Cytotoxic Effect of *Vincarosea* Aqueous Crude Extraction Human Brain Carcinoma Cell Line (AMGM) In *Vitro*

2nd Conference on Environment and Sustainable Development 28-29-Oct-2015

Dr. Liqaa H. Saqban
Biology Department, College of Education Pure Science, Karbala University, Karbala
Dr. Hind H. Obaid
Biology Department, College of Science, Baghdad University, Baghdad
Email: Hind_3000 @Yahoo.com
Dalia Azhar Ahmed
Biology Department, College of Science, Baghdad University, Baghdad
Dimah N. Passat
Biology Department, College of Science, Baghdad University, Baghdad
Mustafa N. J. Al-Darraji
Biology Department, College of Science, Al-Anbar University, Al-Anbar
Rafid M. Karim
Marine Science Centre, Basrah University, Basrah

Abstract
The present study investigated the cytotoxic effects of aqueous crude extracts of *Vincarosea* leaves, flowers and seeds on Human brain carcinoma cell line (AMGA, Ahmed Majeed Glioblastoma Multiform) *in vitro*, by using serial double dilution (concentration between 1.95-1000 µg/ml). The results showed that the cytotoxic effect of extracts was depended on type of parts of plant extracted, concentration and exposure time. The concentration 1000 µg/ml gave inhibition rate (IR), were (34, 49 and 64) % of leaves, flowers and seeds extracts respectively compared with control 100% after 24 hours from exposure time. However, low concentrations of aqueous extracts were found to induce the AMGA cells growth and proliferation (PR), it was 115% by treatment with aqueous extract offlowers extract in 1.95 µg/ml after 24 hours of exposed.

Keywords: AMGA, Vincarosea, cytotoxicity, Inhibitory Rate

التأثير السمي الخلوي للمستخلص المائي الخام لنبات عين البزون (*Vincarosea*) في خط خلايا سرطان الدماغ البشري (AMGM) خارج الجسم الحي

الخلاصة
شملت الدراسة الحالية التحري عن التأثير السمّي الخلوي للمستخلص المائي الخام لنبات عين البزون (أوراق، أزهار، بذور) في خط خلايا سرطان الدماغ البشري (AMGM) (Ahmed Majeed

https://doi.org/10.30684/etj.34.3B.21
2412-0758/University of Technology-Iraq, Baghdad, Iraq
This is an open access article under the CC BY 4.0 license http://creativecommons.org/licenses/by/4.0

(Glioblastoma Multiform، وذلك من خلال استعمال عشرة تراكيز (بإجراء تخافيف نصفية) تراوحت ما بين (1000-1.95ملغم/مل) ولفترات تعريض (72 ,48 ,24) ساعة. ظهر الكشف التمهيدي الاستدلالي عن المركبات الكيميائية للأجزاء النبات الثلاثة بانها تحتوي على القلويدات والتربينات والفلافونويدات والكلايكوسيدات. توصلت الدراسة إلى وجود تأثير سمي للمستخلص المائي الخام لنبات عين البزون في الخلايا السرطانية المدروسة (AMGM) ولكنه لم يكن تأثيرا" كبيرا"، فقد بلغت النسبة المئوية لمعدل تثبيط نمو الخلايا السرطانية (Inhibitory Rate (IR، 34، 49، 64 % لمستخلص الأوراق والازهار والبذور على الترتيب بعد 24 ساعة من التعريض للمستخلصات عند التركيز 1000 ملغم/مل، في حين اعطت التراكيز الواطئة حسب هذه الدراسة معدل تحفيز نمو (Proliferation Rate (PR بلغ 115% لمستخلص الازهار عند التركيز 1.95ملغم/مل بعد 48 ساعة من التعريض. انخفض معدل تثبيط النمو بعد 48 ساعة وللمستخلصات جميعها مقارنة بالـ 24 ساعة. لذلك حسب هذه النتائج تعد خلايا سرطان الدماغ البشري (AMGM) خلايا مقاومة للمستخلص المائي الخام لنبات عين البزون، كما تمتلك فعالية الـ (Hormesis) (Hermetic effect)، وذلك لأنها تمتلك القدرة على تحفيز انقسام الخلايا باستخدام التراكيز الواطئة من المستخلص.

الكلمات المرشدة: AMGM، *Vincarosea*، سمية خلوية، نسبة تثبيط

المقدمة

برز مرض السرطان بوصفه أحد المسببات الرئيسة للوفيات في العالم، إذ يعد من الأمراض الخطيرة التي تقضي على حياة الملايين من البشر سنوياً، ويصيب مرض السرطان رجلاً واحداً من بين كل إثنين منهم خلال فترة حياتهم، ويصيب امرأة واحدة من ثلاث منهن، في حين يسبب وفاة امرأة واحدة من بين كل أربع منهن [1]، لذلك بذل العلماء والباحثون جهوداً كبيرة من أجل تطوير أساليب وأنواع العلاجات، محاولةً منهم للقضاء عليه وإنقاذ حياة الإنسان. ظلّ مرض السرطان عصياً على العلماء بالرغم من وجود عدة أساليب للعلاج، فهناك العلاج الكيميائي والفيزيائي والجراحي، لكن لم تكن هذه العلاجات مقنعة للأطباء ولا للمريض نفسه. لذلك اتجهت المراكز البحثية والباحثون إلى إيجاد علاجات بديلة أخرى للعلاجات الحالية، واتخذت منحى آخر ربما يكون فيه الأمل الكبير للقضاء على هذا المرض.

تكلف الأدوية التجارية مبالغ كبيرة في استيرادها فضلاً عن أن استعمالها المستمر في العلاج يفقدها فعاليتها تدريجياً بسبب مقاومة الخلايا السرطانية لها [2] ، لذا أولت الكثير من دول العالم اهتماماً كبيراً بنباتاتها باعتبارها المصدر الطبيعي للأدوية [3].

