



ISSN 2790 – 5985

eISSN 2790 – 5993

Agriculture College – Wasit University

Dijlah J. Agric. Sci., 2(3): 35-47 , 2024

Dijlah Journal of
Agricultural Sciences

Study of the effect of the aqueous extract of Beta vulgaris root on the cancerous cell line A549 and the normal cell line REF

Hussein Mohsen Kazim¹, Aseel Rahim Mardan²

^{1,2}College of Education - Al-Qadisiyah University – Iraq.

*Corresponding author e-mail: husseinalgabry99@gmail.com

Abstract:

The study included studying the cytotoxic effect of the aqueous extract of beet roots "Beta vulgaris" on the lung cancer cell line A549, using six diluted concentrations of the aqueous extract of the plant roots (7,8 , 31,25 , 62,5 , 125 , 250 , 500) (µg/ml) and for three periods of exposure (24,48,72) hours. The quantitative estimation of the active compounds of the aqueous extract of the plant was calculated, as it was found that the aqueous extract of beet roots contains many active compounds, they are (Saponins- Tannins - Phenols - Flavonoids - Glycosides). The study showed that the concentration causing inhibition of normal cell proliferation REF by the aqueous extract of the plant 50% (Ic₅₀) was 6.35 mg/ml. The aqueous extract of beet roots was tested to detect the cytotoxic effect of the aqueous extract and all concentrations used on the lung cancer cell line A49. An increase in the percentage of cancer cell growth inhibition has been observed for all exposure periods (24,48,72) hours, with significant differences at the probability level ($p \leq 0.05$) and compared with the control, where the percentage rate of inhibition at the lowest concentration ranges (µg/ml 7.8) (4.661±1.864), (5.640±2.743), (6.584±4.159) respectively, and the rate of inhibition increased at the concentration (µg/ml 500) (90.250±1.409) (92.743±1.252) and (94.738±1.416) respectively.

Keywords: Beet (*Beta vulgaris*), cancer, lung cancer (A549), and REF.

والخط الخلوي A549 على الخط الخلوي السرطاني *Beta vulgaris* دراسة تأثير المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر الطبيعي REF

حسين محسن كاظم¹, اسيل رحيم مردان²

قسم علوم الحياة – كلية التربية – جامعة القادسية / العراق

الخلاصة

تضمنت الدراسة دراسة التأثير السمي الخلوي للمستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *Beta vulgaris* على خط خلايا سرطان الرئة A549 والخط الخلوي الطبيعي REF باستخدام ست تراكيز مخففة من المستخلص المائي لجذور النبات وهي (7,8 , 31,25 , 62,5 , 125 , 250 , 500) µg/ml وبثلاث فترات تعريض 24 , 48,72 ساعة حيث تم حساب التقدير الكمي للمركبات الفعالة للمستخلص المائي للنبات , اذ وجد ان المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر تحتوي على العديد من المركبات الفعالة وهي (الصابونينات , التانينات , الفينولات , الفلافونيدات , الكلايكوسيدات). ان تأثير المستخلص على الخلايا الطبيعية REF وبعد فترة تعريض 72 ساعة والمتمثلة بشكل التركيز المسبب لتثبيط تكاثر الخلايا الطبيعية REF بنسبة 50% هو (IC₅₀) بواسطة المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *beta vulgaris* هو 6.35 mg/ml كان اقل سمية حيث سجل المستخلص المائي تأثير تثبيطي قليل جدا مقارنة مع الخط السرطاني A549.

تم اختبار المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر للكشف عن التأثير السمي الخلوي للمستخلص المائي ولجميع التراكييز المستخدمة في خط خلايا سرطان الرئة A549 , لقد تم ملاحظة ارتفاع معدل النسبة المئوية لتثبيط نمو الخلايا السرطانية وخلال فترات التعرض الثلاثة 24 و 48 و 72 ساعة وبفروقات معنوية عند مستوى احتمال ($p \leq 0.05$) ومقارنتها مع السيطرة حيث يتراوح معدل النسبة المئوية للتثبيط عند اقل تركيز $17.8 \mu\text{g/ml}$ عند فترات التعرض الثلاث 24 و 48 و 72 ساعة (4.661 ± 1.864) (5.640 ± 2.743) , (4.159 ± 6.584) على التوالي , وازداد معدل التثبيط عند التركيز 500 (94.738 ± 1.416) , (1.252 ± 92.743) , (1.409 ± 90.250) $\mu\text{g/ml}$ على التوالي .

الكلمات المفتاحية : الشمندر , السرطان , REF, A549 . المقدمة

تعد المستخلصات النباتية مصدراً لعدد كبير من المركبات الفعالة والمهمة التي تعمل كمضادات لنمو الخلايا السرطانية كما أشار (Stefkó *et al.*, 2020)، حيث بين كل من (Kusz *et al.*, 2021) و (Ma *et al.*, 2016) أن مركبات الفينانثرين (Dihydrophenanthrenes) والفلافونويد (Flavonoid) والايجينين (Apigenin) والفينولات (Phenoles) لها تأثير سام لخلايا بعض الخطوط البشرية السرطانية، بالإضافة إلى تأثيرها المضاد للالتهابات (Anti-inflammation) ونمو الجراثيم، كما تعمل كمضادات أكسدة حسب (Petrovska, 2012). وقد أشارت دراسات (Keskin *et al.*, 2018) و (Roy and Bharadvaja, 2017) التي تم إجراؤها على النباتات الطبية والمواد الفعالة المشتقة منها إلى زيادة الاهتمام بهذه النباتات في السنوات الأخيرة، وبيّنت أهمية استعمال هذه المنتجات النباتية بشكل عام من قبل الأشخاص المرضى الذين يعانون من السرطان والأمراض المزمنة وأمراض الكبد والاضطرابات الروماتيزمية وجهاز الدوران.

الشمندر (Beta vulgaris L) والمعروف محلياً باسم الشامندر، يحتوي على مركبات فينولية قوية مضادة للأكسدة وحمض الأسكوربيك والكاروتينات والبيتالين كما ذكر (Clifford *et al.*, 2015)، كما أكد التحليل الكروماتوجرافي السائل عالي الضغط لمستخلص الشمندر وجود مادة البوليفينول النشطة بيولوجياً مثل كيرسيتين وحمض السينابيك وحمض الكوماريك وحمض السرنجيك وحمض الغاليك والكومارين وحمض الكافيك وحمض الكلوروجينيك والكاتشين وفقاً لـ (Indu *et al.*, 2017). كما تشير النتائج الحالية إلى أن مستخلصات بيتا الشائع (الجذر) لها أنشطة خافضة لضغط الدم وخفض السكر في الدم ومضادات الأكسدة حسب (El Gamal *et al.*, 2014)، ومضادة للالتهابات، وأنشطة وقائية للكبد وفقاً لـ (Singh *et al.*, 2011).

