دراسة التاثير السمي للمستخلصات الكحولية لنبات الوسمة *Isatis tinctoria* في بعض الخطوط الخلايا السرطانية

ابراهيم هادي محمد خزعل ضبع وادي رياض حميد نصيف

قسم علوم الحياه – كلية العلوم ديالىBioteciraq@yahoo.com

الخلاصة

اجريت هذه الدراسة لمعرفة تاثير بعض المكونات الفعالة الموجودة في اوراق نبات الوسمة اذ تم استخدام مستخلصات مائية وكحولية من اوراق نبات الوسمة ودراسة التأثير السمي لهذه المستخلصات على نمو الخلايا الورمية المتمثلة بخط خلايا سرطان الرحم Hela cell line وسرطان العضلة البشري RD ومقارنتها في المختبر وقد اظهرت النتائج فروق معنوية في التاثير السام على الخطوط السرطانية اعتمادا على التركيز ومدة التعريض حيث شملت الدراسة فترة تعريض 24 و48 ساعة. وأظهرت النتائج ان التأثير السمي لكلا المستخلصين الخام اعتمد على التركيز المستخدم وذلك باستخدام تسعة تراكيز لكل منهما وهي (31.5، 62.5، 125، 250، 500,1000,2000,4000,8000) مايكروغرام مل$^{-1}$، كان للمستخلص المائي الخام تأثير معنويً ($P<0.05$) في خط خلايا (Hella) من تعريضها للتراكيز المستخدمة، وكانت أعلى نسبة تثبيط نمو عند التركيز 8000 مايكروغرام مل$^{-1}$ للمستخلصين أذ بلغت 75.69% و93.09 على التوالي بعد مدة تعريض 48 ساعة، وبلغت اعلى نسبة تثبيط نمو في خط خلايا (RD) للمستخلص المائي 71.42% عند التركيز 8000 مايكروغرام مل$^{-1}$. وكانت نسبة تثبيط هذا المستخلص لخط خلايا وللتركيزنفسه 77.8% بعد مدة حضن 48 ساعة.

الكلمات المفتاحية: الخلايا السرطانية، نبات الوسمة، القلويدات.

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 وتستخدم بعض منها 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 وتعد 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 اوفي مرحلة تسبق الانقسام او تحفيز الخلايا السرطانية للدخول في مرحلة الموت المبرمج Apoptosis (3). ومن أهم هذه القلويدات vinca alkaloid (vincristine، vinblastine) colchicine ومaytansine و(taxanes، paclitaxel) وخاصة docetaxel التي تستخدم بشكل كبير بوصفها مركبات مضادة للانقسام من خلال عملها على ديناميكية نبيبات المغزل (خيوط المغزل) التي لها دور مهم في انفصال الكروموسومات خلال الانقسام الخيطي (4) ونظراً للدور الذي تقوم به النبيبات الدقيقة في انقسام الخلية

الامرالذي جعلها الهدف المناسب لتطور ادوية العلاج الكيميائي Chemotherapeutic drugs ضد النمو السريع والتوالد غيرالطبيعي للخلايا السرطانية، لذا صار التوجه للبحث عن انواع اخرى من المركبات منها الكلايوسيدات لاستخلاصها ومعرفة تاثيرها في الانقسام. ونظراُ لاحتواء نبات الوسمة على مركبات الكلايوسيدات لذا تم اختيار النبات. نبات الوسمة الاسم الشائع له هو: *Isatis tinctoria* يُطلق على هذا النبات عدة أسماء في اللغة العربية منها: ورد النيل يصنف نبات الوسمة ضمن رتبة القرنفليات فصيلة الصليبية وأغلب نباتات هذه العائلة سامة (5). الوسمة من نباتات الزينة تزرع في الحدائق لتعطي في السنة الاولى الاوراق مفيدة لتصنيع الاصباغ والسنة الثانية تعطي زهور جذابة، غالبا مايستخدم في تزيين الحدائق والمتنزهات والطرق الخارجية. ويستوطن بلاد الشام والمغرب العربي، وكل مناطق اوروبا لكونه حساساً لدرجات الحرارة المنخفضة وينتشر النبات في شمال مناطق العراق (6). أتجهت أنظار الباحثين في السنوات الأخيرة الى أهمية استخدام بعض الأعشاب الطبية في محاولة لعلاج مرض السرطان منها مادة قلويد Tryptanthrin المعزول من نبات الوسمة *Iastis tinctoria* 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 لاختبار فعالية المستخلصات النباتية سعياً ومحاولة لإيجاد مواد فعالة ضد مرض السرطان.

