التاثير السمي للمستخلصات الكحولية والقلويدية لنبات السبحبح *Melia azedarach* في خطين من خطوط الخلايا السرطانية

مريم حكمت عبد اللطيف[1] ، ابراهيم هادي محمد[2] و عامر طالب توفيق[3]

[1،2] قسم علوم الحياة- كلية العلوم- جامعة ديالى

[3]المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية-الجامعة المستنصرية

الخلاصة

في هذه الدراسة تم تسليط الضوء على تأثير المستخلص الكحولي و القلويدي الخام لثمار نبات السبحبح *Melia azedarach* على الخطين السرطانيين HepG2 ، SK -GT، ذلك باستخدام ستة تراكيز (12.5، 25، 50، 100، 200، 400) مكغم/مل و لفترة تعريض 24ساعة اذ وجد ان لكلا المستخلصين سمية خلوية على الانواع المختلفة من الخلايا السرطانية تعتمد درجة تأثيرهما على تركيز و نوع المستخلص ونوع الخلايا . فمن ناحية تأثير التركيز فقد وجد ان الفعالية المضادة للاورام تزداد مع ازدياد تركيز المستخلص . ومن ناحية نوع خلايا الخط السرطاني فقد وجد ان نسب تثبيط نموها بتأثير كل من المستخلصين تختلف باختلافهما، حيث كانت اقل نسبة تثبيط للمستخلص الكحولي هي 9.8% بتركيز 12.5 مكغم/مل واعلى نسبة هي 59.2% بتركيز400 مكغم/مل لخلايا الخط السرطاني HepG2، اما خلايا الخط السرطاني SK-GT2 فكانت اقل نسبة تثبيط للمستخلص الكحولي هي 4.3% بتركيز12.5 مكغم/مل واعلى نسبة هي 36.3% وبتركيز 400 مكغم/مل.

الكلمات المفتاحية : الخلايا السرطانية ، نبات السبحبح ،القلويدات ، المستخلص الكحولي.

التاثير السمي للمستخلصات الكحولية والقلويدية لنبات السبحبح *Melia azedarach* في خطين من خطوط الخلايا السرطانية

مريم حكمت عبد اللطيف ، ابراهيم هادي محمد و عامر طالب توفيق

Toxic Effect of Alcoholic and Alkaloids extracts of *Melia azedarach* plant in two cell lines

Maryam Hikmat Abdullatif [1] , Ibrahim Hade Muhamed[2] and AmerTalibTawfiq[3]

[1,2]Department of Biology - College of Science – Diyala University.
[3]Iraqi Center Of Cancer And Medical Genetic Researches- Al-Mustansiyria Unversity .
[1]Dr.ibrahimhadi@Sciences.Uodiyala.du.iq
[2] maryamhikmat913@gmail.com
[3] Bioteciraq@yahoo.com

Received 17 September 2016 Accepted 19 October 2016

Abstract

In this study we showed effect of alcoholic and alkaloids crude extract of *M.azedarach* fruits on tumor cell lines HepG2, SK-GT2, and so using six concentration (12.5,25,50,100,200,400)µg/ml, and for a period of 24 hours exposure. Both extract revealed cytotoxicity on different cell line, and this effect depend on concentration and type of cells and extract.The inhibition activity for tumor cell line increas with increase concentration of extract. While found that tumor cell line type inhibition variance in both extract depending on cells differences.The lowest inhibition rate for alcoholic extract was 9.8% in concentration 12.5µg\ml, and higher inhibition rate was 59.2% in concentration 400µg\ml for HepG2, while for SK-GT2 the lowest inhibition rate was 4.3% for alcoholic extract in concentration 12.5µg\ml and higher inhibition rate was 36.3% in 400µg\ml.

Keyword: Cell line,*Melia azedarach* , Alkaloides, alcoholic extract**.**

التاثير السمي للمستخلصات الكحولية والقلويدية لنبات السبحبح *Melia azedarach* في خطين من خطوط الخلايا السرطانية