يعرف السرطان على نطاق واسع بأنه قاتل صامت ولا يزال يندرج ضمن الأسباب الرئيسية للوفاة في جميع أنحاء العالم، حيث يحصد أرواح الملايين كل عام، وهو شائع جداً في جميع أنحاء العالم، في كل من البلدان النامية والمتقدمة. على الرغم من المخاطر المرتبطة بالسرطان، والتوعية لا تزال ضعيفة في مجتمعنا، فإن الوقاية من عوامل الخطر والتخفيف منها هي أفضل طريقة لمكافحة السرطان حسب (Tezerjani *et al.*, 2015).

هدف البحث : دراسة تأثير المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر Beet root على خلايا سرطان الرئة والخط الطبيعي REF.

المواد وطرائق العمل

A - جمع النبات واستخلاصه Plant collection and Extraction

اجريت الدراسة في مختبرات مركز البحوث والتقنيات الاحيائية / جامعة النهريين , تم جمع جذور النبات من اسواق محافظة المثنى وتم تصنيف النبات من قبل الاستاذ المساعد الدكتور ازار عبد الامير سوسه في قسم علوم الحياة / كلية التربية / جامعة القادسية , تم تنظيف الجذور من الاتربة وبعد تجفيف جذور النبات بدرجة حرارة الغرفة تم طحنها في جهاز كهربائي ثم تم استخدام جهاز السكسلت من خلال وضع 20 غم من المسحوق النباتي مع 300 مل من الماء المقطر بدرجة حرارة 100 م° لمدة ثلاث ساعات , وتم استخدام جهاز Lypholyzer لفرض تحويل المستخلص السائل الى باودر لتحديد التراكييز المستخدمة في الدراسة .

B- الكشف الكيميائي للمركبات الفعالة في المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر
تم اجراء الكشف الكيميائي على المستخلص المائي الذي تم تحضيره سابقا لغرض التعرف على المكونات الكيميائية الموجودة فيه .

1- الكشف عن التانينات (الدباغيات) Detection of tannins

تم اجراء الكشف وفقاً لطريقة (Naing, 2018).

2- الكشف عن الفلافونيدات Detection of Flavonoids

تم اجراء الكشف وفقاً لطريقة (Naing, 2018).

3- الكشف عن القلويات Detection of Alkaloids

تم اجراء الكشف وفقاً لطريقة (Hussein and Ameer, 2017).

4- الكشف عن الفينولات Detectio of Poly phenols

تم اجراء الكشف وفقا لطريقة (Hussein and Ameer,2017).

5- الكشف عن الصابونينات Detection of Saponins

تم الكشف عن الصابونينات عن طريق رج المستخلص المائي للنبات جيدا وعند تكون رغوة في الاعلى دلالة على وجود الصابونينات (+) .

6- الكشف عن الكلايكوسيدات Detection of glycosides

تم اجراء الكشف وفقا لطريقة (Hussein and Ameer,2017).

C - المحاليل الخاصة بالزراعة النسيجية:

حضرت المحاليل طبقا لطريقة (Freshney.,2000) والتي تخص الزرع النسيجي.

1- بيكاربونات الصوديوم (NaHCO_3) Sodium bicarbonate

حضر بإضافة 4.4 غم من بيكاربونات الصوديوم (NaHCO_3) الى 100 مل من الماء المقطر, وبعدها تم تعقيمه بالمؤصدة وفي درجة حرارة 121 $^{\circ}\text{C}$ ولمدة 15 دقيقة ومن ثم يحفظ في درجة حرارة منخفضة 4 $^{\circ}\text{C}$.

2- المضادات الحيوية Antibiotics

تم تحضيرها من خلال اذابة مكونات العلبه Benzyl penicillin ذات سعة 1000000 IU في حجم 5مل من الماء المقطر , وبعدها تم اخذ 0.5 مل منة , و تم اضافة 1 لتر من الوسط الزراعي وحفظ في درجة حرارة منخفضة -20 $^{\circ}\text{C}$.

3- المصل البقري الجنيني Fetal Bovine Serum

تم استخدامه من الشركة المزودة Sigma وتم تثبيطه في درجة حرارة (56 $^{\circ}\text{C}$) لمدة نصف ساعة ومن ثم يضاف للوسط الزراعي .

4- التربسين Trypsin

حضر عن طريق اذابة غرام واحد من مسحوق التربسين في 100 مل من PBS , ثم يعقم بمرشح ذا ثقب بقطر 0.22 μm ويوضع بدرجة حرارة - 20 $^{\circ}\text{C}$.

5- الوسط الزراعي (RPMI- 1640 - Rosswell Park Memorial Insitute)

المادة	الكمية / الحجم
RPMI-1640 with hepes buffer and L-glutamine الوسط الزراعي	غم 10.4
NaHCO_3 4.4 % بيكاربونات الصوديوم	مل 14
Penicillin المضاد الحيوي البنسلين	مل 0.5
Streptomycin المضاد الحيوي الستربتومايسين	مل 0.5
Fetal Bovine Serum مصل الدم البقري الجنيني	مل 100

تم اضافته 800 مل من الماء المقطر الخالي من الايونات الى 10.4 غم) من الوسط الزراعي (RPM-1640) في , ثم اضيفت محاليل المضادات الحيوية و بيكاربونات الصوديوم , عدل (PH) الى 7.2 , و بعدها تم اضافة مصل الدم البقري الجنيني , ثم نقوم بترشيح الوسط الزراعي و يكمل الحجم الى 1 لتر من خلال اضافة الماء المقطر, ثم بعدها يتم تعقيمه باستخدام المرشح ذي ثقب 0.22 μm ثم يوضع في قناني زجاجية نظيفة و معقمة وتحفظ في الحاضنة وبدرجة حرارة (37 $^{\circ}\text{C}$) لمدة ثلاث ايام لغرض التأكد من عدم تلوثها , ثم تحفظ بدرجة حرارة (4 $^{\circ}\text{C}$) لحين الاستعمال (Yaseen.,1990).

6- الوسط الزراعي الخالي من المصل Serum Free Media (SFM)

حضر بالطريقة نفسها سابقة الذكر بالفقرة (5) لكن بدون اضافة المصل للوسط الزراعي .

7- محلول دارئ الفوسفات الملحي phosphate buffer saline saline (PBS)

حضر بإذابة (0.20 g) من KCl و (8g) من NaCl و (0.20 g) من KH_2PO_4 و (0.92g) من Na_2HPO_4 ثم يكمل بـ (100 ml) من الماء المقطر ويتم تعقيمه بالمؤسدة في درجة حرارة 121 °C ولمدة 15 دقيقة , وبعدها يتم حفظه بدرجة حراره 4 °C لحين الاستخدام .

8- تحضير صبغة (Methyl Thiazolyl Tetrazolium Stain (MTT)

حضرت عن طريق اذابة (0.005 غم) من مسحوق الصبغة في 1مل واحد من محلول PBS في دورق زجاجي , ثم يوضع الدورق على صفيحة مغناطيسية هزازة ثم يتم ترشيح المزيج بمرشح (0.22 μm) لكي يتم ازالة البلورات الزرقاء المتشكلة عنها , حيث تم تحضير الصبغة انيا وعند الاستخدام و تم حفظها في مكان مظلم وظروف معقمة وذلك لعدم تأكسدها بسبب الضوء .(Betancur-Galvis *et al.*, 1999).

