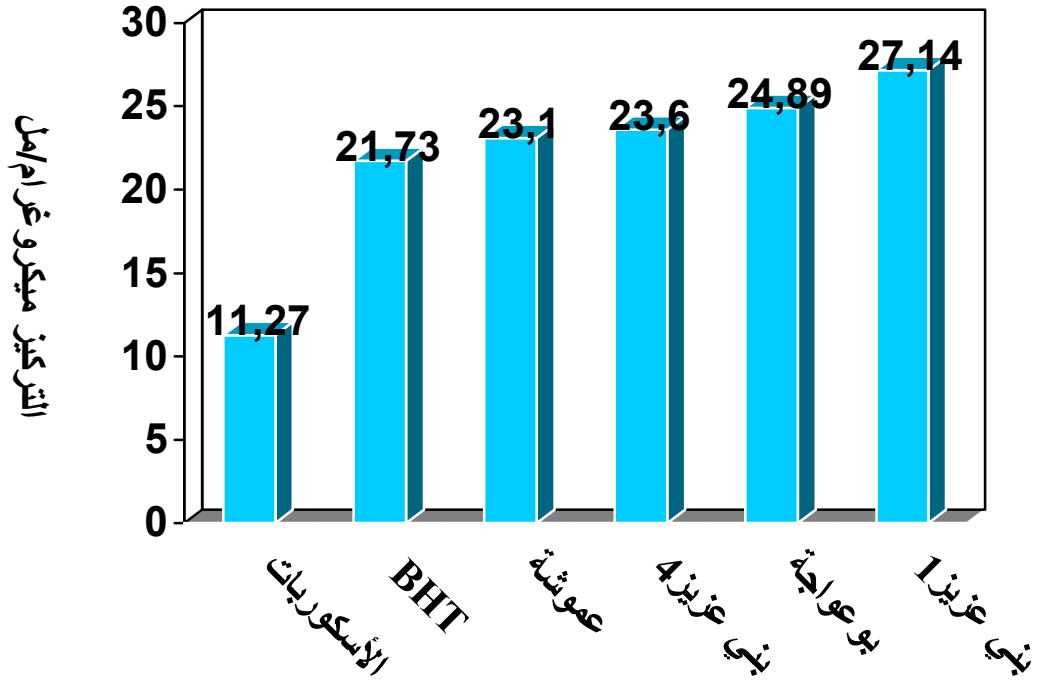
تم قياس الكثافة الضوئية لمحلول DPPH بإضافة تراكيز مختلفة من المستخلص الإيثانولي للبروبوليس ومن ثم حساب نسبة التثبيط مع كل تركيز مختبر حيث تم الحصول على منحنى تغيرات نسبة التثبيط بدلالة التراكيز المختلفة المختبرة (الشكل16)، انطلاقا من هذا الأخير تم استخراج منحنيات الميل لكل العينات المختبرة و التي مكنت من الحصول على المعادلات التي يحسب بواسطتها التركيز المثبط لـ 50% من الجذر الحرDPPH (الجدول 8) (الشكل17).

جدول، 8: التركيز المثبط ل50% من الجذر الحر DPPH (عدد المكررات 3).

المواد	ع1	ع2	ع3	ع4	الأسكوربات	**BHT**
CI_{50}	27.14	23.1	24.89	23.6	11.27	21.73



شكل، 16: النشاطية الضد تأكسدية لمختلف عينات البروبوليس، الأسكوربات و BHT.



شكل، 10: الـ IC_{50} لمختلف عينات البروبوليس، الأسكوربات و BHT.

المناقشة

1-5- الإستخلاص:

تم اختيار الإيثانول 70% كمذيب عضوي اعتمادا على دراسة Ikigaki و Park (1998) عل مدى تأثير مختلف المذيبات (الماء و تراكيز مختلفة من الإيثانول) على فعالية البروبوليس حيث تم الحصول على أكبر نسبة من الفلافونويدات باستعمال الإيثانول بين60 و 80 % و التي أعطت أكبر قوة تثبيطية لنمو الميكروبات.

هناك عدة طرق لاستخلاص البروبوليس و الحصول على المستخلص الإيثانولي منها الإذابة المباشرة بوضع البروبوليس الخام في الإيثانول و الرج المستمر لمدة معينة و هذه الطريقة هي الأكثر انتشارا، ومنها طريقة أخرى هي التي اعتمدنا عليها بتقسيم الإيثانول المستعمل على مرحلتين:

مرحلة أولى بالحضن ثلاثة أيام مع الرج (بمعدل 10د/يوم) ثم إستبدال الإيثانول.

مرحلة ثانية بالحضن لمدة يومين مع الرج (بمعدل 10د/يوم) و جمع الجزأين الطافيين، و قد أظهرت هذه الطريقة إيجابيتها من خلال مردودها، والذي قدر بـ32% بالنسبة للعينة (3)،و هو مردود جيد مقارنة بالنسبة 21% التي تحصل عليها Hegazi و Abd El-Hady (2002) من البروبوليس المجني من الإسماعيلية (منطقة1)، و مقارنة بـ 13% التي تحصلا عليه (2001) من البروبوليس المتحصل عليه من الفيوم، و 24% بالنسبة للبروبوليس المتحصل عليه من أسيوط، و 10% من البروبوليس المتحصل عليه من السوهاج (مصر).

إلا أن المردود المتحصل عليه بالنسبة لباقي العينات الذي تراوح بين 14.9 - 20.4% يعتبر قريبا من النسب التي تحصل عليها Hegazi و Abd El-Hady (2001،2002).

من جهة أخرى يعتبر أعلى مردود تحصلنا عليه هو 32% بالنسبة للعينة (2) مردود قليل مقارنة بالمردود 80% الذي تحصل عليه Hegazi و Abd El-Hady (2002) من بروبوليس الدخالية (Dakahlia)، و هذا الأخير يعتبر مردود جد جيد، و قليل أيضا مقارنة بـ 40% و33% واللذان تحصل عليهما من بروبوليس الشرقية و الإسماعيلية (منطقة 2) على الترتيب .