إن اكتشاف الفعالية المضادة للسرطان Anticancer لقلويدات نبات عين البزون أكسبه أهمية طبية كبيرة، فهذه القلويدات تعد عوامل معالجة كيميائية Chemotherapy agents لمختلف أنواع السرطانات البشرية [4,5,6]، إذ اكتشف حوالي 75 نوعاً من القلويدات بعض منها ذو فعالية مضادة للسرطان أهمها الفنبلاستين والفنكرستين [7]، فضلا" عن استعمال هذا النبات في معالجة داء السكري [8,9]. كما أُجريت بحوث عديدة لاستعمال مستخلص النبات في معالجة الأمراض المايكروبية مثل الاسهال والإصابات الجلدية [10,11]. تحتل مثبطات الانقسام الخيطي ومنها قلويدات الفينكا Vinca alkaloids المشتقة من نبات عين البزون (= *Vincarosea* (*Catharanthusroseus*، مكانة خاصة بين أصناف العلاج الكيمياوي المستعملة في علاج أنواع عديدة من أمراض السرطان [5,12,13] ومن هذا المنطلق ولغرض تعزيز دراسة تأثير مستخلصات النباتات الطبية الموجودة في البيئة العراقية ضد بعض خطوط الخلايا السرطانية كخطوة أولى لاستكشاف فعاليتها المضادة للسرطان ،فقد صممت هذه الدراسة لمعرفة تأثير المستخلصات الخام لنبات عين البزون *V.rosea* الموجودة في البيئة المحلية العراقية في تثبيط نمو خط خلايا سرطان الدماغ البشري (AMGM-cells).

المواد وطرائق العمل

جمع النبات

تم جمع نبات عين البزون *V.rosea* المزروع بوصفه نبات زينة في حدائق كلية التربية / جامعة كربلاء، وقد صنف النبات من قبل المعشب الوطني العراقي/ الهيأة العامة لفحص وتصديق البذور التابع لوزارة الزراعة.

بعد جمع النبات وتنظيفه غُسِل بالماء جيداً، وفصلت الأجزاء النباتية (الأوراق والأزهار والبذور) وتركت لتجف في الظل وبدرجة حرارة الغرفة ضمن محيط جاف جيد التهوية لمنع تلف النماذج، وبعد جفاف هذه الأجزاء الثلاثة تم طحنها طحناً ناعماً بمطحنة كهربائية، ثم حُفظت الأجزاء المطحونة في حاويات بلاستيكية نظيفة بعيداً عن الضوء والحرارة والرطوبة لحين الاستعمال.

تحضير المستخلصات المائية الخام لنبات عين البزون

حُضر المستخلص المائي باردا حسب الطريقة المتبعة من قبل هاربورن وجماعته [14]، فقد أخذ 50 غم من المسحوق الجاف لكل جزء من النبات وأضيف اليه 250 من الماء وترك المزيج على جهاز المحرك المغناطيسي magnetic stirrerبدرجة حرارة الغرفة ولمدة 3 أيام، بعدها رشح المزيج بالشاش ثم بورق الترشيح (Whatman No.1)، بعدها جفف الراشح للحصول على المسحوق الجاف والذي حضر منه التراكيز المطلوبة.

الكشف الكيميائي الاستدلالي عن المركبات الفعالة

تم تحديد انواع مركبات الايض الثانوي الكيميائية الموجودة في المستخلصات النباتية المدروسة (القلويدات والتربينات والفلافونويدات والكلايكوسيدات)، اعتمادا" على ما ورد في [14].

دراسة التاثيرات السمية لمستخلصات نبات عين البزون في نمو خط خلايا سرطان الدماغ البشريAMGM- cell line

نوع الخلايا السرطانية المدروسة

إجريت دراسة التأثير السمي للمستخلص المائي لنبات عين البزون في المركز العراقيلبحوث السرطان والوراثة الطبية باستعمال خط خلايا سرطان الدماغ البشري بالتمريرة رقم 27، فقد تم الحصول عليه من المركز نفسه. نميت الخلايا بوسط RPMI-1640 المزود بـ 5% من مصل العجل الجنيني.Fetal Calf Serum (FCS)

التأثيرات السمية الخلوية

استخدمت أطباق الزرع النسيجي ذات الحفـر المتعددة (96-Microtiter plates) والقعر المسطح (Flat Bottom) لأجراء هذا الاختبار، وتضمنت التجربة ثلاثة مراحل:

1- **زرع أو بذار الخلايا Cells Seeding**

بعد ان تمت عملية تنمية وتكثير الخلايا السرطانية، أخذت الاوعية ذات النمو الكامل، حصدت الخلايا باستعمال محلول التربسين – فرسين Trypsin Versen(T.V). .أضيف 20 مل من الوسط الزرعي المزود بالمصل الى كل وعاء (حسب نوع الخلايا) ومزج بصورة جيدة، بعدها عُدت الخلايا باستعمال شريحة عد خلايا الدم (Haemocytometer) باستخدام صبغة التريبان الزرقاء Trypan blue (1%) وحسب ماأشار اليه Freshney (15).

أخذ (0.1) مل بوساطة الماصة الدقيقة من عالق الخلايا ووزعت على حفر الطبق الحاوية على (1×10 4) خلية/حفرة، ثم تمت تغطية سطح حفر الطبق بورق لاصق شفاف معقم خاص لهذا الغرض وحُرِّك الطبق بلطف، حضن بعدها بدرجة حرارة 37 ْم الى اليوم التالي للسماح بالتصاق الخلايا (Cell attachment).

2- معاملة (تعريض) الخلايا السرطانية بالمستخلص النباتي Exposure

تمّ عمل تخافيف نصفية متسلسلة في أنابيب اختبار معقمة لكل نوع من المستخلص النباتي باستعمال الوسط الزرعي الخالي من المصل (RPMI-1640- SF) في اليوم التالي منزرع الخلايا(Seeding)،

وبدأت التخافيف من (2/1 ← 1024/1) وبصورة تدريجية التي أعطت التراكيز من (1000 ← 1.95 مكغم/مل) على الترتيب، مع مراعـــاة تحضير التخافيف آنياً عند العمل. سكب الوسط الزرعي من حفر أطباق الزرع النسيجي بعد رفع اللاصق، وعد العمود رقم 1كسيطرة سالبة، و أضيف له 0.2 مل من الوسط الزرعـــي الخالي من المصل، أما الاعمدة من 2 ← 12 فقدأضيفت لها تخافيف مستخلصات نبات عين البـزون المحضرة بحجم 0.2 مل/حفرة/ من كل تركيز، ثم أعيد وضع طبقـــة جديدة من الـــورق اللاصق على سطح الطبق. حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 مْ ، أما فتـرات التعريض (Exposure time) فكانت 24، 48، 72 ساعة.