D - الخطوط الخلوية التي استخدمت بالدراسة Cell Lines

تم تجهيزنا بالخطوط الخلوية من قبل مركز البحوث والتقنيات الاحيائية / جامعة النهرين وهي خط خلايا سرطان الرئة A549 (Adenocarcenomic 549) , والخط الخلوي الطبيعي (REF) Rat Embryo Fibroblast , ثم اجريت اختبار السمية الخلوية للمستخلص المائي لجذور نبات الشمندر على خلايا الخطوط وحسب طريقة (Khashan *et al.*, 2020).

E - دراسة تاثير المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر في نمو الخطوط الخلوية

1- تهيئة الوسط الزراعي وخطوط الخلايا Preparation of medium and cell lines

وزع الوسط الزراعي المحضر سابقا وتم وضعة داخل قناني زجاجية مغطاة بغطاء محكم سعتها 200 مل و حفظت القناني بدرجة حرارة 20- °C لحين الاستعمال , وتم تهيئة الخط الخلوي السرطاني والخط الطبيعي الخاصة بالدراسة وهي (A549, REF) وتم اجراء الخطوات الخاصة بالزرع النسيجي في ظروف معقمة (Freshney., 1994) وحسب الخطوات التالية:

- تم اضافة 2 مل من محلول التريسين الى قنينة الزرع النسيجي ذات الحجم 50 سم الحاوية على الخلايا بعد ازالة الوسط الزراعي وغسلها بالمحلول (PBS) , وحركة القنينة برفق وتم حضنها في الحاضنة بدرجة حرارة 37 °C لمدة 5 دقائق وذلك لتفكيك الخلايا الملصقة وخلخلة التصاقها بجدار القنينة للحصول على الخلايا الاحادية المفردة.
- اضفنا 15 مل من وسط نمو جديد (RPMI-1640) الى القنينة الحاوية على الخلايا المفككة , يتم تحريك القنينة جيدا وبعد ذلك وزعت محتويات القنينة بالتساوي مع قنينة اخرى جديدة بحيث تكون كمية الخلايا مع الوسط الزراعي متساوية بين القنيتين حيث تسمى هذه العملية بالزرع الثانوي (Subculturing Process)
- بعدها حضنت القناني في درجة حرارة 37 °C لمدة يوم , بعد ان كتب عليها معلومات كاملة عن رقم التمرير الجديد ونوع الخلايا وتاريخ اجراء الزرع وتم متابعة القناني وذلك لكي نتأكد من خلوها من التلوث وان الخلايا المزروعة بحالة جيدة , عن طرق فحصها بمجهر الطور المقلوب (Inverted-phase Microscope), وعندما كانت الطبقة الاحادية للخلايا متكاملة Confluent monolayer تكون القناني جاهزة للاستخدام .

2- اختبار سمية المستخلص المائي للنبات في نمو الخط الخلوي السرطاني

بعد تحضير المستخلص المائي يتم اذابة 0.5غم لمسحوق المستخلص في 10 مل من الوسط الخالي من المصل , وتم تعقيم المستخلص باستخدام مرشح ذو الثقوب بقطر 0.22 مايكرومتر , ثم يحضر مئة ست تراكيز (تخافيف نصفية) باستخدام الوسط الخالي من المصل وهي (7.8, 31.25, 62.5, 125, 250, 500) $\mu\text{g/ml}$ وتحت ظروف معقمة , حيث تم استخدام كل التراكيز التي حضرت مباشرة بعد اكتمال عملية التحضير , وتم تجهيز عالق الخلايا بواسطة اضافة محلول التريسين حجم 50 سم² الى طبقة الخلايا المزروعة في القنينة الخاصة بالزرع النسيجي , وبعدها تم اضافة 20 مل لة من الوسط الزراعي الحاوي على المصل بنسبة 10% , بعدها مزج العالق جيدا بعد كل مزجة يتم نقل 0.2 مل الى حفر طبق معايرة الزرع النسيجي ذي القعر المسطح () Microtiter plates with 96- fat bottom well من خلال استخدام ماصة اوتوماتيكية دقيقة Micropipette وبعدها تم وضع الاطباق داخل الحاضنة في درجة حرارة 37 °C ولمدة 24 ساعة الى حين التصاق الخلايا داخل الحفرة Well وبعدها يتم

التخلص من الوسط الزراعي القديم في الحفرة ويتم اضافة 0.2 مل من تراكيز المستخلص التي تم تحضيرها سابقا وبثمان مكررات لكل تركيز منها , وتم عمل ثمان مكررات كوحدة سيطرة Control. وتم حضن الاطباق في درجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة , ثم اخرجنا الاطباق من الحاضنة وازالة الوسط الزراعي بعدها غسلنا الخلايا بمحلول (PBS) , وبعد ذلك اضفنا لكل حفرة 0.1 مل من صبغة (MTT stain) وتركناها لمدة ثلاث ساعات , بعدها تم غسل الحفرة بمحلول (PBS) وذلك لكي يتم ازالة الصبغة الزائدة , حيث تصطبغ الخلايا الملصقة بقاع الحفرة باللون الاصفر , ثم اضفنا 0.1 مل من محلول ثنائي ميثيل سلفوكسيد DMSO متبوعا بفترة حضن تحت درجة حرارة 37 م° لمدة 15 دقيقة وبعد جفاف الاطباق تم قراءة النتائج باستخدام جهاز الاليزا Eliza plate Reader وعند الطول الموجي 620 نانومتر , حيث تم اجراء هذه الخطوات السابقة الذكر على الخطوط الخلوية (A549 , REF) عن طريق استخدام المستخلص المائي وبثلاث فترات تعريض وهي (24, 48, 72) ساعة , وتم حساب معدل التثبيط لنمو الخلايا (النسبة المئوية للسمية الخلوية) بالمعادلة الآتية

$$\text{Inhibition rate (IR)} = \frac{A-B}{A} * 100$$

حيث ان A تشير الى الكثافة الضوئية للسيطرة , و B تشير الى الكثافة الضوئية للعينات (Abdullah et al., 2020).

النتائج

1- الكشف الكيميائي عن المركبات الفعالة للمستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *Beta vulgaris*.

اظهرت النتائج التي تم الحصول عليها والمبينة في الجدول رقم (1) عند اجراء الكشف عن مركبات الايض الثانوي والمركبات الفعالة الموجودة في المستخلص المائي لنبات *Beta vulgaris* على وجود مركبات الفلافونويد، الفينولات والقلويدات والصابونين و التانينات و الكلايكوسيدات .