المواد وطرائق البحث

الشكل 1. نبات الوسمة *Isatis tinctoria*

تم الحصول على النبات من شمال العراق وتم تصنيف النبات من قبل الدكتور خزعل ضبع وادي في كلية العلوم جامعة ديالى، واجريت خطوات العمل كالآتي:

1- حضرت المستخلصات النباتية للمستخلصات المائية الخام بحسب ما ورد في Mukherjee وآخرون (2001)، وحضرت المستخلصات الكحولية الخام للنبات باستخدام جهاز السكسوليت Soxhlet، وحسب الطريقة المتبعة في Lopus (2006).

2- خطوط الخلايا السرطانية اشتملت نوعين من خطوط الخلايا السرطانية:

أ- خط خلايا سرطان الرحم استعمل هذا الخط عند التمريرة 250.

ب- خط خلايا سرطان العضلة البشري استعمل هذا الخط عند التمريرة 235.

تم الحصول على هذه الخطوط المذكورة وهي منماة على وسط RPMI1640 المزود 10% مصل العجل البقري واجريت الخطوات الخاصة بالزرع النسيجي تحت ظروف معقمة بحسب Freshney (1994) وكالآتي: أضيف 2 مل من محلول التربسين – فرسين 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 (12) 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 نحو10 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

جُهز عالق الخلايا عن طريق أضافة محلول (التربسين – فرسين) 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 المائي والكحولي باستعمال الوسط الزرعي الخالي من المصل Serum Free Media (SFM) وهي (62.5، 31.5، 125، 250، 500، 1000، 2000، 4000، 8000) مايكروغرام مل$^{-1}$، 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 طريقة Hoesel ، (1999). أخرج الطبق من الحاضنة وأضيف µl 50 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 Honda, وTostirisuk ، (1989) من خلال تحويل قيم التأثير السمي للمستخلصين المائي والكحولي لنبات المديد في الخطوط الخلوية السرطانية الى نسب مئوية:

Inhibition Rate (IR)% = (A-B/A) x 100

النتائج والمناقشة

الخط الخلوي السرطاني Hella

المستخلص المائي والكحولي لنبات الوسمة لمدة تعريض 24 ساعة

يبين الجدول 1 إن لهذا المستخلص المائي تأثيراً مثبطاً في نمو الخط الخلوي السرطاني Hella ولمدة تعريض 24 ساعة، بدأ بالتركيز 62.25 مايكروغرام مل$^{-1}$ وبفرق معنوي عن السيطرة إذ بلغت نسبة التثبيط 7.9% عند التركيز 62.25 مكغم مل$^{-1}$ وأزدادت إلى 50.00% و72.69% عند إستخدام التركيزين 4000 و8000 مكغم مل$^{-1}$ على التوالي، وكانت الفروق معنوية بين جميع التراكيز المستخدمة والسيطرة ما عدا أقل تركيزين وهما 15.625 و31.25 مكغم مل$^{-1}$ وبين التركيزين 500 و1000 وبين التركيزين 1000 و2000 مكغم مل$^{-1}$ على التوالي وهناك فرق معنوي بين كافة التراكيز الاخرى. يبين الجدول 1 إن للمستخلص الكحولي تأثيراً مثبطاً في نمو الخط الخلوي السرطاني Hella ولمدة تعريض 24 ساعة، بدءاً بالتركيز 15.6 مايكروغرام مل$^{-1}$ وبفرق معنوي عن السيطرة إذ بلغت نسبة التثبيط 14.70%، وإزدادت النسبة إلى 61.62% عند التركيز 1000 مكغم مل$^{-1}$ وتدريجيا إلى 91.87% عند التركيز8000 مكغم مل$^{-1}$. وكان هناك فرق معنويٌ بين التراكيز المستخدمة والسيطرة ولم يكن الفرق معنوياً بين التركيزين 62.5 و125 مايكروغرام مل$^{-1}$ وهناك فرق معنوي بين كافة التراكيز الاخرى.