3-الكشف عن التأثير السمي Cytotoxicity Assay

استخدمت صبغة البنفسج البلوري (crystal violet stain) للكشف عن التأثير السمي الخلوي للمستخلصات في الخلايا السرطانية وعلى وفق الآتي:
بعد انتهاء فترات الحضن، أخذت الأطباق وسكبت محتوياتها، ثم غسلت بمحلول دارئ الفوسفات Phosphate buffer saline (PBS)، ثم أضيف 0،1 مل من صبغة البنفســـج البلـــوري المحضرة حسب ماجاء في [16])،الى كل حـــفرة من حفر الطبق،وتركـــت لمدة 20 دقيقة.غسلت بعدها الخلايا بمحلول PBS عدة مرات لحين زوال الصبغة الزائدة، بعد جفاف الأطباق تماما، تم قراءة النتائج باستخدام جهاز المطياف الضوئي الخاص بأطباق المعايرة الدقيقة ELISA microplate) (spectrophotometer، عند طول موجي مقداره 492 نانوميتر.
تم حساب معدل تثبيط نمو الخلايا السرطانية (Inhibitory Rate/I.R) وفق المعادلة المشار اليها من قبل الباحث Goaوجماعته [17] وكالاتي :

$$IR\% = (A - B)/A \times 100 \quad (1)$$

كما حُسب معدل تحفيز النمو /Proliferation Rate)
(PR وفقاً للمعادلة المشار اليها من قبلالباحثين Chumchalova و[18]Smarda وكالآتي:

$$PR\% = B/A \times 100 \quad (2)$$

حيث ان:
IR= النسبة المئوية لمعدل التثبيط
PR= النسبة المئوية لمعدل التحفيز.
A= الكثافة الضوئية للسيطرة السالبة.
B= الكثافة الضوئية لمجموعة الاختبار.

النتائـــج

الكشف الاستدلالي للمركبات الكيميائية الفعالة

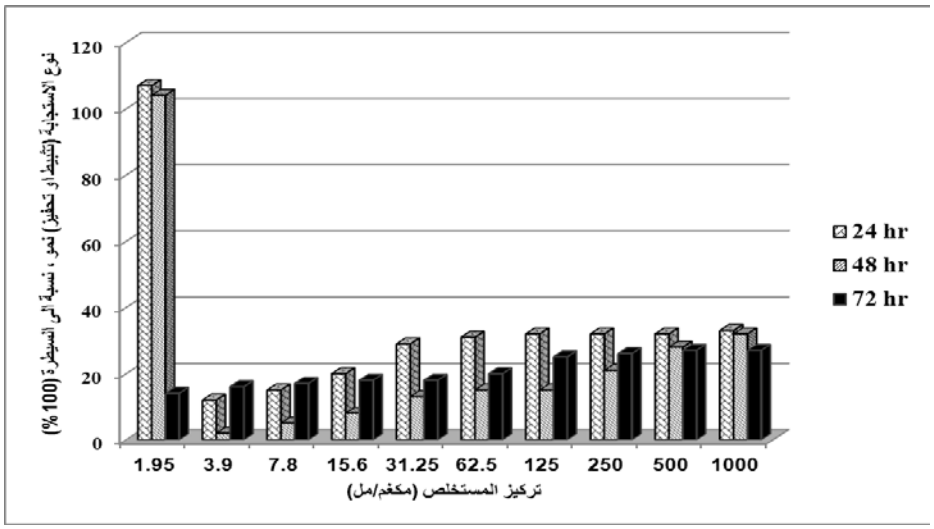
أظهرت نتائج الكشف عن المركبات الكيميائية في المستخلصات المائية لأجزاء (أوراق، أزهار، بذور) نبات عين البزون أنها تحتوي على القلويدات والتربينات والفلافونويدات والكلايكوسيدات.

التأثيرات السمية لمستخلصات نبات عين البزون في خط خلايا سرطان الدماغالبشري (AMGM).

التأثير السمي لمستخلص الأوراق.

درس التأثير السمي لمستخلص أوراق نبات عين البزون في خلايا سرطان الدماغ البشري بالتمريرة رقم 27. بينت النتائج الموضحة في الشكل 1 أن التأثير التثبيطي لم يكن كبيراً، فقد بلغت أعلى نسبة مئوية لتثبيط النمو 34 % عند التركيز 1000 مكغم / مل من المستخلص بعد 24 ساعة

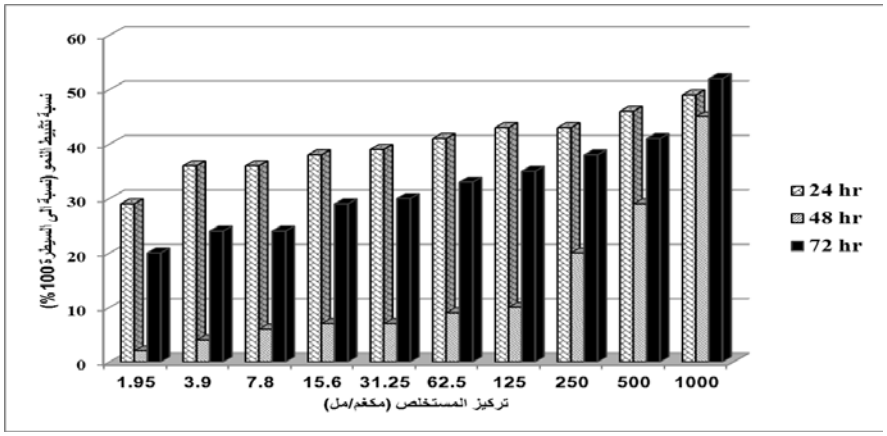
الأولى من التعريض، ويبدأ التثبيط يقل كلما انخفض التركيز.أما التركيز 1.95 مكغم / مل فأنه أدى الى تحفيز نمو الخلايا، فقد بلغت نسبة الخلايا الحية (معدل التكاثر Proliferation Rate)107 % بعد 24 ساعة من المعاملة مقارنة بالسيطرة 100 % .كذلك يلاحظ ان التأثير السمي التثبيطي بعد 48 و 72 ساعة من المعاملة بالمستخلص المائي النباتي كان ضعيفا" حتى عند استعمال التراكيز المرتفعة فقد بلغت أعلى نسبة تثبيط نمو 32 % و 27 % (بنسبة عيوشية viability مقدارها 68 % و 73%) عند التركيز 1000مكغم /مل بعد 48 و 72 ساعة من المعاملة على الترتيب.