جدول (1) : نتائج الكشف عن المركبات الفعالة في المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *beta vulgaris*

ت	المركبات الفعالة	اسم الكاشف	دليل الكاشف	نتيجة الكشف
1	الفينولات	كاشف كلوريد الحديدك 1%	راسب ازرق مخضر	+
2	الفلافونويدات	الكشف باستخدام خلاص الرصاص المائية C4H6O4Pb	لون اصفر رائق	+
3	التانينات	الكشف باستخدام خلاص الرصاص المائية C4H6O4Pb	راسب جيلاتيني	+
4	الكلايكوسيدات	كاشف بندكت	راسب برتقالي احمر	+
5	القلويدات	كاشف دراجندروف	راسب بني	-
6	الصابونيات	بواسطة رج المحلول	فقاعات	+

العلامة (+) تدل على ايجابية الكشف , العلامة (-) تدل على سلبية الكشف

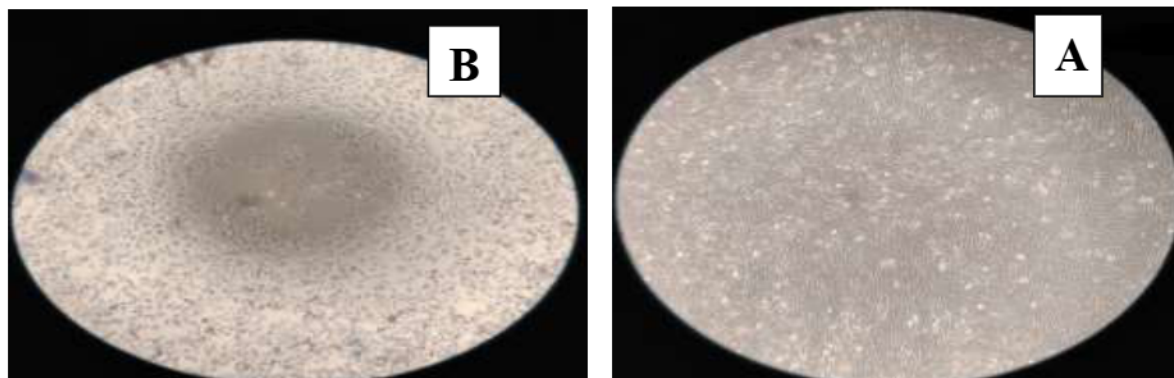
2- التأثير السمي الخلوي للمستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *Beta vulgaris* على خط الخلايا الطبيعية REF

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها ان تأثير المستخلص على الخلايا الطبيعية والمتمثلة بشكل التركيز المسبب لتثبيط تكاثر الخلايا الطبيعية REF بنسبة 50% هو (IC50) بواسطة المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *beta vulgaris* كان 6.35mg/ml كما في الشكل (2) كما اظهرت النتائج تغيرا في نسبة حيوية الخلايا في التراكيز المستخدمة المختلفة كما في الجدول 2

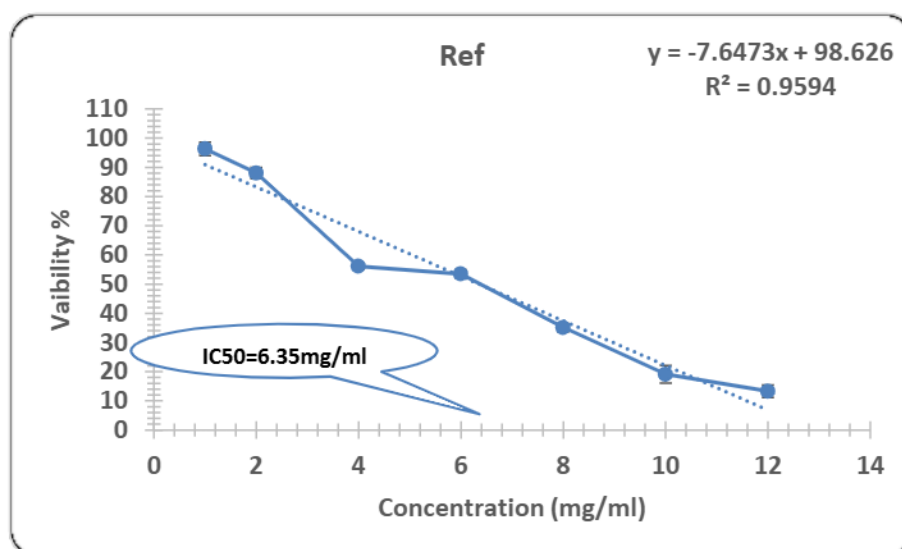
جدول (2) معدل حيوية خط الخلايا الطبيعية المعرضة للمستخلص في تراكيز مختلفة

Con. mg/ml	Mean± SD
1	96.329±2.310
2	88.080±1.920
4	56.103±1.103
6	53.473±1.383
8	35.144±1.372

10	19.128±3.014
12	13.289±2.130



شكل (1) -A خلايا الخط الطبيعي REF غير المعرضة للمستخلص المائي لنبات الشمندر B- خلايا الخط الطبيعي REF المعرضة للمستخلص المائي لنبات الشمندر



شكل (2) التركيز المسبب لتنشيط تكاثر الخلايا الطبيعية (IC50) للمستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *Beta vulgaris*

2- تأثير المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *beta vulgaris* على خط خلايا سرطان الرئة A549

أظهرت نتائج التحليل الاحصائي التي تم الحصول عليها والموضحة في جدول (3) أن تأثير المستخلص المائي بدأ بعد 24 ساعة من التعريض و بفروق معنوية عند مستوى احتمال ($p \leq 0.05$) بالمقارنة مع السيطرة أذ سجل معدل النسبة المئوية لتنشيط الخلايا السرطانية لأقل التراكيز 7.8 mg/ml هو 4.661 ± 1.864 وأزداد التأثير السمي في الخلايا عند اعلى التراكيز 500 mg/ml اذ بلغت 90.250 ± 1.409 عند نفس مستوى الاحتمال وفتره التعريض نفسها أما عند انقضاء فترة 48 ساعة من التعرض للمستخلص تم ملاحظة أن معدل النسبة المئوية لتنشيط أرتفع و لجميع التراكيز تقريبا أذ سجل عند التركيز 7.8 mg/ml بلغت 5.640 ± 2.743 وأزداد التأثير السمي في الخلايا عند اعلى التراكيز 500 mg/ml بلغت 92.743 ± 1.252 ، في حين بعد 72 ساعة من التعريض بلغت النسبة المئوية لمعدل التنشيط اعلى مستوياتها وبالمقارنة مع التراكيز ذاتها اذ سجلت نسبة التركيز في الخلايا السرطانية 6.584 ± 4.195 عند التركيز 7.8 mg/ml مقابل 94.738 ± 1.416 عند التركيز 500 mg/ml .

