الجمهورية العربية السورية
جامعة دمشق
كلية العلوم
قسم علم الحياة النباتية

مقارنة مورفولوجية وكيميائية لأنواع جنس الحندقوق .*Melilotus* Mill من الكومارينات والفلافونات وتقييم نشاطها الحيوي

أطروحة مقدمة لنيل درجة الدكتوراه في العلوم–علم الحياة النباتية

إعداد الطالبة

ميس محسن معروف

إشراف

الدكتورة جورجيت بابوجيان
أستاذ في قسم علم الحياة النباتية
كلية العلوم – جامعة دمشق

الدكتور نزار عيسى
أستاذ مساعد في قسم علم الحياة الحيوانية
كلية العلوم – جامعة دمشق

الجمهورية العربية السورية / جامعة دمشق
كلية العلوم / قسم علم الحياة النباتية

قرار لجنة الحكم على بحث طالبة الدكتوراه ميس محسن معروف

استناداً إلى اللائحة التنفيذية لقانون تنظيم الجامعات الصادرة بالمرسوم الجمهوري رقم /250/ لعام 2006، وقرار مجلس جامعة دمشق رقم 2411/15 ص تاريخ 2022/05/10 بشأن إجراءات القيد والمناقشة العلنية ومنح الدرجات العلمية في جامعة دمشق، وقرار مجلس جامعة دمشق رقم /1751/ ص.م تاريخ 23 أيار 2019 بشأن الموافقة على تسجيل بحث الدكتوراه للسيدة ميس محسن معروف لنيل درجة الدكتوراه في علم الحياة النباتية بعنوان:

مقارنة مورفولوجية وكيميائية لأنواع جنس الحندقوق *Melilotus* Mill. من الكومارينات والفلافونات وتقييم نشاطها الحيوي

وتسمية أ. د. جورجيت بابوجيان مشرفاً ومشاركة أ. م. د. نزار عيسى، واستناداً إلى أحكام المادتين 163 و 164 من اللائحة التنفيذية لقانون تنظيم الجامعات الصادرة بالمرسوم الجمهوري رقم /250/ تاريخ 2006/7/10، وإشارةً إلى قرار مجلس الجامعة رقم 2411/15 ص تاريخ 2022/05/10 واقتراح تشكيل لجنة الحكم والمصادق عليه بقرار مجلس البحث العلمي والدراسات العليا رقم /2134/ م. ب. د المتخذ في الجلسة رقم /15/ المنعقدة بتاريخ 2025/4/7، المتضمن تشكيل لجنة الحكم من السادة:

الدكتورة جورجيت بابوجيان :	**أستاذ في قسم علم الحياة النباتية / جامعة دمشق**	**عضواً ومشرفاً**
الدكتور عدنان اختيار :	**مدير بحوث في هيئة الطاقة الذرية**	**عضواً**
الدكتورة منال داغستاني :	**أستاذ مساعد في قسم الكيمياء / جامعة دمشق**	**عضواً**
الدكتورة ميساء الجودة :	**مدرس في قسم علم الحياة النباتية / جامعة دمشق**	**عضواً**
الدكتورة أحلام معروف :	**مدرس في قسم علم الحياة النباتية / جامعة دمشق**	**عضواً**

اجتمعت لجنة الحكم في جلسة علنية لمناقشة بحث الدكتوراه الذي تقدمت به طالبة الدكتوراه ميس محسن معروف في الساعة 12 ظهراً من يوم الثلاثاء الموافق 2025/4/29 وبعد الاستماع إلى دفاع الطالبة والمناقشة التي تمت، أوصت **اللجنة بما يلي:**

1- قبول الأطروحة والحكم على أهلية الطالبة ميس معروف لنيل درجة الدكتوراه في علم الحياة النباتية (بعد إجراء التعديلات) باختصاص علم الحياة النباتية وفق التوزيع التالي:

أعضاء اللجنة	توزيع الدرجة				
	تقييم الأطروحة 45 درجة	مجريات الدفاع 45 درجة	المجموع 90 درجة	أعمال مميزة 10 درجات	الدرجة النهائية من 100
الأستاذة الدكتورة جورجيت بابوجيان	44	44	88	3	88
الأستاذ الدكتور عدنان اختيار	40	42	82		
الأستاذ المساعد الدكتورة منال داغستاني	40	42	82		
المدرس الدكتورة ميساء الجودة	42	43	85		
المدرس الدكتورة أحلام معروف	44	44	88		
متوسط المجموع	42	43	85		

وبذلك تُمنح الطالبة ميس محسن معروف درجة الدكتوراه بعد المناقشة العلنية بتقدير امتياز **وعلامة قدرها** 88 ثمان وثمانون

دمشق في 29 نيسان 2025

أعضاء لجنة الحكم

أ. د. جورجيت بابوجيان	**أ. د. عدنان اختيار**	**أ.م.د. منال داغستاني**	**د. ميساء الجودة**	**د. أحلام معروف**

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة دمشق – كلية العلوم
قسم علم الحياة النباتية

إقرار لجنة الحكم

نشهد نحن أعضاء لجنة الحكم أننا اطلعنا على أطروحة الدكتوراه المحكمة بتاريخ 2025/4/29 للطالبة ميس معروف والتي تحمل العنوان:

مقارنة مورفولوجية وكيميائية لأنواع جنس الحندقوق ***Melilotus*** **Mill.** من الكومارينات والفلافونات وتقييم نشاطها الحيوي

Morphological and Chemical Comparison of *Melilotus* Mill. Species of Coumarins and Flavonoids Evaluation of Their Biological Activity

وناقشنا الطالبة في محتوياتها، وفيما له علاقة بها، ونرى أنها جديرة بالقبول لنيل درجة الدكتوراه في علم الحياة النباتية.

أ.د. جورجيت بابوجيان

أ.د. عدنان اختيار

أ.م. د. منال داغستاني

د. ميساء الجودة

د. أحلام معروف

وزاؤة التعليم العالي
جامعة دمشق–كلية العلوم
قسم علم الحياة النباتية

Ministry of High Edication
Damascus University-faculty of sciences
Departement of plant biology

إقرار المشرفين

نشهد أن إعداد هذه الأطروحة والتي تحمل العنوان:

مقارنة مورفولوجية وكيميائية لأنواع جنس الحندقوق *Melilotus* Mill. من الكومارينات والفلافونات وتقييم نشاطها الحيوي

Morphological and Chemical Comparison of *Melilotus* Mill. Species of Coumarins and Flavonoids Evaluation of Their Biological Activity

قد جرى بإشرافنا نحن **أ.د. جورجيت بابوجيان** (أستاذ في قسم علم الحياة النباتية– كلية العلوم– جامعة دمشق) كمشرف رئيس، **ود. نزار عيسى** (أستاذ مساعد في فيم علم الحياة الحيوانية–كلية العلوم–جامعة دمشق)كمشرف مشارك، وقد تم تدقيق الأطروحة علمياً ولغوياً.

المشرف الرئيس

أ.د.جورجيت بابوجيان



المشرف المشارك

أ.م.د نزار عيسى



Ministry of Higher Education
Damascus University-faculty of science
Departement of plant biology

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة دمشق-كلية العلوم
قسم علم الحياة النباتية

أشهد أن أطروحة الدكتوراه بعنوان والتي تحمل العنوان:

مقارنة مورفولوجية وكيميائية لأنواع جنس الحندقوق *Melilotus* Mill. من الكومارينات والفلافونات وتقييم نشاطها الحيوي

Morphological and Chemical Comparison of *Melilotus Mill.* Species of Coumarins and Flavonoids Evaluation of Their Biological Activity

لم يسبق أن لأي شهادة، ولم يقدم حالياً لأي شهادة أخرى.

الباحثة ميس محسن معروف

شكر وامتنان

الحمد لله أولًا وآخراً، ظاهرًا وباطنًا، الذي أنعم عليّ وأكرمني بتمام هذه المسيرة العلمية، له الفضل وحده في أن وفقني لاجتياز مرحلة الدكتوراه بعد جهدٍ وعناء، أسأله تعالى أن يبارك في هذا الجهد، ويجعله خالصًا لوجهه الكريم.

بعد أن تكللت مسيرتي العلمية بثمرةٍ غالية في طريقٍ شاق امتلأ بالجهد والعزيمة، وجب أن أرفع أسمى عبارات الشكر والامتنان لكل من كان سببًا في بث النور والأمل في دربي، ولكل من منحني الثقة في أوقات الضيق والعناء.

إلى **الأستاذة الدكتورة جورجيت بابوجيان** بكلماتٍ يملؤها الحب والاحترام والامتنان، أتوجّه بخالص الشكر والتقدير إليك، التي كانت لي نورًا يهدي خطاي، وسندًا يمدّني بالقوة والعزيمة. لقد غرستِ في نفسي الثقة، وأحطتني برعايتكِ وتوجيهاتكِ السديدة، فلكِ مني كل الوفاء والامتنان على ما أوليتني من وقتٍ وجهدٍ وعطاء بكل مشاعر الوفاء والعرفان.

وبكل ما يحمله القلب من تقدير واحترام، أتوجّه إلى أستاذي الكريم ومشرفي القدير **الأستاذ الدكتور نزار عيسى** الذي كان نبراسًا أستنير به في مسيرتي، وركيزةً أستمد منها العزم والثقة. فجزاه الله عني خير الجزاء على ما قدّمه من دعمٍ وتوجيهٍ ورعاية كريمة طوال فترة الدراسة.

أتقدّم بخالص الشكر وعظيم التقدير إلى أعضاء لجنة الحكم الموقّرة المتمثلة **أ.د جورجيت بابوجيان، أ.د. عدنان اختيار**،**أ.م.د منال داغستاني، د. ميساء الجودة، د.أحلام معروف** على ما بذلوه من وقتٍ وجهدٍ كريم في مناقشة هذا العمل، وعلى ملاحظاتهم القيّمة وتوجيهاتهم السديدة التي كانت زاداً علميًّا ومعرفيًّا أثمنه بكل الامتنان والعرفان.

أتوجّه بخالص الشكر وعظيم الامتنان إلى عمادة كلية العلوم، ممثلةً بالدكتور **حمود عرابي**، وإلى قسم علم الحياة النباتية ممثلًا **بالدكتور سهيل نادر**، وجميع العاملين فيه، لما هيّأوه لي من بيئة علمية، والتي أسهمت في.

كما يطيب لي أن أخص بالشكر كلًّا من **الدكتورة لينا الأمير**، والأستاذ **عامر أنجق** من هيئة التقانة الحيوية، والدكتور **عدنان اختيار**، والدكتورة **منال داغستاني**، لما قدّموه من دعم وتعاون كريم، كان له الأثر البالغ في إنجاز هذا البحث والوصول إلى هذه المرحلة العلمية.

لكم أصدقاء الدرب: **د. ريم العطار، الانسة نور خالد، د. ناديا خضر د. خالد رمضان، د. لمى شبيب**، وإلى **جميع زملائي وأصدقائي طلاب الدراسات العليا** في قسم علم الحياة النباتية لقد كنتم بحق شركاء حقيقيين في هذه الرحلة، نتقاسم صعوباتها وتحدياتها كما نتقاسم لحظات الفرح والإنجاز. كان تعاونكم ومؤازرتكم نورًا يبدّد وعورة الطريق، وقوةً جعلت من هذه المرحلة الصعبة مسارًا ممكنًا وخصبًا بالنجاح.

إهداء

إلى العينين اللتين أنارتا حياتي بمحبة لا تنضب وعطاء لا ينتهي، إلى من اتشحت بالصبر الجميل، وغرست في داخلي أن سرّ الحياة يكمن في الإيمان والثبات... إلى قلبٍ لا يعرف سوى الرحمة والبذل، أمي الحبيبة **ملك معروف**، لك أهدي أصدق الامتنان وأعمق المحبة والتقدير.

وإلى الروح الطاهرة التي علمتني أن القيم والأخلاق هي الجذور التي يقوم عليها كل بناء، إلى من زرع في داخلي الإصرار واليقين، وستظل صورته وذكراه شعاعًا يضيء طريقي أبد الدهر، والدي الغالي **محسن معروف**.

إلى زوجي العزيز، رفيق دربي وملاذ قلبي، الذي كان سندي في كل محطة، فكان لصبره وثقته وتشجيعه اليد البيضاء في أن يصبح الحلم حقيقة، أهديك ثمرة هذا الجهد، مع محبتي وتقديري العميق **إباء محمد**.

إلى أخي الغالي، الذي علّمني كيف يكون العطاء بلا انتظار، وشاركني في دروب البحث وجمع العينات، وثق بقدرتي قبل أن أثق بنفسي، إلى **غياث معروف**، لك أقدم هذا الإنجاز الذي أراه ثمرة إخلاصنا المشترك، مع محبتي وامتناني.

إلى إخوتي ..... السند الذي منحني الأمان، والقلوب التي غمرتني حباً ودعماً لا ينتهي... لم تبخلوا يوماً بعونٍ أو مساعدة، فكنتم الركيزة التي استندت إليها في رحلتي. إن فخري بكم لا يقل عن فخري بإنجازي، بل إن نجاحي ما هو إلا انعكاس لوجودكم إلى جانبي. لكم يا **غيداء، سهير، محمد، صفاء** كل المحبة والاعتزاز والتقدير.

وإلى الصديقة البعيدة القريبة من القلب، الوفية في ودّها، الصادقة في حضورها، التي كانت سندًا في الفرح كما في الحزن، وبقيت أختًا بروحها وصدقها، أهديك هذا العمل مع شكري العميق وامتناني الصادق، صديقتي **سالي وانلي**.

الفهرس

العنوان	الصفحة
الملخص	1
المقدمة	3
مشكلة البحث **Resarch Problem**	5
تساؤلات البحث **Questions**	**6**
فرضيات البحث **Research Assumes**	6
أهداف البحث **Objective**	6
أهمية البحث**Research Importance**	7
مبررات البحث **Research Justifications**	8
محدوديات البحث **Research Limitations**	8
الفصل الأول الدراسة المرجعية	9
1-الحندقوق ***Melilotus*** **Mill, sweet clover** 1-1 الوصف والتصنيف العلمي	10
1-2 المحتوى الكيميائي للحندقوق	12
1-2-1 الفينولات	13
1-2-2 الكومارينات	13
1-2-3 الفلافونوئيدات	13
1-2-4 الصابونينات والتربينوئيدات	14
1-2-5 مركبات أخرى	14
1-3 الكومارينات وأهميتها الحيوية	16
1-4 الفلافونوئيدات وأهميتها الحيوية	19
1-5 أنزيم أكزانتين أوكسيداز **(Ecl.17.3.2)**	23
1-5-1 أهمية أنزيم **Xanthine Oxidase**	24
1-6 تعريف السرطان ومميزات الخلايا السرطانية	26
1-6-1 أنواع الخلايا السرطانية	27
1-6-2 أنواع الموت الخلوي	28
1-6-3 سرطان عنق الرحم وطرق علاجه	30
1-7 التقانات المستخدمة في فصل المركبات الفينولية 1-7-1 تقانة **DiTLC** لتحديد الكمي للكومارين في المستخلصات المختلفة	32
1-7-2 تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الدقة **HPLC**لفصل المركبات الفينولية	33

1-8 طرائق الكشف عن السمية الخلوية للمستخلص الإيتانولي على خلايا سرطان عنق الرحم	**33**
1-8-1 الكشف عن السمية الخلوية باختبار **XTT**	**33**
1-8-2 القياس الخلوي بالتدفق	34
1-8-3- تحليل الدارة الخلوية	34
الفصل الثاني: المواد وطرائق البحث	36
2-1 المواد الكيميائية المستعملة والأجهزة المستخدمة	37
2-2 طرائق البحث 2-2-1 الاعتيان	40
2-2-2 الصفات الشكلية للأنواع المدروسة والتحليل العنقودي للخصائص المورفولوجية	41
2-2-3 دراسة مورفولوجيا البذور	42
2-2-4 الدراسة التشريحية 2-2-4-1 تشريح الزهرة	42
2-2-4-2 دراسة المسام	42
2-2-4-3 الدراسة التشريحية للساق والأوراق	42
2-3 تحضير المستخلصات النباتية	43
2-4 طرائق الكشف الكيفي عن المستقلبات الثانوية في المستخلصات النباتية قبل التبخير	43
2-4-1 الكشف عن الفلافونوئيدات	43
2-4-2 الكشف عن القلويدات	43
2-4-3 الكشف عن التانينات (المواد القابضة)	43
2-4-4 الكشف عن الكومارينات	44
2-4-5 الكشف عن الصابونينات	44
2-4-6 الكشف عن الصابونوزئيدات	44
2-4-7 الكشف عن التربينات الثنائية **Diterpenoids**	44
2-4-8 الكشف التربينوئيدات الثلاثية	44
2-4-9 الكشف عن الستيروئيدات والتربينات الثلاثية	44
2-4-10 الكشف عن الغليكوزيدات القلبية	45
2-4-11 الكشف عن الكربوهيدارت	45
2-5 التقدير الكمي للمركبات الفينولية في السمتخلصات 2-5-1 تعيين المحتوى الكلي للفينولات للأنواع في المستخلصات المختلفة	45
2-5-2 تعيين المحتوى الكلي للفلافونوئيدات للأنواع في المستخلصات	46
2-5-3 تحديد الكمي للكومارين في الأنواع المدروسة في المستخلصات المختلفة بتقانة **DiTLC**	47

2-5-4 التحديد الكمي لبعض المركبات الفينولية في المستخلص الإيتانولي70%باستخدام **HPLC**	48
2-6 اختبار فعالية المستخلصات على تثبيط الجذور الحرة	50
2-6-1 باستخدام **DPPH**	
2-6-2 باستخدام تثبيط الجذر الحر **ABTS**	51
2-7 عزل الكومارين وتنقيته	52
2-8 دراسة فعالية يعض المستخلصات في تثبيط أنزيم **Xanthine Oxidaise**	52
2-8-1 الكشف عن شوارد **superoxide ($O^{\cdot +}$)**	54
2-9 دراسة السمية الخلوية على خط سرطان عنق الرحم **Hela**	55
2-9-1 طرائق القياس الخلوي بالتدفق **Flow Sytomry**	55
2-9-1-1 تحليل الدراة الخلوية	
2-9-1-2 دراسة الموت الخلوي المبرمج باستعمال **Annexin/pi**	56
2-10 الدراسة الإحصائية	57
الفصل الثالث: النتائج والمناقشة والدراسة الإحصائية	58
3-1 نتائج الدراسة المورفولوجية الدقيقة	59
3-1-1 وصف العام للأنواع	
3-1-1-1 ***Melilotus indicus* (L.) All.**	
3-1-1-2 ***Melilotus sulcatus* Dsef.**	60
3-1-1-3 ***Melilotus albus* Medik.**	60
3-1-1-4 ***Melilotus officinalis* (L.) Lam.**	61
3-1-1-5 ***Melilotus segetalis* (Bort.) Ser.**	62
3-1-2 نتائج دراسة مورفولوجيا الأذنات والأوراق	63
3-1-3 نتائج دراسة مورفولوجيا النورات والأزهار	67
3-1-4 نتائج دراسة مورفولوجيا القرون	69
3-1-5 نتائج دراسة مورفولوجيا البذور	72
3-1-6 نتائج التحليل العنقودي وشجرة القرابة المعتمدة على الخصائص المورفولوجية للأنواع المدروسة	73
3-1-7 الدليل التصنيفي الحقلي	77
3-2 الدراسة التشريحية للأنواع	78
3-2-1 الدراسة التشريحية للزهرة	
3-2-2 دراسة المسام	80
3-2-2-1 التحليل الإحصائي لقياسات المسام في البشرة السفلية من الوريقة	82

3-2-3 نتائج الدراسة التشريحية 3-2-3-1 نتائج دراسة المقاطع العرضية في الساق	84
3-2-3-2 نتائج دراسة المقاطع العرضية في الورقة	88
3-2-3-3 التحليل الاحصائي للدراسة التشريحية لطبقات منطقة النتوءات في الساق	91
3-2-4 الدليل التصنيفي التشريحي	91
3-3 الدراسة الكيميائية للأنواع 3-3-1 تعيين مردود الاستخلاص	92
3-3-2 نتائج الكشف الكيفي عن المستقلبات الثانوية في المستخلصات المختلفة	94
3-3-3 نتائج المحتوى الكلي من الفينولات **TP**	96
3-3-4 نتائج المحتوى الكلي من الفلافونوئيدات **TF**	99
3-3-5 نتائج قدرة المستخلصات على تثبيط **$DPPH^{\cdot}$**	103
3-3-6 نتائج قدرة المستخلصات على تثبيط **$ABTS^{\cdot+}$**	113
3-3-7 التحديد الكمي للكومارين في الخلاصات المختلفة بطريقة **DiTLC**	120
3-3-8 عزل الكومارين واستخلاصه بطريقة **TLC**	123
3-3-8-1 التأكد من نقاوة العزل بتقانة **HPLC**	124
3-3-9 نتائج تحديد هوية بعض المركبات الفينولية والفلافونوئيدية بواسطة **HPLC**	124
3-4 نتائج فعالية بعض مستخلصات أنواع الحندقوق في تثبيط نشاط أنزيم **XO**	129
3-4-1 نتائج دراسة شوارد **Superoxide** التفاعل التثبيطي لأنزيم **XO**	134
3-4-2 نتائج الدراسة الإحصائية لمعامل الارتباط بيرسون بين قدرة المستخلصات على تثبيط نشاط **XO** وقدرتها على تثبيط إنتاج شوارد **Superoxide**	137
3-5 نتائج دراسة السمية الخلوية للمستخلص الإيتانولي 70% على الخلايا السرطانية لعنق الرحم **Hela** بطريقة **XTT**	137
3-6 نتائج التدفق الخلوي 3-6-1 نتائج تحليل الدارة الخلوية	141
3-6-2 نتائج اختبار **Aennexin v/PI** لتقدير الموت الخلوي **Apoptosis**	142
الاستنتاجات	147
التوصيات	149
المراجع	151
الملخص باللغة الإنكليزية	171

فهرس الأشكال

الشكل 1. الصيغة الكيميائية للكومارين البسيط	17
الشكل 2. الصيغ الكيميائية لبعض أنواع الكومارين الطبيعية	18
الشكل 3. الصيغة العامة للفلافونوئيدات	20
الشكل 4. الصيغة الكيميائية لأنواع الفلافونوئيدات	21
الشكل 5. تفاعل تحويل الهيبوكسانتين إلى حمض البول	23
الشكل 6. تغيرات الخلايا من الطبيعية إلى السرطانية	27
الشكل 7. آلية الموت المبرمج بمساره الخارجي والداخلي	29
الشكل 8. السلسلة العيارية لحمض الغاليك	46
الشكل 9. السلسلة العيارية للكيرستين	46
الشكل 10. السلسلة العيارية للكومارين	47
الشكل 11. المظهر العام لنوع ***M.indicus***	59
الشكل 12. المظهر العام لنوع ***M.sulcatus***	60
الشكل13. المظهر العام النوع ***M.albus***	61
الشكل 14. المظهر العام لنوع **M.officinalis**	61
الشكل 15. المظهر العام لنوع **M.segetalis**	62
الشكل 16. الشكل العام للأوراق والتسنن في حافة الورقة وشكل الأذنات للأنواع المدروسة	64
الشكل 17. الشكل العام للنورات والاختلافات بين الأنواع	67
الشكل 18. الشكل العام للعناقيد بين الأنواع	70
الشكل 19. صورة لأشكال القرون وتجاعيدها	71
الشكل 20. صورة للبذور للأنواع المدروسة تحت المكبرة **40X**	72
الشكل 21. شجرة القرابة المبنية على الصفات المورفولوجية لأنواع المدروسة	76
الشكل 22. أجزاء التويج لكل نوع	79
الشكل 23. الأنماط المختلفة للثغور في الأنواع المدروسة	80
الشكل 24. اختلافات متوسط طول ومتوسط أبعاد المسام	82
الشكل 25. البنية النسيجية في المقاطع العرضية في ساق الأنواع المدروسة	84
الشكل 26. المقاطع العرضية في الوريقة لكل الأنواع بتكبير **400x,200x**	89
الشكل 27. النسبة المئوية لمردود الاستخلاص للأنواع في المذيبات المختلفة	92
الشكل 28. المحتوى الكلي الفينولي في الخلاصات المختلفة للأنواع	97

الشكل 29. المحتوى الفلافونوئيدي للأنواع المختلفة	99
الشكل 30. تغير قدرة المستخلصات على تثبيط $DPPH^+$ بتغير تراكيز المستخلص المائي	103
الشكل 31. تغير قدرة المستخلصات على تثبيط $DPPH^+$ بتغيرتراكيز المستخلص الميتانولي	105
الشكل 32. تغيرقدرة المستخلصات على تثبيط$DPPH^+$ بتغيرتراكيز المستخلص الإيتانولي	107
الشكل 33. قيم **IC50%** لحمض الاسكوربيك مقارنة بالأنواع في الخلاصات المختلفة باختبار $DPPH^+$	110
الشكل 34. تغير القدرة على تثبيط $ABTS^{\cdot+}$ مع تغير التراكيز في المستخلص المائي	113
الشكل 35. تغير القدرة على تثبيط $ABTS^{\cdot+}$ مع تغير التراكيز في المستخلص الميتانولي	115
الشكل 36. تغير القدرة على تثبيط $ABTS^{\cdot+}$ مع تغير التراكيز في المستخلص الإيتانولي70	115
الشكل 37. قيم **ic50%** لحمض الاسكوربيك وأنواع الحندقوق في المستخلصات	117
الشكل 38. صورة لشريحة **TLC** توضح للكومارين في الأنواع في المذيبات المختلفة	119
الشكل 39. تركيز الكومارين في الأنواع في المستخلصات المختلفة	119
الشكل 40. تحديد وعزل الكومارين من السمتخلص المائي والإيتانولي لنوع ***M.indicus***	122
الشكل 41. كروماتوغرام المركب العياري للكومارين ب **HPLC** عند زمن احتفاظ 21.8	122
الشكل 42. كروماتوغرام المركب المعزول من المستخلص الإيتانولية 70%عند زمن احتفاظ 21.7	123
الشكل 43. كروماتوغرامات المركبات العيارية مع زمن الاحتفاظ لكل مركب	123
الشكل 44. كروماتوغرامات لمستخلصات الإيتانولية 70% لأنواع **Melilotus**	124
الشكل 45.مقارنة تراكيز المركبات الفينولية مقدرة **mg/100g E** في المستخلص الايتانولي لكل نوع	126
الشكل 46. قيم **IC50%** للمستخلصات الميتانولية والإيتانولية 70% على تثبيط نشاط أنزيم **XO**	128
الشكل 47. قيم **IC50%** لتثبيط إنتاج شوارد **Superoxide**	133
الشكل 48. صورة للوحة 96 بئر قبل وبعد المعالجة بتراكيز مختلفة من المستخلص النوعين لخلايا **Hela**	136
الشكل 49. تغير نسبة العيوشية لخلايا **Hela** مع تغير تراكيز مستخلص للنوعين	137
الشكل 50. مخطط لتأثير تغير التراكيز للنوعين على أطوار الدراة الخلوية	140
الشكل 51. تمثيل نقطي لنسب الخلايا الحية والميتة تحت تأثير تغير التراكيز للنوعين مقارنة بالشاهد	141
الشكل 52. مخطط يمثل الارتباط بين أطوار الدراة الخلوية ونسب **PCD** تبعا لتغير تراكيز النوعين	144

الجدول 1. المواد الكيميائية المستخدمة	37
الجدول 2. الأجهزة والأدوات المستخدمة	39
الجدول 3. المواقع التي جمعت الأنواع منها	40
الجدول 4. الأنواع النباتية ومناطق جمعها ورمزها بقاعدة البيانات	41
الجدول 5. النظام الزمني المتدرج لـ**HPLC**	49
الجدول 6. شروط تحليل **HPLC**	49
الجدول 7. زمن احتباس المركبات العيارية بتحليل **HPLC**	**50**
الجدول 8. الإحصاءات القياسية للوريقات الجانبية والوسطى ومعيلق الوريقة الوسطى	66
الجدول 9. القياسات الإحصائية للأزهار	69
الجدول 10. الاختلافات الشكلية بين القرون للأنواع المدروسة	69
الجدول 11. القيم والقياسات الإحصائية للقرون	71
الجدول 12. الاختلافات الشكلية واللونية بين قرون الأنواع المدروسة	73
الجدول 13. قاعدة البيانات وتشمل الصفات المختلفة بين الأنواع المدروسة	73
الجدول 14. نتائج التحليل العنقودي باستخدام برنامج **MVSP.3.2**	76
الجدول 15. الاختلافات بين أجزاء التويج للأنواع المدروسة	79
الجدول 16. أنماط الثغور وشكل جدران الخلايا المجاورة في الأنواع	81
الجدول 17. الإحصاءات الوصفية لتباين تعداد وأبعاد الثغور لدى الأنواع	82
الجدول 18. التحليل الاحصائي **ANOVA** العدد وأبعاد المسام بين الأنواع	83
الجدول19. الاختلافات التشريحية في الطبقات المؤلفة لمقطع عرضي في سيقان الأنواع المدروسة	87
الجدول 20. الاختلافات التشريحية لمقطع عرضي للوريقة الوسطى لدى الأنواع	88
الجدول 21. الإحصاءات الوصفية لطبقات المؤلفة لمنطقة النتوءات في مقطع عرضي للساق	91
الجدول 22. نتائج اختبارات الكشف الكيفي للمستقلبات الثانوية في المستخلصات النباتية	94
الجدول 23:اختبار **LSD** بين متوسطات امتصاصية المستخلصات وتأثيرها على المحتوى الكلي للفينولات	96
الجدول 24. تراكيز المحتوى الكلي للفينولات مقدرة **mgG/g**	98
الجدول 25. اختبار **LSD** بين متوسطات امتصاصية المستخلصات وتاثيرها على المحتوى الكلي للفلافونوئيدات	100
الجدول 26. اختبار **LSD** بين متوسطات امتصاصية الأنواع واختلاف المحتوى الكلي للفلافونوئيدات	100
الجدول 27. تراكيز المحتوى الكلي للفلافونوئيدات في المستخلصات مقدرة **mgQ/g**	101
الجدول 28 **اختبار LSDبين متوسطات امتصاصية تثبيط الجذور الحرة لاختبار DPPH للأنواع**	106
الجدول 29 النسب المئوية للتثبيط المتغيرة تبعا لتراكيز الأنواع في المستخلصات المختلفة باختبار **DPPH**	109
الجدول 30. النسب المئوية للتثبيط المتغيرة تبعا لتراكيز المستخلصات المختلفة للأنواع باختبار**ABTS**	116

الجدول 31. تراكيز التقريبية للمركبات التي تم تحديدها في أنواع الحندقوق بتقانة **HPLC**	126
الجدول 32 قيم التركيز الأعظمي لتثبيط 50% من نشاط أنزيم **XO** للمستخلصات	129
الجدول 33 اختبار **LSD** بين متوسطات امتصاصية تراكيز المستخلص الميتانولي للأنواع في نسبة تثبيط انزيم **XO**	130
الجدول 34 اختبار **LSD** بين متوسطات امتصاصية تراكيز المستخلص الإيتانولي 70% للأنواع	130
الجدول 35 اختبار **LSD** بين متوسطات امتصاصية تراكيز المستخلص الميتانولي للأنواع كمضاد تأكسد لشوارد **superoxide**	134
الجدول 36 اختبار **LSD** بين متوسطات امتصاصية تراكيز المستخلص الإيتانولي 70% للأنواع كمضاد تأكسد لشوارد **superoxide**	134
الجدول 37. تغير **PCD%** تبعا لتغير التراكيز النوعين مقارنة بالشاهد	143

قائمة الاختصارات

الاختصار	المقابل باللغة الإنكليزية	المقابل باللغة العربية
ABTS	**Azino – bis (3- ethyl – '2 ,2) (– benzoline 6- sulfonic acid)**	**2**-أزينو–بيس 3– إيتيـل بنزولين— 6 , 2' حمض السلفونيك
DPPH	**2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl**	**2**ثنائي فينيل – 1– بكريل هيد ا رزيل
XO	**Xanthine Oxidaise**	أنزيم اكزانتين أوكسيداز
PCD	**Programmed cell death**	الموت المبرمج
XTT	**2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide**	**2,3-**ثنائي (2–ميثوكسي–4–نيترو–5–سلفوفينيل)–2-**H**تترازوليوم–5–كربوكسانيليد
DMSO	**Dimethyl sulfoxide**	ثنائي ميتيل السلفوكسيد
TF	**Total flavonoids**	الفلافونوئيدات الكلية
TP	**Total phenols**	الفينولات الكلية
HPLC	**High-Performance Liquid Chromatography**	الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء
TLC	**Thin Layer Chromatography**	الكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة
Di-TLC	**Digital Thin-Layer Chromatography (Digital TLC)**	الكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة الرقمية
PI	**Propidium iodide**	يوديد البروبيديوم
IC50	**Half-maximal inhibitory concentration**	تركيز المادة الموافق للتثبيط النصفي
APG	**Angiosperm Phylogeny Group**	التصنيف السلالي لمجموعة مغلفات البذور
mgQ/g	**milligrams of quercetin equivalents per gram of extract**	ملغ مكافئ كيرسيتين في غرام من المستخلص
CVD	**Cardiovascular Disease**	أمراض القلب والأوعية الدموية
ADP	**Adenosine Diphosphate**	أدينوزين ثنائي الفوسفات
ROS	**Reactive Oxygen Species**	إنتاج الجذور الحرة
COPD	**Chronic Obstructive Pulmonary Disease**	مرض الانسداد الرئوي المزمن
mg/co E	**milligrams of coumarin per gram of extract**	ملغ من الكومارين في غرام من المستخلص
HPTLC	**High-Performance Thin-Layer Chromatography**	**الكروماتوغرافيا الطبقية الرقيقة عالية الأداء**
MLD	**Manual Lymphatic Drainage**	التصريف اللمفاوي اليدوي
CEMO	**Coumarin extrct Melilotus Officinalis**	مستخلص الكومارين للحندقوق الطبي
NAD^+	**Nicotinamide Adenine Dinucleotide**	ثنائي نوكليوتيد الأدينين والنيكوتيناميد

الملخص

تضمنت هذه الدراسة تحليل الخصائص الميكرومورفولوجية والتشريحية والكيميائية لخمسة أنواع من جنس الحندقوق (إكليل الملك/ البرسيم الحلو)).***Melilotus* Mill**، التي جُمعت من بيئات طبيعية في سورية خلال الأعوام 2020–2022. والأنواع المدروسة هي:

***Melilotus.indicus* (L.), *M.sulcatus* Desf, *M.albus* Medik., *M.officinalis* (L.)Pal., *M.segetalis* (Brot.) ser.**

أُجري توصيف مورفولوجي لصفات الأوراق، الأزهار، القرون، والبذور باستخدام القطاعات العشوائية، حُللت 49 صفة نوعية لمعرفة شجرة القرابة باستعمال **MVSP 3.2.**، ثم كُشف عن المستقلبات الثانوية في المستخلصات (المائية، الميتانولية، والإيتانولية 70%) وقُيس المحتوى الكلي للفينولات والفلافونوئيدات، ثم حُسب تركيز الكومارين وعزله و تنقيته واختبرت نقاوة عزله باستعمال **HPLC**، اختبرت الفعالية المضادة للتأكسد باستعمال اختبارات **DPPH**، **ABTS**، والسمية الخلوية لنمو خلايا سرطان عنق الرحم باستخدام **XTT**، و**Annexin/PI**، وقد أُختبرت فعالية مستخلصات بعض الأنواع في تثبيط أنزيم **XO**.

فُصلت الأنواع المدروسة إلى عنقودين باستخدام التحليل العنقودي: الأول ضم ***Melilotus officinalis*** و***Melilotus albus***، والثاني ضم ***Melilotus segetalis***، ***Melilotus sulcatus***، ***Melilotus indicus***.

لوحظ ازدياد في عدد طبقات الدعامية في الساق لدى***M. segetalis*** ، بينما تميز ***M. indicus*** بأكثر عدد في الثغور.

و تميزت بذرة ***M. albus*** بنقير شديد التقعر على شكل **L**، وقد لوحظ اختلافات في الدراسة التشريحية للوريقات من حيث عدد طبقات النسيج المتوسط وكثافة الأوبار بين الأنواع.

بين الكشف الكيفي عن المستقلبات الثانوية غنى المستخلص الميتانولي، كما سجل ***M. albus*** أعلى محتوى من الفينولات، في حين سجل ***M. indicus*** أعلى قدرة في تثبيط الجذر $DPPH^{\cdot}$، بينما سجل ***M. sulcatus*** أعلى فعالية لثبيط الجذر الكايتوني **ABTS**.

احتوى المستخلص الإيتانولي70% لـ ***M. officinalis*** على التركيز الأعلى للكومارين بين مستخلصات الأنواع المدروسة بتقانة **Di-TLC**، كما كُشف عن غناه بالمركبات الفينولية باستعمال **HPLC**، وحقق المستخلص الميتانولي لنوع ***M.albus*** الفعالية الأعلى في تثبيط أنزيم اكزانتين أوكسيداز **XO** ، كما أظهر مستخلصه الإيتانولي 70% الفعالية الأكبر تجاه نمو خلايا سرطان عنق الرحم **(Hela).**

الكلمات المفتاحية: الحندقوق، دراسة الميكرومورفولوجية، الكشف الكيفي، الدراسة التشريحية، المحتوى الكلي للفينولات، المحتوى الكلي للفلافوئيدات، **ABTS**، **DPPH**، الكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة المحسنة رقمياً، الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء، أنزيم اكزانتين أوكسيداز، السمية الخلوية لسرطان عنق الرحم.

المقدمة**Introduction**

تعد سورية مركزاً غنياً بالتنوع الحيوي النباتي، بحكم تميزها بالمناخ المتوسطي والإيراني التوراني، حيث احتلت فيها بعض الفصائل المرتبة الأولى من حيث الانتشار والتنوع كالفصيلة الكلئية (Poaceae) والفصيلة الفولية(**Fabaceae**)، وهذا ما أكده التقرير الوطني الخامس لاتفاقية التنوع الحيوي، 2016 التي أشارت إلى أن الفلورا السورية تضم عمايزيد 3300 نوعاً من النباتات الوعائية، حيث عدد أنواع عريانات البذور 12 نوعاً، ومغلفات البذور 3270 نوعاً، منها 402 نوعاً و50 جنساً يعود إلى الفصيلة الفولية.

تعزى أهمية الفصيلة الفولية لوجود العقد الآزوتية التي تتوضع على جذورها والتي تعمل على تثبيت الآزوت في التربة من الغلاف الجوي وبذلك تقلل من تكاليف الأسمدة للمزارعين، ولاحتواء بذور البقوليات وأوراقها على كمية عالية من البروتينات مقارنة بباقي الأنواع، كما تقوم بعض نباتات هذه الفصيلة بإعادة توزيع المياه في التربة التي تدعى الرفع الهيدروليكي (Sprent,2009)، كما تستخدم بعض محاصيلها كأعلاف للحيوانات بالإضافة إلى استخداماتها الواسعة في الغذاء مثل الفول والبازلاء والفاصولياء والخرنوب والصويا (Kurlowich,1995)، كما تستخدم بعض نباتاتها كمصادر مهمة لإنتاج العسل والرحيق مثل البرسيم الحلو الأصفر والأبيض(Oratel 1967). بالإضافة إلى إنتاج بعض نباتاتها الصمغ الذي يدخل في تركيب بعض مستحضرات التجميل والأدوية لمعالجة السعال والالتهابات اللثة، وأيضا في إنتاج بعض أنواع الأصبغة كالأصبغة الحمراء والأرجوانية من نبات***Pithecellobium dulce* (Roxb.)benth**.

ينتمي الحندقوق أو إكليل الملك، أو البرسيم الحلو ***Melilotus* Mill.** إلى الفصيلة الفولية، يعرف هذا الجنس بأنه نبات عطري لاحتوائه على الكومارين في خلايا أنسجته، ينتشر في الوقت الحالي في كافة أنحاء العالم، وهو من أصل أوراسي (أوروبا، آسيا)، ويعتبر من الأنواع الغازية التي تتمتع بالقدرة الكبيرة على التكيف البيئي ولاسيما الترب المالحة والمشبعة بالمياه، الامر الذي يسمح له بالانتشار على مساحات واسعة من الأراضي المزروعة والمعالجة (Rorers *et al.,* 2008, Alsharif 2009,Ted 2013)، كذلك يتميز بقدرته على تثبيت الآزوت في التربة

ولامتيازها بوجود عقد آزوتية على جذورها، بالإضافة إلى عمق جذورها الذي يمكنه النمو في الترب الرملية وتثبيتها (Yuan *et al.,* 2008).

يبلغ عدد أنواع الحندقوق من 27 نوعاً تنتشر في أنحاء العالم عموماً وفي منطقة البحر الأبيض المتوسط خصوصاً (Hoppy 1975,Jastor 2024)، منها 7 أنواع منتشرة في سورية حسب موتيرد (Mouterde,1986)، تتميز أنواع الحندقوق بأنها أعشاب حولية أو ثنائية الحول أو معمرة لدى بعضها، الأوراق ريشية ثلاثية الوريقات، مسننة بشكل كامل أو من الأعلى فقط وتامة بسيطة من الأسفل في بعض الأنواع يوجد أذنات تامة أو مسننة، تجتمع الأزهار الفراشية على شكل نورات، تستطيل عند الإثمار في بعض الأنواع؛ الكأس قصير، يتألف خمسة سبلات ملتحمة من الأسفل ومنفصلة من الأعلى بزاوية منفرجة. الأسدية 10 تسعة منها ملتحمة الخيوط وواحدة حرة، تأخذ الثمار شكل قرون غير متفتحة كروية أو بيضوية الشكل، متدلية، ببذرة واحدة، نادراً (2) أو(3). (Mouterde 1986, Zouhary 1982).

عرف الحندقوق بأهميته الطبية بسبب احتوائه على العديد من المركبات الكيميائية الهامة حيث وجد 135 مستقلباً كيميائياً (الحموض الفينولية، والكومارين، والفلافونوئيدات، والتربينوئيدات، والصابونينات، واسترات الحموض الدهنية وغيرها). (**Anwer *et al*., 2008, Rajab 2022 ,Alsanfi 2020**). استخدم ***M.indicus*** في تسريع شفاء الجروح والتقرحات والقدم السكري (**Chorpsima *et al*., 2013**)، وأُستخدم أيضاً ضماداً لمعالجة القروح منذ العصور اليونانية حتى القرن التاسع عشر(**Grossberg and fox 2007**) ووجد أنه يثبط نمو الخلايا السرطانية ومضاد للالتهابات ومضاد أكسدة فعال (**Liu *et al*., 2018,Zhao *et al*., 2007**)، ومضاد فعال للجراثيم سالبة وموجبة الغرام (**Pehlivan *et al*.,2012**)، كما استخدم لعلاج القولون التقرحي عند الفئران (**Safarpou *et al*., 2015**)، وذكرت وكالة الأدوية الأوروبية إمكانية استخدام بعض أنواع الحندقوق عن طريق الفم لتخفيف الانزعاج وثقل الساقين المرتبط باضطرابات الدورة الدموية الوريدية الطفيفة ، وأوصت باستخدامه موضعياً على الجلد لعلاج التهابات الجلد الطفيفة ولتخفيف الكدمات وبعض الالتواءات (**EMA** 2017)، كما أظهرت

الدراسات أن هذا النوع يمنع شيخوخة الجلد، ويعزز تجديد الأنسجة، ويقلل من ترسب الدهون (**Pastorino *et al.*, 2017**).

ومن هنا تأتي أهمية هذا البحث كمساهمة لدراسة الأنواع التي تنمو في الفلورا السورية ولدراستها الميكرومورفولوجية والتشريحية وتحديد مركباتها الكيميائية الفعالة بيولوجياً ودراسة أهم استعمالاتها.

مشكلة البحث Research problem

تبرز الحاجة لدراسات معمقة في عدة محاور لأنواع جنس الحندقوق (***Melilotus***) للأسباب التالية:

1. في ظل الحاجة إلى بدائل طبيعية أكثر أمانًا لعلاج داء النقرس والاضطرابات الأيضية المرتبطة بفرط حمض البول، واستخدام دواء الألوبيرينول كمثبط فعال لإنزيم أوكسيداز إكزانتين المسبب الأساسي له، والذي يُسبب آثاراً جانبية تتراوح بين الطفح الجلدي واضطرابات الكبد، وصولًا إلى تفاعلات تحسسية خطيرة في بعض الحالات، لذلك برزت أهمية دراسة المستخلصات النباتية، التي تُظهر قدرة واعدة على تثبيط هذا الإنزيم بفضل محتواها من المركبات الفعالة. ونظرًا لغياب الأبحاث المحلية والعالمية حول تأثير مستخلصات نبات الحندقوق (***Melilotus***) على إنزيم**Xanthine Oxidase** ، كان لابد من البحث في هذا المجال لاستكشاف إمكانيات علاجية جديدة ذات فعالية وأكثر أماناً.
2. مع ازدياد معدلات الإصابة بمرض السرطان عالمياً ومحدودية فعالية العلاجات التقليدية بسبب آثارها الجانبية ومقاومة الخلايا لها، والحاجة إلى بدائل طبيعية أكثر أماناً، أدى إلى التوجه للبحث عن مصادر أخرى أكثر أماناً، وافتقار الدراسات لتقييم تأثير مستخلصات أنواع *Melilotus* على الخلايا السرطانية، كونها غير معروفة في المجال العلاجي.
3. وضعف الوعي حول الأهمية الطبية والصيدلانية لأنواع جنس الحندقوق، رغم الانتشار الواسع في الفلورة السورية، التي يُنظر إليها غالبًا كنباتات ضارة يجب التخلص منها، ويزداد هذا الإهمال العلمي وضوحاً في ظل غياب الدراسات التي تستكشف الفروقات الكيميائية بين الأنواع، خصوصاً فيما يتعلق بتركيز المواد الفعالة بيولوجياً، مما يفتح المجال أمام ضرورة البحث والتقييم المتكامل لهذا الجنس النباتي المهم.

تساؤلات البحث Questions

يطرح عنوان هذا البحث عدة تساؤلات أهمها:

- ما الفروقات المورفولوجية بين الأنواع المختلفة من جنس الحندقوق؟
- ماهي أنواعه المنتشرة في سورية؟
- هل هناك اختلافات تشريحية تميز الأنواع فيما بينها؟
- ما الاختلافات في محتوى الكومارينات والفلافونوئيدات بين الأنواع المختلفة من الحندقوق؟
- هل هناك علاقة بين التركيب الكيميائي للحندقوق وخصائصه العلاجية؟
- ما الطرائق التحليلية الأكثر دقة لتحديد نسبة الكومارينات والفلافونوئيدات في أنواع الحندقوق المختلفة؟
- كيف يختلف النشاط الحيوي (مثل النشاط المضاد للأكسدة) بين الأنواع المختلفة من الحندقوق؟
- ما مدى تأثير الفلافونوئيدات والكومارينات في تعزيز النشاط الحيوي لهذه الأنواع؟
- هل يمكن استخدام مستخلصات الحندقوق كمصدر طبيعي لعلاج بعض الأمراض؟
- كيف تقارن فعالية المستخلصات النباتية مع الأدوية الكيميائية الشائعة في نفس المجال العلاجي؟

فرضيات البحث Research Assumes

"تفترض هذه الدراسة أن مستخلصات أنواع الحندقوق ***(Melilotus)*** تحتوي على مركبات فعالة حيوياً قادرة على تثبيط إنزيم **Xanthine Oxidase**، وقد تمتلك أيضًا تأثيرًا مضادًا للخلايا السرطانية.

أهداف البحث Objective

1-دراسة مورفولوجية وتشريحية لخمسة أنواع من جنس الحندقوق وتحديد الخصائص الحقلية المميزة للأنواع، ووضع مفتاح تصنيفي لتمييزها حقلياً، ورسم شجرة قرابة بين الأنواع اعتماداً على تلك الخصائص.

2-دراسة كيميائية للأنواع من حيث:

- تحديد المحتوى الكلي للفينولات والفلافونوئيدات في المستخلصات المدروسة.

- دراسة محتوى المستخلصات النباتية للأنواع من الكومارين بتقانة TLC.
- دراسة المحتوى الكيميائي للمستخلص الإيتانولي 70% ب تقانةHPLC.

3-تقييم الفعالية الحيوية لثلاثة مستخلصات للأنواع المدروسة من خلال:

- تعيين القدرة على تثبيط جذري DPPH,ABTS.
- دراسة الفعالية الحيوية في تثبيط الأنزيم XO لبعض مستخلصات أنواع الحندقوق.
- اختبار السمية الخلوية للأنواع ***M.officinalis*،*Melilotus albus*** .(ذات التراكيز العالية من المركبات الكيميائية الفعالة) وتطبيقها في اختبارات التدفق الخلوي

أهمية البحث Importance of the research

تكتسب هذه الدراسة أهميتها من كونها الأولى في سورية التي تُجري مقارنة شاملة بين الأنواع المنتشرة محلياً من نبات الحندقوق، من خلال تعيين محتوى المستخلصات المائية والميثانولية والإيتانولية (70%) من المركبات الفعالة(الكومارينات)، والفعالية الحيوية لها باستخدام اختباري **DPPH** و**ABTS**.

كما سلط البحث الضوء على أهمية بعض أنواع الحندقوق، ***(Melilotus indicus, M. officinalis ،M. albus)*** في معالجة بعض الأمراض كالنقرس من خلال دراسة تثبيط نشاط أنزيم **Xanthine Oxidase**لأول مرة محلياًوعالمياً، والحد من نشاط خلايا سرطان عنق الرحم مما يفتح آفاقاً جديدة لاستخدام هذه النباتات كمصادر طبيعية محتملة لعلاجات دوائية فعالة وآمنة.والدوائية.

مبررات البحث

يُعد نبات الحندقوق من النباتات المهمة بيئيًا ودوائيًا في سورية، إلا أن العديد من الجوانب المرتبطة به لا تزال غير مدروسة بشكل كافٍ، خصوصًا فيما يتعلق بتنوعه المورفولوجي والكيميائي وفعاليته الحيوية، تعزى الحاجة إلى هذا البحث من عدة مبررات أساسية، أهمها:

- نقص الدراسات المحلية التي توثق التنوع النباتي لأنواع الحندقوق ضمن الفلورة السورية.

- أهمية مركب الكومارين الموجود بكثرة في هذا النبات، والذي يتميز بخصائص دوائية واعدة، مما يستدعي تحديد الأنواع الأكثر غنى به وتطوير طرق فعالة لعزله واستخدامه كمصدر طبيعي في الصناعات الدوائية.
- البحث عن بدائل طبيعية لعقار الألوبيرينول، من خلال دراسة تأثير مستخلصات الحندقوق على إنزيم **Xanthine Oxidase** المرتبط بمرض النقرس.
- الاهتمام العالمي بالطب البديل ومكافحة السرطان، حيث يدرس تأثير فعالية مستخلص الإيتانولي 70% لنوعين من الحندقوق في تثبيط خلايا سرطان عنق الرحم **(Hela)** ، ما يجعل من هذا البحث خطوة رائدة نحو اكتشاف بدائل علاجية طبيعية جديدة.

محدوديات البحث

يعد هذا البحث خطوة مهمة في دراسة التنوع المورفولوجي والكيميائي لأنواع من جنس الحندقوق.***Melilotus*** Mill، خاصةً فيما يتعلق بمحتواها من الكومارينات والفلافونوئيدات ودورها في النشاط الحيوي.

ومع ذلك، وكما هو الحال في أي دراسة علمية، هناك بعض المحدوديات التي تواجه أي بحث علمي:

- ❖ عدم توفر جميع المركبات العيارية لإمكانية الكشف عن جميع المركبات الكيميائية في الأنواع.
- ❖ اختلاف االفعالية الحيوية بين التجارب المخبرية (في الزجاج) وجسم الكائن الحي.
- ❖ صعوبة تقدير سمية هذه المستخلصات عند اختباراها في الزجاج.

الفصل الأول

الدراسة المرجعية

Referential Study

يمثل هذا الفصل عرضاً مرجعياً شاملاً للأبحاث التي تناولت أنواع الحندقوق من مختلف الجوانب المورفولوجية، التشريحية، والكيميائية على المستويين المحلي والعالمي، مما يساعد في وضع البحث الحالي في سياقه العلمي الصحيح. إن استعراض الدراسات السابقة يساهم في تحديد الفجوات البحثية التي لم يتم تناولها بعمق، كما يوفر خلفية علمية موثوقة تدعم فرضيات البحث الحالي.

1- **الحندقوق Melilotus Mill., Sweet clover:**

1.1. **الوصف والتصنيف العلمي:**

الحندقوق، المعروف أيضاً باسم إكليل الملك أو البرسيم الحلو، يتميز برائحته العطرية الحلوة التي تنبعث من أوراقه وزهوره، والتي تشبه رائحة الفانيليا، وذلك بسبب احتوائه على الكومارين، المسؤول عن رائحته المميزة، يُشتق اسم الجنس من الكلمتين اليونانيتين **Meli**، والتي تعني العسل، و**Lotos**، التي تشير إلى البرسيم، نظراً لتشابه أوراقه مع أوراق البرسيم أو العلف، كما ورد في قاموس **(The American Heritage Dictionaries 2000 ,Chorepsima *et al*., 2013).**

يُعرف الحندقوق في الولايات المتحدة باسم **Sweet Clover**، وهو أحد الأعشاب التي تنتمي إلى قبيلة **Trifolieae** ضمن الفصيلة الفولية **Fabaceae** المعروفة أيضاً باسم الفراشية **Papilionaceae** أو القرنية **Leguminosae (Bandel, 1974).**

تظهر أنواع الحندقوق على هيئة أعشاب حولية أو ثنائية الحول، بينما تتميز بعض أنواعه الأخرى بأنها معمرة قصيرة العمر **(Zouhary, 1972).** تمتلك أوراقه تركيباً ريشياً مكوناً من ثلاث وريقات، تكون مسننة بالكامل أو في الجزء العلوي فقط، بينما تظل تامة وبسيطة في الجزء السفلي في بعض الأنواع. كما توجد أذنات تامة أو مسننة، بينما تتجمع الأزهار الفراشية في نورات تستطيل عند الإثمار في بعض الأنواع، يتميز الكأس بقصره واحتوائه على خمس سبلات ملتحمة عند القاعدة ومنفصلة عند القمة بزاوية منفرجة، في حين تتألف الأسدية 10(تسعة منها ملتحمة وواحدة حرة). أما الثمار، فتأخذ شكل قرون غير متفتحة ذات هيئة كروية أو بيضوية، متدلية، وتحتوي عادة على بذرة واحدة، ونادراً ما تضم بذرتين أو ثلاثاً **(Zouhary, 1972; Mouterde, 1986).**

يضم جنس الحندقوق حوالي 27 نوعاً منتشراً حول العالم **(WFO Plante List 2024)**، تم توثيق سبعة أنواع فقط في سورية حسب الفلورا السورية اللبنانية**(Mouterde, 1986) .**

يأخذ جنس الحندقوق **Melilotus** الموقع التصنيفي التالي حسب**(APG IV, 2016):**

- المملكة النباتية: **Plante**
- شعبة مغلفات البذور: **Angiosperms** شعبة المغنوليات **Magnolophyta)**
- صف ثنائيات الفلقة: **Dicotyledoneae** (صف المغنوليات **Magnoliopsida)**
- رتبة الفولية: **Fabales**
- الفصيلة الفولية: **Fabaceae**
- القبيلة: **Trifolieae**
- الجنس: ***Melilotus* Mill.**

على الرغم من وجود بعض الدراسات التي أشارت إلى بعض أنواع الحندقوق في سورية، إلا أنه لم يتم حتى الآن إجراء دراسة تفصيلية شاملة للخصائص المورفولوجية لهذه الأنواع. فقد سُجل النوع ***Melilotus segetalis*** في بساتين الحمضيات بمحافظة اللاذقية (طباش وآخرون، 2016)، كما وُثق ***M. indicus*** في منطقتي وادي القرن جنوب دمشق ووادي بردى، إلى جانب تحديد نوع ***M. sulcatus*** في هذه المناطق (منصور وآخرون، 2005؛ أبو غزال، 2012). ومع ذلك، لم تتناول هذه الدراسات بشكل دقيق الصفات الشكلية لهذه الأنواع، وفيما يتعلق بالجوانب التشريحية والكيميائية، دُرست البنية التشريحية والمحتوى الكيميائي لنوع ***M. indicus***، بالإضافة إلى فعاليته المضادة للتأكسد (حرامي وإبراهيم، 2020). وضمن دراسات التنوع الحيوي، وجد ***M. indicus*** في محافظة السويداء (عليوي وآخرون، 2023). كما حُلل المحتوى الكيميائي للزيت العطري المستخلص من ***M. officinalis*** وقُيمت تأثيراته على بعض الأحياء الممرضة (البودي وآخرون، 2018).

في السنوات الأخيرة، تم التركيز على استخدام العلامات الجزيئية في التمييز بين أنواع ***Melilotus*** المختلفة، حيث قام الباحثون بتحليل التباين الجيني لنباتات البرسيم الحلو ورسم شجرة نسب، مما ساعد في فهم علاقاتها الجينية

ومدى تقاربها مع الأنواع الأخرى. على سبيل المثال، ساهم تحليل جينوم البلاستيدات الخضراء في تحديد العلاقات الجينية بدقة أكبر **(Xu *et al*., 2024; Ouyang *et al*., 2021)**، إلى جانب الدراسات الجينية، دُرست التأثيرات البيئية على بعض الصفات المورفولوجية، من حيث عدد الأزهار والتفرعات في نوعي ***M. officinalis*** **و *M. albus*** وفقاً لاختلاف الظروف المناخية .(**Sagalbekov,1996**) كذلك عدد البويضات في المبيض، ووقت الإنبات، والإنتاجية لنفس النوعين في بيئات مختلفة.(**Kolyasnikova, 2013**)

أما من الناحية التصنيفية، فقد تم الاعتماد على مجموعة من الصفات المورفولوجية لتحديد الأنواع، بما في ذلك طول النوع، تسنن الأوراق، لون الأزهار (التي ينبغي ملاحظتها خلال مرحلة الإزهار قبل تحول المبيض إلى قرن، حيث يتغير لون التويج من الأصفر إلى الأبيض)، إضافة إلى طول الزهرة، عدد الأزهار على حامل الأزهار، شكل الأذنات، خصائص البذور، وشكل القرون، بما في ذلك قمتها والتجاعيد على سطحها، حيث تلعب هذه الصفات دوراً هاماً في تصنيف الأنواع المتشابهة شكلياً.

(Chamberlin, 1972, Abid *et al*., 2018, Gupta. M, 1977, Stevenson G.A, 1969, Hansen, 1968, Jauzein 1995 , Verloove F. *et al*., 2012, Aljoboury *et al*., 2017, Gazara *et al*., 2001, Shehata A Faiza, 2018).

إضافةً إلى الدراسات المورفولوجية والجينية، تم التركيز على الصفات التشريحية لأنواع الحندقوق لفهم علاقاتها التصنيفية وارتباطها بأجناس أخرى ضمن زمرة ثلاثية الوريقات **(Gazara et al., 2001)**. كما تم دراسة تأثير العوامل البيئية على هذه الصفات، نظراً لقدرة هذا الجنس للتكيف مع بيئات متباينة.**(Zhang *et al*., 2016)**

وفي هذا السياق، أُجريت دراسات تفصيلية على الصفات التشريحية لبعض الأنواع، حيث قام (**McMurry *et al*., 1937**) بدراسة ***M. albus***، بينما تناول (**Ozbek *et al*., 2014**) التشريح في نوع ***M.bicolor*** كما قام (**Gupta,1977**) بدراسة البنية التشريحية للزهرة، إضافة إلى دراسة صفات البذور لأنواع مختلفة من الحندقوق.**(Abid *et al*., 2018)**

1-2 المحتوى الكيميائي للحندقوق:

يُعد الحندقوق من النباتات الطبية المُعترف بها في دستور الأدوية الطبية(2009) ، وذلك لما يحتويه من مستقلبات ثانوية مشتقة من المستقلبات الأولية مثل (الكومارين من حمض الشكميك من مشتقات فينيل ألانين)، والتي تلعب

دوراً رئيسياً في خصائصه العلاجية. وقد أدى ذلك إلى جذب اهتمام الباحثين والعلماء لدراسة تركيبه الكيميائي بعمق، بهدف استعماله في مختلف المجالات الطبية والصيدلانية والبيئية ومن أهم الزمر الكيميائية التي تم الكشف عنها في الحندقوق مايلي:

1-2-1 الفينولات:

تم عزل ثمانية حموض فينولية مشتقة بشكل أساسي من حمض هيدروكسي السيناميك **($C_9H_8O_3$)**، المعروف أيضاً باسم حمض الكافئيك أو حمض البن .تشمل هذه الحموض حمض الهيدروكسي بنزويك، حمض الفانيليك، حمض أورثو -الكوماريك و حمض ميتا -الكوماريك و حمض بارا -الكوماريك وبالإضافة إلى غليكوزيد حمض بارا-الكوماريك و حمض الفيروليك، وحمض الكلوروجينيك، حمض الغاليك حيث تلعب هذه الحموض دوراً مهماً في العمليات الحيوية، وتتميز بخصائصها الفعالة التي تسهم في العديد من الفوائد الصحية والدوائية.