ومن هنا يمكن القول أن طريقة الإستخلاص على مرحلتين هي طريقة حسنة للحصول على مردود معتبر.

مما لاشك فيه أن الفروقات المسجلة بين عينة و أخرى تعود بالدرجة الأولى إلى نوعية البروبوليس المستعمل من حيث ضروف جنيه و مصدره النباتي (أي تركيبه).
حيث قارن Santos و آخرون (2003) بين نسب تواجد حبوب الطلع في البروبوليس البرازيلي المجني في كل من الفصلين الجاف و الممطر، فتحصل على 31 نوع من حبوب الطلع، إفرازات شعرية من أشجار(genus *Baccharis*) و جزيئات من قشور النباتات.

5-2- نشاطية المستخلص الإيثانولي المضادة للأحياء الدقيقة:

أدى المستخلص الإيثانولي للبروبوليس إلى تثبيط الأحياء الدقيقة المختبرة بنوعيها البكتيرية و الفطرية بشكل متفاوت.

5-2-1- النشاطية المضادة للأنواع البكتيرية:

درس الكثير من الباحثين النشاطية ضد ميكروبية للبروبوليس، بينما وجد البعض أن عينات البروبوليس نشطة ضد البكتيريا G^+ و بعض الفطريات فقد وجد آخرون نشاطية ضعيفة ضد البكتيريا G^- .
أثبت Uzel و آخرون (2005) أن لبكتيريا G^+ حساسية لتراكيز ضعيفة من البروبوليس، في حين يثبط نمو البكتيريا G^- في التراكيز العالية للبروبوليس فقط.
لم تسجل في هذه الدراسة أي حساسية مع الأنواع البكتيرية السالبة الغرام ما عدا البكتيريا *E.coli* التي كانت حساسة للمستخلص الإيثانولي و بشكل أقل بكثير من حساسيتها للمضاد الحيوي رغم التركيز المرتفع المستعمل 1650ميكروغرام /البئر.
أما تأثير المستخلص الإيثانولي على الأنواع السالبة الغرام الأخرى المختبرة و هي:
S. typhi, K. pneumoniae, Serratia spp, Citrobacter spp, Pseudomonas spp
فكان منعدما حيث أبدت جميع هذه الأنواع مقاومة كلية للمستخلص الإيثانولي للبروبوليس.
أما بالنسبة للأنواع الموجبة الغرام فسجل تثبيط معتبر على النوعين المختبرين هما *S.aureus* و *B.subtilus* إلا أنه يعتبر متوسط أو ضعيف مقارنة مع تأثير المضاد الحيوي.

بمقارنة النتائج المتحصل عليها باختبار نشاطية المستخلص الإيثانولي للبروبوليس المحلي من أربع مناطق مختلفة من منطقة سطيف مع دراسات أخرى، أستعمل فيها مستخلصات إيثانولية من عينات مختلفة المصدر من البروبوليس، نجد أن نتيجة التثبيط التي سجلناها متوافقة مع سجله Murat و آخرون (2003) مع *Pseudomonas* Spp و *K.peumoniae* حيث لم يسجل أي تأثير مع المستخلص الإيثانولي التركي مع هذين النوعين باستعمال نفس التركيز أما بالنسبة للنوعين *S.aureus* و *B.subtilus* فتعتبر الأقطار التي سجلناها ضعيفة بالمقارنة مع ما تحصل عليه إذا ما أخذنا بعين الإعتبار التركيز حيث تحصل على أقطار بين 9-11 ملم مع عينتين من البروبوليس التركي بالنسبة لكل من *S.aureus* و *B.subtilus* باستعمال التركيز 0.1 مغ/مل، و سجلنا أقطار بين 12-13.5مم بالنسبة لـ *S.aureus* و13-16.5ملم بالنسبة لـ *B.subtilus*مع تركيز مرتفع جدا للمستخلص الإثانولي للبروبوليس و هو 1.65مغ/ البئر.

أما Choi و آخرون (2006) فقد توافقت نتائجه باستعمال عينات من البروبوليس الكوري مع ما تحصلنا عليه بالنسبة للنوع *Pseudomonas* Spp حيث لم يلاحظ أي تأثير للمستخلص الإيثانولي للبروبوليس باستعمال التركيز 0.1 مع/مل. بينما تبدو النتائج التي تحصلنا عليها ضعيفة بالنسبة لـ *S.aureus* و *B.subtilus* حيث تحصل على أقطار بين 11.2-11.8ملم بالنسبة لـ *S.aureus* و بين 10- 12ملم بالنسبة لـ *B.subtilus* باستعمال تركيز أقل 16 مرة من تركيزنا المستعمل ليتحصل على نتائج مقاربة لما تحصلنا عليه.

و الملاحظ أن Choi و آخرون (2006) باستعمال البروبوليس الكوري حصل على مناطق تثبيطية مع *S.typhi* بين 10-12.1 ملم بينما لم نسجل أي تثبيط على هذه الأخيرة حتى باستعمال تركيز 1.65مغ/ البئر.

أكد اختبار تقدير التركيز الأدنى المثبط CMI و التركيز الأدنى القاتل CMB فعالية المستخلص الإيثانولي على الأحياء الدقيقة التي أبدت تجاوبا في طريقة الآبار و هي *E.coli* و *B.subtilus* و *S.aureus* و باختلاف واضح بين العينات الأربع، حيث تميزت العينة1 بقوتها و هذا من خلال تسجيل CMI و CMB 1.375مغ/مل مع النوعين *E.coli* و*B.subtilus* .

لوحظ وجود اختلاف في حساسية *E.coli* و *S.aureus* بالنسبة للعينة الأولى أثناء تقدير CMI و CMB مقارنة باختبار النشاطية التثبيطية، فبكتيريا *S.aureus* كانت أكثر حساسية من بكتيريا *E.coli* في اختبار النشاطية التثبيطية و العكس بالنسبة لاختبار CMI و CMB.