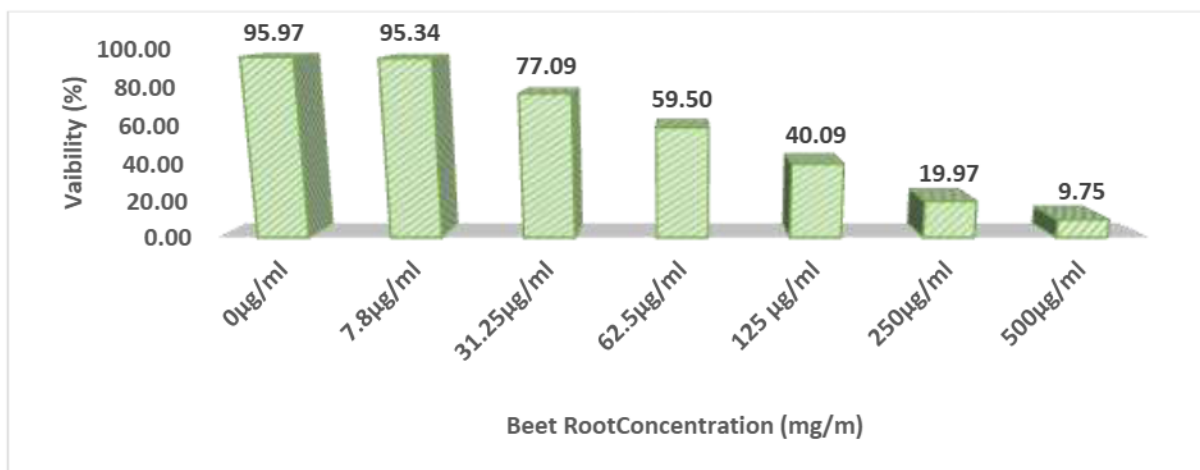
جدول (3): تأثير المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *beta vulgaris* على خط خلايا سرطان الرئة A549 بعد مرور 24 , 48 و 72 ساعة في تراكيز مختلفة

Concentration/ Time	24hr (Mean± SD)	48hr (Mean± SD)	72 hr (Mean± SD) lung
0 µg/ml	4.028±0.814a A	4.111±1.026a A	4.404±1.991a A
7.8 µg/ml	4.661±1.864a	5.640±2.743a	6.584±4.195a

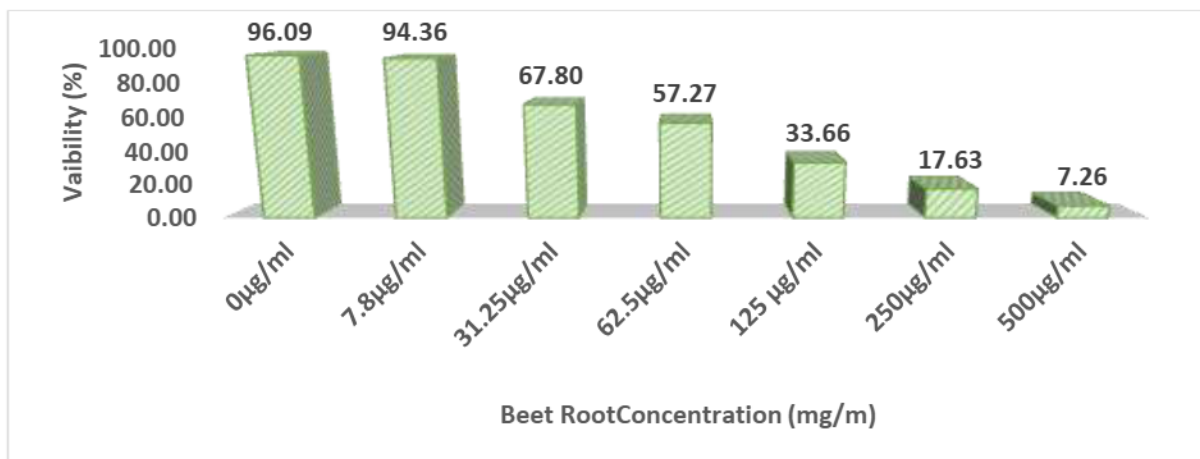
	A	A	A
31.25 µg/ml	22.909±5.283a	32.199±4.685b	34.476±5.386b
	B	B	B
62.5 µg/ml	40.497±5.911a	42.729±5.957ab	46.686±5.601b
	C	C	C
125 µg/ml	59.914±3.041a	66.340±2.177b	72.776±2.347c
	D	D	D
250 µg/ml	80.033±3.638a	82.369±3.083ab	83.125±2.966b
	E	E	E
500 µg/ml	90.250±1.409a	92.743±1.252b	94.738±1.416c
	F	F	F
LSD0.05	2.98		

*الاحرف الصغيرة تشير الى الفروقات بين الاوقات , الاحرف الكبيرة تشير الى الفروقات بين التركيز. * الاحرف المتغيرة تشير الى الفروقات المعنوية , * الاحرف المتشابهة اشارة الى لا وجود فرق معنوي .

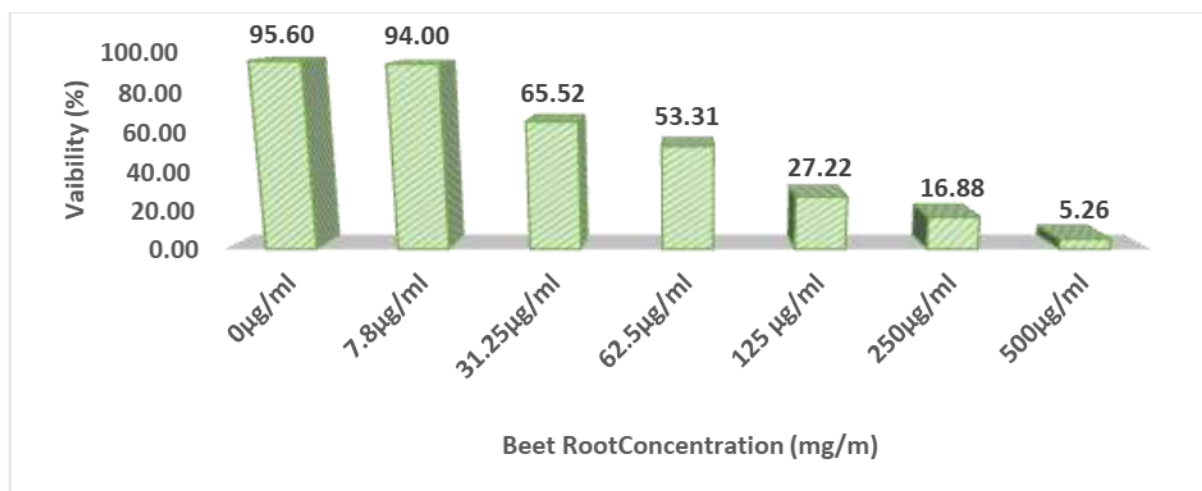
كما اظهرت النتائج بعد 24 ساعة من التعرض ان اقل نسبة حيوية للخلايا السرطانية سجلت في تركيز 500 µg/ml والتي بلغت 9.75 بينما اعلى نسبة حيوية للخلايا كانت في تركيز 7.8 µg/ml اذ بلغت 95.34 . كما لاحظت النتائج ان هذه الحيوية تقل مع مرور الوقت في نفس التراكيز المستخدمة في 48 ساعه كانت نسبة الحيوية للخلايا في تركيز 500 µg/ml بلغت 7.25 بينما اعلى نسبة حيوية للخلايا كانت في تركيز 7.8 µg/ml اذ بلغت 94.36 , واخيرا اقل نسبة حيوية للخلايا السرطانية كانت في تركيز 500 µg/ml بعد 72 ساعة اذا بلغت النسبة الحيوية للخلايا السرطانية 5.25 كما في الشكل (2 و 3 و 4).