الشكل (1). تأثير مستخلص الأوراق المائي لنبات عين البزون في النسبة المئوية لحيوية خط خلايا سرطان الدماغالبشري AMGM بعد التعريض لفترات زمنية مختلفة.

التأثير السمي لمستخلص الأزهار

أظهرت نتائج معاملة خط خلايا AMGM بمستخلص أزهار نبات عين البزون، أن التأثير السمي التثبيطي يكون في اليوم الأول للتعريض، فقد بلغت اعلى قيمة للتثبيط (49%) عند التركيز1000 مكغم /مل ثم تبدأ بالانخفاض التدريجي مع انخفاض التركيز، الشكل 2. أما نسبة تثبيط النمو بعد 48 ساعة من التعريض فقد انخفضت ولجميع التراكيز المستعملة مقارنة بالـ 24 ساعة، في حين تعود هذه النسبة بالارتفاع مرة أخرى بعد 72 ساعة لتصل الى 52% عند التركيز 1000 مكغم / مل.

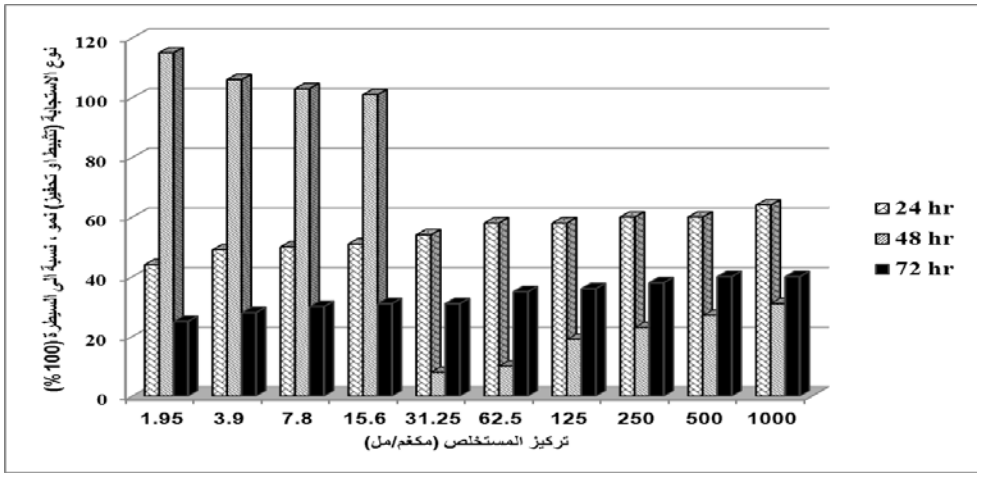


الشكل (2). تأثير مستخلص الأزهار المائي لنبات عين البزون في النسبة المئوية لحيوية

خط خلايا سرطان الدماغ البشري AMGM بعد التعريض لفترات زمنية مختلفة.

التأثير السمي لمستخلص البذور

تأثير مستخلص بذور نبات عين البزون في خلايا سرطان الدماغ البشري شابه في إطاره العام نوعي المستخلصين السابقين (الاوراق والازهار). فقد ظهرت افضل النتائج بعد الـ 24 ساعة الأولى من المعاملة ثم انخفض معدل تثبيط النمو (اي ارتفعت حيوية الخلايا) بعد 48 ساعة، ثم عادت لتنخفض بعد الـ 72 ساعة. ظهر التأثير السمي الأفضل بعد 24 ساعة من المعاملة، وبلغ 64% اي بنسبة حيوية 36% عند أعلى التراكيز المستخدمة 1000مكغم / مل، فضلا" عن ذلك ظهر التأثير المحفز للنمو بعد الـ 48 ساعة الأولى من المعاملة فقط، فقد تراوح ما بين 101-115 % وبدأ يظهر في التركيز 15.6 مكغم/مل وصولا" الى أقل تركيز 1.95 مكغم/مل على الترتيب، (شكل 3).

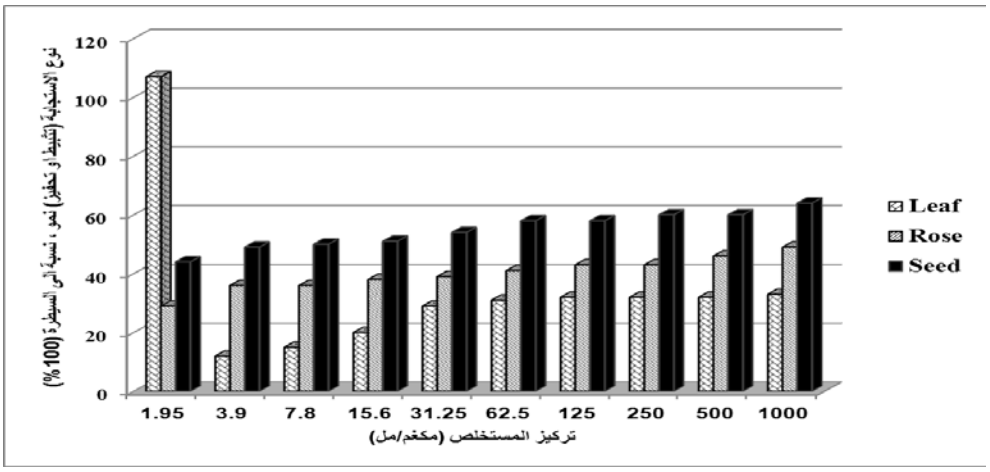


الشكل(3). تأثير مستخلص البذور المائي لنبات عين البزون في النسبة المئوية لحيوية خط خلايا سرطانالدماغالبشريAMGMالتعريض لفترات زمنية مختلفة.