يعود السبب في ذلك حسب Rasooli (2000) إلى تأثير وسط الزرع على نشاطية العامل الضد ميكروبي (للمستخلص الإيثانولي للبروبوليس)؛ علما أن هذا التأثير يختلف بين الوسط الصلب و الوسط السائل. كما أن نتائج طريقة الإنتشار عبر الآغار تتأثر بالعديد من العوامل مثل الوزن الجزيئي للعامل الضد ميكروبي و نفاذيته داخل وسط الآغار.

تراوحت قيم CMI بالنسبة للأنواع المختبرة بين 1375 - 2500 ميكروغرام/مل مع اختلاف بين الأنواع و عينات البروبوليس.

تعتبر هذه القيم عالية إذا ما قورنت مع ما تحصلت عليه Silici و آخرون (2005) باستعمال البروبوليس من سلالات مختلفة من النحل و هو ما بين 117 و 234 µغ/مل مع الـ *S.aureus* ، و تعتبر القيمة التي تحصلنا عليها كبيرة جدا إذا ما قورنت مع ما تحصل عليه Uzel و آخرون (2005) حيث قدر CMI بين 8-16 µغ/ملل باستعمال عينات مختلفة من البروبوليس الأناضولي بالنسبة لـ *S.aureus* و بين 16 – 128غ/ملل بالنسبة لـ *E.coli* . أما بالنسبة لـ *B.subtilus* فسجل Mohammadzadeh و آخرون (2006) بالنسبة لـCMI مساو لـ 250 µغ/مل، كما سجل 500 µغ/مل مع *E.coli* و هما قيمتان صغيرتان جدا إذا ما قورنت مع ما تحصلنا عليه، إلا أن القيم التي تحصلنا عليها أفضل مما تحصل عليه Hegazi و Abd El Hady (2002) باستعمال عينات مختلفة من البروبوليس المصري مع كل من النوعين *S.aureus* و *E.coli* حيث سجل CMI بين 2600 و 5400 µغ/مل مع *S.aureus* و ما بين 1800 و 3200 µغ/مل مع *E.coli* على الترتيب و مقارنة مع ما تحصلت عليه Silici و آخرون (2005) أيضا مع *E.coli* فسجلت CMI بين 1875 و 3750 µغ/مل و CMB بين 1875 و 7500 µغ/مل أي حوالي 5 مرات CMB الذي تحصلنا عليه مع عينة بني عزيز1.

5-2-2- النشاطية المضادة للأنواع الفطرية:

أبدت كل الأنواع الفطرية المختبرة حساسية تجاه المستخلص الإيثانولي للبروبوليس و بدرجات متفاوتة تبعا لنوع العينة والتركيز المستعمل.

أظهر كل من *A.Niger* و *A.Fumigatus* حساسية واضحة بتفاوت طفيف بين عينات البروبوليس ثم يأتي في الأخير الفطر *A.Flavus* بتسجيل حساسية ضعيفة حتى مع رفع التركيز إلى 1650 µغ/البئر.

لم يتم إجراء أبحاث كثيرة على أعفان الـ *Aspergillus*؛ و بالتالي قد يصعب علينا مقارنة ما تحصلنا عليه بأبحاث أخرى قصد معرفة مدى قوة البروبوليس من مطقة سطيف.

إلا أن Hegazi و Abd El Hady (2002) ذكرا أنهما تحصلا على أقطار تثبيطية باستعمال عينات مختلفة من البروبوليس المصري وباستعمال طريقة الإنتشار على وسط الآغار ضد *A.flavus*، *A.niger*، *A.fumigatis*، *A.parasiticus* هي: 32 ، 26 ، 21 و 24ملم على الترتيب.

و من خلال مجموع الأبحاث القليلة على أعفان *Aspergillus* لاحظ كل من Mohammadzadeh و آخرون (2006) و Hegazi و Abd El Hady (2002) أن أعفان *Aspergillus* حساسة للمستخلص الإيثانولي للبروبوليس من خلال تسجيلهما لتركيز أدنى مثبط 500 µغ/مل و 1200 µغ/مل على الترتيب. كما تحصل Ghaly و آخرون (1998) على تأثير للبروبوليس بتركيز 1-4 غ/ل بخفضه للوزن الجاف لـ-*A.flavus* بنسبة ما بين 11-80%.

استعمل Pepeljnjak و آخرون (1982) تراكيز بين 15-30مغ/مل فثبطت نمو *A.flavus* و *A.ochraccus* وهي تراكيز كبيرة جدا إذا ما قورنت بأكبر تركيز قمنا باختباره و هو 1.65مغ/مل.

أرجع Mohammadzadeh و آخرون (2006) النشاطية الضد فطرية إلى وجود بعض الأحماض الأليفاتية و العطرية، Caffeate esters، و كميات كبيرة من الفلافانونات في البروبوليس الإيراني مقارنة بالبروبوليس المصري.

ذكر Cushni و Lamp (2005) أن *Galangin* و هو فلافونول متواجد بكثرة في عينات البروبوليس يملك نشاطية ضد الـ *Aspergillus*، و أنواع فطرية أخرى خاصة منها الفطريات الجلدية و خميرة الـ *Candida* بأنواعها. و بالتالي يمكن اعتبار البروبوليس كعلاج ناجح

للفطريات الجلدية باستعماله في شكل مرهم موضعي و هذا ما أثبتته Ota و آخرون (2000) باستعمال محلول كحولي للبروبوليس البرازيلي 6% كمحلول لمضمضة الفم مرتين في اليوم صباحا و مساءا قبل النوم مدة أسبوعين من طرف مرضى متطوعين (12 مريض) ظهرت عليهم أعراض التهاب الفم، فتحصلت على خفض لعدد خلايا خميرة *C.albican* بنسبة بين 30 و 95 % بعد أسبوعين من العلاج. تحصل Murat و آخرون (2003) على Caffeate esters من البروبوليس التركي من منطقة كازان بتركيا و أظهر أن النشاطية الضد ميكروبية للبروبوليس ترجع إلى وجود هذا المركب كما أثبت أن التركيب الكيميائي مرتبط مباشرة بإفرازات براعم شجر الحور، و هجائنه المحيطة بمنطقة كازان.