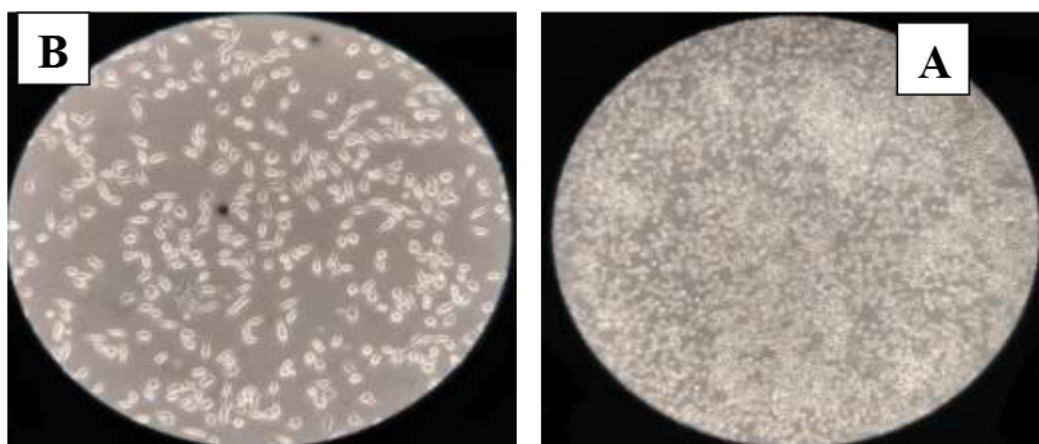
الشكل (2): تأثير المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *beta vulgaris* على خط خلايا سرطان الرئة A549-Cell بعد مرور 24 ساعة في تراكيز مختلفة



الشكل (3): تأثير المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *beta vulgaris* على خط خلايا سرطان الرئة A549-Cell بعد مرور 48 ساعة في تراكيز مختلفة



الشكل (4): تأثير المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *beta vulgaris* على خط خلايا سرطان الرئة A549-Cell بعد مرور 72 ساعة في تراكيز مختلفة.



الشكل (5) A - خلايا سرطان الرئة A549 غير المعرضة للمستخلص المائي لنبات الشمندر B - خلايا سرطان الرئة A549 المعرضة للمستخلص المائي لنبات الشمندر

- المناقشة Discussion

1- الكشف الكيميائي عن المركبات الفعالة للمستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *Beta vulgaris*.

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Rehman *et al.*, 2021)، الذين استخدموا طريقة استخلاص جهاز السوكسلت لتحضير مستخلصات الأوراق والجذور الخام وأفادوا أن التحليل الكيميائي النباتي لمستخلصات الجذور والأوراق أظهر وجود مركبات الفلافونويد، الفينولات، القلويدات، الصابونين والجليكوسيدات. علاوة على ذلك، اتفقت النتائج مع (Arjeh *et al.*, 2022)، الذي تم حصاد جذور *Beta vulgaris* من مقاطعة أذربيجان الغربية، إيران، وأعطى مستخلص القشرة للجذور قيمًا أعلى للمركبات في جميع التجارب التي أجريت مقارنة بالأجزاء الطازجة في مذيب الإيثانول والميثانول، والذي اتفق مع دراسة مختلفة (Kujala *et al.*, 2000) التي بينت أن المركبات الفينولية تتوزع في الغالب على الأجزاء الخارجية من الجذر. كانت كمية المركبات الفينولية في القشرة (19.7 ± 1.1 g/mg db) أكثر من ضعف الكمية في الجزء الطازج (8.3 ± 0.0 g/mg db) علاوة على ذلك، كان للمذيبات أيضًا تأثير معنوي على كمية المركبات الفينولية، وكان الميثانول أكثر فعالية من الإيثانول في استخلاص المركبات الفينولية كما أشار (Barreca *et al.*, 2016).

بالإضافة إلى ذلك، أيد (El-Beltagi *et al.*, 2022) هذه النتائج عندما تم تحديد إجمالي البوليفينول بواسطة اختبار Folin-Ciocalteu، حيث كانت المركبات النشطة بيولوجيًا السائدة (832 mg / 100 gm) في مستخلص الجذور. علاوة على ذلك، تمثل مركبات الفلافونويد ما يقرب من 25% (234 mg / 100 gm) من إجمالي البوليفينول الموجود في مستخلص الجذر. وفي الوقت نفسه، وصل محتوى البيتالين (betalains) إلى 535 mg/100 gm. وكانت هذه النتائج التي تم الحصول عليها أعلى من تلك التي تم تقييمها بواسطة (Tumbas Šaponjac *et al.*, 2016)، والتي أظهرت محتويات البوليفينول الإجمالية (326.51).

و (mg betanin / 100 gm 60.52) والبيتالين (mg RE / 100 gm 10.23)، والفلافونويدات (mg GAE / 100 gm 61.33) في مستخلص الإيثانول المائي من ثفل الشمندر المجفف. بالإضافة إلى ذلك، كانت النتائج التي تم الحصول عليها أقل من تلك التي تم تقييمها من قبل (Lazār et al., 2020)، الذين أظهروا أن مستخلص مسحوق قشر الشمندر المائي يحتوي على نسبة عالية من محتوى البوليفينوليك وفقاً لـ (Vulić et al., 2012).

2- التأثير السمي الخلوي للمستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *Beta vulgaris* على خط الخلايا الطبيعية REF

أظهرت نتائج السمية الخلوية أن التركيز المسبب لتنشيط تكاثر الخلايا الطبيعية REF بنسبة 50 (IC50) بواسطة المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *Beta vulgaris* كان 6.35 mg/ml كما في الشكل (2-4). كما أظهرت النتائج تغيّراً في نسبة حيوية الخلايا في التراكيز المستخدمة المختلفة كما في الجدول (2-4). أن النتائج التي تم الحصول عليها كانت متوافقة مع (Saber et al., 2022)، الذي درس تأثيرات الشمندر الأحمر والبيتالين على خطوط خلايا سرطان القولون والمستقيم البشرية بعد العلاج بجرعات مختلفة (20 إلى 140 ميكروغرام/مل) من مستخلص الشمندر والبيتالين خلال (24 و 48 ساعة). تم تحديد IC50s على أنها 92 ميكروغرام/مل، 107 ميكروغرام/مل و 64 ميكروغرام/مل، 90 ميكروغرام/مل في خطوط الخلايا HT-29 و Caco-2 عند 48 ساعة، على التوالي. كما أظهرت النتائج عدم تأثيرها على خطوط الخلايا الطبيعية KDR/293 (المجموعة الضابطة) بأعلى تركيز محدد (140 ميكروغرام/مل) عند 24 ساعة و 48 ساعة. كما أشار (Saber et al., 2022) إلى أن مستخلص الشمندر والبيتالين يثبط بشكل كبير نمو خطوط الخلايا HT-29 و Caco-2 بطريقة تعتمد على الوقت والجرعة، مع زيادة التركيزات من 40 إلى 100 ميكروغرام/مل للبيتالين و 60 إلى 100 ميكروغرام/مل لمستخلص الشمندر.

