تاثير المستخلص المائي الخام لحبوب الكلغان *Silybum marinum* L. على الخطوط الخلوية السرطانية والطبيعية خارج الجسم الحي *invitro*

*اسراء صكر سلمان** *محمد عبد الهادي غالي** *ناهي يوسف ياسين***

استلام البحث 16، حزيران، 2010
قبول النشر 26، تشرين الاول، 2010

الخلاصة:

تم الحصول على المستخلص المائي لحبوب نبات الكلغان *Silybum marianum* الجافة بشكل خام عن طريق اذابتها في الماء المقطر بطريقة التنقيع والتحريك. ودرس تاثيره خارج الجسم invitro في ثلاثة انواع من الخطوط الخلوية السرطانية وهي خط Hep-2 لسرطان الحنجرة البشري وخط AMN-3 لسرطان الغدة اللبنية الفاري وخط RD لسرطان العضلة البشري ولمدة تعريض 24 ، 48 ، 72 ساعة فضلا عن نوع واحد من الخطوط الخلوية الطبيعية REF لجنين الجرذ ولمدة تعريض 72 ساعة فقط. اظهرت النتائج وجود تاثير سمي للمستخلص المائي الخام على الخطوط الخلوية السرطانية RD, AMN-3, Hep-2 عند التراكيز 10و 100 مايكروغرام / مل صعودا الى التراكيز العالية وذلك عند تعرضها للمستخلص لمدة 48 ساعة مقارنة مع السيطرة. وعند زيادة مدة التعريض الى 72 ساعة, بدا التاثير السام من التراكيز الواطئة (5-10 ملغم /مل) مقارنة مع مجموعة السيطرة.

اظهرت مقارنة نتائج تاثير المستخلص المائي على الخطوط الخلوية, ان اكثرالخطوط تاثرا هو الخط الخلوي السرطاني AMN-3 يليه الخط Hep-2 ومن ثم الخط RD . اما الخط الخلوي الطبيعي REF فلم يلاحظ عليه اي تاثير.

اظهر الفحص المجهري وجود تاثير حال وسام للتراكيز الواطئة والعالية من المستخلص المائي على الخلايا تمثلت باحداث تغيرات واضحة في نمو الخلايا السرطانية وفقدانها الشكل الخلوي المميز.

الكلمات المفتاحية : الكلغان، المستخلص المائي الخام، الخطوط الخلوية السرطانية ، الخط الخلوي الطبيعي

المقدمة :

يعد الكلغان [*Silybum marianum*] من النباتات الطبية و يعود للعائلة Asteraceae والذي ينمو بريا وله عدة تسميات مثل النبات المشوك (milk thistle) والشوك المقدس blessed (thistle) [1]. وينتشر في في العمادية والسهل الرسوبي من العراق [2] . ويوجد على نوعين من الاجناس هما *Silybum marianum* و *S. eburnum* [3]. الكلغان نبات حولي annual او ثنائي الحول biennual ،ذو لون أخضر شاحب وساق بسيط او متفرع قليلا، أوراقه كبيرة مزركشة بعروق بيضاء، ذات رائحة شبيهة برائحة السبانغ، التي كانت تستخدم سابقا في السلطات بعد إزالة الاشواك منها، اما لون أزهار هذا النبات فهو ارجواني او وردي او أبيض، الثمرة من النوع الفقيرة achene وهي حبوب سوداء وكل منها يحمل خصلة من شعيرات بيضاء[2]. يحتوي نبات الكلغان على العديد من المواد الكيميائية الفعالة طبيا، حيث تتركز هذه المركبات او المواد الفعالة في اجزاء مختلفة منه اولها الحبوب او الازهار ومن ثم الاوراق. ومن اهم هذه المواد الفلافونيدات ومن اهمها السيلمارين Silymarin وSilybin و Qercetin, Taxifolin. كما يحوي التانينات والصابونينات والتانينات والزيوت الثابتة بنسبة 20-30% والتي من اهمها حامض اللينولك Linolic acid و Oleic acid وحامض البالميتك Plamitic acid.

كذلك يحوي مواد مخاطية ودهون وسكريات وفيتامينات K, C, E, B12, A وكذلك يحوي على الابيجينين والهستامين [4]. فضلا عن بعض العناصر مثل الزنك و السلينوم والكالسيوم والحديد والمغنيسيوم[5].