الجدول 1. تاثير تراكيز مختلفة من المستخلص المائي والكحولي الخام لاوراق الوسمة على نسب التثبيط في الخط السرطاني Hella لمدة تعريض 24 ساعة (المتوسط ± الخطا القياسي)

التركيز µg ml^{-1}	المستخلص المائي الخام نسبة التثبيط ±الخطأ القياسي	المستخلص الكحولي الخام نسبة التثبيط± الخطأ القياسي
السيطرة	h 0.00±1.15	j 0.00± 1.17
15.625	h 0.64± 1.48	i 0.24± 5.40
*31.25	h 0.79± 4.09	h 0.79±14.70
*62.5	f 0.81±7.86	g 0.81± 18.61
*125	f 0.30± 13.16	g 0.30±20.95
250	e 0.23±24.89	f 0.23±34.90
*500	d 0.33± 31.28	e 0.33±47.73
*1000	dc 1.12± 36.21	d 1.12± 61.62
*2000	c 0.37± 41.28	c 0.37± 70.46
*4000	b 0.60±50.50	b 0.60± 75.08
*8000	a 3.93± 72.69	a 3.93± 91.87

- الحروف المختلفة في العمود الواحد تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى (P<0.05).

المستخلص المائي والكحولي لنبات الوسمة ولمدة تعريض 48 ساعة

لوحظ من الجدول 2 من خلال تجارب إختبار سمية المستخلص المائي الخام لنبات الوسمة في خلايا Hella لمدة 48 ساعة بأن الفعالية التثبيطية كانت أعلى مما كانت عليه عند التعريض لمدة 24 ساعة، إلا أن سلوكية تلك المستخلصات مع الخلايا لم تتغير. وبدءاً بالتركيز 62.5 مكغم مل$^{-1}$ ظهرفرق معنوي بالمقارنة مع السيطرة إذ بلغت نسبة التثبيط 8.83% وأزدادت إلى 50.93% و75.69% عند

إستخدام التركيزين 4000 و8000 مكغم مل$^{-1}$ على التوالي. كانت الفروق معنوية بين جميع التراكيز المستخدمة والسيطرة ما عد بين التركيز 62.5 و125 و بين التركيز 1000 و2000 مكغم مل$^{-1}$ لم تكن هناك فروق معنوية، يبين الجدول 2 إن للمستخلص الكحولي تأثيراً مثبطاً في نمو الخط الخلوي السرطاني Hella بدءاً بالتركيز 15.6 مايكروغرام مل$^{-1}$ وبفرق معنوي عن السيطرة إذ بلغت نسبة التثبيط 15.42%، وإزدادت النسبة إلى 62.28% عند التركيز 1000 كغم مل$^{-1}$ وتدريجيا إلى 93.09% عند التركيز8000 مكغم مل$^{-1}$. وكان هناك فرق معنويٌ بين التراكيز المستخدمة والسيطرة ولم يكن الفرق معنوياً بين التركيزين 62.5 و125 مايكروغرام مل$^{-1}$ وهناك فرق معنوي بين كافة التراكيز الاخرى.