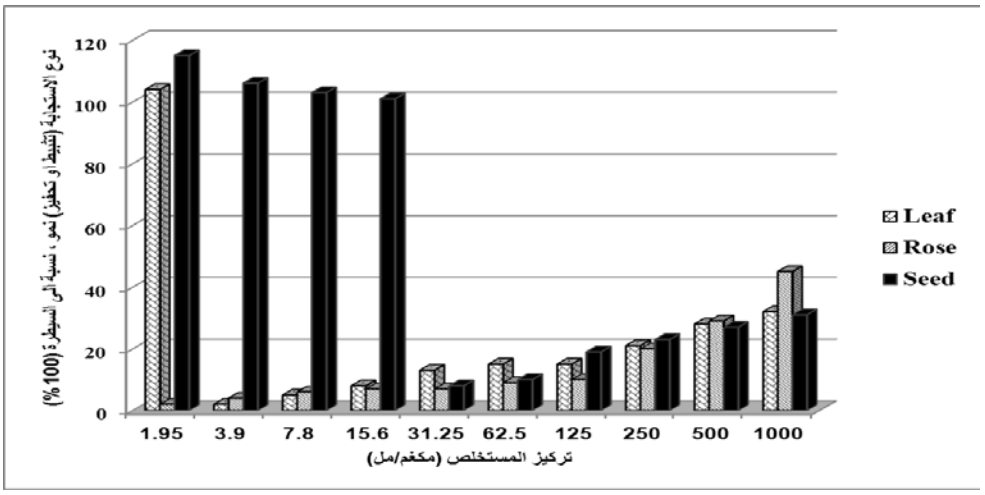
مقارنة تأثير فترة التعريض في حيوية خلايا سرطان الدماغ البشري لأنواع المستخلصات الثلاث المدروسة

عند اجراء مقارنة بين حيوية انواع المستخلصات الثلاث المدروسة (الأوراق والأزهار والبذور) في كل فترة زمنية للتعريض، وجد بعد الـ 24 ساعة الأولى من المعاملة هي التي أعطت أعلىنسب تثبيط نمو، فقد بلغت حيوية الخلايا 66 و 51 و 36 % اي بنسب تثبيط نمو مقدارها 34 و 49 و64 % للمستخلصات الثلاث المدروسة على الترتيب وعند أعلى التراكيز المعاملة بها 1ملغم/مل (شكل 4)، فضلا" عن ذلك كانت نتائج التعريض لمدة 48 ساعة مشابهة في أطارها العام لنتائج التعريض بعد 24 ساعة، فقد بلغت نسب تثبيط النمو 32 و 45 و 31 % لأنواع المستخلصات الثلاث على الترتيب، لكن انخفضت هذه النسب ولجميع التراكيز المستخدمة مقارنة بزمن التعريض 24 ساعة (شكل 5).

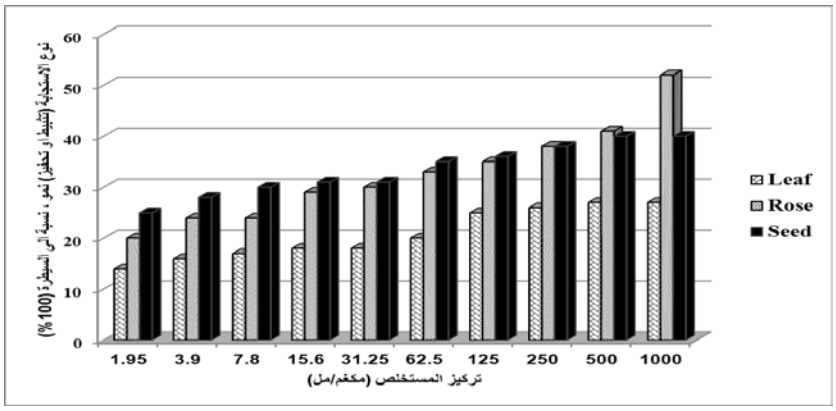
أما عن نسب تُثبيط نمو الخلايا خلال 72 ساعة من المعاملة، فقد كانت 37 و52 و40 % عند التركيز 1ملغم/مل أي بنسبة عيوشية مقدارها 46 ، 48 و60 % على الترتيب مقارنة بالسيطرة 100% (شكل 6)، ومن الملاحظ أن نسب التثبيط هذه تبدأ بالارتفاع من جديد مقارنة بالـ 48 ساعة. من خلال النتائج التي تم الحصول عليها وجد ان خلايا سرطان الدماغ البشري المدروسة تعد خلايا مقاومة للمستخلصات المستعملة بسبب بقاء حيوية الخلايا السرطانية بنسب مرتفعة.



الشكل (4). مقارنة تأثير المستخلصات المائية لنبات عين البزون في النسبة المئوية لحيوية خط خلايا سرطان الدماغ البشريAMGM بعد 24 ساعة من المعاملة



الشكل (5). مقارنة تأثير المستخلصات المائية لنبات عين البزون في النسبة المئوية لحيوية خط خلايا سرطان الدماغ البشري AMGM بعد 48 ساعة من المعاملة.



الشكل (6). مقارنة تأثير المستخلصات المائية لنبات عين البزون في النسبة المئوية لحيوية خط خلايا سرطان الدماغ البشري AMGM بعد 72 ساعة من المعاملة.

المناقشة

نظراً لأهمية إيجاد مركبات فعالة ضد مرض السرطان وإيجاد المزيد من أنواع النباتات التي تمتلك تلك المركبات، فقد تم اختيار نبات عين البزون *V.rosea* الذي يعد واحداً من النباتات الطبية المتوفرة محلياً الذي يمتلك خواص علاجية مختلفة، وذلك للتعرف على تأثيرات المستخلصات المائية الخام في خلايا سرطان عنق الرحم البشري ومدى إمكانية استخدام هذه المستخلصات كمواد علاجية طبية ضد السرطان مستقبلاً. يعُد اختبار الكشف عن التأثيرات السمية لمادة ما في الخلايا السرطانية في الزجاج أحد االتقانات المهمة التي يتم اعتمادها مبدئياً في التحري عن امتلاك تلك المواد تأثيراً قاتلاً تجاه هذه الخلايا الخبيثة، التي قد تعقد عليها الآمال كعلاج مستقبلي.