يستخدم هذا النبات في علاج التهاب الكبد واليرقان على وجه الخصوص، فضلا عن حلات الاجهاد الكبير سواء كان السبب في ذلك العدوى او الافراط في تناول الكحول او نتيجة العلاج الكيميائي الذي يوصف لمعالجة الامراض مثل السرطان [6]. وتكتسب المركبات الفعالة فيه مثل الفلافونيدات اهمية طبية كبرى، منها مضاد للكثير من الاحياء المجهرية مثل الفطريات والبكتريا وغيرها [7]. كما ان للمركبات الفلافونيدات Flavonoid الموجودة في هذا النبات فاعلية مضادة للاكسدة ولذا تعتبر مضادة للسرطان Anticancer [8].

*قسم علوم الحياة /كلية العلوم للبنات.
**المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية/ الجامعة المستنصرية

يعد السليمارين والسلبين من اهم المركبات الفلافونيدية الموجودة في حبوب الكلغان والتي تلعب دوراً مضاداً للأكسدة Antioxidant وتقليل وجود الجذور الحرة Free radical من خلال تفاعلها مع هذه الجذور[9]. كما استخدم السليمارين والسلبين في تثبيط بعض الخطوط الخلوية السرطانية وفي علاج السرطان، اذ اثبتت هذه المركبات فعالية ضد عدة أنواع من الخطوط الخلوية السرطانية النامية في المزارع النسيجية، حيث وجد ان مركب الـ Silymarin له دور في تثبيط الخط الخلوي لسرطان الثدي Breast Cancer Cell line MDA-MB468 وتكون الية التثبيط من خلال ايقاف الدورة الخلوية عند الطور G_1 phase ، كما انه مضاد للتكاثر Antiproliferation[10]. اما الزيوت الثابتة الموجودة في النبات فلها دور مضاد للسرطان ايضا ومنها الحامض الدهنيOleic acid الذي له القابلية في تثبيط نمو الخلايا السرطانية من خلال ايقاف عملية تكوين الاوعية الدموية Angiogenesis للخط الخلوي السرطاني لسرطان القولون HCTIS [11]. ولكون النبات يحوي على مجموعة كبيرة من المركبات الفعالة والتي لها دور مهم في تثبيط الخطوط الخلوية السرطانية لذا هدف البحث الى دراسة تاثير نبات الكلغان على بعض الخطوط الخلوية السرطانية خارج الجسم الحي.

المواد وطرائق العمل:

جمع النبات وتحضير المستخلصات النباتية:

جمعت حبوب نبات الكلغان من حدائق جامعة بغداد –الجادرية وابي غريب في شهري ونيسان وايار 2006. جففت الاوراق وطحنت بجهاز الطحن وحفظت في حاويات بلاستيكية نظيفة بعيدة عن الضوء والحرارة والرطوبة لحين الاستعمال. جرى تحضير المستخلصات الخام بطريقة التنقيع والتحريك وحسب[12]، بوزن 15 غرام من المسحوق النباتي واضافة 100 مليليتر من المذيب الماء المقطرله . بعد وزن المستخلص قسم الى عدة اقسام وحفظ كل منها في قنينة تحت درجة حرارة 4 ْم. اذيب 0.1 غم من المستخلص الجاف في 10مل من الوسط الزرعي RPMI الخالي من المصل (serum free media)، وخفف بالمحلول نفسه ورشح بورق الترشيح Whatman 1 و ثم اعيد ترشيحه وتعقيمه بورق ترشيح Nalgen filter ذو ثقوب بسعة 0.22 µm.

تاثير المستخلص المائي الخام في نمو الخطوط الخلوية السرطانية والطبيعية:

- **تهيئة الخطوط الخلوية**

تم الحصول على انواع من الخطوط الخلوية وهي : الخط الخلوي السرطاني RD (التمريرة 120) لخلايا العضلة البشرية من مختبرات الصحة المركزيةوالخط الخلوي السرطاني لسرطان الحنجرة Hep-2(التمريرة 228) والخط الخلوي السرطاني لسرطان الغدة اللبنية AMN-3 (التمريرة 98) من المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية , والخط الخلوي الطبيعي REF لجنين الجرذ (التمريرة 18) من المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية / الجامعة المستنصرية. تم عمل مزارع ثانوية (passage or subculture) لكل خط خلوي وتحت ظروف معقمة وحسب طريقة [13]. وتمت متابعة الخطوط الخلوية يومياً للتاكد من خلوها من اي تلوث بفحصها بوساطة مجهر مقلوب الطور . Inverted phase contrast microscope واصبحت الخلايا جاهزة للاستعمال بعد تكوينها عدة طبقات من الخلايا (overgrowth).