مريم حكمت عبد اللطيف ، ابراهيم هادي محمد و عامر طالب توفيق

المقدمة

نالت الأعشاب الطبية اهتماماً كبيراً منذ القدم وذلك لقدرتها الكبيرة على تسكين الألم والشفاء، ولا نزال نعتمد عليها حتى يومنا هذا في صناعة عدد كبير من الادوية لأن طب الأعشاب يكمل العلاجات التقليدية في الغالب فيوفر أدوية مأمونة على الرغم من ان بعض النباتات قد تنتج آثار جانبية على غرار كل الأدوية، لذا فمن الضروري ألا تؤخذ الا باشراف ممارس.تتوقف قدرة الدواء العشبي على التأثير في أنظمة الجسم على المكونات الكيميائية التي يحتوي عليها. لذا بدأ الباحثون باستخلاص وعزل هذه المواد من النباتات في القرن الثامن عشر ومنذ ذلك الوقت أعتدنا النظر الى الاعشاب وتأثيراتها بدلالة المكونات الفعالة التي تحتويها (1). زاد الاهتمام بالمكونات الفعالة (مركبات الايض الثانوي) بوصفها علاجاً للسرطان أذ تمتلك تلك المركبات خصائص علاجية تختلف في تأثيراتها في الخلية السرطانية اذ قد تكون لهذه المركبات فعالية تثبيطية تؤدي الى قتل الخلية الورمية او ايقاف نموها (2)،ومن هذه المركبات التي اثبتت فعاليتها المثبطة لتكاثر الخلايا السرطانية هي القلويدات والتي تعد من أهم وأكثر المركبات الفعالة الموجودة في المستخلصات النباتية، أذ تمتاز بسميتها العالية للخلايا السرطانية نتيجة تأثيرها في عدة آليات في الخلية ومنها الانقسام الخلوي او في مرحلة تسبق الانقسام او تحفيز الخلايا السرطانية للدخول في مرحلة الموت المبرمج Apoptosis (3).و من أهم هذه القلويدات vinca alkaloid (vincristine ، vinblastine) و colchicine (paclitaxel ، taxanes) وخاصة docetaxel التي تستخدم بشكل كبير بوصفها مركبات مضادة للانقسام من خلال عملها على ديناميكية انبيبات المغزل (خيوط المغزل) التي لها دور مهم في انفصال الكروموسومات خلال الانقسام الخيطي (4). ونظراً للدور الذي تقوم به النبيبات الدقيقة في انقسام الخلية الامر الذي جعلها الهدف المناسب لتطور ادوية العلاج الكيميائي Chemotherapeutic drugs ضد النمو السريع والتوالد غير الطبيعي للخلايا السرطانية، لذا صار التوجه للبحث عن انواع اخرى من المركبات منها الكلايكوسيدات لاستخلاصها ومعرفة تاثيرها في الانقسام. نبات السبحبح الاسم الشائع له هو *Melia azedarach* يطلق على هذا النبات عدة أسماء في اللغة العربية منها التمر الاخرس: يصنف نبات السبحبح ضمن رتبة السذبية Sapindales و التي تعود لعائلة السبحبح Meliaceae (5) . السبحبح من النباتات متوسطة الحجم سريعة النمو وتصل الى ارتفاع 8 متر، الاوراق متساقطة ،الازهلر ثنائية الجنس او عديمة الجنس، الثمرة حسلية او لبية صفراء اللون متجمعة في عناقيد ،كل ثمرة تحمل بذور ، ينتشر في العراق من الشمال الى الجنوب ، ويزع في حدائق الزينة والمتنزهات (6). استعملت العديد من مركبات الايض الثانوية في محاولة معالجة مرض السرطان و كان من اهم هذه المواد القلويدات لذا صار التوجه لاختيار القلويد المعزول من نبات السبحبح *Melia azedarachc* اذ وجد انه يثبط عدة أنواع من الخطوط الخلوية السرطانية البشرية المقاومة للعقاقير المتعددة من خلال منع بلمرة النبيبات الدقيقة وتثبيطه لتكاثر الخلايا وحثها على الموت المبرمج (7). ومن الدراسات العراقية الحديثة التي اهتمت بهذا الجانب ونجحت في استخدام المستخلصات النباتية في تثبيط نمو خطوط الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي وداخله والتي شملت نبات المرير *Sonchus oleraceus* (8)، ونبات المديد *Convolvulues arvensis* (9) إذ توصلت هذه الدراسات إلى ان لهذه

المستخلصات تأثيرات سمية في مختلف أنواع خطوط الخلايا السرطانية، ومازالت البحوث جارية ومنها الدراسة الحالية التي تهدف الى اختبار فعالية المستخلصات النباتية سعياً ومحاولة لإيجاد مواد فعالة ضد مرض السرطان.

المواد وطرائق البحث

تم الحصول على نبات السبحبح(شكل 1) من الحدائق المنتشرة في العراق وتم تصنيف النبات من قبل الدكتور خزعل ضبع وادي الاختصاص في علم تصنيف النبات (Plant taxonomy) في كلية العلوم جامعة ديالى

شكل 1 نبات السبحبح *Melia azedarach*

اجريت عملية الاستخلاص الكحولي الخام حسب ما ورد في (10) اذ تم اخذ (20)غم من العينة الجافة لثمار نبات السبحبح واضيف اليها الكحول الاثيلي بتركيز (98%) حتى اصبح الحجم النهائي (200) مل و تركت لمدة نصف ساعة بجهاز الهزاز الافقي (Horizontal shaker) و على سرعة متوسطة تم تركت العينة لتستقر لمدة ساعة ثم رشحت بثلاث طبقات من قماش الشاش لفصل العوالق الصلبة و بعدها اخذ الراشح .و تم الاستخلاص القلويدي الخام للنبات حسب الطريقة المتبعة في (11) إذ أخذت كمية 20 غم من مسحوق الأوراق الجافة ووضعت في وعاء اسطواني الشكل مصنوع من مادة ورقية ذات مسامات يسمى Thimble، ثم وضع Thimble في المكان المخصص في جهاز السوكسليت Soxhlet وأضيف إليه الهكسان لغرض إزالة الدهون والكلوروفيل وأجري الاستخلاص لمدة 12 ساعة في درجة حرارة(40-60) م° وهي درجة حرارة تبخر المذيب المستخدم، بعدها تم نقل مسحوق الأوراق المزال منها الدهون والكلوروفيل إلى كحول الميثانول 70% في جهاز reflex ولمدة ثلاث ساعات، ثم رشح المستخلص بقطعة شاش ثم بورقة ترشيح، بعدها تم تركيز المستخلص الكحولي بالحاضنة ولمدة يوم إلى يومين، ثم تمت معاملة المستخلص الميثانولي بـ حامض الهيدروكلوريك 1% HCl في جهاز reflex ولمدة نصف ساعة ثم رشح مرة أخرى بورقة ترشيح نوع Whattman 1 ، وبإضافة diethyl ether إلى الراشح في قمع الفصل وتركه لمدة يوم كامل ظهرت طبقتان، الطبقة العليا هي طبقة diethyl ether التي أهملت والطبقة السفلى هي الطبقة المائية التي أخذت ثم بعد ذلك رفع الأس الهيدروجيني بإضافة قاعدة ضعيفة هي الامونيا لغرض الحصول

على pH 8، ثم جزئت هذه الطبقة إلى طبقتين باضافة الكلوروفورم لها في قمع الفصل مع الرج، فالطبقة العليا هي الطبقة المائية والطبقة السفلى هي طبقة الكلوروفورم الحاوية على القلويدات الأولية والثانوية والثالثية وكررت العملية ثلاث مرات، بعد ذلك تم التخلص من الكلوروفورم بتركه في الحاضنة المروحية ليتبخر وعُزلت مجموعة القلويدات بوصفها ناتجاً نهائياً. استعمل نوعين من خطوط الخلايا السرطانية وهما: خط خلايا سرطان الكبد استعمل هذا الخط عند التمريرة (18) و خط خلايا سرطان المرئ استعمل هذا الخط عند التمريرة (4).