.(Macías *et al*., 1999; Raza *et al*., 2019; Ragab *et al*., 2021;Ragab *et al*., 2021)

1-2-2 الكومارينات:

ترجع الرائحة العطرية المميزة لنوع الحندقوق إلى احتوائه على مشتقات الكومارين، حيث تم تحديد عشرة مشتقات في بعض أنواعه مثل ***M. indicus* ,*M. messanensis*** تشمل هذه المركبات :الكومارين، 3-هيدروكسي كومارين، 3- (4-ميثوكسي-2-هيدروكسي فينيل)-7-هيدروكسي كومارين، ميلميسانول B- 3) -(4-هيدروكسي-2-ميثوكسي فينيل)-4,7-ديهيدروكسي كومارين، الكوميسترول (7,4-ثنائي هيدروكسي كوميستان)، وغيرها من المركبات الكومارينية التي لها دور في الرائحة العطرية إضافة إلى دورها الدفاعي الحيوي من خلال مقاومة الميكروبات والحشرات، والتأثير الأليلوباثي، والحماية من الإجهاد التأكسدي، إلى جانب مشاركتها في تنظيم النمو والتكيف البيئي.. **(Ahmed *et al*., 2019; Macias *et al*., 1999; Mahmou,2014)**

1-2-3 الفلافونوئيدات:

تُعد المركبات الفينولية من أهم المستقلبات الثانوية وأكثرها شيوعاً في جنس الحندقوق***Melilotus***، حيث تضم مجموعة واسعة من الفئات الكيميائية، ويُعتبر الفلافونول الفئة الأكثر انتشاراً بين أنواع هذا الجنس.

في نوعي ***M. indicus*** ،***M. messanensis***، تشمل الفلافونولات الشائعة على مشتقات كل من الكامبيفيرول والكيرسيتين، بالإضافة إلى مركبات أخرى مثل الإيزوفلافون والإيزوفلافانون، والتي تم تصنيفها بناءً على تركيبها الكيميائي**(Harborne & Mabry, 1975)** .

كما تم تسجيل أربعة مماكبات لكل من الكامبيفيرول والكيرسيتين، إلى جانب إيزوهامنتين، وهو نوع من الفلافونول المثيلي الذي يرتبط بالغليكوزيدات، مكوِّناً مماكبات مختلفة حسب موقع ارتباطه. كذلك، أشارت الدراسات إلى وجود مركبات أخرى مثل الإيزوفلافون والديهيدروفلافونول، مما يعكس التنوع الكيميائي الكبير لهذه المركبات **(Ahmed & Alrefai, 2014; Saxena, 1997; Ragab *et al*., 2021).**

1-2-4- الصابونينات والتربينوئيدات:

يُظهر جنس الحندقوق تنوعا واسعاً للتربينوئيدات والصابونينات. حيث تم عزل أربعة أنواع من الصابونينات من المستخلص الكحولية من ***Melilotus indicus***، كذلك تم عزل تسعة أنواع من التربينات، وخمسة مركبات ستيروئيدية من ***M. messanensis*** **(Macias *et al*.,1997)**.

1-2-5- مركبات أخرى:

كشفت الدراسات المرجعية عن مجموعة متنوعة من المواد الكيميائية النوعية التي تم تحديدها في أنواع الحندقوق المختلفة مثل الحندقوق الهندي والطبي والأبيض. تشمل هذه المركبات استرات الأحماض الدهنية، الكحولات، والمركبات العطرية، التي تُستخدم تقليدياً كمطريات، مستحلبات، ومواد مكثفة في مستحضرات التجميل والمكملات الغذائية. علاوة على ذلك، تم اعتماد إدارة الغذاء والدواء الأمريكية **(FDA)** هذه المواد كعوامل دوائية مضادة للفيروسات، مع وصف العديد من مركبات استرات الأحماض الدهنية في بعض أنواع الحندقوق.

(Katez *et al*., 1991;Williams, 1996; Cornara 2016).

وفي هذا الإطار، لا بد من الإشارة إلى الأهمية الكبيرة لجنس ***Melilotus***، حيث تمتاز بعض أنواعه بأنشطة طبية ودوائية متعددة، تشمل مضادات الأكسدة ومضادات الالتهاب وخفض سكر الدم ومضادات الميكروبات ومضادات السرطان، بالإضافة إلى أنشطة حماية الكبد .وقد أظهرت الدراسات الحديثة أن هذه الأنواع تلعب دوراً هاماً في

الطب التقليدي والحديث على حد سواء، مما يعزز إمكانياتها في العلاجات الطبية المتنوعة (***Saleem et al.,*** **2020, Rajab *et al*., 2021**)

أُجريت دراسة سريرية لتقييم فعالية مستخلص الكومارين لنوع ***Melilotus officinalis***، المعروف اختصاراً بـ **CEMO**، في علاج الوذمة اللمفية المزمنة لدى 21 مريضة خضعن لاستئصال العقد اللمفية بسبب سرطان الثدي. تلقت المشاركات جرعة يومية قدرها 8 ملغ من الكومارين لمدة ستة أشهر، مع متابعة التغيرات في محيط الذراع وتقييم الأعراض عبر استبيانات دورية.

أظهرت النتائج أن 66.6% من المريضات التزمن بالعلاج، في حين أن 52.3% منهن شهدن انخفاضاً في محيط الذراع بنسبة 5% على الأقل وتحسناً ملحوظاً في الأعراض. كما لوحظت آثار جانبية خفيفة لدى 14.2% من الحالات .وبشكل عام، تبين أن CEMO كان فعالاً في 79% من المريضات، مما يجعله خياراً علاجياً مكملاً مهماً إلى جانب العلاج الطبيعي التقليدي مثل التصريف اللمفاوي **اليدوي**(**MLD**) **.(Pastura *et al*., 1999)**

درس تأثير ***Melilotus albus***في تعزيز الزراعة المستدامة على المستويات العالمية والإقليمية والوطنية. ركزت الدراسة على جودة الكتلة الحيوية في النظام البيئي المحلي لهذا النوع واستخدامه في استعادة الأراضي المتدهورة . أظهرت النتائج أن الحندقوق الأبيض يمكن أن يُستخدم ضمن مزيج من الأعشاب والبقوليات لإنشاء أراضٍ عشبية مؤقتة .بالإضافة إلى ذلك، يمكن الاستفادة من الكتلة الحيوية المحصودة كعلف بديل لحيوانات المزرعة أو كركائز في مولدات الغاز الحيوي لإنتاج الطاقة المتجددة **.(ŢÎŢEI, 2022)**

أظهرت دراسة حديثة أن عسل الحندقوق البولندي يمتلك نشاطاً مضاداً للبكتيريا قوياً ضد العديد من البكتيريا الممرضة مثل ***aureus*** Staphylococcusو ***Escherichia coli*** و***Klebsiella pneumoniae*** **و *Salmonella.spp***، تم تحليل العسل من حيث القدرة المضادة للأكسدة، إزالة الجذور الحرة، ومحتوى الفينولات الكلي .أظهرت النتائج أن جميع عينات العسل المختبرة أظهرت نشاطاً مضاداً للبكتيريا بنسبة تزيد عن (90%) بتركيز يتراوح بين **12.5%إلى 25.%** كما تبين أن نشاط العسل المضاد للبكتيريا مرتبط بشكل رئيسي بعمل أنزيم الغلوكوز أوكسيداز، الذي يتم تدميره في وجود الكاتلاز .كما لوحظ ارتباط عكسي بين النشاط المضاد للبكتيريا المعتمد على بيروكسيد الهيدروجين وإزالة الجذور الحرة والمركبات الفينولية **(Sowa *et al*., 2017)**.

تم تحقيق نتائج إيجابية في علاج جروح قرحة القدم السكرية باستخدام المستخلص الجاف المتوفر تجارياً من البرسيم الحلو الأصفر، **Semelil (Angiparstm)**، كما تم توثيقه في العديد من الدراسات السريرية **(Chorepsima *et al*., 2013).**

تم اختبار ألياف نانوية ثلاثية الطبقات من الكولاجين **PCL** تحتوي على مستخلص ***M. officinalis*** لعلاج القرحة السكرية في نموذج الفئران، بناءً على التقييمات الهيستوباثولوجية والهيستومورفومترية، فقد ثبت أن الضمادات المخصبة بمستخلص النوع (خاصة تلك التي تحتوي على 0.08 جرام من المستخلص) واعدة في تعزيز التئام القرحة السكرية في الدراسات التي أجراها **(Derakhshan *et al*.,2022)**

قام **(Safarpour *et al*., 2015)** بدراسة التأثيرات المضادة للأكسدة والالتهابات لهلام البرسيم الحلو الأصفر (بتركيز 10% و20%) **و**المستخلص المائي (عن طريق الفم بجرعات 500،1000 mg/kg) في نموذج **Rattus norvegicus** المصاب بالتهاب القولون التقرحي المستحث، وبعد سبعة أيام من العلاج، فُحصت أنسجة القولون بحثاً عن التغيرات العينية والنسيجية المرضية، بالإضافة إلى قياس مستويات الإجهاد التأكسدي، حيث لوحظت فروق كبيرة في التغيرات المرضية ومستويات مالونديالدهيد، حيث لوحظ تحسن في الوزن مقارنة بمجموعة التحكم غير المعالجة.

أظهرت دراسة أن حقن المستخلصات المائية (بتراكيز mg/kg 100 و250 و500 لمدة ثلاثة أيام) تُحسن موت الخلايا المبرمج في أنسجة المخ لدى الفئران المصابة بنقص تروية المخ .وقد تم تحقيق ذلك من خلال تقليل الخثار الدماغي والإجهاد التأكسدي والوسطاء الالتهابيين، مما يشير إلى فعالية هذه المستخلصات في حماية أنسجة المخ من الأضرار الناجمة عن نقص التروية **(Zhao *et al*., 2017)**.

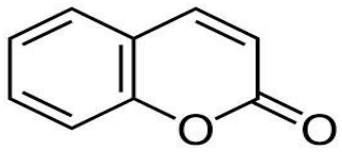
1-3 الكومارينات وأهميتها الحيوية:

يعد الكومارين مركباً طبيعياً عطرياً واسع الانتشار في المملكة النباتية، نجده في الخضروات، التوابل، الفواكه، والنباتات الطبية . يمكن العثور عليه في مختلف أجزاء النوع، مثل الجذور، السيقان، الأوراق، والثمار، إلا أن تراكيزه

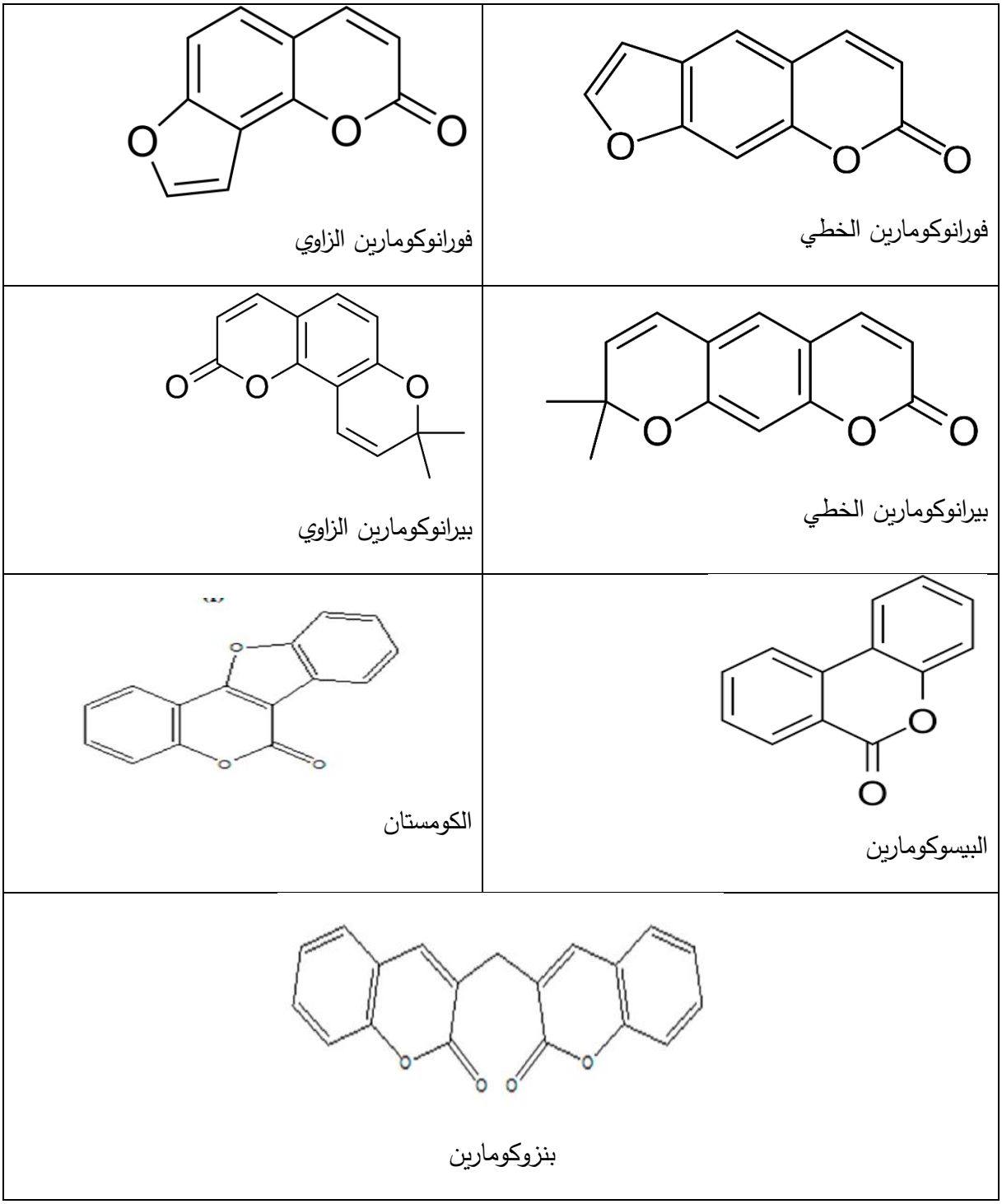
تكون أعلى في بعض الأنواع، مثل **القرفة،** التي تُعد من أبرز المصادر التي يتناولها الإنسان لهذه المادة. نشأ اسم "الكومارين" من الكلمة الفرنسية **"Coumarou"** التي تشير إلى فول التونكا**(Dipteryx odorata)** ، حيث تم عزل الكومارين لأول مرة في عام 1820 بواسطة **Vogel** فيما بعد **(Önder 2020)**، تم العثور على الكومارين في العديد من النباتات الأخرى مثل البرسيم الحلو، والخشب، وعشب البيسون، وعشب الفانيليا، والقرفة، والفراولة، والكشمش الأسود، والمشمش، والكرز **(Yahaya 2019, Fitoz 2018)** . الشكل (1)

في الطبيعة، يوجد الكومارين ومشتقاته إما في صورة حرة أو مرتبطة بجزيئات أخرى مثل الغليكوزيدات **(Yang *et al*., 2009)**. ومعظم هذه المركبات لا تشكل خطراً على صحة الإنسان عند التركيزات الموجودة في النوعات الصالحة للأكل **(Wang *et al*., 2013)**.

تُعد الكومارينات عائلة مهمة من المركبات الطبيعية المشتقة من البنزوبيرون، حيث تتكون جميعها من حلقة بنزين مرتبطة بحلقة بيرون **(Robledo *et al*., 2019)** . ويمكن تصنيف الكومارينات الطبيعية إلى ست مجموعات رئيسية **:**الكومارينات البسيطة، الفورانوكومارينات (بنوعيها الخطي والزاوي)، والبيرانوكومارينات بنوعيها الخطي والزاوي(البيسوكومارين، البنزوكومارين، والكومستانات) **.(Önder *et al*., 2020)** الشكل (1)



الشكل (1): الصيغة الكيميائي للكومارين البسيط (Pubchem 2016)



الشكل (2): الصيغ الكيميائية لبعض أنواع الكومارين الطبيعية. Önder *et al.*, 2020

- يُعتبر الكومارين، بما في ذلك مركب بنزوبيران ـ2ـ ون وحمض السيس ـ أو ـ كوماريك، من المركبات الفعالة في علاج الوذمة اللمفية وأمراض الأوردة المزمنة (**CVD**). يعمل الكومارين على تقليل تراكم البروتين والسوائل في الأنسجة التالفة من خلال تحفيز عملية البلعمة وزيادة إنتاج الأنزيمات البروتينية، مما يساهم في

تسريع الشفاء وتحسين حالة المرضى. كما أظهرت الدراسات السريرية دوره في تقليل التورم وتعزيز التفاعلات البيولوجية التي تمنع احتباس السوائل في الجسم (**Casley *et al*., 1993, Perrin *et al*., 2011**).

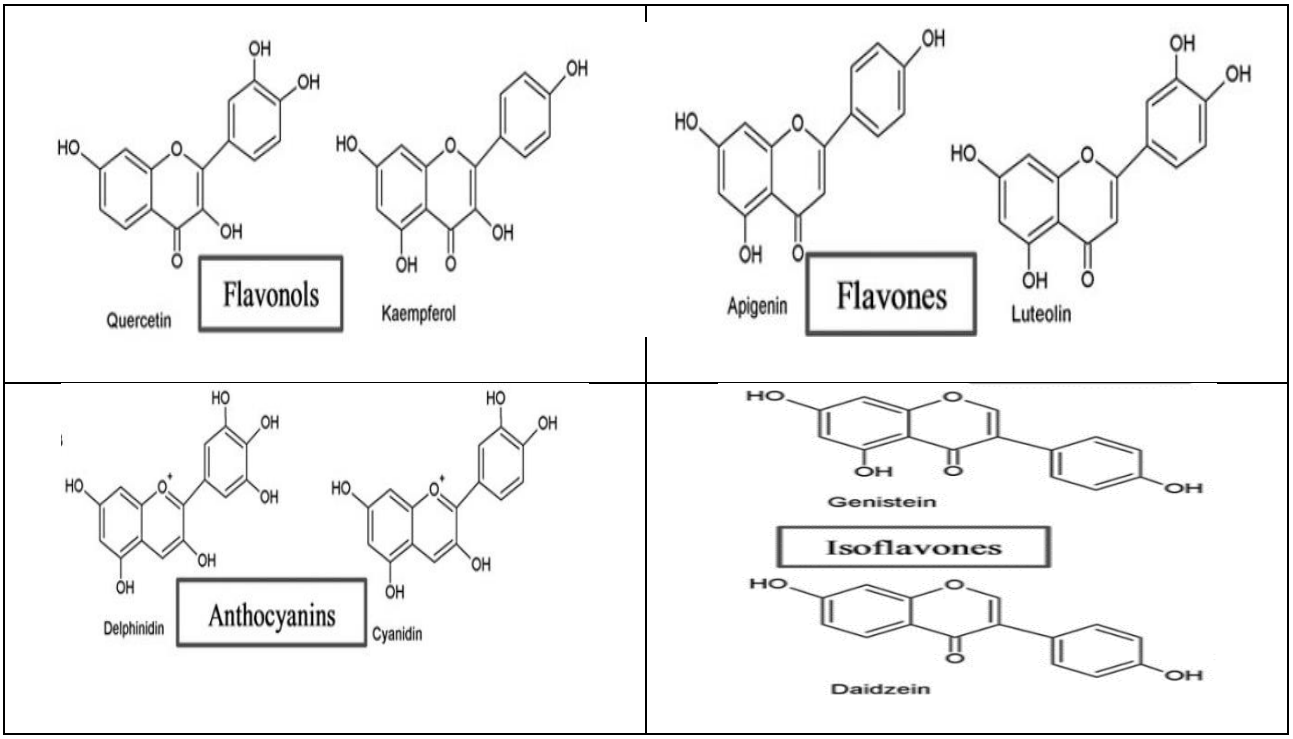
- يتميز الكومارين بتأثيراته المهدئة والمضادة للالتهابات والتشنجات، مما يجعله ذا قيمة علاجية في العديد من الحالات. إضافةً إلى ذلك، كشفت الأبحاث عن دوره المحتمل في تثبيط نمو الخلايا السرطانية، حيث أظهر فعالية ضد بعض أنواع سرطان البروستاتا مثل **DU145** و**LNCaP**، وكذلك سرطان الكلى مثل (**786-O,A-498**) لدى البشر.(**Kubrak *et al*., 2017**)
- أظهرت الدراسات أن الكومارين يمتلك نشاطاً مضاداً للصفيحات، حيث يعمل على تثبيط تراكم الصفائح الدموية الناتج عن تحفيز **ADP** الكولاجين، مما يعزز دوره الوقائي ضد التخثر الدموي (**Sowa *et al*., 2023**)
- أثبتت الدراسات الحديثة أن مشتقات الكومارين يمكن أن تحفز موت الخلايا المبرمج **(Apoptosis)** وتثبط تكاثر الخلايا السرطانية من خلال التأثير على مسارات إشارات خلوية متعددة، مما يبرز إمكاناتها كعوامل مضادة للسرطان.
- يساهم (7–5 ديهيدروكسي –4– مثيليكومارين، 7–6 ديهيدروكسي –4– ميثيلكومارين) في تقليل مدة الرجفان البطيني في قلوب الفئران المعزولة بعد تعرضها لنقص التروية، وهي حالة تلعب فيها الجذور الحرة المشتقة من الأكسجين دوراً رئيسياً. يشير ذلك إلى أن هذه المركبات، التي تنتمي إلى فئة الكومارينات المضادة للأكسدة، تمتلك خصائص وقائية مهمة في هذا النوع من الاضطرابات الفيزيولوجية **(Hoult & Payá, 1996)**.

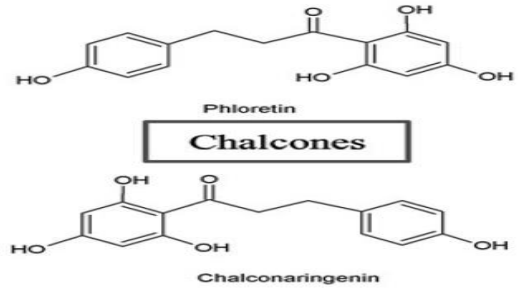
1–4– الفلافونوئيدات وأهميتها الحيوية:

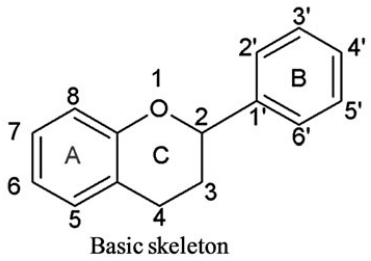
الفلافونوئيدات هي مركبات طبيعية تتميز بتركيب فينولي متنوع، وتتواجد في مجموعة واسعة من المصادر مثل الفواكه، الخضروات، الحبوب، اللحاء، أجزاء النبات المختلفة، الشاي والنبيذ. تشتهر هذه المركبات جميعها بفوائدها الصحية المتعددة، وقد تم بذل جهود كبيرة لاستخلاصها نظراً لتأثيراتها الإيجابية.

تعتبر الفلافونوئيدات اليوم جزءاً أساسياً في العديد من التطبيقات في مجالات الغذاء، والصيدلة، والطب، والتجميل، وذلك بفضل خصائصها المضادة للتأكسد، والمضادة للالتهابات، والمضادة للطفرات، والمضادة للسرطان. بالإضافة إلى ذلك، تسهم الفلافونوئيدات في تعديل وظائف الأنزيمات الخلوية الحيوية. كما أظهرت الأبحاث الحديثة دور الفلافونوئيدات في تقليل معدلات الوفيات الناتجة عن أمراض القلب والأوعية الدموية، فضلاً عن قدرتها في الوقاية من أمراض القلب التاجية.

يمكن تقسيم الفلافونوئيدات إلى عدة مجموعات فرعية بناءً على ترتيب كربون الحلقة C وترابط الحلقة B معها. على سبيل المثال، إذا كانت الحلقة B ترتبط بالموضع 3 من الحلقةC ، فإن المركب يُسمى آيزوفلافون، بينما إذا كانت الحلقة B ترتبط بالموضع 4، فيُسمى فلافونويد جديد. كما يتم تقسيم الفلافونوئيدات الأخرى حسب الموقع الهيكلي للحلقة C إلى فئات مثل الفلافون، الفلافونول، الفلافانون، الفلافانونول، الفلافانول (أو الكاتيسين)، الأنثوسيانين والغالكونات. (الشكل3)







الشكل (3):الصيغة الكيميائية العامة للفلافونوئيدات (Panche *et al*., 2016)

الشكل (4) الصيغة الكيميائية لأنواع الفلافونوئيدات (Panche *et al*., 2016)

تمتلك مركبات الفلافونوئيد مجموعة متنوعة من الأنشطة البيولوجية في النباتات والحيوانات والبكتيريا. ففي النباتات، يُعرف منذ فترة طويلة أن الفلافونوئيدات تُصنَّع في مواقع محددة وتساهم في إضفاء الألوان والروائح على الزهور والفواكه، مما يساعد في جذب الملقحات. كما تلعب هذه المركبات دوراً مهماً في تعزيز نمو وتطور الشتلات **.(Griesbach 2005)**

تحمي الفلافونوئيدات النباتات من الضغوط الحيوية الإجهاد، حيث تعمل كمرشحات فريدة للأشعة فوق البنفسجية **.(Takahashi & Ohnishi)**إضافة إلى ذلك، فهي تلعب دوراً في الإشارة الخلوية، وتعمل كمركبات نباتية مضادة للميكروبات، وكمحفزات للدفاع ضد السموم. كما أنها تمتلك أدواراً في مقاومة قساوة الصقيع والجفاف، وقد تسهم في تأقلم النباتات مع درجات الحرارة المنخفضة، مما يعزز قدرتها على التحمل في بيئات شديدة البرودة **(Samanta A& Das G 2011)**.

كذلك تمتلك الفلافونوئيدات تأثيرات وقائية مهمة لصحة القلب، حيث تعمل على تثبيط بيروكسيد الدهون، وتقلل من أكسدة الأيونات المعدنية، وتخفيف العمليات المرتبطة بأنواع الأكسجين التفاعلية، مما يساهم في الحماية من أمراض القلب والأوعية الدموية.**(Heim *et al*., 2002).**

إضافةً إلى ذلك، أثبتت الدراسة أن المستقلبات النشطة حيوياً التي تنتجها ميكروبات الأمعاء من الفلافونوئيدات تلعب دوراً مثبطاً في تطور سرطان الأمعاء، مما يعزز أهميتها في الوقاية من هذا النوع من السرطان **. (Griffin *et al*., 2021)**

وأظهرت الدراسات المختبرية والحيوية أن الفلافونوئيدات تمتلك نشاطاً مضاداً للالتهابات وتساهم في تعديل الاستجابة المناعية، مما يجعلها عوامل علاجية محتملة للاضطرابات الالتهابية المختلفة **(Yahfoufi *et al.*, 2018)**

رغم أن الفلافونوئيدات تُعرف عموماً بخصائصها المضادة للتأكسد، إلا أنها قد تمتلك أيضاً تأثيرات مؤكسدة (أي قدرتها في بعض الظروف على إنتاج الجذور الحرة **(ROS)** داخل الخلايا بدلًا من تثبيطها **Maliar *et al*.,2023**)، حيث يمكن أن تحفّز موت الخلايا السرطانية، مما يجعلها خياراً واعداً في مكافحة الأورام.

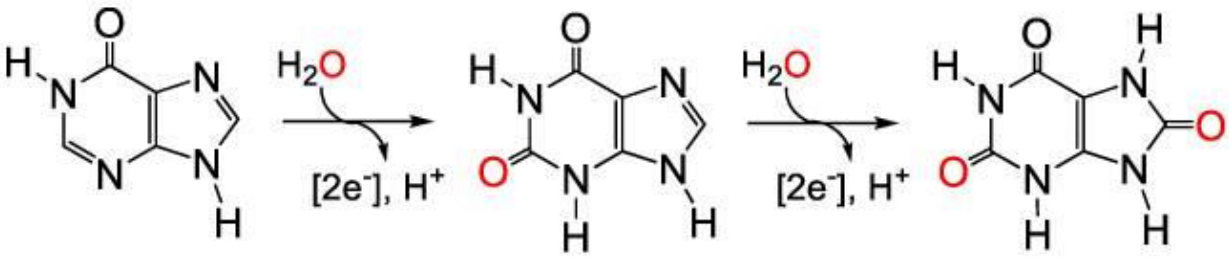
تلعب هذه المركبات بشكل عام دوراً رئيسياً في علاج العديد من الأمراض الالتهابية مثل التهاب المفاصل والتهاب المعدة والتهاب الكبد، من خلال تأثيرها على السيتوكينات والأنزيمات الالتهابية. فعلى سبيل المثال، يُساهم الكيرسيتين في تقليل التهاب المفاصل عبر تثبيط الأنزيمات المسؤولة عن الالتهاب، بينما يعمل الأبيجينين كمضاد للأكسدة، مما يساعد في تقليل الضرر التأكسدي في الخلايا العصبية، وهو ما قد يسهم في الوقاية من مرض الزهايمر.

علاوةً على ذلك، تقلل بعض الفلافونوئيدات، مثل اللوتولين، من التعبير عن عامل نخر الورم **(TNF-α)**، مما يساعد في الحد من الالتهابات المرتبطة بتصلب الشرايين. كما أن لهذه المركبات تأثيرات دوائية واسعة من خلال تثبيط بعض الأنزيمات المهمة في مسارات الالتهاب، مثل السيكلوأوكسجيناز (COX-2) ، حيث يساهم الكيرسيتين

في تخفيف آلام الالتهاب المزمن عبر هذا التأثير(**Shukla *et al.*, 2019**.). بفضل هذه الآليات المتنوعة، تمثل الفلافونوئيدات عوامل علاجية واعدة للأمراض الالتهابية والمزمنة، مما يعزز من استخدامها في التطبيقات الطبية والصيدلانية.

1-5- أنزيم كزانتين أوكسيداز (Ec1.17.3.2):

من أنزيمات الأكسدة والإرجاع لايعمل إلا بوجود FAD+ المولبيديوم تظهر فعاليته عند حدوث خلل في عمل الكبد والالتهابات، وتتم معايرته في الدم في بعض الأمراض حيث يعتبر مؤشراً لذلك، ويحفّز أنزيم كزانتين أوكسيداز (**XO**) عملية الهيدروكسيل التأكسدية لمركب الهيبوكسانتين، مما يؤدي إلى تحويله إلى الكزانتين، ثم إلى حمض اليوريك، وهو الناتج النهائي لتحلل البيورينات لدى البشر، كما هو موضح في الشكل 5. ينتشر هذا الأنزيم على نطاق واسع في الكائنات الحية، حيث يؤدي دوراً رئيسياً في استقلاب البيورينات. في معظم الكائنات، يعمل الأنزيم على نزع هيدروجين، حيث ينقل الإلكترونات الناتجة عن أكسدة الركيزة إلى **$NAD^{+\cdot}$**، أما في الثدييات، فبالرغم من إنتاجه في البداية على نزع هيدروجين، فإنه يوجد عادةً في صورة أوكسيداز، حيث ينقل الإلكترونات إلى الأكسجين (**O_2**) بدلاً من **$NAD^{+\cdot}$** ولهذا السبب، يُعرف غالباً باسم "الأكزانتين أوكسيداز نازع الهيدروجين **(Hell, 2023)**.



هيبوزانتين **زانتين** **حمض البول**

الشكل (5): يوضح تحويل الهيبوكسانتين إلى حمض البول Hell.2023

يوضح الشكل (5) عملية الأكسدة المحفزة بأنزيم الأكزانتين أوكسيداز (**XO**) ، حيث يتم تحويل الهيبوكسانثين إلى الأكزانتين، ثم إلى حمض البول، عبر تفاعلين متتاليين. في كل خطوة، يتم إدخال ذرة أكسجين مشتقة من الماء، مع إطلاق إلكترونين (**2e+**) وبروتون (**H^+**). يمثل هذا التفاعل المرحلتين الأخيرتين في استقلاب البيورينات لدى البشر، حيث يُعد حمض البول المنتج النهائي لهذا المسار الاستقلابي، كذلك يدخل الأنزيم باستقلاب بيورينات الأحماض النووية الأدنيين،والغوانين A,G ضمن سلسلة من التفاعلات لتعطي هيبوزكزانتين.

يُعد الأكزانتين أوكسيداز من أوائل الأنزيمات التي تم تنقيتها، حيث تم عزله لأول مرة من حليب البقر عام 1924 **(Dixon & Thurlow, 1924).** . ولم يتم التأكد حتى عام 1966 من أن إشارات الرنين الإلكتروني الصادرة عنه تعود إلى عنصر الموليبدينوم، الذي يخضع لعملية إرجاع أثناء التحفيز التأكسدي للأكزانتين، مما يؤدي إلى إنتاج حمض البول.(**Bery & Meriwether, 1966**) . ويُعَد وجود الموليبدينوم في بنية الأنزيم دليلاً على دوره المحوري في استقلاب البيورينات، وهو ما يفسر تركزه في الأعضاء الأيضية مثل الكبد والغشاء المخاطي للأمعاء الدقيقة في الثدييات.**(Voet & Voet, 1990)** .

على المستوى الجزيئي، يُصنَّف الأكزانتين أوكسيداز ضمن عائلة أنزيمات الموليبدينوم، ويتميز بتركيب معقد يحتوي على فلافين أدينين دينوكليوتيد**(FAD)**، وجزيء واحد من الموليبدينوم، بالإضافة إلى أربع روابط حديد–كبريت، مع كتلة جزيئية تُقدَّر بحوالي (**290**) كيلو دالتون. كما يوجد الأنزيم في شكل زيموجين غير نشط، ويتم تفعيله عند شطره بواسطة أنزيم التربسين، إلى جانب تحويله إلى الأكزانتين ديهيدروجيناز، مما يعكس آلية تنظيمه الحيوية المعقدة ودوره في التفاعلات الأيضية.

1-5-2 أهمية أنزيم Xanthine Oxidase(XO):

- تأتي أهمية أنزيم **(XO)**من أداوره الحيوية التي لها أدورا هامة في الجسم حيث أنه يساهم في تنظيم وظائف الأوعية الدموية، إلا أن زيادته في حالات ارتفاع الكوليسترول قد تؤدي إلى تأثيرات ضارة. يرتبط **XO**بالغليكوز أمينوغليكانات الكبريتية الموجودة على سطح الخلايا البطانية، والتي تزداد كميتها في هذه الظروف، مما يعزز إنتاج الأكسجين النشط (O_2) **(Adachi *et al*., 1996)** .يؤدي هذا التفاعل إلى تثبيط تأثير أكسيد النيتريك **(NO)** ، وهو المركب المسؤول عن ارتخاء الأوعية الدموية، مما يعيق تدفق الدم بشكل طبيعي. ومع مرور الوقت، يؤدي التفاعل بين **NO**و**O_2** إلى تكوين بيروكسي نيتريت(**$NOOO^-$**) ، الذي يُلحق ضرراً دائماً بوظيفة الأوعية الدموية، وقد يُساهم في تطور تصلب الشرايين والخلل الوعائي المزمن.(**White *et al*., 1996**) .

- تشير الدراسة إلى دور أنزيم **(XO)** في مرض السكري من النوع الثاني، حيث توجد علاقة إيجابية بين مستوى حمض البول في المصل- الناتج عن أكسدة الهيبوكسانثين- وتطور مرض السكري من النوع الثاني **(Kodama *et al*., 2009)**. ومع مرور الوقت، أصبح ارتفاع حمض البول مؤشراً مهماً على زيادة خطر الإصابة بالسكري. **(Viazzi *et al*., 2011)** كما كشفت الأبحاث الحديثة عن ارتباط مستقل بين مستويات **XO** ومرض السكري، مما دفع بعض الباحثين إلى التوصية بمراقبة مستويات **XO** في المصل كإجراء وقائي للحد من خطر الإصابة بالسكري من النوع الثاني **(Hasan *et al*., 2022).**
- بالإضافة إلى ذلك، يُعتقد أن أنزيم (XO) يعد مصدراً رئيسياً لجزيئات الأكسجين التفاعلية في حالات فشل القلب **(Jennifer *et al*., 2005)**. كما أظهرت الدراسات أن نشاط **(XO)** يكون مرتفعاً بشكل ملحوظ لدى مرضى الانسداد الرئوي المزمن **(COPD)** مقارنة بالأشخاص الأصحاء، مما يشير إلى دوره المحتمل في تطور المرض **(Ichinose *et al*., 2003).**
- يؤدي ارتفاع نشاط أنزيم (XO) إلى زيادة إنتاج حمض البول، مما يسبب تراكمه على شكل بلورات إبرية في المفاصل، محفزاً التهاباً حاداً يتمثل في الاحمرار والتورم والألم الشديد، وهو ما يُعرف بمرض النقرس. كما أن ارتفاع مستويات حمض البول قد يسهم في تكوّن حصوات الكلى، وفي الحالات الشديدة، قد يؤدي إلى الفشل الكلوي .من ناحية أخرى، أشارت الدراسات الحديثة إلى أن تقليل نشاط **(XO)** يقلل من إنتاج حمض اليوريك، مما يساعد في الحد من خطر الإصابة بهذه المضاعفات. **(Jang *et al*., 2014).**
- أظهرت الدراسات أن استخدام دواء الألوبيورينول الوريدي لتثبيط أنزيم الـ XO في حالات فشل القلب لدى الحيوانات والبشر يؤدي إلى تحسين الكفاءة الميكانيكية للقلب، وفي بعض الحالات، أظهرت التقارير تحسناً في وظيفة القلب الانقباضية.**(Cappola *et al*., 2001; Ukai *et al*., 2001)** .
- وأشارت الدراسات إلى أن التثبيط المزمن لأنزيم **(XO)** قد يُسهم في تحسين معدلات البقاء على قيد الحياة وتعزيز وظيفة القلب لدى المرضى المصابين باعتلال عضلة القلب الناتج عن نقص التروية الدموية **(Engberding *et al*., 2004; Stull *et al*., 2004).**

- كما يمكن أن يساهم التثبيط المزمن لأنزيم (**XO**) في تغيير مسار تطور فشل القلب لدى المرضى المصابين باعتلال عضلة القلب المتوسع.(**Jennifer *et al*., 2005**).
- يثبط (**XO**) بواسطة بعض الأدوية، بما في ذلك الأدوية المضادة للسرطان مثل الآزوثيوبرين و6-مركابتوبورين، التي يتم استقلابها عبر اكزانتين أوكسيداز . وعند استخدام مثبطات الأكزانتين أوكسيداز مع هذه الأدوية المضادة للسرطان، يؤدي ذلك إلى تراكم مفرط لهذه الأدوية في الجسم نتيجة التحلل المحدود، مما يستدعي تقليل الجرعة بعد ذلك لتجنب تقليل إنتاج الكريات البيض وضعف المناعة بشكل كبير.(**Bradford, Shih, 2011**).
- تشير الأبحاث أيضاً إلى أن تثبيط (**XO**) قد يساعد في تقليل موت الخلايا الجرثومية الناجم عن تجميد الخصية في التجارب المعملية، مما قد يشير إلى ارتباط العقم بالإجهاد الحراري.(**Kumagai *et al*., 2000**)
- يزداد تركيزه بالدم عند حدوث خلل بالكبد أو إصابات فيروسية معيار تركيزه دلالة على أمراض الكبد.

بناءً على ذلك، يُمكن اعتبار أنزيم (**XO**) عاملاً رئيسياً في العديد من الحالات الصحية، مثل النقرس والفشل الكلوي،والكبد وله تأثيرات على صحة القلب وتفاعلاته مع بعض الأدوية، مما يجعله هدفاً مهماً للعلاجات الدوائية.

6-1 تعريف السرطان ومميزات الخلايا السرطانية:

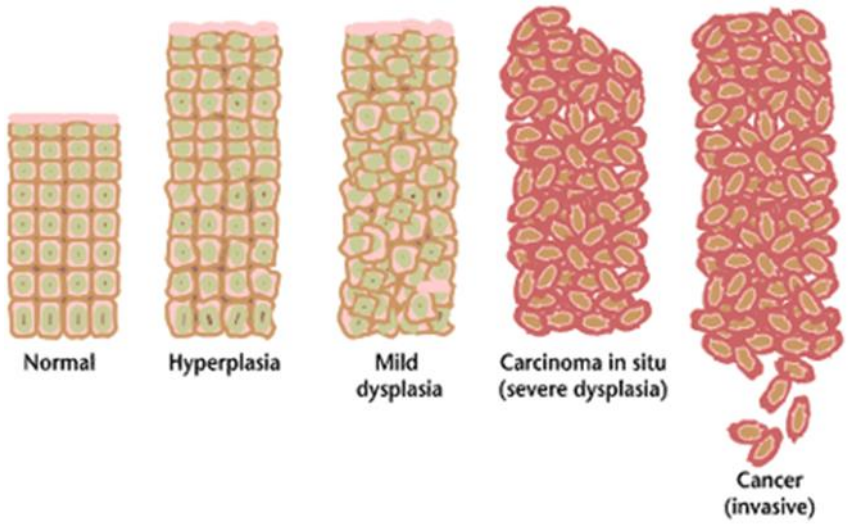
السرطان، وفقاً للتعريف الحديث، هو تكاثر غير منضبط لخلايا خضعت لتحولات جينية تطورت عبر آلية الانتقاء الطبيعي. تراكم التغيرات الجينية والوراثية في هذه الخلايا يمنحها خصائص عدوانية تمكنها من الانتشار والتكاثر. بالإضافة إلى الطفرات الجينية، يسهم البيئة المحيطة بالورم في تعزيز بعض السمات الظاهرية للخلايا السرطانية، مثل التسلل إلى الخلايا المجاورة والتهرب من الجهاز المناعي.(**Brown *et al*., 2023**) .

تلعب التكيفات التي تنشأ من الانتقاء الطبيعي دوراً في تحسين قدرة الخلايا السرطانية على امتصاص الموارد والتسلل إلى الأنسجة المحيطة، وكذلك توجيه نمو الأوعية الدموية لتوفير الأوكسجين والمواد الغذائية. كما تساهم الأنسجة البينية خارج الخلوية في دعم نمو الخلايا السرطانية وتكاثرها (**Gorgorio *et al*., 2022; Maley *et al*., 2017**)

على الرغم من النمو غير المنضبط، تواجه الخلايا السرطانية تحديات داخلية من حيث التنافس على الموارد والمجال، بالإضافة إلى الضغوط من الجهاز المناعي والمخاطر السامة، مما يعكس الطابع التنافسي للبقاء داخل الورم.(**Brown *et al*., 2023; Hanahan *et al*., 2011**).

1-6-1 أنواع الخلايا السرطانية:

ليست كل التغيرات التي تحدث في أنسجة الجسم هي سرطان بل عدة تغيرات خلوية تتطور تدريجياً من فرط التنسج **(Hyperplasia)** إلى خلل التنسج **(Dysplasia)** ثم تتحول لخلايا سرطانية. في فرط التنسج، تنقسم الخلايا بسرعة ولكن تظل طبيعية تحت المجهر، بينما في خلل التنسج، تظهر خلايا غير طبيعية مما يزيد من خطر تحوّلها إلى سرطان.**(Rajput, 2022)** الشكل (6).



الشكل (6): تغيرات الخلايا من طبيعية إلى سرطانية shah 2014

هناك أكثر من 100 نوع من السرطان، وتشمل:

- سرطان الخلايا الظهارية **:(Carcinomas)** مثل سرطان الثدي، القولون، الجلد.
- الساركوما **(Sarcoma)** :تصيب العظام والأنسجة الرخوة.
- اللوكيميا **(Leukemia)** :تنشأ في نقي العظم.
- اللمفوما **(Lymphoma)** :تصيب الخلايا اللمفاوية.
- سرطان الميلانوما :يصيب الخلايا الصباغية.

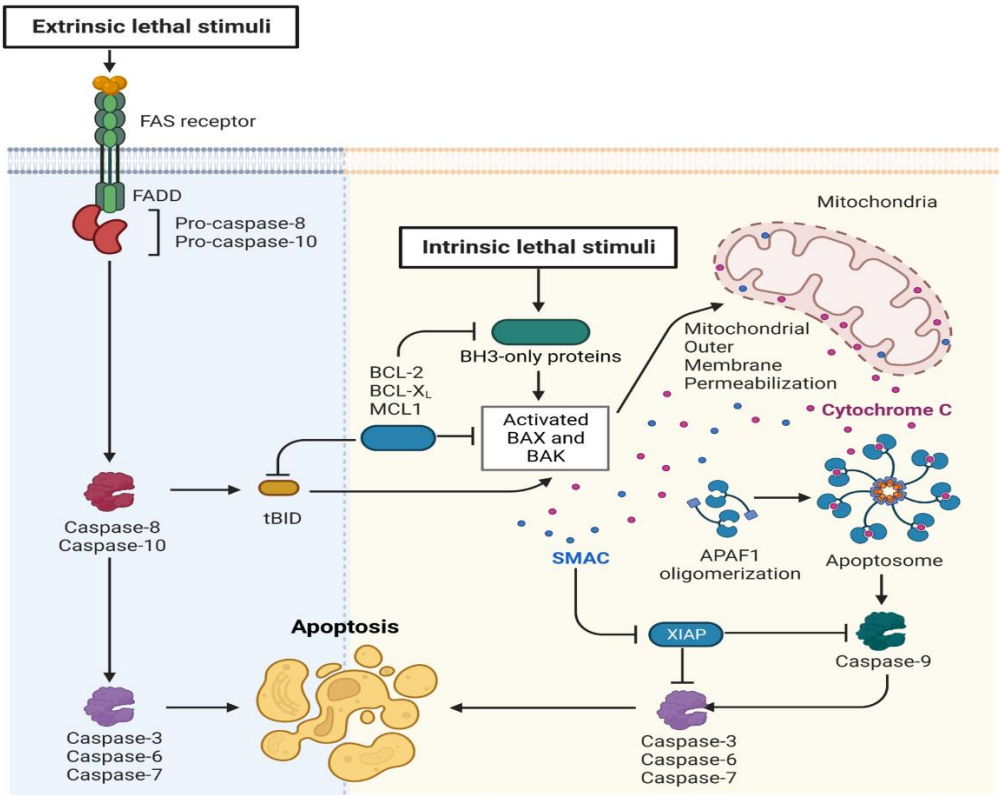
- سرطان الجهاز العصبي المركزي **:**مثل الدماغ والحبل الشوكي.**(Cancer Research UK, 2023) .**

يعتمد علاج السرطان على نوعه ومدى تقدمه، ويشمل الجراحة، العلاج الكيميائي، والإشعاعي. ولكن العلاج الكيميائي التقليدي قد يكون صعباً بسبب التشابه بين الخلايا السرطانية والطبيعية، مما يتطلب استخدام أدوية مستهدفة تدخل في آليات الخلية السرطانية مثل إيقاف دورة الخلية وتحفيز الموت المبرمج.**(Valter *et al*., 2017)**

1-6-2 أنواع الموت الخلوي:

الموت الخلوي هو عملية طبيعية تحدث في الكائنات الحية وتساهم في الحفاظ على توازن الخلايا داخل الأنسجة والأعضاء. يتجسد الموت الخلوي في نوعين رئيسيين**:** الموت الخلوي المبرمج **(Apoptosis)** والموت الخلوي التنخري. **(Necrosis) .** حيث يحدث الموت الخلوي التنخري بسبب أضرار غير طبيعية مثل الإصابة أو التسمم، مما يؤدي إلى تمزق الخلايا والتهاب الأنسجة المحيطة. أما الموت الخلوي المبرمج، فهو عملية منضبطة يتم فيها موت الخلايا بشكل انتقائي ومنظم دون التأثير على الخلايا المجاورة أو التسبب في التهابات، مما يساعد في منع نمو الخلايا غير الطبيعية مثل الخلايا السرطانية.**(Zhang et al., 2007).**

يعد الموت الخلوي المبرمج حيوياً للحفاظ على صحة الأنسجة، حيث يمر بعدة مراحل تبدأ بتكثيف الكروماتين النووي وتدمير الهياكل الخلوية، وتنتهي بتكوين "جسيمات التموت " التي تُلتهم بواسطة خلايا أخرى مثل البلعميات **(Zhang *et al*., 2007)**، يُنفذ هذا الموت عبر مسارين رئيسيين**:** المسار الخارجي الذي يبدأ بتفاعل مستقبلات الموت مع ربيطة **Fas** و**TRAIL**، مما يؤدي إلى تشكيل مجمع إشارات **(DISC)** وتحفيز الموت. أما المسار الداخلي يتضمن إفراز الميتوكوندريا لسيتوكروم سي و **SMAC/DIABLO** استجابة للمحفزات، مما ينشط أنزيمات الكاسبيز لتدمير الخلية **(Tan *et al*., 2009)**، كما تلعب مثبطات موت الخلايا المبرمج **(IAPs)** دوراً هاماً في تنظيم هذه العملية، حيث تمنع تنشيط الكاسبيزات مثل كاسباس-9، مما يساعد الخلايا على النجاة من الموت المبرمج.**(Tan *et al*., 2009)** . الشكل (7).



الشكل (7): آلية الموت المبرمج بمساره الخارجي أو الداخلي Wani *et al.*, 2023

يوضح الشكل المسار الخارجي الذي يتلخص: كإشارة من خارج الخلية ← تنشيط كاسبيز-8 ← تنشيط كاسبيز-3 ← موت الخلية (Apoptosis)، ويتلخص المسار الداخلي: بتلف داخلي ← خروج Cyt C من الميتوكوندريا ← تنشيط كاسبيز-9 ← ثم كاسبيز-3 ←موت الخلية (Apoptosis).

فالموت الخلوي المبرمج (Apoptosis) هو عملية حيوية تساعد في الحفاظ على توازن الأنسجة ومنع تحول الخلايا إلى خلايا سرطانية. أي خلل في تنظيم هذه العملية قد يطيل عمر الخلايا السرطانية ويسهم في انتشار الطفرات الجينية، مما يعزز قدرتها على النمو في ظروف الإجهاد وتكوين الأوعية الدموية في الورم، ويعدّ مقاومة الخلايا السرطانية لهذه العملية عاملاً رئيسياً في مقاومتها للعلاج الكيميائي.**(Vanden *et al.*, 2014)** .

من المعروف أن بعض البروتينات التي تحارب الموت الخلوي، مثل **Bcl-2** و **Akt** و **NF-κB** وعائلة **IAP** ، تُعبّر بكثرة في العديد من الأورام. بناءً على ذلك، هناك جهود لتطوير أدوية تستهدف هذه البروتينات لتدمير الخلايا السرطانية بشكل انتقائي.

لابد من الإشارة إلى أن هناك 11–19 نمط من الموت الخلوي المبرمج مثل :

Apotosis, Autophagy, Necrosis/Necroptosis,Anoikios,Pryoptosis…..ext .

يحدث تحول الخلايا السليمة إلى خلايا سرطانية بسبب تراكم طفرات جينية تؤثر في الجينات المثبطة للورم وتنشط الجينات المسرطنة، مما يساهم في بقاء الخلايا السرطانية وانتشارها، تسهم هذه التعديلات في مقاومة الخلايا السرطانية للموت الخلوي المبرمج عن طريق تعطيل مسارات الاستماتة وتعديل التفاعلات البروتينية، من بين أنواع السرطان التي تتبنى هذه الآليات هو سرطان عنق الرحم، الذي يعد أحد أكثر أنواع السرطان شيوعاً حول العالم.

1–6–3 سرطان عنق الرحم وطرق علاجه:

سرطان عنق الرحم هو رابع أكثر أنواع السرطان شيوعاً بين النساء عالمياً، حيث يشكل (600,000) حالة جديدة و(340,000) حالة وفاة سنوياً، وتُسجل معظم هذه الحالات (83٪ من الإصابات و88٪ من الوفيات) في البلدان ذات الدخل المنخفض والمتوسط **(Arbyn *et al*., 2020; Cohen, 2019).** .

يُعدّ فيروس الورم الحليمي البشري **(HPV)** العامل الرئيسي المسبب لهذا السرطان، حيث يرتبط بشكل وثيق بتطوره، خاصة أنواع الفيروس 16 و18.**(Crosbie *et al*., 2013; Hausen, 2009)**

ينشأ سرطان عنق الرحم غالباً من منطقة الانتقال بين عنق الرحم الداخلي والخارجي بعد الإصابة المستمرة بفيروس HPV، ويؤدي ذلك إلى تغييرات خلل التنسج التي قد تتطور إلى سرطان. في غالبية الحالات، يبدأ السرطان من الخلايا الحرشفية بنسبة (75%)، بينما تمثل الخلايا الغدية النوع الآخر الأقل شيوعاً. على الرغم من أن معظم الإصابات بفيروس HPV تختفي تلقائياً، فإن حوالي (10–20%) منها قد تؤدي إلى السرطان، خاصة إذا تم دمج الحمض النووي الفيروسي في الجينوم الخلوي.**(Pecorelli, 2009)**.

يعتمد علاج سرطان عنق الرحم على مرحلته ويشمل: الجراحة، العلاج الإشعاعي، والعلاج الكيميائي. في المراحل المبكرة، يتم استخدام الجراحة لإزالة الأنسجة السرطانية، بينما في المراحل المتقدمة يتم استخدام العلاج الإشعاعي مع العلاج الكيميائي، حيث تعود محدودية العلاج وخاصة بالسيسبلاتين بسبب سميته للك هناك دراسات تشير الى الثر التازري للسيسبلاتين مع بعض المستخلصات النباتية التي تزيد فعاليته مما يساعد على تخفيض جرعته وبالتالي

خفض سميته. ومع ذلك، لا تزال مقاومة الأدوية تشكل تحدياً كبيراً، مما يستدعي تطوير علاجات جديدة أكثر فعالية.(**Burmeister *et al*., 2022**).

يتجه اليوم العالم الطبي إلى النباتات الطبية ومستخلصاتها والمواد الكيميائية الطبيعية المعزولة منها بفضل تقنيات مختلفة حتى يتم تجنب الكثير من تلك الآثار الجانبية للعلاجات الكيميائية التي تسبب الإجهاد والتعب الخلوي ومن هذه الدراسات :

تم دراسة تأثير مستخلص الإيثانولي لزهرة ***Ammi majus*** الذي تنتمي لفصيلة **Apiaceae** على خلايا **Hela** و**MCF7**، وأظهرت النتائج تأثيراً ساماً على هذه الخلايا. تعتبر المركبات القمرية (جزء من مركبات الفينول) المكونات الرئيسية للنوع والمسؤولة عن أنشطته البيولوجية. وأظهرت الأبحاث سمية مركبات الكومارين على الخلايا وأكدت قدرتها على تحفيز الموت الخلوي المبرمج. تلعب السورالينات، وهي أهم مركبات الكومارين، دوراً مضاداً للسرطان عبر تثبيط نشاط السيتوكروم بي 450 **(Ghareeb *et al* ., 2011, Shokoohinia *et al*., 2014)**.

اللبان ***Boswellia serrata*** هو نبات طبي من الفصيلة **Burseraceae** واسمه اللبان أو اللبان الذكر. أظهر المستخلص الكحولي لهذا النوع موت خلايا سرطان عنق الرحم (خلايا **Hela**) حيث يعتمد على الجرعة المقدمة وزمن العلاج.(**Moussaieff, 2009, Siddiqui 2011).**

وتُعد الونكا أو العناقية ***Vinca rosea*** من النباتات الطبية المهمة منذ زمن طويل. حيث أبدى المستخلص الميتانولي لهذا النوع في دراسة على خط خلايا سرطان الجلد البشري A431، تأثيراً إيجابياً في تقليل تكاثر الخلايا السرطانية. حيث تحتوي الأجزاء الهوائية للنبتة على قلويدات مثل **فينكريستين، فيندولين**، وغيرها من المركبات القلويدية التي يستخدم بعضها كأدوية مضادة للسرطان، وأظهرت الدراسات أن لهذه القلويدات تأثيراً على خلايا سرطان الثدي، البروستاتا، وعنق الرحم**(MCF-7, PC3-1C, Hela)** ، حيث ترتبط ببروتينات الأنيبوبة الدقيقة **(Tubulin)** وتغير هيكلها، مما يؤدي إلى منع انقسام الخلايا السرطانية. بالإضافة إلى ذلك، تمتلك هذه المركبات خصائص مضادة للأكسدة تساعد في منع تطور السرطان. **(Khazaei *et al* ., 2014, Jayakumar *et al* .,2010).**

أظهر مستخلص ***Melilotus indicus*** الحندقوق الهندي الميتانولي **(MIE)** قدرته على تثبيط نمو خلايا سرطان الكبد **HepG2**و **SNU-182** دون التأثير على الخلايا الطبيعية**. L-02** يحفز **MIE**موت الخلايا المبرمج عبر مسار مستقل عن الكاسباس، معتمداً على انخفاض **ΔΨm**وزيادة **Bax/Bcl-2**وانتقال **AIF**للنواة. تثبيط **AIF**قلل من تأثير **MIE**، مما يؤكد دوره في تحفيز الموت الخلوي، ما يجعل **MIE** مرشحاً محتملاً لعلاج سرطان الكبد **(El-Hafeez *et al.*, 2018)**.

1-7 التقانات المستخدمة في فصل المركبات الفينولية:

1-7-1 تقانة DiTLC للتحديد الكمي للكومارين في المستخلصات المختلفة:

تعرف تقنية الكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة **TLC (Thin Layer Chromatography)** طريقة تحليلية تستعمل لفصل وتعيين المركبات الكيميائية كيفياً وكمياً في مزيج معين. تعتمد هذه التقنية على مبدأ فصل المكونات بناءً على اختلافها في قدرتها على الالتصاق بطبقة رقيقة من مادة معينة (عادةً مادة السيليكا أو الألومينا)**.**

تتألف من **TLC**:

- الطور الثابت**(Stationary Phase):** يتكون عادةً من شريحة رقيقة مغطاة بمادة مثل السيليكا **(SiO_2)** أو الألمنيوم **(Al_2O_3).** يتم امتزاز الجزيئات الموجودة في العينة على سطح هذه المادة**.**
- الطور المتحرك**: (Mobile Phase)** هو سائل يُستعمل لنقل المركبات عبر الطور الثابت، يمكن أن يكون هذا السائل قطبياً (مثل الماء أو الكحول) أو غير قطبي (مثل الألكانات)، طورت لتقانة **HPTLC** حيث يتم تحميل المواد على صفائح خاصة بهذه التقانة تمتلك جزيئات أصغر من جزئيات صفائح **TLC** العادية، يتم وصلها بجهاز آلي وتحلل المواد بأدوات مؤتمتة، لكن تتميز هذه التقنيات بتكاليف باهظة الثمن **(Hess, 2007)**.

لذلك تم ابتكار طريقة جديدة عملية وبتكاليف قليلة حيث تم استعمال صفائح **TLC** المفلورة العادية وتصويرها لمعالجتها رقمياً تسمى كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة المعززة رقمياً **DiTLC Digital Evaluation of Thin Layer Chromatography)** يمكن في هذه التقنية استعمال الصفائح المفلورة F_{254} دون الحاجة إلى صفائح **HPTLC** الخاصة، وتستعمل آلة تصوير رقمية وبرنامج مجاني لمعالجة صور الصفائح الناتجة **TLC analyzer**،

يمكنه إجراء مسح لصور الصفائح الملتقطة للحصول على معلومات عن المواد الكيميائية المفصولة على صفيحة TLCمما يعني أن **DiTLC** تستخدم للتعيين الكمي للعينات **(Hess, 2007)**، استخدمت هذه الطريقة في التحليل الكمي والكيفي لمركب الكومارين في المستخلصات النباتية الثلاثة بعد تصويرها بكاميرا رقمية **(infinix hot10t)**التي أُخذت في (2023).

1-7-2 تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الدقة HPLC لفصل المركبات الفينولية:

تعتمد هذه التقنية على فصل وتحليل مكونات خليط معين بالاعتماد على اختلاف درجات الامتزاز أو الذوبان بين المركبات والطورين: الثابت والمتحرك. حيث تتحرك كل مركّبات الخليط بسرعات مختلفة وفقاً لقدرتها على التفاعل أو الارتباط بالطور الثابت، وكذلك ذوبانها في الطور المتحرك. يؤدي هذا الاختلاف إلى فصل المركّبات، حيث تخرج من العمود في أزمنة مختلفة تُعرف باسم زمن الاحتباس**.(Retention Time)**

يقوم الكاشف **(Detector)** بتسجيل كل مركب عند خروجه من العمود، مما يسمح بالتعرف عليه. ويتم تحديد المركّبات الفينولية في العينة من خلال مقارنة زمن احتباسها مع تلك الخاصة بمركّبات عيارية قياسية تم تحليلها باستخدام الشروط نفسها.

1-8- طرائق الكشف عن السمية الخلوية للمستخلصات على خلايا سرطان عنق الرحم HELA:

خلايا سرطان **Hela** هو أول خط خلوي بشري خالد، مستمد من خلايا سرطان عنق الرحم لدى هنريتا لاكس عام 1951، يتميز بمعدل تضاعف سريع، وبنشاط تيلوميرازي مرتفع، وعدم استقرار جيني مع عدد غير طبيعي من الكروموسومات، تُستخدم على نطاق واسع في أبحاث السرطان، اختبار الأدوية، دراسة الفيروسات، والهندسة الوراثية، ولعبت دوراً رئيسياً في تطوير لقاح شلل الأطفال.