5-3- النشاطية المضادة للأكسدة:

إنطلاقا من النتائج المتحصل عليها تمكنا من حساب التراكيز التثبيطية لـ 50% (IC_{50}) للعينات الأربع و كذا لكل من BHT و Ascorbate.

تبين على ضوء هذه النتائج أن جميع المستخلصات الإيثانولية للعينات الأربع تملك نشاطية مضادة للأكسدة.

لوحظت أهم نشاطية مضادة للأكسدة مع عينة عموشة بتسجيل IC_{50} يساوي 23.5 µغ وهي قيمة أقل مما سجله Ahn و آخرون (2006) حيث سجل تثبيط في حدود 80% من الجذر الحر DPPH باستعمال البروبوليس الصيني منطقة (Hebei, Neimongol) بتركيز نهائي 20µغ/مل. حصل Kumazawa و آخرون (2004) باستعمال بروبوليس من بلدان مختلفة بتركيز نهائي 20 µغ /مل على تثبيط أكثر من 60% مع البروبوليس الأسترالي، الصيني، الهنغاري و النيوزلندي، و قد تميز البروبوليس الصيني بتسجيل تثبيط 80% باستعمال نفس التركيز.

و من جهة أخرى يعتبر ما تحصلنا عليه أكبر مما تحصل عليه كل من Ahn و آخرون (2006) وKumazawa و آخرون (2004) حيث سجلا قيما أقل من 45% (باستعمال تركيز 20µغ /ملل) مع بروبوليس صيني من كل من منطقتي Hainan و Gansu و من كل من جنوب إفريقيا، تايلند، الأوروغواي و أكرانيا، و يعتبر ما تحصلنا عليه قيمة جيدة إذا ما

قورنت مع ما Hegazi و Abd El Hady (2002) حيث تحصلا على تثبيط 15 و 13% فقط باستعمال البروبوليس المصري بتركيز10 µغ /ملل، بينما تحصلنا عند استعمال نفس التركيز على قيم تثبيطية بين 21.5 و 47.1% باختلاف العينات.

أرجع كل من Ahn و آخرون (2006) و Kumazawa و آخرون (2004) القدرة العالية على إزالة الجذر الحر DPPH إلى امتلاك هذه العينات لمحتوى عالي من المواد المضادة للأكسدة كحمض الكافييك، حمض الفيروليك و CAPE، كما بينوا أن العينات التي أبدت قدرة عالية على إزالة جذر DPPH أظهرت أيضا قدرة عالية مضادة للأكسدة باستعمال تقنية الـ β-Carotene .

مقارنة الـ CI_{50} لكل من العينات الأربع مع الشاهدين الإيجابيين الـ Ascorbate و BHT، وجد أن البروبوليس من منطقة سطيف ذو فعالية معتبرة نسبيا على إزالة الجذور الحرة.

يرجع الإختلاف في النتائج المتحصل عليها (خاصة في دراسة النشاطية الضد بكتيرية) إلى العينة المستعملة و درجة نقاوتها و مدى حداثتها حيث استعمل كل من Silici و آخرون (2005) و Mohammadzadeh و آخرون (2006) المصائد الخاصة بجمع البروبوليس و التي تسمح بالحصول على بروبوليس صافي بينما تحصلنا على البروبوليس بكشط الإطارات الشمعية و صناديق النحل و هذا يوضح مدى الاختلاف في نقاوت العينات من جهة، و من جهة أخرى تمكن مصائد البروبوليس من الحصول على بروبوليس حديث الجني بينما لا تسمح طريقتنا بضبط هذا الأخير.

كما تعتبر المناطق التي تحصلنا على عيناتنا الأربع منها مناطق ضعيفة الغطاء النباتي، خاصة أذا ما قورنت بمناطق أخرى كالمناطق الإستوائية و المدارية كالبرازيل و التايوان و الصين و غيرها ممن تميزت عيناتها بالقوة الواضحة و الفعالية الجيدة.

أما عن العينة3 و هي من منطقة بوعواجة (مدينة سطيف) و هي منطقة شبه عمرانية فتميزت بضعفها مقارنة بالعينات الأخرى لضعف غطائها النباتي أكثر من المناطق الأخرى.

الخاتمة:

أعطى استخلاص البروبوليس بواسطة الإذابة في الإيثانول مردودا متوسطا رغم التفاوت في نوعية البروبوليس و الإختلاف في الجودة و النقاوة.

بينت دراسة النشاطية التثبيطية للمستخلص الإيثانولي على الأحياء الدقيقة، مجال النشاط الواسع لهذا المستخلص؛ حيث أنه أدى إلى تثبيط أنواع بكتيرية و أخرى فطرية ذات أهمية طبية و اقتصادية.

نتائج التثبيط التي تحصل عليها مع الأحياء الدقيقة بالأخص مع الأنواع البكتيرية الموجبة الغرام و الأعفان، تطرح بقوة إمكانية استعمال هذا المستخلص كعلاج للكثير من الإصابات الميكروبية، كما أن تثبيط المستخلص الإيثانولي لبعض الأنواع المتسببة في إفساد الأغذية و/أو إحداث التسمم الغذائي، و القدرة العالية على إزالة الجذور الحرة التي أظهرها تجعل من البروبوليس مادة ذات مكانة كبيرة في حفظ بعض الأغذية خاصة و أنه يكسبها نكهة مميزة و يزيد من قيمتها الغذائية؛ لا سيما أن مواد الحفظ الكيميائية المستعملة لهذا الغرض تسبب الكثير من الأخطار على صحة الإنسان.