أظهرت نتائج الدراسة الحالية في الكشف التأكيدي عن المركبات الفعالة في مستخلصات أجزاء نبات عين البزون (أوراق، أزهار، بذور) وجود القلويدات واالتربينات والفلافونويدات والكلايكوسيدات التي قد تساهم معاً بقتل الخلايا السرطانية بفعالية أفضل نتيجة العمل التآزري فيما بينها مما قد يقلل من سمية المركبات النقية المستعملة. وُجد من خلال نتائج الدراسة الحالية أن المستخلصات الخام لعبت دوراً في قتل الخلايا السرطانية وتثبيط نموها وانقسامها خارج الجسم الحي، فقد أشارت النتائج أن التأثير السمي لنبات عين البزون في خط خلايا سرطان الدماغ البشري (AMGM) اعتمد بصورة أساس على التركيز المستخدم ومدة التعريض ونوع المستخلص المستعمل، فقد كان مستخلص البذور هو الافضل بالتأثير، من جانب آخر يلاحظ ان هذا النوع من الخلايا السرطانية وحسب نتائج هذه الدراسة تعد مقاومة للمستخلصات المائية العلاجية المحضرة، فبالرغم من أنها سببت تثبيط نمو الخلايا، إلا أن التثبيط لم تتجاوز نسبته المئوية الـ 64% في مستخلص البذور بعد 24 ساعة من المعاملة ثم يعود التأثير التثبيطي يقل عند زيادة مدة التعريض، عدا مستخلص الأزهار الذي يرتفع الى 52% بعد 72 ساعة لكن باستخدام التركيز المرتفع 1000 مكغم/مل. تشير تلك النتائج الى أن عمل هذا المستخلص يكون خلال الـ 24 ساعة الاولى من التعريض وبالتراكيز المرتفعة، لذلك عند زوال تأثيره تبدأ الخلايا الحية بمعاودة نشاطها وانقسامها، مما يُظهر أهمية اِعطاء جرعات مرتفعة متكررة ومستمرة لضمان قتل الخلايا السرطانية المتبقية جميعها.

توصلت دراسة اجريت من قبل ياسين وجماعته [19] تم فيها المقارنة بين نوعي المستخلصين الكحولي والمائي، فوجد أن المستخلصات الكحولية أكثر فعالية من مثيلاتها المائية في خلايا Hep-2.قد يعود ذلك الى إن نسبة المادة الفعالة التي تم استخلاصها بالكحول الاثيلي (70 %) تكون أكبر مما هو عليه عند استخدام المستخلص المائي وهذا ما أشار إليه هاربورن وجماعته [14].

تحتوي المستخلصات الخام لنبات عين البزون على نسبة مرتفعة من القلويدات، إذ تعد خزيناً لأكثر من 75 نوعاً منها [20]، فضلاً عن وجود التربينات والفينولات [21] والكثيرمن العناصر المعدنية [22].

تتباين نسبة النواتج الأيضية الثانوية الموجودة في النبات تبعاً لنوع العضو النباتي (أوراق، أزهار، بذور)، كما تتأثر هذه النسبة بألعوامل البيئية المحيطية [21].

تعد القلويدات من أهم وأكثر المواد الفعالة الموجودة في تلك المستخلصات، أما آلية عملها فتكون من خلال تثبيط عملية الانقسام الخيطي، لتبقى الخلايا في الطور الإستوائي Metaphase وذلك بوساطة منع بلمرة بروتين التيوبيولين Tubulin المسؤول عن تكوين خيوط المغزل [13,23,24]، فضلاً عن ذلك تعمل القلويدات على تثبيط بناء الأحماض النووية خارج الجسم الحي [25,26].

كما أشارت العديد من الدراسات السابقة التي قام بها الباحثون الى امتلاك قلويدات عين البزون فعالية ضد الخلايا السرطانية، ومنها خلايا سرطان عنق الرحم البشري Hela cells، إذ تسبب التراكيز الواطئة منها تثبيط عمل خيوط المغزل [27,28].

من جانب آخر أكد الباحثان Parekh و [29] Simpkins ان هذه القلويدات تؤثر في خطوط الخلايا اللمفاوية السرطانية للجرذ وفي خطوط خلايا سرطان المبيض البشري التي تتميز بمقاومة العلاجات الكيميائية الشائعة الاستعمال كالـ Cisplatin، فضلاً عن كونها أكثر فعالية من الـ Taxolو Adriamycin . أما سمّية هذه المركبات تجاه خلايا سرطان الدم Leukemia L1210 فهي مرتبطة بدرجة تأثيرها على بروتين Tubulin T وترتيبه المغزلي [30,31].

أما فعالية المركبات الفينولية ومنها الفلافونويدات (Flavonoids) فيكون من خلال امتلاكها فعالية مضادة للأكسدة (Antioxidant) إذ تعمل على إزالة الجذور الحرة المتولدة، وتُوَّجه الخلية للدخول في مرحلة الموت المبرمج[32]، ومن الأمثلة عن الخلايا السرطانية التي وجد أنها حساسة للمركبات الفينولية هي خلايا سرطان الحنجرة البشريHep-2 وخلايا سرطان عنق الرحم Hela وسرطان الدماغ البشري AMGM والقولون والبروستات البشرية [34,33,30].

تعمل العديد من المركبات الفعالة باتجاهين متعاكسين اعتمادا على التركيز المستخدم، فكما يلاحظ من خلال النتائج المذكورة إن التراكيز المرتفعة قد ثبطت نمو خلايا AMGM، في حين حفزت التراكيز الواطئة من نمو تلك الخلايا فازدادت الحيوية وإن كانت الزيادة بنسب قليلة تراوحت ما بين 101-115 % نسبة الى السيطرة 100%، وهذا يشير الى ان المستخلص قيد الدراسة يمتلك تأثير (Biphasic effect) [35]. او ما يسمى Hormetic effect، فهناك الكثير من المركبات الكيميائية العلاجية و المضادات الحياتية والسموم تنقاد في عملها لظاهرة الـ Hormesis (هي ظاهرة بيولوجية شائعة في علم السموم)، اذ تعمل بتراكيز واطئة على التحفيز مما قد يكون مفيداً للكائن الحي لاسيما عند تنشيط الخلايا المناعية، في حين تسبب الجرعات العالية تثبيط جزئي او كلي للخلايا [36]تظهر هذه الحالة نتيجة فعل بعض المركبات المضادة للسرطان مثل Mitomycin C و Bleomycin و Actinomycin والمضادات الحيوية والمضادات الفيروسية [37]، فضلا" عن مبيدات الأعشاب والمبيدات الحشرية والفطرية والطفيلية [38] وبعض الهيدروكربونات والعناصر المعدنية [39] ، كذلك ينتج عن بعض العوامل الفيزيائية كالأشعة المؤينة [41] والأشعة الكهرومغناطيسية [41]،ودرجات الحرارة الواطئة [42] وغيرها من العوامل.