ومع ذلك، فقد وجد (Bouchmaa et al., 2022) أن المستخلص الميثانولي لأوراق *B. vulgaris* subsp ليس له أي تأثير سام للخلايا ضد الخلايا الطبيعية (PBMCS) ($IC_{50} > 50$ ميكروغرام/مل). وعلى العكس، وجد أن المستخلص يتمتع بقدرة قتل انتقائية للغاية ضد سرطان الثدي السلبي الثلاثي (TNBC) وخطوط خلايا سرطان الثدي الإيجابية (MDA-MB-468) و (MCF-7). كذلك، وجد (Rehman et al., 2021) أن مستخلص الجذر يحمل قيمة IC_{50} تبلغ 2.32 ± 0.72 ميكروغرام/مل مقارنة بمستخلص الأوراق (2.20 ± 0.72 ميكروغرام/مل). قد يكون السبب وراء انخفاض قيمة IC_{50} لمستخلص الأوراق هو أنه يحتوي على محتوى فينولي أكبر مقارنةً بمستخلص الجذر، وأشار إلى أن انخفاض IC_{50} يرتبط بالنشاط العلاجي الكبير للمكونات النشطة بيولوجيًا الموجودة في المستخلصات. ويعزى ذلك إلى أن البيتالين، الذي يشكل أكثر من 95% من إجمالي البيتاسيانين، غير سام بتركيزات مختلفة على الخلايا البطانية للوريد السري البشري والخلايا الليفية البشرية الطبيعية، كما يمنع إنتاج أنواع الأكسجين التفاعلية ويقلل مستوى أنواع الأكسجين التفاعلية داخل الخلايا (Loo et al., 2003).

3- تأثير المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *beta vulgaris* على خط خلايا سرطان الرئة A549

اتفقت النتائج مع (El-Beltagi et al., 2022) على أن النشاط السام لمستخلص الجذر كعامل مضاد للسرطان (باتجاه الرئة) حيث انخفضت النسبة المئوية لخط خلايا سرطان الرئة A549 مع زيادة تركيزات المستخلص الميثانولي لجذر *Beta vulgaris*. من ناحية أخرى، لم تتأثر خلايا سرطان القولون والمستقيم الغدي Caco-2 بجميع تراكيز مستخلص الجذر باستثناء التركيزات العالية (800 ميكروغرام/مل) التي أظهرت انخفاضاً طفيفاً في صلاحية خط خلايا Caco-2. كما أظهرت النتائج اتفاقاً مع (El-Mesallamy et al., 2020) على أنه تم تحديد السمية الخلوية باستخدام مقايصة MTT للمستخلص الميثانولي، والتي أظهرت نشاطاً معنوياً مضاداً للسرطان ضد سرطان البنكرياس (PANC-1) بمعدل ($IC_{50} = 3.69$ ميكروغرام/مل)، نشاط معتدل سام للخلايا ضد HepG2 مع ($IC_{50} = 4.43$ ميكروغرام/مل)، سرطان الرئة (A549) مع ($IC_{50} = 4.9$ ميكروغرام/مل)، ونشاط ضعيف ضد سرطان البروستاتا (PC-3) مع ($IC_{50} = 6.1$ ميكروغرام/مل).

وقد بين (Kim, 2013) أن الاستراجالين كان ساماً لخلايا سرطان الكبد البشري (HepG2) المزروعة. كما أدى إلى انخفاض بقاء الخلايا وزيادة موت الخلايا المبرمج لخطوط خلايا سرطان الرئة البشرية المزروعة A549 و (H1299)، ولكن ليس في خلايا الرئة الطبيعية (BEAS-2B) وفقاً لـ (Hu et al., 2017). إن آلية الانتقائية تجاه الورم مقابل الخلايا الطبيعية غير معروفة، ولكن مضادات الأكسدة يمكن أن تمنع نمو الخلايا السرطانية من خلال توقف دورة الخلية أو موت الخلايا المبرمج عن طريق استنفاد أنواع الأكسجين التفاعلية لأن نمو الخلايا السرطانية يعتمد على (H_2O_2) كما أشار (Loo et al., 2003).

ووجد (Maurya et al., 2010) أن حمض الغاليك يتم توزيعه على نطاق واسع في النباتات والفواكه والأطعمة وله مجموعة من الأنشطة البيولوجية. في هذه الدراسة، تم استكشاف الآليات المحتملة لخصائص حمض الغاليك المضادة للسرطان في خط خلايا سرطان الرئة A549. بينما ذكر (Chandrasekaran et al., 2022) أن التأثيرات السامة للخلايا للبيتالين تعتمد على الجرعة خلال 24 ساعة (20-100 ميكرومتر/مل) وتزداد تأثيرات السمية الخلوية بطريقة تعتمد على التركيز. وكان IC_{50} للسمية الخلوية مع البيتالين 73.5 ميكرومتر/مل. وقد لوحظت فعالية السمية الخلوية للبيتالين كعامل مضاد للسرطان، حيث أظهر التأثير على خلايا سرطان الرئة A549 من خلال الفحص المجهرى، حيث يؤدي مركب البيتالين النباتي النشط بيولوجياً إلى موت الخلايا المبرمج، مما يؤدي إلى موت الخلايا وظهور فقاعات وانهايار وتسرب العضيات الداخلية.