رغم أن التطبيق الفعلي للبروبوليس أو مستخلصه الإيثانولي أو المائي بدأ فعلا في شتى الميادين خاصة الطبية و التجميلية و أن آثاره الجانبية تعتبر ضعيفة أو منعدمة إلا أنه بحاجة إلى مزيد من الأبحاث و الدراسات خاصة بالنسبة للبروبوليس الجزائري و الذي لم تمكن هذه الدراسة من معرفة قيمته الحقيقية بسبب محدودية الإمكانيات سواء في الجني أو في الإختبار قصد تحسين استعماله و معرفة المجالات التي يمكن أن يؤثر فيها و تعميم الدراسات على الإنسان إن أمكن.

كما تتطلب معرفة قيمة البروبوليس الجزائري دراسة تركيبه الكيميائي و معرفة المركبات الفعالة و علاقتها بالباتات المحيطة بمنطقة الجني.

الملخص:

البروبوليسس هو المادة الصمغية التي تجمعها شغالات النحل من مصادر نباتية مختلفة.
و قد عرف بخصائصه البيولوجية منها ضد بكتيرية، ضد فطرية، الضد تأكسدية و خصائص علاجية أخرى. اختبرت هذه الدراسة النشاطية الضد ميكروبية و النشاطية الضد تأكسدية لأربع عينات من مناطق مختلفة من ولاية سطيف: بني عزيز1، عموشة، بو عواجة (قجال)، بني عزيز2.تم تحضير المستخلص الإيثانولي للبروبوليس (EEP) و اختبار تأثيره على نمو الميكروبات (البكتيريا و الفطريات).استعمل من أجل دراسة النشاطية الضد ميكروبية طريقة الإنتشار بالأقراص و الآبار، كما قدر التركيز الأدنى المثبط CMI و الركيز الأدنى القاتل CMB(بالنسبة للبكتيريا). أفضل قيمة CMI و CMB تم تسجيلها مع العينة1و هي:1.375مغ/مل مع كل من *B.subtilus* و *E.coli*.

كما قدرت النشاطية الضد تأكسدية للـ EEP للعينات الأربع أيضا من خلال تقدير إزالة الجذر الحر DPPH.أبدت كل العينات نشاطية ضد تأكسدية قوية نسبيا بالمقارنة مع ابحاث أخرى بتسجيل أفضل IC_{50} يساوي 23.5 µغ مع عينة عموشة.

Abstract

Propolis is a resinous substance collected by honeybees from various plant sources.It is known for its biological properties, like antibacterial, antifungal, antioxidant and other healing properties. This study examined the antimicrobial activity and antioxidant activity of four different samples of propolis from various areas of Setif: Beni azize 1, Amoucha, Bouaouaja (Guedjel) and Beni azize 2.

Ethanol extracts of propolis (EEP) were prepared and examined for their inhibition effects on microorganisms (bacteria and fungi).The disc and well diffusion method were used For the antimicrobial activity assay (for bacteria and fungi).Wherease, minimum and bactericidale inhibitory concentrations (MIC,MBC) were determined for bacteria only.The MIC and MBC values of the most effective propolis (Amoucha) were 1.375 mg/ml for *B.subtilus* and *E.coli*. (EEP) of the four samples were evaluated for their antioxidant activities by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical-scavenging. All propolis samples had relatively strong antioxidant activity by the comparison withe other researches.The best IC50 is 23.5µg with amoucha sample.

المراجع باللغة العربية:

-أحمد عصام عبد الوهاب.1986، المدخل لدراسة علم الحشرات، عالم الكتب- القاهرة- ص: 37.

-أمون ريفيس روت و آخرون، موسوعة نحل العسل، ترجمة: دريد نوايا 1997.

ط 2003، مجد المؤسسة الجامعية للدراسات و النشر و التوزيع.ص:419-423.

-عارف سالم حمزة. 1998، تربية النحل و منتجات الخلية و التغذية و العلاج،

منشورات دار علاء الدين-دمشق- ص: 48-76.

-عبد الحميد عبد السلام أرحيم.2001، عسل النحل فوائد واستخدامات.

منشأة المعارف بالإسكندرية، ص: 33-36.

المراجع باللغة الأجنبية:

- Ahn, M.R., Kumazawa, S., Usui, Y.,Nakamura, J.,Matsuka, M.,Zhu, M Nakayama, T.(2007). Antioxidant activity and constituent propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*,**101**,1383-1392.

-**Aisling-Aherne,S.,and Brien, N.M.**(2002). Dirtary, flavonolos: Chemistry, food conent and metabolism. *The Journal of Nutrision **18**, 75*-81.

-Alarcon de la lastra, C., Martin, M . J., Lacasa, , C. and Motilva,V .(1994). Antiulcergenicity of the flavonoid fraction from *Bidens aurea L* : comparison with ranitidine and omprazole. *Journal of Ethnopharmacolog* **42**(3), 161-168.

-**Alexandrakis. M. Singh, L., Boucher, W., Letourneau R, Theoflopoulos, P. and Theoharides, T.C.**(1999). Differential effects of flavonoids on inhibition of secretion and on accumulation of secretory granules in rat basophilic leukaemia cells. *International Journal Immunopharmacology* **21**, 379-390.

-Amoros M, Simoes CM, Girre L, Sauvager F, Cormier M. (1992). Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplexvirus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *J Nat Prod* **55**(12): 1732-40.

-Amoros M, Lurton E, Boustie J, Girre L, Sauvager F, Cormier M. (1994). Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. . *J Nat Prod* **57**(5): 644-7.

-**Aruoma, O.I.** (1997). Extracts as antioxidants prophylactic agents.*Informatic* **8**,1236-1242.

-**Aruoma, O.I.** (1998). Freeradicals, oxidative stressand antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Chemical Society* **75**,199.