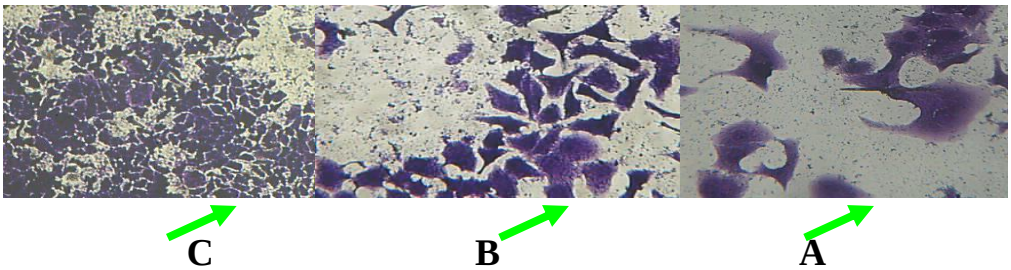
الجدول 2. تاثير تراكيز مختلفة من المستخلص المائي والكحولي الخام لاوراق الوسمة على نسب التثبيط في الخط السرطاني Hella لمدة تعريض 48 ساعة (المتوسط ± الخطا القياسي)

التركيز µg ml^{-1}	المستخلص المائي الخام نسبة التثبيط ±الخطأ القياسي	المستخلص الكحولي الخام نسبة التثبيط± الخطأ القياسي
السيطرة	h 0.00±1.17	j 0.00± 1.18
15.625	h 0.11± 1.74	i 0.62± 5.58
*31.25	h 0.16± 4.61	h 0.65±15.24
*62.5	f 0.28±8.38	g 1.12± 19.17
*125	f 3.88± 13.81	g 0.26±21.74
250	e 0.55±23.73	f 0.70±35.76
*500	d 0.33± 32.40	e 0.64±48.72
*1000	dc 0.32± 37.12	d 1.12± 62.28
*2000	c 4.40± 41.92	c 0.43± 72.31
*4000	b 0.39±50.93	b 0.33± 76.61
*8000	a 1.17± 75.69	a 3.70± 93.09

* الحروف المختلفة في العمود الواحد تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى ($P\leq0.05$).

مقارنة التأثير السمي على الخط Hella بتأثير المستخلصين المائي والكحولي لنبات الوسمة

لم يكن هناك أي فرق معنوي في نسبة التثبيط للخلايا السرطانية Hella للمستخلصين المائي والكحولي الخام وبعد مدة تعريض اربعة وعشرين ساعة وعند التراكيز 15.5 و62.5 و250 مايكرغرام مل$^{-1}$ في حين اظهرت التراكيز الاخرى وجود فروق معنوية **($P\leq0.05$)** بالنسبة للتثبيط ما بين المستخلصين المائي الخام والكحولي الخام وكانت جميعها لصالح المستخلص الكحولي الخام، الجدول 2.



الشكل 2. مقارنة بين خلايا Hella عند تركيز 8000 مكغم مل$^{-1}$ بعد 48 ساعة للمستخلص المائي والكحولي

(A) الخط الخلوي السرطاني Hella الذي يمثل السيطرة (B) الخط الخلوي Hella المعامل بالمستخلص المائي عند تركيز 8000 مكغم مل$^{-1}$ ويوضح الفراغات بين الخلايا. (C) الخط Hella المعامل بالمستخلص الكحولي عند تركيز 8000مكغم مل$^{-1}$ ويوضح الفراغات بين الخلايا.

الخط الخلوي RD

المستخلص المائي والكحولي لنبات الوسمة لمدة تعريض 24 ساعة

يتبين من الجدول 3 ان للمستخلص المائي لنبات الوسمة تاثيرا معنويا مثبطا لخلايا السرطان RD مقارنة مع مجموعة السيطرة **(P≤0.05)** ولجميع التراكيز ومن جانب تفوق التركيز 8000 مايكروغرام مل$^{-1}$ على بقية التراكيز الاخرى ثم تلاه التراكيز(4000 و20000 و1000و500 و250 و125 و62.5 و31.5) واخيرا التركيز 15.5 مكغم مل$^{-1}$. ومن ناحية اخرى لم تكن هناك اي فروق معنوية بين التركيزين 500 و1000مكغم مل$^{-1}$ وبين التركيزين 1000 و2000 مايكروغرام مل$^{-1}$.