1-8-1 الكشف عن السمية الخلوية باختبار XTT:

يعتمد اختبار **XTT (2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)** على قدرة الخلايا الحية على اختزال مركب **XTT** (وهو صبغة تيترازوليوم القابلة للذوبان في الماء) إلى فورمازان ملون بواسطة أنزيمات الميتوكوندريا، مما يعكس نشاطها الأيضي، حيث يتم قياس الامتصاصية

عند طول موجي **nm**450–490، حيث تكون شدة اللّون متناسبة مع عدد الخلايا الحية. يُستخدم الاختبار على نطاق واسع في تقييم السمية الخلوية للمركبات الكيميائية والمستخلصات النباتية، واختبار حيوية الخلايا وتكاثرها في الأبحاث الدوائية والطبية.

1-8-2 القياس الخلوي بالتدفق Flow Cytometry:

يعتمد على تحليل خصائص الخلايا الفردية باستخدام مؤشرات فلورية لتمييز الخلايا الحية عن الميتة. بعد معالجة خلايا سرطان عنق الرحم **Hela** بالمستخلصات النباتية، يتم استخدام صبغات فلورية مثل **Annexin V- PI** لتمييز الخلايا الميتة عن الحية. ترتبط الصبغة **Annexin V** بالخلايا التي بدأت بالدخول في مرحلة الموت المبرمج**(Apoptosis)** ، بينما **PI** يخترق الخلايا الميتة فقط التي تكون أغشيتها قد تضررت. من خلال هذه الصبغات، يمكن تمييز الخلايا الحية التي لا تتفاعل مع هذه الألوان عن الخلايا الميتة، مما يسمح بتحليل تأثير المستخلصات على الخلايا من حيث التسمم أو التأثير على دورة الخلية.**(Manhar *et al.*,2024)**

1-8-3 تحليل الدارة الخلوية Cell Cycle Analysis:

يعتمد مبدأ اختبار الدورة الخلوية على استخدام تقنيات تحليلية لفحص توزيع الخلايا عبر مراحل دورة الخلية **(G2/M ،S،G0/G1)** يتم تمييز الخلايا بناءً على محتوى الحمض النووي باستخدام صبغة فلورية مثل **Propidium Iodide (PI)**، التي تتراكم في النوى وتعطي إشعاعاً عند تعرضها للضوء. بعد معالجة خلايا سرطان عنق الرحم **Hela** بالمستخلصات النباتية، يتم استخدام التدفق الخلوي لقياس التألق(التفلور) لتحديد الكمية الدقيقة للحمض النووي في الخلايا عبر مراحل الدورة الخلوية. هذا يسمح بتحديد تأثير المستخلصات على توقف الخلايا في مرحلة معينة من الدورة الخلوية، مثل التأثيرات على مرحلة النمو أو الانقسام، ما يساعد في تقييم فاعلية المستخلصات في إعاقة أو تعديل هذه المراحل.

يُستخدم **(PI)** لتحديد مرحلة الدورة الخلوية من خلال قياس كمية الحمض النووي في الخلايا. عند إضافة **PI** إلى الخلايا، يرتبط البروبيديوم تداخلياً مع **DNA** بشكل نوعي بين **C-G** ولايتراكم في النواة، لذلك تتناسب شدة التفلور لل**PI** مع كمية **C-G**، وبالتالي يسمح ذلك بتمييز الخلايا في المرحلة**G0/G1** عن **S**عن **G2/M**،

من خلال تحليل شدة الفلورا باستخدام جهاز قياس التدفق الخلوي **(Flow Cytometry)** . يمكن تحديد نسبة الخلايا في كل مرحلة من مراحل الدورة الخلوية استناداً إلى كثافة الضوء المنبعث من **PI .(Mason 2022)**

الفصل الثاني

المواد والطرائق
Materials and Methods

2-1 الأجهزة والمواد الكيميائية المستعملة:

يظهر الجدول (1) المواد الكيميائية المستخدمة في هذا البحث:

المواد المستخدمة	الشركة المصنعة
ماءات الصوديوم **NaOH**	**PRS-India**
إيتانول **CH_3CH_2OH**	**EMD-USA**
ميتانول عالي النقاوة**CH_3OH**	**Sigma-Aldrich USA**
دي ميتيل سلفوكسيد **DMSO**	**Atomic Scientific- UK**
أسيتون**CH_3COCH_3**	**Merck- Germany**
خلات النحاس **$Cu(CH_3COO)_2$**	**Riedel- De Haën- Germany**
حمض كلور الماء **HCl**	**SDFCL-India**
حمض الكبريت **H_2SO_4**	**PRS-India**
حمض الخل الثلجي **CH_3COOH**	**ProLab- Bahrain**
حمض كلور الماء **HCl**	**SDFCL-India**
حمض الغاليك **$C_7H_6O_5$**	**Sigma-R&D-USE**
التلوين المضاعف (أحمر كارمن الشبي+ أخضر اليود)	**Riedel- De Haën -Germany**
حمض الأسكوربيك (فيتامين**C**) **$C_6H_8O_6$**	**PRS-India**
كلوريد الحديد الثلاثي **$NaCl_3$**	**ProLab- Bahrain**
الفوسفات ثنائية الصوديوم المائية **$Na_2HPO_4.7H_2O$**	**Sigma-Aldrich USA**
فوسفات البوتاسيوم الحامضية **KH_2Po_4**	**PRS-India**
الفوسفات ثنائية البوتاسيوم **K_2HPO_4**	**PRS-India**

Sigma-Aldrich USA	كاشف فولين – سيكالتو
PRS-India	كربونات الصوديوم Na_2CO_3
KOSDAQ-South Korea	كلوريد الألمنيوم المائية $AlCl_3 \cdot 6H_2O$
Riedel- De Haën-Germany	خلات البوتاسيوم CH_3COOK
TITAN- Indonesia	الروتين $C_{27}H_{30}O_{16}$
Sigma-Aldrich USA	**(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) DPPH**
TITAN-Biotbch- India	كومارين–99% $C_9H_6O_2$
Sigma-R&D-USA	كاتشين– 99% $C_{15}H_{14}O_6$
Sigma-R&D-USA	كيرستين–98% $C_{15}H_{10}O_7$
Sigma-R&D-USA	تولوين C_7H_8
Sigma-R&D-USA	كلوروفورم $CHCl_3$
Sigma-R&D-USA	**ethylenediaminetetraacetic EDTA 2NA $(CH_2N(CH_2CO_2H)2)$acid**
Sigma-Aldrich- Germany	**(-azino-bis(3-ethylbenzoline-2,2 6- ABTS sulfonic acid)**
Riedel- De Haën-Germany	بيرو سلفات البوتاسيوم
Sigma-life science-usa	أنزيم **xanthetin oxidais bovine milk**
Sigma-life science-usa	ركيزة **xanthine boiultra >99%**
TITAN-Biotbch- India	هيدروكسيل الأمين NH_2OH
Sigma-Aldrich Germany	وسط **RPMI**1640
Sigma-Aldrich Germany	سيروم جنين العجل **Fetal Bovine Serum**
Sigma-Aldrich Germany	(بنسلين/ستربتومايسين)1%

PBS موقي فوسفاتي خاص بالزرع الخلوي	**Sigma-Aldrich Germany**
(4-(2-hydroxyethyl)-1-(piperazineethane sulfonic acid) HEPES	**Sigma-Aldrich Germany**
كلوريد البوتاسيوم **KCl**	**Sigma-Aldrich Germany**
كلوريد الصوديوم **NaCl**	**Sigma-Aldrich Germany**
البروبيديوم ايوداید **pi**	**Sigma-Aldrich Germany**
البلورونيك (**Pluronic F-68)**	**Sigma-Aldrich Germany**
(Thiazole Orange) TO	**Sigma-Aldrich Germany**
(Fluorescein isothiocyanate) FITC+ Annexin V	**Sigma-Aldrich Germany**

والجدول (2) الأجهزة والأدوات المستخدمة:

أدوات تشريح، صفائح زجاجية وسواتر، عدسة ميكرومترية، بياشر بسعات مختلفة، أرلينات بسعات مختلفة، عبوات زجاجية بسعات مختلفة، أنابيب اختبار مختلفة الأحجام، أنابيب تثقيل، أنابيب ابندورف، حوامل أنابيب، ماصات ميكروية مع رؤوس.	
مجهر ضوئي طراز B- 180	OPTIKA-Italy
مكبرة	OPTIKA-Italy
هزازة ميكانيكية	JSR -Japan
حاضنة هزازة	JSR-Japan
مطحنة كهربائية	Amanda-Syria
مثقلة طراز Heraeus Labofuge−200	Thermo Fisher Scientific- USA
مبخر دوار طراز IKA RV10	IKA -Germany

مجمدة طراز Hilife	JOUD- Syria
ميزان رقمي	Precise-Switzerland
جهاز تقطير الماء طراز 8	Ivymen
جهاز قياس pH	CRISON-Spain- AC-L
جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer طراز Optizen	Mecasys- Korea
فرن كهربائي	Memmert-Germany
سخان كهربائي مع محرك مغناطيسي طراز ARCS	Velp Scientifica- Italy
حاضنة خلوية مزودة بغاز CO2 5%	Jouan - France
جهاز HPLC	Young lin
جهاز القياس الخلوي بالتدفق Flow cytometry BD FACSCalibur	BD Biosciences- USA

2-2 طرائق البحث:

2-2-1 الاعتيان:

أماكن جمع العينات: تم جمع العينات لخمس أنواع من الحندقوق من مناطق مختلفة من سورية (دمشق_طرطوس _اللاذقية) خلال أعوام (2022_ 2020) من الفترة الممتدة من شباط وحتى أيار للأنواع كافة ماعدا ***M. albus*** **من** تموز إلى كانون الأول، الجدول(3,4).

الجدول (3): المواقع التي جمعت الأنواع منها:

الموقع	التربة	الارتفاع	المناخ	مكان الجمع
دمشق_كلية العلوم	حمراء	700م	جاف وقاري	الحديقة مقابل كلية الحقوق الجديدة

جبلة –عين الشرقية	رملية	288م	رطب وبارد	على جوانب الطرقات
جبلة –الزهيريات	كلسية	20م	رطب ودافئ	على جوانب الطرقات والسواقي
طرطوس –دريكيش	حمراء	550 م	رطب ودافئ	على جوانب الطرقات
جبلة – الحويز	حمراء	160م	رطب ودافئ	في بساتين الزيتون والحمضيات

الجدول (4) الأنواع النباتية ومناطق جمعها ورمزها بقاعدة البيانات

اسم النوع	رمز النوع في قاعدة البيانات	منطقة الجمع	منطقة الجمع في موتيرد (1986)
Melilotus indicus	**M1**	كلية العلوم– دمشق	جرمانا– حمص –حماه
Melilotus sulcatus	**M2**	عين الشرقية –جبلة–اللاذقية	دمشق– هيجانة
Melilotu albus	**M3**	الزهيريات – جبلة–اللاذقية	الربوة – حمص
Melilotus officinalis	**M4**	الدريكيش–طرطوس	حديقة كلية العلوم
Melilotus segetalis	**M5**	الحويز– جبلة–اللاذقية	شرق حمص –حلب –القنيطرة

درست مجمل الصفات المورفولوجية العامة والحقلية للعينات النباتية بعد جمعها مباشرة في الأنواع الخمسة المدروسة التي تم تسميتها وتحديدها وفق الفلورات المتاحة مثل **Mouterde**، **Zohary**، **Post**، فلورا مصر فلورا باكستان فلورا الصين و فلورا مالطا و فلورا إنكلترا وفلورا بلجيكا، فلورا قبرص، فلورا شمال أميركا،WOF، KEW وتم تجفيف المادة النباتية بعد الجمع بمعزل عن الضوء والرطوبة وتم حفظها في معشبة كلية العلوم.

2-2-2 الصفات الشكلية للأنواع المدروسة والتحليل العنقودي للخصائص المورفولوجية المدروسة:

تم التركيز على الصفات الحقلية نظراً لصعوبة تمييز الأنواع في الحقل (الشكل الحياتي، التوطن، الموئل، كثافة الأفراد، الإزهار)، كما تناول البحث الصفات الشكلية الدقيقة (طول النوع، تسنن الأوراق، الأذنات، لون الزهرة، طول حامل الأزهار، عدد الأزهار على حامل الأزهار، لون الكأس، وشكل وتجاعيد القرن، لونه في بداية تشكله وعند

نضجه) لكل من الأنواع المدروسة، وتمّت المقارنة بين الأنواع ال (5) من ***Melilotus Mill.***، المدونة في الجدول (11) وكان حجم العينة هو (20) فرد نباتي للإحصاءات العددية والوصفية حيث عولجت إحصائياً. ليتمّ ادخالها ضمن تحليل بياني عنقودي يظهر مدى العلاقة التطورية بين الأنواع.

2-2-3 دراسة مورفولوجيا البذور:

تم جمع قرون الأنواع المدروسة لجنس الحندقوق حوالي(15-30) قرن، ثم تم فتحها بالمشرط، ووضع عدد من البذور على صفيحة زجاجية ودراستها تحت المكبرة بتكبير 40x حيث تمت دراسة الصفات المورفولوجية (طول -عرض، اللون، تزيينات (الشكل الخارجي)، توضع النقير، شكل النقير، سماكة الوجه الجانبي).

2-2-4 الصفات التشريحيةAnatomical characteristics:

2-2-4-1 - تشريح الزهرة:

أُخذت الأزهار مكتملة النمو من نورات مختلفة لعدة أفراد وتم تشريحها باستخدام دبابيس وفحصها تحت المكبرة على الورق المليمتري.

2-2-4-2 دراسة المسام:

وأُخذت سلخات من البشرة السفلية للورقة للثلث المتوسط من الورقة مكتملة النمو لتحديد نمط الثغور وتوزعها ضمن ساحة المجهر (400x)، وجُهزت محضرات الدراسة ولّونت ووضعت ضمن صفائح وساترات (**sheikh *et al.*, 2016 , ozbak *et al.*, 2014**، حمد وآخرون 2010).

2-2-4-3 الدراسة التشريحية لمقاطع العرضية في الساق والأوراق:

دُرست العينات الجافة والطرية، وأجريت مقاطع تشريحية عرضية يدوية بواسطة المشرط الحاد لكل من الساق (بأقطار متشابهة) والورقة (بأحجام وترتيب عقد متشابه) لأفراد مكتملة النمو، وتم أخذ العينات من نفس العمر للأنواع الخمسة المدروسة، ولُونت بالتلوين المضاعف (أحمر الكارمن_أخضر اليود).

وتم دراسة النسج النباتية المكونة تحت المجهر الضوئي بالتكبير (100)X و(400)X.

2-3 تحضير المستخلصات النباتية:

طحنت االأجزاء الهوائية للعينات بعد تجفيفها في الظل بواسطة مطحنة كهربائية من نوع أماندا لنحصل على مسحوق جاف، ثم جرى تحضير ثلاث مستخلصات باستعمال الماء والميتانول المطلق والإيتانول 70%، حيث تم وزن (30)غ من المسحوق النباتي الجاف للأجزاء الهوائية ووضعه في عبوة زجاجية سعة (500)مل، ثم أضيف المذيبات المختلفة بنسبة (10/1) من الوزن، ثم وُضعت على هزازة بسرعة (120) دورة في دقيقة لمدة ثلاثة أيام ثم رُشحت بورق الترشيح **wathman** لمرتين على الأقل لضمان خلوها من المعلقات النباتية، ثم بُخر السائل الناتج بالمبخر الدوار لنحصل على المادة الجافة بدرجة حرارة (40°C) وحُفظت في درجة حرارة (−20°C). وقد تم حساب النسبة المئوية للمردود لكل مستخلص باستخدام المعادلة:

$$Y\% = (W1 * 100)/W2$$

حيث (W1) وزن المستخلص بعد تبخير المذيب، (W2) وزن العينة الجاف.(**Alani & Haleem 2014, Mladenović *et al.*, 2016, Tarawneh *et al* .,2008).**

2-4 طرائق الكشف عن المستقلبات الثانوية في الخلاصات النباتية قبل التبخير:

2-4-1 الكشف عن الفلافونوئيدات Flavonoids: يضاف بضع قطرات من محلول الأمونيا **(10%)** إلى 3**ml** من المستخلص، يدل ظهور اللون الأصفر على وجود الفلافونوئيدات. **(Balamura *et al.*, 2019).**

2-4-2 الكشف عن القلويداتAlkaloids: تضاف قطرات من الكواشف التالية (ماير، دراجندروف،**$FeCl_3$)** إلى المستخلص يدل ظهور راسب أبيض، راسب برتقالي، راسب أصفر على التوالي على وجود القلويدات. (نعمه وآخرون**2017**،**Balamurugan *et al.*, 2019,Soni&Sosa 2013**).

2-4-3 الكشف عن التانينات(Tannins) : يؤخذ 2**ml** من المستخلص ويضاف إليه 1**ml** من كلوريد الحديد الثلاثي**1%($FeCl_3$)**، تلون المحلول بلون أخضر بني أو أخضر مسود دليل على وجود التانينات

. (Ajianade&oderind 2011, khan &Akhtar 2012, Maham et al., 2021).

2-4-4 الكشف عن الكومارينات Coumarins: يؤخذ **2ml** من المستخلص ويضاف **3ml** من محلول **NaOH (10%)** إليها، يشير ظهور اللون الأصفر إلى وجود الكومارينات. **(Soni and Sosa 2013)**.

2-4-5 الكشف عن الصابونينات Saponins: يتم إجراء اختبار الرغوة بإضافة القليل من الماء المقطر إلى **2ml** من المستخلص النباتي، ثم يرج المحلول بقوة ثم يترك لمدة **20** دقيقة، و يتم تقييم محتوى الصابونين كالتالي:

عدم تشكل رغوة = اختبار سلبي، وهذا يعني عدم وجود الصابونين.

رغوة أقل من **1cm** = اختبار إيجابي ضعيف، وهذا يعني وجود الصابونين بكمية ضعيفة.

رغوة من **1-2cm** = اختبار إيجابي، وهذا يعني وجود الصابونين.

رغوة أكثر من **2cm** = اختبار إيجابي للغاية، وهذا يعني غني جداً بالصابونين. **(Khan &Akhtar 2012)**.

2-4-6 الكشف عن الصابونوزئيدات Saponosides: نضع **5ml** من كل مستخلص في أنابيب اختبار ترج جيداً، عند تشكل رغوة ثابتة نضيف لها من(5-6) قطرات من الزيت. تشكل المستحلب يدل على تواجد الصابونوزيدات **(Soni&Sosa 2013)**.

2-4-7- الكشف عن التربينوئيدات الثنائية Diterpenoids: يضاف بضع قطرات من محلول خلات النحاس 10% إلى **1ml** من المستخلص، ظهور لون أخضر يدل على وجود التربينات الثنائية **(Morsy, 2014)**.

2-4-8- الكشف عن التربينوئيدات الثلاثية Triterpenes: يضاف **1ml** من كبريتات النحاس اللامائية إلى **1ml** من المستخلص ثم توضع بضع قطرات من **HCl** المركز، يدل ظهور اللون الأخضر المزرق على وجود التربينوئيدات الثلاثية.

2-4-9 الكشف عن الستيروئيدات Steroids والتربينات الثلاثيةTriterpenes (اختبار Salkowski): يؤخذ **2ml** من المستخلص ويضاف اليه **5ml** من الكلوروفورم ثم يضاف إليه حجم مماثل من حمض الكبريت المركز بحذر على جدار الأنبوب، وفي حال وجود الستيروئيدات تتلون طبقة الكلوروفوم بالأحمر، بينما تبدو طبقة حمض الكبريت بلون أخضر متدرج **(Balamurugan *et al.*, 2019،Soni&Sosa 2013)** .

2-4-10 الكشف عن الغليكوزيدات القلبية (Keller-kiliani): أخذ 1**ml** من المستخلص وأضيف إليه 1**ml**من محلول كلوريد الحديد الثلاثي **($FeCl_3$)5%** وقطرات من حمض الخل الثلجي، ثم أضيف بضع قطرات من حمض الكبريت المركز. في حال وجود الغليكوزيدات القلبية تظهر حلقة بنية أو بنفسجية تدل على وجود غليكوزيدات منزوعة الأوكسجين (أو لون أخضر متدرج في طبقة حمض الخل). **(Ajianade&oderind 2011,Soni &Sosa2013,Morsy 2014).**

2-4-11 الكشف عن الكربوهيدرات carbohydrates: نأخذ 1**ml** من المستخلص ثم نضيف 1**ml** من **H_2SO_4** ممدد ثم 2**ml** من محلول **A+B Fehling** ويشير تشكل راسب أحمر إلى إيجابية التفاعل.

(Morsy 2014, Maham *et al*., 2021).

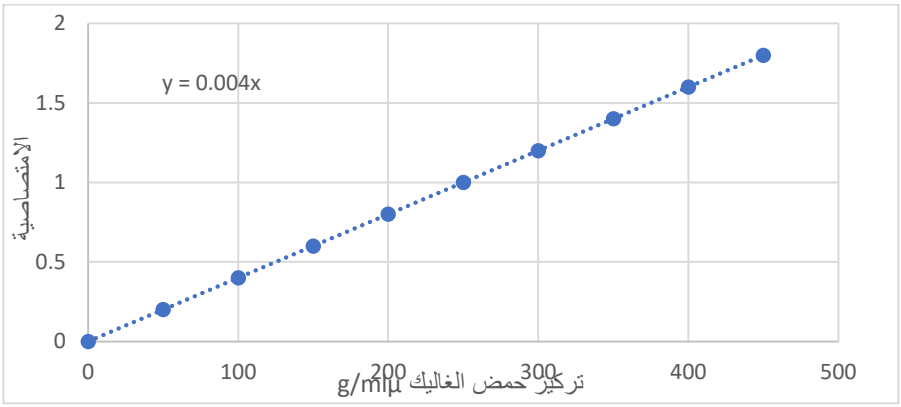
2-5 التقدير الكمي للمركبات الفينولية في المستخلصات:

2-5-1 التقدير الكمي للفينولات الكلية في الأنواع المدروسة Total Phenol(TP):

حُدد المحتوى الفينولي الكلي في الأجزاء الهوائية باتباع طريقة كاشف الفولين–سيكالتو **Folin-Ciocalteu reagent (FCR)** في وسط قلوي، فينتج عنه محلول أزرق تُقاس امتصاصيته عند طو ل الموجة 750**nm** باستخدام جهاز المطياف الضوئي **(Shaghaghi *et al.*, 2008,Alhafez *et al.*, 2020).**

وفق طريقة العمل: وُضع 1**ml** من المستخلص الممددة بالإيتانول (50%) في أنبوب اختبار وأُضيف **4.8ml**ماء ثنائي التقطير و**4ml**كربونات الصوديوم اللامائية 2% و **0.2 ml** من كاشف فولين، يُحرك المزيج ويترك في الظلام عند درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة بثلاث مكررات لكل مستخلص وتحديد المتوسط، ثم قيست الامتصاصية عند طول الموجة **760nm**بجهاز السبيكترومتر.

استخدام شاهد يحوي جميع المواد والكواشف واستبدال العينة بالايتانول 50%، وتم تعيين المحتوى الكلي للفينولات في الخلاصات النباتية من معادلة المنحني المعياري (المعادلة) وتقدر بعدد الميللي غرامات المكافئة لحمض الغاليك لكل 1غ من الوزن الجاف الشكل (8).

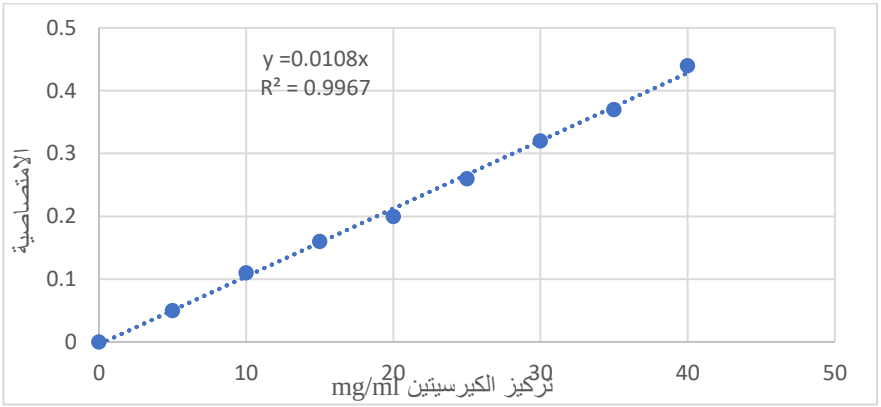


الشكل (8): السلسلة العيارية لحمض الغاليك.

2-5-2 تعيين المحتوى الكلي للفلافونوئيدات TF:

حُدد محتوى الفلافونوئيدات الكلي باستخدام كاشف ثلاثي كلوريد الألومنيوم **$AlCl_3$**، حيث تعتمد هذه الطريقة على تكوين معقد فلافونوئيد–ألومنيوم ذو اللون الأصفر وقيست الامتصاصية عند طول موجة **nm** 415.

أخذ **0.5 mg** من كل مستخلص وحُل في الميتانول بشكل منفصل، وتم إضافة **1.5 ml** من الميثانول و**0.1 ml** من كلوريد الألومنيوم (10%)، و**0.1 ml** من خلات البوتاسيوم**1M** و**2.8ml** من الماء المقطر، وتُركت الأنابيب تتفاعل عند درجة حرارة الغرفة لمدة(30) دقيقة. (بثلاث مكررات لكل مستخلص) ثم سُجلت امتصاصية كل تركيز عند **415 nm**، تم تحضير بالطريقة ذاتها محاليل ممددة للكيرستين تتراوح تراكيزها ما **(0.350-0)mg/ml**، وتم تعيين محتوى الفلافونوئيدات في الخلاصات النباتية من معادلة المنحني المعياري للكيرسيتين (المعادلة) وتقدر بعدد الميللي غرامات المكافئة للكيرسيتين لكل**1**غ من الوزن الجاف (**Alhafez 2020 , Shaghig 2009**) الشكل (9).

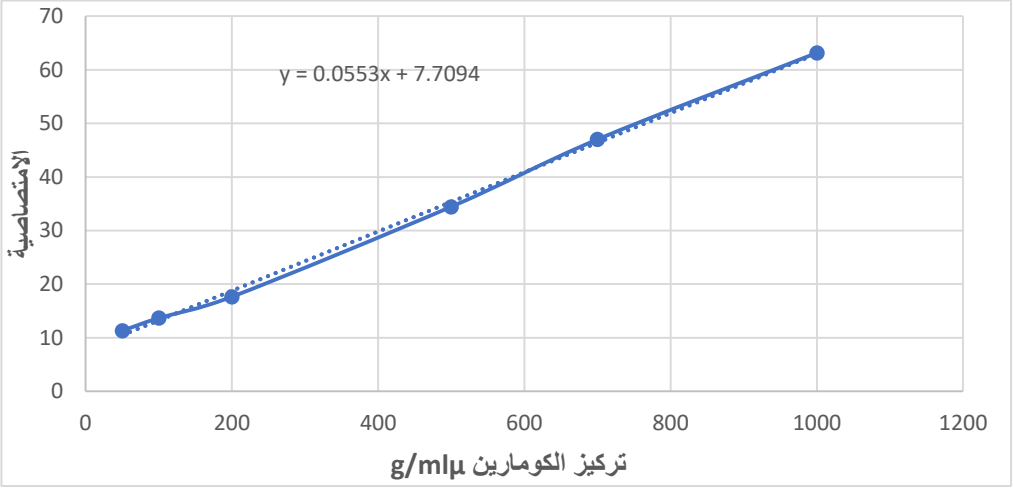


الشكل (9): السلسلة العيارية للكيرسيتين

2-5-3 التحديد الكمي للكومارين في الأنواع في المستخلصات المختلفة بتقانة DiTLC:

تُحضر سلسلة من المحاليل القياسية للكومارين بتراكيز متزايدة **µg/ml**(1000,700,500,200,100,50) من المادة المدروسة، حيث ذُوِّبت العينات في **1ml** من الإيثانول المطلق لضمان التجانس الكامل(**Verushkin *et al.*,2021**).

ويتم تنشيط صفائح **TLC** المفلورة بتسخينها في فرن بدرجة حرارة 120°م لمدة 20 دقيقة لضمان تجفيفها الكامل وتحسين قدرتها على الامتصاص.(**Ahmed *et al.*, 2017**).وباستخدام ماصة دقيقة، تُحمل **5 µl** من كل تركيز على الصفائح المهيأة، مع الحفاظ على مسافات منتظمة بين النقاط المحملة. تُترك الصفائح لتجف في الهواء لضمان ثبات العينة، ويُحضر الوسط المتحرك المكون من مزيج ثلاثي من التولوين، الكلوروفورم، والأسيتون بنسبة (45: 5: 55) المشبع بحمض الخل الثلجي(**Pascual *et al.*, 2002**)، وهو الوسط الذي يضمن فصلاً فعالاً لمكونات العينات، توضع الصفائح بعناية في حوض **TLC** يحتوي على الوسط المتحرك بحيث تلامس أطرافها السفلية سطح الوسط المتحرك. يُغلق الحوض بإحكام لضمان التشبع والتحكم في التبخر، ثم تترك الصفائح في الحوض حتى يتحرك الوسط إلى الأعلى، حاملاً معه الكومارين على طول الصفائح لمدة 30دقيقة، تسحب الصفحية وتجفف ثم يتم تعريض الصفيحة للأشعة فوق البنفسجية بطول موجة **256nm**، تؤخذ صورة للصفحية بواسطة كاميرا رقمية **Inifinx hot 10t** بدقة **48mp** ،و تم حساب قيمة **RF** يدوياً حسب العلاقة: مسافة حركة البقعة / مسافة حركة المذيب ومقارنته بالمراجع والمادة العيارية، يتم تحميل الصورة على برنامج **TLC analyzer**حتى يتم حساب الكثافة الضوئية لكل بقعة عن طريق المعادلة:**OD = 2(B/20)**



الشكل (10): السلسلة العيارية للكومارين

تم تحضير محلول لكل نوع من الخلاصات النباتية بتركيز **(50) mg/mL** باستخدام المذيب المناسب لكل مستخلص لضمان ذوبانه الكامل وتحقيق تجانس المحلول، بعد ذلك، جرى تنشيط صفيحة **TLC** المفلورة **(20 cm × 20)** بتسخينها في فرن مُسبق التسخين عند درجة حرارة **120°C** لمدة **20** دقيقة ، وذلك بهدف تحسين امتصاصية الطبقة الرقيقة وتعزيز كفاءة عملية الفصل. تم تحميل **20µl** من كل مستخلص على الصفيحة، وفق ترتيب محدد مع الحفاظ على مسافات منتظمة بين العينات، وترك مسافة **1.5 cm** من الحواف الجانبية والسفلية. كما تم تحميل محلول قياسي للكومارين بتركيز **1mg/mL** ليُستخدم كمرجع للمقارنة..

وبعد تكرار الخطوات المذكورة سابقاً وبمجرد وصول الطور المتحرك إلى قرب نهاية الصفيحة، تُخرج وتترك لتجف في الهواء. ثم عُرضت الصفيحة بعد ذلك لأشعة **UV** للكشف عن المركبات المنفصلة، ثم حُسبت الكثافة الضوئية للبقع باستخدام برنامج **TLC Analyzer**. بعد تصويرها بكاميرا الهاتف المحمول واستُخدمت القيم الناتجة لحساب كمية مركب الكومارين في العينة بوحدة **mg/co E** من العينة، وذلك من خلال تعويضها في معادلة السلسلة المعيارية للمركب.

2-5-4- التحديد الكمي لبعض المركبات الفينولية في المستخلص الإيتانولي 70% باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC):

حُددت بعض المركبات الفينولية الهامة التي تكسب الأنواع أهمية حيوية، مما يتيح تقييما جيداً للتركيب الكيميائي لهذه النباتات حيث تمت مقارنة هذه المركبات الناتجة بمركبات عيارية بتطبيق الشروط نفسها.

حيث كُشف عن وجود بعض المركبات العيارية (حمض الغاليك، حمض الأسكوربيك، الكيرسيتين، الكومارين، الكاتشين، حمض الفيروليك، الروتين) في المستخلص الإيتانولي **70%**، حيث وُزن **g**0.02 من كل مادة عيارية وحلها في**500µl** من الإيتانول المطلق فتم الحصول على تركيز **0.02g/ml**، وتم وزن **g**0.02 من كل المستخلص جاف لكل نوع نباتي في **µl** 500 من الماء المنزوع الشوارد للحصول على محلول بتركيز **0.04g/ml**. ثم رُشحت العينات بفلاتر **2 µm**.

الشروط الخاصة بجهاز HPLC:

تم التحليل بجهاز **Young lin** باستخدام نظام الإزاحة المتدرج بمعدل **1 ml/min** ، حيث استخدم طور حامل مؤلف من ماء محمض بحمض الخل الثلجي(5%) **B:** استيو نتريل**A** بنسب مزج مختلفة وفق الجدول الزمني التالي (5):

الجدول(5): نظام الزمني المتدرج لـHPLC		
Time (min)	**A%**	**B%**
Initial	**8.0**	**92.0**
0.01	**8.0**	**92.0**
2.00	**10.0**	**90.0**
27.00	**30.0**	**70.0**
37.00	**56.0**	**44.0**
37.10	**8.0**	**92.0**
45.00	**8.0**	**92.0**

(Mradu *et al.*, 2012, Istasse *et al.*, 2016, Singh *et* al., 2017, Dimcheva *et al.*, 2019, Safarpour *et al.*, 2015)

يبين الجدول (6) شروط جهاز **HPLC**:

الجدول **(6)**: الشروط تحليل **HPLC**	
نوع العمود الكروماتوغرافي	**Intertsustain c18 5µm 4.6*250 mm**
درجة حرارة العمود	**35°C**
الكاشف	**كاشف الأشعة فوق البنفسجية والمرئية**
طول الموجة	**(256-280)nm**
الطور المتحرك	**ماء محمض بحمض الخل الثلجي (0.5%)B: اسيتونتريل A**
التدفق	**(1)ml/min**
حجم الحقنة	**(10)µ**

جرى حقن المركبات العيارية والتحقق من زمن خروجها عند طول الموجة المناسب لكل مركب وفق الجدول التالي:

الجدول (7): زمن احتباس المركبات العيارية بتحليل HPLC			
اسم المركب	طول الموجةnm	R_t min	Area
حمض الغاليك	256	14.4	2255.77
الروتين	256	17.72	1241.42
حمض الفيروليك	256	12.8	96019.83
حمض الاسكوربيك	256	1.7	17535.73
الكيرستين	280	4.1	783.26
الكومارين	280	21.8	115171.58
الكاتشين	280	2.7	17535.73

ثم حدد محتوى المستخلص الإيتانولي 70% للأنواع بعد مقارنة مساحة كل مركب مع المركب العياري وفق العلاقة:

المادة المراد حساب تركيزها%= تركيز الستاندر *(مساحة العينةpeak/مساحة المادة العياريةpeak)*(التمديد/وزن العينة) ملغ/(100)غ من المادة المستخلصة.(Raza *et al.*, 2018, Aravinna 2008,).

2-6 اختبار فعالية المستخلصات على تثبيط الجذور الحرة

2-6-1 باستخدام (DPPH):

مبدأ الطريقة: يظهر محلول **(DPPH)** قدرة امتصـــاص عالية عند طول الموجة **517nm** بســبب الكترونه الحر المســـتقر فيظهر بلون بنفســـجي غامق ويختفي اللون مع فقدانه الالكترون، وتعتمد درجة زوال اللون على عدد الالكترونات المكتسـبة **(Ke Dare SB, 2011)** وعادة ما تتم المقارنة مع حمض الاسـكوربيك كمركب مرجعي في تثبيط الجذور الحرة.

وُضع في أنابيب اختبار **1ml** من المستخلصات النباتية المدروسة بتراكيز تراوحت بين **µg/ml(31.2 -1000)** ثم يضاف لكل أنبوب **1ml** من **DPPH** المذاب في الميتانول ذو التركيز **450mM**، حُركت بعدها الأنانيب جيداً، ثم

تُركت في الظلام لمدة30 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة. (بتكرار ثلاث مرات من كل مستخلص)، ثم قيست الامتصاصية عند طول موجة **517nm** باستخدام السبيكترومتر، وحُسبت النسبة المئوية لتثبيط الجذور الحرة للخلاصات النباتية وحمض الاسكوربيك وفق المعادلة **I%**، بوجود أنبوب شاهد يحوي الميتانول–الموقي:

I DPPH % = [(Ab-Aa) /Ab)] *100.

Ab : امتصاصية محلول **DPPH.**

Aa : امتصاصية العينة.

(Maldenovic *et al.*, 2016 ,sonju *et al.*, 2017, sisay *et al.*, 2021 ,stefanovic *et al.*, 2015 ,nez *et al.*, 2017,borhani *et al.*, 2023)

2-6-2 تعيين القدرة على تثبيط الجذور الحرة باستخدام $ABTS^{\cdot+}$:

يعتمد تفاعل **ABTS** على قدرة المستخلصات النباتية على إزاحة الجذر الكاتيوني $ABTS^{\cdot+}$ الذي يتم تشكليه من أكسدته عند إضافة بيرو سلفات البوتاسيوم ($K_2S_2O_8$) فيظهر اللون الأخضر المزرق لا يلبث أن يتحول إلى محلول عديم اللون عندما يضاف له مركب قادر على كسب هذا الالكترون فتقاس قدرته بقياس الامتصاصية عند طول الموجة **734nm.**

تحضير محلول $ABTS^{\cdot+}$:

تم تحضير محلول إيتانولي من **ABTS** بتركيز **7mM** وأضيف له حجم مماثل من محلول بيرو سلفات البوتاسيوم **2.45mM**، وتُرك المزيج في الظلام لمدة (12-16) ساعة؛ ثم مدد بالإيتانول النقي لتصبح امتصاصيته إلى 0.7±0.05 عند طول الموجة **734nm**، وبهذا أصبح المحلول جاهزا للاستعمال.

أُخذ **1ml** من محلول $ABTS^{\cdot+}$ وأضيف إليه **1ml** من المستخلص بتراكيز مختلفة **µg/ml**(1000-31.25) وحُضنت لمدة (20-30) دقيقة في الظلام (بثلاث مكررات لكل مستخلص)، ثم قيست الامتصاصية عند طول الموجة 734**nm** باستخدام السبيكترومتر، وتمت مقارنة العينات مع حمض الاسكوربيك باعتباره مركب مرجعي في تثبيط الجذور الحرة، حيث حُضرت ركيزة ممددة بالتراكيز المدروسة ذاتها وحُسبت النسبة المئوية لتثبيط الجذور الحرة وذلك وفق المعادلة **I%**، وبوجود شاهد يحوي الإيتانول:

. I ABTS % = [(Ab-Aa) /Ab)] *100

حيث **Ab:** امتصاصية محلول $ABTS^{\cdot+}$**.**

Aa: امتصاصية العينة.

2-7 عزل الكومارين وتنقيته:

تم تحضير محلول من المستخلص الإيثانولي (70%) لنبات ***Melilotus indicus*** بتركيز **50 mg/ml**، ثم تم حقن **50 µl** من هذا المستخلص على صفيحة **TLC** مهيأة مسبقًا على شكل شريط، إلى جانب محلول الكومارين المعياري، مع تكرار نفس خطوات الترحيل المذكورة سابقًا باستخدام نفس الطور المتحرك المشبع بحمض الخل الثلجي. بعد اكتمال عملية الفصل، وُضعت الصفيحة تحت الأشعة فوق البنفسجية عند طول موجي **245 nm.** بعد التأكد من وجود المركب المطلوب من خلال ظهور بقعة متألقة تحت الأشعة فوق البنفسجية، تم تحديد موضعها على الصفيحة، ثم قشطت البقعة بعناية، ووضعت في **3 mL** من ثنائي الإيثيل إيثر لاستخلاص المركب من طبقة السليكا جل، بعد ذلك، يتم ترشيح المحلول لفصل حبيبات السليكا، بهدف الحصول على مستخلص إيثري يحتوي على مركب الكومارين، وكررت عملية الاستخلاص ثلاث مرات لضمان استخراج كامل الكمية (الباشا، 2018**).** تم التأكد من هوية المركب المستخلص باستخدام صفيحة **TLC** جديدة باستخدام الطور المتحرك نفسه والمشبع بحمض الخل الثلجي**(1%)** كما تم حفظ جزء من المستخلص الإيثري لتحليله لاحقًا باستخدام تقنية **HPLC**، وذلك بمقارنة المركب المفصول مع الكومارين المعياري للتحقق من تطابق الهوية الكيميائية**.**

2-8 دراسة فعالية بعض المستخلصات في تثبيط أنزيم Xanthin Oxidaise (أكزاتين اوكسيداز):

تم في هذه المرحلة تقييم فعالية المستخلصات الميثانولية والإيتانولية (70%) لثلاثة أنواع من نبات الحندقوق **:** ***Melilotus indicus, Melilotus albus, Melilotus officinalis***، في تثبيط نشاط أنزيم **Xanthine Oxidase** لأول مرة في سورية. استخدم **Allopurinol** (شركة ابن سينا) كمرجع للمقارنة مع فعالية المستخلصات في تثبيط الأنزيم الذي يعتبر الشاهد الإيجابي، بالإضافة إلى الشاهد السلبي (بدون وجود المستخلص أو المركب المرجعي)،

وثم قيست الامتصاصية عند طول موجة **(295)nm**، ثم قيست الفعالية المثبطة للأنزيم بحسابها كنسبة مئوية لتثبيط تشكيل حمض البول وفق المعادلة:

$$\mathbf{PI\%=1-^{*}\ \frac{ODA}{ODB}*100}$$

حيث **ODA** تمثل امتصاصية التفاعل بوجود العينة.

و **ODB** تمثل امتصاصية التفاعل بغياب العينة.

المحاليل اللازمة:

- الموقي الفوسفاتي بتركيز **0.2M**، **PH=7.5**:

نزن **87.09g** من K_2HPO_4 بتركيز **1M** ونحله بـ **500ml** من الماء المقطر م1، نزن **68.08g** من KH_2PO_4 بتركيز **1M** ونحله في **500ml** من الماء المقطر(م2). ثم نضع من م1 **70.2ml**، ونأخذ من م2 **(29.8)ml**. ثم نزيد ماء مقطر حتى **500ml**.

- محلول **EDTA** تركيز **0.5M**: نزن **1.86g** من **EDTA.NA** ونحلها في **50ml** من الموقي الفوسفاتي.
- محلول هيدروكسيل الأمين **100mM**: نزن **70mg** ونحلها في **10ml** من الماء المقطر.
- تحضير ركيزة **Xanthine**: نزن **0.3mg** من **Xanthine** ونحلها في **20ml** في الموقي الفوسفاتي .
- محلول الأنزيم **XO** بتركيز **7.5mu/ml**: حيث يؤخذ **7µl/ml** من الأنزيم ويحل إلى بـ **1ml** من الموقي الفوسفاتي.
- تحضير محلول **0.85M HCL**: نأخذ **3.29ml** من حمض كلور الماء المركز ونضيفها إلى**100ml** من الماء المقطر.

تم تقييم قدرة مستخلصات الحندقوق على تثبيط تكوين حمض البول بواسطة أنزيم أكزانتين اوكسيداز وفقاً للطريقة المذكورة من(**nouru *et al.*, 1983**) حيث نحضر خليط التفاعل **1.7ml** يتكون من:

جُهّز مزيج التفاعل بخلط **1000 µl**من محلول الأكزانتين**(Xanthine)** ، المذاب في محلول الفوسفات المنظم عند **pH = 7.5**، مع **400 µl** من محلول **EDTA** بتركيز **0.5 M**، ثم أُضيف إلى المزيج **4 µl** من محلول هيدروكسيل الأمين، إلى **196 µl** من محلول الفوسفات.

بعد ذلك، أُضيف **100 µl** من مستخلصات الأنواع الثلاثة، بتراكيز مختلفة تراوحت بين **10–1000 µg/ml**، والمذابة في الميثانول أو الإيثانول، حيث نُفّذت التجربة بتكرارين لكل تركيز.

يبدأ التفاعل بإضافة **300µl** من إنزيم الإكزانتين أوكسيداز **(XO)** بتركيز **7.5 µU/ml** مذاب في محلول الفوسفات، ليُستكمل حجم التفاعل النهائي إلى **2 ml** وُضع المزيج في الحاضنة عند درجة حرارة **37°C** لمدة **30** دقيقة، ثم يوقف التفاعل بإضافة **300 µl** من حمض كلور الماء **HCl** بتركيز **0.58 M** جرى بعد ذلك قياس الامتصاصية عند طول الموجة **295 nm** باستخدام جهاز المطياف الضوئي، مع تسجيل امتصاصية الشاهد السلبي (الذي يحوي جميع مكونات التفاعل عدا الإنزيم **XO)** ، وكذلك الشاهد الإيجابي (الذي يتضمن جميع المكونات باستثناء المستخلص).

عُبّر عن نتائج الفعالية من خلال حساب النسبة المئوية لتثبيط نشاط الإنزيم، مما يعكس القدرة التثبيطية للمستخلصات النباتية قيد الدراسة.

2-8-1 الكشف عن شوارد superoxide $O^{\cdot -2}$:

للكشف عن السوبر أوكسيد ($O^{\cdot -2}$) يتم عن طريق التفاعل بين حمض السلفانيليك ($C_6H_7NO_3S$) الذي يستعمل للتلوين **(300)µl/ml** و**N- (1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochoride** ، **5µl/ml** وحمض الخل **CH3COOH** (16.7%). بعد حدوث التفاعل بين الأنزيم وركيزته يتم أخذ حوالي **1ml** من خليط التفاعل مع **1ml** من المزيج السابق ويحضن في درجة حرارة الغرفة لمدة (30) دقيقة، ثم يتم قراءة امتصاصية التفاعل عند طول الموجة**550nm** باستخدام المطياف الضوئي **(Oyanagui 1984)**. وقد استخدم الألوبيورينول كمركب إيجابي، والذي يستخدم بشكل عام لعلاج مرض النقرس.

وتم استخدام الصيغة التالية لتقدير الفعالية المضادة للتأكسد بنسبة تثبيط السوبر أوكسيد:

PI=(1-DOA/DOB)*100

PI : نسبة التثبيط.

DOA : امتصاص المحلول في وجود المستخلص.

DOB : امتصاص المحلول في غياب المستخلص.

2-9 دراسة السمية الخلوية على خط سرطان عنق الرحم Hela:

تم تقييم التأثير السمي للمستخلص الإيتانولي(70%) لنوعي ***M.albus M.officinalis*** باستخدام اختبار السمية الخلوية **XTT** على خلايا سرطان عنق الرحم **Hela.** تم الحصول على الخلايا من هيئة الطاقة الذرية وحُفظت في وسط الزرع **RPMI-1640** المكمل بـ (10%) من المصل البقري الجنيني المعطل بالحرارة، بالإضافة إلى **(100)un/ml** بنسلين، **(100)µg/ml** ستربتومايسين.

تمت زراعة خلايا **Hela** في صفائح تحتوي على **(96)** بئراً، حيث وُزّعت **(15,000)** خلية في كل بئر. بعد ذلك، حُضر تراكيز مختلفة من المستخلصات النباتية بين **5-90 µg/ml** باستخدام مذيب **DMSO**، وإضافتها إلى وسط الزرع، ثم أُضيف **100 ml l** من وسط الزرع المحتوي على المستخلصات بالتراكيز المختلفة إلى كل بئر، ونفذت سبعة مكررات لكل تركيز لضمان دقة النتائج، إضافة إلى استخدام شاهد سلبي لمقارنة النتائج

بعد ذلك، حُضنت الصفائح في حاضنة تحتوي على (5%) من CO_2، بنسبة رطوبة (95%)، ودرجة حرارة (37) درجة مئوية لمدة (48) ساعة، وتم قياس الامتصاصية عند طول الموجة **nm**(450) باستخدام قارئ الصفائح، وحُسبت نسبة العيوشة الخلوية باستخدام العلاقة التالية:

نسبة العيوشة %=امتصاصية الآبار المعالجة /امتصاصية الشاهد السالب *100.

ثم حُددت قيمة **IC50%** لكل مستخلص نباتي، واختيار التركيزين الأكثر فعالية لمواصلة دراسة الخلايا باستخدام تقنية التدفق السيتومتري **(Flow Cytometry)** وتحليل دورة الخلية وتقييمها.

2-9-1 طرائق القياس الخلوي بالتدفق Flow Sytomtry:

2-9-1-1 تحليل الدارة الخلوية:

بينما يرتبط **Annexin/v**مع فوسفاتيديل سيرين في الغشاء الخلية

المحاليل اللازمة:

- موقي التلوين: وهو محلول فيزيولوجي فوسفاتي موقي **PBS** يحتوي على البلورونيك **(Pluronic f – 68)** بتركيز (0.2%).
- محلول الثيازول أورنج =**(TO)** بتركيز **42µM/ml** منحل في **DMSO**. يحفظ هذا المحلول في مكان مظلم وبدرجة حرارة (2–8)° م.
- محلول البروبيديوم ايوداید= **(PI)** بتركيز **4.3mM** منحل في الماء. يحفظ هذا المحلول في الظلام عند درجة حرارة (2–8)° م.

طريقة العمل:

يمدد المعلق الخلوي بمحلول التلوين بنسبة 1:10، يضاف **4µl** من محلول **TO** و**2µL** من محلول **PI** ويرّج الأنبوب بلطف ويترك في مكان مظلم لمدة (5) د عند درجة حرارة الغرفة، وتحلل العينة في جهاز القياس الخلوي بالتدفق– **BD FACSCalibur Flow Cytometry**، وتعالج البيانات باستعمال برنامج **Cell Quest**.

2–9–1–2 دراسة الموت الخلوي المبرمج باستعمال Annexin v/p:

المحاليل اللازمة:

Annexin V الموسوم ب**FITC**(**fluorescein isothiocyanate**) **(FITC-Annexin v)**

محلول البروبيديوم إيوداید **(propodoium iodide) PI**، يخزن عند درجة حرارة (+4)°م.

محلول موقي ارتباط الأنكسين -**V**، ويتكون من: **(0.1) M HEPES**، **0.4 M NaCl**، **K**،**25mM $CaCl_2$**، تضبط درجة **PH** المحلول عند **7.5** بماءات الصوديوم **NaOH**.

الأنكسين -**V** الموسوم **FiTC**، يخزن عند درجة حرارة (–80)°م.

محلول **PBS**: ويتكون من **8g NaCl**، **0.2g KCl**، **1.44g $Na_2HPO_4.7H_2O$**، **(0.24)g KH_2PO_4**. تحل الكميات في **800ml** ماء مقطر منزوع الشوارد ثم تضبط **PH** إلى 7.2، ويتمم المحلول إلى**1L** ثم يرشح عبر فلتر مساميته **0.22µm**، ويحفظ في البراد.

طريقة العمل:

يضاف من معلق الخلايا الموافق (**1*106** خلية/مل)، إلى أنبوب سعة **15ml**، **1ml** ثم يضاف فوقها 10**ml** مل من محلول **PBS** البارد، ثم التثفيل بقوة نبذ (300*)ج مدة (5) د عند درجة حرارة الغرفة، ثم سحب الطافي وطرحه، ثم تكرر هذه العملية مرة ثانية.

تعلق الخلايا في كل أنبوب 1 مل من محلول ارتباط الأنكسين−**V**، وبعد المزج جيدا، ينقل **10µl** من المعلق الخلوي إلى الأنبوب جديد، و يضاف **5 µl** إلى كل أنبوب من **5µl** من محلول **V-Annexin** الموسوم **FITC**، و**5µl** من محلول **PI**، بعد المزج يحضن في الظلام لمدة 15 د، ثم يضاف إلى كل أنبوب **400µl** من موقي ارتباط **V-innexin** وتحلل العينات بواسطة جهاز التدفق الخلوي خلال ساعة على الأكثر من انتهاء تحضير العينة باستعمال برنامج **Cell Quest.**

2−10 الدراسة الإحصائية:

وضعت التجربة وفق تصميم القطاعات العشوائية الكاملة، بواقع أربع مكررات (فرد) من كل نوع، موزعة بشكلٍ عشوائي بمكان الجمع مع مراعاة أن تكون متماثلة من حيث العمر ومرحلة النمو. تمّ تجميع البيانات وتبويبها وتحليلها باستعمال برنامج التحليل الإحصائي SPSS 26 لحساب قيم أقل فرق معنوي بين المتغيرات المدروسة لجميع الصفات، عند مستوى معنوية 5%، وحساب قيمة معامل التباين (CV%). تم حساب مؤشرات الإحصاء الوصفي للمتغيرات المدروسة كالمتوسط والانحراف المعياري لمقاييس الأنواع، وتمت مقارنة المتوسطات من خلال إجراء تحليل التباين ANOVA بالنسبة للصفات المورفولوجية والتشريحية للأنواع.

كذلك الدراسة الإحصائية للاختبارات الكيميائية باختبار (**Tow Way Anova**) وحساب الفروق بين المتوسطات باختبار **LSD.**

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة والدراسة الإحصائية

يستعرض هذا الفصل لنتائج العمل المخبري والحقلي بعد جمع العينات النباتية:

3-1نتائج الدراسة المورفولوجية الدقيقة :

3-1-1 الوصف العام للأنواع:

***Melilotus indicus* (L.)All**. 1-1-1-3

هو عشب حولي ذو ساق مفترشة أو منتصبة، لا يتجاوز طوله 70 سم. أوراقه مسننة الحواف في الجزء العلوي، وتصبح تامة كلما اتجهنا نحو القاعدة. الأذنات خيطية في القمة وعريضة قليلاً في القاعدة. الأزهار صغيرة ومتجمعة بكثافة على محور النورة، وتكون أقصر من معلاق الوريقات المجاورة، لكنها تتطاول عند الإثمار. القرون كروية مفلطحة عند القاعدة وتنتهي بزائدة طويلة وتتميز بتجاعيد مستعرضة.

في سورية، يُعتبر هذا االنوع الأكثر انتشاراً بين الأنواع المماثلة، وينمو من بداية شهر مارس وحتى نهاية شهر مايو.الشكل11.



الشكل (11) المظهر العام للنوع *M.indicus* 2020

3-1-1-2 *Melilotus sulcatus* Dsef.

عشب سنوي، ذو ساق منصبة أو مفترشة لايتجاوز طول النوع (50)سم الوريقات مسننة الحواف على كامل الوريقة، الأزهار صغيرة نوعا ما والكأس أخضر أو أحمر، تتجمع في نورات عنقودية متوسطة الكثافة؛ تكون أقصر من الوريقات الحاملة لها، لاتلبث أن تتطاول عند الإثمار، القرن كروي غير متدلي(يتوضع بشكل جانبي)؛ مفلطح من القاعدة يتميز بتجاعيد متحدة المركز، أخضر اللون يصبح بني باهت عند النضج. ينمو من بداية شهر آذار وحتى نهاية شهر أيار نشاهده في سورية على جوانب الطرقات في موائل جبلية ورطبة.الشكل 12



الشكل 12: المظهر العام للنوع *M.sulcatus* 2020

3-1-1-3 *Melilotus albus* Medik.:

يدعى في أمريكا وأوربا Wihte sweet clovr، نبات ثنائي الحول أو معمر بشكل قصير، يصل طوله إلى 250 سم ذو ساق منتصبة ووريقات مسننة من الأعلى فقط، الأذنات تامة خيطية من الأوراق الحاملة لها، القرن بيضوي بقمة منقارية متدلي، ذو تجاعيد شبكية مستعرضة، أخضر لامع، ثم لايلبث أن يتحول إلى بني أو أسود عند النضج، ينمو من بداية شهر آب ويستمر حتى نهاية شهر تشرين الأول، يشاهد على أطراف السواقي والمياه في بيئات رطبة.

الشكل 13



الشكل 13 المظهر العام للنوع *M.albus* في عام 2020

***Melilotus officinalis*(L.) Lam. *4-1-1-3*:**

يسمى في أوروبا وأمريكا باسم sweet clover، هو عشب ثنائي الحول، ذو ساق منتصبة يتراوح طول النوع من (100–200) سم موبر بشكل قليل، الوريقات مسننة من الأعلى فقط، والأذنات تامة خيطية من الأعلى، الأزهار كبيرة تتجاوز (3) مم وهي تتوضع على شكل نورات قليلة التراص، وطولها يتجاوز معلاق الورقة الحاملة لها، القرن أخضر لامع متدلي، لايلبث أن يتحول إلى بني فاتح عند النضج، يبدأ حياته في بداية شهر آذار وينتهي في نهاية شهر أيار ينمو على أطراف الطرقات.الشكل 14



الشكل (14) : المظهر العام للنوع *M.officinalis* في عام *2020*

:*Melilotus segetalis*(Bort.) Ser. 5-1-1-3

نبات عشبي حولي، يشاهد غالباً في بساتين الحمضيات، ذو ساق منصبة أو مفترشة، طوله حوالي (30–60) سم، موبر، الوريقات مسننة الحواف بشكل تام، الأذنات تامة غشائية مسننة، الأزهار صفراء كبيرة الحجم تتجاوز4 وقد تصل الى 10مم، الكأس أخضر أو قد يكون أحمر، تتوضع الأزهار بشكل متراص في نورات، طولها يتجاوز حامل الوريقات الحامل لها، القرون متدلية بيضوية متطاولة ضيقة من القاعدة، ينتهي بقمة شوكية وزائدة طويلة، وهو أخضر لامع لايلبث أن يتحول إلى أصفر باهت عند النضج. يبدأ نموه في بداية شهر أذار وحتى نهاية شهر أيار.الشكل 15





الشكل (15): المظهر العام للنوع *M.segetalis* في عام 2020

لابد من التنويه أن جميع هذه الصفات العينية للأنواع التي جُمعت من سورية توافقت مع فلورا السورية اللبنانية (Mouterde 1986) كذلك فلورا فلسطين باختلاف عدم وجود نوع *M.segetalis* ووصف *M.albus* بأنه سنوي أو ثنائي الحول عدا ذلك فقد تم التوافق بين الأنواع الموصوفة أعلاه والأنواع الموصوفة في فلورا فلسطين (Zohary 1972) كذلك توافقت مع فلورا ألمانيا وفلورا فلسطين، فلورا تركيا، وفلورا البحر الأبيض المتوسط .

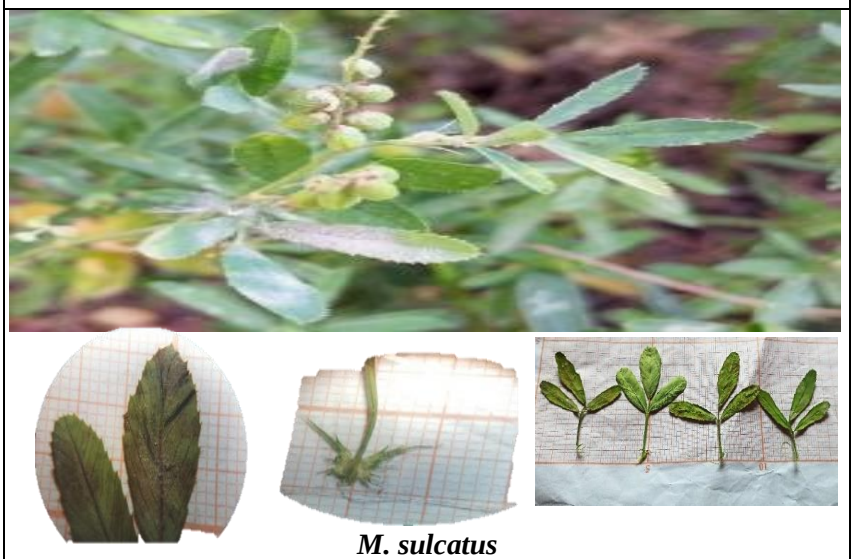
3-1-2 نتائج دراسة مورفولوجيا الأوارق ولأذنات:

بينت النتائج وجود اختلافات في صفات أوراق الأنواع المدروسة للحندقوق من حيث (طول الوريقات وعرضها ونسبة الطول للعرض واختلاف طول المعيلق لدى الوريقة الانتهائية بفروق معنوية واضحة أما الوريقتان الجانبيتان فهما لاطئتين)

وأيضاً تباين في تسنن حافة الوريقة وشكل الأذنات فقد كانت أذينات تامة خطية وحافة مسننة من الأعلى تامة من الأسفل في أنواع *M. indicus, M. albus, M. officinalis* أما في نوعي *M. sulatus, M. segeitalis* تميزت بأذنات تامة محيطة بالقاعدة غشائية وحافة وريقات مسننة بشكل كامل كما هو موضَح بالشكل (16).