-**Bankova V, Popov S, Marekov N, Manolova N.**(1988). The chemical composition of propolis fractions with antiviral action.*Acta Microbiol Bulg* **23**, 52-7.

-**Basta, G., Schmidt, A.M.and DeCaterina, R.**(2004). Advanced glication end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes . *Curdiovascular Research Center Bulletin* **63**,582-592.

-Belaiche, S. and March, Y. (1997). Les dermatoses allergiques professionnelle. *Revue Francaise D' allergologie* **37**, 943-946.

-**Beyer G and Melzig MF**. (2005). Effect of propolis on hypoxanthine-xanthine oxidase-induced toxicity.Biol Pharm Bull., **28**(7):1183-6.

-**Borreli F, Izzo AA, Maffia P, Mascolo N.** (2002). Effect of a propolis extract and caffeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon. *Fitoterapia*, **73** Suppl 1:S38-43.

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

-**Bruneton, J.** (1993). Composès phénolique shikimat-acetates Pharmacognosie: phytochimie, Plants médicinales Technique et Documontation-Lvoisier (Paris): Chap3: 199-383.

-**Chen, J., H,J. ; Hamm, L., Vatuman, V, and Whelton, P.K.** (2002). Serum antioxidant vitamins and blood pressure in the United States population. *Hypertention* **40**, 810-860.

-**Chia-Nana C, Chia-Lib W, Jen-Kuna L.** (2004). propolin C from propolis induces apoptosis through activating caspases, Bib and cytochrome C release in human melanoma cells. *Biochem pharmacol* **67**, 53-66.

-**Clark,S.F.**(2002). The biochemistry of . antioxidants revisited. *Nutrition in Clinial Practice* **17**, 5-17.

-**Clarkson, P.M., and Thompson, H.S**.(2000). Antioxidants:What role do they play in physical activity and health. *The American Journal of Clinical Nutrition. 72*,637-646.

-**Cohen, A. B., Chenoweth , D. E. and Hugli, T. E.** (1982). The rlease of elastase, myeloperoxidase, and lysozyme from human alveolar macrophages. *The American Review of Respiratory Disease*, 126-241.

-**Dalton, T.P., Shertzer,H.G.and Puga ,A.** (1999). Regulation of gene expression by reactive oxygen.Annual. *Review of pharmacology and Toxicology* **39**, 67-101.

-**Davies.M.J., Dean,R.T.** (Eds),(1997). The pathology of protein oxidation,Radical-Mediated Protein Oxidation , Oxford Science Publications Oxford,PP. 203-237.

-**Debiaggi M, Tateo F, Pagani L, Luini M, Romero E**. (1990). Effect of propolis flavonoids on virus infectivity and replication .*Microbiologica* **13**(3), 207-13.

-**De Groot, H. and Rauen, U.** (1998). Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of Flavonoids . *Fundam Clin Pharmacol* **13**(3), 249-255.

-**De Souza, R.F. V. and De Giovani , W.F.** (2004). Antioxidant properties of complexies of flavonoids with metal ions .*Redox Report* **9**, 97-104.
- **Demo, A ., Petrakis, C. H., Kefalas, P., and Boskou, D.** (1998). Nutrient antioxidants in some herbs and Mediterranean plant leaves. *Food Research International* **32**, 351-354.

-**Di Carlo, G., Mascolo, N., Lzzo, A. A. and Capasso, F.** (1999). Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Science* **65** (4) ,337-353.

- **Doshi, S. N., McDowel, L. F. W., Moat, S. j., Newcomb, R.G. Kredan, M. B., Lewis, M. J. and Goodfellow; j**. (2001). Folate improvise endothelial function in cornary artery disease an effect mediated by reduction of intracellular superoxide. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. **21**, 1196-1202.

-**Droge, W.**(2002). Freeradicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* **82**, 47-95.

-**Dugas, A.J., Castaneda-Acosta.J., Bonin. G.C., Price. K. L., Fichier. N.H and Wiston, G.W.** (2000). Evaluayion of the total peroxyl radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relaioship. *Journal of Natural Product* **63**.327-331.

-**El-Khawaga OA, Salem TA, Elshal MF**. (2003). protective role of Egyptian propolis against tumor in mice. *Clin Chim Acta* , 338(1-2): 11-6.

-**Firuzi, O., Mladenka, P., Petrucci, R.,. Marrosu, G. and Saso, L.** (2004). Hypochlorite scavenging activity of flavonoids. *Journal of Pharmacology* **56**,801-807.

-**Forkmann, G.** (1993). Boisynthesis and biodegradation of polyphenols .in "polyphenolic phenpmena ".*ED.scalbert A.INRA(Paris);*chap. 265-271.

-**Fujiki, H., Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, E., Suga, K.,Lmai, K., Nakachi, K. and Kimura,S**..(1999).Mechaistic findings of green tea as cancer preventive for humans.Proceedings *Society of Experimental Biology and Medicine* 220,225-228.

-**Furuno, K., Akasako, T. and Sugihhara, N.** (2002). The contribution of pyrogallol moity to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids. *Biologiocal Pharmacology Bulletin* **25** (1),19-23.

-**Garcia-Estrada ,j., Gonzalez-Perez, O., Gonzalez-Castenada, R. E., Martinez-Contreras, A., Luquin, S.and Garzon-delaMora, P**.(2003).An alpha-lipoic acid-Vitamin Emixture reduces postembolism lipid peroxidation cerebral infarction, and neurologicaldeficit in rata. *Journal of neuroscience research* **47** (2), 213-9-224.

-**Garcia-Viguera, C. Brudelle, P., Ferreres, F., Tomas-Barburan.,F. A.** (1994). Influence of variety maturity and processing on phenolic compounds of apricot juices and jams. *ZLebensm Unters Forsch* **199** , 433-436.

-**Ghizalberti EI**. (1978). Propolis a Review, Bee Wopld.