الجدول 3. تاثير تراكيز مختلفة من المستخلص المائي والكحولي الخام لاوراق الوسمة على نسب التثبيط في الخط السرطاني RD لمدة تعريض 24 ساعة (المتوسط ± الخطا القياسي)

التركيز ml^{-1} µg	المستخلص المائي الخام نسبة التثبيط ±الخطأ القياسي	المستخلص الكحولي الخام نسبة التثبيط± الخطأ القياسي
السيطرة	J 0.00±1.14	j 0.00± 1.15
15.625	i 0.014± 1.50	i 0.17± 5.40
31.25	h 0.45± 5.41	i 0.49±6.75
*62.5	f 0.33±8.98	h 0.36± 10.48
*125	f 0.33± 9.99	g 0.31±13.13
*250	e 1.40±12.53	f 0.79±17.08
500	d 0.33± 17.53	e 0.63±21.35
1000	dc 3.18± 23.82	d 1.36± 32.81
*2000	c 0.48± 31.71	c 1.20±52.86
*4000	b 1.99±40.15	b 0.59± 67.75
*8000	a 0.86± 68.86	a 0.58±76.31

* الحروف المختلفة في العمود الواحد تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى (P≤0.05).

المستخلص المائي والكحولي ولمدة تعريض 48 ساعة

إن تعريض خلايا RD بالمستخلصات المائي الخام للوسمة بجميع تراكيزها لمدة 48 ساعة أظهر فعاليات تثبيطية تفوق تلك التي أظهرتها مثيلاتها من المستخلص ذاته والتركيز ذاته عندما كانت مدة التعريض 24 ساعة، فقد أعطى المستخلص المائي الخام فعالية تثبيطية بلغت 31.71، 68.86% عند التركيزين 2000، 8000 مايكروغرام مل$^{-1}$ على التوالي عندما كانت مدة التعريض 24 ساعة، بينما بلغت 33.22، 71.24% عند التركيزين ذاتهما على التوالي عند مدة التعريض 48 ساعة، هذه النتائج يوضحها الجدول 4. إن للمستخلص الكحولي تأثيراً مثبطاً في نمو الخط الخلوي السرطاني RD بدءاً بالتركيز 15.62 مايكروغرام مل$^{-1}$، وبفرق معنوي عن السيطرة بنسبة تثبيط 5.36 %. وازدادت النسبة اذ بلغت 68.57% عند التركيز 4000 مايكروغرام مل$^{-1}$ وإزدادت حتى بلغت 77.85% عند التركيز 8000 مكغم مل$^{-1}$. هناك الفرق معنوياً بين التراكيز كافة والسيطرة بينما لم يظهر وجود فرق معنوي بين التركيزين 15.62 و31.25 مايكروغرام مل$^{-1}$ لم يظهرا اي فرق معنوي بينهما.

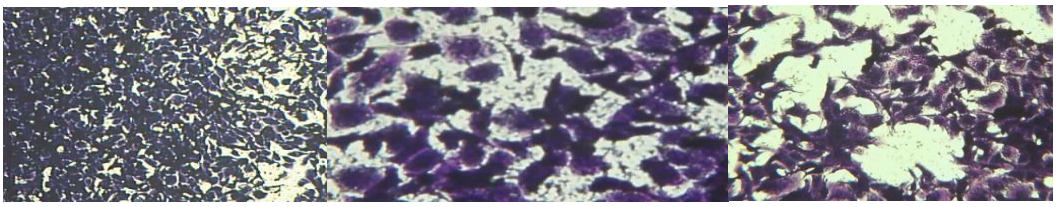
الجدول 4. تاثير تراكيز مختلفة من المستخلص المائي والكحولي الخام لاوراق الوسمة على نسب التثبيط في الخط السرطاني RD لمدة تعريض 48 ساعة (المتوسط ± الخطا القياسي)