M. indicus



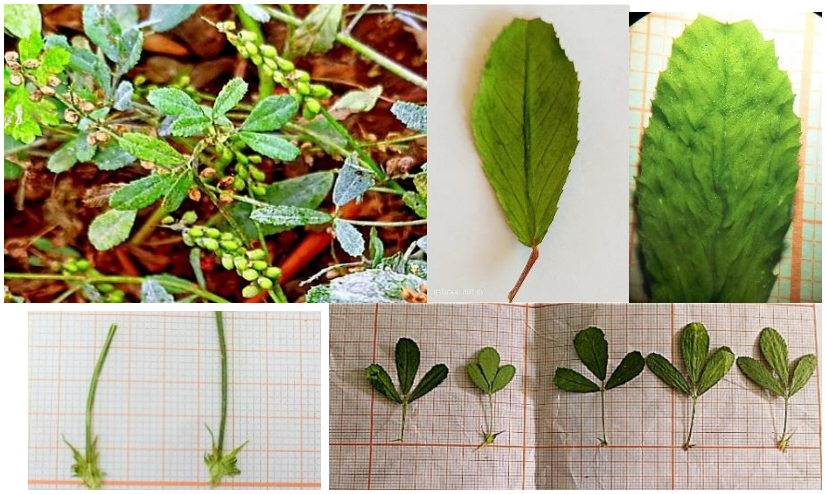
M. sulcatus



M. albus



M. offiicinails



M. segetalis

الشكل (16): الشكل العام للأوراق والتسنن في حافة الوريقات وشكل الأذنات للأنواع المدروسة

وعند الدراسة الإحصائية للأبعاد الوريقات والمعاليق يتضح من قيمة **Sig by ANOVA**(أقل من 0.05) أن هناك فروقاً معنوية بين الأنواع المدروسة لكل صفة، مما يشير إلى وجود اختلافات جوهرية بين الأنواع فيما يخصها، حيث كان أعلى متوسط في طول الوريقة الوسطى ***M. officinalis*** 24.70 و***M. segetalis*** 24.55، وأدنى متوسط لطول الوريقة الوسطى ***M. albus*** 18.15. كذلك سجل ***M. segetalis*** أعلى متوسط لطول الوريقة الجانبية 26.30، بينما كان أدنى متوسط في طول الوريقة الجانبية ***M. albus*** 15.45.

ولوحظ تباين واضح بين عرض الوريقات الوسطى للأنواع، حيث كان ***M. officinalis*** 16.40الأعلى، بينما سجل ***M. albus*** أقل قيمة 7.55.

أظهر نوع ***M. sulcatus*** أعلى نسبة في طول إلى عرض للوريقة الجانبية **2.94**، بينما كانت أدنى نسبة في ***M. officinalis*** 2.04. كان أطول معيلق للوريقة في ***M. officinalis*** 5.75 وأقصره في ***M. albus*** 3.55.

يظهر الجدول وجود اختلافات معنوية بين أنواع الحندقوق من حيث الطول والعرض ونسبة الطول للعرض وطول المعاليق، مما يدل على تنوع كبير في الصفات الشكلية للأوراق بين الأنواع المدروسة. الجدول (6).

الجدول (8). يبين الإحصاءات القياسية للوريقات الجانبية والوسطى ومعيلق الوريقة الوسطى								
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum	Sig by ANOVA
طول الوريقة الوسطى	*M. indicus*	20	21.50	1.850	0.414	19	25	Between Groups 0.000
	M. sulcatus	20	18.25	2.337	0.523	14	24	
	M. albus	20	18.15	3.573	0.799	12	22	
	M. officinalis	20	24.70	3.511	0.785	20	33	
	M. segetalis	20	24.55	4.286	0.958	15	33	
طول الوريقة الجانبية	*M. indicus*	20	21.450	4.0324	0.9017	14.0	31.0	Between Groups 0.000
	M. sulcatus	20	17.575	2.5509	0.5704	12.0	21.0	
	M. albus	20	15.450	2.6848	0.6003	10.0	22.0	
	M. officinalis	20	22.800	4.5952	1.0275	15.0	32.0	
	M. segetalis	20	26.300	2.8116	0.6287	20.0	30.0	
عرض الوريقة الوسطى	*M. indicus*	20	8.000	1.7770	0.3974	4.0	10.0	Between Groups 0.000
	M. sulcatus	20	8.350	1.0013	0.2239	6.5	10.0	
	M. albus	20	7.550	1.5720	0.3515	5.0	10.0	
	M. officinalis	20	16.400	3.4702	0.7760	5.0	22.0	
	M. segetalis	20	13.725	2.0993	0.4694	11.0	17.0	
عرض الوريقة الجانبية	*M. indicus*	20	9.050	2.6052	0.5825	3.0	14.0	Between Groups 0.000
	M. sulcatus	20	6.075	.8156	0.1824	5.0	7.0	
	M. albus	20	6.000	1.6543	0.3699	4.0	9.0	
	M. officinalis	20	11.400	2.6238	0.5867	7.0	15.0	
	M. segetalis	20	11.100	1.7214	0.3849	7.0	14.0	
طول الوريقة الوسطى/عرض الوريقة الوسطى	*M. indicus*	20	.6993	.20771	0.04645	0.45	1.15	Between Groups 0.002
	M. sulcatus	20	.6144	.40492	0.09054	0.35	2.22	
	M. albus	20	.3030	.08666	0.01938	0.18	.44	
	M. officinalis	20	.4437	.11552	0.02583	0.18	.71	
	M. segetalis	20	.5826	0.54638	0.12217	0.18	1.83	
طول الجانبية /عرض الجانبية	*M. indicus*	20	2.5428	0.80530	0.18007	1.62	4.67	Between Groups 0.000
	M. sulcatus	20	2.9366	0.53420	0.11945	2.00	3.80	
	M. albus	20	2.6955	0.60548	0.13539	1.89	4.00	
	M. officinalis	20	2.0393	0.33180	0.07419	1.67	2.78	
	M. segetalis	20	2.4005	0.27010	0.06040	1.92	2.88	
طول معيلق وريقة وسطى	*M. indicus*	20	4.20	0.834	0.186	3	6	Between Groups
	M. sulcatus	20	4.35	0.933	0.209	3	6	
	M. albus	20	3.55	0.826	0.185	2	5	

	M. officinalis	20	5.75	1.070	0.239	4	9	0.000
	M. segetalis	20	5.55	0.999	0.223	4	8	

3-1-3 نتائج دراسة مورفولوجيا النورات والأزهار:

أظهرت الدراسة اختلاف طول النورات وعدد الأزهار التي تحملها واختلاف طول الزهرة، حيث كانت النورة متراصة الأزهار عند نوعي ***M.indicus, M.segetalis***, وكانت متوسطة التراص في نوع ***M.sulcatus*** أما في نوعي ***M.albus***, ***M.officinalis*** قليلة التراص إلى غير متراصة وتميزت الأنواع (***M.albus, M.officinalis, M.segetalis***) أن طول حامل النورة قبل الإثمار أكبر بكثير من معلاق الأوراق الحاملة لها بينما يتطاول حامل الأزهار في نوعي ***M.sulcatus, M.indicus*** عند الإثمار. والشكل (17) يوضح الشكل العام للنورات :



M.indicus



M.sulcatus



M.officinalis



M.albus



M.segetalis

الشكل (17) يوضح الشكل العام للنورات والاختلافات فيما بينها

ويوضح الجدول (7) التحليل الإحصائي للقياسات: أظهرت نتائج تحليل ANOVA لاختبار الفروق بين الأنواع المدروسة في طول حامل الأزهار، وعدد الأزهار على الحامل، وطول الزهرة، حيث تبين وجود فروق معنوية كبيرة بين الأنواع.

أظهر طول حامل الأزهار قيمة F مرتفعة 69.889 مع دلالة إحصائية (Sig = 0.000)، مما يشير إلى اختلاف واضح بين الأنواع، وسجل عدد الأزهار على الحامل قيمة F = 37.333 وكانت الفروق معنوية (Sig=0.00)، مما يدل على تنوع كبير بين الأنواع. أما طول الزهرة فقد سجل أعلى قيمة F = 75.128 مع دلالة إحصائية قوية Sig = 0.000، مما يعكس اختلافاً ملحوظاً في هذه الصفة بين الأنواع. تعكس هذه الفروق تنوعاً في الصفات الزهرية قد يكون مرتبطاً بالعوامل البيئية واختلاف الصفات بين الأنواع وراثياً.

الجدول (9). يوضح القياسات الإحصائية للإزهار

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
طول حامل الأزهار	Between Groups	26268.340	4	6567.085	69.889	0.000
	Within Groups	8926.650	95	93.965		
عدد الأزهار على الحامل	Between Groups	5155.060	4	1288.765	37.333	0.000
	Within Groups	3279.450	95	34.521		
طول الزهرة	Between Groups	63.845	4	15.961	75.128	0.000
	Within Groups	20.183	95	.212		

3-1-4 نتائج دراسة مورفولوجيا القرون:

بناءً على الدراسة التفصيلية للقرون (اللون، الشكل، الكأس، التجاعيد على سطح القرن، انتهائه بشوكة قصيرة وزائدة خطية) والتي تعتبر من المميزات المورفولوجية الهامة لتمييز أنواع الحندقوق ***Melilotus* Mill.** حقيلاً، تم تحديد أهم الصفات الوصفية والعددية التي ميزت الأنواع المدروسة المبينة في الجدول (10) والشكل (18،19).

الجدول (10). يظهر الاختلافات الشكلية بين القرون للأنواع المدروسة

اسم النوع	اللون	الشكل	التجاعيد على سطح القرن	قمة القرن	الكأس
M.indicus	أخضر باهت بني مغبر عند النضج	كروي مفلطح من القاعدة متدلي	مستعرضة(شبكية)	ينتهي بزائدة طويلة	أخضر أو أحمر موبر
M.sulcatus	أخضر غامق بني فاتح عند النضج	كروي مفلطح من القاعدة غير متدلي يتوضح بشكل جانبي	متحدة المركز	ينتهي بقمة شوكية وزائدة طويلة	أخضر أو بني مصفر، موبر
M.albus	أخضر لامع أسود أو أصفر عند النضج	بيضوي، متدلي	مستعرضة شبكية	ينتهي بقمة منقارية وبزائدة طويلة	أخضر أو بني مصفر موبر

M.officinalis	أخضر لامع بني فاتح عند النضج	بيضوي، متدلي	مستعرضة شبكية	ينتهي بقمة شوكية وزائدة طويلة	أخضر موبر
M. segetalis	أخضر لامع أصفر فاتح عند النضج	كروي ضيق من القاعدة، متدلي	متحدة المركز (متوازية)	ينتهي بقمة شوكية وزائدة طويلة	أخضر أو أحمر موبر



M.indicus



M.sulcatus



M.albus



M.officinalis



M.segetalis

الشكل (18): يوضح الشكل العام لعناقيد القرون في الأنواع



الشكل (19): صورة لتجاعيد القرون وأشكالها المميزة للأنواع تحت المكبرة X40

يوضح الجدول (11) الفروق الإحصائية في طول وعرض القرون ونسبة الطول إلى العرض بين الأنواع المدروسة، حيث بين أن جميع القيم فروقاً معنوية **(Sig = 0.000)** وفقاً لاختبار **One Way ANOVA**.

- تفاوت طول القرن بين الأنواع، حيث كان ***M.officinalis*** الأطول بمتوسط **3.72**مم، بينما كان ***M.indicus***الأقصر بمتوسط **2.75**مم، وسجل ***M.sulcatus*** أعلى قيمة في متوسط عرض القرن **2.43**مم، وأقل متوسط في العرض كان لنوع ***M.segetalis*** 1.81 مم.
- أما نسبة الطول إلى العرض أظهرت اختلافات واضحة، حيث كانت أعلى نسبة في نوع ***M.segetalis*** (1.94)، وأقلها في نوع ***M.sulcatus*** (1.3).

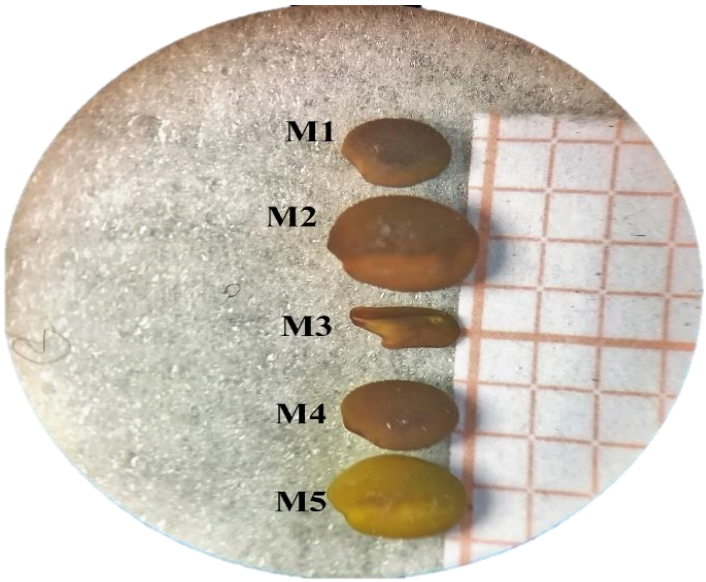
الجدول (11): القيم والقياسات الإحصائية للقرون

	النوع	Min-max=mean ± st.D	Sig.by anova
طول القرن	***m. indicus***	2-3.5=2.75± 0.47	0.000
	m. sulcatus	2-4=3.05± 0.43	0.000
	m. albus	2-4=3.16± 0.52	0.000

	m. officinalis	2-4.5=3.72± 0.59	0.000
	m. segetalis	3-4=3.43± 0.41	0.000
عرض القرن	***m. indicus***	1.5-2=1.93± 0.81	0.000
	m. sulcatus	1.85-3.5=2.43± 0.38	0.000
	m. albus	2-3.1=2.2± 0.35	0.000
	m. officinalis	1.5-3=2.21± 0.31	0.000
	m. segetalis	1.5-2.25=1.81± 0.28	0.000
الطول /العرض	***m. indicus***	1-2.33=1.4± 0.32	0.000
	m. sulcatus	1-1.9=1.3± 0.21	0.000
	m. albus	1-2.35=1.5± 0.33	0.000
	m. officinalis	1-2.25=1.7± 0.35	0.000
	m. segetalis	1.44-2.67=1.94± 0.89	0.000

3-1-5 دراسة مورفولوجيا البذور:

أظهرت نتائج دراسة البذور وجود عدة اختلافات معنوية من حيث الطول والعرض والتزيينات على سطحها، اللون، وسماكة البذور في جميع الأنواع وبينما كانت جميع الأنواع ***M.indicus, M.sulcatus, M.officinalis,*** ***M.segetalis*** متشابهة في مكان النقير وشكله، باستثناء شكل النقير في بذور النوع ***M.albus*** حيث كان على شكل حرف L وشديد التقعر، وهذا يتفق مع الدراسة العراقية في بغداد **(Khansaa *et al.*, 2017, Abid ,2018)** كما يوضح الجدول (12) والشكل (20)



الشكل (20). صورة للبذور توضح الاختلافات تحت المكبرة x40

الجدول (12). الاختلافات الشكلية واللونية بين قرون الأنواع المدروسة					
الأنواع	*M. indicus*	*M. sulcatus*	*M. albus*	*M. officinalis*	*M. segetalis*
اللون	أخضر زيتوني	بني مصفر إلى مصفر	أخضر أو بني مصفر	بني	أخضر مصفر
طول- عرض	1.8مم-1.5مم	2مم-1.8مم	2مم-1مم	1.5مم-1.5مم	2.1مم-1.2مم
تزيينات (شكل الخارجي)	حبيبات درنية واضحة	حبيبات درنية شديدة الوضوح	ملساء لامعة	درنية إلى شبكية واضحة	حبيبات صغيرة
توضع النقير	أقرب إلى قمي	أقرب إلى قمي	أقرب إلى قمي	بين قمة والوسط	أقرب الى قمي
شكل النقير	مقعر-جانبي	مقعر-جانبي	شديد التقعر على شكل حرف L	مقعر	مقعر
سماكة الوجه الجانبي	0.9ml	1.1ml	0.75ml	0.9ml	1ml

3-1-6 نتائج التحليل العنقودي وشجرة القرابة بالاعتماد على الخصائص المورفولوجية للأنواع المدروسة:

تم إجراء التحليل العنقودي لمعرفة علاقات القرابة بين الأنواع **cluster analysis** للصفات المورفولوجية والحقلية االتي درست سابقاً وجمعت بمراحل عمرية مختلفة وعلى فترة سنوات حيث يبين الجدول (13) الصفات المورفولوجية المدروسة بين الأنواع باستخدام برنامج **MVSP 3.2** بالاعتماد على قرينة "جاكارد" لحساب المسافة الوراثية بين الأنواع وعلى **UPGMA Method** لفصلها إلى مجموعات. وقد ضُمِّنت المصفوفة 5 أسطر تمثل الأنواع الخمسة المدروسة و49 عموداً تمثل تسع وأربعون متغيراً، فكانت النتيجة كما في الجدول (13) والشكل (21):

الجدول (13): يمثل قاعدة البيانات وتشمل الصفات المختلفة بين الأنواع المدروسة

مثل + أن الصفة موجودة أما – تمثل غياب هذه الصفة

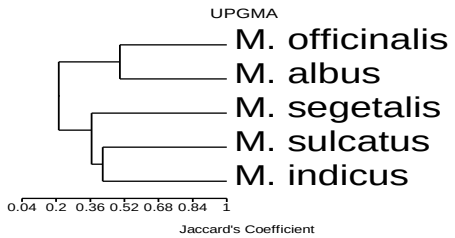
		الأنواع المدروسة التابعة لجنس *Melilotus*				
	الصفة المدروسة	M1	M2	M3	M4	M5
		M. indicus	*M. sulcatus*	*M. albus*	*M. officinalis*	*M. segetalis*
1	حولي	+	+	–	–	+

2	ثنائي الحول	−	−	+	+	−
3	معمر	−	−	+	−	−
4	الإزهار من آذار الى أيار	+	+	−	+	+
5	الإزهار من تموز إلى كانون الأول	−	−	+	−	−
6	الموئل جبلي	+	+	−	−	−
7	الموئل تربة حمراء	+	+	−	+	−
8	الموئل في بساتين الحمضيات	+	−	+	−	+
9	الموئل تربة هشة عند السواقي	−	−	+	−	−
10	طول النوع 10−50سم	−	+	−	−	−
11	طول النوع يتراوح بين 100الى سم200	−	−	−	+	−
12	طول النوع يصل إلى أكثر من 250سم	−	−	+	−	−
13	نبات قائم	+	+	+	+	+
14	نبات مفترش	+	+	−	−	+
15	موبر بشكل واضح	+	+	−	−	+
16	موبر قليلا	−	−	+	+	−
17	الأوراق مسننة كاملا	−	+	−	−	+
18	الأوراق مسننة من الأعلى فقط	+	−	+	+	−
19	الأذنات تامة خيطية من الأعلى	+	−	+	+	−
20	الأذنات تامة غشائية مسننة	−	+	−	−	+
21	الأزهار بيضاء	−	−	+	−	−
22	الأزهار صفراء	+	+	_	+	+
23	الكأس ملون أحمر	+	+	−	−	+
24	الكأس أخضر	+	+	+	+	+
25	الكأس بني مصفر	−	+	+	−	−
26	الأزهار صغيرة لا تتجاوز مع الكأس 3مم	+	+	−	−	−
27	الأزهار كبيرة تتجاوز 3مم	−	−	+	+	+

28	النورة متراصة الأزهار	+	−	−	−	+
29	النورة متوسطة التراص	−	+	−	−	−
30	النورة قليلة التراص	−	−	+	+	−
31	تتطاول النورة عند الإثمار	+	+	−	−	−
32	النورة أطول من الأوراق الحاملة لها	−	−	+	+	+
33	القرن كروي مفلطح من القاعدة	+	+	−	−	−
34	القرن بيضوي	−	−	+	+	−
35	القرن كروي متطاول ضيق من القاعدة	−	−	−	−	+
36	القرن ينتهي بقمة منقارية	−	−	+	−	−
37	القرن ينتهي بقمة شوكية	−	+	−	+	+
38	القرن ينتهي بزائدة طويلة	+	−	+	+	+
49	القرن بتجاعيد مستعرضة (شبكية)	+	−	+	+	−
40	القرن بتجاعيد متحدة المركز	−	+	−	−	+
41	القرن أخضر باهت	+	−	−	−	−
42	القرن أخضر لامع	−	−	+	+	+
43	القرن أخضر غامق	−	+	−	−	−
44	القرن أسود أو أصفر عند النضج	−	−	+	−	−
45	القرن أصفر عند النضج	−	−	−	−	+
46	القرن بني فاتح عند النضج	−	+	−		−
47	القرن بني مغبر عند النضج	+	−	−	−	−
48	القرن متدلي	+	−	+	+	+
49	القرن غير متدلي (جانبي)	−	+	−	−	−

الجدول (14): نتائج التحليل العنقودي باستخدام برنامج **MVSP3.2**
((UPGMA Method, Jacards Coefficient)) المعتمد على تحليل 49 متغير يخص 5 أنواع من جنس الحندقوق ***Melilotus***

عددعناصر المجموعة	نسبة التشابه	المجموعة 2	المحموعة 1	العقدة **(node)**
2	0.500	***M.officinalis***	***M.albus***	1
2	0.419	***M.sulcatus***	***M.indicus***	2
3	0.365	***M.segetalis***	**Node2**	3
5	0.212	**Node1**	**Node3**	4



الشكل (21): شجرة القرابة المبنية على الصفات المورفولوجية للأنواع المدروسة من الحندقوق كما يظهرها التحليل العنقودي**(UPGMA Method) cluster analysis**

يبين كل من الجدول (14) والشكل (21) ما يلي:

- فُرزت الأنواع المدروسة ضمن عنقودين: ضم العنقود الأول النوعين ***Melilotus officinalis*** ،***Melilotus albus*** والعنقود الثاني الأنواع: ***Melilotus segetalis, Melilotus sulcatus, Melilotus indicus***، بنسبة تشابه 0.212.
- انفصل العنقود الثاني إلى تحت عنقودين، ضم تحت العنقود الأول النوع ***Melilotus segetalis*** وضم تحت العنقود الثاني النوعين ***Melilotus sulcatus*** ،***Melilotus indicus***، بنسبة تشابه 0.365.
- بلغت نسبة التشابه 0.419 بين النوع ***Melilotus sulcatus***، والنوع ***Melilotus indicus***.
- أوضحت العقدة (1) أعلى درجة قرابة وذلك بين النوعين ***Melilotus officinalis*** ،***Melilotus albus***، بنسبة تشابه 0.500.

3-1-7 الدليل التصنيفي الحقلي:

1- نبات موبر بشكل واضح 2

1- نبات موبر قليلاً..`2

2- الأوراق مسننة كاملاً.....3

`2-الأوراق مسننة من الأعلى فقط ....`3

3- النورة متراصة الأزهار..... 4

`3-النورة قليلة التراص ....4`

4- الأزهار كبيرة تتجاوز 3مم..... 5

`4 -الأزهار صغيرة لاتتجاوز مع الكأس 3مم ....`5

5- القرن بتجاعيد مستعرضة شبكية..... 6

`5-القرن بتجاعيد متحدة المركز.....6`

6- القرن أخضر لامع 7

`6-القرن لونه غير ذلك .....`7

7- الأذنات تامة خيطية من الأعلى 8

`7-الأذنات تامة غشائية مسننة .....`8

8-الأزهار بيضاء الكأس بين مصفر/ القرن بيضوي متدل/ أسود أو أصفرعند النضج ينتهي بقمة منقارية

M.albus.....

`8-الأزهار صفراء.....9

9- القرن كروي مفلطح عند القاعدة متدل، طول النبات 10-50 سم، النورة متوسطة التراص تتطاول عند الإثمار

M.sulcatus.....

`9-القرن متدل.....10

10-تتطاول النورة عند الإثمار ، القرن أخضر باهت .....***M.indicus***

`10-النورة أطول من الأوراق الحاملة لها.....11

11- القرن أصفر عند النضج ، كروي متطاول ضيق عن القاعدة.....***M.segetalis***

`11-القرن بيضوي ينتهي بزائدة طويلة، الكاس أخضر .....***M.officinalis***

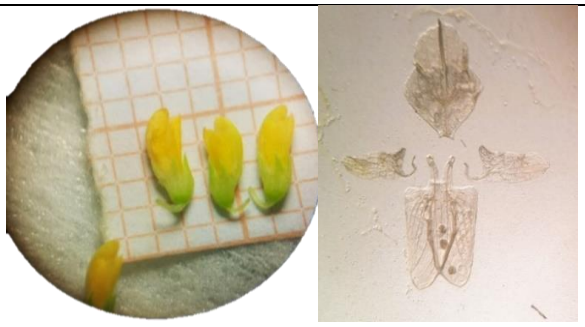
3-2 الدراسة التشريحية للأنواع:

3-2-1 الدراسة التشريحية للزهرة:

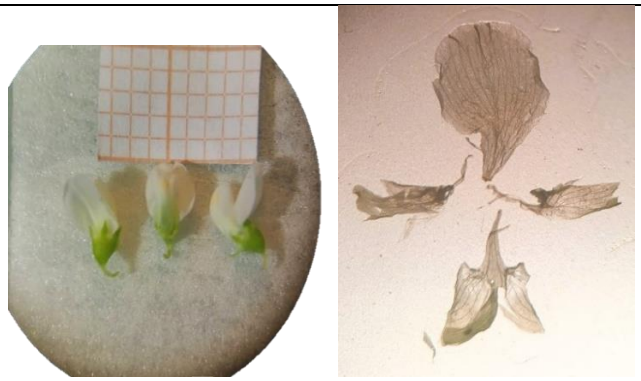
تحمل صفات الزهرة دلالة تصنيفية مميزة للأنواع تستند إلى الملاحظة البصرية، من حيث نسبة الكأس إلى التويج، وشكل العلم بين البيضوي والدائري بوجود الظفر أو دونه؛ وتباين حجم العلم من 2 -3 مم بحيث يغطي الزورق أو العكس، كما تميز الجناحان في بعض الأنواع بظفر واضح بطول أكثر أو أقل من 1مم وزائدة مميزة أو بدونها؛ وزورق بظفر وزائدة واضحة أو غير واضحة، وتوافقت بعض نتائج دراستنا مع الدراسة من حيث شكل وتوضع التويج (**Gazara *et al*., 2001, Aljoboury *et al*., 2017**) كما يوضح الجدول (15) والشكل (22):



M.indicus



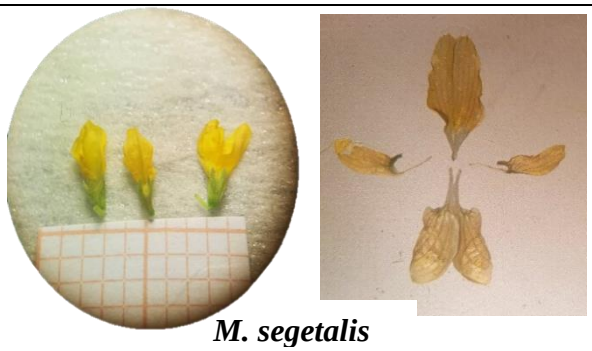
M.sulcatus



M. albus



M. officinalis



M. segetalis

الشكل (22): يوضح أجزاء التويج للأنواع المدروسة

الجدول (15): يوضح الاختلافات بين أجزاء التويج للأنواع المدروسة

النوع	نسبة طول الكأس للتويج	شكل العلم	قمة العلم	الجناحين	زورق	حجم العلم	حجم الزورق
M. indicus	**0.5±1.4**	**بيضوي بنهاية مدببة**	**حافة مثلومة مع ظفر**	**ظفر وزائدة واضحان**	**مع ظفر بلا زائدة**	**3 مم العلم يحيط بالزورق**	**2.5 مم**

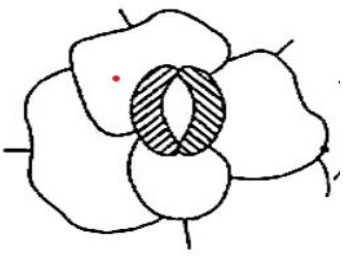
M. sulcatus	**0.4±1.3**	**دائري**	**حافة تامة مدببة مع ظفر قصير جدا**	**ظفر وزائدة طويلة والظفر أقل من 1مم قصيرة1.5 مم**	**مع ظفر بزائدة قصيرة جداً**	**2مم الزورق يغطي العلم**	**2.25مم**
M. albus	**0.05±0.5**	**بيضوي**	**حافة تامة مدورة مع ظفر قصير جدا**	**ظفر 1مم مع زائدة قصيرة**	**مع ظفر بلا زائدة**	**3مم**	**2مم حجم الزورق أقل من العلم**
M.officinalis	**0.01±0.6**	**دائري مع ظفر**	**حافة تامة مدورة**	**ظفر 1مم مع زائدة قصيرة**	**مع ظفر بلا زائدة**	**حوالي 3 مم تقريبا**	**2.6 مم**
M. segetalis	**1.1±0.6**	**بيضوي مع ظفر**	**حافة مثلومة مع ظفر طويل**	**ظفر أقل من 1 مم**	**مع ظفر بزائدة واضحة**	**حوالي 2.5 مم والعلم يغطي الزورق**	**1.75 مم**

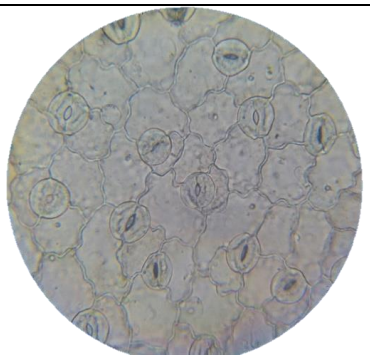
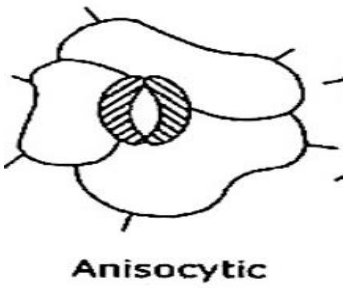
3-2-2 دراسة المسام:

صُنفت المسام وفقا للباحثان **(Prabhakar,**2004 **,Vesque, 1889)** اللذين وجدا نمطين من الثغور :

النمط المتباين **Anisocytic type**، النمط الشاذ **Anomocytic type** في أوراق جميع الأنواع المدروسة كما هو موضح بالجدول (16) وهي تتوافق مع (اللامي وآخرون**2015** ، حرامي وإبراهيم 2020). الشكل (23).

وتمّ عد المسام في (16) ساحة مجهرية لمحضر البشرة السفلى للأوراق لكل نوع من الأنواع الخمسة المدروسة وحساب متوسط العدد فيها والانحراف المعياري وقد لوحظ وجود فروق معنوية واضحة **(p>0.005)** بين الأنواع حيث تفوق النوعين ***M.albus***، ***M.indicus*** في عدد المسام على بقية الأنواع ، وتوضعت المسام في مستوى خلايا البشرة في جميع الأنواع. الجدول (16).

النمط	
Anomosytic type النمط الشاذ  Anomocytic	 *Melilotus officinalis*

 *Melilotus indicus*	**النمط المتباين Anisocytic type**  Anisocytic
الشكل (23): يوضح الأنماط المختلفة للمسام في الأنواع المدروس	

الجدول (16): أنماط االمسام، عددها وشكل جدران الخلايا المجاورة في الأنواع الخمسة

النوع	نمط المسام	متوسط عدد المسام	شكل جدران الخلايا المجاورة
M. indicus	**anisocytic, Anomocytic**	**56**	**متعرجة**
M. sulcatus	**anisocytic, Anomocytic**	**29**	**أميبي متعرج بعمق شديد**
M. albus	**anisocytic, Anomocytic**	**41**	**أميبي زيك زاك ومتموج**
M. officinalis	**Anisocytic, Anomocytic**	**35**	**أميبي متعرج بعمق**
M. segetalis	**anisocytic, Anomocytic**	**26**	**متموج**

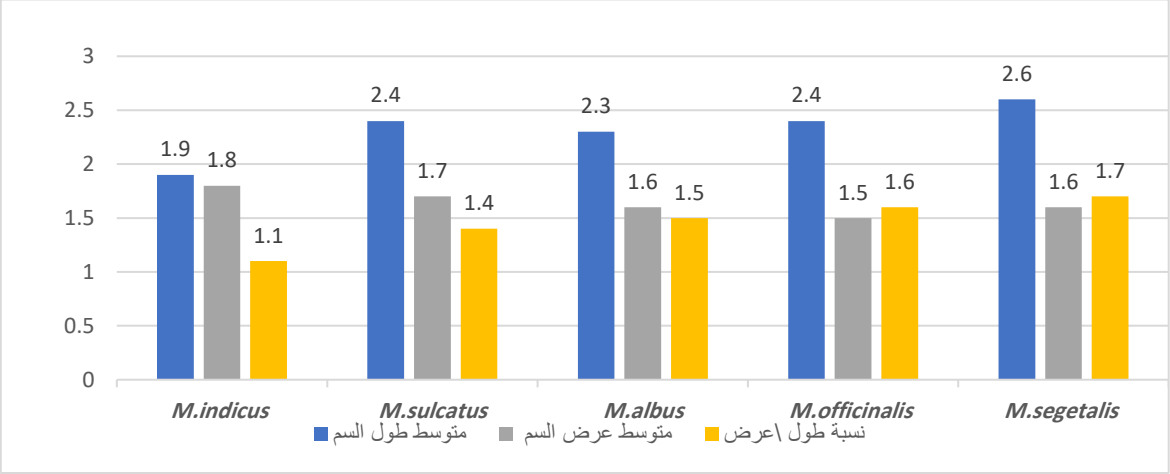
3-2-2-1 التحليل الإحصائي لقياسات المسام في البشرة السفلية من الورقة:

بيّنت الدراسة الدقيقة للمسام وجود تباين بين طول وعرض السُم ونسبتيهما لبعضهما وعددها في الساحة المجهرية بتكبير (x400) وذلك لـ (16) عينة لكل نوع، تميز النوع ***M.indicus*** بالعدد الأكبر من المسام، بينما كان الأقل عدداً للمسام في نوع ***M.segetalis***، وكان المتوسط الحسابي لأطوال الخلايا السُمية في النوع ***M. segetalis*** الأكثر

طولاً µm(2.6) وأقلها طولاً µm(1.9) في النوع ***M.indicus***، فيما تقاربت متوسطات أطوال الخلايا السمية لبقية الأنواع µm(2.3–2.4)، أما بالنسبة لمتوسطات عرض الخلية السُمية فكانت القيم متقاربة نوعا ما، أكبرها µm(1.8) في النوع ***M. indicus***، وأصغرها في النوع ***M. officinalis*** ، وأعطت الدراسة الإحصائية فروقاً معنوية واضحة ($p < 0.005$) بين الأنواع المدروسة كما هو موضح الشكل (24) والجدول (17):

الجدول (17): الإحصاءات الوصفية لتباين تعداد وطول وعرض المسام لدى أنواع النباتات المدروسة

		N	Mean	Std.Deviation	Std.Error	Minimum	Maximum
عدد المسام في الساحة المجهرية بالتكبير 400x	*M.indicus*	16	56.47	10.269	2.567	28	72
	M.sulcatus	16	29.63	8.156	2.039	21	57
	M.albus	16	41.87	6.500	1.625	29	53
	M.officinalis	16	35.07	6.137	1.534	23	44
	M.segetalis	16	26.47	2.729	.682	20	30
طول السم µm	*M.indicus*	16	1.9933	.11235	.02809	1.80	2.20
	M.sulcatus	16	2.4400	.25245	.06311	1.70	2.80
	M.albus	16	2.3267	.23514	.05878	2.00	2.90
	M.officinalis	16	2.3600	.08000	.02000	2.30	2.60
	M.segetalis	16	2.6467	.17461	.04365	2.50	3.10
عرض السم µm	*M.indicus*	16	1.8467	.11470	.02867	1.60	2.10
	M.sulcatus	16	1.7333	.10111	.02528	1.60	1.90
	M.albus	16	1.5667	.31763	.07941	1.10	2.00
	M.officinalis	16	1.5333	.06992	.01748	1.40	1.60
	M.segetalis	16	1.5867	.08844	.02211	1.50	1.80
نسبة الطول /العرض	*M.indicus*	16	1.0887	.07868	.01967	1.00	1.25
	M.sulcatus	16	1.4140	.17240	.04310	.89	1.63
	M.albus	16	1.5045	.26126	.06532	1.05	2.00
	M.officinalis	16	1.5518	.11478	.02869	1.44	1.86
	M.segetalis	16	1.6712	.11662	.02916	1.44	1.94



الشكل (24): اختلافات متوسط طول ومتوسط عرض ونسبة الطول لعرض المسام بين الأنواع

يظهر الجدول (18) جميع المتغيرات تظهر دلالة إحصائية قوية (Sig. = 0.000)، مما يعني وجود فروقات معنوية بين المجموعات، وقيم F المرتفعة تشير إلى أن التباين بين المجموعات أكبر من التباين داخل المجموعات، مما يعزز من قوة الاختبار الإحصائي.

الجدول (18): يظهر التحليل الاحصائي ANOVA بين العدد وأبعاد المسام بين الأنواع المدروسة

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
عدد في الساحة المجهرية بالتكبير 400x	Between Groups	9082.881	4	2270.720	43.781	0.000
طول السمµm	Between Groups	3.583	4	0.896	26.572	0.000
عرض السم µm	Between Groups	1.122	4	0.281	10.240	0.000
نسبة الطول /العرض	Between Groups	3.105	4	0.776	29.640	0.000

3-2-3 نتائج الدراسة التشريحية:

3-2-3-1 مقطع عرضي في الساق:

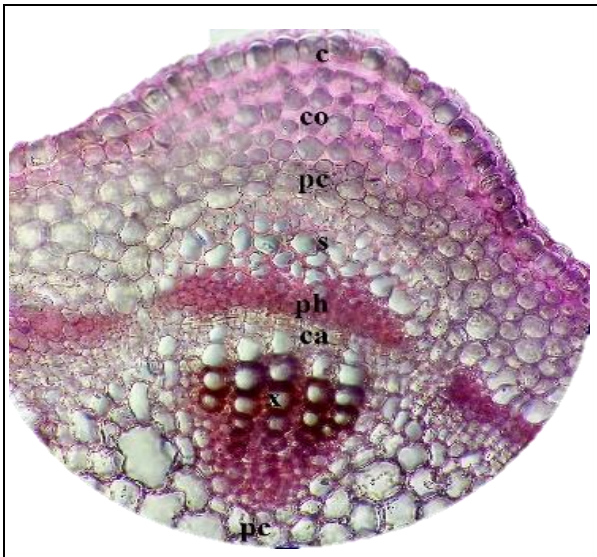
تميز المقطع العرضي للساق بشكله المضلع ذو النتوءات غير المتناظرة حيث كانت ستة نتوءات للأنواع ***M.indicus,*** ***M. sulcatus, M. albus, M.segetalis*** بينما تميز النوع ***M.officinalis*** بثمانية نتوءات اختلفت نتائج هذه

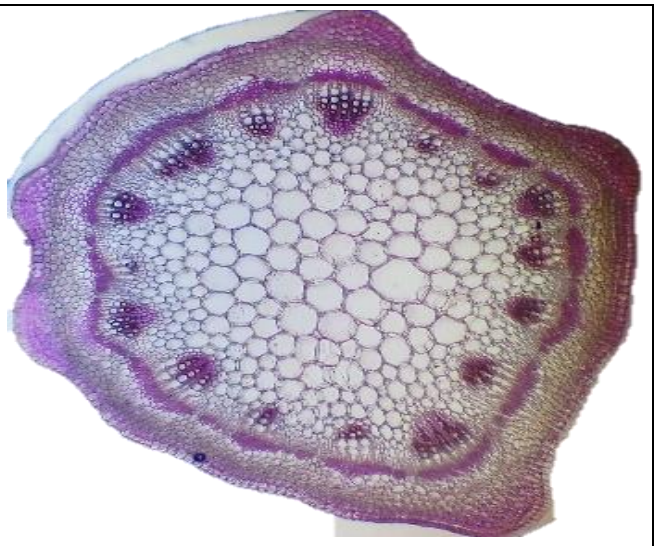
الدراسة مع دراسة (حرامي وإبراهيم، 2020) من حيث عدد النتوءات لنوع ***M.indicus*** وتوافقت مع **(Shehata, 2018)** من حيث عدد النتوءات للأنواع.

أوضحت الدراسة للمقاطع التشريحية وجود الطبقات التالية:

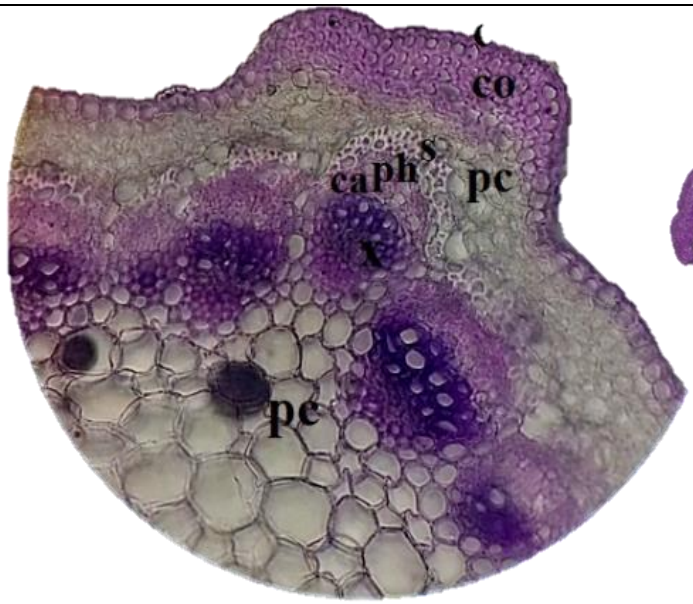
البشرة: صف واحد من الخلايا المتراصة تغطيها طبقة رقيقة من القشيرة ويلاحظ وجود الأوبار الواقية وحيدة الخلية بشكل واضح في ***M.sulcatus*** وندرتها في باقي الأنواع.

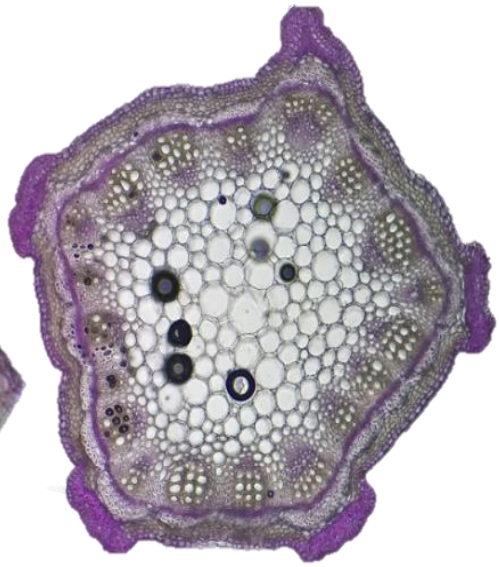
تليها عدد من طبقات القشرة **(5–7)** طبقات من الخلايا البرانشيمية على جانبي النتوء**(1-5)**طبقات في منطقة النتوء، ونلاحظ تواجد (3–8) طبقات للكولانشيم الزاوي في منطقة النتوءات تحت البشرة تماماً وغيابه على جانبيه؛ وتوضع السكلرانشيم المكون من عدة طبقات فوق الحزم الوعائية مباشرةً؛ و كان عدد هذه الحزم يتراوح بين(15–25) حزمة وهي واضحة وغير متصلة في الساق الفتية وتتصل الحزم لتشكل دوارة مع تقدم الساق بالعمر، ويوجد (2–4) طبقات كامبيوم تتوضع بين الخشب واللحاء ليولد بنية ثانوية واضحة في الأنواع ومميزة للنوعين ***M.albus, M.officinalis***، ويحتل مركز الساق برانشيم مخي يغيب في الساق البالغة لتظهر فضوة مركزية واضحة وتوافقت دراستنا مع (**Sheikh *et al.*,2016**)، وتعزى هذه الاختلافات في النواحي التشريحية للأنواع منها جزء وراثي يكسبها صفات تتميز بها عن الأنواع الأخرى والآخر لتكيفها مع البيئة التي تناسب نموها وتطورها. كما يوضح الشكل (25) والاختلافات بين الأنواع في الجدول (19).





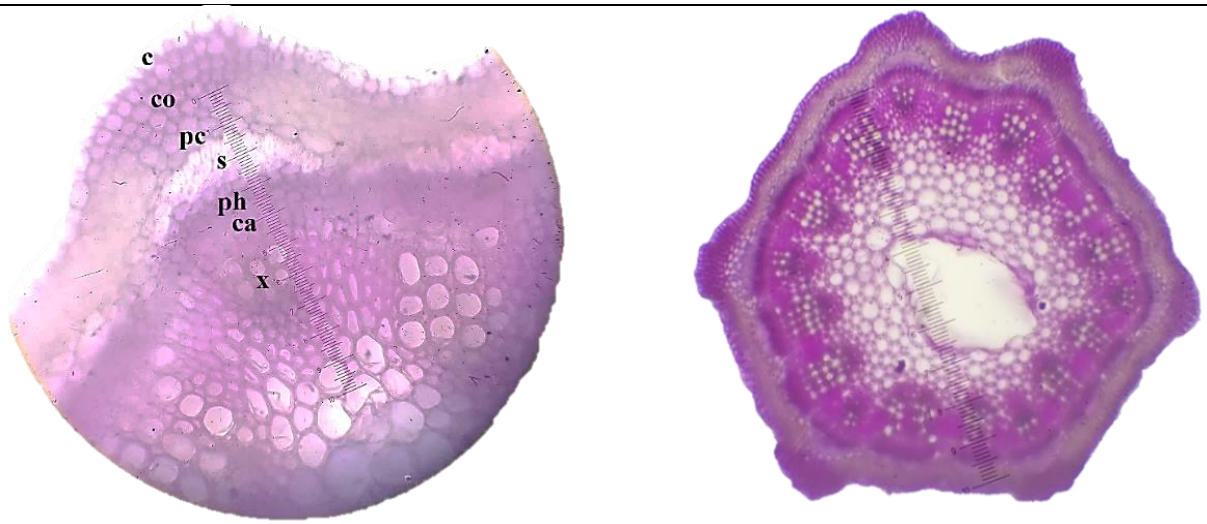
M.indicus



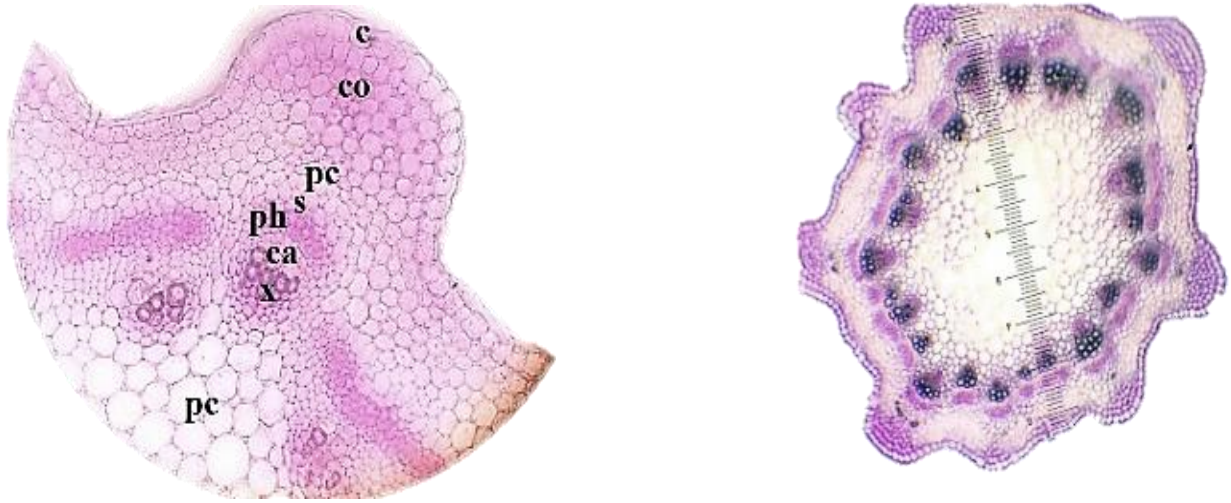


A

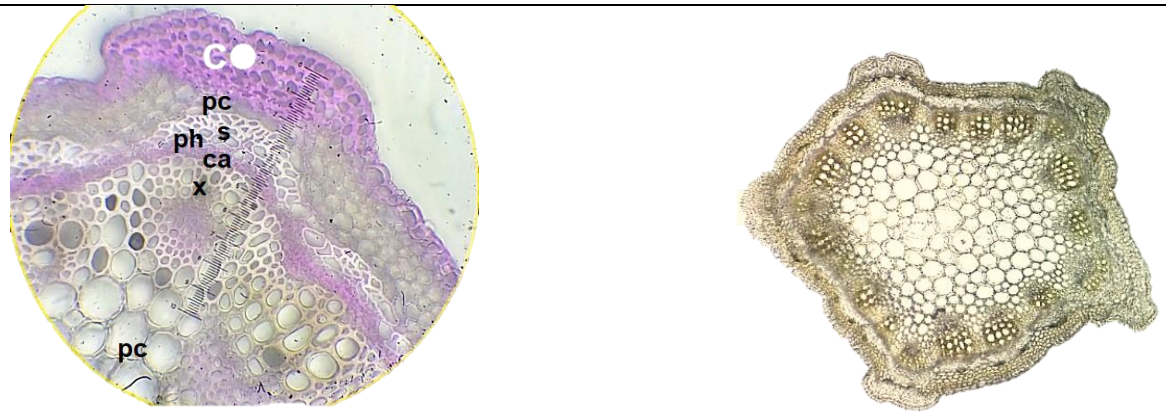
M.sulcatus



M.albus



M.officinalis



M.segetalis

الشكل (25): يوضح البنية النسيجية المقاطع العرضية في الساق للأنواع المدروسة :

A:بتكبير الشكل العام للساق x100، B:الشكل التفصيلي للنتوء x400.

c= القشرة، co= الكولانشيم زاوي، pc= البرانشيم، s= سكلرانشيم،ca=الكامبيوم، ph= اللحاء، x=الخشب.

الجدول (19): يعرض الاختلافات التشريحية في الطبقات المؤلفة لمقطع عرضي في ساق الأنواع المدروسة								
الأنواع	عدد النتوءات	عدد الحزم	سكلرانشيم		كولانشيم زاوي تحت النتوءات	برانشيم		ملاحظات
			تحت النتوء	على جانبي النتوء		تحت النتوء	على جانبي النتوء	
M.indicus	6	19–15	3–4	لا يوجد	4–5	2–3	4–5	الكامبيوم 4 طبقات، حزم واضحة غير متصلة يوجد برانشيم مخي (shehata 2018)
M.sulcatus	6	كبير وحجمها صغير ومتصلة مع بعضها	3–2	لا يوجد	2–5	1–3	3–5	الكامبيوم 2 طبقة، موبر بأوبار واقية وحيدة الخلية يوجد سكلرانشيم فوق الحزم الوعائية كجزر وغير متصلة
M.albus	6	كبيرة متصلة مع بعضها	5–6	لا يوجد	4–6	1–2	6–5 طبقات	الكامبيوم من 5–7 طبقات، يتواجد الخشب الثانوي في طبقات واضحة والمميز للبنية الثانوية ويوجد السكلرانشيم بشكل دوارة متقطعة فوق الحزم.
M.officinalis	8	21–17	4–2	لا يوجد	4–7	4	7	الكامبيوم من 2–3 طبقات، عدد الحزم يتراوح بين 17 –21 غير متصلة مع بعصها يوجد جزر من السكلرانشيم فوق الحزم
M.segetalis	6–8	16–25	3–5	لا يوجد	6–8	4–5	7–5	الكامبيوم من 1–2 يوجد سكلرانشيم كجزر تحت النتوء بين 2–3 طبقات غير متصلة موبر قليلاً

3-2-3-2 البنية التشريحية للأوراق:

تشابهت المقاطع العرضية للوريقات الجانبية مع الوريقة الوسطى في منطقة الضلع الرئيسي والصفيحة الورقية لذلك تم اعتماد دراسة الوريقة الوسطى تشريحياً:

- ففي مستوى حزمة الضلع الرئيس:

شوهدت بشرة عليا تعلوها قشيرة رقيقة ثم نسيج حباكي يليه نسيج برانشيمي تتوسطه الحزمة الناقلة المؤلفة من حزمة الأوعية الخشبية واللحائية وتظهر بضع طبقات من الكولانشيم الحلقي محيطة باللحاء، ثم خلايا برانشيمية 2-4 طبقات وبشرة سفلى مغطاة بالقشيرة.

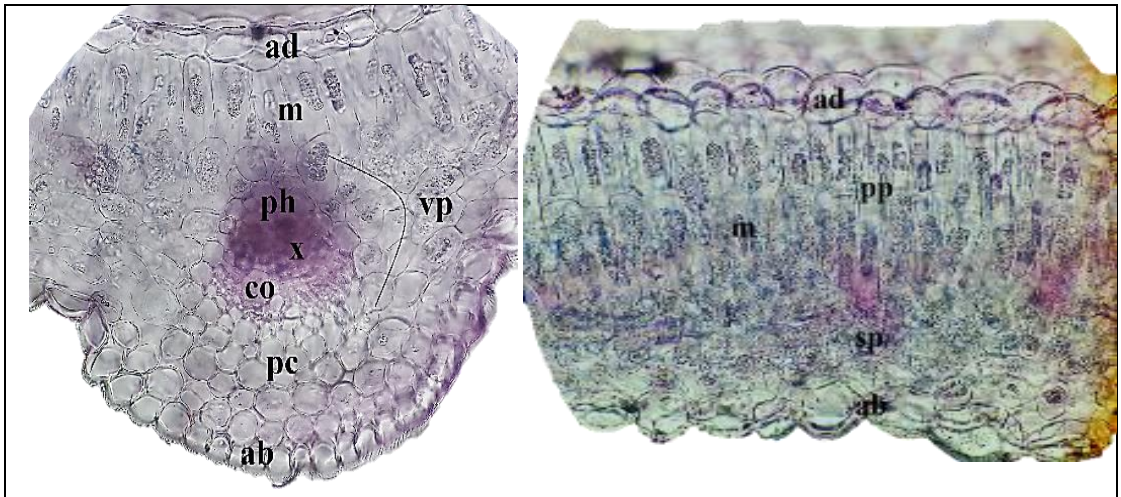
- أما في مستوى الصفيحة الورقية:

يتكون المقطع من قشيرة رقيقة تغطي البشرة العليا التي تتألف من صف واحد من الخلايا السيللوزية مستطيلة الشكل أو بيضوية، يليها نسيج متوسط المؤلف من النسيج الحباكي بخلايا سيللوزية متراصة مع بعضها البعض ممتلئة بالصانعات الخضراء حيث يستمر تحت البشرة في منطقة الضلع الرئيسي وهي صفة مميزة للجنس، حيث كانت من 1-2 طبقة في النوع ***M.sulcatus*** *و طبقيتين في نوع* ***M.segetalis*** وتميزت خلاياه بصغر حجمها عن الأنواع الأخرى، *و* من 2-3 طبقات *في نوعي* ***M.indicus, M.officinalis*** وتميز النوع ***M.albus*** بـ 3-4 طبقة، يلي النسيج الحباكي 2-5 طبقات من النسيج الفراغي يختلف عدده بحسب النوع ثم طبقة من البشرة السفلى تغطيها قشيرة رقيقة يتواجد فيها أوبار تختلف كثافتها بحسب النوع ويكثر فيها المسام حيث توافقت نتائجنا مع دراسة **(Dordzhieva *et al.*, 2019 ,ozbak et al., 2014)**، كما هو موضح في الجدول (20) و الشكل (26).

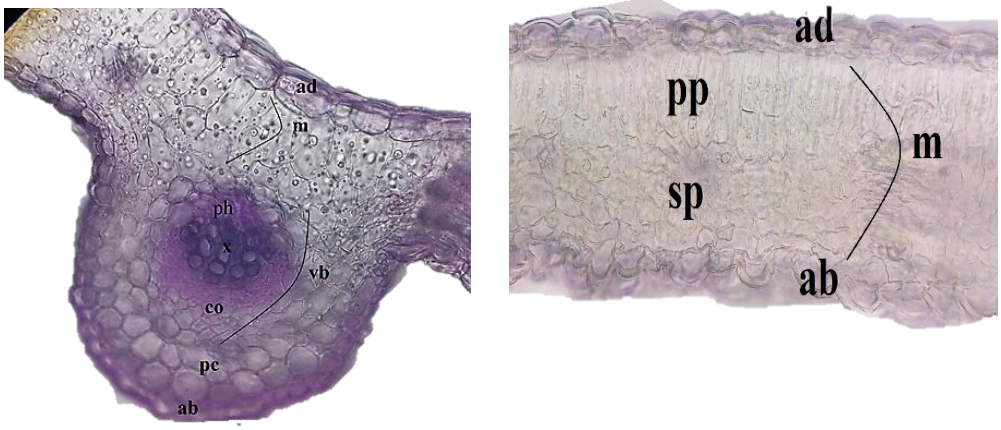
الجدول (20): الاختلافات التشريحية في مقطع عرضي للوريقة الوسطى للأنواع المدروسة

الأنواع	الحباكي	الفراغي	شكل خلايا البشرة	شكل الحزم	الأوبار
M.indicus	2-3	3-5	بيضوية إلى مستطيلة متشابهة في الحجم والشكل بين البشرة العليا والسفلية	بيضوية، يحيط فيها4 طبقات الكولانشيم حلقي من الأسفل، و4-5 طبقة من البرانشيم	توجد على البشرة السفلية عادية، قليلة

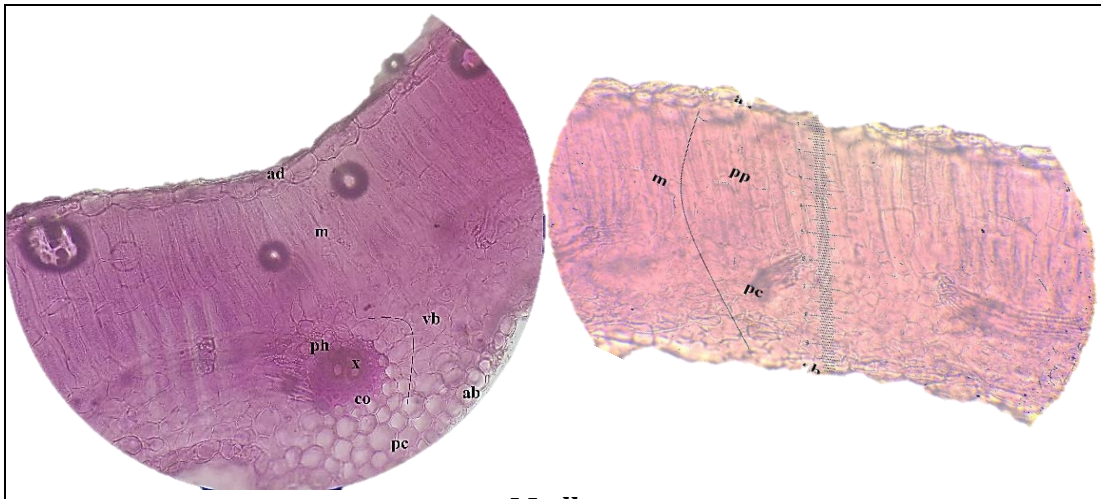
M.sulcatus	2-1خلايا أكبر وأقل عدد من indicus	5-3	خلايا البشرة العلوية والسفلية مستطيلة إلى بيضوية متشابهة	بيضوية، محاطة من الجهة السفلية بالكولانشيم من الأسفل، و4 طبقات من البرانشيم	أوبار وحيدة الخلية توجد في البشرة السفلية وأقل في العلوية
M.albus	4-3	5-6	مستطيلة ومتشابهة الحجم بين البشرة العليا والسفلى	كروية إلى بيضوية، الكولانشيم 4 طبقات من الأسفل	موبر بشكل واضح للبشرة السفلية أكثر من العلوية
M.officinalis	3-2	4-5	مستطيلة إلى بيضوية وحجمها متساو بين البشرتين	بيضوية، يحيط الكولانشيم من الأعلى 3 طبقات ومن الأسفل 2-1طبقة	نادرة الوجود
M.segetalis	2 حجم الخلايا صغير	2-4	مستطيلة إلى بيضوية ومتشابهة العلوية والسفلية	بيضوية يحيط الكولانشيم من الأعلى 2 طبقة ويلاحظ السكلرانشيم من 2-3 طبقة	يوجد أوبار عادية على البشرة السفلية



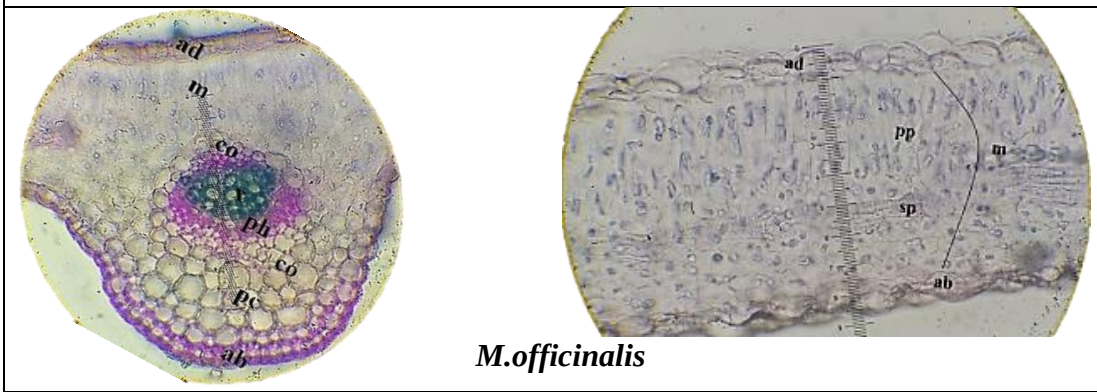
M.indicus



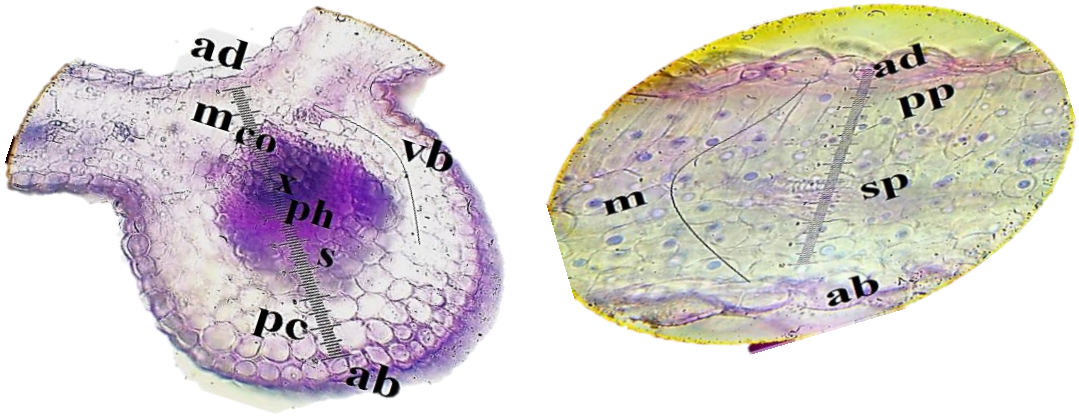
M.sulcatus



M.albus



M.officinalis



M.segetalis

الشكل (26) يوضح المقاطع العرضية في الوريقة لكل الأنواع المدروسة بتكبير x400، A:الصفيحة الورقية، B:الضلع الرئيسي حيث أنad= بشرة عليا، ab=بشرة سفلى، vb=حزمة رئيسة، m=خلايا الميزوفيل، pp= البرانشيم العمادي،sp= النسيج الاسفنجي pc= خلايا برانشيم، co= كولانشيم s=سكلرانشيم، ph= لحاء، x= خشب،

3-2-3-3 التحليل الاحصائي للدراسة التشريحية لطبقات منطقة النتوءات في الساق:

يوضح الجدول (21) الإحصاءات الوصفية لعدد الطبقات المؤلفة لمنطقة النتوءات في الساق لدى أنواع النباتات المدروسة: بينت النتائج في(15) ساحة مجهرية لمقاطع عرضية للساق فروق معنوية واضحة لعدد طبقات السكلرانشيم والكولانشيم بين الأنواع، حيث كان النوع ***M.segetalis*** أعلى قيمة في عدد الطبقات الدعامية للنوع،ويليه النوعين ***M.albus ,M. officinalis*** وأدنى قيمة كانت في النوع ***M.indicus*** يليه نوع ***M.sulcatus***.

