# Contents


| Content | Page |
|---|---|
| Financial support……. | 1 |
| Acknowledgement……... | 2 |
| Abbreviations…….. | 5 |
| List of tables…… | 7 |
| List of figures…….. | 8 |
| Summary…… | 10 |
| Chapter I: Background and Introduction | 12 |
| I.1. Background……. | 12 |
| I.1.1. Natural products…….. | 12 |
| I.1.2. Bioassay-guided fractionation strategy……... | 12 |
| I.1.3. Definitions……... | 13 |
| I.2. Introduction…… | 16 |
| I.2.1. Bee venom……... | 16 |
| I.2.2. Factors affect bee venom content…… | 21 |
| I.2.3. Uses of venom as anticancer……... | 23 |
| I.2.4. Objectives of the present study…… | 26 |
| Chapter II: Materials, Apparatus and Experimental | 27 |
| II.1. Materials…… | 27 |
| II.2. Used apparatuses……. | 28 |
| II.2.1. Bee venom collector……..... | 28 |
| II.2.2. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) …….. | 28 |
| II.2.3. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)…… | 30 |
| II.2.4. Mass Spectrometry (MS)……. | 31 |
| II.2.5. MS Sequence……... | 31 |
| II.2.6. Freeze Dryer…… | 32 |
| II.2.7. Speed Vacuum…… | 32 |
| II.3. Experimental…… | 32 |
| II.3.1. Feeding honeybee…… | 32 |
| II.3.2. Extraction of bee venom ……. | 33 |
| II.3.3. Analysis of bee venom extracts with UV-HPLC ……... | 33 |
| II.3.4. Analysis of bee venom extracts with LC-MS ……. | 34 |
| II.3.5. Determination of the cytotoxicity of the bee venom extracts…….. | 34 |

| Content | Page |
|---|---|
| II.3.6. Bioassay-guided fractionation for BV-2 extract…… | 35 |
| II.3.7. Cytotoxicity for isolated peptide(s) from BV-2 extract ……. | 36 |
| II.3.8. The equation is used to calculate molecular weight of the peptide……. | 36 |
| Chapter III: Results and discussion | 39 |
| III.1. UV-HPLC for bee venom extracts ……..... | 39 |
| III.2. LC-MS for bee venom extracts ……. | 54 |
| III.3. Cytotoxicity for bee venom extracts …….. | 78 |
| III.4. Bioassay-guided fractionation for BV-2 extract ……. | 79 |
| III.4.1. Isolation, Purification and Identification for melittin…….. | 79 |
| III.4.2. Isolation, Purification and Identification for apamin ……. | 86 |
| III.4.3. Isolation, Purification and Identification for secapin ……. | 91 |
| III.4.1. Cytotoxicity of isolated peptide(s)……. | 96 |
| III.5. Conclusion …… | 97 |
| III.6 Recommendation……. | 97 |
| Chapter IV : References | 99 |
| Arabic summary……..... | 111 |
| Arabic financial support…….. | 113 |

# الملخص العربى

أجريت هذه الدراسة فى قسم العقاقير – كلية الصيدلة – مركز الطب الحيوى – جامعة أبسالا–السويد و قسم الصيدلة الأكلنيكية – مستشفى جامعة أبسالا – السويد و معمل كيمياء المنتجات الطبيعية – قسم الكيمياء – كلية العلوم – جامعة المنوفية – مصر وقسم بحوث النحل –معهد بحوث وقاية النباتات – مركز البحوث الزراعية – مصر.

## الهدف من الدراسة :

١- معرفة تأثير التغذية على محتوى سم النحل.

٢- تتبع النشاط البيولوجى للمستخلص النشط ضد الخلايا السرطانية لفصل المركبات الفعالة.

٣-التعرف على البيبتيدات.

٤- إختبار النشاط البيولوجى للبيبتيدات لمعرفة أيهم له نشاط ضد الخلايا السرطانية.

## تتلخص الدراسة فى هذه الرسالة فى النقاط التالية:

## الباب الأول:

يحتوي علي نبذة مختصرة عن: تعريف المنتجات الطبيعية وكذلك عرض موجز لإستراتيجية فصل المركبات النشطة (تتبع النشاط البيولوجي للمستخلصات الفعالة) كما يشتمل أيضا علي مقدمة عن سم النحل من حيث المواد المفصولة منه و العوامل التى تؤثر على محتواه و استخدامه كمضاد للخلايا السرطانية.

## الباب الثاني:

هذا الباب يحتوى على ثلاثة أجزاء:

- الجزء الأول يحتوى على المواد المستخدمة فى الدراسة.
- الجزء الثانى يحتوى على الأجهزة التى تم استخدامها وهى كالآتى: كروماتوجرافيا السائل ذو الأداء العالى بنوعيه و كروماتوجرافيا السائل ذو الأداء العالى المتصل بطيف الكتلة وطيف الكتلة المتصل بطيف الكتلة و جهاز استخلاص السم وجهاز التجفيف بالتجفيد.
- الجزء الثالث يحتوى على التجارب العملية التى أجريت و هى كالآتى:

١- تغذية مجموعة النحل بأربعة أنواع مختلفة من المغذيات ثم بعد ذلك تم استخلاص السم لنحصل على أربعة مستخلصات و هى بى فى-١ و بى فى-٢ و بى فى-٣ و بى فى-٤.

٢- عمل كروماتوجرافيا السائل ذو الأداء العالى و كروماتوجرافيا السائل ذو الأداء العالى المتصل بطيف الكتلة لمستخلصات سم النحل الناتجة من التغذية.

٣- إختبار النشاط البيولوجى لمستخلصات سم النحل ضد الخلايا السرطانية.

٤- فصل و تنقية و التعرف على البيبتيدات المشتقة من السم و تقييم النشاط البيولوجى لها ضد الخلايا السرطانية.

## الباب الثالث:

يختص هذا الباب بالنتائج المتحصل عليها من الدراسة والتى يمكن إيجازها كالآتى:

١- تم تحليل لمستخلصات سم النحل باستخدام جهازى كروماتوجرافيا السائل ذو الأداء العالى و كروماتوجرافيا السائل ذو الأداء العالى المتصل بطيف الكتلة ووجد: أنهم مشتركون فى عدد من البيبتيدات وهى الميلتين و الإسكابين و الأبامين و بيبتيد تحطيم الخلايا الحلمية و إختلافهم فى عدد أخرمن البيبتيدات.

٢- بإختبار مدى السمية للمستخلصات على سرطان الخلايا الليمفاوية، وجد أن بى فى-٣ أكثرهم تثبيطاً للخلايا يليه بى فى-٤ ثم بى فى-٣ ثم بى فى-١.

٣- تم إجراء العديد من خطوات الفصل على بى فى-٣ لمعرفة المركب المسئول عن النشاط البيولوجى و أدى ذلك إلى فصل ثلاثة بيبتيدات وتم التعرف عليهم باستخدام أجهزة طيف الكتلة و السائل ذو الأداء العالى المتصل بطيف الكتلة وطيف الكتلة المتصل بطيف الكتلة و هم الميلتين و بيبتيد تحطيم الخلايا الحلمية و الأبامين و لهم وزن جزئى يساوى ٢٨٤٥,٣٥, ٢٨٦٦,٨٤, ٣٠٣٦,٨١ دالتون على الترتيب.

٤- تم إختبار السمية للبيبتيدات المفصولة باستخدام خمس أنواع من الخلايا السرطانية ووجد أن المركب المسئول عن النشاط ضد الخلايا السرطانية محل الدراسة هو الميلتين.