تم الحصول على هذه الخطوط المذكورة من المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية/الجامعة المستنصرية وهي منماة على وسط RPMI1640 المزود 10% مصل العجل البقري واجريت الخطوات الخاصة بالزرع النسيجي تحت ظروف معقمة بحسب ماذكره (12) وكالآتي:أضيف (2) مل من محلول Trypsin –Versin solution إلى وعاء الزرع النسيجي حجم (50) سم^3 الحاوي على الخلايا بعد تفريغه من الوسط الزرعي وغسله بمحلول ملحي المعقم، ثم حرك الوعاء برفق وحضنت في الحاضنة بحرارة (37) م° لمدة (5-10) دقيقة لتفكيك الخلايا الملتصقة وكذلك خلخلة التصاقها بجدار الوعاء للحصول على خلايا مفردة. عُدت الخلايا الحية لكل نوع على وفق المعادلة:

$$C = N \times 10^4 \times F \text{ /ml}$$

حيث ان:-

C = عدد الخلايا في مل واحد من المحلول

N= عدد الخلايا في الشريحة

F = عامل التخفيف

10^4= ابعاد الشريحة

باستخدام صبغة التريبان الزرقاء (Trypan blue) ، إذ تأخذ الخلايا الميتة الصبغة ببضع ثوان مما يجعلها سهلة التمييز من الخلايا الحية ذات اللون البّراق.تم حساب الخلايا باستعمال شريحة العدّ المجهري Improved) double neubauer ruling) أضيف الى الوعاء الحاوي على الخلايا المفككه نحو (10) مل من وسط نمو جديد (RPMI-1640) ، وتم تحريك الوعاء جيداً وبعدها أفرغت محتوياته الى وعاء آخر جديد بحيث يكون مستوى الوسط الزرعي مع الخلايا متساوياً بين الوعائين وبذلك تم الحصول على المزرعة الثانوية (Subculture or Passage). حضنت الأوعية بحرارة (37) م° بعد أن كتب عليها معلومات كاملة عن نوع الخلايا ورقم التمريرة الجديدة (new passage) وتاريخ تكوين المزرعة الثانوية، وتمت متابعة الأوعية يومياً للتأكد من خلوها من أي تلوث، وأن الخلايا بحالة جيدة وذلك بفحصها بوساطة المجهر مقلوب الطور (Inverted microscope). وعندما تصبح الخلايا ذات نمو جيد متمثل بتكوين طبقة احادية كاملة من الخلايا (Confluent monolayers) تكون الخلايا جاهزة للاستعمال في فحص السمية الخلوية.

اختبار السمية الخلوية للمستخلصين الخام في نمو الخطوط الخلوية السرطانية

اختبرت سمية المستخلصات النباتية في الخطوط السرطانية و ذلك بتجهيز عالق الخلايا عن طريق أضافة محلول Trypsin Versin solution– الى وعاء الزرع النسيجي حجم 50 مل ، ثم أضيف له 20 مل من الوسط الزرعي المزود بالمصل وقد تم مزج عالق الخلايا جيداً وأخذ منه 0.2 مل بعد كل مزجة الى كل حفرة من حفر طبق الزرع النسيجي ذي القعر المسطح (96-Microtiter plates) وذلك باستعمال ماصة أوتوماتيكية دقيقة، تركت الأطباق في الحاضنة بحرارة (37) م° لمدة تراوحت بين 12-18 ساعة الى حين التصاق الخلايا في الحفرة، وبعدها تمّ التخلص من الوسط الزرعي القديم في الحفر، وأضيف (0.2) مل من التراكيز المحضرة آنياً لكل من المستخلص الكحولي والقلويدي باستعمال الوسط الزرعي الخالي من المصل Serum Free Media (SFM) وهي (400,200,100,50,25,12.5) مكغم/مل، وبواقع اربعة مكررات لكل تركيز. كما تم عمل اربعة مكررات للسيطرة باستخدام DMSO (dimethal slfoxid) واربعة مكررات للسيطرة اضيف اليها PBS والتي أضيف لها (0.2) مل من الوسط الزرعي الخالي من المصل، حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م°.بعد مرور مدة التعريض نصف ساعة وبحسب الطريقة التي ذكرها (12) أخرج الطبق من الحاضنة وأضيف (50µl) من صبغة البنفسج البلوري لكل حفرة وأعيد الطبق الى الحاضنة ليحضن لمدة 20 دقيقة، بعدها اخرج الطبق وأزيلت محتوياته وغسلت بمحلول (PBS) لحين زوال الصبغة الزائدة وتركت الخلايا لتجف إذ ان الخلايا الميتة تأخذ الصبغة أما الحية فلا تأخذها، قُرأت النتائج باستخدام جهاز المطياف الضوئي الخاص باطباق المعايرة الدقيقة بطول موجي 492 نانوميتر.تم تحديد معدل تثبيط النمو للخلايا السرطانية على وفق المعادلة المشار اليها في معادلة التثبيط% = (قراءة السيطرة – قراءة المعاملة لكل تركيز/ قراءة السيطرة) x 100 من خلال تحويل قيم التأثير السمي للمستخلصين الكحولي والقلويدي لنبات السبحبح في الخطوط الخلوية السرطانية الى نسب مئوية. Inhibition Rate (IR)% = (A-B/A) x 100

حيث ان:-

A= قراءة السيطرة

B= قراءة المعاملة لكل تركيز

التحليل الاحصائي

حللت النتائج احصائيا باستخدام نظام التحليل الاحصائي Graphpad Prism Version 6 وفق اختبار تحليل التباين Anova و تم مقارنة المتوسطات الحسابية باختبار Duncan متعدد الحدود بفرق معنوي عند مستوى احتمالية $P < 0.05$.