التركيز $\mu g\ ml^{-1}$	المستخلص المائي الخام نسبة التثبيط ±الخطأ القياسي	المستخلص الكحولي الخام نسبة التثبيط± الخطأ القياسي
السيطرة	i 0.00±1.15	j 0.00± 1.15
15.625	i 0.00± 1.16	i 0.22± 5.36
31.25	h 0.34± 6.29	i 0.15±6.98
*62.5	fh 0.25±9.60	h 0.36± 11.48
*125	gf 0.60± 10.55	g 0.56±14.17
*250	f 0.18±13.78	f 0.62±18.08
*500	e 0.78± 18.61	e 1.31±23.32
1000	d 3.37± 25.25	d 1.36± 33.52
*2000	c 0.58± 33.22	c 0.92±54.92
*4000	b 2.60±45.41	b 0.88± 68.75
8000	a 2.46± 71.42	a 0.93±77.85

* الحروف المختلفة في العمود الواحد تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى (P>0.05) بحسب اختبار دنكن المتعدد الحدود.

مقارنة التأثير السمي على الخط السرطاني RD بتأثير المستخلصين المائي والكحولي الخام

وجد من النتائج التي اعتمدت على نسب تثبيط الخلايا السرطانية RD ان هناك اختلاف في سمية المستخلصين . عند فترة تعريض 24 ساعة وجد ان التراكيز الاقل من 62.5 تقاربت نسب التثبيط لكلا المستخلصين وعند التراكيز التي تراوحت بين 62.5 و250 مايكروغرام مل$^{-1}$ كانت هذه الخلايا اكثر حساسية للمستخلص القلويدي الخام وكانت نسب التثبيط 10.48 و13.13 و17.07%. قد اظهرت فرقا معنوي بينهما وبين نسب التثبيط للمستخلص المائي الخام التي كانت 8.98 و9.99 و12.77%. عند التراكيز التي تراوحت بين 500 و1000 مكغم مل$^{-1}$ كانت نسب التثبيط للمسخلصين متقاربا وعند التراكيز الاعلى اصبح تاثير المستخلص الكحولي اكثر حساسية وبفارق معنوي عن المستخلص المائي الخام وكانت نسب التثبيط 67.75 و76.31% عند التركيزين 4000 و8000 مكغم مل$^{-1}$ للمستخلص الكحولي الخام وبين نسب تثبيط المستخلص المائي التي كانت 31.5 و68.86% على التوالي. عند مدة تعريض 48 ساعة وجد ان التراكيز الاقل من 62.5 مايكروغرام مل$^{-1}$ تقاربت نسب التثبيط لكلا المستخلصين وعند التراكيز التي تراوحت بين 62.5 و500 مايكروغرام مل$^{-1}$ كانت هذه الخلايا اكثر حساسية للمستخلص الكحولي الخام وكانت نسب التثبيط. (9.60 و10.55 و13.87و18.61)% قد اظهرت فرقا معنوي بينهما وبين نسب التثبيط للمستخلص المائي الخام التي كانت (9.60 و10.55و13.78 و18.61)% على التوالي. عند التركيز 1000 مكغم مل$^{-1}$ كانت نسب التثبيط للمسخلصين متقاربا وعند التراكيز الاعلى اصبح تاثير المستخلص الكحولي اكثر حساسية وبفارق معنوي عن المستخلص المائي الخام وكانت نسب التثبيط 54.92 و68.75% عند التركيزين 2000 و4000 مكغم مل$^{-1}$ للمستخلص الكحولي الخام وبين نسب تثبيط المستخلص المائي التي كانت 33.22 و45.41% على التوالي.