ومن الجدير بالذكر ان المستخلص المستخدم في هذهِ الدراسة هو مستخلصاً خاماً، اي انه يحوي العديد من انواع المركبات الفعالة التي تم التطرق الى فعاليتها او التي لم يرد ذكرها، مما يدعم نتائج ظهور التضادية في التأثير على الخلايا السرطانية اعتماداً على التركيز المستخدم. فمن المحتمل ان يكون تأثيره على المادة الوراثية باتجاهين، الاول يسبب تثبيط لجينات معينة، في حين يحفز الاخر النمو والتضاعف. ومما يجب التطرق اليه، ان تأثير المواد المضادة للسرطان لا يختلف حسب نوع الخلايا فقط، و انما حسب تمريره الخلايا Passag وذلك بسبب حدوث طفرات بالمادة الوراثية بعد عدة تمريرات [43]. وبذلك سوف تختلف المستضدات الخلوية للخلايا السرطانية فضلاً عن خصائصها الاخرى. اما عالمياً فتدرس الخلايا الام او التمريرات القريبة منها تلافياً لذلك، فضلاً عن ان الخلية

السرطانية الام المعزولة من المريض تختلف وراثياً ومستضدياً عن تلك التي نميت لفترات طويلة فالهيئة الكروموسومية لاتشبه ماموجود في الخلايا الاصل التي نشأت منها، مما ينتج عنها اختلاف الاستجابة للمادة العلاجية المدروسة [44]. لذلك تعد هذهِ النتائج دليل اولي على وجود التأثير التثبيطي خارج الجسم الحي، ومن ثم اختبار الكفاءة العلاجية داخل الجسم الحي.

المصادر

[1] American Cancer Society.CANCERFACTS and FIGURES 2015 American Cancer Society, Atlanta, 2015.

[2] Murray, R.K. CANCER GENES AND GROWTH FACTORS. In: Harper'sbiochemistry. (24th Ed). R.K. Murray, D.KGranner, P.A., Mayes,V.W. Rodwell (Eds.), Appleton and Lange, Stamford . pp. 757-778, 1996.

[3] Safarzadeh, E., Shotorbani, S.S. and Baradaran, B." HerbalMedicine as Inducers of Apoptosis in Cancer Treatment "*Adv Pharm Bull*, 4(1), 421-427, 2014.

[4] Lobert, S. Fahy, J., Hill,B.T. ,Duflos, A.,Etievant,C. and Correia, J.J(). "Vinca.Alkaloid-Induced Tubulin Spiral FormationCorrelates with Cytotoxicity in the Leukemia L 1210 Cell Line". *Biochemistry*, 39:12053-12062, 2000.

[5] Aslam, J., H. K., Sheba, H. S,Zahid, F., Zohra, M, Mehpara and Mukthar, A "Catharanthusroseus Don. Lan Important Drug IT'S Applications and Production", *PharmacieGlobale* (IJCP), 4:12, 2010.

[6] Al-Azawee, N.H.I."The Cytotoxic Effect of Some ChemotheraptiDrugs &Functional Activity of Breast Cancer Patients Peripheral Blood Lymphocytes."*International Journal of Advanced Research*, 3(1), 81-86, 2015.

[7] Almagro, L.,Fernandez-Perez, F. and Pedreno,M.A. " Indole Alkaloids from Catharanthusroseus: Bioproduction and Their Effect on Human Health"*Molecules*, 20, 2973-3000,2015.

[8].Ghosh, S.,Suryawanshi, S.A. "Effect of VincaroseaExtracts in Treatment of AlloxanDiabetes Inmale Albino Rats". *Indian J. Exp. Biol*, 39, 748–759, 2001.

[9] Ahmed, M.F.,Kazim,S.M,Ghori,S.S,Mehjabeen, S.S, Ahmed, S.R., Ali,S.M and Ibrahim, M. ''AntidiabeticActivity of VincaroseaExtracts in AlloxanInducedDiabetic Rats".*Int. J. Endocrinology*, vol, article ID 841090,6,2010.

[10]Raza, M. L,Nasir, M. Abbas, T. and Naqvi, B. S. "Antibacterial Activity of Different Extracts from the Catharanthusroseus". *CEMED*, 3(1): 81-85, 2009.

[11]AL-makhzumi, A. A., AL-dulaimy, H. H. and Jawaad, A. M. " In VivoEffect ofCatharanthusroseusCrude Extracts on Pathogenic Bacteria Isolated from Skin Infections".*Iraqi Journal of Science*, 56(1):656-664,2015

[12]Fattorusso, E. and T. Scafati, "MODERN ALKALOIDS STRUCTURE''WILE - VCH VerlagCmb H. and kga A Co., Germany, 28-41, 2008.

[13] Mohammed, I. H. " Effect of Vincristine and Vinblastine from Vincarosea on Microtubules of Tumor H22 Cell line"*Diyala Journal of Medicine*, 3 (1):97–104, 2012.

[14] Harborne J.B. PHYTOCHEMICAL METHODS. (2nded.) Chapman and Hall, H. p. London, 193, 1984.

[15].Freshney, R.I. CULTURE of ANIMALCELLS: A manual for basic technique. 4th ed. Wiley-Liss, A John Wiley and Sons, Inc. Publication, New York, 2000.

[16] Mather, K.E., PRINCIPLES of RADATION THERAPY. In: B.M. Nevidjon and K.M. Sowers(ed).A nurse's guide to cancer careLippincott, philadelpphia, pp: 215. 2000.

[17].Gao, S.; Yu, B.; Li, Y.; Dong, W. and Luo, H." AntiproliferativeEffect of Octreotide on Gastric Cells Mediated by Inhibition of Akt/PKB and Telomerase "*World J. Gastroenterol*, 9: 2362-5. 2003.

[18]Chumchalova, J. and Smarda, J.'' Human Tumor Cells are selectively inhibited by Colicins ". Folia Microbiol., 48: 111-5, 2003.

[19] ياسين، ناهي يوسف وحسن، هادي رسول و صكبان، لقاء حسون"دراسة تأثير المستخلصات الخام لنبات عين البزون*Vincarosea* على نمو الخطوط الخلوية السرطانية والطبيعية لبعض اللبائن خارج الجسم الحي *In vitro*.مجلة *جامعة كربلاء العلمية* (عدد خاص ببحوث المؤتمر العلمي الخامس للجامعة),2009.

[20] Mukherjee, A.K.,Basu, S.,Sarkar, N. and Ghosh,C.A. "Advances in Cancer Therapy with Plant Based Natural Products" *Current Medicinal Chemistry*, 8:1467-1486,2001.