النتائــج والمناقشة

1. تأثير المستخلص الكحولي الخام لثمار نبات السبحبح في خلايا الخطوط الخلوية السرطانية.

يبين الجدول (1) تأثير المستخلص الكحولي الخام لثمار نبات السبحبح في نمو خلايا الخطوط الخلوية السرطانية (SK-GT2 and HepG2) ، فقد وجد اقل نسبة تثبيط لنمو الخلايا عند التركيز 12.5 مكغم /مل و اعلى نسبة تثبيط عند التركيز 400 مكغم/مل لخلايا الخطين الخلويين السرطانيين. و قد لوحظ ان نسب التثبيط لهذا المستخلص تختلف حسب نوع الخط الخلوي السرطاني ، اذ ان نسب التثبيط لخلايا الخط السرطاني HepG2 قد بدأت بالتركيز 12.5 مكغم/مل وبلغت 9.8% و ازدات الى 14.4%، 16.7%، 32.7%، 41.1%، 59.2% للتراكيز (25،50،100،200،400)مكغم/مل و على التوالي . وكانت الفروق معنوية بين التركيز 400 مكغم/مل وجميع التراكيز المستخدمة الاخرى في حين لم تكن الفروق معنوية بين التركيزين (100،200) مكغم/مل وكذلك بين التراكيز الادنى (12.5،25،50)مكغم/مل كما في الشكل (2).

يلاحظ من الجدول (1) ان نسب تثبيط خلايا الخط السرطاني SK-GT2 بتأثير المستخلص الكحولي الخام بدأت بالتركيز 12.5مكغم/مل اذ بلغت نسبة التثبيط 4.3%، و ازدادت الى 3.5%، 11.5%، 14.2%، 22.5%، 36.3% للتراكيز (25،50،100،200،400)مكغم/مل و على التوالي . كانت الفروق معنوية بين التركيز 400 مكغم/مل و جميع التراكيز الاخرى ماعدا التركيز 200مكغم/مل لم يظهر فرق معنوي ، وايضا لم يظهر أي فرق معنوي بين التراكيز الادنى الاخرى كما في الشكل (3) . حسب النتائج الاحصائية تبين ان هناك فرق معنوي بين الخطين السرطانيين (HepG2، SK-GT2) بتأثير المستخلص الكحولي عند التراكيز (25،100،200 و 400)مكغم/مل، في حين لم تظهر فروق معنوية عند استعمال التركيزين (12.5 و50)مكغم/مل.

2. تأثير المستخلص القلويدي الخام لثمار نبات السبحبح في خلايا الخطوط الخلوية السرطانية.

يبين الجدول (2) تأثير المستخلص القلويدي الخام لثمار نبات السبحبح في نمو خلايا الخطوط الخلوية السرطانية (SK-GT2 and HepG2)، فقد وجدت اقل نسبة تثبيط لنمو الخلايا عند التركيز(12.5)مكغم/مل واعلى نسبة تثبيط عند التركيز(400)مكغم/مل لخلايا الخطين الخلويين السرطانيين. وقد لوحظ ان نسب التثبيط لهذا المستخلص تختلف حسب نوع الخط الخلوي السرطاني ، اذ ان نسب التثبيط لخلايا الخط السرطاني HepG2 بدأت بالتركيز(12.5)مكغم/مل بلغت 30.4%، وازدادت الى 31.5%، 35.3%، 36.2%، 47.5%، 65% للتراكيز(25،50،100،200،400) مكغم/مل وعلى التوالي . وكانت الفروق معنوية بين التركيز(400)مكغم/مل وجميع التراكيز المستخدمة الاخرى، وبين التركيز(200)مكغم/مل والتركيز (12.5)مكغم/مل ، اما في التراكيز الاخرى (100،50،25،12.5)مكغم/مل لم يظهر أي فرق معنوي كما في الشكل (4).

تبين نتائج الجدول (2) ان نسب تثبيط الخط السرطاني SK-GT2 بتأثير المستخلص القلويدي بدأت بالتركيز(12.5)مكغم/مل اذ بلغت 3.7% و ازدادت الى 5.1%،6.1%،13.3%،25%،30.8% للتراكيز (25،50،100،200،400)مكغم/مل وعلى التوالي. لم يظهر فرق معنوي بين التركيزين (400 و200)مكغم/مل. بينما ظهر فرق معنوي بين هذين التركيزين و التراكيز الاخرى و لم تكن الفروق معنوية بين التراكيز (12.5،25، 50، 100)مكغم/مل كما في الشكل(5). حسب النتائج الاحصائية تبين ان هناك فرق معنوي بين الخطين السرطانيين (SK-GT2 and HepG2) عند استعمال جميع تراكيز المستخلص القلويدي.

جدول (1) نسب التثبيط في الخط الخلوي السرطاني HepG2 و SKGT2 بتأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي الخام لثمارنبات السبحبح لمدة 24 ساعة

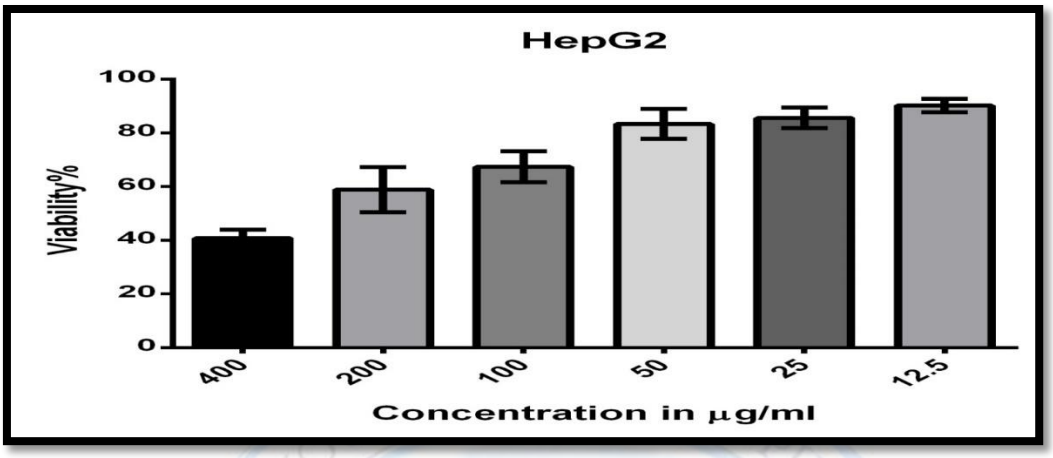
التركيز µg/ml	الخط الخلوي السرطاني HepG2 نسبة التثبيط ±الانحراف المعياري	الخط الخلوي السرطاني SKGT2 نسبة التثبيط± الانحراف المعياري
12.5	2.5 ± 9. 8 c	2.8 ± 4.3 bc
25	3.8 ± 14.4 c	3.8 ± 3.5 bc
50	5.6 ±16.7 c	7.3 ± 11.5 b
100	5.8 ± 32.7 b	2.7 ± 14.2 b
200	8.4 ± 41.1 b	6.4 ± 22.5 ab
400	3.1± 59.2 a	8.3 ± 36.3 a