References

- Abdullah, S. A., Al-Shammari, A. M., & Lateef, S. A. (2020). Attenuated measles vaccine strain have potent oncolytic activity against Iraqi patient derived breast cancer cell line. *Saudi journal of biological sciences*, 27(3), 865-872.
- Arjeh, E., Khodaei, S. M., Barzegar, M., Pirs, S., Karimi Sani, I., Rahati, S., & Mohammadi, F. (2022). Phenolic compounds of sugar beet (*Beta vulgaris* L.): Separation method, chemical characterization, and biological properties. *Food Science & Nutrition*, 10(12), 4238-4246.
- Barreca, D., Laganà, G., Leuzzi, U., Smeriglio, A., Trombetta, D., & Bellocchio, E. (2016). Evaluation of the nutraceutical, antioxidant and cytoprotective properties of ripe pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) hulls. *Food chemistry*, 196, 493-502.
- Betancur-Galvis, L. A., Saez, J., Granados, H., Salazar, A., & Ossa, J. E. (1999). Antitumor and antiviral activity of Colombian medicinal plant extracts. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94, 531-535.
- Chakole, R., Zade, S., & Charde, M. (2011). Antioxidant and anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Beta vulgaris* Linn. roots. *International Journal of Biomedical and Advance Research*, 2(4), 124-130.
- Chandrasekaran, R., Yadav, S. A., Periakaruppan, R., Prabukumar, S., Abomughaid, M. M., Al-Dayyan, N., ... & Dhanasekaran, S. (2021). Augmented cell signaling by betanin insights cancer cell remodeling: A molecular docking and experimental approach. *Biointerface Res Appl Chem*, 3, 3161.
- Clifford, T., Bell, O., West, D. J., Howatson, G., & Stevenson, E. J. (2017). Antioxidant-rich beetroot juice does not adversely affect acute neuromuscular adaptation following eccentric exercise. *Journal of sports sciences*, 35(8), 812-819.
- El Gamal, A. A., AlSaid, M. S., Raish, M., Al-Sohaibani, M., Al-Massarani, S. M., Ahmad, A., ... & Rafatullah, S. (2014). Beetroot (*Beta vulgaris* L.) extract ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity associated oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rodent model. *Mediators of inflammation*, 2014.
- El-Beltagi, H. S., El-Mogy, M. M., Parmar, A., Mansour, A. T., Shalaby, T. A., & Ali, M. R. (2022). Phytochemical characterization and utilization of dried red beetroot (*Beta vulgaris*) peel extract in maintaining the quality of Nile Tilapia Fish Fillet. *Antioxidants*, 11(5), 906.
- El-Beltagi, H. S., El-Mogy, M. M., Parmar, A., Mansour, A. T., Shalaby, T. A., & Ali, M. R. (2022). Phytochemical characterization and utilization of dried red beetroot (*Beta vulgaris*) peel extract in maintaining the quality of Nile Tilapia Fish Fillet. *Antioxidants*, 11(5), 906.
- El-Mesallamy, A., El-Latif, A., Ahlam, E. S., El-Azim, A., Hassan, M., Mahdi, M. G., & Hussein, S. A. A. (2020). Chemical composition and biological activities of red beetroot (*Beta Vulgaris* Linnaeus) roots. *Egyptian journal of chemistry*, 63(1), 239-246.
- Freshney, R.I. (2000). *Culture of animal cells: A manual for basic technique* (4th ed.) Wiley-liss, A John wiley and sons, Inc. publication, New York.
- Freshney, R.I. (1994). *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. New York.
- Hu, T., Liu, Q. M., He, X. W., Huang, F., Zhang, M. W., & Jiang, J. G. (2017). Identification of bioactives from *Astragalus chinensis* Lf and their antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative effects. *Journal of food science and technology*, 54, 4315-4323.
- Hussein, N., & Ameer, N. (2017). The Antimicrobial Activity of *Eucalyptus Camaldulensis* Leaves against Bacteria Cause Urinary Tract Infection. *Al- Mustansiriyah Journal of Science*, 28(1).

- Indu, R., Adhikari, A., Ray, M., Hazra, A. K., Sur, T. K., & Das, A. K. (2017). Antioxidant properties of polyphenolic rich HPLC standardized extract of *Beta vulgaris* L. roots. *International Journal of Research and Development in Pharmacy & Life Sciences*, 6(3), 2619-2624.
- Keskin, C., Özen, H. Ç., Toker, Z., Kızıl, G., & Kızıl, M. (2018). Determination of in vitro antioxidant and antimicrobial properties of shoot and root extracts of *Astragalus diphtherites* FENZL var. *diphtherites* and *Astragalus gymnales* RECH. FIL. obtained by different solvents.
- Khashan, K. S., Sulaiman, G. M., Hussain, S. A., Marzoog, T. R., & Jabir, M. S. (2020). Synthesis, characterization and evaluation of anti-bacterial, anti-parasitic and anti-cancer activities of aluminum-doped zinc oxide nanoparticles. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 30(9), 3677-3693.
- Kim, Y. J. (2013). Rhamnetin attenuates melanogenesis by suppressing oxidative stress and pro-inflammatory mediators. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 36(8), 1341-1347.
- Kujala, T. S., Lopenen, J. M., Klika, K. D., & Pihlaja, K. (2000). Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: Distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(11), 5338-5342.
- Kúsz, N., Stefkó, D., Barta, A., Kincses, A., Szemerédi, N., Spengler, G., ... & Vasas, A. (2021). Juncaceae species as promising sources of phenanthrenes: antiproliferative compounds from *Juncus maritimus* Lam. *Molecules*, 26(4), 999.
- Lazăr, S., Constantin, O. E., Horincar, G., Andronoiu, D. G., Stănciuc, N., Muresan, C., & Răpeanu, G. (2022). Beetroot by-product as a functional ingredient for obtaining value-added mayonnaise. *Processes*, 10(2), 227.
- Loo, G. (2003). Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation. *The Journal of nutritional biochemistry*, 14(2), 64-73.
- Loo, G. (2003). Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation. *The Journal of nutritional biochemistry*, 14(2), 64-73.
- Maurya, D. K., Nandakumar, N., & Devasagayam, T. P. A. (2010). Anticancer property of gallic acid in A549, a human lung adenocarcinoma cell line, and possible mechanisms. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 48(1), 85-90.
- Ma, W., Zhang, Y., Ding, Y. Y., Liu, F., & Li, N. (2016). Cytotoxic and anti-inflammatory activities of phenanthrenes from the medullae of *Juncus effusus* L. *Archives of pharmacological research*, 39, 154-160.
- Naing, W. (2018). Preliminary Phytochemical Investigation and Antioxidant Activity of leaves from *Carica papaya* Linn; *Thin-Baw* and leaves of *Dolichandrone spathacea* (Lf) *Tha-khut*.
- Petrovska, B. B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy reviews*, 6(11), 1.
- Rehman, S., Shah, S., Butt, A. M., Shah, S. M., Jabeen, Z., & Nadeem, A. (2021). Biochemical profiling and elucidation of biological activities of *Beta vulgaris* L. leaves and roots extracts. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 592-602.
- Roy, A., & Bharadvaja, N. (2017). Medicinal plants in the management of cancer: a review. *Int J Complement Alt Med*, 9(2), 00291.
- Saber, A., Abedimanesh, N., Somi, M. H., & Khosroushahi, A. Y. (2021). Antiproliferative and apoptotic effects of red beetroot and betanin on human colorectal cancer cell lines.
- Singh, A., Garg, V. K., & Sharma, P. K. Wound healing activity of ethanolic extract of *Beta vulgaris*. *Pharmacologyonline*. 2011; 1: 1031-1038.
- Stefkó, D., Kúsz, N., Szemerédi, N., Barta, A., Spengler, G., Berkecz, R., ... & Vasas, A. (2022). Unique Phenanthrenes from *Juncus ensifolius* and Their Antiproliferative and

Synergistic Effects with the Conventional Anticancer Agent Doxorubicin against Human Cancer Cell Lines. *Pharmaceutics*, 14(3), 608.

- Tumbas Šaponjac, V., Čanadanović-Brunet, J., Četković, G., Jakišić, M., Djilas, S., Vulić, J., & Stajčić, S. (2016). Encapsulation of beetroot pomace extract: RSM optimization, storage and gastrointestinal stability. *Molecules*, 21(5), 584.
- Yaseen, N. Y. (1990). Cytogenetic study on human colorectal cancer cells (Doctoral dissertation, University of Sheffield, Department of Experimental and Clinical Microbiology).