الشكل 3. مقارنة بين خلايا RD عند تركيز 8000 مكغم مل بعد 48 ساعة تعرض للمستخلصين المائي والكحولي لنبات الوسمة

(A) الخط الخلوي RD الذي يمثل السيطرة ويوضح خلايا الخط الكثيفة. (B) الخط الخلوي RD المعامل بالمستخلص المائي عند تركيز 8000 مكغم مل$^{-1}$ ويوضح الفراغات بين الخلايا. (C) الخط الخلوي RD المعامل بالمستخلص الكحولي عند تركيز 8000 مكغم مل$^{-1}$ 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 (14)، كما يعزى التباين في استجابة الخلايا السرطانية تجاه المستخلصات المستخدمة إلى تباين المستقبلات الموجودة على سطح الخلايا للانواع المختلفة من المستخلصات (15). أظهرت المستخلصات الخام بشكل عام تأثيرات تثبيطية في خلايا Hella وRD معتمدة التركيزوعلى 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 الكحولي الذي أبدى فعالية أعلى من المستخلص المائي في هذه الخلايا. ويرجع سبب ذلك إلى احتواء هذه المستخلصات على مركبات تؤثر في الحالة الفسلجية لهذه الخلايا، واحتوائها على مركبات تعمل على إيقاف دورة الخلايا السرطانية Arrest cell cycle عند طور معين وتمنعها من التكاثر (16)، أو احتوائها على مركبات تحفز الخلايا السرطانية على الموت المبرمج (Apoptosis). حصل (17) على أعلى نسبة تثبيط لخلايا Hep-2 كانت 86.7% عند معاملتها بالتركيز 1000 مايكروغرام مل$^{-1}$ 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 (18) في تأثير مستخلصات نبات السعد على الخطوط الخلوية السرطانية Hep-2 وRD وAMN-3 والخط 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 (19). في هذه الدراسة حقق كل من المستخلصين المائي الخام والكحولي الخام، أعلى نسبة تثبيط في خلايا Hella عند التركيز 8000 مكغم مل$^{-1}$ إذ كانت 75.69 و93.09% على التوالي، بينما كانت نسبة التثبيط في الخط الخلوي RD 71.42 و77.85% على التوالي لمدة يومين. وكان الفرق بينهما معنويا في الجرعات الأدنى من ذلك فقد حقق المستخلص الكحولي الخام نسبة تثبيط أعلى من المائي 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 (20). إذ توصل (21) 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 (22). ان الميزة المهمة في أدوية العلاج الكيميائي هي تهديفها الخلايا السرطانية دون الخلايا الطبيعية، لذا ففي دراستنا الحالية، وجدنا إن مستخلصات نبات الوسمة تؤثر في دورة انقسام الخلية وبأكثر من آلية، كما إنها تؤثر في الخلايا السرطانية من نوع Hella وRD وتؤثر بنسبة اقل في نمو الخلايا الطبيعية عند التراكيز العالية مما يجعل هذا النبات واعداً في علاج السرطان، فضلا عن توافره وسهولة الحصول عليه.

المصادر

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.

زغير، زينب رزاق. 2009. دراسة دراسة تاثير مستخلصات الخام لنبات المرير *onchus olevaceu*. رسالة دكتوراه. كلية الطب البيطري. جامعة بغداد.

Allen, J. C. Shuler and S. A. Latt. 1977. A simplified Technique for *In vivo* analysis of SCE using 5-Brdu tablets. *Cyto. Cell. Genet.* 18: 231-234.

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

Chakravarty, H. L. 1976. Plant wealth of Iraq (A dictionary of economic plants) 1. Botany Directorate. Ministry of Agriculture and Agrarian reform, Baghdad, Iraq.

Dixon, W. J. 1980. Efficient Analysis of Experimental Observations. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 20: 441-62.

Harborne, J. B. 1984. Phytochemical Methods. (2nd ed.) Chapman & Hall. London. P. 5.

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

Freshney, R. I. 2001. Application of cell culture to toxicology. *Cell Biology and Toxicology*. 17: 213-230.