الاحرف المتشابهة تدل على عدم وجود فروق احصائية

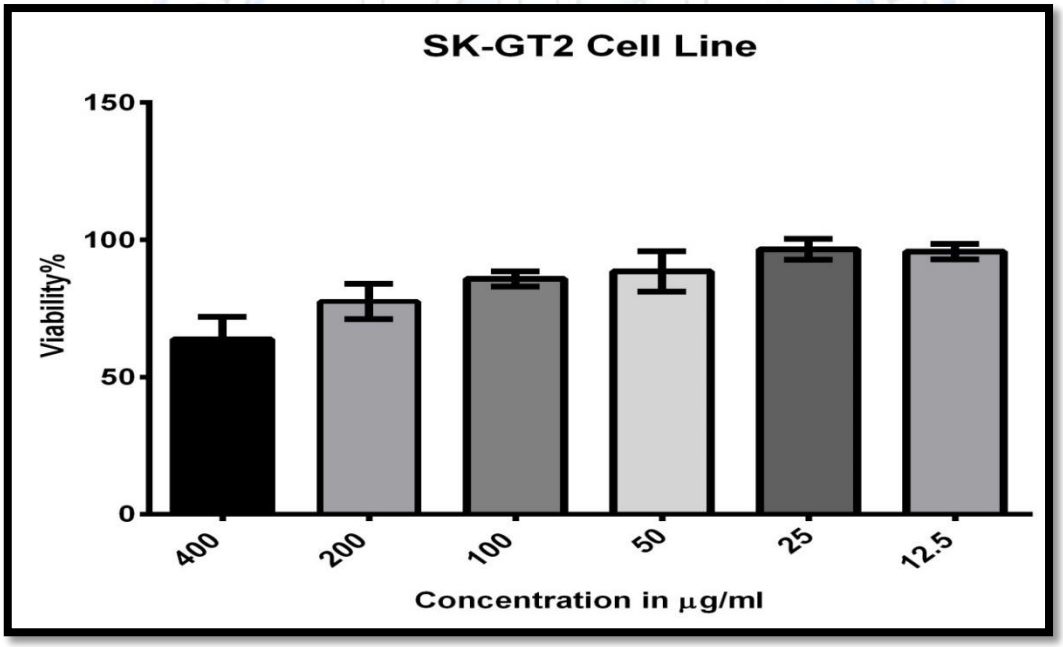
جدول (2) نسب التثبيط في الخط الخلوي السرطاني HepG2 و SKGT2 بتأثير تراكيز مختلفة من المستخلص القلويدي الخام لثمار نبات السبحبح ولمدة 24ساعة.

التركيز µG/ML	الخط الخلوي السرطاني HEPG2 نسبة التثبيط ±الانحراف المعياري	الخط الخلوي السرطاني SKGT2 نسبة التثبيط± الانحراف المعياري
12.5	8.9 ± 30.4 c	2.1 ± 3.7 b
25	2.5 ± 31.5 bc	3.1 ± 5.1 b
50	5.9 ± 35.3 bc	2.4 ± 6.1 b
100	5.4 ± 36.2 bc	7.2 ± 13.3 b
200	4.7 ± 47.5 b	0.5 ± 25 a
400	6.2 ± 65 a	2.8 ± 30.8 a

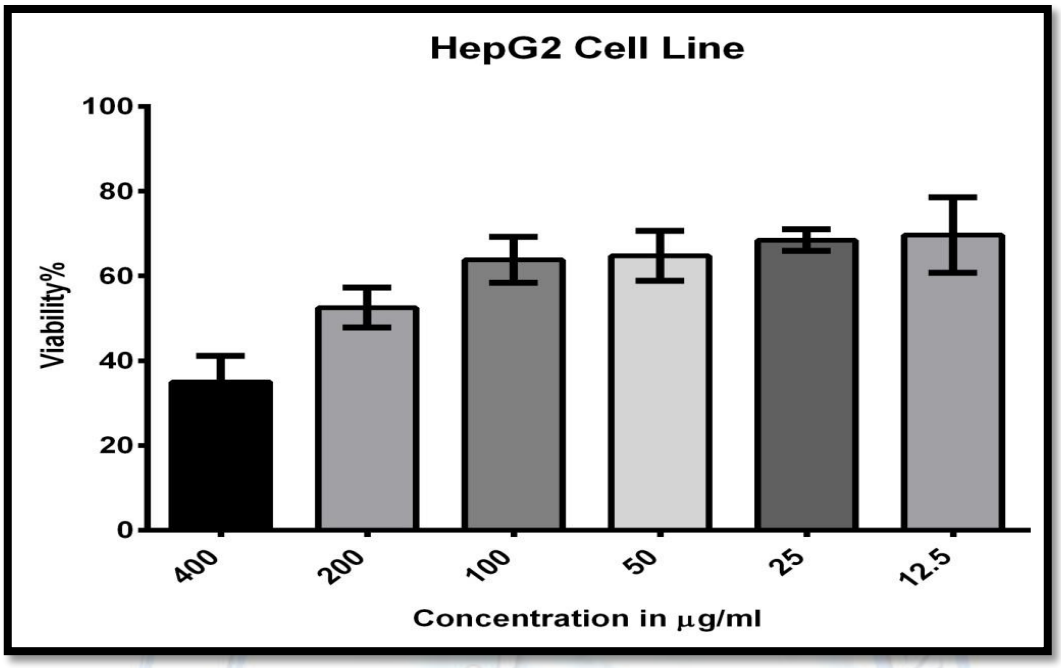
الاحرف المتشابهة تدل على عدم وجود فروق احصائية