[21] Vazquez-Flota, F.; Carrillo-Pech, M.,Minero-Garcia, Y. and Miranda- Ham,M. " Alkaloid Metabolism in Wounded CatharanthusroseusSeedlings ". *Plant Physiology and Biochemistry*, 42:623-628, 2004.

[22] Sahito, S.R.,Kazi, T.G.,Kazi, G.H.,Jakhrani, M.A. and Shaik, M.S." TraceEelements in TtwoVarieties ofIndigenous Medicinal Plant Cathranthusroseus (Vincarosea) ". *The Science*, 74-77, 2001.

[23] Pourroy, B., Carre, M.,Honore, S.,Bourgarel-Rey, V.,Kruczynski, A. , Briand, C. and Braguer, D. " Low Concentrations of VinflunineInduce Apoptosis in Human SK-N-SH NeuroblastomaCells through a Postmitotic G1 Arrest and a Mitochondrial Pathway "*Mol. Pharmacol*., 66:580-591,2004.

[24] Ngan, V.K., Bellman, K., Hill, B.T., Wilson, L. and Jordan,M.A. '' Mechanism of Mitotic Block and InhibitionofCell Proliferation by the Semisynthetic VincaAlkaloids Vinorelbine and its New Derivative Vinflunine" *Molecular Pharmacology*, 60:225-232,2001.

[25] Medinger,M. ; Unger,C. and Drevs,J."PflanzlicheZytostatiForschung and klinik "*BundesgesundHeitsbl-GesundheitsForsch-Gesundheitsschutz* 46:1050-1054, 2003.

[26] Gascoigne, K.E and Taylor, S.S. "How Do Anti-mitotic Drugs Kill Cancer Cells ". *Journal of Cell Science*, 122, 2579-2585, 2009.

[27] Jordan, M.A., Thrower, D. and Wilson, L."Mechanism of Inhibition of Cell Proliferation by VincaAlkaloids "*Cancer Research*, 51:2212-2222, 1991.

[28] Becvarova, P., SkorpIkova, J.1., Janisc h. R and Novy, J. "Avinca Alkaloids Effect on Microtubules of HeLa Cells "*Scriptamedica (brno)*,79 (1):19–34,2006.

[29] Parekh, H.R. and Simpkins, H.'' Cross-Resistance and Collateral Sensitivity to Natural Product Drugs in Cisplatin- Sensitive and Resistant Rat Lymphoma and Human Ovarian Carcinoma Cells "*CancerChemother. Pharmacol.*, 37:457-462, 1996.

[30] Lopez-Lazaro, M. " Flavonoids as Anticancer Agents: Structure- Activity Relationship Study ". *Curr. Med. Chem.*, 2:691-714, 2002.

[31] Ahmad, N.H., Abdul Rahim, R. and Mat,I."Catharanthusroseus Aqueous Extract is Cytotoxic to JurkatLeukaemic T-cells but Induces the Proliferation of Normal Peripheral Blood Mononuclear Cells".*Tropical Life Sciences Research*, 21(2), 101–113,2010.

[32] Sathiya, S.,Karthikeyan, B.,Jaleel, C. A.,Azooz, M. M. and Iqbal, M.,"Antibiogram of CatharanthusroseusExtracts "*Global J. Mol. Sci*., 3(1) : 1-7,2008.

[33] Forkmann, G. and Martens, S. " Metabolic Engineering and Application of Flavonoids "*Curr. Opinion Biotech.* , 12:155-160, 2001.

[34] سلمان، إسراء صكر وياسين، ناهي يوسف وأحمد، أيسر عايدو حسين ولقاء مائدة وطه، زهراء رافع و شاكر، هبة كريم; حسن، أيمن علي، "تأثير الفلافونيدات على الخطوط الخلوية السرطانية

والطبيعية خارج الجسم الحي"*المجلة العراقية لبحوث السرطان والوراثة الطبية*، 4 (1): 94-100,2011.

[35] Pedra, M.,ferreira, M. , M ,cidade H. , Kijjoa, A. , Bronze – da – rocha, E. and Nascimento, M. S. J ." Artelastin is a Cytotoxic Prenylated Flavone that DsturbsMicrotubules and Interferes with DNA Replication in MCF -7 Human Breast Cancer Cells''. *Life Sciences*, 77:993 – 311, 2005.

[36] Calabrese E .J .and Baldwin, L .A." Hormesis: the Dose-Response Revolution''*Annu. Rev .Pharmacol .Toxicol.* , 43: 175 – 197, 2003.

[37] Calabrese, E. J. and Baldwin, L. A. " Chemotherapeutics and Hormesis" .*Crit. Rev. Toxicol*., 33:305-353, 2003.

[38] Zheng, T.,Holford, T.R. ,Mayne, S.T. , Ward, B. , Carter, D. andOwens, P.H. " DDE and DDT in Breast Adipose Tissue and Risk of Female Breast Cancer " . Am. J. Epidemiol., 150:453-458, 1999.

[39] Calabrese, E.J. and Baldwin, L. A."Inorganics and Hormesis". *Crit. Rev. Toxicol*., 33:215-304, 2003.

[40] Feinendegen, L.E. and Neumann, R.D." PhysicsMmust Join with Biology in Better Assessing Risk from Low-Dose Irradiation "*Radiat. Prot. Dosimetry*, 33:105-153, 2005.

[41] Pollycove, M. and Feinendegen, L.E. "Radiation-Induced Versus Endogenous DNA Damage: Possible Effect of Inducible Protective Responses in Mitigating Endogenous Damage "*Hum. Exp. Toxicol.*, 22:290-306, 2003.

[42] Rattan, S.I." HormeticMechanisms of Anti-aging and Rejuvenating Effects of Repeated Mild Heat Stress on Human Fibroblasts InVitro "*Rejuvenation Res*., 7:40-48,2004.

[43]علي ، آمال محمد، (2004)، دراسة وراثية خلوية ومناعية لخط خلايا سرطان الحنجرة Hep-2 . رسالة ماجستير . كلية العلوم – جامعة بغداد.

[44] Bruserud, O.,Gjertsen, B.T., Foss, B. and Huang, T.. ''New Strategies in the Treatment of AcateMyelogenousLeukemia (AML): In Vitro Culture of AML Cells the Present Use in Experimental Studies and the Possible Importance for Future Therapeutic Approaches ". *Stem cells*, 19: 1 – 1, 2001.