Mukherjee, A. B. Sourar. S. Nabainta and C. Anil. 2001. Advance in anser therapy with plant based natural product. *Curent medicinal chem*. 1467-1486.

Lopus, M. D. panda. 2006. the enzophenanthridine alkaloid sanguinarine perturbs microtubule assembly dynamic through tubulin binding. A possible mechanism for its ntiproliferative activity. *J. FEBS*. 273 (10): 2139-50.

Hoesel, J. Rand Endicott. 1999. indirubin the active constituent of Chinese antileukemia medicine inhbits cyclin-dependt Kinase *Nat. cell boil*. 1:60-67.

Honda, G., V. Tostirisuk. 1980. Isolation of an antidermatophytic ptanthrin from indigo plants polgonum tinctorium and *isatis tinctoria*. *Planta Medica*. 38(3): 275.

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.

Jone, S. and K. K. Janardhanan. 2000. Antioxidant and Antitumor activity of Ganoderma lucidum (Curtifr.) P. Karstreishi (Apyllophoromycetideae) from south India. *Int. J. Med. Mushr*., 2: 195-200.

Ge, N. L., S. Ye. N. Zheng. R. Sun. Y. Lin. and Z. Tang. 2003. Prevention of hepatocellular carcinoma in mice by IL-2 137-1 genes co-transfected liver cancer cell vaccines. *World J. Gastroenterol*. 9: 2182-5.

Toshio, N., K. Akiko, M. Yuasa and O. David. 2008. Mechanism of growth of inhibitory effect of blume.*Biochem*.772(5): 1183-1189.

Todd, F. G. F. F. Stermitz. P. Schultheis. A. P. Knight and S. Dargatz. 1995. Tropane alkaloids and toxicity of *Convolvulus arvensis; phytochem*., 39: 301-3.

Sasan, M., N. Leila. and A. Zahra. 2009. Cytotoxic activity of isatis campylocarpa. aniranian endemic plant on human cancer cell lines. *j. cell and molecular research*. 65: 55-63.

Schmidt, M. and H. Bastians. 2007. Mitotic drug target and development of novel anti-mitotic anticancer drugs. D*rug Resistance Updates*. 10: 162-181.

Sajedi, C., F. Sharifinia and M. Asadi. 2005. A studay of the genus *isatis in Iran. rostaniha*. 6: 47-66.

Wu, G., J. Liu and F. Fang. 1982. Studies on the mechanism of indirubin action in the treatment of chronic granuloytic. *Sci. Sin*. 25(10): 1071-9.

Study toxic effect for extraction alcoholic and aqueous to plant *Isatis tinctoria* in same cell line

Ibraheem H. Mouhammed **Khazal D. Wadi** **Riyad H. Nesief**
Dept. of Biology-college of Science –Diyala Univ. Bioteciraq@yahoo.com

ABSTRACT

This study aimed to investigate the effect of the aqueous and crude alcohol extracted from the leaves of *Isatis tinctoria* on two malignant cell lines Hela and RD. Also this study included evaluation of the effect of these extracts on several cytogenetic parameters. The cytotoxicity of the aqueous extract and crude alcohol extract was investigated on the cancer cells line, Hella and RD. Toxic effect for both extracts was indicated by rate of proliferation inhibition. The alcohol extract showed the inhibition of Hela cell line at percentage (19.17% - 93.03%) more than the aqueous extract (8.95% - 75.69%) at concentrations: 62.5-8000 μg ml^{-1}. The rate inhibition of alcohol extract for RD cell line (11.48% - 77.87%) was higher than that of the aqueous extract (9.60%-71.14%) at the concentrations 62.5 and 8000 μg ml^{-1}. Both extracts (alcohol extract and aqueous extract) showed almost the same effect at the concentration 8000 μg ml^{-1}.

Keyword: Cell line, *Isatis Tinctoria*, Alkaloides.