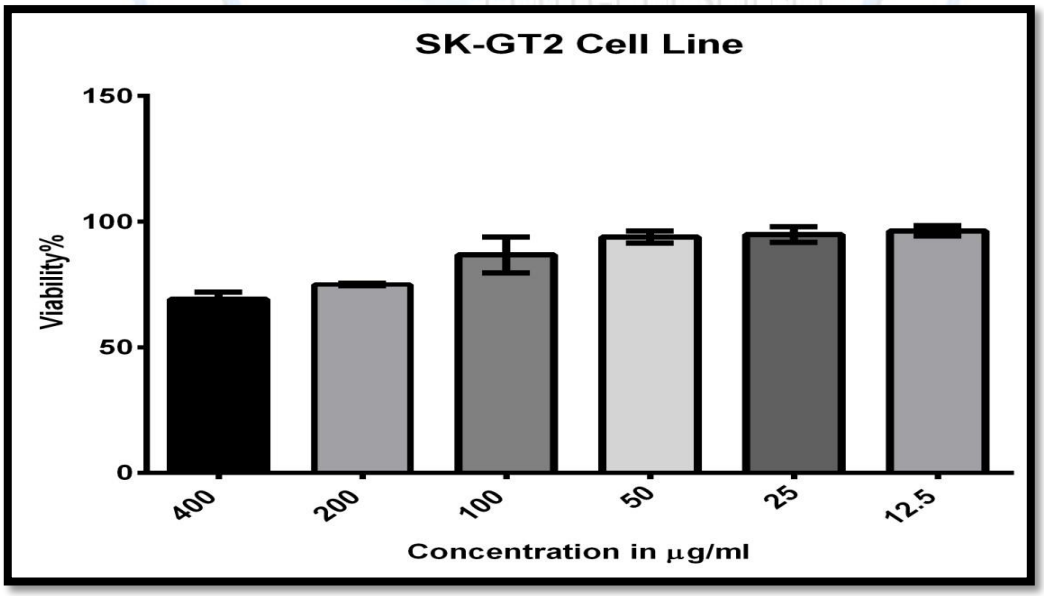
شكل (2) تأثير المستخلص الكحولي الخام لثمار نبات السبحبح في الخط الخلوي السرطانيHepG2 لفترة 24 ساعة و بدرجة حرارة 37 مْ باستخدام اختبار MMT.



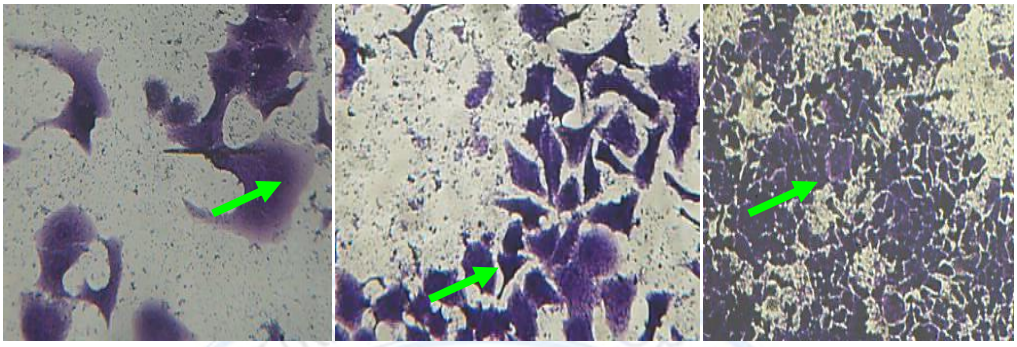
شكل (3) تأثير المستخلص الكحولي الخام لثمار نبات السبحبح في الخط الخلوي السرطانيSKGT2 لفترة 24 ساعة و بدرجة حرارة 37 مْ باستخدام اختبار MMT.



شكل (4) تأثير المستخلص القلويدي الخام لثمار نبات السبحبح في الخط الخلوي السرطانيHepG2 لفترة 24 ساعة و بدرجة حرارة 37 مْ باستخدام اختبار MMT.



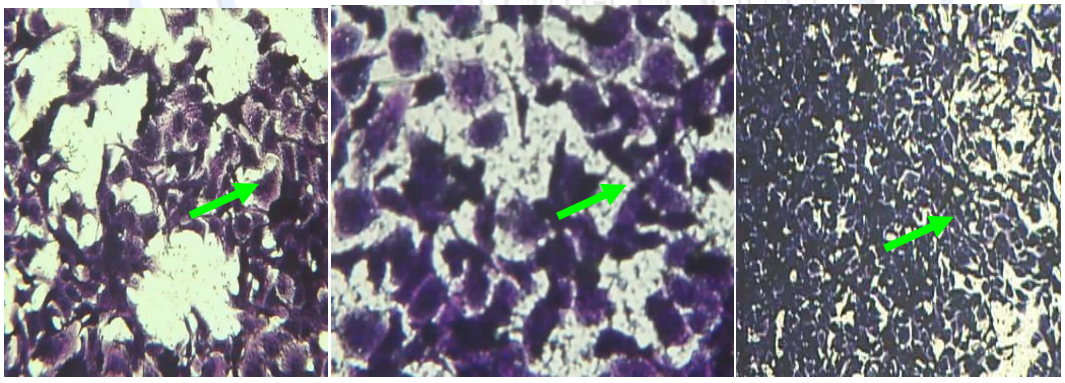
شكل (5) تأثير المستخلص القلويدي الخام لثمار نبات السبحبح في الخط الخلوي السرطاني SKGT2 لفترة 24 ساعة و بدرجة حرارة 37 مْ باستخدام اختبار MMT.