-**Goodyear-Bruch. C. and Pierce. J. D.** (2002). Oxidative stress in critically ill patients. *American journal Critique Care* **11**,543-551.

- **Gupta, S., Ahmad, N., Nieminen, A.L. and Mukhtar, H.** (2000). Growth inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by green tea constituent(-)-epigallocatechin-3-gallate in androgen-sensitive and androgen-insensitive human prostate carcinoma cells. *Toxicology and applied pharmacology* **164**, 82-90.

-Gutteridge, J. M. C. and M ITCHELL, J. (1999). Redox imbalance in the critically ill. *Briish Medical Bulletin* **55**(1),49-75.

-Haenen, G. R., Paquay, J.B., Korthouwer, R. E. and Bast, A. (1997). Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **236**, 591-593.

-Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrilion Reviws* **52**, 253-265.

-Halliwell, B. and Gutteridge,J.M.C..*(1999).*Anti oxidant defenses in free radicals In: Biology and medicine third Ed Oxford university press new york p 175.

-Hana, B., Hana, P., Slanina, j., Musil, P.and Tborska, E. (2003). Main flavonoids in the root of Scutellaria baicalensis cultivated I, europ and their comparative antiradical Properties *phytotherapy Research* **17**, 640-644.

-Hanasaki, Y., Ogawa,S.and Fukui, S. (1994).The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free radical Biology and Medecine* **16**, 845-850.

-Harbone, J. B. (1994). Phenolics in natural products:their chemistry and biological significance."Eds.MannJ. Davidson RS,Hobbs JB. Longman (London), chap 6:361-388.

-Harper,K.A.,Morton, A. D. and Rolfe, F.J. (1969). The phenolic compounds of black currant juice and their protective effect on ascorbic acid. *Journal of Food and Technology* **4**,255.

-Haslam, E. (1993). Epolyphenol compllexation in"polyphenolic phenomena'ED Selabert A.INRA (Paris) chap2,23-31.

-Hàslam,E. and Lilley , T.H. (1988). Natural astringency in foodstuffs a molecular interpretation .*Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **27**(1).1-4.

-Hausen.B M,Wollenweber E,Senff H,Post B. (1987).Propolis allergy-originproperties usage and literature. *review contact dermatitis* **17**.p:163-170.

-Havsteen, B. (1983). Flavonoids, A classof natural priducts of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol*:**32**: 617-624.

-Havsteen, BH. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* **96**(2-3):67-202.

-Hodek, A., Trefil, P.and Stiborova, M. (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P 450. *Chemico-Biological Interactions* **139**,1-21.

-Hollman,P.C.H.,Katan, M.B. (1998). Bioavaibility and health effects of dietary Flavonolos in man. *Archives of Toxicology*. (suppl. 20), 237-248.

-**Hughes, R. E., and Wilson, H.K**.(1977). Flavonoids: Some physiological and nutritional consideration. *Progress in Medicine §Chemistry* **14**, 285-301.

-Huleihel M, Isanu V. (2002). Anti-herpes simplex virus effect of an aqueous extract of propolis. *Irs Med Assoc J*, (11Suppl): 923-7.

-**Hussain, S.P., Hofseth, L.J. and Harris, C.C**.(2003). Radical causes of cancer. *Nature Publishing Group* **3**, 276-285.

-**Inci, E., Civelek, S., Seven, A., Inci, F., Korkut, N., and Burcak, G.** (2003). Laryngeal cancer: in relation to oxidative stress. *The Tohoku Journal of experimental medicine* **200**,17-23.

-**Ishige, K., Schubert, D.And Sagara, Y**.(2001). Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *FreeRadicals Biology §Medicine* **30** (4),433-446.

- Junko I, Fang-Rong C, Hui-Kang W, Yon kun P, Masaharu I, Nikole K and Kuo-Hsiung L.(2001). Anti-AIDS Agents.48. Anti-HIV Activity of Moronic Acid Derivatives and the New *.J. Nat. Prod.*,,64,(10),pp 1278-1281.

-Kimoto T, Aria S and Kohguchi M. (1998). Apoptosis and suppression of tumor growth by artepillin C extracted from Brazilian propolis . *Cancer Detection and prevention*, **22**; 15-506.

- **Krell R** (1996). value-added products from beekeeping FAO AGRICULTURAL SERVICES BULLETIN No. 124 Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome.

-Kuhn, M. A. (2003).Oxygen free radicals antioxidants. *American Journal of Nursing.* **103** (4), 58-62.
-Kuhnau, J. (1976). The flavonoids: a class semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Review of Nutrition & Diet* **24**, 117-191.

-Lehucher-michel, M.P., Lesgards, J.F., Dlubac, O., Stocker, P., Prost, M. (2001). Stress oxidant et patologies humaines Bilan et perspectives preventives. *Presse Medicale* **30**, 1076-1081.

-Markham, K.R. (1982). Techniques of flavonoid identification Academic Press(London) Chapl et 2 : 1-113.

-Martinez-Florez, S., Gonzalez-Gallgo, J., Culebars, J. M. and Tunon, M.J. (2002) Flavonoids : properties and anti-oxidizing action. *Nutrition Hospitalaria* **17**(6), 271-278.

- McCord, J. M. (1985). Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New England Journal of the Medicin* **312**, 159-163.

-McCord, J. M. (2000). The evolution of free radicals and oxidativesterss.*The American Journal of Medicine* **312**, 159-163.

-Mc Dermontt, J. H. (2000). Anti oxidant nutrionts: current dietary recomondation and researche update. *Journal of the American pharmacists. Association* **40** (6), 785-799.

-Mirzoeva O.K., and Calder, P.C. (1996). The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. **55**(6).p:441-449.

-Middleton, E., and Kandaswami, C. (1992). Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell function.*Biochemistry and Pharmacology* **43**, 1167-1197.

-**Middleton, Z., and Drzewieeki. G**.(1993). Ascorbic acid protects against flavonoid oxidation: A possible mechanism of augmented flavonoid effects (Abstract). *The Journal of allergy and clinical immunology* **91**,301.