الجدول (21): يوضح الإحصاءات الوصفية لطبقات النتوءات في المقطع العرضي للساق للأنواع المدروسة

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum	SIG BY ONE WAY ANOVA
عدد طبقات الكولانشيم	*M. indicus*	15	4.40	0.507	0.131	4	5	0.000
	M.sulcatus	15	5.27	0.799	0.206	3	6	
	M.albus	15	5.07	0.884	0.228	4	6	
	M.officinalis	15	6.47	0.640	0.165	5	7	
	M.segetalis	15	6.93	0.961	0.248	5	8	
عدد طبقات سكلرانشيم	*M. indicus*	15	3.47	0.516	0.133	3	4	0.000
	M.sulcatus	15	4.33	0.617	0.159	3	5	
	M.albus	15	5.47	0.516	0.133	5	6	
	M.officinalis	15	3.73	0.458	0.118	3	4	
	M.segetalis	15	4.13	1.187	0.307	3	7	

3-2-4 – الدليل التصنيفي التشريحي:

تشير خلاصة القراءات التشريحية للمقاطع العرضية للساق والأوراق والتي جمعت عدة صفات أدت إلى المفتاح التصنيفي التالي:

1-متوسط عدد المسام في الوجه السفلي للوريقة أكبر من 41 2

1´- متوسط عدد المسام في الوجه السفلي أقل أو يساوي 41 .....2`

2-في المقطع العرضي للوريقة يكون شكل الحزمة الوعائية كروية إلى ببضوية 3

2´- في المقطع العرضي للوريقة يكون شكل الحزمة بيضوية .....3`

3-لايحيط السكلرانشيم في الحزمة الوعائية في م.ع. للوريقة 4

3´- يحيط السكرانشيم بالحزمة الوعائية في م. ع للوريقة .....***M.segetalis***

4- العلم يحيط بالزورق 5

4´- الزورق يحيط بالعلم .....***M.sulcatus***

5- يكون مقطع العرضي للساق مضلع غير منتظم ذو 6 نتوءات 6

5`- يكون المقطع العرضي للساق مضلع غير منتظم ذو 8 نتوءات .....***M.officinalis***

6-عدد طبقات الكولانشيم الزاوي تحت النتوء أكثر من 5 طبقات 7

6`-عدد طبقات الكولانشيم الزاوي تحت النتوء أقل أو يساوي 5 طبقات .....7`

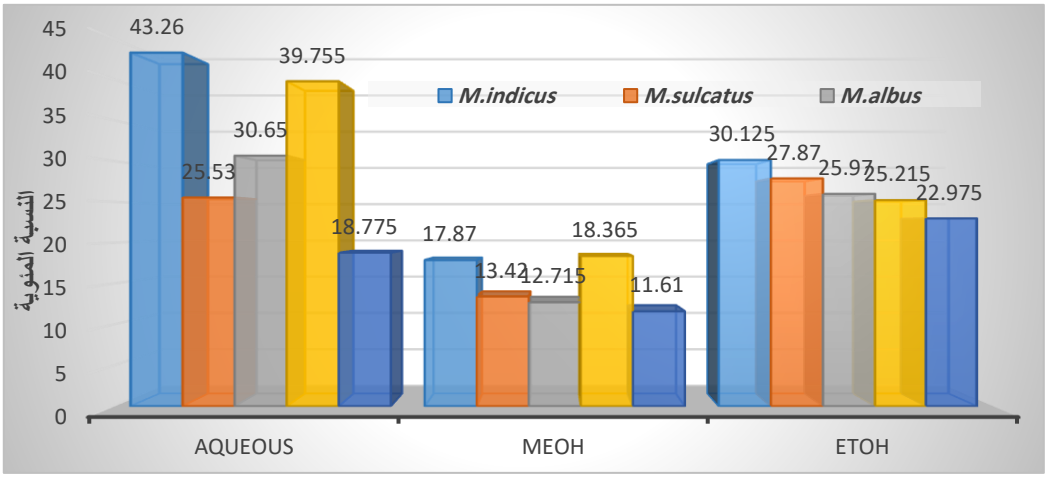
7-عدد طبقات السكلرانشيم تحت النتوء أكثر من 4 طبقات .....***M.albus***

7`- عدد طبقات السكلرانشيم تحت النتوء أقل أو يساوي4 طبقات .....***M.indicus***

3-3 الدراسة الكيميائية للأنواع:

3-3-1 تعيين مردود الاستخلاص:

تم حساب مردود الاستخلاص لجميع مستخلصات الأجزاء الهوائية (الساق، الأوراق، الأزهار، القرون) للأنواع



الشكل (27): النسبة المئوية لمردود الاستخلاص للأنواع في الخلاصات المختلفة

يُظهر المخطط أن نسبة مردود الاستخلاص تختلف باختلاف نوع المذيب المستخدم، حيث كانت المستخلصات المائية **(Aqueous)** الأكثر كفاءة في الاستخلاص مقارنةً بالمذيبات (الميتانولية والإيتانولية70%).

سجل ***M.indicus*** أعلى نسبة مردود في المستخلصات المائية 43.26%، بينما كان ***M.officinalis*** ثاني أعلى مردود 39.755%، في حين أن أدنى نسبة سجلها ***M.segetalis*** **18.775%**.

أما في المستخلصات الميثانولية **(MeOH)**، فكانت نسبة الاستخلاص أقل نسبياً من باقي المستخلصات، ثم سجل ***M. officinalis*** أعلى نسبة 18.365%، بينما كان ***M. segetalis*** الأدنى 11.61%.

وبالنسبة للمستخلصات الإيتانولية **(EtOH70%)**، جاءت النسب متوسطة بين المائي والميثانولي، حيث حقق ***M.indicus*** أعلى نسبة 30.125%، في حين سجل ***M.segetalis*** أدنى نسبة (22.975%).

وهذا يشير إلى أن المذيبات المائية توفر استخلاصاً أفضل للمركبات مقارنةً بالمذيبات الأخرى، مما يعكس تأثير الذوبانية والتفاعلات الكيميائية بين المركبات النشطة والمذيبات المستخدمة، مما يجعل اختيار المذيب أمراً أساسياً في عمليات الاستخلاص.**(Balamurugan *et al*.,2019)**.

وقد توافقت نتائجنا مع **Sheikh and Desai, 2017, Alsanfi, 2020** بأن المستخلص المائي تفوق على الميتانولي عند الاستخلاص لنوع ***M.officinalis*** بقيم على التوالي **3.96,13.27%**، كذلك مع دراسة **Mladenovie *et al*., 2016** , تفوق المستخلص المائي على الإيتانولي **36.9,6.47%** على التوالي، وكذلك في نوع ***M. indicus*** فقد كان المستخلص المائي الأفضل في المردود من الميتانولي **36,3.6%** في دراسة **Iftikhar *et al*., 2019**.

بينما كان المستخلص الميتانولي أعلى مردود من المستخلص الإيتانولي حسب **Tarawneh *et al*., 2008** لأوراق ***M.indicus*** وهذا ما يخالف دراستنا، والذي يعود لأسباب مختلفة منها: جزء النبات المستخلص منه، وكذلك نوع المذيب الذي استعمل في الاستخلاص(الإيتانول المطلق في دراسة **Tarawneh *et al*., 2008**، بينما استعمل الإيتانول المائي 70%، واختلاف المناطق والبيئات التي جمعت منها النباتات.

وعند مقارنة مردود الخلاصتين المائية والميتانولية ***M.albus*** في دراسة **Dahamani *et al*., 2024** فقد كان المستخلص المائي الأفضل في قيمة المردود من المستخلص الميتانولي وهذا يتوافق مع نتائج هذه الدراسة.

3-3-2 نتائج الكشف الكيفي عن المستقلبات الثانوية:

كشف عن عشرة مستقلبات ثانوية في المستخلصات المتنوعة والمختلفة القطبية ويبين الجدول (22) نتائج الكشف:

الجدول(22) نتائج الاختبارات الكشف الكيفي في المستخلصات المختلفة

المركبات التي تم الكشف عنها		*Melilotus indicus*			*Melilotus sulcatus*			*Melilotus albus*			*Melilotus officinalis*			*Melilotus.segetalis*		
		Aqueous	MEOH	ETOH	Aqueous	MEOH	ETOH	Aqueous	MEOH	ETOH	Aqueous	MEOH	ETOH	Aqueous	MEOH	ETOH
الفلافونوئيدات flavonoids NH4OH		++	+++	++	+++	++	+++	++	++	++	+++	+++	++	+	+	+
القلويدات	dragndroff	+++	+	++	+++	+++	+	++	++	++	+++	++	+++	++	+	++
	FeCl3	+	+	+++	++	+++	+	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	++	+
	Mayer	++	+	+	+++	+++	+++	++	++	++	+	+++	++	+++	++	+
التانينات Tannins		+	+++	+	++	+++	++	++	+++	+++	+	++	+++	+++	+	+
الكومارينات coumarins		++	++	+++	++	+	+++	+++	+	++	++	+	+++	+++	++	++ +
الصابونينات Saponinas		+	–	–	+	+	+	–	–	–	+	–	–	+	–	–
الصابونوزيدات Saponosides		+	–	–	+	–	–	–	–	–	+	–	–	+	–	–
التربينات الثنائية Diterpenes		+++	++	+++	+++	++ +	+++	++	+	++	+++	+++	+++	++	+	+
التربينات الثلاثية Triterpenes (كبريتات النحاس اللامائية)		+++	++	+++	+++	+	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+	+
Triterpenes	حلقة حمراء	+	+++	+++	++	++	+++	+++	+	++	++	++	+++	++	+	++
Steroids	لون أحمر	+	++	++	++	+++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+	+	+
الغليكوزيدات القلبية Glycosides cardiac		+++	++	+++	++	++	++	+++	+	+++	+	+++	+++	+	+	+
الكربوهيدرات Carbohydrates		++	+++	++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	+	+++	++	++	+

تدل إشارة + على وجود ضعيف للمستقلب، وتدل إشارة ++ على وجود متوسط للمستقلب، وتدل إشارة +++ على وجود قوي للمستقلب، بينما تدل إشارة - على غياب المستقلب

أظهرت نتائج الكشف الكيفي للمستخلصات عن وجود المستقلبات الثانوية بنسب مختلفة في مختلف الخلاصات حيث كانت جميعها غنية بالمركبات الفينولية، حيث أظهرت المقارنة أن المستخلص الميثانولي كان الأفضل في إظهار عدد أكبر من المركبات يليه المستخلص الإيتانولي 70% الذي كان فعالاً في استخلاص الفلافونوئيدات، الكومارينات، والتربينات الثلاثية لكنه أقل كفاءة باستخلاص القلويدات والغليكوزيدات. أما المستخلص المائي فكان الأقل كفاءة باستخلاص معظم المستقلبات الثانوية عدا الصابونينات والصابونوزئيدات، كما احتوى على بعض القلويدات، الكربوهيدرات، والغليكوزيدات القلبية، مع الستيروئيدات والتربينات. بذلك، يُعد الميثانول هو المستخلص الأكثر كفاءة لاستخلاص المركبات النشطة، يليه الإيثانول، ثم الماء الذي كان فعالاً فقط في استخلاص الصابونينات والصابونوزئيدات وبعض الغليكوزيدات.

وفي المقارنة بين الأنواع من حيث غناها بالمركبات الكيميائية في المستخلصات المختلفة، كان ***Melilotus indicus*** هو الأكثر غنى بالمركبات الكيميائية في جميع المستخلصات. أظهر المستخلص الميثانولي أعلى فعالية في استخراج المركبات الكيميائية من ***M. indicus***، حيث أظهر وفرة عالية نسبياً من الفلافونوئيدات، القلويدات، التانينات، التربينات، الستيروئيدات، يليه ***Melilotus officinalis***، الذي كان غنياً أيضاً بالعديد من المركبات، خاصة الفلافونوئيدات والقلويدات. أما ***M. sulcatus*** ،***M. albus*** فقد أظهرا تفاعلات كشف إيجابية منخفضة الشدة التي تدل على انخفاض تراكيز المركبات الكيميائية في جميع المستخلصات، مع ملاحظة غياب الصابونوزيدات والصابونينات في ***M.albus*** في كافة المستخلصات.

في المقابل، كان ***Melilotus segetalis*** هو الأقل احتواءً على المركبات النشطة، حيث كانت الصابونينات و الصابونوزئيدات غائبة أو موجودة بكميات ضئيلة في المستخلصات الميثانولية والإيتانولية .وبالتالي، يُعتبر ***Melilotus indicus*** الأكثر غنى بالمركبات الكيميائية، يليه ***M. officinalis***، بينما كانت ***M. sulcatus*** و ***M. segetalis*** الأقل غنىً بالمركبات الفعالة ويمكن تفسير هذا التباين في وفرة المركبات الفعالة باختلاف درجة التأقلم البيئي، حيث يُعد ***M. indicus*** من الأنواع الواسعة الانتشار، ما قد ينعكس في كفاءة أعلى لمساراته الأيضية الثانوية، مقارنة بالأنواع الأخرى ذات الانتشار المحدود

وعند مقارنة نتائج هذه الدراسة بنتائج دراسة الفيتو كيميائية لأوراق ***M.indicus*** **Sonju *et al.,* 2017** فقد تبين وجود توافق من حيث التفاعل الإيجابي لاختبارات الكربوهيدرات والغليكوزيدات والقلويدات في المستخلصين الميتانولي والإيتانولي70%، واختلافاً مع نتائج دراستنا من حيث التفاعل السلبي في المستخلص المائي، كذلك أظهرت تفاعلاً سلبياً في كل من التانينات والفلافونوئيدات في المستخلصات الثلاث المائية والميتانولية والايتانولية والقلويدات في المستخلص المائي خلافاً لنتائج دراستنا هذه.

وقد توافقت نتائج دراستنا مع نتائج دراسة **Mirzaei *et al.,2021*** لمستخلص المائي لبذور ***M.officinalis*** في التفاعلات الإيجابية لكل من الفلافونوئيدات والغليكوزيدات والصابونينات والتربينوئيدات

3-3-3 نتائج المحتوى الكلي من الفينولات:

بيّنت النتائج أن كفاءة الماء والإيتانول 70% في استخلاص الفينولات الكلية كانت متقاربة، في حين كان الميتانول الأقل كفاءة فيمابينها، وقد رُتبّت المذيبات حسب فاعليتها كما يلي:

Aqueous ≈ EtOH 70% > MeOH

بينت الدراسة الإحصائية التي هدفها دراسة تأثير نوع المستخلص (المائي، الإيتانولي، الميثانولي) وأنواع جنس الحندقوق، ***(Melilotus indicus،M. albus ،M. sulcatus***

M.officinalis ،M.segetalis) على المحتوى الكلي للفينولات، وأوضحت النتائج وجود فروق معنوية بين المستخلصات الثلاثة ضمن الأنواع المدروسة، وذلك عند($p<0.05$)، ولمعرفة الفروق بين المتوسطات تم إجراء اختبار أقل فرق معنوي (LSD)، وكانت النتائج كما في الجدول (23):

الجدول 23: اختبار اقل فرق معنوي بين المحتوى الكلي للفينولات باختلاف المستخلصات

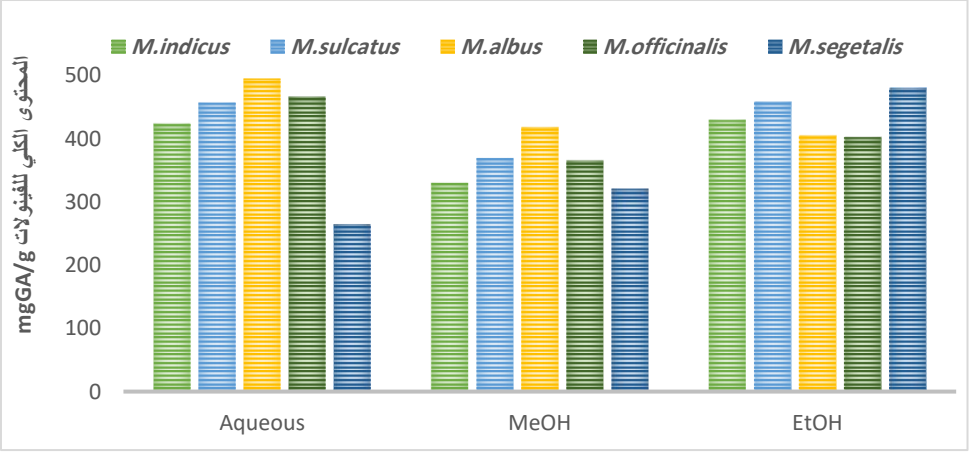
LSD Multiple Comparisons **Dependent Variable:** للفينولات_ الكلي _المحتوى

(I)المستخلصات	(J)المستخلصات	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.		95% Confidence Interval	
					معنوي/غير معنوي	Lower Bound	Upper Bound
مائية	ميتانولية	.1422*	.04815	.006	معنوي	.0439	.2405
	ايتانولية	-.0247-	.04815	.611	غير معنوي	-.1231-	.0736
ميتانولية	مائية	-.1422-*	.04815	.006	معنوي	-.2405-	-.0439-
	ايتانولية	-.1669-*	.04815	.002	معنوي	-.2653-	-.0686-

ايتانولية	مائية	.0247	.04815	.611	غير معنوي	-.0736-	.1231
	ميتانولية	.1669*	.04815	.002	معنوي	.0686	.2653

وقد دعمت النتائج الإحصائية هذه الملاحظات، حيث بيّن تحليل التباين الثنائي الاتجاه **(Two-Way ANOVA)** وجود فروق معنوية بين المستخلصات الثلاثة، وكذلك بين بعض الأنواع النباتية من حيث قدرتها على إنتاج الفينولات. وأظهر اختبار **LSD** أن الميتانول كان الأقل قدرة على الاستخلاص بشكل معنوي مقارنة بالمائي والإيتانولي70%، مما يتوافق مع القيم الكيميائية المنخفضة المرتبطة بها.

وعند مقارنة الأنواع المدروسة من جنس ***Melilotus***، أوضحت الاختبارات الكيميائية أن النوع ***M.albus*** سجل أعلى قيمة للمحتوى الكلي للفينولات في كل من المستخلص المائي (494.66±0.06 mgGa/g) والميثانولي (415.41±0.12 mgGa/g)، في حين سجل النوع ***M.segetalis*** القيمة الأعلى في المستخلص **الإيتانولية.**(479.51±0.01 mgGa/g) . أما أقل القيم للمحتوى الفينولي فقد سُجلت في النوع ***M. officinalis*** ضمن المستخلص المائي (264.74±0.13 mgGa/g)، وفي النوع ***M. sulcatus*** ضمن المستخلص الميثانولي .(320.88±0.01 mgGa/g) في حين كان المحتوى الفينولي في المستخلص الإيتانولي متقارباً في نوعي ***M. officinalis*** و***M. albus***، إذ بلغت القيم 405.18±0.18 و 402.37±0.37 mgGa/g على التوالي. كما سجل النوعان ***M. sulcatus*** و ***M. segetalis*** محتوى أعلى من المحتوى الكلي للفينولات مقارنة بالنوع ***M. albus*** (اختبار**LSD**)، وهو ما يتفق مع البيانات الكيميائية التي أظهرت تميز ***M. segetalis*** في المستخلص الإيتانولي. الشكل (28)، الجدول(24):



الشكل 28: المحتوى الكلي للفينولات للمستخلصات المختلفة للانواع

الجدول (24) يوضح تراكيز المحتوى الكلي للفينولات mgG/g			
تركيز المحتوى الكلي للفينولات mg Ga/g	Aqueous	MeOH	EtOH 70%
M.indicus	**422.963±0.06**	**329.92±0.15**	**429.03±0.15**
M.sulcatus	**456.963±0.12**	**369.037±0.03**	**458.07±0.03**
M.albus	**494.66±0.09**	**418.518±0.2**	**405.18±0.2**
M.officinalis	**465.92±0.07**	**365.1852±0.19**	**402.37±0.19**
M.segetalis	**264.74±0.13**	**320.88±0.014**	**479.51±0.014**

وعند مقارنة نتائج هذه الدراسة مع دراسة (**Snojou *et al.*, 2017**) فقد تفوقت المستخلص الميتانولي لأوراق ***M.indicus*** في المحتوى الكلي للفينولات بقيمة **2.83 mgGa/g** على باقي المستخلصات، وكان المستخلص المائي الأقل في المحتوى الفينولي بقيمة **1.66mgGa/g** على عكس دراستنا التي تفوق فيها المستخلص الإيتانولي في استخلاص المحتوى الكلي للفينولات بقيمة **429.03mgGa/g**، و تبيّن أن المستخلص الميتانولي هو الأقل استخلاصاً بقيمة **329.92mgGa/g**.

وقد توافقت نتائجنا مع دراسة (**Ahmed *et al.*, 2012**) بأن المستخلص الميتانولي تفوق على المستخلص المائي للأجزاء الهوائية ***M.indicus*** في استخلاص المحتوى الكلي للفينول.

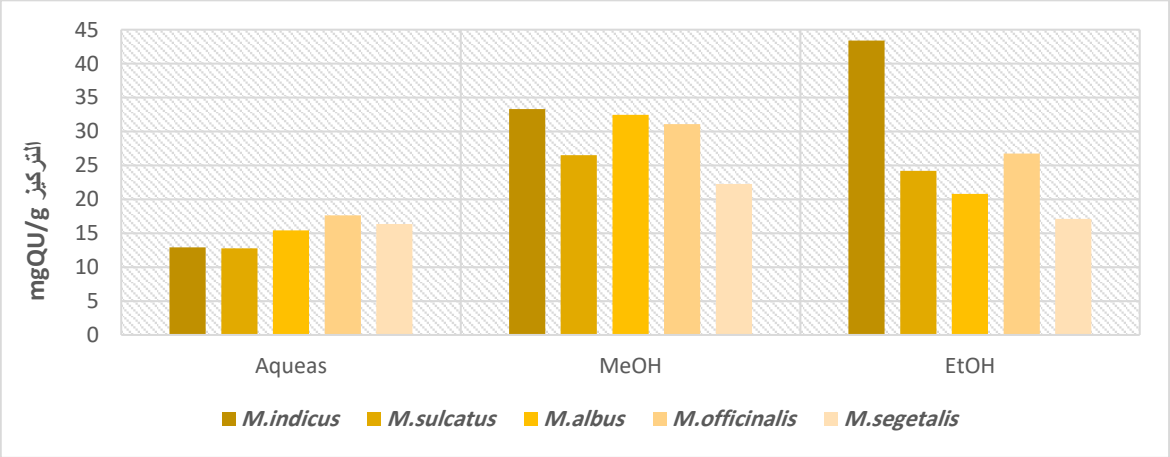
وأيضاً مع دراسة **(Alsanfi 2020)** في تفوق المستخلص المائي لـ***M.officinalis*** على المستخلص الإيتانولي في استخلاص المحتوى الكلي من الفينولات بقيمة **(36.25±0.79,34.19±0.19mgRU/g)**، ومع دراسة **Sheikh and Desai 2017** ودراسة **maldenvic *et al.*, 2016** لمستخلصات كل من أوراق وسُوق ***M.officinalis*** بتفوق الماء كمذيب على الميتانولي في استخلاص الكمية الأكبر من المحتوى الفينولي، وقد أظهرت نتائج دراسة **Borhani *et al.*, 2024** تفوق المستخلص الإيتانولي 80%(جذور، ساق، أزهار) ***M.officinalis*** على المستخلص المائي على عكس نتائج دراستنا.

وفي دراسة **Dahmani *et al.*, 2024** لتعيين المحتوى الفينولي في نوع ***M.albus*** فقد لوحظ أن الماء أعلى كفاءة في استخلاص الفينولات من الميتانول، وهذا ما يتوافق مع دراستنا حيث يتميز الماء بالقطبية العالية، ممايعزز ذوبانية المركبات الفينولية خاصة البسيطةأو المرتبطة بالسكريات.

3-3-4 نتائج المحتوى الكلي للفلافونوئيدات:

يُوضح المخطط البياني اختلاف فعالية المذيبات الثلاثة (المائية، الميتانولية، الإيتانولية 70%) في استخلاص المحتوى الكلي للفلافونوئيدات من الأنواع الخمسة المدروسة من جنس ***Melilotus*.**

ويتبيّن من الرسم أن المستخلص الميثانولي (**MeOH**) كان الأكثر فعالية في استخلاص المحتوى الكلي للفلافونوئيدات في أغلب الأنواع، عدا ***M.indicus***، حيث سجّل المستخلص الإيتانولي (EtOH70%) أعلى قيمة للاستخلاص (43.42±0.03 mgQu/g)، وأما المستخلص المائي فقد كان الأقل فعالية في استخلاص المحتوى الكلي للفلافونوئيدات في معظم الأنواع، الذي تفوق فيه نوع ***M. officinalis*** مقارنة ببقية الأنواع الشكل.(29)



الشكل (29) المحتوى الكلي للفلافونوئيدات لأنواع الحندقوق تبعاً لنوع المذيب.

وقد دعمت الدراسة الإحصائية هذه النتائج، وأظهرت النتائج وجود فروق معنوية بين المذيبات الثلاثة عند مستوى الدلالة **P>0.05**، ولتعيين أقل فرق معنوي بين المتوسطات تم إجراء اختبار **(LSD)** فبينت النتائج أن الفرق بين المستخلصين الإيتانولي والميثانولي كان معنوياً **(p=0.000)**، في حين لم تُسجل فروق معنوية بين المائي والميثانولي **(p=0.585)**، مما يعزز فعالية المذيبين العضويين مقارنة بالمائي.(الجدول 25).

الجدول25 :اختبار أقل فرق معنوي بين متوسطات المستخلصات وتأثيرها على المحتوى الكلي للفلافونوئيدات المحتوى الكلي للفلافونوئيدات: **LSD** Multiple Comparisons **Dependent Variable**							
(I)المستخلصات	(J)المستخلصات	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.		95% Confidence Interval	
					معنوي/غير معنوي	Lower Bound	Upper Bound
مائية	ميتانولية	.0245	.04446	.585	غير معنوي	-.0663-	.1153
	ايتانولية	.3335*	.04446	.000	معنوي	.2427	.4243
ميتانولية	مائية	-.0245-	.04446	.585	غير معنوي	-.1153-	.0663
	ايتانولية	.3089*	.04446	.000	معنوي	.2181	.3997
ايتانولية	مائية	-.3335-*	.04446	.000	معنوي	-.4243-	-.2427-
	ميتانولية	-.3089-*	.04446	.000	معنوي	-.3997-	-.2181-

وبالنسبة للأنواع، فقد أظهرت البيانات أن أعلى محتوى للفلافونوئيدات سُجّل في نوع ***M. indicus*** في المستخلصين الإيتانولي والميثانولي، تلاه نوع ***M. albus***، في حين سجّل نوع ***M. segetalis*** أقل القيم في جميع المستخلصات. يعود اختلاف كمية الفلافونوئيد المستخلصة باستخدام مذيبات مختلفة إلى تباين قطبية هذه المذيبات، إذ تؤثر قطبية المذيب في نوع وهيكل الفلافونوئيدات التي يمكن استخلاصها. وهذا بدوره يؤدي إلى اختلاف في النشاط الحيوي للمستخلصات. (Ahmed ***et al.,*** 2012).

وأكدت الدراسة الإحصائية على وجود فروقاً معنوية بين ***M. indicus*** وكل من ***M. M.segetalis*** (p=0.002) ***M. sulcatus*** (p=0.005)، في حين لم تكن الفروق بين ***M. indicus*** وباقي الأنواع معنوية. كما لوحظ تفوق ***M. officinalis*** في المستخلص المائي، وهو ما تدعمه الفروق الإحصائية بينه وبين ***M. segetalis*** (p=0.009). الجدول (26).

الجدول (26): LSD **اختبار أقل فرق معنوي بين المتوسطات المحتوى الكلي للفلافونويد بين الأنواع**							
Dependent Variable: المحتوى الكلي للفلافونوئيد							
(I)النوع	(J)الأنواع	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.		95% Confidence Interval	
					معنوي/غير معنوي	Lower Bound	Upper Bound
M.indicus	***M.sulcatus***	.1760*	.05740	.005	معنوي	.0588	.2932
	M.albus	.0988	.05740	.096	غير معنوي	-.0185-	.2160
	M.officinalis	.0349	.05740	.548	غير معنوي	-.0823-	.1521
	M.segetalis	.1962*	.05740	.002	معنوي	.0790	.3135
M.sulcatus	***M.indicus***	-.1760-*	.05740	.005	معنوي	-.2932-	-.0588-
	M.albus	-.0772-	.05740	.189	غير معنوي	-.1945-	.0400
	M.officinalis	-.1411-*	.05740	.020	معنوي	-.2583-	-.0239-

	M.segetalis	**.0202**	**.05740**	**.727**	غير معنوي	**-.0970-**	**.1375**
M.albus	***M.indicus***	**-.0988-**	**.05740**	**.096**	غير معنوي	**-.2160-**	**.0185**
	M.sulcatus	**.0772**	**.05740**	**.189**	غير معنوي	**-.0400-**	**.1945**
	M.officinalis	**-.0639-**	**.05740**	**.275**	غير معنوي	**-.1811-**	**.0533**
	M.segetalis	**.0974**	**.05740**	**.100**	غير معنوي	**-.0198-**	**.2147**
M.officinalis	***M.indicus***	**-.0349-**	**.05740**	**.548**	غير معنوي	**-.1521-**	**.0823**
	M.sulcatus	**.1411***	**.05740**	**.020**	معنوي	**.0239**	**.2583**
	M.albus	**.0639**	**.05740**	**.275**	غير معنوي	**-.0533-**	**.1811**
	M.segetalis	**.1613***	**.05740**	**.009**	معنوي	**.0441**	**.2786**
M.segetalis	***M.indicus***	**-.1962-***	**.05740**	**.002**	معنوي	**-.3135-**	**-.0790-**
	M.sulcatus	**-.0202-**	**.05740**	**.727**	غير معنوي	**-.1375-**	**.0970**
	M.albus	**-.0974-**	**.05740**	**.100**	غير معنوي	**-.2147-**	**.0198**
	M.officinalis	**-.1613-***	**.05740**	**.009**	معنوي	**-.2786-**	**-.0441-**

تعكس هذه النتائج توافقاً واضحاً بين التحليل الكيميائي والمخرجات الإحصائية، وتُبرز أهمية كل من نوع المذيب والنوع النباتي في تحديد كفاءة الاستخلاص للمركبات الفلافونوئيدية.

وسجل النوع ***M.segetalis*** أقل قيمة لمحتوى الفلافونوئيدات في المستخلص الإيتانولي والميتانولي (**17.12±0.06, 22.24±0.02 mgQu/g**)، بينما سجل النوعان ***M. indicus, M. sulcatus*** قيماً منخفضة ومتقاربة بفارق بسيط من المحتوى الكلي للفلافونوئيدات في المستخلص المائي. الجدول (27).

الجدول (27). المحتوى الكلي للفلافونوئيدات في المستخلصات المختلفة.

تركيز الفلافونوئيدات mg Qu /g	**Aqueas مائي**	**MeOH الميتانولي**	**EtOH70% ايتانولي 70%**
M.indicus	12.92±0.09	33.31±0.08	43.42±0.03
M.sulcatus	12.78±0.24	26.51±0.19	24.18±0.04
M.albus	15.39±0.11	32.46±0.12	20.78±0.05
M.officinalis	17.64±0.16	31.09±0.15	26.73±0.12
M.segetalis	16.34±0.09	22.24±0.02	17.12±0.06

انسجمت نتائج هذه الدراسة مع دراسة Ahmed ***et al.,*** 2012 بأن المستخلص الميتانولي كان الأفضل من المستخلص المائي لـ ***M.indicus*** في استخلاص الكمية الأكبر من محتوى الفلافونوئيد، واختلفت معها بأن المستخلص الإيتانولي كان الأكثر كفاءة في استخلاص المحتوى الكلي للفلافونوئيدات بين المستخلصات.

تشابهت دراسة **Sonjou *et al*., 2017** في أن المستخلص الإيتانولي لأوراق ***M.indicus*** كان الأفضل لاستخلاص المحتوى الكلي للفلافونوئيدات من المستخلصين الميتانولي والمائي التي كانت الأقل جودة في الاستخلاص مع دراستنا هذه، حيث يتميز المذيب الإيتانولي 70% بقطبية متوسطة والتي تسمح بإذابة الفلافونوئيدات القطبية والشبه القطبية. ويعزى غنى النوع ***M.indicu*** بالمحتوى العالي من الفلافونوئيدات بأنه نبات متكيف يعيش في بيئات مختلفة، لاسيما في البيئات الجافة التي تتميز بأوقات طويلة من الشمس والحرارة، حيث تُحفز الأشعة فوق البنفسجية إنتاج الفلافونويدات كجزء من آلية الدفاع الطبيعي للنبات ضد الإجهاد البيئي **Sezai *et al*., 2008**.

وعند مقارنة نتائج دراستنا مع دراسة **Borhani *et al*.,. 2024** التي بحثت في المحتوى الكلي للفلافونوئيدات لمستخلصات جذور، ساق، وأزهار ***M. officinalis*** ، فقد وجد أن المستخلص الإيتانولي **80%** كان الأكثر كفاءة في استخلاص الفلافونوئيدات مقارنة بالمستخلص المائي، وهو ما يتوافق مع نتائجنا.

كذلك، أكدت نتائج دراسة **Sheikh and Desai, 2017** أن الميثانول الأفضل في استخلاص المحتوى الكلي للفلافونوئيداتكما نتائج دراستنا.

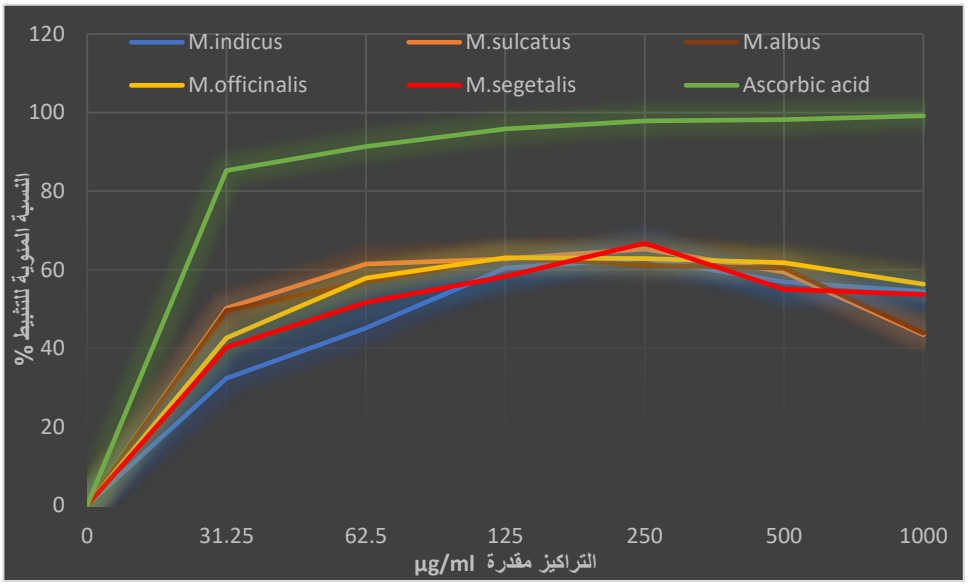
أما في دراسة **Dahmani *et al*., 2024** فقد سجل المستخلص المائي القيمة الأعلى من المحتوى الكلي للفلافونوئيدات من المستخلص الميتانولي وهذا ما يخالف نتائج دراستنا.

يتأثر المحتوى الكلي للفلافونوئيدات بكل من نوع المذيب المستعمل وصفات النوع النباتي، حيث تلعب قطبية المذيب دوراً حاسماً في استخلاص المركبات الفلافونوئيدية، بينما تسهم العوامل البيئية والفيزيولوجية الخاصة به في تحديد مستويات هذه المركبات داخل الأنسجة النباتية.

3-3-5 نتائج قدرة المستخلصات على تثبيط الجذور الحرة باستخدام DPPH:

بينت النتائج أن جميع الخلاصات، رغم اختلاف خصائصها وقطبيتها، تمتلك القدرة على تثبيط الجذور الحرة لمركب DPPH، إلا أنها كانت جميعها أقل فعالية من حمض الأسكوربيك المستخدم كمركب مرجعي. وقد تميز المستخلص الميتانولي بأعلى قدرة على التثبيط مقارنةً بالمستخلصين المائي والإيتانولي 70%.

في المقابل، لوحظ أن الفعالية الحيوية تنخفض مع زيادة تركيز المستخلص المائي لدى جميع الأنواع المدروسة، مما يشير إلى علاقة عكسية بين التركيز والفعالية في هذا النوع من المستخلصات وقد يعود ذلك لنوعية الفينولات مثلاً ودورها أو وجود عوامل إضافية أو مركبات أخرى لم يتم الكشف عنها لهادور في تقليل الفعالية التثبيطة لدى زيادتها في المستخلص. يوضح الأشكال(30،31،32) الفروق بين الأنواع في الخلاصات الثلاث.



الشكل (30): يوضح تغير القدرة على تثبيط DPPH· بتغير تركيز المستخلص المائي

يوضح المخطط أن أعلى نسبة تثبيط للجذور الحرة عند استخدام المستخلص المائي تم تسجيلها في النوع ***M.segetalis*** بنسبة 66.73±0.11% عند تركيز 250 µg/mL ، يليه ***M.sulcatus*** بنسبة 65.24±0.06%. بينما أظهر نوعا ***M.albus ,M.officinalis*** نسب تثبيط متقاربة عند تركيز 125 µg/ml(63.07±0.10% و63.11±0.08% على التوالي)، في حين سجل النوع ***M.indicus*** أدنى فعالية بنسبة 62.86±0.10% عند تركيز 250 µg/ml.

استُخدم تحليل التباين ثنائي الاتجاه **(tow-Way ANOVA)** لتقييم تأثير التراكيز المختلفة(31.25،62.5، 125، 250،500،1000**µg/ml**) من المستخلص المائي على تثبيط الجذور الحرة في خمسة أنواع نباتية هي***M.indicus***،

M.sulcatus*، *M.albus*، *M.officinalis*، *M.segetalis. وقد بيّنت النتائج وجود فروق معنوية بين التراكيز عند مستوى دلالة 0.05.

وكشفت نتائج اختبار **LSD** (اختبار أقل فرق معنوي) أن التركيز **250 µg/mL** سجّل فروقاً معنوية موجبة بالمقارنة مع التراكيز الأخرى، خاصة بالمقارنة مع التركيزين 62.5 و31.25 و1000**µg/mL** ، ما يشير إلى أن هذا التركيز يُمثل القيمة المثلى لتحقيق أعلى فعالية تثبيطية.

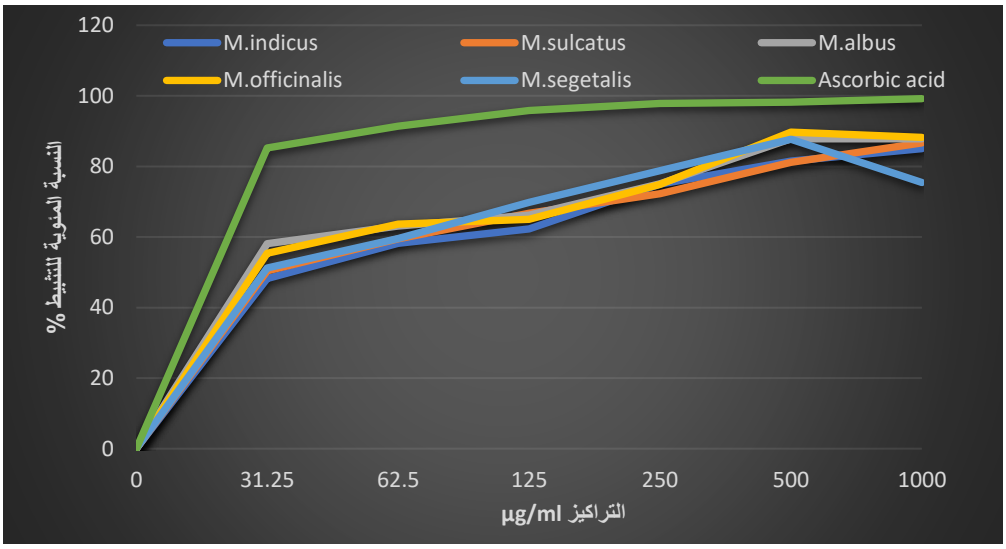
وتتسق هذه النتائج الإحصائية مع التحليل الكيميائي، حيث حقق مستخلص النوعان ***M. segetalis*** و***M. sulcatus*** أعلى نسب تثبيط عند تركيز **µg/mL** 250، وارتبطت فعاليتهما بارتفاع المحتوى الفينولي في خلاصاتهما المائية (وفقاً للبيانات الواردة في الجدول22، ص112)، في المقابل، كان النوع ***M. indicus*** الأقل فعالية، ويُعزى ذلك إلى انخفاض محتواه من المركبات الفينولية.

من جهة أخرى، وعلى الرغم من أن ***M. albus*** احتوى على أعلى تركيز فينولي، إلا أن نسبة تثبيطه لم تتجاوز 63.07%، مما يُشير إلى أن العلاقة بين الفينولات والفعالية ليست طردية بالضرورة، وقد تتأثر بعوامل إضافية مثل نوعية المركبات الفينولية، وتفاعلاتها النوعية مع الجذور الحرة.

بناءً على ما سبق، تُبرز النتائج التكامل بين التحليل الإحصائي والتفسير الكيميائي، وتُؤكّد وجود تباين معنوي في الفعالية التثبيطية بين بعض الأنواع النباتية المدروسة، مما يُوضح أهمية التركيز والتركيب الكيميائي في تحديد الفعالية الحيوية.

وبالنسبة لاختبار المستخلص الميتانولي، تبيّن أن التركيز µg/ml 1000هو الأكثر فعالية في تثبيط الجذور الحرة، حيث أظهر أعلى نسب تثبيط في جميع الأنواع. وقد سجّل النوع ***M. indicus***أعلى نسبة تثبيط بلغت ± 93.47

0.01%، يليه ***M. albus*** بنسبة 92.96 ± 0.03%، بينما أظهر النوع ***M. officinalis*** أقل قدرة على التثبيط بنسبة 89.15 ± 0.02%. الشكل (31).



الشكل 31: تغير القدرة في تثبيط DPPH· بتغير تركيز المستخلص الميتانولي

تعكس هذه النتائج الفروقات في التركيب الكيميائي للمستخلصات، لا سيما في محتواها من المركبات الفينولية والفلافونوئيدات، المعروفة بفعاليتها كمضادات أكسدة بسبب نوعية الفينولات بالمستخلص الميتانولي هي الأكثر فعالية.

بينت الدراسة الإحصائية تأثير كل من التراكيز المختلفة **(31.25,62.5, 250, 500,1000 µg/ml)** والأنواع النباتية ***M. indicus*** ،***M. sulcatus*** ،***M. albus*** ،***M. officinalis*** ،***M. segetalis*** وقد أُجري اختبار **LSD** **(** أقل فرق معنوي**)** لتحديد الفروق بين المتوسطات، فروقاً معنوية بين معظم التراكيز، مما يؤكد أن الزيادة في التركيز تؤدي إلى تحسن واضح في الفعالية التثبيطية، كما بيّن تحليل **LSD** وجود فروق معنوية بين الأنواع، باستثناء بعض المقارنات مثل ***M. officinalis*** مع ***M. albus***، والتي لم تكن معنوية، ما يعكس تشابهاً في فعاليتهما الكيميائية إلى حد لم تحقق فروق معنوية عند مستوى دلالة 0.05%، سواء بين التراكيز أو بين الأنواع.الجدول(28)

الجدول 28: اختبار LSDبين متوسطات امتصاصية تثبيط الجذور الحرة لاختبار DPPH للأنواع

Dependent Variable:نسبة_تثبيط_الجذور_الحرة

LSD

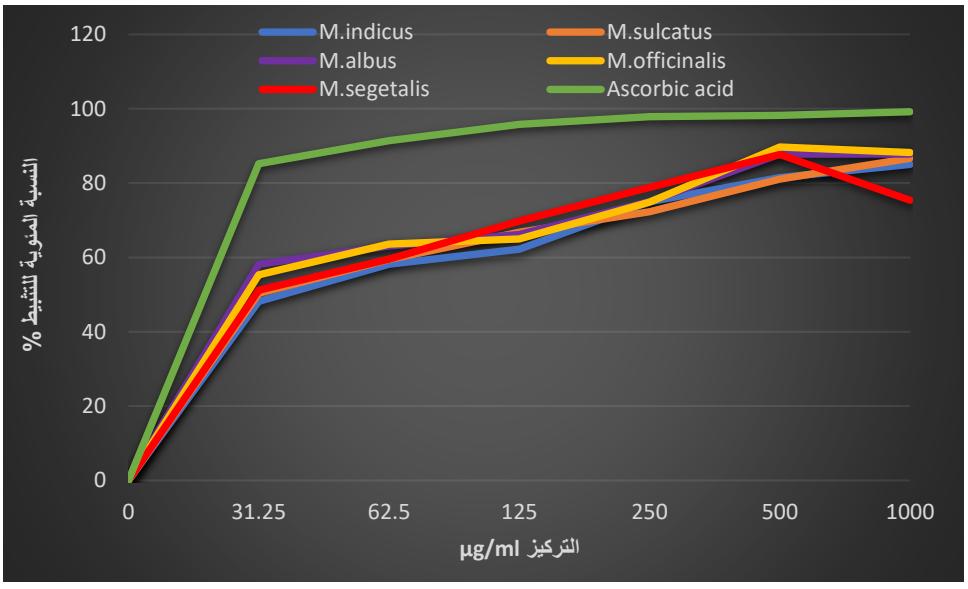
(I)الأنواع	(J)الأنواع	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	معنوي/غير معنوي	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
M.indicus	***M.sulcatus***	-.0067-	.01303	.607	غير معنوي	-.0329-	.0194
	M.albus	-.0546-*	.01303	.000	معنوي	-.0808-	-.0284-
	M.officinalis	-.0565-*	.01303	.000	معنوي	-.0827-	-.0304-
	M.segetalis	-.0865-*	.01303	.000	معنوي	-.1126-	-.0603-
M.sulcatus	***M.indicus***	.0067	.01303	.607	غير معنوي	-.0194-	.0329
	M.albus	-.0479-*	.01303	.001	معنوي	-.0740-	-.0217-
	M.officinalis	-.0498-*	.01303	.000	معنوي	-.0760-	-.0236-
	M.segetalis	-.0797-*	.01303	.000	معنوي	-.1059-	-.0536-
M.albus	***M.indicus***	.0546*	.01303	.000	معنوي	.0284	.0808
	M.sulcatus	.0479*	.01303	.001	معنوي	.0217	.0740
	M.officinalis	-.0019-	.01303	.883	غير معنوي	-.0281-	.0242
	M.segetalis	-.0319-*	.01303	.018	معنوي	-.0580-	-.0057-
M.officinalis	***M.indicus***	.0565*	.01303	.000	معنوي	.0304	.0827
	M.sulcatus	.0498*	.01303	.000	معنوي	.0236	.0760
	M.albus	.0019	.01303	.883	غير معنوي	-.0242-	.0281
	M.segetalis	-.0299-*	.01303	.026	معنوي	-.0561-	-.0038-
M.segetalis	***M.indicus***	.0865*	.01303	.000	معنوي	.0603	.1126
	M.sulcatus	.0797*	.01303	.000	معنوي	.0536	.1059
	M.albus	.0319*	.01303	.018	معنوي	.0057	.0580
	M.officinalis	.0299*	.01303	.026	معنوي	.0038	.0561

بيّنت نتائج اختبار **LSD** وجود فروقاً معنوية واضحة بين الأنواع النباتية في قدرتها على تثبيط الجذور الحرة باستخدام المستخلص الميثانولي بتركيز **1000 µg/ml**، حيث سجل النوع ***M. indicus*** أعلى نسبة تثبيط 93.47 ± 0.01%، متفوقاً معنوياً على ***M. albus***، ***M. officinalis***، و***M. segetalis***، بينما لم يختلف معنوياً عن ***M. sulcatus.***، وقدمت النتائج أن ***M. albus*** يمتلك فعالية عالية 92.96 ± 0.03% تقاربت مع ***M. officinalis*** **89.15 ± 0.02%**، في حين جاءت فعالية ***M. segetalis*** متوسطة.

تتوافق نتائج التثبيط مع القيم الكيميائية للمستخلصات الميثانولية الواردة في الجدولين (24) و(27)، حيث سجل ***M. indicus*** أعلى محتوى من الفينولات **329.92 mg Ga/g** والفلافونوئيدات **33.31 mg Qu/g**، مما يفسر فعاليته

المضادة لتأكسد، كما أظهر ***M.albus*** تراكيز مرتفعة من المركبين، بينما كانت فعالية ***M.officinalis*** الأدنى، متوافقة مع انخفاض محتواه منهما، أما ***M.segetalis***، على الرغم من احتوائه على تركيز جيد من المحتوى الكلي من الفينولات، إلا أن انخفاض المحتوى الكلي للفلافونوئيدات قد يفسر ضعف نشاطه، وتدعم هذه البيانات العلاقة الطردية بين محتوى الفينولات والفلافونوئيدات والنشاط البيولوجي في تثبيط الجذور الحرة.

وفي المستخلص الإيتانولي 70%حقق النوع ***M.officinalis*** أعلى نسبة تثبيط عند تركيز 500 ± **89.71 µg/ml**، تلاه ***M.albus*** **87.81 ± 0.04%**، بينما احتاج كل من ***M.sulcatus*** و ***M.indicus*** إلى التركيز 1000 **µg/ml** لتحقيق الفعالية القصوى 86.66% و85.02% على التوالي. بالمقابل، كان النوع ***M.segetalis*** الأقل فعالية بنسبة تثبيط بلغت 0.09± 79.5% عند **500 µg/ml**.(الشكل 32).



الشكل (32): اختلاف الفعالية التثبيطية في تثبيط DPPH· بتغير تراكيز المستخلص الإيتانولي 70%

كذلك بينت نتائج تحليل التباين الثنائي **(Tow-Way ANOVA)** للمستخلص الإيتانولي 70% فروقاً معنوية واضحة في فعالية تثبيط الجذور الحرة **DPPH** بين التراكيز المختلفة 62.5 ، 125، 250، 500، 1000 **µg/ml** ، وذلك عند مستوى دلالة 0.05. وبحسب اختبار **LSD** ، تبين أن أعلى الفروق المعنوية كانت بين التركيز الأدنى **62.5,31.25 µg/ml**والتركيزين الأعلى **500 µg/ml** و1000، إذ بلغ الفرق بين **µg/ml**62.5 و500 قيمة معنوية

قدرها 0.2640، وبين **µg/ml** 62.5 و1000 قيمة 0.2719، وكلاهما دال إحصائياً **.(Sig = 0.000)** في المقابل، لم تكن الفروق بين التركيزين **µg/ml** 500 و1000 معنوية **(Sig = 0.811)** ، مما يشير إلى وصول فعالية التثبيط إلى حدّ الإشباع البيولوجي عند التركيز **µg/ml** 500 وهذا ينسجم تماماً مع النتائج البيولوجية.

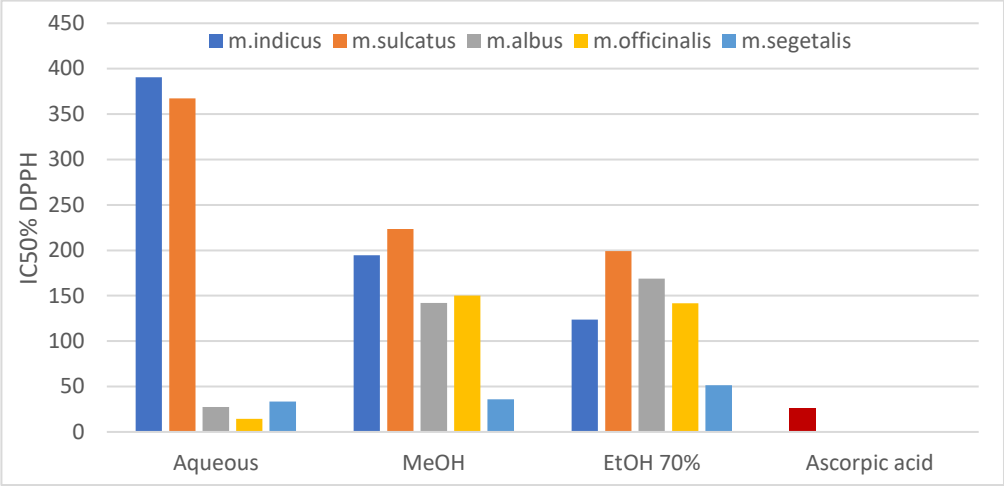
يمكن تفسير هذه الاختلافات البيولوجية بناءً على المحتوى الكيميائي للمستخلصات، إذ بين الجدولان (24) و(27) أن الأنواع الأعلى فعالية تثبيطية مثل (***M. officinalis*** و***M. albus***) احتوت على نسب مرتفعة من الفينولات والفلافونوئيدات (**mg GAE/g** 402.37 ،418.52 للفينولات، **mg QE/g** 31.09 ،32.46 للفلافونوئيدات على التوالي). ويعزز هذا الترابط بين النتائج الإحصائية والبيولوجية والكيميائية الفرضية القائلة بأن زيادة تركيز المركبات الفينولية والفلافونوئيدية في المستخلصات الإيتانولية ترتبط ارتباطاً طردياً بفعالية تثبيط الجذور الحرة لمركب**DPPH** وعند مقارنة المستخلصات المختلفة، تبين أن المستخلص الميتانولي أظهر أفضل قدرة على تثبيط الجذور الحرة، حيث تزداد هذه القدرة بشكل طردي مع زيادة تركيز المستخلص، لتصل إلى نسبة مرتفعة تقارب **93%**. ومع ذلك، تبقى هذه االفعالية أقل من تلك التي يحققها حمض الأسكوربيك المستخدم كمركب مرجعي. يليه المستخلص الإيتانولي بتركيز 70%، حيث وصلت قدرته على التثبيط إلى حوالي 88%، وتزداد عادةً مع زيادة تركيز المستخلص. أما المستخلص المائي فقد أظهرت أقل نسبة تثبيط للجذور الحرة، حيث لم تتجاوز 67% في معظم الحالات، مما يجعله الأقل نشاطاً كمضاد للتأكسد. الجدول (29). حيث تعزى هذه النتائج لما يرتبط النشاط المضاد للتأكسد أو المُؤكسد للمركبات الفينولية والفلافونوئيدية بحسب تركيزها في المستخلص، والتركيب الكيميائي لها، والفعل التآزري لهذه المركبات فيما بينها (**Gabhe *et al.*,.,2006, Procházková.,*et al.*, 2011**).

الجدول (29): النسب المئوية للتثبيط تبعا للتراكيز المستخلصات المختلفة							
		31.25 µg/ml	62.5 µg/mL	125 µg/ml	250 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml
Ascorbic acid		85.23±0.01	91.37±0.05	95.81±0.01	97.86±0.01	98.22±0.02	99.19±0.01
Melilotus indicus	Aqueous	45.1±0.04	59.09±0.09	60.38±0.01	62.85±0.1	56.87±0.03	54.38±0.01
	MeOH	55.32±0.03	67.09±0.02	71.47±0.05	80.47±0.02	86.77±0.03	93.47±0.01
	EtOH	48.22±0.16	58.15±0.16	62.23±0.12	74.97±0.08	81.54±0.04	85.02±0.03
Melilotus sulcatus	Aqueous	50.21±0.01	61.45±0.07	62.72±0.03	65.24±0.06	.37±0.0659	.4±0.0543
	MeOH	53.2±0.02	68.1±0.03	72.21±0.06	78.86±0.01	88.86±0.01	90.11±0.01
	EtOH	50.27±0.1	59.47±0.015	66.76±0.09	75.08±0.14	81.11±0.1	86.66±0.02
Melilotus albus	Aqueous	49.52±0.02	56.91±0.05	63.11±0.08	61.09±0.17	60.36±0.05	43.8±0.12
	MeOH	56.09±0.03	60.7±0.01	64.62±0.01	73.53±0.03	85.17±0.01	92.96±0.03
	EtOH	58.13±0.09	63.07±0.1	66.19±0.08	75.08±0.05	87.81±0.02	87.81±0,04
Melilotus officinalis	Aqueous	42.56±0.03	57.83±0.06	63.03±0.03	62.8±0.06	61.76±0.11	56.31±0.17
	MeOH	51.28±0.03	58.6±0.06	66.64±0.06	77.37±0.01	84.63±0.01	89.15±0.06
	EtOH	55.34±0,04	63.62±0.1	64.97±0.09	74.88±0.07	89.71±0.01	88.24±0.04
melilotus segetalis	Aqueous	40.23±0.1	51.62±0.26	58.22±0.04	66.73±0.11	55.03±0.01	53.68±0.09
	MeOH	45.22±0.02	50.94±0.08	62.131±0.04	71.54±0.06	87.69±0.01	91.28±0.06
	EtOH	51.23±0.02	59.561±0.11	69.82±0.07	78.801±0.06	79.41±0.09	75.41±0.04

وعند مقارنة الأنواع النباتية، أظهر النوع ***M. indicus*** مع ***M. albus*** أعلى فعالية في تثبيط الجذور الحرة باستخدام المستخلص الميثانولي عند تركيز **1000 µg/ml**، في المقابل، سجل النوعان ***M. officinalis ,M. albus***أعلى قدرة على التثبيط في المستخلص الإيتانولي 70% عند تركيز **500 µg/ml**. أما في المستخلص المائي، فقد كانت فعالية التثبيط أقل عموماً مقارنة بالمستخلصات الأخرى، حيث سجل نوعا ***M. officinalis ,M. segetalis*** أعلى قدرة بين الأنواع عند تركيز **125 µg/ml**. بالنسبة لبقية الأنواع، كان التركيز الأمثل لتثبيط الجذور الحرة في المستخلص المائي هو **250 µg/ml**. هذه النتائج تؤكد أهمية اختيار نوع المستخلص والتركيز المناسب لتحقيق أعلى فعالية في تثبيط الجذور الحرة، عند تحليل نتائج تأثير الخلاصات المختلفة عليها.

ولقد تم حساب **IC50%** لاعتماده بشكل أدق في معرفة القدرة التثبيطية والمستخلص الأفضل (التركيز اللازم من المستخلص لكل نوع واللازم لتثبيط 50% من الجذور الحرة لمركب **DPPH**) من تغيرات التراكيز لكل نوع في كل

المستخلص الشكل (33).