C B A

الشكل 6 مقارنة بين خلايا HepG2 عند تركيز 400 مكغم/مل بعد 24 ساعة للمستخلص الكحولي والقلويدي بقوة تكبير (100X).

(A) الخط الخلوي السرطاني HepG2 الذي يمثل السيطرة (B) الخط الخلوي HepG2 المعامل بالمستخلص الكحولي عند تركيز 400 مكغم/مل ويوضح الفراغات بين الخلايا . (C)الخط HepG2 المعامل بالمستخلص الالقلويدي عند تركيز 400 مكغم/مل ويوضح الفراغات بين الخلايا .



C B A

الشكل 7 مقارنة بين خلايا SKGT-2عند تركيز 400 مكغم/مل بعد 24 ساعة تعرض للمستخلصين الكحولي والقلويدي لنبات السبحبح وبقوة تكبير(100X).

(A) الخط الخلوي SKGT-2 الذي يمثل السيطرة ويوضح خلايا الخط الكثيفة. (B)الخط الخلوي SKGT-2 المعامل بالمستخلص الكحولي عند تركيز 400 مكغم/مل ويوضح الفراغات بين الخلايا . (C)الخط الخلوي SKGT-2 المعامل بالمستخلص القلويدي عند تركيز 400 مكغم/مل ويوضح الفراغات بين الخلايا .

عززت نتائج هذه الدراسة ما توصلَ إليه العديد من الباحثين في دراسات محلية حول امتلاك المستخلصات النباتية فعالية مضادة للخلايا السرطانية، وتعتمد هذه الفعالية بشكل أساس على التركيز المستخدم من هذه المركبات ونوع المستخلص ومدى حساسية الخلايا السرطانية..وجدَ تباينٌ بين تأثير المستخلصات الخام في خطوط الخلايا المدروسة، قد يعود إلى طبيعة المركبات الموجودة في كل مستخلص وتفاعلها مع الطبيعة الايضية لكل نوع من الخلايا (13)، كما يعزى التباين في استجابة الخلايا السرطانية تجاه المستخلصات المستخدمة إلى تباين المستقبلات الموجودة على سطح الخلايا للانواع المختلفة من المستخلصات(14). أظهرت المستخلصات الخام بشكل عام تأثيرات تثبيطية في خلايا الكبد والمرئ معتمدةعلى التركيزو مدة التعريض ، فقد كانت حيوية هذه الخلايا تنخفض بشكل معنوي ، يرافقها ارتفاع الفعالية التثبيطية للمستخلصات مع زيادة تراكيز تلك المستخلصات ، وهذا كان واضحاً ولا سيما في حالة المستخلص القلويدي الذي أبدى فعالية أعلى من المستخلص الكحولي في خلايا الكبد ولكن عند دراستها في خلايا المرئ لوحظ ان المستخلص الكحولي كان افضل من المستخلص القلويدي في نسبة التثبيط . و يرجع سبب ذلك إلى احتواء هذه المستخلصات على مركبات تؤثر في الحالة الفسلجية لهذه الخلايا ، و احتوائها على مركبات تعمل على إيقاف دورة الخلايا السرطانية Arrest cell cycle عند طور معين وتمنعها من التكاثر(15) ، أو احتوائها على مركبات تحفز الخلايا السرطانية على الموت المبرمج (Apoptosis). حصل (16) على أعلى نسبة تثبيط لخلايا Hep-2 كانت 86.7% عند معاملتها بالتركيز 1000 مايكروغرام /مل من المستخلص المائي لبذور نبات الكتان لمدة 48 ساعة وفي خلايا AMN-3 كانت 89.8% وفي خط خلايا RD كانت 86.2% ، وجد ذلك التباين ايضا في دراسة (17) عن تأثير مستخلصات نبات السعد في الخطوط الخلوية السرطانية Hep-2 و RD و AMN-3 و الخط الخلوي الطبيعي Ref. تنفرد الخلايا السرطانية بصفات تفتقر لها مثيلاتها الطبيعية، إذ تتميز بالانتهازية والقابلية على الغزو والانتشار وفرط الحاجة، فضلا عن حدوث تغيرات في بروتيناتها ومستضداتها السطحية، كذلك تتميز الخلايا السرطانية بنفاذية أغشيتها وهذه الصفة تسهل عملية دخول المركبات إلى داخلها بشكل عشوائي غير منتظم مما يؤثر سلباً في تلك الخلايا ويسهل من استجابتها للمواد المضادة التي تتعرض لها (18). في هذه الدراسة حقق كل من المستخلصين الكحولي الخام والقلويدي الخام، أعلى نسبة تثبيط في خلايا HepG2عند التركيز 400 مكغم/مل إذ كانت (59.2و65)% على التوالي، بينما كانت نسبة التثبيط في الخط الخلوي.SK-GT2 (36.3 و 30.8)% على التوالي لمدة يوم واحد فقط . وكان الفرق بينهما معنويا في التراكيز الأدنى من ذلك فقد حقق المستخلص الكحولي الخام نسبة تثبيط أعلى من القلويدي الخام ويعزى ذلك إلى اختلاف كمية المكونات الموجود في وحدة الحجم في كل منهما، كما إن تقارب المستخلصين في الجرعات العالية يعود إلى مركبات أخرى تعمل تآزرياً مع القلويدات عند تلك الجرعات وهذا يشير إلى إن فضل المستخلص قد يعود إلى القلويدات أيضاً. تؤثر هذه المركبات كذلك في الآلية السرطانية من خلال تثبيط فعالية الجين Bcl-2 ونتيجة للخلل الحاصل في هذا الجين تدخل الخلية السرطانية مرحلة الموت المبرمج مثلما هو في العديد من الخطوط الخلوية لسرطان الدم البشري Human Leukemic cell lines (19). إذ توصل (20) إلى إن التربينات المعزولة من Dophn nucronata لها دور تثبيطي على الخط الخلوي السرطاني human Myelogenous leukemia من خلال عملها على إيقاف الدورة الخلوية عند طور G1، ، أما التانينات فإنها تؤثر في الخلايا السرطانية للخط الخلوي السرطاني HL-60 من خلال تجزئة شريط DNA وحث