-Middleton, E., and Kandaswami, C.Theoharides, T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation. Heart disease, and cancer. *Pharmacology Reviews* , 673-751.

-Miller, M. J., Sadowska, K.H., Chotinaruemol, S., Kakkis, J.L., Clark, D.A.(1992) amelioration ofchronic ileteitis by nitric oxide synthase inhibition. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **264**,11-16.

-Miller, A. L., (1996). Antioxidant flavonoids: structure, function and clinical usage. Alt *Medicine Reviews* (2), 103-111.

-Morton, L.W.,Abu-Amsha, C. R., Puddey ,I. B., Croft , K. D. (2000).chemistry and biological effects of dietary phenilic compounds: Relevance to cardiovascular disease. *Clinical and experimental pharmacology* **27**,152-159.

-Mohammadzadeh, S.,Shariatpanahi, M.,Hamedi, M.,Ahmadkhaniha, R.,Samadi, N., Ostad, S. N. (2007). Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food Chemistry* **103**, 1097-1103.

-Murakami, S., Muramatsu, M., and Otomo, S. (1992). Inhibitory effect of tannic acid on gastric H', K'-ATPase.*Journal of Natural Product* **55** (4), 513-516.

-Ong KC and Khoo H-E. (1996). Insulinomimetic effects of myricetin on lipogenesis and glucose transport in rat adipocytes but not glucose transporter relocation. *Biochemistry and pharmacology* **51**, 423-429.

-Orsolic N, Sver L, Terzic S, Tadic Z, Basic I. (2003). Inhibitory effect of water-soluble derivative of propolis and its poliphenolic compounds on tumor growth and metastasizing ability: a possible mode of antitumor action. *Department of animal Phisiology*, **47**(2): 63-156.

-Orsolic N, Basic L. (2005). Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis . *Departement of animal Physiology*, **59**(10):70-561.

-Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto, F. (2000).Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **48**, 3396-3402.

-Rice-Evans , C. A., Miller , N.J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M. and Pridham, J.B .(1995). The relative antioxidant activites of plant-derived poly phnolic flavonoids. *Free Radical* .**22** , 375-383.

-Race-Evants, C. A. and Packer L. (1998). *Flavonoids in Health and Disease*. Marcel Dekker, Inc., New York.

-Robak, J. and Gryglewski, R. J. (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem pharmacol* **37**, 837-841.

-Resenson, R. S. (2004) Statins in atherosclerosis: lipid-lowering agents withantioxidant capabilites.*Atherosclerosis* **173**, 1-12.

-Ross, D. and Moldeus, p. (1977). Antioxidant defense systems and oxidative stress .in Vigo-pelfry ,C, ed.superoxide and superoxide Dismutase .New York: Acadimic press , 19-60.

-Ruiz, C.M, and Gomes J. C. (2000).Effects of ethanol acetaldehyde and asetic acid on histamine secretion in guinea pig hing mast cell. *Alcohol* **20**.p:133-138.

-Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Sorrenti. V., Di Giacoma, C., Vvirgata, G., Barcellona M.L.and Vanella, A. (2000). Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biology and Toxicology* **16** (2), 91-8.

-Salama, A., and Mueller-Eckhardt, C. Cianidanoland its membolites bind tightly to red cells and are responsible for the production of auto-and or drugdependent antibodies against these cells. *British Journal of Haematology* **66**, 263-266.

-Schroeter, H., Spencer, J.P.E., Rice-Evans. C. and Williams, R.J.(2001). Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-inducedapoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *Biocheistry Journal*. **358**, 547-557.

-Sen, C. k . (1995). Oxidants and antioxidants in exercise. *Journal of Applied Physiology* **79**, 675-686.

-Shackelford, R. E., Kaufm , W. K., Paules, R. S. (2000). *Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. Free Radicals Biology and Medicin* **28**, 1387-1404.

- **Strehl E, Volpert R, and Elstnez E.F.**(1994) Biochemical Activities of propolis extract. Inhibition of DHR. In Z. Naturforsch.,**49**(1-2).pp.39-43.

-Su ZZ, Lin J, Grunberger D, Fisher PB. (1994). Growth suppression and toxicity induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in type 5 adenovirus-transformed rat embryo cells correlate directly with transformation progression. *Cancer Res*. **54**(7): 1865-70.

-Till, G. O., Friedl, H. P. and Ward, P. A. (1991). Lung injury and complement activation :role of neutrophils and xanthin oxidase. *Free Radical Biology and Medicine* **10**, 379-386.

-Touyz, R.M. and Schiffrin, E. L. (2004). Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertention. Histochem. *Cell Biology*. Online first article, DOI/ 10.1007/s00418-004-0696-7.

-Van Acker, S. A. B. E., van den Berg, D. J., Tromp, M. N. J. L., Griffioen, D. H., van Bennekom, W.P., van der Vijgh, W. J. F., bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical and Biological Midicine*, **20**, 331-492.

- Van Acker, S. A. B. E., van Balen, G. P. and Van der Vijgh, W.J.F.(1998) .Influence of Iron Chelation on the Antioxidant Activity of Flavonoids. *Biochemical Pharmacology* **56**, 935-943.

-**Ververidis, F., Trantas, E., Douglas, C., Vollmer, G., Kretzschmar, G., Panopoulos, N.** (2007). "Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health". *Biotechnology Journal* **2** (10).

-Walker and Crane. (1987). Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. **55**, 70-75.

-Xu, H.X., Wan, M., Dong, H. But, P. P. H. and Food, L. Y.(2000). Inhibitory activity of flavonoids and tannins against HIV-I protease. *Biological Pharmacology Bulletin* **23,** 1072-1076.

-Zhu, X., Raina, A. K., Lee, H., Casadesus, G., Smith, M. A. and Perry, G. (2004). Oxidative stress signalling in Alzheimer Ts disease. *Brain Research*.**1000**, 32-39.