الشكل 33: يوضح قيم IC50% **لحمض الاسكوربيك وأنواع الحندقوق في الخلاصات الثلاث**

تُظهر نتائج اختبار **DPPH** الموضحة في الشكل(33) أن فعالية المستخلصات المضادة للتأكسد تختلف بوضوح بين الأنواع المدروسة من جنس ***Melilotus***، وكذلك بين المذيبات المستخدمة في الاستخلاص (الماء، الميتانول، الإيتانول 70%). وتم استخدام **(Ascorbic acid)**كمركب قياسي مرجعي، وقد سجّل أدنى قيمة **IC_{50} (~25 µg/ml)** ، ما يعكس فعالية عالية جدًا في تثبيط الجذر الحر **DPPH** ، ويشكّل معيارًا لمقارنة فعالية المستخلصات النباتية.

لوحظ أن المستخلص الميثانولي لنوع ***Melilotus segetalis*** أظهر أعلى فعالية مضادة للتأكسد بين الأنواع المدروسة، إذ سجّل قيمة **IC_{50}** منخفضة(أقل من **50 µg/ml**)، وهي قريبة نسبيًا من المركب المرجعي، مما يشير إلى غناه بمركبات ذات قدرة تثبيطية عالية. كما أظهرت المستخلصات الإيتانولية 70% لكل من ***M. officinalis*** و***M. albus*** فعالية معتدلة **IC_{50}** تراوحت بين **130–150 µg/ml**، ما يدل على احتوائها على مركبات نشطة، وإن كانت بكفاءة أقل من ***M. segetalis***.

في المقابل، كانت فعالية المستخلصات المائية لكل من ***M. indicus*** و***M. sulcatus*** منخفضة بشكل ملحوظ، حيث تجاوزت قيم **IC_{50}** الـ **350 µg/ml** ، ما يشير إلى أن الماء غير كافٍ لاستخلاص المركبات الفعالة من هذين النوعين

بكفاءة.وتؤكد هذه النتائج أهمية اختيار المذيب المناسب في استخلاص المركبات الفعالة، حيث كان الميثانول الأكثر كفاءة يليه الإيتانول 70%.

وبمقارنة نتائج هذه الدراسة مع دراسة (**Mladenović *et al.*, 2017**) فقد لوحظ أن المستخلص المائي للأجزاء الهوائية لنوع ***M.officinalis*** كان له اعلى نشاط مضاد للتأكسد بقيم تتراوح بين(**% 21.43, 93.59**)، في حين لم يتجاوز نسبة التثبيط للمستخلص الإيتانولي نسبة التثبيط **(71.97%)** وهذا ما يخالف نتائج دراستنا حيث أظهرت أن المستخلص الإيتانولي 70% الأكثر قدرة على التثبيط من المستخلص المائي.

على الرغم من اختلاف طرائق التحليل المستخدمة بين دراستنا وهذه الدراسات كان لابد من المقارنة لإغناء البحث فقد تمت لدراسة (**Dahmani *et al.*, 2024**) والتي تناولت القدرة التثبيطية للمستخلصات المائية والميتانولية لـ ***M.albus*** والتي تفوق فيها المستخلص المائي على المستخلص الميتانولي بالقدرة التثبيطية وهذا ما يخالف نتائجنا التي تفوق فيها المستخلص الميتانولي ***M.albus*** على المستخلص المائي.

وعند دراسة القدرة التثبيطية للمستخلص الميتانولي لأوراق ***M.indicus*** فقد أظهر تناسبا عكسيا بين القدرة التثبيطية وزيادة التركيز على عكس نتائج هذا البحث بحيث أظهرت أن هناك قدرة متزايدة على التثبيط بازدياد تركيز المستخلص .**(Sonjou *et al.*, 2017)**

وعند دراسة النشاط المضاد للتأكسد لمستخلص ***M.officinalis***المائي والإيتانولي باختبار **DPPH** أظهر المستخلص المائي قوة تثبيط أعلى من الإيتانولي بقيم **(21.43-93.59%,13-71.98%)** على التوالي وهذا ما يعاكس نتائج هذا البحث **(Alsanfi 2020)**.

وتوافقت نتائجنا من حيث التناسب الطردي بين تركيز المستخلص وقدرة التثبيط لمستخلص الميتانولي لبذور ***M.officinalis*** بنسبة **29.87%** عند تركيز **100µg/ml**.(**Sisay *et al.*, 2021**).

وعند دراسة الفعالية المضادة للتأكسد للمستخلص المائي والايتانولي 80% لمستخلص***M.indicus***، فقد كان المستخلص المائي أعلى نشاط في تثبيط الجذور الحرة وهذا ما يخالف نتائج هذه الدراسة حيث كان للمستخلص المائي لـ ***M.indicus*** الفعالية الأقل من المستخلص الإيتانولي 70% والتي تتناسب عكساً مع زيادة التركيز، وقد يفسر ذلك بأنه لا يعتمد تفاعل مضادات التأكسد مع جذر DPPH على التركيز فقط، بل يتأثر أيضاً ببنية وطبيعة مضادات التأكسد. ووفقاً لدراسة (**Khiya *et al.*, 2021**)، تتفاعل بعض المركبات بسرعة كبيرة مع جذر **DPPH**، كما أشار تركمان وآخرون (**Turkmen *et al.*, 2017**) إلى أن البوليفينولات تُعد مانحاً فعالاً للهيدروجين لجذر **DPPH**، نظراً لبنيتها الكيميائية، مما يمنحها تفاعلية عالية كمانحات للهيدروجين أو الإلكترونات، إلى جانب قدرتها على استحلاب أيونات المعادن، علاوةً على ذلك، يسهم التآزر بين المركبات الفينولية الفردية في الخليط في تعزيز النشاط المضاد للتأكسد، مما يجعل تأثيره لا يعتمد فقط على التركيز، بل يشمل أيضاً تأثير البنية والتفاعلات المتبادلة بين المركبات (**Stefanovic *et al.*, 2015**).

3-3-6 نتائج القدرة المضادة للتأكسد للمستخلصات المختلفة اختبار ABTS:

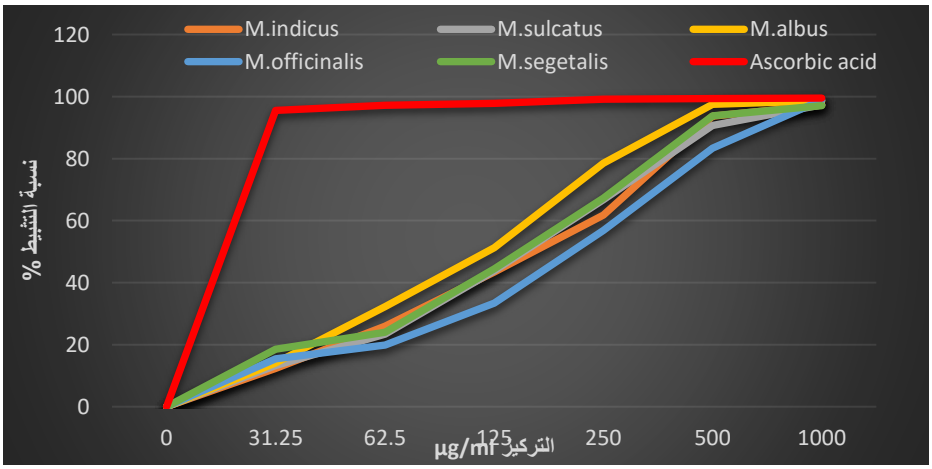
أُجريت الدراسة بهدف تقييم الفعالية المضادة للتأكسد للمستخلص المائي لخمسة أنواع من نبات الحندقوق (***Melilotus sulcatus, M.indicus, M.albus, M.officinalis, M.segetalis***)، وذلك باستخدام اختبار قدرة التثبيط للجذور الكاتيونية لمركب **ABTS** وقد جرى تحضير تراكيز مختلفة من المستخلص (**31.25,62.5,125,250,500,1000µg/ml**)، وتم إجراء القياسات بتكرارين لكل تجربة.

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي بالاعتماد على تحليل **Tow-Way Onova** وجود فروق معنوية عند مستوى دلالة 0.05، مما يدل على تأثر الفعالية المضادة للتأكسد بتركيز المستخلص. ولاختبار الفروق بين المتوسطات، تم استخدام اختبار أقل فرق معنوي(**LSD**)، حيث بيّنت النتائج أن معظم الفروق بين التراكيز كانت ذات دلالة إحصائية عالية.

وقد أوضحت نتائج الاختبارات الكيميائية أن المستخلص المائي لنوع ***M. albus*** أكثر قدرة على تثبيط الجذور الكاتيونية لمركب **ABTS**، خصوصاً مع زيادة التركيز، لتقترب فعاليته من فعالية حمض الأسكوربيك المستخدم كمركب مرجعي. يليه نوعا ***M. indicus*** ، ***M. officinalis*** اللذان أظهرا فعالية ملحوظة عند التركيز الأعلى **1000 µg/ml)**. ومن الملاحظ أن التحسن في الفعالية بلغ ذروته تقريباً عند تركيز **500 µg/ml** ، ما يشير إلى أن رفع التركيز إلى **1000 µg/ml** لا يُحدث تحسناً كبيراً في بعض الأنواع، وهذا ما أكدته نتائج التحليل الإحصائي، بأن التركيز المثالي للحصول على أعلى فعالية لمضاد الأكسدة **ABTS** في الخلاصة المائية هو **500µg/mL**، حيث سجل هذا التركيز فروقًا معنوية مقارنة بالتراكيز الأدنى، دون وجود فروق معنوية بينه وبين التركيز الأعلى **(1000)µg/ml.**

في المقابل، سجّلت أنواع ***M. sulcatus*** ،***M. segetalis*** فعالية أقل نسبياً، خاصة عند التراكيز المنخفضة، وإن كانت فعاليتها تتحسن مع زيادة التركيز، إلا أنها لم تصل إلى مستوى الفعالية المثلى كما في الأنواع الأخرى.

وقدمت النتائج أن جميع الخلاصات لكافة الأنواع باختلاف خصائصها والمواد التي تستخلصها تمتلك قدرة عالية على تثبيط الجذور الكاتيونية لمركب **ABTS**، حيث أكدت الدراسة الإحصائية وجود فروقاً معنوية بين الأنواع **(P<0.05)** حيث تزداد هذه القدرة كلما ازداد تركيز المستخلص، وبنسب مئوية مرتفعة نسبياً توازي القدرة التثبيطية لحمض الأسكوربيك الذي استخدم كمركب مرجعي. الشكل (34)

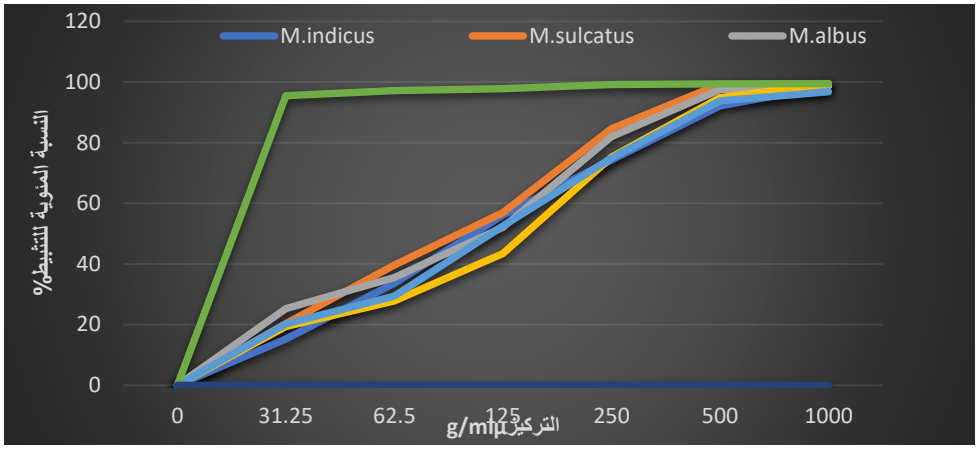


الشكل (34): تغير القدرة على تثبيط جذور مركب ABTS بتغير التراكيز في المستخلص المائي

في المستخلص الميتانولي، تميز النوع ***M.sulcatus*** بفعالية ملحوظة عند تركيز **500 µg/ml**، حيث بلغ نسبة تثبيط الجذور الكاتيونية **(99.27%)**، ليكون أكثر مستخلص فعالية مقارنة بالأنواع الأخرى عند نفس التركيز رغم أن محتواه من الفينولات والفلافونوئيدات لم يكن الأعلى، مما يشير إلى دور نوعية المركبات الفعالة وليس كميتها فقط كما ورد في الجدولين (24،27).

أما بالنسبة للتركيز **(1000 µg/ml)**، فقد أثبتت الأنواع الأخرى فعاليتها العالية في تثبيط الجذور الكاتيونية لمركب $ABTS^{\cdot+}$ فقد برز النوع ***M.officinalis*** بأعلى قدرة على التثبيط بنسبة تكاد تعادل فعالية حمض الأسكوربيك، تلاه كل من ***M.indicus*** و ***M.albus*** بنسب متقاربة. في المقابل، كان ***M.segetalis*** أقل الأنواع قدرة على التثبيط عند هذا التركيز بنسبة **.96.78%**. الشكل (35).

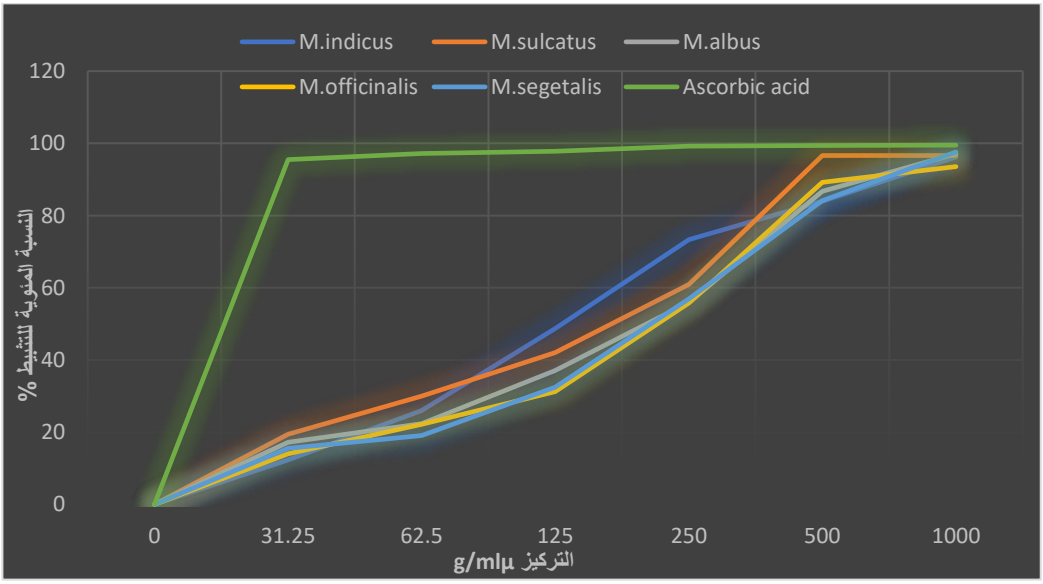
ارتبطت هذه الفعالية الحيوية المرتفعة بمحتوى معتدل إلى مرتفع من الفينولات والفلافونوئيدات، مما يدعم وجود علاقة ارتباط إيجابي بين التركيب الكيميائي والفعالية المضادة للتأكسد، واعتماداً على نتائج التحليل الإحصائي باستخدام اختبار **Tow Way ANOVA** واختبار أقل فرق معنوي**(LSD)** ، أكدت النتائج على أن التراكيز المستخدمة من المستخلص الميثانولي لها فروقاً معنوية واضحة في قدرتها على تثبيط الجذور الكاتيونية لمركب **ABTS**، حيث ازدادت الفعالية التثبيطية بشكل ملحوظ مع زيادة التركيز من **31.25µg/ml** إلى **500** ، ثم استقرت عند **1000µg/**ml دون فرق معنوي يُذكر، مما يشير إلى أن التركيز 500 يُعد الأمثل من حيث التأثير. كما أظهرت الدراسة الإحصائية في اختبار **(LDS)** بين الأنواع النباتية المدروسة وجود فروقاً معنوية في قدرتها على التثبيط، حيث تفوق نوع ***sulcatus*** معنوياً على كل من ***M. officinalis ,M. segetalis ,M. indicus***، في حين لم تُسجّل فروق معنوية واضحة بين الأنواع الأخرى، مما يؤكد أهمية كل من التركيز والنوع النباتي في التأثير البيولوجي للمستخلصات.



الشكل (35) يوضح تغير قدرة الأنواع على تثبيط $ABTS^{+\cdot}$ تبعاً لتغير تراكيز المستخلص الميتانولي

وفي المستخلص الإيتانولي70%، أظهر النوع ***M.sulcatus*** قدرة عالية على تثبيط الجذور الكاتيونية عند تركيز **500 µg/ml**، حيث حقق نسبة تثبيط بلغت **(96%)** ومن الملاحظ أنه عند زيادة التركيز إلى **(1000) µg/ml**، لم يُظهر النوع ***M.sulcatus*** تحسناً ملحوظاً في الفعالية، مما يشير إلى أن تركيز **500 µg/ml** كان كافياً لتحقيق أقصى قدرة تثبيط ممكنة لهذا النوع.

بينما كان التركيز **(1000µg/ml)** بالنسبة لباقي الأنواع الأفضل في نسبة التثبيط حيث سجل النوع ***M.segetalis,*** ***M. albus*** الأنواع الأعلى قدرة للتثبيط **(97.61, 97.11±%)** على التوالي، وسجل نوع ***M.officinalis*** الأقل في نفس التركيز **(93.61%)**.الشكل (36).



الشكل (36): تغير القدرة بتغير تراكيز الأنواع في المستخلص الإيتانولي70%

الجدول (30): النسب المئوية المتغير تبعاً للتراكيز في المستخلصات المختلفة							
		31.25 µg/ml	62.5 µg/ml	125 µg/ml	250 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml
Ascorpic acid		97.4±0.001	97.8±0.001	98.51±0.001	99.2±0.001	99.4±0.001	99.5±0.04
Melilotus indicus	Aqueous	12.36±0.01	25.99±0.01	43.37±0.02	61.79±0.02	93.63±0.05	97.24±0.001
	MeOH	15.3±0.01	33.64±0.05	56.16±0.04	74.24±0.02	93.134±0.04	98.77±0.003
	EtOH	20.23±0.019	25.99±0.077	48.67±0.058	73.35±0.058	83.99±0.056	96.204±0.01
Melilotus sulcatus	Aqueous	13.24±0.01	23.41±0.01	43.8±0.01	66.78±0.01	90.705±0.03	97.33±0.009
	MeOH	20.3±0.02	39.63±0.019	56.98±0.02	84.59±0.004	99.277±0.005	98.71±0.001
	EtOH	19.45±0.01	29.95±0.02	42.07±0.01	60.07±0.003	96.62±0.01	96.62±0.002
Melilotus albus	Aqueous	14.11±0.02	32.27±0.01	51.29±0.023	78.48±0.022	97.504±0.005	98.62±0.001
	MeOH	25.24±0.04	35.55±0.02	52.08±0.03	81.94±0.009	97.512±0.006	98.71±0.001
	EtOH	17.22±0.01	22.35±0.005	37.04±0.004	55.94±0.008	86.71±0.007	97.11±0.0
Melilotus officinalis	Aqueous	15.44±0.011	19.88±0.016	33.39±0.016	56.88±0.06	83.39±0.07	98.88±0.003
	MeOH	19.42±0.05	27.84±0.07	43.49±0.06	75.2±0.07	94.86±0.03	99.51±.002
	EtOH	14.03±0.01	22.19±0.03	31.18±0.01	55.77±0.02	89.19±0.02	93.56±0.02
melilotus segetalis	Aqueous	11.5±0.01	24.01±0.02	44.49±0.02	67.29±0.05	93.803±0.015	97.07±0.012
	MeOH	20.2±0.03	29.45±0.06	52.56±0.07	74.87±0.09	93.74±0.05	96.78±0.009
	EtOH	15.5±0.01	19.05±0.01	32.42±0.01	56.93±0.02	84.15±0.04	97.61±0.002

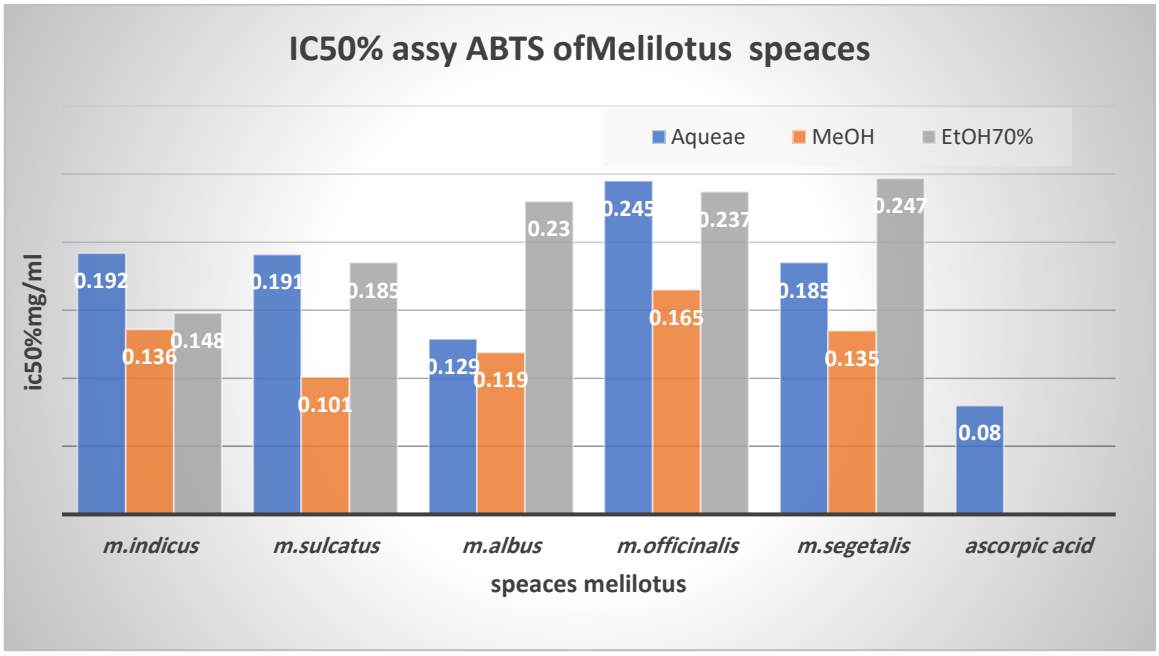
في ضوء نتائج الدراسة الإحصائية لتحليل فعالية المستخلص الإيتانولي على تثبيط الجذور باستخدام اختبار **ANOVA** واختبار **LSD** ، تبين وجود فروق معنوية بين التراكيز المدروسة، حيث ارتفعت القدرة التثبيطية بشكل واضح حتى تركيز **500µg/ml**، والذي شكّل نقطة تحوّل مهمة، والذي تطابق مع أغلب الأنواع، إذ بلغت الفعالية في نوع ***M.sulcatus*** عند هذا التركيز **96%**، دون تسجيل تحسن إضافي يُذكر عند زيادة التركيز إلى **1000 µg/ml**. كما أظهرت نتائج اختبار **LSD** فروقاً معنوية بين الأنواع، خاصة بين ***M. officinalis*** من جهة وكل من ***M. sulcatus*** ,***segetalis*** من جهة أخرى، مما يعزز ارتباط الفعالية التثبيطية بالاختلاف النوعي في التركيب الكيميائي، إضافةً إلى تأثير التركيز كمحدد حاسم للفعالية البيولوجية.

وبمقارنة الخلاصات فيما بينها فقد كانت المستخلص الميتانولي الأفضل بشكل عام في تثبيط جذور **ABTS** في الأنواع المختلفة من الحندقوق، حيث تميز ***Melilotus officinalis*** عند التركيز **1000 µg/ml**. في المقابل، أظهر المستخلص المائي فعالية جيدة عند التركيزات العالية، لكنها انخفضت بشكل ملحوظ مع انخفاض التركيزات، وقد برز ***Melilotus albus*** كالأكثر كفاءة في هذا المستخلص. أما في المستخلص الإيتانولي70%، فكان الأقل فعالية بين الخلاصات، إلا أن ***Melilotus segetalis*** حقق أفضل النتائج في هذه المستخلص. الجدول (30)

وتعزى هذه الاختلافات في قدرة التثبيط بين الخلاصات إلى العلاقة القوية بين نوعية المذيب والمركبات التي استخلصها وكذلك كمية تلك المركبات في المستخلص، وخصائصها التي منحتها قدرة كبيرة على منح الالكترون أو البروتون والتي تسهم في استقرار الجذور الحرة. (**Borhani *et al.*, 2023**).

توافقت نتائج دراستنا مع نتائج **(Braga *et al.*, 2013)** التي درست الفعالية المضادة للتأكسد باختبار **$ABTS^{\cdot+}$** لمستخلص***M.officinalis*** الإيتانولي 85% والذي أبدى فعالية كبيرة عند **160µg/ml** بنسبة تثبيط **76.39%±4.01** وهذا يشابه الفعالية التي أظهرها المستخلص الإيتانولي 70% عند تركيز **125µg/ml** بنسبة تثبيط **31.18±0.01** .

ولقد تم حساب **IC50%** لاعتماده بشكل أدق في معرفة القدرة التثبيطية والمستخلص الأفضل (التركيز اللازم من المستخلص لكل نوع واللازم لتثبيط 50% من الجذور الحرة لمركب **$ABTS^{\cdot+}$**) من تغيرات التراكيز لكل نوع في كل المستخلص الشكل (37).



الشكل (37) يوضح قيم IC50% لحمض الاسكوربيك وأنواع الحندقوق في المستخلصات الثلاث

بشكل عام، أظهرت المستخلصات الميثانولية أقل قيم **IC50** في جميع الأنواع، مما يشير إلى أنها تمتلك أقوى نشاط مضاد للأكسدة مقارنة بالمستخلصات المائية والإيتانولية 70%، التي سجلت قيماً أعلى.

بالنظر إلى أنواع ***Melilotus***، ففقد أظهر ***M. officinalis*** أقل نشاط مضاد للتأكسد بمستخلصه الميثانولي **IC50** (**0.165 mg/ml =**، بينما أظهر ***M. sulcatus*** أفضل قدرة بقيمة **IC50%** في المستخلص الميثانولي **0.101** (**mg/ml**، ما يشير إلى نشاط مضاد للأكسدة أقوى، مع بقاء حمض الأسكوربيك الأكثر فعالية بمقدار **0.08 mg/ml**،

وعند دراسة النشاط المضاد للتأكسد لمستخلصي أوراق ***M.indicus*** الميتانولي والإيتانولي بواسطة اختبار **ABTS** **Tarawneh *et al*., 2008** فقد أظهر المستخلص الإيتانولي 1.4±**ic50%=23.8** القدرة الأكبر على تثبيط جذور **ABTS** مقارنة بالمستخلص الميتانولي1.1 ± **IC50%=59.4** وهذا يعاكس هذه الدراسة حيث كان المستخلص الميتانولي بقيمة **ic50%=0.136mg/ml** الأفضل قدرة من المستخلص الإيتانولي **70% IC=0.147mg/ml**.

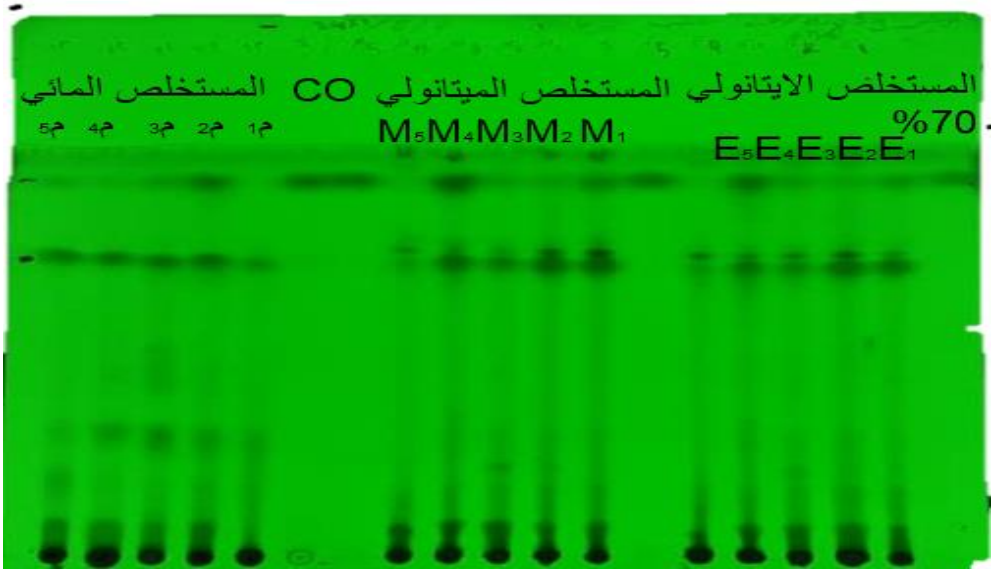
وعند مقارنة نتائج هذه الدراسة بدراسة **(Dahmani *et al*., 2024)** الفعالية المضادة للتأكسد لمستخلصي الميتانولي والمائي لنوع ***M.albus*** باختبار **ABTS** فقد وجد أن الفعالية الأكبر للمستخلص المائي لنوع ***M.albus*** بقيمة تثبيط **IC50%=0.014 ± 0.001mg/ml** مقابل نسبة تثبيط في المستخلص الميتانولي **IC50%= 0.167 ± 0.03mg/ml** على عكس نتائجنا التي أظهرت الفعالية الأقوى كانت للمستخلص الميتانولي **IC50%=0.119mg/ml** بينما سجل المستخلص المائي القيمة الأعلى **IC50%=0.129mg/ml**.

3-3-7 التحديد الكمي للكومارين في الخلاصات المختلفة بطريقة DiTLC:

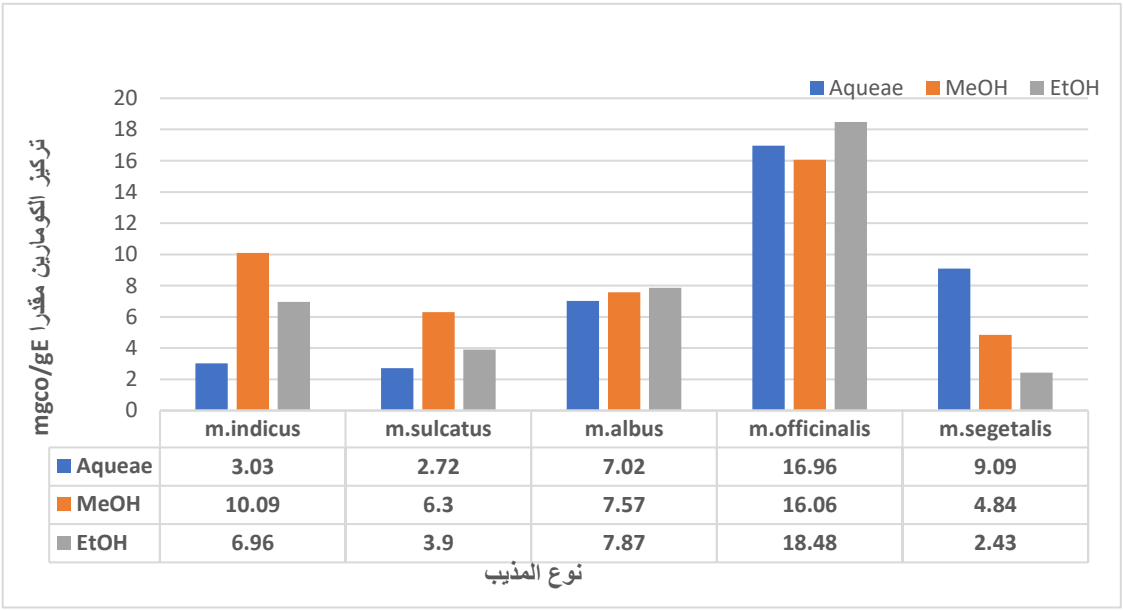
تم حساب تركيز الكومارين في الأنواع المدروسة للمستخلصات المختلفة للأجزاء الهوائية لأنواع الحندقوق، بدلالة معادلة السلسة المعيارية للكومارين**y = 0.0553x + 7.7094** في برنامج **TLC analyzer**، وأعطت نتائج الدراسة الإحصائية أن جميع القيم ذات دلالة إحصائية ولفروق معنوية معتد بها **p<0.05**.

فقد أظهر المستخلص المائي أنه الأقل كفاءة في استخلاص الكومارين مقارنة بالمذيبات الأخرى بقيم تراوحت بين **(2.72-16.96 mgCO/gE)**، تلاه المستخلص الميتانولي حيث تمتع بكفاءة أفضل نسبياً في استخلاص الكومارين من الأنواع، وتراوحت التراكيز للأنواع **(4.84-16.06 mgCO/gE)**، بينما كانت النسب الأعلى والمذيب الأفضل

استخلاص الكومارين من الأنواع المستخلص الإيتانولي 70%. حيث حُددت **Rf= 0.75±0.04** الشكل (38)



الشكل (38): شريحة TLC توضح الكومارين في الأنواع المدروسة في المذيبات العضوية المختلفة



	m.indicus	m.sulcatus	m.albus	m.officinalis	m.segetalis
Aqueae	3.03	2.72	7.02	16.96	9.09
MeOH	10.09	6.3	7.57	16.06	4.84
EtOH	6.96	3.9	7.87	18.48	2.43

الشكل (39): تراكيز الكومارين في المستخلصات المختلفة

أظهرت النتائج تفاوتاً في كفاءة استخلاص الكومارين باختلاف النوع النباتي والمذيب المستخدم.

تبين أن النوع أكثر تركيزاً ***M.officinalis*** للكومارين في المستخلص الإيتانولي 70% بتركيز **18.48 mgCO/gE**، مما يعكس غناه الكبير بهذا المركب، يليه ***M. indicus***، الذي أظهر تركيزاً مرتفعاً من الكومارين في المستخلص الإيتانولي 70% أيضاً، حيث بلغ **10.09 mgCO/gE**، لكنه كان أقل مقارنةً بـ ***M. officinalis***. الشكل 39

أما ***M. sulcatus***، فقد احتوى على أعلى تركيز للكومارين بالمذيب الميتانولي في استخلاص الكومارين، بينما كان المذيب المائي الأقل كفاءة في استخلاصه، في المقابل، لم تُظهر مستخلصات ***M. albus*** فروقاً كبيرة بين المذيبات المختلفة**mgCO/gE** 87. 7−7.02، مما يشير إلى استقرار تركيز الكومارين بغض النظر عن نوع المذيب المستخدم .

أما بالنسبة إلى ***M. segetalis***، فقد كان المذيب المائي الأكثر كفاءة في استخلاص الكومارين، في حين كان المستخلص الإيتانولي الأقل فعالية.

وعند مقارنة نتائج هذه الدراسة مع دراسة (مطشر وآخرون **2009**) التي ظهر فيها موقي الخلات الأفضل باستخلاص الكومارين، يليه الماء ثم الإيثانول 80 **%**بقيم **(2.7, 2.4, 1.8 mg/g)**على التوالي. وهذا يتناقض مع نتائجنا، حيث كان الإيثانول 70% هو الأكثر كفاءة في استخلاص الكومارين في.***M. officinalis* ,*M. indicus***

أكدت دراسة **Braga et *al*., 2013** ارتفاع نسبة الكومارين في ***M. officinalis***، حيث بلغ تركيزه **246.3mg/g** في المستخلص الإيتانولي 85**%**، وهو ما يتماشى مع نتائجنا التي أظهرت تفوق الإيثانول في استخلاص الكومارين من هذا النوع.

وفي دراسة **(Sheikh & Desai, 2017)** لوحظ توافق بين قيمة **Rf** للكومارين العياري مع أحد المركبات التي ظهرت في المستخلص الميتانولي دون المائي **(Rf = 0.76)**، مما يدل على كفاءته الأعلى في استخلاص الكومارين مقارنةً بالماء**(Rf = 0.76)** ، وهذا ما يخالف نتائجنا التي أظهرت أن الماء أفضل في استخلاص الكومارين بفارق طفيف نسبيا مقارنة مع الميتانول في استخلاص الكومارين في نوع ***M.officinalis*.**

وفي دراسة أجراها **(Kore *et al*., 2017)**، تم اختبار تأثير مستخلصات ***M. officinalis*** (إيثر البترول، الكلوروفورم، الإيثانول) كمضادات للقلق في الفئران، حيث كشف تحليل **HPTLC** عن وجود **(9)** مركبات، من بينها الكومارين، ويتماشى ذلك مع نتائجنا التي أظهرت ارتفاع تركيز الكومارين في مستخلصات ***M. officinalis*** مقارنةً بالأنواع الأخرى.

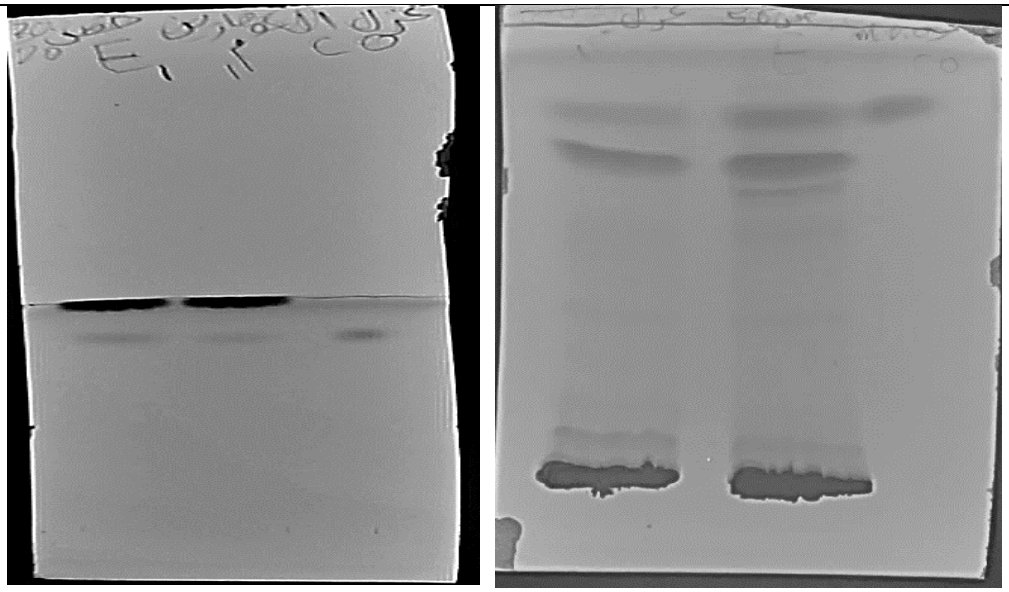
أكدت دراسة **(Iraina & Anna .2023)** وجود الكومارين في ***M. albus*** ،***M. officinalis*** من خلال اختبار **TLC** للمستخلص الإيتانولي 50% (لأوراق وأزهار النبات الكامل)، مما يدعم نتائج دراستنا حول انتشار هذا المركب في الأنواع المختلفة من ***Melilotus*.sp**.

وبالمقارنة مع دراسة لتحديد تركيز الكومارين وتطبيقاته، في هذا البحث، تم عزل وتحديد وقياس مركب الكومارين في ***M.officinalis*** باستخدام تقنيات متعددة، شملت الاستخلاص بالمذيبات العضوية (الماء وإيثر البترول) باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة**(TLC)** ، حيث تبين أن الكومارين أحد أكثر المركبات الكيميائية نشاطاً في النوع. وبلغ تركيز الكومارين في المستخلص المائي **46.78 ± 0.0760 µg/ml**، ما يمثل **1.152%** من المادة الجافة للمستخلص .وفي إيثر البترول، بلغ التركيز **820.13 ± 34.06 mg/g**، ما يعادل**82.013%** من المادة الجافة للمستخلص الإيثري **. (Wu *et al.*, 2016)**

تؤكد هذه النتائج أن ***M.officinalis*** هو الأغنى بالكومارين بين الأنواع المدروسة، ويُظهر اختلاف تراكيز الكومارين بين المستخلصات والمذيبات تأثيراً واضحاً للمذيب على كفاءة استخلاص هذا المركب. تتوافق نتائجنا مع العديد من الدراسات السابقة، مما يعزز موثوقية استخدام **TLC**و **DiTLC** في تحديد مركب الكومارين في الأنواع المختلفة من ***Melilotus*.**sp

3-3-8 عزل الكومارين واستخلاصه بطريقة TLC:

بعد أن تم تحديد مركب الكومارين وحساب تركيزه في مستخلصات الأجزاء الهوائية لأنواع الحندقوق فقد تم اختيار ***M.indicus*** لعزل الكومارين من الخلاصتين الإيتانولية والمائية باعتبارهما الأفضل في استخلاص الكومارين بالنسبة لهذا النوع، حيث تم عزله من المستخلص الايتري والتأكد من وجوده ونقاوة عزله على شريحة **TLC** مقارنة بالمركب العياري الشكل (40).

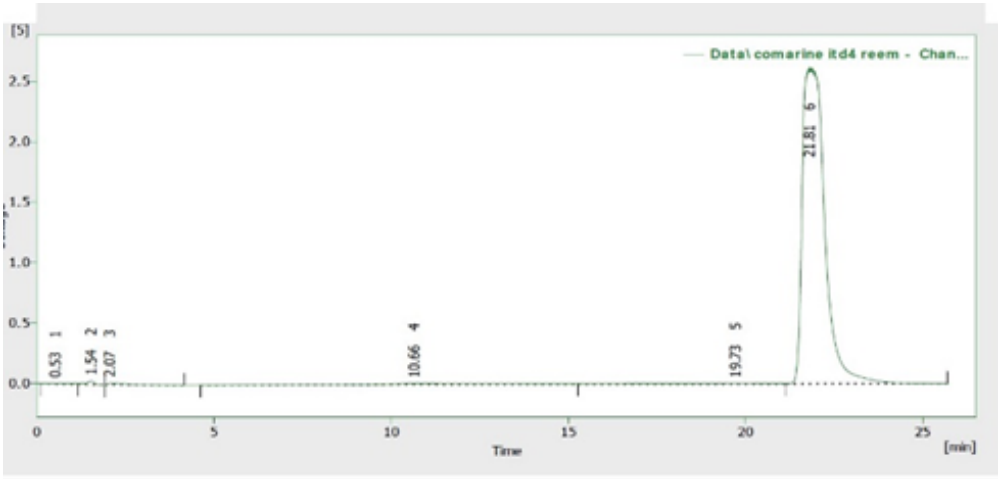


شريحة **TLC** لتحديد مركب الكومارين قبل العزل　　شريحة **TLC** لمركب الكومارين المعزول

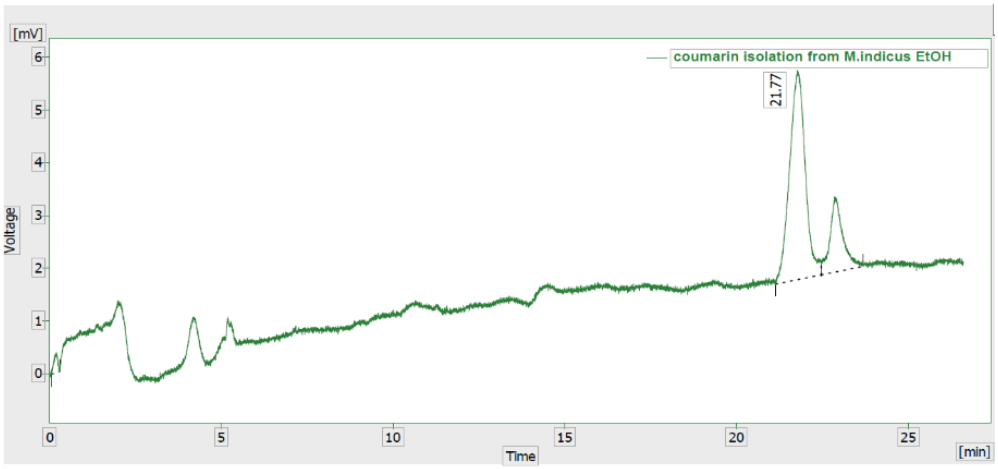
الشكل (40): يوضح تحديد وعزل الكومارين من مستخلصي المائي والايتانولي 70% لنوع ***M.indicus***

3-3-8-1 التأكد من نقاوة العزل بتقانة HPLC:

تم حقن كل من الكومارين المعزول من المستخلص الإيتانولي 70% للأجزاء الهوائية لنوع ***M.indicus*** و المركب العياري للكومارين، وتمت مطابقة كروماتوغرام المركب المعزول من حيث زمن الاحتفاظ مع كروماتوغرام العياري، وذلك باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الدقة **HPLC**، بتطبيق الشروط المذكورة السابقة في الجدول**(6)** ويوضح الشكلان (41،42) كروماتوغرام الكومارين العياري والمعزول من المستخلص الاريتري على التوالي.



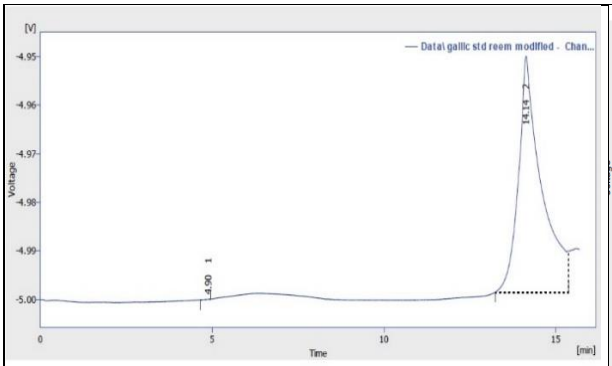
الشكل (41) كروماتوغرام **HPLC** المركب العياري للكومارين عند زمن احتفاظ **21.8min**



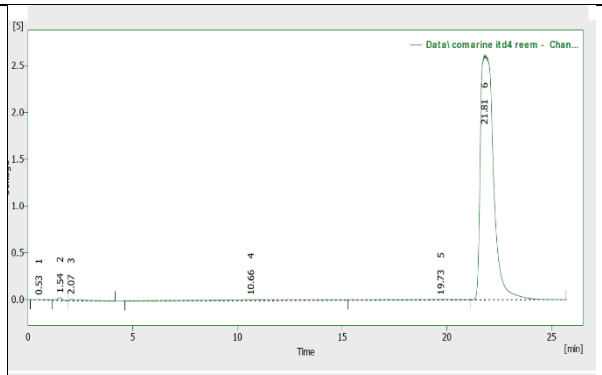
الشكل (42): كروماتوغرام **HPLC** للكومارين المستخلص من ***M.indicus*** عند زمن احتفاظ **21.77min**

3-3-9 فصل بعض المركبات الفينولية والفلافونوئيدية بواسطة HPLC:

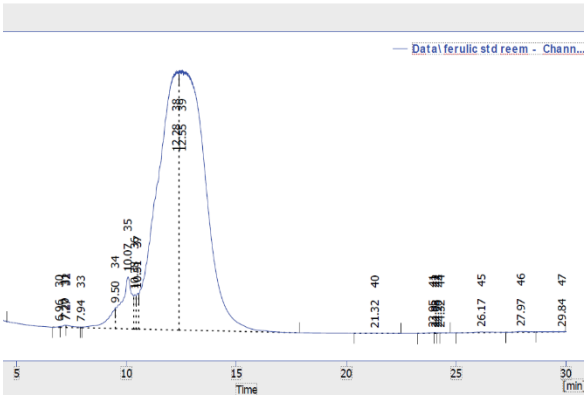
تم تحديد بعض المركبات الفينولية والفلافونوئيدية في المستخلص الإيتانولي 70% للأنواع الخمسة المدروسة بمقارنتها بمركبات عيارية لكل من الكومارين، حمض الغاليك، الكيرسيتين، حمض الاسكوربيك، حمض الفيروليك، الكاتشين، الروتين؛ من حيث زمن احتباس المادة العيارية ومطابقتها مع مركبات الأنواع المدروسة، وحساب تركيز المركب في المستخلص حسب العلاقة المذكورة وفيما يلي الشكلان (42،43) يظهر كروماتوغرامات المواد العيارية وكروماتوغرامات الأنواع المدروسة.



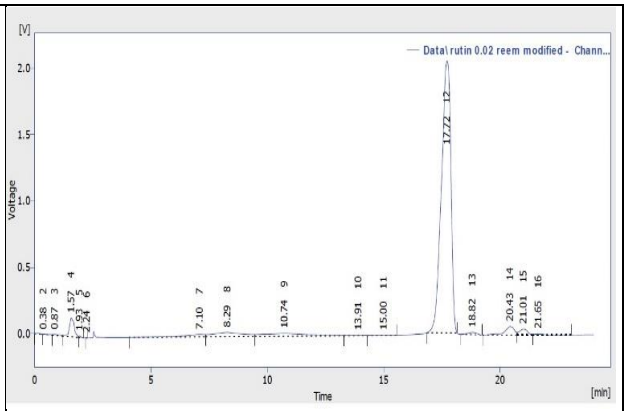
Gallic acid time 14.4min



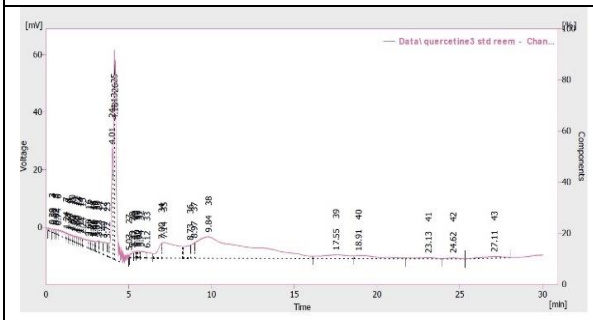
coumarin time 21.7min



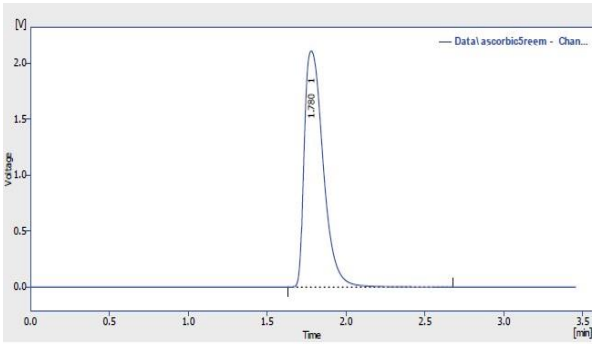
Ferulic acid time 12.8 min



Rutin time 17.72 min

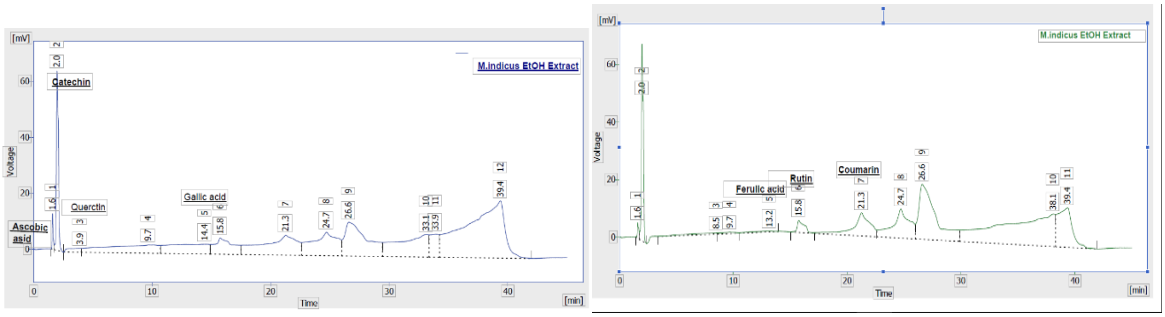


Quercetin time 4.01 min

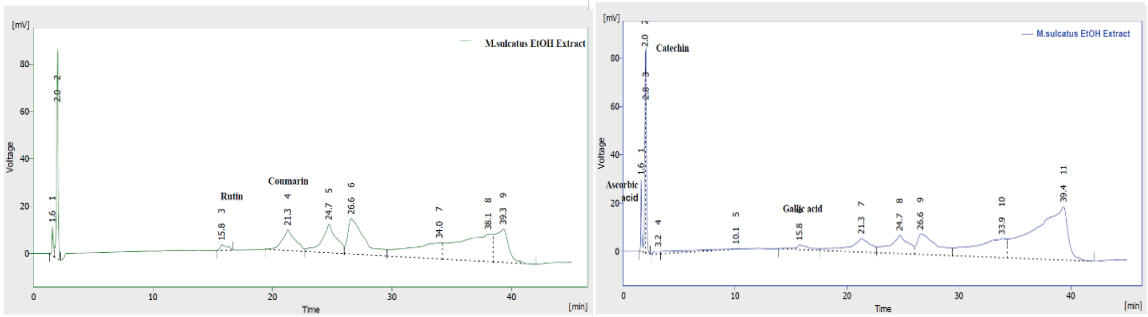


Ascorpic acid time 1.7min

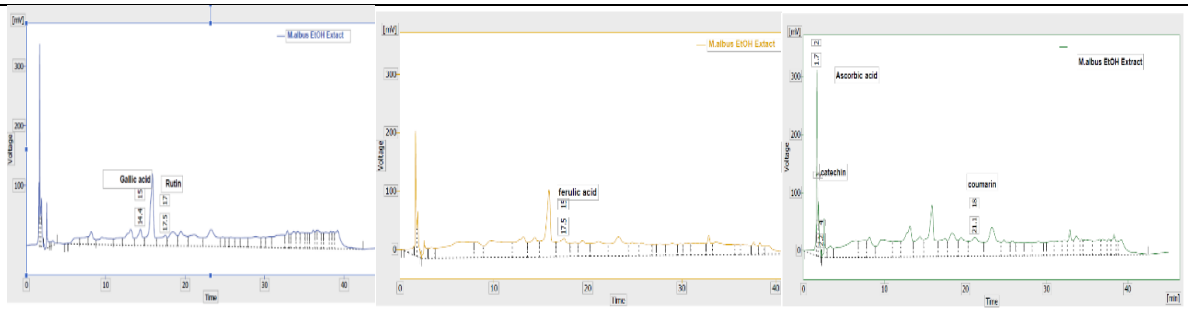
الشكل (43) الكروموتوغرامات للمركبات العيارية وزمن الاحتفاظ لكل مركب



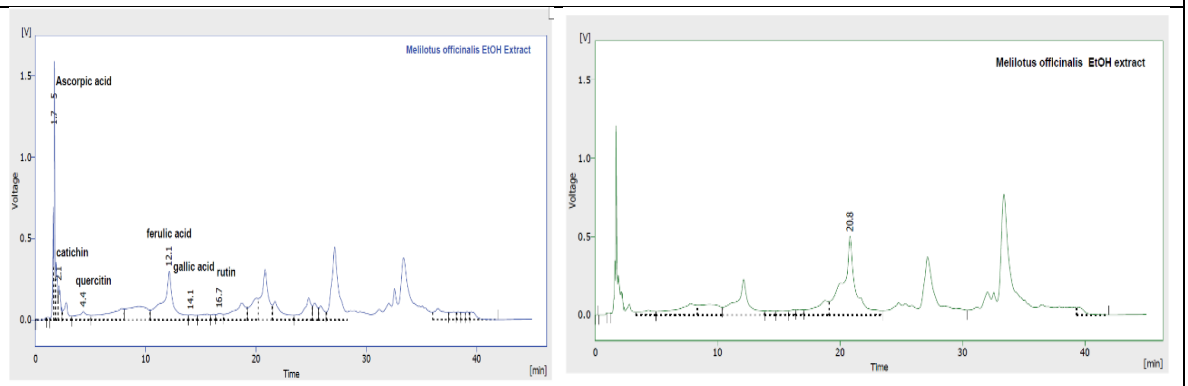
M.indicus



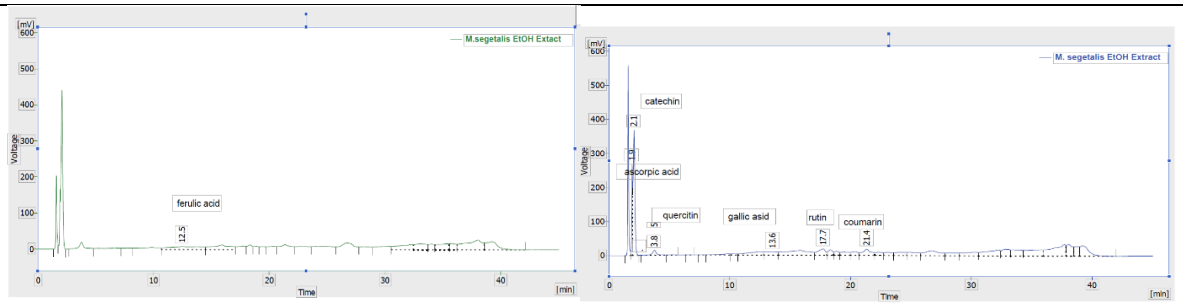
M.sulcatus



M.albus



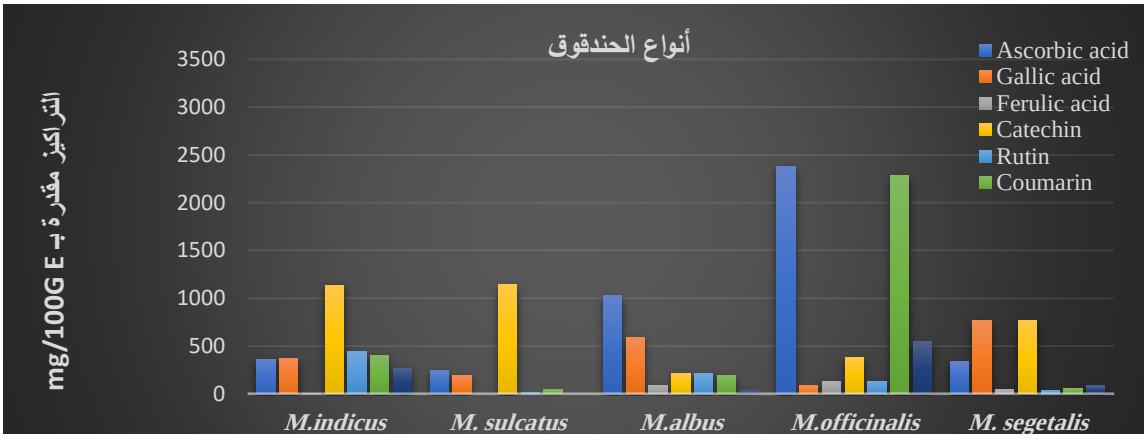
M.officinalis



M.segetalis

الشكل (44) الكروماتوغرامات للمستخلصات الإيتانولية70% لأنواع الحندقوق

يوضّح الشكل (45) مقارنة المركبات الفينولية والفلافونوئيدية في المستخلصات الإيتانولية 70% لأنواع الحندقوق المدروسة واختلاف توفرها أو عدم وجودها مع بيان تراكيزاها بشكل تقريبي بحسب تقنية **HPLC** تبعاً للعلاقة التي ذكرت سابقاً.



الشكل (45): مقارنة تراكيز المركبات الفينولية مقدرة mg/100g في المستخلص الإيتانولي 70% لكل نوع

ويوضح الجدول (31) تراكيز المركبات التي تم الكشف عنها والمقدرة بـ mg/100g E

الجدول 31: يظهر التراكيز التقريبية للمركبات التي تم تحديدها في أنواع الحندقوق

التركيز mg/100g E	مض الغاليك	حمض الفيروليك	الكاتشين	الروتين	الكومارين	حمض الاسكوربيك	الكيرستين
M.indicus	**365.477**	**1.03**	**1134.8**	**445.504**	**402.83**	**363.137**	**269.085**
M. sulcatus	**191.509**	**-**	**1138.27**	**9.65**	**41.04**	**239.808**	**-**
M.albus	**589.6**	**90.165**	**211.1**	**211.218**	**194.794**	**1025.7**	**35.9**
M.officinalis	**81.27**	**131.69**	**383.16**	**132.085**	**2282.29**	**3382.45**	**544.43**
M. segetalis	**771.2**	**42.7**	**761.67**	**35.43**	**58.37**	**335.628**	**83.49**

يتبيّن من الجدول أعلاه أن ***M. officinalis*** الأكثر تميزاً بين الأنواع المدروسة، حيث يتميز بغناه بالمركبات الفينولية، وأبرزها الكومارين، حمض الأسكوربيك، الفلافونوئيدات مثل الكيرسيتين، وحمض الغاليك، إضافةً إلى مركبات أخرى مثل الكاتشين، الروتين.

فقد أظهر ***M.indicus***، تركيزاً مرتفعاً من الكاتشين إلى جانب تراكيز جيدة من الكومارين والروتين والكيرسيتين وحمض الغاليك، مع مستويات معتدلة من المركبات الفينولية الأخرى.

وعلى الجانب الآخر، تفوق ***M.albus*** بارتفاع محتواه من حمض الأسكوربيك، إلى جانب تراكيز معتدلة من حمض الفيروليك والكاتشين، لكنه سجل انخفاضاً ملحوظاً في المركبات الأخرى.