الخلايا نحو الموت المبرمج (21). ان الميزة المهمة في أدوية العلاج الكيميائي هي استهدافها الخلايا السرطانية دون الخلايا الطبيعية، لذا ففي دراستنا الحالية، وجدنا إن مستخلصات نبات السبحبح تؤثر في دورة انقسام الخلية وبأكثر من آلية، كما إنها تؤثر في الخلايا السرطانية من نوع HepG-2 و SKGT-2 وتؤثر بنسبة اقل في نمو الخلايا الطبيعية عند التراكيز العالية مما يجعل هذا النبات واعداً في علاج السرطان، فضلا عن توافره وسهولة الحصول عليه.

References

1. Sumit, D.; Ripunjoy, B. and Nishant, N.(2014). A Review on Immune Modulatory Effect of Some Traditional Medicinal Herbs, *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biologica l Sciences*, 2(1): 33- 42.
2. Cragg, M.; Newman,J. and David, J.(2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*100(1–2):72-9.
3. Om, P.; Amit, K. and Ajeet,A.(2013). Anticancer Potential of Plants and Natural Products: A Review, *American Journal of Pharmacological Sciences*,. 1, (6): 104-115.
4. Jordan, M.A. 2002. Mechanism of action of anti tumor drugs that interact with microtubules and tubulin, *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents*, 2: 1-17.
5. Rupa,B.; Azam, N.; Abdul Mannan; Ahmed, N. and Hasan, N.(2014). Phytochemistry and PharmacologicalAppraisals of Persian Lilac (*Melia azedarach*Linn.). A Quick Comprehensive Review.*American Journal of Ethnomedicine*, 1(3): 152-163.
6. Sultana, S.;Hafiz, m.and Saif, A. (2015).Comprehensive review on ethanobotanical uses *Melia azedarach* . *Asian J Pharmaceut Res Health Care* 6 (1): 26-32.
7. Kikuchi, T.; Pan, X.; Ishi,K .;et al. (2013).Cytotoxic and Apoptosis-Inducing Activities of 12-*O*-Acetylazedarachin B from the Fruits of *Melia azedarach* in Human Cancer Cell Lines. *Biol. Pharm. Bull*, 36(1): 135–139 .
8. زغير، زينب رزاق . 2009. دراسة تاثير مستخلصات الخام لنبات المرير *onchus olevaceu*. رسالة دكتوراه، كلية الطب البيطري، جامعة بغداد.
9. الربيعي ،ابراهيم هادي محمد . 2009. تأثير المستخلص المائي والقلويدي الخام للمديد *Convolvulus arvensis* L. في تثبيط الخلايا السرطانية داخل وخارج الجسم، رسالة دكتوراه، كلية العلوم للبنات، جامعة بغداد.
10. Harborne, J.B. 1984. Phytochemical Methods. (2nd ed.), Chapman & Hall, London, P.5 .

11. Cannell, R.J.P. 1998. Natural product isolation, Humana Press, New. Jersey,U.K.

12. Freshney, R., 2012. Culture of animal cell.Sixth edition.Wily-liss,New York.

13. Shoieb, A.; Elgayyar, M.; Dudrick, P.; Bell, E.and Titnof, P. (2003). Inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thimoquinol, *Int. Oncology*, 22: 107-113.

14. Chen, R.; Wu, M.; Wang, H.; Hwang, J.; Hong, C.; Huang, Y.; Yen, S. and Ou, X.(2001). Sensitization of tumor but not normal tissue, to the cytotoxic effect of ionizing radiation using *Panax noto ginseng* extract, *Am. J. Chin. Med*., 16: 234-242.

15. Heitham, T. (2007). Effect of crude extracts vegetative and callus parts of *Melia azedarach* on cancer and normal cell (in vitro). M.Sc.thesis, Collage of Biotechnology. University of Al-nahrain, Iraq.

16. الموسوي، أشرف نزار سعد (2007). دراسة وراثية خلوية لتأثير المستخلصات الخام لبذور الكتان في بعض الخطوط الخلوية السرطانية، رسالة ماجستير، كلية العلوم ، جامعة بغداد.

17. الحلي، زيد عبد المنعم علي (2004) تأثيرالمستخلصات الخام لعشب السعد *Cyperus rotundus L.* في تثبيط نمو الخطوط الخلوية السرطانية، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بغداد.

18. Mohd F.; Abu B.; Maryati, M.; Asmah, R.; Steven, A., and Jeffrey, R. (2010).Cytotoxicity and polyphenol diversity in selected parts of Mangifera pajang and Artocarpus odoratissimus fruits, Mal., *J.*: *Food Sci. Nut*.0034-6659.

19. Hoi,L., H. Chan, K. Nai, and N. Kwork. 2009.Modulatory effect and action mechanisms of try ptanthrin on murine myloi leukemia cells .*Cellular andolecular immunology*.6(5)335-342.

20. Sadeghi, H.; Yazdanparast, R.(2003). Antitumor Activity and cell cycle arrest of a new Diterpene Ester from *Daphne mucronata* using k562 cells, *Iraq. Biomed. J.* , 7(3): 127-131.

21. Akihisa, T.; Xin, P.; Yasuhiro, N.and Takashi, K. (2013) Limonoids from the fruits of Melia azedarach and their cytotoxic activities. *Phytochemistry*,89: 59–70.