وبالنسبة لـ ***M.sulcatus***، فقد انفرد بتركيز عالٍ من الكاتشين، لكنه افتقر إلى حمض الفيروليك والكيرسيتين وسجل مستويات منخفضة من بقية المركبات. أما ***M. segetalis***، فقد احتوى على حمض الغاليك والكاتشين بتركيزات متوسطة مع انخفاض واضح في باقي المركبات.

عند مقارنة هذه النتائج بالدراسات السابقة، أكدت دراسة **(Bubenchikova & Drozdova .2004)** وجود المركبات الفينولية نفسها في مستخلص الإيثانول 70% لـ ***M.officinalis***، كما أوضحت دراسة **(Pune *et al.*, 2020)** أن مستخلص الإيثانول 50% لهذا النوع غني بالروتين والكيرسيتين، في حين دعمت دراسة **(Liu *et al.*, 2018)** وجود الكومارين والكيرسيتين في مستخلص الإيثانول 70%. وقد كشف تحليل **HPLC** الذي أجراه **(Al-Sanafi .2020)** عن وجود **(9.7mg)** من حمض الغاليك، **(99mg)** من الكاتشين، **(21.9mg)** من حمض الكافيين، **(548.9 mg)** من حمض السيناميك، و**(289mg)** من الكومارين في **5** غرامات من مسحوق زهرة ***M.officinalis***، وهي نتائج تتوافق مع ما تم كشفه في هذه الدراسة من حيث النوعية والتراكيز العالية لـ100غرام من المستخلص الإيتانولي للأجزاء الهوائية لـ ***M.officinalis***.

عند إجراء تحليل للمستخلص الإيتانولي لنوع ***M. officinalis*** في شروط مشابهة، كشفت النتائج عن وجود الكومارين ولكن بتراكيز منخفضة، وهو ما يتناقض مع نتائج هذه الدراسة من حيث التركيز العالي، حيث بلغ تركيزه في هذه الدراسة حوالي(2282.4 mg/100g) من المستخلص، وهو تركيز أعلى بكثير مما سجلته دراسة **(Hachim *et al.*, 2020)**، التي أشارت إلى تركيز أقل لهذا المركب.

كما كشفت دراسة **(Obistioiu *et al.*, 2021)** عبر تحليل **LC** عن غياب حمض الغاليك وحمض الفيروليك في مستخلص ***M. officinalis***، وهو ما يتناقض مع تحليل **HPLC** في هذه الدراسة التي أثبت وجودهما.

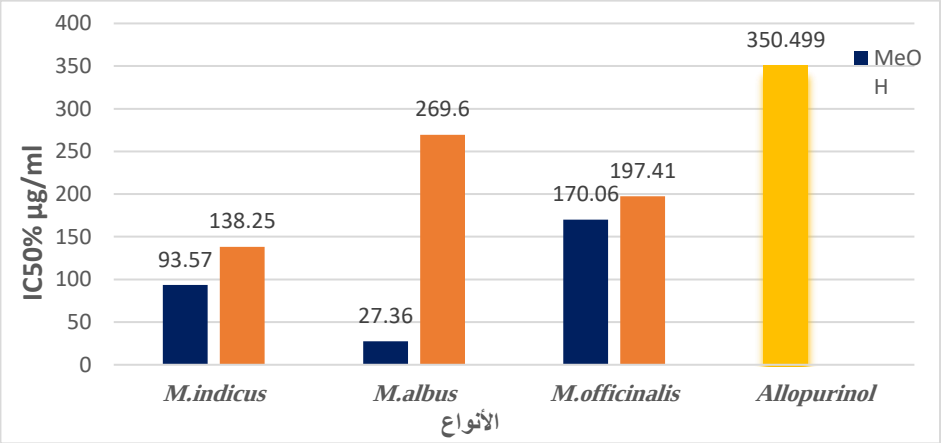
أما بالنسبة لنوع ***M. indicus*** ، فقد توافقت نتائجنا مع دراسة **(Bashir *et al.*, 2022)** بأن المستخلص الإيتانولي 70% يحتوي على **(269.04mg/100g)** من الكيرسيتين.

في حين اختلفت نتائج هذه الدراسة مع دراسة **(Razat *et al.*, 2018)** التي لم ترصد الكيرسيتين وحمض الغاليك في المستخلص المائي للنوع نفسه، لكنها أكدت وجود حمض الفيروليك.

نظراً لعدم توفر دراسات كيميائية كافية حول أنواع الحندقوق(***M. albus*** ،***M. sulcatus*** ،***M. segetalis***) فإن المقارنة مع نتائج دراسات سابقة تبقى محدودة.

3-4 نتائج فعالية بعض مستخلصات الحندقوق في تثبيط أنزيم Xanthine Oxidase:

تمت دراسة قدرة المستخلصات الميتانولية لأنواع ***M.indicus ,M.albus, M.officinalis*** والإيتانولية 70% على تثبيط نشاط أنزيم **XO** لثمانية تراكيز لكل مستخلص**(20-1000µg/ml)** وبتكرارين لكل تركيز بوجود الشاهد السلبي والشاهد الإيجابي مع مقارنته بالمركب المرجعي **Allopurinol**، ثم تم حساب **IC50%** لتثبيط كل مستخلص، وأظهرت النتائج أن المستخلص الميتانولي كان الأكثر فعالية في تثبيط الأنزيم **XO** مقارنة بالمستخلص الإيتانولي 70% لجميع الأنواع المدروسة الشكل (46).



الشكل (46): IC50% للخلاصات الميتانولية والإيتانولية 70% على تثبيط نشاط أنزيم **XO**

أظهر المستخلص الميثانولي لنوع ***M.albus*** أعلى قدرة في تثبيط أنزيم**XO**، حيث بلغ تركيز التثبيط النصفي **IC_{50} = 27.36±0.015 µg/ml** ، في حين كانت قدرة المستخلص الإيتانولي 70% للنوع نفسه أقل بشكل ملحوظ، إذ سجل قيمة **IC_{50}=269.6±0.013 µg/ml** وجاء بعده من حيث الفعالية في المستخلص الميثانولي نوع ***M.indicus***، حيث بلغت قيمة **IC_{50} = 93.57±0.07 µg/ml**، مقارنة بالمستخلص الإيتانولي الذي سجّل فعالية أقل بقيمة**IC_{50}= 138.25±0.02 µg/ml**. الجدول (32)

الجدول (32): قيم التركيز الأعظمي لتثبيط 50% من نشاط الأنزيم XO للمستخلصات مقارنة بالمركب المرجعي				
IC50%	***M.indicus***	***M.albus***	***M.officinalis***	**Allopurinol**
MeOH	93.57±0.07	27.36±0.01	170.06±0.01	350.499±0.03
EtOH	138.25±0.02	269.6±0.013	197.41±0.07	

أما نوع ***M. officinalis***، فقد أظهر أقل فعالية تثبيطية بين الأنواع الثلاثة، حيث كانت الفروق بين المستخلص الميثانولي**IC_{50} = 170.06 ±0.01µg/ml** م والمستخلص الإيتانولي **IC_{50} = 197.41 µg/ml** طفيفة نسبياً، مما يشير إلى أن نوع المذيب المستخدم لم يكن له تأثير كبير على فعالية هذا النوع النباتي.

عند مقارنة المستخلصات مع المركب المرجعي **Allopurinol** الذي سجل **IC50 = 350.499±0.03µg/ml**، تبين أن جميع الأنواع المدروسة أظهرت فعالية أعلى مقارنة بالمركب المرجعي، وخاصة المستخلص الميتانولي لـ ***M.albus*** الذي تفوق بشكل كبير والذي يعزى إلى التركيز المرتفع للفينولات والفلافونوئيدات في ***M. albus*** (الجدول24 ص98، ج27 ص101) حيث يفسر فعاليته العالية في تثبيط **XO**، هذه المركبات التي تعمل كعوامل مضادة للتأكسد، والتي تساهم بشكل كبير في الحد من الجذور الحرة الناتجة عن الأنزيمات مثل **XO**.

بينت النتائج الإحصائية وجود فروق معنوية بين التراكيز والأنواع المدروسة، بدلالة **p<0.05.**

تم حساب اختبار أقل فرق معنوي **LSD** بين المتوسطات للتراكيز المستخلصات والفعالية الأنزيمية، فقد تبين وجود فروق معنوية عالية بين معظم التراكيز المختبرة، حيث لوحظ أن قيم الامتصاصية زادت مع زيادة التركيز. وبما أن الامتصاصية تتناسب عكسياً مع الفعالية البيولوجية، فإن هذه النتائج تعكس زيادة فعالية التثبيط للأنزيم **XO** عند التراكيز المنخفضة، بحيث توافقت هذه النتائج مع القيم المحسوبة ل .% **IC50**، حيث أظهر مستخلص ***M.albus*** الميتانولي أعلى فعالية **(IC50 = 27.36 µg/ml)** مقارنة بـ ***M.indicus M.officinalis***

كذلك بيّن اختبار **LSD** فروقات معنوية بين الأنواع المدروسة في قدرتها على تثبيط أنزيم **XO**، حيث تشير القيم الأعلى للامتصاصية إلى فعالية أقل والعكس صحيح.

سجل ***M.indicus*** أعلى امتصاصية بشكل معنوي مقارنة بـ ***M.albus***، ***M.officinalis*** **(p < 0.001)**، مما يدل على فعالية أقل، في المقابل، لم تُسجل فروقات معنوية بين ***M. albus*** و***M. officinalis*** **(p = 0.770)** ، رغم

تفوق ***M. albus*** مخبرياً بقيمة **IC50 =27.36 µg/ml** مقابل 170.06 **µg/ml** لـ***M. officinalis*** ، كما هو موضح في الشكل(46).الجدول (33).

الجدول33: اختبار أقل فرق معنوي LSD بين متوسطات تراكيز المستخلص الميتانولي للأنواع						
الامتصاصية التفاعل للمستخلص الميتانولي :Dependent Variable						
الأنواع(I)	الأنواع(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
M.indicus	***M.albus***	.01970*	.004139	.000	.01125	.02814
	M.officinalis	.01845*	.004139	.000	.01000	.02689
M.albus	***M.indicus***	-.01970-*	.004139	.000	-.02814-	-.01125-
	M.officinalis	-.00125-	.004236	.770	-.00989-	.00739
M.officinalis	***M.indicus***	-.01845-*	.004139	.000	-.02689-	-.01000-
	M.albus	.00125	.004236	.770	-.00739-	.00989

رغم الفارق الكبير في**IC50%** ، قد يُعزى إلى تقارب القيم داخل التكرارات أو ارتفاع التباين، قلة التكرارات، مما حد من دلالة الفروقات إحصائياً، وتعكس هذه النتائج أهمية الربط بين التحليل الإحصائي والبيوكيميائي، حيث إن عدم الدلالة الإحصائية لا يُلغي بالضرورة الفروق البيولوجية الفعلية، خصوصًا في دراسات الفعالية الدوائية.

ولمعرفة المتوسطات المختلفة بين الأنواع في المستخلص الإيتانولي 70% تم حساب اختبار أقل فرق معنوي **LSD** بين المتوسطات فكانت الفروق:

الجدول 34: اختبار LSD بين متوسطات تراكيز المستخلص الإيتانولي 70% للأنواع						
Dependent Variable:						
الأنواع(I)	الأنواع(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
M.indicus	***M.albus***	-.03645-*	.007684	.000	-.05214-	-.02076-
	M.officinalis	-.04450-*	.007684	.000	-.06019-	-.02881-
M.albus	***M.indicus***	.03645*	.007684	.000	.02076	.05214
	M.officinalis	-.00805-	.007684	.303	-.02374-	.00764
M.officinalis	***M.indicus***	.04450*	.007684	.000	.02881	.06019
	M.albus	.00805	.007684	.303	-.00764-	.02374

أظهرت نتائج اختبار **LSD** فروقات معنوية واضحة بين ***M.indicus*** وكل من ***M.albus* ,*M.officinalis*** في قدرتها على تثبيط أنزيم **XO**، حيث كانت النسبة (متوسط الامتصاصية) لدى ***M.indicus*** أقل بشكل معنوي **(p < 0.001)**، مما يشير إلى فعالية أعلى في التثبيط.

في المقابل، لم تُسجَّل فروق معنوية بين ***M.albus, M.officinalis*** **(p = 0.303)**، مما يدل على تقارب فعاليتهما وعليه، يمكن ترتيب الأنواع حسب الفعالية من الأكثر إلى الأقل فاعلية كما يلي:

M.indicus > ***M.officinalis*** ≈ ***M.albus*** ، يتفق نتائج التحليل الاحصائي مع النتائج الحيوية في الشكل(45) الجدول(32).

عند ربط نتائج تحليل **HPLC** من جهة، الجدول(31)، مع البيانات الخاصة بالمحتوى الكلي للفينولات والفلافونوئيدات (الجدولين 22 و25)، وفعالية تثبيط إنزيم **XO**، نلاحظ تبايناً واضحاً بين الأنواع المدروسة.

أظهر المستخلص الإيتانولي لنوع ***M. albus*** أقل فاعلية في تثبيط إنزيم **XO** ، حيث بلغت قيمة **IC_{50} = 269.6 µg/ml**، على الرغم من احتوائه على تركيز مرتفع من **Ascorbic acid**، **Gallic acid**، وكمية معتدلة من **Ferulic acid**، واحتواءه على تركيز عال من المحتوى الكلي للفينولات (ج24)، وكذلك كمية معتدلة من الفلافونوئيدات(ج27)، إلا أن انخفاض الفعالية قد يُعزى إلى انخفاض استقرار أو نشاط هذه المركبات عند استخلاصها بالإيتانول مقارنةً بالميتانول، أو إلى ضعف التآزر بينها.**(Liazid *et al.*, 2007)**.

أما مستخلص ***M. officinalis*** الإيتانولي، فقد أبدى فاعلية معتدلة بقيمة **(IC_{50} = 197.41 µg/ml)** ، رغم احتوائه على تركيزات مرتفعة من **Ascorbic acid**، **Coumarin** ، **Quercetin**، إضافة إلى التركيز العالي من المحتوى الكلي للفينولات والفلافونوئيدات، وهذا ما يدعم ملاحظات **(Sunjo *et al.*, 2017)** بأن زيادة تركيز بعض المركبات لا تعني بالضرورة زيادة في الفعالية التثبيطية للإنزيم، وقد يُعزى ذلك إلى التداخل بين المركبات أو محدودية توافرها الحيوي.

بالمقابل، أظهر مستخلص ***M.indicus*** الإيتانولي أفضل فاعلية نسبية بقيمة **(IC_{50} = 138.25 µg/ml)**، والتي يمكن أن تُعزى إلى احتوائه على **Catechin(1134.8 mg/100g)**، و**Rutin (445.504 mg/100g)** ، بالإضافة

إلى **Gallic acid (365.477 mg/100g)**، كما تميّز هذا المستخلص بأعلى تركيز كلي من الفينولات **429.03 mg GAE/g)** والفلافونوئيدات **(43.42 mg QE/g)** بين الأنواع المدروسة، مما يدعم العلاقة الإيجابية بين غنى المستخلص بالمركبات متعددة الفينول وفعاليته التثبيطية.

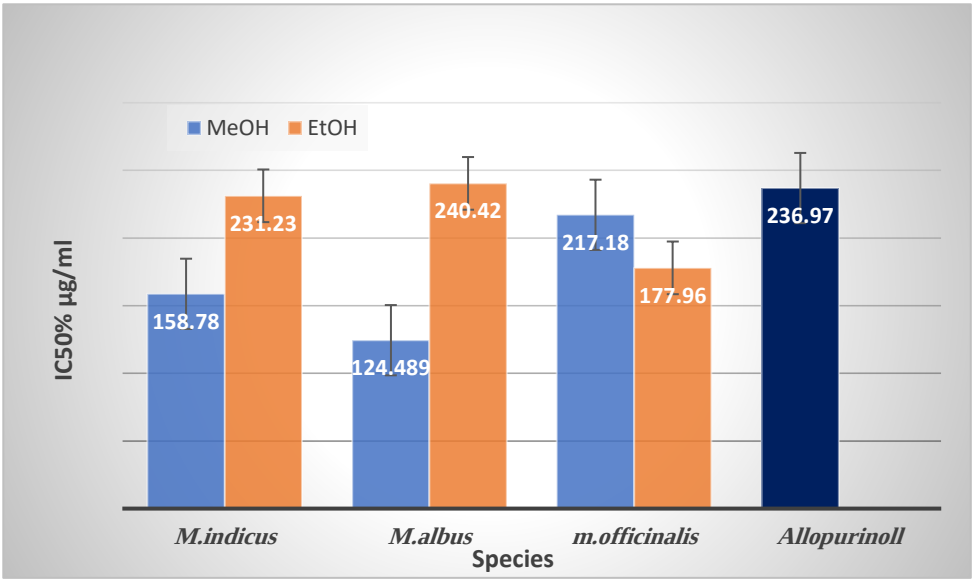
عند مقارنة نتائج دراستنا مع دراسة **(Liu *et al.*, 2018)**، والتي تدرس تأثير التربسين المعزول من المستخلص الإيتانولي لنوع ***M.albus*** كمثبط لإنزيم **XO** ، حيث أبدى فعالية عالية كمركب معزول عن المستخلص، بالمقابل كانت الفعالية المثبطة له أقل بكثير وهو في المستخلص الخام والجاف، مما يؤكد الفعل التآزري بين المركبات، لتزيد الفعالية المضادة للتأكسد أو تقلل من فعالية المركب (التربسين) بمفرده، حيث تتوافق نتيجة بحثه مع نتائج بحثنا في ضعف قدرة المستخلص الإيتانولي ل***M.albus***.

إنّ كيفية تأثير وجود مجموعات الهيدروكسيل على المواقع المثبطة ترتبط ارتباطاً وثيقاً بما إذا كانت الاستبدالات تزيد من العائق الفراغي أو تزعج تفاعل الفلافونوئيد مع الموقع التحفيزي لـ **XO**

(Van Hoorn *et al.*,. 2015؛ Mathew *et al.*,2020).

3-4-1 نتائج دراسة شوارد Superoxide في التفاعل التثبيطي لأنزيم XO:

يعتبر أنزيم الأكزانتين أوكسيداز **(XO)** أحد المصادر الرئيسية لإنتاج شوارد فوق الأكسجين **(Superoxide, O_2^-)** في الجسم، والتي تُعد من الجذور الحرة المسببة للإجهاد التأكسدي المرتبط بعدد من الأمراض المزمنة، مثل النقرس، والتهابات المفاصل، والأمراض القلبية الوعائية. يتمثل دور مثبطات **XO** في الحد من تكوين هذه الشوارد، وبالتالي تقليل الإجهاد التأكسدي وحماية الخلايا من التلف، حيث تم دراسة فعالية هذه المستخلصات في تثبيط نشاط أنزيم **XO** ومدى قدرة هذه المستخلصات على تقليل نسبة إنتاج هذه الشوارد الشكل (47) .



الشكل (47): قيم **IC50%** لتثبيط إنتاج شوارد **Superoxide**

أظهرت المستخلصات الميثانولية فعالية واضحة في تثبيط شوارد**Superoxide** مقارنة بالمستخلصات الإيتانولية، حيث سجل ***M. albus*** أعلى فعالية مضادة للأكسدة بقيمة **IC50 = 124.489 µg/ml**، يليه ***M. indicus*** بقيمة **IC50 = 158.78 µg/ml**، بينما كان ***M. officinalis*** الأقل فعالية بين المستخلصات الميثانولية بقيمة **IC50%=217.18 µg/ml.**، أما المستخلصات الإيتانولية، فقد أظهر ***M. officinalis*** أعلى قدرة على تثبيط شوارد **superoxide** حيث كانت قيمة **IC50 = 177.96 µg/ml**، في حين كان ***M.albus*** الأقل كفاءة بقيمة **IC50 = 240 µg/ml.**

عند مقارنة هذه النتائج بالمركب المرجعي **Allopurinol**، الذي سجل **IC50 = 236.97 µg/ml**، يتضح أن بعض المستخلصات النباتية، خاصة ***M.albus*** **MeOH,** ***M. officinalis*** **EtOH**، أظهرت فعالية مضادة للتأكسد أعلى من المركب المرجعي، مما يشير إلى إمكانية استخدامها كمضادات أكسدة طبيعية بديلة.

أوضحت نتائج الدراسة الإحصائية وجود فروق معنوية ذات دلالة إحصائية **($p < 0.05$)** لكل من عاملي التركيز والنوع النباتي، مما يدل على تأثير واضح لهذين العاملين في النسبة المئوية للتثبيط. وأوضحت اختبارات المقارنة المتعددة **(LSD)** أن التركيزات الأعلى أظهرت فعالية تثبيط أقل، حيث كانت الفروق بين التراكيز معنوية بشكل كبير، وخاصة بين التركيز **1000µg/ml** وبقية التراكيز، مما يشير إلى علاقة عكسية بين التركيز وفعالية التثبيط.

كما بيّنت النتائج وجود فروق معنوية بين الأنواع النباتية في المستخلص الميتانولي، حيث أبدى***M.albus*** قدرة عالية كمضاد لتأكسد مقارنة بالأنواع الأخرى، تلاه ***M. indicus***، في حين كان ***M. officinalis*** الأقل فعالية في تثبيط شوارد **Superoxide**. الجدول (35).

الجدول 35: LSD بين متوسطات امتصاصية تراكيز المستخلص الميتانولي للأنواع كمضاد تأكسد لشوارد **superoxide**						
Dependent Variable LSD MeOH :النسبة						
(I)الأنواع	**(J)**الأنواع	**Mean Difference (I-J)**	**Std. Error**	**Sig.**	**95% Confidence Interval**	
					Lower Bound	**Upper Bound**
M.indicus	***M.albus***	.00728*	.000507	.000	.00624	.00832
	M.officinalis	.00183*	.000507	.001	.00079	.00287
M.albus	***M.indicus***	-.00728-*	.000507	.000	-.00832-	-.00624-
	M.officinalis	-.00544-*	.000507	.000	-.00649-	-.00440-
M.officinalis	***M.indicus***	-.00183-*	.000507	.001	-.00287-	-.00079-
	M.albus	.00544*	.000507	.000	.00440	.00649

كذلك أظهرت المقارنات بين المتوسطات وجود فروق معنوية بين الأنواع المختلفة في المستخلص الايتانولية70%، حيث أن ***M. officinalis*** أظهر أعلى فعالية مضادة للأكسدة مقارنة بالأنواع الأخرى، تليه***M. albus***، بينما ***M. indicus*** سجل أقل فعالية. الجدول (36).

الجدول 36: اختبار LSDبين متوسطات امتصاصية تراكيز المستخلص االأيتانولي70% للأنواع كمضاد تأكسد لشوارد superoxide						
Dependent Variable LSD EtOH :النسبة						
(I)الأنواع	**(J)**الأنواع	**Mean Difference (I-J)**	**Std. Error**	**Sig.**	**95% Confidence Interval**	
					Lower Bound	**Upper Bound**
M.indicus	***M.albus***	-.00306-*	.000388	.000	-.00385-	-.00226-
	M.officinalis	-.00706-*	.000388	.000	-.00785-	-.00626-
M.albus	***M.indicus***	.00306*	.000388	.000	.00226	.00385
	M.officinalis	-.00400-*	.000388	.000	-.00480-	-.00320-
M.officinalis	***M.indicus***	.00706*	.000388	.000	.00626	.00785
	M.albus	.00400*	.000388	.000	.00320	.00480

وتُظهر هذه القيم (التي تتناسب عكسياً مع الفعالية الحيوية) توافقاً مع نتائج التحليل الإحصائي، حيث أن الأنواع التي سجلت أقل قيم **IC50** كانت في معظمها الأعلى في نسب التثبيط وفقاً للتحليل الإحصائي. وعند مقارنة هذه القيم بالمركب المرجعي(**Allopurinol (IC50 = 236.97 µg/mL** ، يتضح أن مستخلصي ***M. albus*** (ميثانولي)

و ***M.officinalis*** (إيتانولي) قد أظهرا فعالية مضادة للتأكسد تفوق المركب المرجعي، مما يبرز إمكانيتهما الواعدة كمصادر طبيعية لمضادات الأكسدة.

تعكس الفعالية المضادة للتأكسد للمستخلصات الإيتانولية للأنواع المدروسة تبايناً في تركيز المركبات الفينولية والفلافونوئيدات، حيث سجل ***M.officinalis***قدرة على تثبيط شوارد**Superoxide (IC50 = 177.96 µg/mL)** ، بفضل احتوائه على أعلى تركيز من حمض الأسكوربيك**(3382.45 mg/100g)** ، والكومارين، والكيرسيتين، مما يفسر تفوقه على المركب المرجعي **.Allopurinol (IC50 = 236.97 µg/mL)** في المقابل، أظهر ***M.indicus*** فعالية متوسطة **(IC50 = 231.23 µg/mL)** مدعومة بارتفاع مستويات الكاتشين والروتين، بينما كان ***M. albus*** الأقل كفاءة **(IC50 = 240 µg/mL)** نتيجة لانخفاض تركيز الفلافونوئيدات، رغم احتوائه على كميات جيدة من حمض الغاليك والفيروليك. تعكس هذه النتائج التأثير التكاملي بين المركبات الفينولية المختلفة، مما يبرز أهمية التراكيب الكيميائية في تحديد النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات النوعية.

وبالعودة الى الجدول (27) أن المستخلصات الميثانولية تمتلك نسبة أعلى من الفلافونوئيدات الكلية **(TF)** في ***M. indicus*** و ***M. albus*** مقارنةً بالمستخلصات الإيتانولية (70%)، في حين أن الإيثانول كان أكثر كفاءة في استخلاص المركبات الفينولية الكلية**(TP)** ، حيث أظهر***M.officinalis*** **EtOH** تركيزاً مرتفعاً**(402.37mg/100g)** مقارنةً بالمستخلص الميثانولي.

من جهة أخرى، ترتبط فعالية المستخلص بعدد جذور الهيدروكسيل الحرة الموجودة في المركبات الفينولية والفلافونوئيدية مثل الكومارين، حيث تتأثر الفعالية عادة بوجود عدد أكبر من مجموعات الهيدروكسيل الحرة في المستخلص. **(Lin *et al*., 2008,Heim *et al*., 2002)**.

3-4-2 نتائج الدراسة الإحصائية لمعامل الارتباط بيرسون بين نشاط المستخلصات في تثبيط الأنزيمXO وقدرتها على تثبيط إنتاج شوارد Superoxide:

عند حساب معامل الارتباط بيرسون لتحليل العلاقة بين قدرة المستخلصات على تثبيط نشاط أنزيم**XO** وفعاليتها في تثبيط شوارد **Superoxide**، أوضحت النتائج أن هناك ارتباطاً إيجابياً قوياً جداً **(r=0.99)** بين المستخلصات

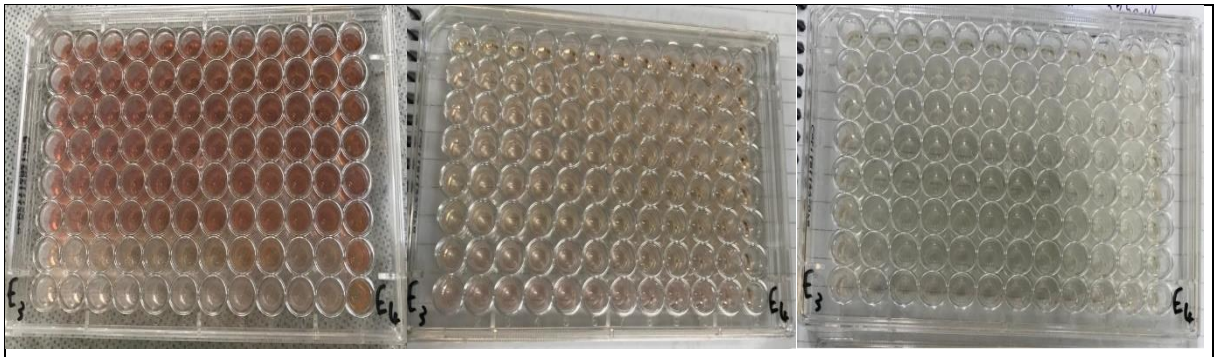
الميثانولية للأنواع المدروسة، بفضل محتواه الأعلى من المحتوى الكلي للفلافونوئيدات مما يشير إلى أن المستخلصات التي تمتلك قدرة عالية على تثبيط **XO** تتمتع أيضاً بفعالية قوية كمضادات تأكسد ضد شوارد **.superoxide**

في المقابل، أظهرت المستخلصات الإيتانولية **(70%)** ارتباطاً ضعيفاً جداً**(r=0.13)** ، مما يدل على أن تأثيرها على تثبيط **XO** لا يرتبط بشكل واضح بقدرتها على تثبيط شوارد **Superoxide**.

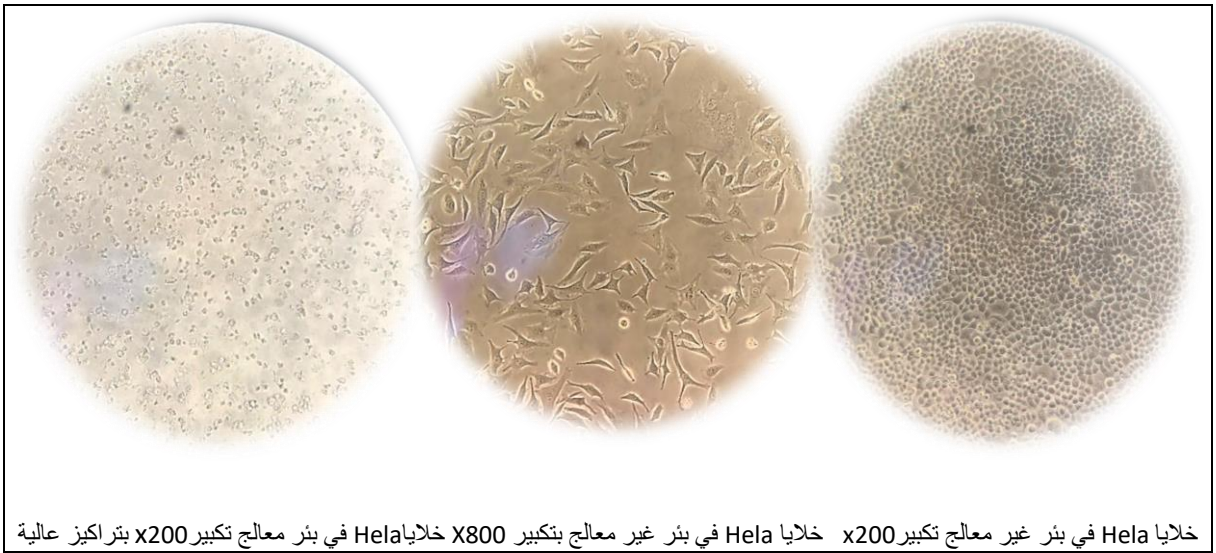
يمكن تفسير ذلك بأن قطبية المذيب تلعب دوراً حاسماً في استخلاص المركبات النشطة بيولوجياً، حيث يبدو أن الميتانول أكثر كفاءة في استخلاص المركبات التي تمتلك تأثيراً مزدوجاً كمثبطات لأنزيم **XO** ومضادات للأكسدة، في حين أن الإيتانول 70% قد يكون أقل قدرة على استخلاص هذه المركبات الفعالة.

3-5 نتائج دراسة السمية الخلوية على الخلايا السرطانية في عنق الرحم Hela بطريقة XTT:

تمت دراسة سمية لمستخلصات الحندقوق الإيتانولية 70% لنوعين ***M.albus, M.officinalis*** باختبار **XTT** حيث يوضح الشكل (48) الصفيحة قبل وبعد المعالجة .



قبل إضافة تفاعل **XTT** بعد إضافة تفاعل **XTT** مباشرة بعد **4** ساعات من الحضن

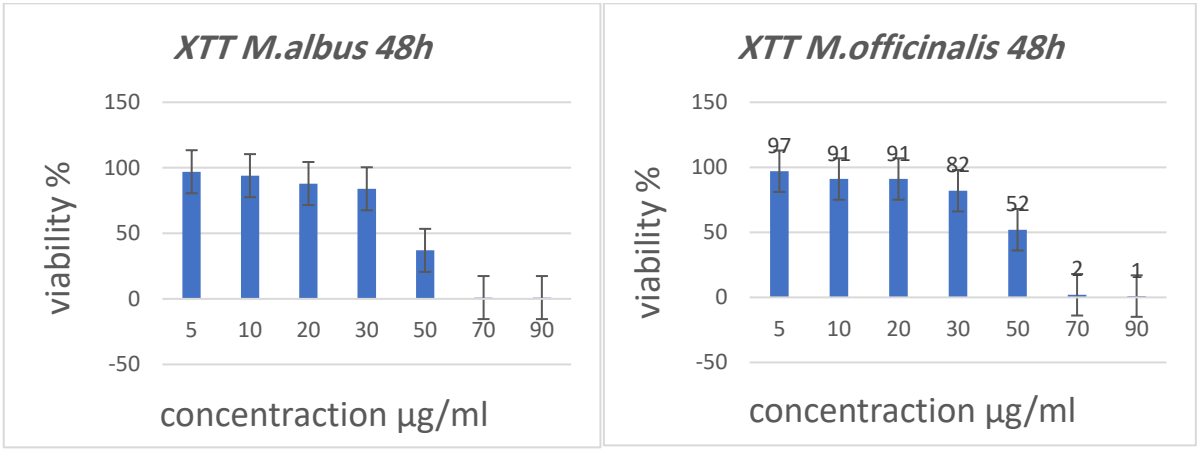


خلايا Hela في بئر غير معالج تكبير x200 خلايا Hela في بئر غير معالج بتكبير X800 خلاياHela في بئر معالج تكبير x200 بتراكيز عالية

الشكل (48): صورة لوحة 96 بئر المعالجة بسبعة تراكيز من 5-10-20-30-50-70-90µg/ml من المستخلص الإيثانولي70% لنوعين من الحندقوق حيث يدل ***Melilotus albus* E3**، ***Melilotus officinalis* E4**.

صور لأبار قبل وبعد المعالجة تحت المجهر بتكبير 200X,800X

أظهرت نتائج مستخلصي الإيثانول 70% لكل من ***Melilotus albus*** و ***Melilotus officinalis*** تأثيراً متفاوتاً على خلايا سرطان عنق الرحم(**Hela**) ، حيث ارتفعت السمية الخلوية تدريجياً مع زيادة تركيز المستخلص. لوحظت تأثيرات خفيفة ضمن التراكيز **30–5 µg/ml** ، في حين ظهرت سمية واضحة عند تركيز µg/ml50، خاصةً في ***M.albus.*** أما عند التراكيز الأعلى**90،70** µg/ml ، فسُجلت سمية حادة، ما يدل على فعالية المستخلصات في تحفيز آليات الموت الخلوي بطريقة تعتمد على الجرعة.الشكل 49



الشكل (49): تغير نسبة العيوشية لخلايا سرطان **Hela** مع تغير تراكيز المستخلص للنوعين

تم تحليل النتائج باستخدام برنامج **SPSS 26** وفق اختبار تحليل التباين الأحادي(**One-Way ANOVA**) ، بوجود ستة مكررات لكل تركيز. أظهرت النتائج فروقاً معنوية ($P < 0.05$) بين التراكيز المدروسة من مستخلص ***M. officinalis,M. albus***، ما يشير إلى وجود علاقة واضحة بين تركيز المستخلص ومستوى الامتصاصية، التي تم اعتمادها كمؤشر غير مباشر لتقييم الفعالية البيولوجية.

وأُجري اختبار **LSD** لمعرفة أقل فرق معنوي بين المتوسطات، وأظهر أن التراكيز المرتفعةµg/ml (50، 90،70) كانت ذات تأثير معنوي أكبر في تقليل نسبة الخلايا الحية مقارنة بالتراكيز المنخفضة والشاهد، في المقابل، لم تُسجل فروق معنوية بين التراكيز **30–5 µg/ml** ، رغم أن لها تأثيراً بيولوجياً ملحوظاً، ما يعكس التباين في التفاعل بين التركيب الكيميائي للمستخلص وحساسية الخلايا السرطانية.

بالرغم من احتواء ***M. officinalis*** على تركيزات مرتفعة من عدة مركبات فعالة مثل حمض الأسكوربيك **(**الكومارين، الكاتشين، والكيرستين الجدول (31)، إلا أن ***M. albus*** أظهر فعالية سُمية أعلى ضد خلايا سرطان عنق الرحم **HeLa**، خاصة عند التراكيز العالية **50)**، **(µg/ml** 70 ، 90) مما يشير إلى أن التوازن بين المركبات يلعب دوراً أكثر أهمية من الكمية الإجمالية، حيث يتميز ***M. albus*** بتركيز مرتفع من حمض الغاليك ، وهو مركب معروف بتأثيره القوي في تثبيط الجذور الحرة وتعزيز الموت الخلوي المبرمج، إضافة إلى احتوائه على حمض الفيروليك والكاتشين اللذين يسهمان في إيقاف دورة الخلية وتقليل تكاثر الخلايا. ورغم أن المحتوى الكلي للفينولات في مستخلص الإيثانول 70% متقارب بين النوعين مقارنة بـ ***M. officinalis*** الجدول(24)، والمحتوى الفلافونوئيدي الأعلى في ***M.officinalis*** مقارنة بالمحتوى الفلافونوئيدي لـ ***M.albus*** الجدول (27)، إلا أن قدرة ***M. albus*** أفضل والتي قد تُعزى إلى توازن مكوناته الفينولية وتفاعلها المشترك، مما يعزز تأثيره المضاد للسرطان مقارنةً بالتوزيع غير المتوازن نسبياً في***M. officinalis***، إضافة إلى الفعالية الحيوية للمستخلصات لا تعتمد فقط على كمية الفينولات والفلافونوئيدات، بل على طبيعتها الكيميائية وقدرتها على التفاعل مع المسارات الخلوية،(Tsao, 2010).

حيث يتميز ***M.albus*** بمحتوى مرتفع من حمض الغاليك (**589.6 mg/100g**)، وهو مركب قوي في تثبيط الجذور الحرة وتعزيز فعالية العلاجات الكيميائية عبر استهداف مسارات PI3K/Akt، مما يزيد من موت الخلايا السرطانية ويحد من هجرتها. (**Ashrafizadeh *et al*.,., 2021**).

كذلك يعزز التوازن بين المركبات الفينولية مثل الكاتشين وحمض الفيروليك التأثير السمي على الخلايا السرطانية، إذ يساهم حمض الفيروليك في إيقاف دورة الخلية في طور **G0/G1** وتثبيط مسارات البقاء الذاتي(**Autophagy**) ، مما يقلل من تكاثر وانتشار الخلايا.(**Gao *et al*.,., 2018**).

أما الكاتشين، فقد أبدى نشاطاً قوياً مضاداً للتأكسد وساهم في تقليل قابلية خلايا **Hela** للبقاء وزيادة معدل الموت المبرمج، حيث بلغ **IC50 = 22.91 µg/mL**، مما يعكس تأثيره القوي المضاد للسرطان رغم احتواء ***M.officinalis*** على تركيزات أعلى من المركبات الفينولية، أثبت ***M.albus*** فعالية أكبر في بعض التراكيز، نتيجة لتوازن مركباته النشطة واعتماده على حمضي الأسكوربيك والغاليك، مما يعزز قدرته على تثبيط الإجهاد التأكسدي وتحسين الاستجابة للعلاج.

في دراسة(**Ahmed and Al-Refai 2014**)، تم تقييم تأثير مستخلصات مختلفة (الكلوروفورم، أسيتات الإيثيل، والميثانول) من ***Melilotus indicus*** على خطوط سرطانية متعددة (**Hela ، HepG-2، HCT-116، Caco-2، MCF-7**) كان مستخلص الكلوروفورم الأكثر سمّية، إذ أثبت أن له تأثيراً مثبطاً للنمو يعتمد على الجرعة بعد **24** ساعة، خاصة على خلايا **HepG-2** و**HCT-116**، وسجّل قيم **IC50** منخفضة تراوحت بين**µg/ml 9.21 و 15.52 .**

أما المستخلص الميثانولي، فكان الأكثر فاعلية ضد خلايا.**Hep-2 IC50 = 10.86 µg/ml**

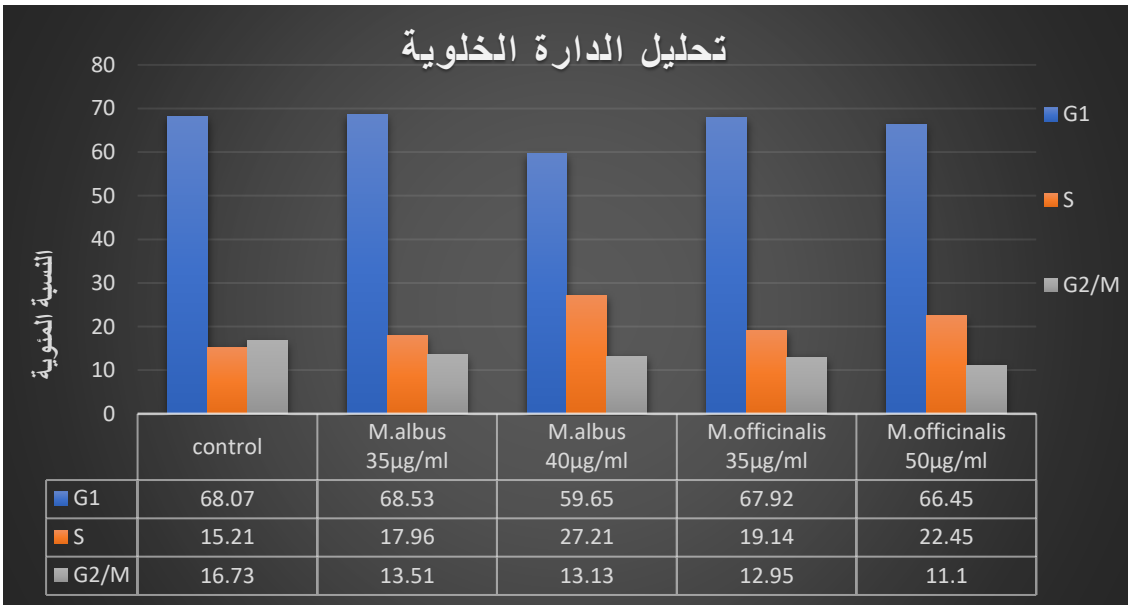
كما جرى عزل وتنقية مستخلص إيتانولي ***M.indicus*** ، ما مكّن من تحديد ثمانية مركبات فلافونوئيدية نشطة، من مشتقات الكاتشين، الإبيكاتشين، سواء بشكله الحر أو الجليكوسيدي، وتم تأكيد تراكيبها باستخدام تحاليل طيفية متقدمة، عند مقارنة هذه النتائج مع مستخلصي ***M.albus*** و ***M.officinalis*** (70% إيثانول)، تبين أن ***M.albus*** (**IC50 = 46.6 µg/ml**) له سمية خلوية أعلى نسبياً من ***M.officinalis*** **IC50 = 44.61 µg/ml** ، إلا أن كلاهما كان أقل فعالية من مستخلص ***M.indicus***، وخاصة الكلوروفورمي، الذي تفوّق من حيث التأثير السام بوضوح. تشير

هذه النتائج إلى أن فعالية المستخلصات النباتية تعتمد بشكل كبير على تركيبتها الكيميائية المتوازنة، إضافة إلى استهدافها الدقيق للمسارات الخلوية، ما يعزز استخدامها المحتمل كمساعد في علاج السرطان.

3-6 نتائج التدفق الخلوي :

3-6-1 نتائج تحليل الدارة الخلوية :

تمت معالجة الخلايا السرطانية **Hela** بتركيزين لكل نوع ***M.albus***35,40µg/ml و ***M.officinalis*** 35,50µg/ml لمدة **72** ساعة حيث يظهر الشكل 50 نتائج تأثير المستخلصين على أدوار الدارة الخلوية.



	control	M.albus 35µg/ml	M.albus 40µg/ml	M.officinalis 35µg/ml	M.officinalis 50µg/ml
G1	68.07	68.53	59.65	67.92	66.45
S	15.21	17.96	27.21	19.14	22.45
G2/M	16.73	13.51	13.13	12.95	11.1

الشكل (50) يوضح تأثير المستخلصين للنوعين المدروسين على أطوار الدارة الخلوية لخلايا سرطان **Hela**

لم يظهر انخفاض ملحوظ في نسبة الخلايا بالمرحلة **G1** مقارنة بالشاهد، باستثناء مستخلص ***M.albus*** عند تركيز **40µg/ml**، حيث انخفضت النسبة من 68.07% إلى 59.65%، مما يشير إلى قدرته على محاصرة الخلايا في الطور **S** وتعطيل السيطرة على بداية دورة الخلية.

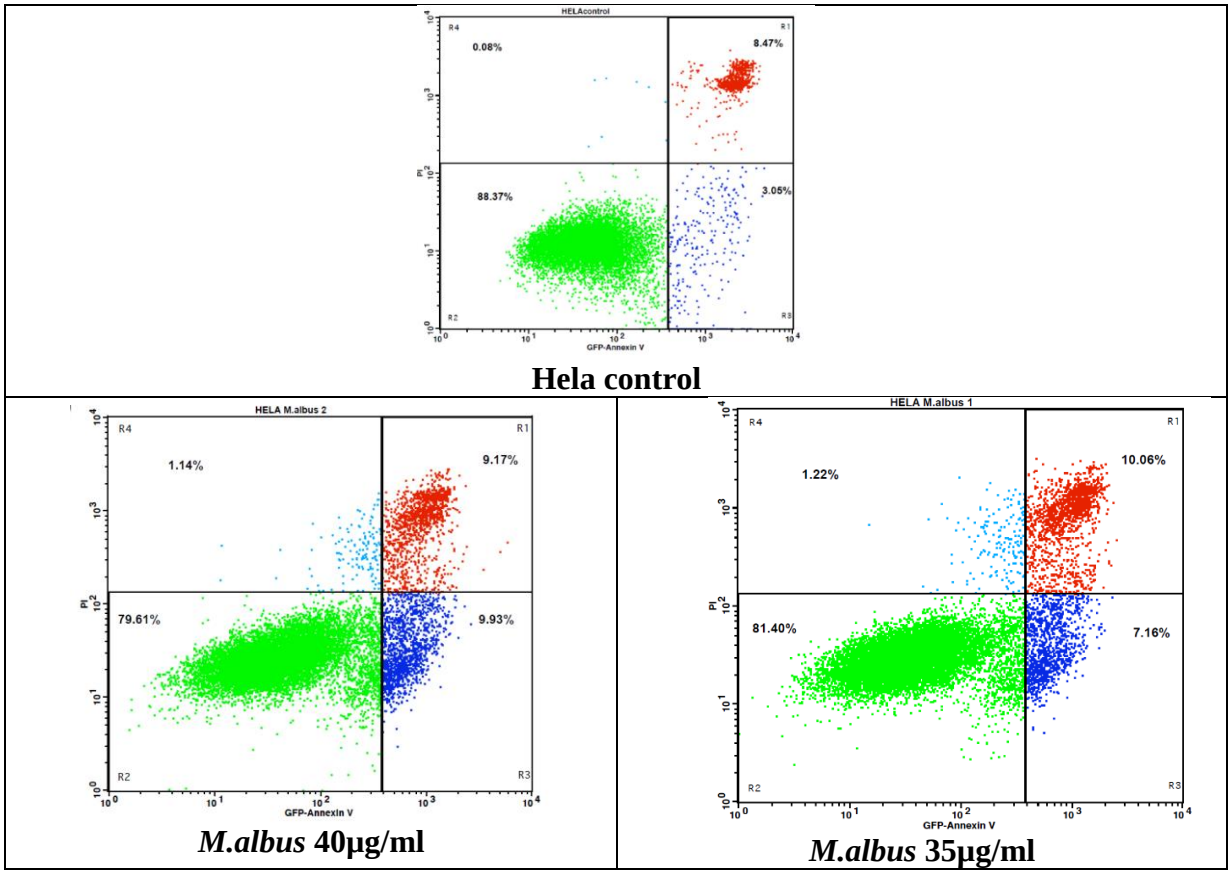
أظهر ***M. albus*** عند التركيز ذاته **35µg/ml** زيادة كبيرة في الخلايا بالمرحلة **S** 27.21% مقارنة بالشاهد 15.21%، بينما حقق ***M.officinalis*** عند تركيز **50 µg/ml** زيادة أقل من ***M.albus*** 22.45%. تعكس هذه النتائج محاصرة الخلايا في الطور (**S-phase arrest**) ومنع تقدم الخلايا إلى **G2/M**.

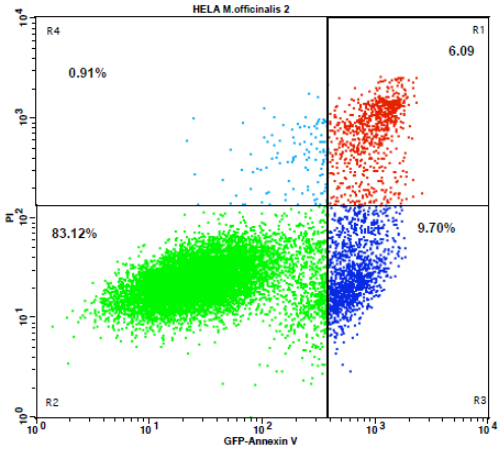
بنفس الوقت يلاحظ في كلا التركيزين انخفاض نسبة الخلايا في G0/G1و في G2/M

بالمجمل، كان ***M.albus*** عند تركيز **40µg/ml** أكثر فعالية في تثبيط دورة الخلية، بينما أظهر ***M.officinalis*** تأثيراً أقل نسبياً.

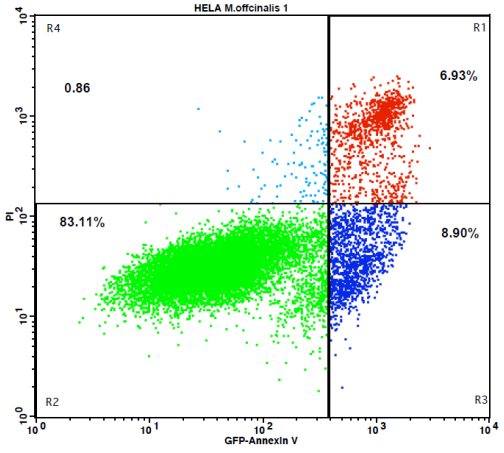
3-6-2 نتائج اختبار Annexin V/Pi لتقدير الموت الخلوي Apoptosis :

تمت معالجة الخلايا لمدة 72 ساعة باستخدام تراكيز **µg/ml** 35,40 لنوع ***M.albus*** وتراكيز **µg/ml**35,50لنوع ***M.officinalis***، ثم أجري تحليل العينات باستخدام اختبار الوسم الثنائي **Annexin V/Pi** لتقدير النسب المئوية للخلايا الحية،والخلايا الميتة نتيجة الموت المبرمج(**Apoptosis**)، والخلايا الميتة بسبب التنخر(**Necrosis**).





***M.officinalis* 50µg/ml**



***M.officinalis* 35µg/ml**

تمثيل نقطي لنسب الخلايا الحية والموت المبرمج بتراكيز مختلفة لنوعي للحندقوق مدة **72**ساعة حيث يمثل **R1** الخلايا الخاضعة للموت المبرمج، **R2** الخلايا الحية، **R3** الخلايا في الموت المبرمج المبكر، **R4** الخلايا التي ماتت بالتنخر.

الشكل (51) تمثيل نقطي لنسب الخلايا الحية والميتة **(PCD)** لخلايا **HELA**بتغير تراكيز النوعين مقارنة بالشاهد

فعند مقارنة تأثير مستخلصي ***M.albus*** و***M.officinalis*** على خلايا **Hela** مع الشاهد**(Control)** ، أظهرت النتائج تبايناً واضحاً في الفعالية بين المستخلصين. في حالة الشاهد، بلغت نسبة الخلايا الحية **88.37%** مع نسب منخفضة لكل من الموت المبرمج المبكر **(8.47%)** والموت المبرمج المتأخر **(3.05%)**، مما يعكس غياب التأثير السام.

بالنسبة لمستخلص ***M.albus***، عند تركيز **µ35g/ml** ، انخفضت نسبة الخلايا الحية إلى **81.40%**، بينما ارتفعت نسب الموت المبرمج المبكر **(10.06%)** والمتأخر **(7.16%)** ، مما يشير إلى فعالية ملحوظة في تحفيز موت الخلايا. عند زيادة التركيز إلى **40µg/ml**، لوحظ انخفاض إضافي في نسبة الخلايا الحية إلى **(79.61%)**، مع ارتفاع كبير في نسبة الموت المبرمج المتأخر **(9.93%)** ، مما يعكس أقوى تأثير بين جميع التراكيز المدروسة.

أما مستخلص ***M.officinalis***، فقد أظهر تأثيراً أقل مقارنة بـ ***M.albus*** عند تركيز **35µg/ml**، بلغت نسبة الخلايا الحية **(83.11%)**، مع نسب متوسطة لكل من الموت المبرمج المبكر **(6.93%)** والمتأخر **(8.90%)**، عند زيادة التركيز إلى **50µg/ml**، لم تظهر تغييرات كبيرة، حيث بلغت نسبة الخلايا الحية **83.12%**، مع ارتفاع طفيف في الموت المبرمج المتأخر **(9.70%)**.

بالمقارنة مع الشاهد، أثبت ***M.albus*** عند تركيز **40µg/ml** أنه الأكثر فعالية في تقليل نسبة الخلايا الحية وتحفيز الموت المبرمج، خاصة الموت المتأخر، مما يجعله الخيار الأكثر تأثيراً في تثبيط نمو خلايا **Hela** في المقابل، كان تأثير ***M.officinalis*** أقل وضوحاً وأقرب إلى نتائج الشاهد، مما يشير إلى فعالية محدودة نسبياً.

إن مستخلص ***M.albus*** يحتوي على تركيزات عالية نسبياً من حمض الأسكوربيك والغاليك، وهي مركبات معروفة بقدرتها على تحفيز الموت المبرمج للخلايا السرطانية من خلال تأثيراتها المضادة للأكسدة. كما يحتوي أيضاً على تراكيز معتدلة من الكومارين، الكاتشين، حمض الفيروليك، والكيرسيتين، وهذه المركبات قد تعمل بشكل تآزري لتعزيز تأثير تحفيز الموت المبرمج للخلايا (**Apoptosis**) في خلايا **Hela** قد يكون الفعل التآزري بين هذه المركبات في مستخلص ***M.albus*** هو السبب في فعاليته العالية في قتل الخلايا السرطانية.

في المقابل، يحتوي مستخلص ***M.officinalis*** على تركيزات عالية من الكومارين والكيرسيتين، لكن تأثيره في تحفيز الموت الخلوي لم يكن بنفس القوة. قد يعود ذلك إلى أن التراكيز العالية من الكومارين والكيرسيتين قد تتداخل مع تأثيرات مركبات أخرى في المستخلص، مما يؤدي إلى تقليل فعاليته في تحفيز الموت المبرمج.

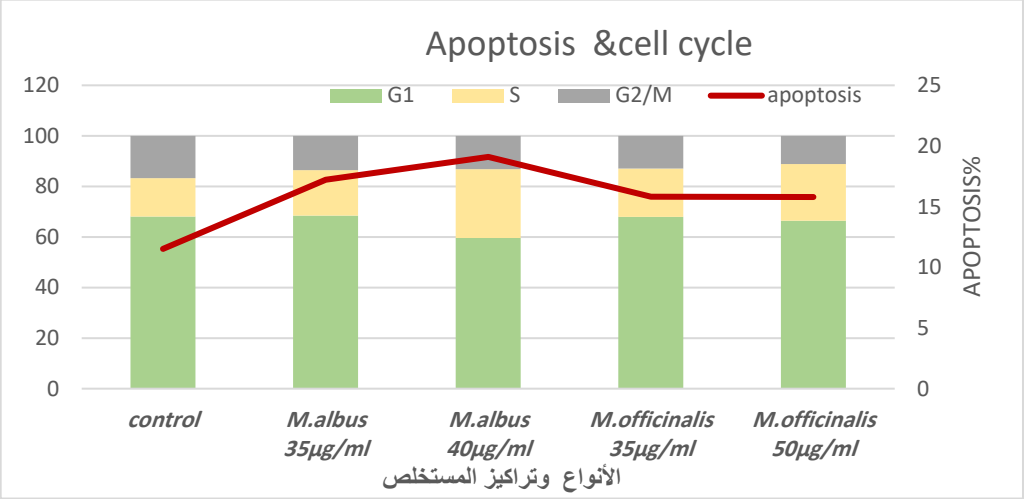
بالإضافة إلى ذلك، من الممكن أن التراكيز العالية نسبياً من الكومارين والكيرسيتين قد تؤدي إلى تأثير سام على خلايا **Hela**، مما يعوق تأثيرهما المفيد في تحفيز الموت الخلوي. الجدول (37)

الجدول (37) %PCD في تراكيز المستخدمة لنوعي الحندقوق ($p<0.05$)

التركيز	%PCD
الشاهد	11.52%
M.albus 35µg/ml	17.22%
M.albus 40 µg/ml	19.1%
M.officinalis 35µg/ml	15.83%
M.officinalis 50µg/ml	15.79%

يوضح الجدول (37) أن ***M.albus*** أظهر فعالية أكبر في تحفيز الاستماتة، خاصة عند التركيز **40 µg/ml** حيث بلغت نسبة الاستماتة **19.1%**، مما يعكس تأثير المركبات الفعالة مثل **Gallic Acid.** (**jaing *et al.*, 2022**) وتأثير التركيز المعتدل من الكيرسيتين والكومارين. بينما أظهر ***M.officinalis*** تأثيراً معتدلاً على الاستماتة مع عدم وجود زيادة كبيرة مع زيادة التركيز.

ولفهم أعمق لقدرة المستخلصات على تثبيط خلايا سرطان **Hela**، تم تحليل عامل الارتباط بين نتائج نسبة الموت المبرمج ونتائج دراسة الدورة الخلوية، مما يساهم في توضيح آلية تأثير المستخلصات على نمو الخلايا السرطانية وتثبيطها.



الشكل (52): مخطط يمثل الارتباط بين أطوار دورة الخلية والموت المبرمج تبعا لتراكيز النوعين

يظهر الشكل (52) توزيع الخلايا في مراحل دورة الخلية(**G1** ، **S**، **G_2/M**) مع قياس معدلات حدوث الاستماتة (**apoptosis**) تحت تأثير مركبات مستخلصة من نباتين ***M.albus*** و ***M.officinalis*** عند تركيزات مختلفة مقارنةً بالمجموعة الشاهدة (**Control**) حيث كانت نسبة الموت المبرمج نسبة منخفضة طبيعية يرافقه توزع طبيعي لدورة الخلية حيث النسبة الأكبر من الخلايا في المرحلة **G**.

وعند معالجة الخلايا بمستخلص ***M.albus*** بتركيز الأول **35µg/ml** لوحظ زيادة في المرحلة **G1**، مع ارتفاع طفيف في نسبة الخلايا بمرحلة **S**(اللون الأصفر) ومرحلة **G2/M**.مع زيادة نسبية في معدل الموت المبرمج مقارنة بالشاهد، وفي التركيز **40 µg/ml** ازدادت الخلايا بشكل واضح في المرحلة **S** مما يشير إلى توقف في دورة الخلية عند مرحلة النسخ **DNA**، مع تسجيل النسبة الأعلى في الموت المبرمج مقارنة بالتراكيز. أما عند اختبار مستخلص ***M.officinalis*** لوحظ تراجع في نسبة الخلايا **G1** وزيادة طفيفة في الخلايا عند **G2/M, S**، أما عند التركيز **50µg/ml** فتمت ملاحظة استقرار في التوزيع بين مراحل دورة الخلية مقارنة بالتركيز وانخفاض طفيف في معدل الموت المبرمج مقارنة بالتركيزات.

يشير هذا المخطط إلى أهمية تقييم التأثيرات المعتمدة على الجرعة لكل مستخلص لدراسة فعاليته كعلاج مضاد للسرطان حيث يبدو ***M.albus*** أكثر تأثيراً في تحفيز الاستماتة خاصة عند تركيز **40 µg/ml**، مع تعطيل دورة الخلية بشكل ملحوظ في المرحلة **S**، بينما كان ***M.officinalis*** تأثير أقل شدة.

وتم دعم هذه الملاحظات بتحليل معامل بيرسون الذي كشف عن علاقة عكسية قوية ذات دلالة إحصائية بين نسبة الخلايا في طور **G1** ونسبة**Apoptosis (r = -0.91, p = 0.012)** ، بالإضافة إلى علاقة طردية معتدلة ودالة بين **G2/M**و**Apoptosis (r = 0.75, p = 0.048)**، بينما لم تظهر العلاقة بين طور **S** و **Apoptosis** أي دلالة معنوية **(r = 0.22, p = 0.60).**تعزز هذه النتائج فرضية أن تثبيط تقدم الخلايا في أطوار محددة من الدورة الخلوية قد يسهم في زيادة فعالية المستخلصات النوعية في تحفيز مسارات الموت المبرمج في الخلايا السرطانية.

في دراسة **(Bashir *et al*., 2022)** لتأثير المستخلص الإيتانولي ***M.indicus*** على سرطان الجلد المستحث بواسطة **DMBA** أظهرت الدراسة تأثيراً مضاداً للأكسدة معتدلاً**(IC50 = 93.55 ± 5.59 µg/mL)** ، بالإضافة إلى تأثيرات تآزرية مع الكيرسيتين والكومارين في تقليل نمو الورم وتحسين بنية الجلد في نموذج سرطان الجلد. مما يعكس قدرة ***M. indicus*** على التأثير على مسارات الالتهاب والنمو السرطاني.

في المقابل، أظهرت دراسة ***M. albus*** تأثيراً قوياً على خلايا **Hela**(سرطان عنق الرحم)، حيث أظهرت زيادة في نسبة الخلايا في مرحلة **S** من دورة الخلية عند التركيز **40µg/ml** ، مما يشير إلى توقف في عملية نسخ الـ **DNA**، مما يعكس تأثيراً قوياً على دورة الخلية وزيادة في معدل الموت المبرمج. بينما كانت تأثيرات ***M. officinalis*** معتدلة أكثر، حيث أظهرت تأثيراً أقل وضوحاً في تعطيل دورة الخلية، مع زيادة طفيفة في الخلايا في مراحل **S**و **G2/M**، مما يشير إلى تأثير أقل شدة على تكاثر الخلايا السرطانية بالمقارنة مع ***M. albus***.

بالمقارنة بين الأنواع وباختلاف نوعية المذيب، ونوع الخلايا المستهدف للاختبار، يمكن القول إن ***M. indicus***يظهر تأثيراً واسعاً على أنواع مختلفة من السرطان، سواء في الجلد أو الكبد، مع قدرات ملحوظة في تقليل نمو الأورام والتأثير على مسارات الالتهاب، مما يضعه في موضع قوة من حيث تأثيراته العلاجية المحتملة.

وأن ***M. albus*** و ***M. officinalis*** كان لهما تأثيرات ملحوظة على خلايا **Hela**، إلا أن ***M. albus*** كان أكثر قوة في التأثير على دورة الخلية وزيادة الاستماتة مقارنةً بـ ***M. officinalis***، مما يبرز الفروق في فعالية المستخلصات النباتية عبر أنواع السرطان المختلفة.

الاستنتاجات:

- بينت شجرة القرابة بين الأنواع المدروسة من خلال العقدة (1) أعلى درجة قرابة وذلك بين النوعين ***M. officinalis, M. albus*** بنسبة تشابه 0.500.
- أظهرت الدراسة المورفولوجية للأزهار والأوراق والقرون وجود فروق معنوية بين الأنواع ليسهل تمييزها في الحقل.
- بناءً على الدراسة المورفولوجية الدقيقة للبذور من حيث الحجم والشكل والتزيينات الخارجية على السطح ووجود اختلافات معنوية واضحة تم التأكيد هذا المعيار كمعيار تصنيفي هام لتمييز الأنواع.
- قدمت الدراسة مفتاح تصنيفي مورفولوجي يسهل التعرف اليها والوصول للأنواع الخمسة المدروسة حقلياً.
- تشابهت الأنواع في الشكل العام للأزهار واختلفت في المعايير الدقيقة لطول وشكل العلم، طول الزورق بالنسبة للعلم حيث كان طول الزورق في النوع ***M.sulcatus*** أطول من العلم بحيث يتجاوزه.
- وتشابهت أنماط المسام في جميع الأنواع (المتباين، الشاذ) واختلفت في عدد المسام فكان أكثرها عدداً في النوع ***M.indicus*** وأقلها عدداً في النوع ***M.segetalis*** كذلك اختلفت بأبعاد الخلية السمية (طول، عرض ونسبتيهما) أعطت جميعها فروقاً معنوية مميزة للأنواع.
- وتميز المقطع العرضي النوع ***M.officinalis*** بثمانية نتوءات خلافاًعن بقية الأنواع. وأعطت وبينت النتائج التشريحية وجود فروقاً معنوية من حيث عدد طبقات الكولانشيم الزاوي، والبرانشيم والسكلرانشيم المحيط بالحزمة الوعائية وتفوق النوع ***M.segetalis*** في عدد هذه الطبقات.
- كان النوع ***M.indicus*** غناً بالمركبات الكيميائية في اختبارات الكشف الكيفي (فينولات، قلويدات، تربينات...) وبينما كان النوع الأقل غنى بهذه المركبات ***M.sulcatus***
- إن مستخلصات الأنواع ***M.officinalis، M.albus،M.indicus*** هي الأغنى في محتواها الكلي من الفلافونوئيدات والفينولات على التوالي. كذلك اظهر ***M.sulcatus***المحتوى الأعلى للفينولات في المستخلصات الإيتانولية 70%.

- أغنى الأنواع بالكومارين هو ***Melilotus officinalis***، حيث سجل أعلى تركيز في جميع المستخلصات، خاصةً في المستخلص الإيتانولي 70% **mg/g** 18.48. يليه ***Melilotus segetalis*** **mg/g**9.09 في المستخلص المائي) ثم ***Melilotus indicus*** **mg/g** 10.09 في المستخلص الميتانولي)، والمستخلص الإيتانولي 70% (**EtOH70%**) هو الأفضل لاستخلاص الكومارين، يليه الميتانولي (**MeOH**)، بينما كان المائي الأقل كفاءة.
- المستخلص الميتانولي الأكثر فعالية كمضاد للتأكسد تبعاً لاختباري **DPPH,ABTS** في معظم الأنواع النباتية، وكان النوع ***Melilotus indicus*** الأكثر فعالية نسبياً مما يشير غناها بالمركبات الفعالة المضادة للتأكسد في المقابل كانت المستخلصات المائية أقل فعالية مما يؤكد ذوبان المركبات الفعالة المضادة للتأكسد يكون أفضل بالمذيبات العضوية. بالمقابل وتبعاً لاختبار **ABTS** أبدت الأنواع ***Meliltous albus, M.sulcatus***، الفعالية الأكبر كمضادات تأكسد حيث سجلا أقل قيم **IC50**، ممايشير إلى قدرتهما العالية في إزالة الجذور الحرة.
- أظهرت نتائج **HPLC** أن جميع الأنواع في المستخلصات الإيتانولية 70% لجميع الأنواع المدروسة غناها بالمركبات الفينولية وأغناها هو ***M.officinalis*** يليه ***M.indicus*** ثم ***M.albus*** ليكون الأقل هو ***M.segetalis***
- بالرغم من غنى ***M.officinalis*** بالمركبات ولكنه أظهر قدرة أقل من ***M.albus ,M.indicus*** في تثبيط نشاط أنزيم **XO** في الخلاصتين الميتانولية والإيتانولية ورغم ذلك فقد كان الأفضل مقارنة بالمركب المرجعي **Alluperinol**.
- كذلك أظهر ***M.albus*** فعالية عالية في سميته الخلوية لخلايا سرطان عنق الرحم **Hela** عن طريق تعزيزه للموت الخلوي المبرمج، وعن طريق توقيف الخلايا في الطور **S** وهو الطور الذي يحدث فيه تضاعف لـ **DNA** وبالتالي تثبيط حياة الخلايا السرطانية.

التوصيات:

- دعم الدراسات المورفولوجية بدراسات دقيقة تعتمد على المجهر الالكتروني خاصة صفات القرون والبذور واستكمال الفجوات لتأكيد التصنيف الدقيق للجنس مما يضيف أهمية كبيرة للفلورا السورية.
- الاهتمام بالدراسات الكيميائية لجنس الحندقوق لما له من أهمية طبية والذي يعد كمصدر هام للكومارين ذو استخدامات صناعية وغذائية وعلاجية هامة.
- إجراء الدراسة بالمجهر الالكتروني الماسح للأوبار والثغور وبالمجهر الالكتروني النافذ لمقاطع الورقة والساق بالمجهر الالكتروني لمعرفة تفاصيل أكثر وضوحا التي قد تميز الأنواع.
- دعم هذه الدراسات بالدراسات الجزيئية وربطها بالدراسات الأخرى.
- ربط هذه الأبحاث بالمعايير الأخرى المميزة لأفراد النوع الواحد ودراسة متغيراتها في مستوى البيئة والظروف المحيطة فيها.
- يُنصح بالتعمق في الآليات الجزيئية التي تقف وراء تأثير هذه المستخلصات على دورة الخلية والموت المبرمج، مما قد يسهم في فهم أفضل لكيفية استخدامها في العلاجات المستهدفة.
- إجراء دراسات سريرية على الحيوانات المخبرية أولاً ثم على اختبارها على البشر.
- استخدام المستخلصات الميثانولية: نظراً لفعاليتها العالية، خاصةً مستخلص ***M.albus*** الميتانولي الذي أظهر قيمة **IC50** منخفضة مما يشير إلى قدرته الكبيرة على تثبيط أنزيم **XO**
- تطوير أدوية طبيعية: الاستفادة من هذه المستخلصات في تطوير علاجات طبيعية لخفض مستويات حمض البول في الدم، مما قد يساهم في الوقاية والعلاج من الأمراض المرتبطة بارتفاعه، مثل النقرس.
- إجراء دراسات سريرية: لتأكيد فعالية وسلامة هذه المستخلصات في البشر، وضمان إمكانية استخدامها كبدائل أو مكملات للعلاجات التقليدية.

- تطوير علاجات محتملة: نظراً للفعالية الملحوظة لمستخلص ***M.albus*** في تثبيط نمو خلايا **Hela** وتحفيز الموت المبرمج، يُوصى بإجراء دراسات إضافية لتحديد المركبات النشطة المسؤولة عن هذا التأثير وتطويرها كعلاجات محتملة لسرطان عنق الرحم.

المراجع:

1. **Abid, R., Ali, S. A., Saeed, E., Munir, I., Hashemi, S. U., Ather, A., Qaiser, M.(2108). Chemotaxonomy And Seed Morphological Studies Of The Genus Melilotus Mill. From Pakistan. Pak. J. Bot. 50(2): 575-578**
2. **Adachi, T., Fukushima, T., Usami, Y. & Hirano, K. (1993) Biochem. Adachi, T., Fukushima, T., Usami, Y. And Hirano, K., 1993. Binding Of Human Xanthine Oxidase To Sulphated Glycosaminoglycans On The Endothelial-Cell Surface.Biochem., .,Vol. 40: Pp344-348.**
3. **Ahmad Khalid,Khan Mir Ajab, Ahmad AQ Musht, Shaheen Nighat And Nazir Abdul (2010). Taxonomic Diversity In Epidermal Cells Of Some Sub-Tropical Plant Species. International Journal Of Agricultur& Biology, Vol. 12.Pp.115-118**
4. **Ahmed Omer H, Maha N Hamad, Noor S Jaafar.2017. Phytochemical Investigation Of Chenopodium Murale (Family: Chenopodiaceae) Cultivated In Iraq, Isolation And Identification Of Scopoletin And Gallic Acid. Asian J Pharm Clin Res Vol 10, Issue 11, 2017.**
5. **Ahmed SA-K., Al Refai M. (2014). Chemical Constituents And Cytotoxic Activities Of The Extracts Of Melilotus Indicus. Eur J Chem,5(3),503–506**
6. **Ajibade Ajayi I. A., O. And Oderinde R. A.2011. Preliminary Phytochemical Analysis Of Some Plant Seeds. Journal Of Chemical Sciences. Vol. 1(3).Pp:58-62.**
7. **Al Sherif, E. A., 2009. Melilotus Indicus (L.) All., A Salt-Tolerant Wild Leguminous Herb With High Potential For Use As A Forage Crop In Salt-Affected Soils. Flora, 204: 737–746**
8. **Al-Ani Rana R, Haleem Azhar M. (2014). Phytochemical Analysis Of Some Iraqi Medicinal Plants. World Journal Of Pharmaceutical Sciences.Vol. 2(12) .Pp: 1837-1840**
9. **Alhafez Maysoon, Kheder Fadi And Aljoubbeh Malak.2014. Polyphenols, Flavonoids And (-)-Epigallocatechin Gallate In Tea Leaves And In Their Infusions Under Various Conditions. Nutrition & Food Science. Vol. 44 Iss 5 Pp. 464-47**
10. **Al-Joboury Khansaa Rasheed, Gatea Lubab Al-Azerg, Aliwy Sukeyna Abass, (2017). Morphological Anatomical And Numerical Taxanomy Studies For Some Species Of Fabaceae Family . Journal Of Biodiversity And Environmental Sciences Vol 11 P 117123.**

11. **Al-Joboury Khansaa Rasheed, Gatea Lubab Al-Azerg, Aliwy Sukeyna Abass, Chamberlain DF (1970) Melilotus L. In: Davis PH (Ed) Flora Of Turkey And The East Aegean Islands, Vol 3. Edinburgh Univ. Press, Edinburgh, Pp 448-452.**
12. **Al-Snafi AE. 2019.Chemical Constituents And Pharmacological Effects Of Lepidium Sativum- A Review. International Journal Of Current Pharmaceutical Research; Vol11(6):Pp1-10 .**
13. **Anand ،Preetha Kunnumakara ،Ajaikumar B.؛ Sundaram ،Chitra؛ Harikumar ، Kuzhuvelil B.؛ Tharakan ،Sheeja T.؛ Lai ،Oiki S.؛ Sung ،Bokyung؛ Aggarwal ،Bharat B. (20089). "Cancer Is A Preventable Disease That Requires Major Lifestyle Changes". Pharmaceutical Research.Vol 2–2097**
14. **Arbyn M., E. Weiderpass, L. Bruni, S. De Sanjos´E, M. Saraiya, J. Ferlay, F. Bray, Estimates Of Incidence And Mortality Of Cervical Cancer In 2018: A Worldwide Analysis, Lancet Global Health (2020),**
15. **Ashraf izadwh Milad,Ali Zarrabi, Sepdeh Mirzaei, Farid Hashemi Et Al., .(2021).Gallic Acid For Cancer Therapy: Molecular Mechanisms And Boosting Efficacy By Nanoscopical Delivery. Food & Chemical Toxicology. Vol 157.Pp1-4.**
16. **Balamurugan Vishnu, Fatima M A Sheerin, Sreenithi Velurajan.2019. A Guide To Phytochemical Analysis. .International Journal Of Advance Research And Innovative Ideas In Education .Vol.5.Pp 2395-4396**
17. **Bandel Gerhard (1974). Chromosome Numbers And Evolution In The Leguminosae.Caryologia. Vol27.Pp:7-32**
18. **Bare, Janet E. 1979. Wildflowers And Weeds Of Kansas. Lawrence, KS: The Regents Press Of Kansas. P 509**
19. **Bashir Asiya, Muhammad Asif, Malik Saadullah, Mohammad Saleem, Syed Haroon Khalid , Liaqat Hussain, Ikram Ullah Khan, Hafiza Sidra Yaseen, Hafiz Muhammad Zubair, Muhammad Usman Shamas, Raghdaa Al Zarzour, Tahir Ali Chohan.(2022). Therapeutic Potential Of Standardized Extract Of Melilotus Indicus (L.) All. And Its**

Phytochemicals Against Skin Cancer In Animal Model: In Vitro, In Vivo, And In Silico Studies. Acs Omiga Pubmed.; Vol.7(29) Pp:25772–25785

20. **Boguslav Kurlowich, 1995. The gene bank and breeding of grain legumes (lupine, vetch, soya and beah) / B.S. Kurlovich and S.I. Repyev (Eds.), - St. Petersburg, The N.I. Vavilov Institute of Plant Industry, 438p**
21. **Borhani,Gelareh Masumeh Mazandarani, Hosein Abbaspour.2023..Antioxidant, Antibacterial Activity, Ethnopharmacology, Phytochemical in Different Extracts of Melilotus officinalis L. as an Anti-infection and Anti-diabetic in Traditional Uses of Two Northern Provinces From Iran Crescent Journal of Medical and Biological Sciences.pp1-9**
22. **Bradford K, Shih DQ (2011). Optimizing 6-mercaptopurine and azathioprine therapy in the management of infammatory bowel disease. World J Gastroenterol, vol17, pp4166-73.**
23. **Braga Pier Carlo, Sasso Monica Dal, Norma Lattuada, Laura Marabini, Rossella Calò, Raffaella Antonacci, Aldo Bertelli, Mario Falchi1 and Paola Verducci .(2013). Antioxidant activity of Melilotus officinalis extract investigated by means of the radical scavenging activity, the chemiluminescence of human neutrophil bursts and lipoperoxidation assay journal of Medicinal Plants. Vol. 7(7), pp. 358-365**
24. **Bray, R.C.; Meriwether, L.S. 1966. Electron spin resonance of xanthine oxidase substituted with molybdenum-95. Nature, vol212,pp467–469**
25. **Brown Joel S, Sarah R. Amend, Robert H. Austin, Robert A. Gatenby, Emma U.Hammarlund and Kenneth J. Pienta.2023. Updating the definition of cancer. American Association for Cancer Research**
26. **Burmeister Carly A., Saif F. Khan Georgia Sch¨afer, Nomonde Mbatani, Tracey Adams, Jennifer Moodley, Sharon Prince .2022. Cervical cancer therapies: Current challenges and future perspectives. Tumour Virus Research. 13 (2022) . PP:1-10**
27. **Cancer. Www.who.int. Archived from the original on 2020-03-08. Retrieved 2020-03 27.**
28. **Cancer receache uk .https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancer-starts/types-of-cancer.2023**
29. **Cappola, T.P., Kass, D.A., Nelson, G.S., Berger, R.D., Rosas, G.O., Kobeissi, Z.A., Marban, E. And Hare, J.M., 2001. Allopurinol improves myocardial efficiency in patients with idiopathic dilated cardiomyopathway. Circ.vol 104: pp.2407-2411.**

30. **Chorepsima Stamatia, Konstantinos Tentolouris,Dimitrios Dimitroulis, Nikolaos Tentolouris .(2013).journal of herbal. Medicine . Melilotus: Contribution to wound healing in the diabetic foot.vol.3.pp.81-86**
31. **Chorepsima, S.; Tentolouris, K.; Dimitroulis, D.; Tentolouris, N. 2013. Melilotus: Contribution to Wound Healing in Diabetic Foot. J. Herb.Med, vol 3, pp 81–86.**
32. **Christenhusz, M. J. and Byng, J. W.(2016). The number of known plants species in the world and its annual increase. Phytotaxa 261(3): 201-217.**
33. **Cohen P.A., A. Jhingran, A. Oaknin, L. Denny, Cervical cancer, Lancet (2019)**
34. **Cornara L, Xiao J, Burlando B. 2016Therapeutic Potential of Temperate Forage Legumes: A Review. Crit Rev Food Sci Nutr.; vol 56.pp 149-161**
35. **Crosbie E.J, M.H. Einstein, S. Franceschi, H.C. Kitchener, Human papillomavirus and cervical cancer, Lancet (2013),**
36. **Derakhshan, M.A.; Nazeri, N.; Khoshnevisan, K.; Heshmat, R.; Omidfar, K. Three-2022.Layered PCL-Collagen Nanofibers Containing Melilotus Officinalis Extract for Diabetic Ulcer Healing in A Rat Model. J. Diabetes Metab. Disord.,vol 21, pp313–321**
37. **Diggs, George M., Jr.; Lipscomb, Barney L.; O'Kennon, Robert J. 1999. Illustrated flora of north-central Texas. Sida Botanical Miscellany, No. 16. Fort Worth, TX: Botanical Research Institute of Texas. P 1626**
38. **Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death.2012;149:1060–72**
39. **Dixon, M.; Thurlow, S. 1924. Studies on xanthine oxidase. I.Preparation and properties of the active material. Biochem.vol, 18,pp971–975**
40. **Dordzhieva V. I., Voloshina T. V., and K. S. Ochirova(,2019) Morphological and Physiological Characteristics of the Representatives of Melilotus Albus and Melilotus Officinalis, Growing on the Territory of Kalmykia,knowledgeE.pp877-883**
41. **Duke, J. A., 1981. Handbook of legumes of world economic importance. Plenum Press, New York, USA, pp 345.**
42. **E.J. Crosbie, M.H. Einstein, S. Franceschi, H.C. Kitchener, Human papillomavirus and cervical cancer, Lancet 2013**
43. **El-Hafeez Amer Ali Abd, Hazim O Khalifa, Rania Abdelrahman Elgawish , Samia A Shouman, Magdy Hussein Abd El-Twab, Seiji Kawamoto.2018. Melilotus indicus**

extract induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells via a mechanism involving mitochondria-mediated pathways.pub med.vol 70(2): pp831–842.

44. Fitoz, A.; Nazır, H.; Özgür (nee Yakut), M.; Emregül, E.; Emregül, K.C. 2018, An experimental and theoretical approach towards understanding the inhibitive behavior of a nitrile substituted coumarin compound as an e_ective acidic media inhibitor. Corros. Sci. vol.131. Pp. 451–464.

45. Frisch, S. M., & Francis, H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. The Journal of Cell Biology,vol 124(4), pp: 619-62

46. Fuchs, M., Hilfiker-Kleiner, D., Hornig, B., Drexeler, H. and Landmesser, U.,

47. Gao Jinhua, Hui Yu, Weikang Guo, Ying Kong, lina Gu, Qi Li, Shanshan Yang, Yunyan Zhang, Yaoxian Wang. 2018. The anticancer effects of ferulic acid is associated with induction of cell cycle arrest and autophagy in cervical cancer cells

48. Gazara Magda, Kamel Wafa and Haider Ashraf, (2001) Cladistic analysis of the genera:Trifolium,Trigonella and Melilotus (Fabaceae: Papilionaceae) in Egypt , Egyptian Journal of Biology, Vol. 3, pp 161-170

49. Gokhan Zengin, Sengul Uysal, Ramazan Ceylan, Abdurrahman Aktumsek .(2015) Phenolic constituent, antioxidative and tyrosinase inhibitory activityof Ornithogalum narbonense L. from Turkey: A phytochemical study. Industrial Crops and Products.vol.70 pp:1-6

50. Gorgorio- Aguade, G., Kauffman, S. & Sole, R. Transit (2021). on Therapy: Tackling the Ecology of Tumor Phenotypic Plasticity. Bull Math Biol 84, 24

51. Griesbach R (2005) Biochemistry and genetics of flower color.Plant Breed vol.25, pp.89–114.

52. Griffin LE, Kohrt SE, Rathore A, Kay CD, Grabowska MM, Neilson AP. 2021. Microbial Metabolites of Flavanols in Urine are Associated with Enhanced Anti-Proliferative Activity in Bladder Cancer Cells In vitro. Nutrition and cancer

53. Gupta M (1977). Vascular anatomy of the flower of melilotus, papilionaceae. Plant sci vol 9 pp 33-36

54. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. 2011 .Hallmarks of cancer: the next generation. Cell vol:144, pp:646-674.

55. Hansen A. (1968) Melilotus. In: Tutin T.G. & al. (eds.), Flora Europaea,. Cambridge University Press, Cambridge. vol 2. PP: 148-150.

56. Harborne J.B., Mabry TJ(1975). The flavonoids.London: Chapman & Hall Ltd.

57. Hasan Mahmudul, Khandaker Atkia Fariha, Zitu Barman, Ananya Dutta Mou, Rakib Miah, Ahsan Habib, Humaira Rashid Tuba & Nurshad Ali.2022. Assessment of the relationship between serum xanthine oxidase levels and type 2 diabetes: a cross-sectional study. Scientific Reports.vol.12pp

58. Hausen H. zur, Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account, Virology (2009),

59. Hoppe HA (1975) Drogenkunde Walter de Gruyter, Berlin, New York Band 1, 8 Auflg, p 700.

60. Ichinose, M., Sugiura, H., Yamagata, S., Koarai, A., Tomaki, M., Ogawa, H., Komaki., Barnes, P.J., Shirato, K. And hattori, T., 2003. Xanthine oxidase inhibition reduces reactive nitrogen species production in COPD airways". Eur. Respir. J.vol 22: pp.457-461.

61. Iftikhar Ahmed H., D., Qamar M.T. (2019). Study of Phytochemicals of Melilotus indicus and Alpha-Amylase and Lipase Inhibitory Activities of Its Methanolic Extract and Fractions in Different Solvents. Chemistry select,vol 4(26),pp7679–7685.

62. Irina Corden , Benea Anna.2023. dentification of chemical compounds in vegetal products of Melilotus mill species. Materialele Conferinței.pp 151-153

63. Isely D (1954) Keys to sweet clovers (Melilotus). Iowa Acad Scien. vol61:pp:119-131

64. Istasse Thibaut, Nicolas Jacquet, Thomas Berchem, Eric Haubruge, Bach Kim Nguyen and Aurore Richel. 2016. Extraction of Honey Polyphenols: Method Development and Evidence of Cis Isomerization. Analytical Chemistry Insights.vol 11pp: 49–57

65. J.R.S. Hoult, Miguel Payá .1996. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential.vol 27. pp: 713-722

66. Jang IT, Hyun SH, Shin JW, Lee YH, Ji JH, Lee JS. 2014. Characterization of an Anti-gout Xanthine Oxidase Inhibitor from Pleurotus ostreatus. Mycobiology. Vol.42(3) pp.296-300

67. Jauzein P. (1995) Flore des champs cultivés. INRA, Paris: p898

68. Jayakumar D, Mary SJ, Santhi RJ. Evaluation of antioxidant potential and antibacterial activity of Calotropis gigantea and Vinca rosea using in vitro model. Indian J Sci Technol. 2010;3:720-723.

69. Jennifer, G.D., Rjashree, R., Linda, B.S. and Anne, M.M., 2005. Chronic xanthine oxidase inhibition prevents myofibrillor protein oxidation and preserves cardia function transgenic mouse model of cardiomyopathy. Am J. Physiol. Heart. Cire.Physiol. 289: pp1518-1518

70. Jiang Yuan , Jin Pei , Yan Zheng , Yu-Jing Miao , Bao-Zhong Duan , Lin-Fang Huang .2022. Gallic Acid: A Potential Anti-Cancer Agent. National library medicine.vol 28(7). pp:661-671.

71. Jorgensen, I., Rayamajhi, M., & Miao, E. A. (2017). Programmed cell death as a defence against infection. Nature Reviews Immunology,vol 17(3), pp:151-16

72. Katz D.H., Marcelletti J.F., Khalil M.H., Pope L.E., Katz L.R. (1991). Antiviral activity of 1-docosanol, an inhibitor of lipid-enveloped viruses including herpes simplex. Proc Natl Acad Sci, vol 88(23),pp:10825–10829

73. Ke dare SB et al . 2011. Genesis and development of dpph methde of antioxidant assay. J food tecnol. Vol:48(4):pp 412-422

74. Kelly E. Heim , Anthony R. Tagliaferro, Dennis J. Bobilya .2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. pubmed. vol13(10)pp:572-584

75. Kerr JF,winterfordcm, Harmon BV1994.Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. Cancer;vol73:2013–26.

76. Khan Ali Barkat and Naveed Akhtar.2012.. Phytochemical analysis and acute toxicity tests of two medicinal plant extracts. Journal of Medicinal Plants Vol. 6(19), pp. 3545-3548.

77. Khan Nadeem Muhammad, Ahmed,Muhstaq Khan Wasim Muhammad, and Khan Ali Rahmat .(2018). in vitro pharmacological effects of astragalus eremophilus and melilotus parviflora. Acta Biologica Hungarica.Vol. 69(4), pp. 411–422

78. Khansaa Rasheed Al-Joboury, Lubab Gatea Al-Azerg, Sukeyna Abass Aliwy (2017) Morphological, anatomical and numerical taxonomy studies for some species of the fabaceae family. journal of Biodiversity and Environmental Sciences Vol. 11, No. 5, p. 117-123

79. Khazaei Poul Y, Majd A, Labibi F, Moini Zanjani T. Cytotoxic effect of methanolic extracts of vegetative and reproductive parts of Vinca rosea on A431, a human skin squamous carcinoma cell line. J Physiol Pharmacol. 2014; 18:364-372

80. Kodama Satoru , Kazumi Saito, Yoko Yachi, Mihoko Asumi, Ayumi Sugawara, Kumiko Totsuka, Aki Saito, Hirohito Sone.2009. Association between serum uric acid and development of type 2 diabetes. Diabetes Care.vol 32, pp:1737–1742.

81. Kolyasnikova Nadezhda Leonidovna .2013. The Flowering and Seed Production Species

82. Kozłowski J, Buchwald W, Forycka A, Szczyglewska D.. Rośliny i surowce lecznicze. wyd. iwnirz.Poznań 2009.

83. Kubrak, K.; Podgorski, R.; Stompor, M. Natural and Synthetic Coumarins And Their Pharmacological Activity. Eur. J. Clin. Exp.Med. 2017, 15, 169–175

84. Kubrak, K.; Podgorski, R.; Stompor, M. Natural and Synthetic Coumarins And Their Pharmacological Activity. Eur. J. Clin. Exp.Med. 2017, 15, 169–175

85. Kumagia, A., Kodama, H., Kumagi, J., Fukuda, J., Kawamura, K., Tanikawa, H., Sato, N. And Tanaka, T., 2006. Xanthine oxidase inhibitors suppers testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptor-chidism. J. Nat. Prod., Vol. 69. Pp.1089-1091

86. Kumagia, A., Kodama, H., Kumagi, J., Fukuda, J., Kawamura, K., Tanikawa, H., Sato,N. and Tanaka, T., 2006. Xanthine oxidase inhibitors suppers testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptor-chidism. J. Nat. Prod., Vol. 69, No.7,pp.1089-1091

87. Liazid Ali, Miguel Palma, Jamal Brigui, Carmelo G. Barroso.2007. Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. Journal of Chromatography. Vol1140, pp, 29-34

88. Liu ShiZuo ShuaiJie Yao, Huan Yang, Shuai,Jie Liuand, YanJiao Wang .2023. Autophagy: Regulator of cell death. Cell Death and Disease (2023) 14:648. pp.1-17

89. Liu Yu-Ting, Pei-Han Gong, Feng-Qin Xiao, Shuai Shao, Da-Qing Zhao,Ming-Ming Yan, and Xiu-Wei Yang.(2018).Chemical Constituents and Antioxidant,Anti-Inflammatory and Anti-Tumor Activities of Melilotus officinalis (Linn.) Pall. Molecules journal. Vol.23.271 pp 1-12

90. Macías F.A., Simonet A.M., Galindo J.C.G., Castellano D.1999. Bioactive phenolics and polar compounds from Melilotus messanensis. Phytochemistry, 50(1),35–46.

91. Mahmoud Y.S.Y.2 A Pharmacognostical Study of Melilotus indicus (L.) All. Growing in Egypt. Faculty of Pharmacy, Cairo, Egypt,

92. Maley, C. C Carlo C Maley , Athena Aktipis , Trevor A Graham , Andrea Sottoriva , Amy M Boddy , Michalina Janiszewska , Ariosto S Silva , Marco Gerlinger , Yinyin Yuan , Kenneth J Pienta , Karen S Anderson , Robert Gatenby , Charles Swanton , David Posada , Chung-I Wu , Joshua D Schiffman , E Shelley Hwang , Kornelia Polyak , Alexander R A Anderson , Joel S Brown , Mel Greaves , Darryl Shibata. 2017. Classifying the evolutionary and ecological features of neoplasms. Nat Rev Cancer vol 17,pp 605-619 .

93. Mcmurry e lemer and fisk l. emma (1936). Vascular anatomy of the seedling melilotus albus .Botanical gazette. Var 1936 pp 121-134.

94. ME Rogers, TD Colmer,K Frost, D Henry, D Cornwall,E Hulm, J. Deretic, SR Hug hes and AD Craig.2008. Diversity in the genus Melilotus for tolerance to salinity and waterlogging.plant and soil.v.304,pp 89-101.

95. Mladenović K. G., Muruzović M. Ž., Stefanović O. D., S. M. Vasić, Ljiljana and R. Čomić. (2016). , antimicrobial, antioxidant, antioxant and Antibiofilm activity of extracts of melilotus officinalis(L). The Journal of Animal & Plant Sciences .vol 26(5) pp: 1436-1444

96. Morsy Nagy,(2014),. Phytochemical analysis of biologically active constituents of medicinal plants. Main Group Chemistry .vol 13,PP:1-7

97. Moussavi SM (2001) Species of Melilotus in Iran (Key to species, descriptions and their distributions). Rostaniha.vol 2 (1-4):pp41-44

98. Mouterde, P..Nouvel le flore du Liban et de la Syrie(1986). 2.Librairie orientale Beyrouth, Liban:265-267.

99. Mradu Gupta, Sasmal Saumyakanti, Majumdar Sohini, Mukherjee Arup.2012. HPLC Profiles of Standard Phenolic Compounds Present in Medicinal Plants. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical.vol. 4(3) pp. 162-167

100. Nabavi SM, Samec D, Tomczyk M, Milella L, Russo D, Habtemariam S. et al. Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering. Biotechnology advances. 2020;38:107316

101. Naz Rabia, Hafsa Ayub, Sajid Nawaz, Zia Ul Islam, Tayyaba Yasmin, Asghari Bano, Abdul Wakeel,Saqib Zia and Thomas H. Roberts.(2017). Antimicrobial activity,

toxicity and anti-inflammatory potential of methanolic extracts of four ethnomedicinal plant species from Punjab, Pakistan. BMC Complementary and Alternative Medicine.pp 17:302

102. NDDB. 2012.National Dairy Development Board, Animal Nutrition Group, Anand, India..

103. Nichols, James T.; Johnson, James R. 1969. Range productivity as influenced by biennial sweetclover in western South Dakota. Journal of Range Management. 22: 342-347.

104. Nogues Isabel, Laura Passatore, Marı´a A´ ngeles Bustamante,Emanuele Pallozzi1, , João Luz, Francisco Traquete, Anto´ nio E. N. Ferreira, Marta Sousa Silva and Carlos Cordeiro. 2023. Cultivation of Melilotus officinalis as a source of bioactive compounds in association with soil recovery practices.Fornties in plant science. Vol 14.pp1-17

105. Oertel, E. (1967). "Nectar and Pollen Plants". US Dep. Agr. Handbook.

106. Oleszek W., Stochmal A. (2002). Triterpene saponins and flavonoids in the seeds of Trifolium species.*Phytochemistry*,vol 61(2),pp165–170

107. Önder, A. Anticancer activity of natural coumarins for biological targets. Stud. Nat. Prod. Chem. 2020, pp.85–109

108. Ouyang, Z.;Wang, Y.; Ma, T.; Kanzana, G.;Wu, F.; Zhang, J. Genome-Wide 2021.Identification And Development Of LTR Retrotransposon based Molecular Markers For The Melilotus Genus. Plants,vol 10,pp 890.

109. Overholtzer, M., Mailleux, A. A., Mouneimne, G., Normand, G., Schnitt, S. J., King, R. W., Cibas, E. S., & Brugge, J. S. (2007). A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. Cell,vol 131(5),pp 966-979

110. Özbek Funda, Mehmet Ufuk Özbek, Murat Ekici (2014).,Morphological, anatomical, pollen and seed morphological properties of Melilotus bicolor Boiss. &Balansa (Fabaceae) endemic to Turkey, Australian Journal of Crop Science AJCS 8(4):543-549

111. Pastorino, G., Marchetti, C., Borghesi, B., Cornara, L., Ribulla, S., and Burlando, B. 2017. Biological activities of the legume crops Melilotus officinalis and Lespedeza capitata for skin care and pharmaceutical applications. Ind. Crops Prod. 96, 158–164Europen medicines Agenrcy- science medicine health 2017

112. Pastura G., Mesiti M., Saitta M., Romeo D. Settineri N., Maisano R., Petix M., Giudice A. (1999)..Lymphedema of the upper extremity in patients operated for carcinoma of the breast: clinical experience with coumarinic extract from Melilotus officinalis. Clin Ter,vol 150(6),pp 403–408

113. Pecorelli S, (2009), Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium, Int. J. Gynaecol. Obstet. 105

114. Perrin, M.; Ramelet, A.A. Pharmacological Treatment of Primary Chronic Venous Disease: Rationale, Results and Unanswered Questions. Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 2011, 41, 117–125.

115. Post E George.(1932). Flora of Syria, palastine and sinai.vol 1 pp347

116. postischemic cardiomyopathway. Circ. Res. 95: pp.1005-1011.

117. Prabhakar, M., 2004. Structure, Delimitation, Nomenclature and classification of Stomata. Acta Botanica Sinica, Beijing, China, Vol. 46, No.2, pp. 242-252.88- Qurashi, S. J., Khan.

118. Procházková D. , BoušováI., Wilhelmová N.(2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. ScienceDirect.vol.82.pp. 513-523.

119. Ragab N.A., Aboutabl E.A., Marzouk M.M., elhalawany A.M., Farghaly A.A., Sleem A.A., elsawi S.A. 2021.Chemical Profiling In Vivo Antioxidant Effect and Antimutagenic Evaluation of Melilotus indicus (L.) All. Extracts. Trop J Nat Prod Res, 5(3),534– 542

120. Ragab N.A., El Sawi S.A., Marzouk M.M., elhalawany A.M., Sleem A.A., Farghaly A.A., Aboutabl EA:2021 Chemical characterization of Melilotus messanensis (L.) All.: Antioxidant, antidiabetic and antimutagenic effects in alloxan induced diabetic rats. Biocatal Agric Biotechnol, 33,

121. Ragab Nermin Ahmed, Ali Mahmoud El Halawany, Salma Ahmed El Sawi, Elsayed Ali Aboutabl and Mona Mohamed Marzouk (2022).. A comparative review on phytochemical constituents and biological effects of Melilotus indicus (L.) All. and Melilotus messanensis (L.) All., (Fabaceae):evidence for chemosystematic analysis. Egyptian Journal of Chemistry. Vol. 65, No. 2 pp. 191- 202

122. Rajesh Shukla, Vikas Pandey, Gautam P. Vadnere Santram Lodhi.2019. Role of Flavonoids in Management of Inflammatory Disorders.sience direct. Vol. Pages 293-322

123. **Raza A., Kamran M., Safdar M.E., Ali H.H., Abbas T., Asif M., Ali L., Rehman A .2019. Management tactics for handling Parthenium hysterophorus in non-native environment through phytotoxic compounds of local species. Int J Agric Biol, 21(1),215–222**

124. **Robledo-O'Ryan, N.; Matos, M.J.; Vazquez-Rodriguez, S.; Santana, L.; Uriarte, E.; Moncada-Basualto, M.;Mura, F.; Lapier, M.; Maya, J.D.; Olea-Azar, C. (2017).Synthesis, antioxidant and antichagasic properties of a selectedseries of hydroxy-3-arylcoumarins. Bioorganic Med. Chem. Lett.,vol 25, pp. 621–632.**

125. **Rogers, M.E.; Colmer, T.D.; Frost, K.; Henry, D.; Cornwall, D.; Hulm, E.; Deretic, J.; Hughes, S.R.; Craig, A.D. 2008.Diversity in The Genus Melilotus For Tolerance to Salinity and Waterlogging. Plant Soil., vol 304,pp 89–101**

126. **Rothmaler.w(1988), Exkurionsflora, Kritischer band. Verlag berlin.v328-336**

127. **Safarpour;Ali Reza Fatemeh Kaviyani; Masood Sepehrimanesh,; Nasrollah Ahmadi; Omid Koohi Hosseinabadi; Nader Tanideh; Najmeh Showraki.(2015).. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Gel and Aqueous Extract of Melilotus officinalis L. in Induced Ulcerative Colitis: A Rattus norvegicus Model. published online vol3(2)pp1-7**

128. **Sagalbekov, U.M., 1996. Genofond Kultury Donnika I Ego Ispolzovanie V Selektsii, M.S. Sweetclover On Plant-Pollinator Community Thesis. Almalyk.**

129. **Saleem M., Asif M., Parveen A., Yaseen H.S., Saadullah M., Bashir A., Asif J., Arif M., Khan I.U., Khan R.U. (2020). Investigation of in vivo anti-inflammatory and anti-angiogenic attributes of coumarin-rich ethanolic extract of Melilotus indicus. Inflammopharmacology,1–13**

130. **Samanta A&, Das G (2011) Roles of flavonoids in plants.Int J Pharm Sci Tech vol.6, pp12–35.**

131. **Saxena V. K., Nigam S (1997). A novel prenylated pterocarpan from Melilotus indica. Fitoterapia,68,403**

132. **Sayed Abdel Kader Ahmed a and Mahmoud Al-Refai.2014. Chemical constituents and cytotoxic activities of the extracts of Melilotus indicus. 5 (3) (2014) 503-506.**

133. **Schepetova E V, N M Abdurakhmanova, N A Lomteva, E I Kondratenko and S K Kasimova.(2021). Pharmacological effects at the chronic administration of Melilotus officinalis L. extract). Earth and Environmental Science.vol.839 pp:1-11**

134. **Scott J. Dixon, Kathryn M. Lemberg, Michael R. Lamprecht,Rachid Skouta, Eleina M. Zaitsev, Caroline E. Gleason, Darpan N. Patel, Andras J. Bauer, Alexandra M. Cantley, Wan Seok Yang, Barclay Morrison III, and Brent R. Stockwell, 2012. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death.cell. Vol.149, pp: 1060–1072.**
135. **Shah sonale, manpree kauk. 2014. Biomarkers and chemopreventives in Oral Carcinogenesis and its prevention. Journal of Oral and Maxillofacial Pathology.vol18(1).pp69-76.**
136. **Shehata a faiza (2018), taxanomic revision of melilotus indicus complex in egybt,taeckhlomia var 38,pp 141-151**
137. **Sheikh N. A., T. R. Desai,r.t patel .(2016). Pharmacognostic Evaluation of Melilotus officinalis Linn.pharmacognosy Journal.vol 8. pp:239-242.**
138. **Sheikh N. A., T. R. Desai. (2017). Phyto-physicochemical and high performance thin layer chromatography investigation of Melilotus officinalis Linn. International Journal of Green Pharmacy . vo1:1 (2) pp.285:291**
139. **Sheshata Faiza.(2018) .taxanomic revision of melilotus indicus.complex in Egypt. Taeckhlomia, vol 38 pp:141-151.**
140. **Sisay Melaku Assefa, Wendimagegn Mammo, Estifanos Ele Yaya.(2021) Chemical Society of Ethiopia and The Authors.phytochmical studies of melilotus officinalis.vol. 35(1), pp:141-150.**
141. **Soni Anjali and Sosa Sheetal .(2013).. Phytochemical Analysis and Free Radical Scavenging Potential of Herbal and Medicinal Plant Extracts Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.;vol: 2 (4)pp: 22-29**
142. **Sonju J. J., Islam MD. F., Sutradhar K., Akter T. (2017). Analysis of phytochemical, antioxidant and microbial property of various extracts of the plant Melilotus indica. World Journal of Pharmaceutical Research, Vol.6, Issue 4, 129-147.**
143. **Sowa P. , D. Grabek-Lejko, M. Wesołowska, S. Swacha, M. Dżugan.2017. Hydrogen peroxide-dependent antibacterial action of Melilotus albus honey. Apptied Microbiology international. Vol 56. pp.82-89**
144. **Sowa, P.; Jarecki, W.; Dz˙ugan, M. 2018Nostrzyk (Melilotus)-Zapomniana Ros´Lina O Duz˙ym Znaczeniu Gospodarczym. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.,V 593,PP 73–85**

145. Sowa-Borowiec, P.; Nagalievska, M.; Piechowiak, T.; Sybirna, N.; d˙zugan, 2023 M. The Phenolic Profile of Rapeseed Honey Enriched with Melilotus Albus Flowers and Its Inhibitory Effect on Rat Platelet Aggregation. Zywnosc Nauk. Technol. Jakosc,vol 4, pp:168–183.

146. Sprent, Janet I. (2009). Legume Nodulation: A Global Perspective. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell. P. 12

147. Stefanovi Olgica D, Jelena D., Ljiljana R. _Comi.(2015). Melilotus albus and Dorycnium herbaceum extracts as source of phenolic compounds and their antimicrobial, antibiofilm, and antioxidant potential. journal of food and drug n analysis s.pp1-8

148. Stevens P. F. 2017 - University of Missouri, St Louis, and Missouri Botanical Garden.

149. Stevenson G.A (1969). An agronomic and taxonomic overview of the genus Melilotus Mill. Can. J. Plant Sc. 49: 1-20.

150. Stuessy, T.F. (1990). Plant Taxonomy to Turkey. Columbia Univ. Press. New York, PP: 514.

151. Stull, L.B., Leppo, M.K., Szweda, L., Gao, W.D. and Marban, E., 2004. Chronic

152. Takahashi A & Ohnishi T (2004) The significance of the study about the biological effects of solar ultraviolet radiation using the exposed facility on the international space station. Biol Sci Space vol.18. pp. 255–260

153. Tan Mei Lan, Jer Ping Ooi, Nawfal Ismail, Ahmed Ismail Hassan Moad,and Tengku Sifzizu Tengku Muhammad. Programmed Cell Death Pathways and Current Antitumor Targets.2009. Pharmaceutical Research, Vol. 26, No. 7,

154. Tarawneh KH. A., SH.. Omar,O. A. Twissi, KH. M. Khleifat,, A. Al-Mustafa and KH. Al-Sharafa.2008. Antifungal and Antioxidant Effects of Extracts of Some Medicinal Plant Species Growing in South Jordan. Vol 59: PP241-248.

155. Ted.nield. 2013.continental divide geological society archived from the original on 3 December

156. ŢÎŢEI Victor.2022. Evaluation Of The Biomass Quality Of White Sweetclover,Melilotus Albus, And Prospects Of Its Use In Moldova. National Botanical Garden.vol 2 pp.305-312

157. Turkmen, N., Velioglu, Y., Sari, F. and Polat, G. (2007).Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. Molecules.. 12 (3): 484–496.,

158. Ukai, T., Cheng, C.P., Tachibana, H., Igawa, A., Zhang, Z.S., Cheng, H.J. and Little, W.C., 2001. Allopurinol enhances the contractile response to dobutamine and exercise in dogs with pacing-induced heart failure. Circ., vol.103: pp.750-755

159. Valter K, Chen L, Kruspig B, et al., 2017Contrasting effects of glutamine deprivation on apoptosis induced by conventionally used anticancer drugs. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res ; 1864(3): 498–506.

160. Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., & Vandenabeele, P. 2014. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. Nature Reviews Molecular Cell Biology,vol 15(2),pp: 135-14

161. Verloove F. & Heyneman G. (2012). Merkwaardige plantencollecties van twee antropogene zaadbanken in GentOost-Vlaanderen, België. Dumortiera vol 100: 19-24

162. Verushkin,Aleksey G Artem Yu Kulikov& Andranik A Kutsanyan.(2021). A validated method for coumarin quantifi cation in Meliloti herba and its ethanolic extracts using micellar thinlayer chromatography. Annals of Advances in Chemistry. Vol5.pp 013-018..

163. Viazzi, F., Leoncini, G., Vercelli, M., Deferrari, G. & Pontremoli, R. (2011).Serum uric acid levels predict new-onset type 2 diabetes in hospitalized patients with primary hypertension: The MAGIC study. Diabetes Care.vol 34, pp126–128

164. Voet, D. and Voet, J.G., 1990. Biochemistry". Jhon Willey and Sons, Inc. U.S.A. 760p.

165. Wang, Y.H.; Avula, B.; Nanayakkara, N.P.D.; Zhao, J.; Khan, I.A. 2013Cassia cinnamon as a source of coumarin in cinnamon-flavored food and food supplements in the United States. J. Agric. Food Chem. Vol 6.pp. 4470–4476

166. Wani Atif Khurshid,Nahid Akhtar,Tahir ul Gani Mir,Rattandeep Singh,Prakash Kumar Jha,Shyam Kumar Mallik,Shruti Sinha,Surya Kant Tripathi,Abha Jain,Aprajita Jha,Hari Prasad Devkota andAjit Prakas.2023. Targeting Apoptotic Pathway of Cancer Cells with Phytochemicals and Plant-Based Nanomaterials.vol. 13,(2)pp:194

167. Westerfieled, W., Richart, D. and Higgins, E., 1959. Further studies with xanthine

168. White C. Roger,T, Vicror Darley-Usmartt, William R. Berrington, Michelle Mcadams, Jeri Z. Gore,.1996.Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits

169. Williams S.D. (1996). Chemistry and Technology of the Cosmetics and Toiletries Industry. Springe Science & Business Media

170. Xu, P.; Meng, M.; Zhang, J. 2024. A Comparative Plastome Approach Enhances the Assessment of Genetic Variation in The Melilotus Genus. BMC Genom,vol 25,pp 556

171. Yadava R.N., Jain S. (2005). A new bioactive flavone glycoside from the seeds of Melilotus indica All.J Asian Nat Prod Res, 7(4),595–599

172. Yahaya, I.; Seferoglu, N.; Sefero˘ glu, Z. (2019). Improved one-pot synthetic conditions for synthesis of functionalized fluorescent coumarin-thiophene hybrids: Syntheses, DFT studies, photophysical and thermal properties. Tetrahedron, pp.2143,2154.

173. Yahfoufi, N.; Alsadi, N.; Jambi, M.; Matar, C. 2018.The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. Nutrients,vol 10, pp1618

174. Yang, Z.; Kinoshita, T.; Tanida, A.; Sayama, H.; Morita, A.; Watanabe, N. (2009). Analysis of coumarin and its glycosidically bound precursor in Japanese green tea having sweet-herbaceous odour. Food Chem., vol.114, pp.289–294.

175. Yen GC, Duh PD, Tsai H L,Huang SL. (2003).Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes. Biosci Biotechnol Biochem;vol 6712:pp15–22.

176. Yuan Zi-Qiang , Kai-Liang Yu , Howard Epstein , Chao Fang , Jun-Ting Li , Qian-Qian Liu, Xue-Wei Liu , Wen-Juan Gao , Feng-Min Li.2016. Effects of legume species introduction on vegetation and soil nutrient development on abandoned croplands in a semi-arid environment on the Loess Plateau, China. Science of the Total Environment.vo.541.pp692-700.

177. Zang.Y.M,Hui-Ling Ma, Aljandro Calderon Urea, Chean-Xia Tian, Xiao-Ming Bai, Jin Mei Wi (2016)- Plant Soil.Anatomical Changes To Protect Organelle Integrity Account For Tolerance Alkali And Salt Steresses In Melilotus Officinalis.vol406,pp327

178. Zengin Gokhan, Sengul Uysal, Ramazan Ceylan, Abdurrahman Aktumsek. (2015) Phenolic constituent, antioxidative and tyrosinase inhibitory activityof Ornithogalum narbonense L. from Turkey: A phytochemical study . Industrial Crops and Products .vol.70 pp1–6

179. Zhang L, Ming L, Yu J. BH3 2007.mimetics to improve cancer therapy; mechanisms and examples. Drug Resist Updat;vol10:pp207–17.

180. Zhao, G.; Yuan, Y.; Chai, F.; Ji, F. 2017,Effect of Melilotus Officinalis Extract on The Apoptosis of Brain Tissues by Altering Celebral Thrombosis and Inflammatory Mediators in Acute Cerebral Ischemia. Biomed. Pharmacother. vol89, pp1346–1352.

181. Zohary. Michael, (1972). Flora Palaestina, Part 2, Academy of Sciences and Humanities, P: 153-155

182. أبو غزال. ع. م. (2012) مساهمة في دراسة النوع الحيوي النباتي في وادي بردى، رسالة ماجستير، 116ص.

183. التقرير الوطني الخامس لاتفاقية التنوع الحيوي.2016. وزارة الإدارة المحلية، الجمهورية العربية السورية .ص14

184. الباشا ملاز وائلا. 2018استخلاص وعزل وتعديل بنية بعض المكونات الكيميائية وتحديد الفعالية المضادة للتخثر في النباتات)إكليل الملك- التفاف الزيتي- الشبث .(جامعة حلب كلية العلوم).

185. اللامي حسين باجي سهلية، الشمري عيدان جبر وسام (2015). دراسة تشريحية لبشرة أوراق وسيقان أنواع الحنسين .Melilotus Mill, Scorpiurus L في العراق .ص 1-12. جامعة القادسية العراق مستلة من رسالة ماجستير.

186. حرامي ثناء، إبراهيم أمينة (2020). دراسة البنية التشريحية وتقييم النشاط المضاد للتأكسد والمحتوى الكلي للفينولات والفلافونويدات لنبات .Melilotus indicus L السوري. مجلة العلوم الأساسية جامعة دمشق .المجلد 35. العدد.1 ص :96-121.

187. حمد ابتسام، آغا عصام، القاضي عماد، سوسان عماد (2010).عملي علم النبات، جامعة دمشق، ص117.

188. طباش سمير حداد دينا فنده وسيم. حصر وتعريف أنواع الأعشاب في بساتين الحمضيات في منطقة اللاذقية 2016. مجلة جامعة تشرين للبحوث والدارسات العلمية- سلسة العلوم البيولوجية المجلد (38) العدد (5) ص 202.

189. فيصل كاظم مطشر أماني عبد الوهاب عبد الرزاق غازي منعم عزيز .2009. دراسة تأثير مركبات الكومارين المعزولة من نبات الحندقوقMelilotus indica تجاه بعض البكتريا المرضية وخط الخلايا السرطانية HeLa cell-386:(1) المجلة العراقية للتقانات الحياتية

190. منصور غيثاء وحمد ابتسام والقاضي عماد. (2005) الفصيلة الفولية في وادي القرن. مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية. المجلد (21)- العدد الأول، ص21.

191. نعمه ج د., ابو مجداد ن م ج., جبر و م., 2007 - تقيم الفعالية الضد مايكروبية للمستخلص المائي والكحولي لاوراق نبات السدر. . Ziziphus spina- christi (L)Desf مجلة البصرة للعلوم(ب) مجلد 25 ، العدد 1

Syrian Arab Republic
Damascus University
Damascus University Journal

الجمهورية العربية السورية
جامعة دمشق
مديرية مجلات جامعة دمشق

موافقة نشر
research approval

Damascus: 14/ 08 /2023
No. : 183

دمشق: 14 / 08 /2023
رقم البحث: 183

Dear: Mais Mohsen Marouf
Dr. Georgette Babujian
Dr. Nizar Issa

We are pleased to inform you that your research entitled:

" A study of the morphological characteristics of five species of *Melilotus Mill.* and determining their morphological similarity"

Sent to us 19/ 06/ 2023
has been accepted by Damascus University Journal for Basic Sciences.
On 14 / 08 /2023 .

Best regards.
Editor in chief for Journal for BASIC SCIENCES

Prof. Kamal Kayed
Director of journals

Prof. Ahed Abou younes

ISSN: 1726-5487

السادة: ميس معروف
د. جورجيت بابوجيان
د. نزار عيسى

يسرنا إعلامكم أن بحثكم المعنون:

" دراسة مورفولوجية لخمسة أنواع من الحندقوق *Melilotus Mill.* وتحديد درجة قرابتها "

المرسل إلينا بتاريخ 19 /06/ 2023
قد قبل للنشر في مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية.
بتاريخ 14 / 08 / 2023.

مع فائق الإحترام
رئيس تحرير مجلة العلوم الأساسية
أ.د. كمال كايد
مدير المجلات
ا. د. عهد أبو يونس

ISSN:2789-6366(online)

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

Syrian Arab Republic
Damascus University
Damascus University Journal

الجمهورية العربية السورية
جامعة دمشق
مديرية مجلات جامعة دمشق

موافقة نشر
research approval

Damascus: 24/ 03 /2024

No. : 12075/225

دمشق: 24 / 03 /2024

رقم البحث: 12075/225

Dear: Mais Mohsen marouf

Dr. Georgette Antranik Babujian

Dr. Nizar Abdulaziz Issa

السادة: ميس محسن معروف

د. جورجيت انترانيك بابوجيان

د. نزار عبد العزيز عيسى

We are pleased to inform you that your research entitled:

يسرنا إعلامكم أن بحثكم المعنون:

" An anatomical study of five species *Melilotus* Mill"

" دراسة تشريحية لخمسة أنواع من الحندقوق *Melilotus* Mill"

Sent to us on 12 /05/2023 has been accepted by Damascus University Journal for Basic Sciences.

المرسل إلينا بتاريخ 12 /05/ 2023 قد قبل للنشر في مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية.

On 24 / 03 /2024 .
Best regards.

بتاريخ 24 / 03 / 2024.
مع فائق الاحترام

Editor in chief for Journal for BASIC SCIENCES
Prof. Kamal Kayed
Director of journal
Prof. Ahed Abou younes

رئيس تحرير مجلة العلوم الأساسية
أ.د. كمال كايد
مدير المجلات
أ.د. أحمد أبو يونس

ISSN: 1726-5487

ISSN:2789-6366(online)

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

Syrian Arab Republic
Damascus University
Damascus University Journal

الجمهورية العربية السورية
جامعة دمشق
مديرية مجلات جامعة دمشق

موافقة نشر
research approval

Damascus: 06/01/2025

No. : 243/12969

دمشق: 2025/01/06

رقم البحث: 12969/243

Dear: Mais Mohsen marouf

Dr. Georgette Entranik Babojian

Dr. Nizar Abd alazez Issa

السادة: ميس محسن معروف

د. جورجيت انتريك بابوجيان

د. نزار عبد العزيز عيسى

We are pleased to inform you that your research entitled:

يسرنا إعلامكم أن بحثكم المعنون:

Chemical study of two species of the genus M. segetlais and M. sulcatus and evaluation of their antioxidant activity

دراسة كيميائية لنوعين من جنس الحندقوق *M segetlais.,M.sulcatus* وتقييم فعاليتهما المضادة للتأكسد

Submitted to us on 13 /03/2024 has been accepted by Damascus University Journal for Basic Sciences .

المرسل إلينا بتاريخ 13 /03/ 2024
قد قبل للنشر في مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية

On 06 / 01 /2025.
Best regards.

بتاريخ 2025/01/06.
مع فائق الاحترام

Editor in chief for Journal for BASIC SCIENCES

Prof. Moustafa Ahmad Khaled Sayem El-Daher

رئيس التحرير مجلة العلوم الأساسية

د. مصطفى أحمد خالد صائم الدهر

Director of journal

مدير المجلات

Pr Prof. Ahed Elias Abou younes

ا. د. عهد الياس أبو يونس

ISSN: 1726-5487

ISSN:2789-6366(online)

Abstract

This Research Explores The Micromorphological, Anatomical, And Chemical Characteristics Of Five *Melilotus* Species (Commonly Known As Sweet Clover), Collected From Different Natural Habitats In Syria Between 2020 And 2022. The Studied Species Include: *Melilotus Indicus*, *M. Sulcatus*, *M. Albus*, *M. Officinalis*, And *M. Segetalis*.

A Detailed Morphological Description Of The Leaves, Flowers, Pods, And Seeds Was Carried Out Using Random Sections. Forty-Nine Qualitative Traits Were Analyzed To Determine The Relationships Among Species Using MVSP 3.2 Software. Secondary Metabolites Were Identified In Aqueous, Methanolic, And 70% Ethanolic Extracts. Total Phenolic And Flavonoid Contents Were Measured, And Coumarin Was Quantified, Isolated, And Purified. Its Purity Was Checked Using HPLC.

Antioxidant Activity Was Evaluated Through DPPH And ABTS Assays. Cytotoxic Effects Were Tested On Cervical Cancer (Hela) Cells Using XTT And Annexin/PI Assays. Some Extracts Were Also Tested For Their Ability To Inhibit Xanthine Oxidase (XO) Enzyme.

The Cluster Analysis Grouped The Species Into Two Main Clusters: One Included *M. Officinalis* And *M. Albus*, While The Other Included *M. Segetalis*, *M. Sulcatus*, And *M. Indicus*.

***Melilotus Segetalis* Showed A Higher Number Of Collenchyma Layers In The Stem, While *M. Indicus* Had The Greatest Stomatal Density. The Seed Of *M. Albus* Had A Deeply Concave Hilum Shaped Like The Letter "L." Anatomical Differences Were Also Observed In The Leaflets, Especially In Mesophyll Layer Numbers And Hair (Trichome) Density.**

The Methanolic Extract Showed The Richest Profile Of Secondary Metabolites. *M. Albus* Recorded The Highest Total Phenolic Content, While *M. Indicus* Showed The Strongest DPPH Radical Scavenging Activity. In Contrast, *M. Sulcatus* Had The Highest ABTS Scavenging Effect.

The 70% Ethanolic Extract Of *M. Officinalis* Had The Highest Coumarin Content, Confirmed By Di-TLC And HPLC, And Was Also Rich In Phenolic Compounds. The Methanolic Extract Of *M. Albus* Showed The Best Xanthine Oxidase Inhibitory Activity, While Its 70% Ethanolic Extract Demonstrated The Strongest Cytotoxic Effect Against Hela Cancer Cells.

Keywords: *Melilotus*, Micromorphology, Qualitative Screening, Plant Anatomy, Total Phenolics, Total Flavonoids, DPPH, ABTS, Di-TLC, HPLC, Xanthine Oxidase, Cervical Cancer Cytotoxicity

Syrian Arab Republic

Damascus University

Faculty of Sciences

Department of Plant Biology

Mophological and Chemical Comparison of *Melilotus* Mill. Species of Coumarin and Flavonoids Evaluation of Their Biological Activity

A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Ph.D. in the Sciences

(Department of Plant Biology)

by researcher

Mais Mohsen Maarouf

Supervisors

The main supervisor

Prorf.Dr. Georgete Babojian

Department of Plant Biology

Faculty of Sciences

Damascus University

The associate supervisor

Assist.prof Dr. Nizar Issa

Department of Animal Biology

Faculty of Sciences

Damascus University

1447-2025