- **اختبار سمية المستخلص المائي الخام في نمو الخطوط الخلوية السرطانية والطبيعية**

حضرت عشرة تراكيز مخففة وفقا لما جاء به الباحث عبد المجيد [14]، من المستخلص المائي الخام وكالاتي : 0.1 ,1، 2.5 5 ، 10 ،100 ، 250 ، 500 ، 1000، 2500، 5000، 1000 µg/ml و استخدمت انيا.ُ

جَهز عالق الخلايا عن طريق معاملة وعاء الزرع النسيجي في وعاء حجم 25 مل بمحلول التربسين / فرسين المعقم (20 مل من محلول التربسين (1g : 100ml PBS) 10 مل من محلول الفرسين (1g Acetic Acid Ethylene 370 PBS:Diamine :100 DW، ثم اضيف لـه20 مل من الوسط الزرعي الجديد الخالي من المصل SFM المعقم (16.4g RPMI-1640 : 0.2 ml : 7.2g sodium bicarbonate gentamycin : اكمل ا لحجم الى 1 لتر باضافة ماء مقطر)، تم مزج عالق الخلايا جيدا وتم نقل 0.2 مل الى حفر طبق معايرة الزرع النسيجي ذات القعر المسطح باستعمال ماصة اوتوماتيكية دقيقة، تركت الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 37 ْم لحين التصاق الخلايا في الحفرة. تم التخلص من الوسط القديم في الحفر، واضيف 0.2 مل من التراكيز المحضرة سابقا من المستخلصات وبواقع 3 مكررات لكل تركيز، فضلا عن مكررات السيطرة (وسط زرعي فقط). حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 ْم. و بعد مرور مدة التعريض المحددة للحضن (72، 48 ،24) ساعة للخط الخلوي السرطاني RD و 72 ساعة للخط الخلوي الطبيعي REF، اخرج الطبق من الحاضنة وازيل الوسط الزرعي واضيف محلول صبغة البنفسج البلوري (5g powder crystal violate : 200ml methanol : 50ml

formalin : 1L D.W) للحفر الحاوية على الخلايا وبحجم 0.2 مايكروليتر لكل حفرة، واعيد الطبق مرة ثانية الى الحاضنة ليحضن لمدة 20 دقيقة، اخرج الطبق وازيلت محتوياته وغسلت الخلايا بالماء المقطر لحين زوال الصبغة، ثم جففت الاطباق وهيات للقرءة بجهاز الاليزا بطول موجي 492 نانوميتر.

تم تحويل قيم التاثير السمي للمستخلصات الخام لنبات الكلغان في الخطوط الخلوية الى نسب مئوية ووفق الشكل الاتي :

النسبة المئوية لحيوية الخلايا = قراءة امتصاصية الخلايا المعاملة لكل تركيز / خلايا السيطرة × 1000(14).

التحليل الاحصائي :

استعملت تجربة عاملية حسب التصميم العشوائي الكامل CRD في تحليل تاثير التركيز ومدة التعريض في حيوية الخلايا المدروسة وقورنت المتوسطات باختبار اقل فرق معنوي LSD واستعمل البرنامج SAS لهذا الغرض [15].

النتائج :

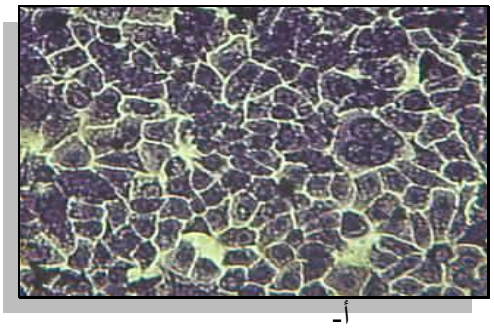
تأثير المستخلص المائي الخام لنبات الكلغان في خلايا سرطان الحنجرة البشري (Hep-2).

أظهرت النتائج المبينة في الجدول (1) ان تأثير المستخلص المائي الخام لحبوب الكلغان في خط الخلايا (Hep-2) أعتمد على التركيز المستخدم ووقت التعريض، فهو لم يظهر تأثيراً سمياً على خلايا الـ (Hep-2) بعد مرور 24 ساعة من التعريض الا عند استخدام التراكيز العالية فقط التي تراوحت بين (250 - 10000) مايكروغرام/مليلتر، وكان هنا ك انخفاضاً في النسبة المئوية لحيوية الخلايا (57 - 31) % اي بنسبة تثبيط نمو تراوحت بين (43-69) % ، اما عند التعريض لمدة 48 ساعة فقد بدأ التأثير السمي في خط خلايا (Hep-2) بفرق معنوي عند معاملة السيطرة بمستوى ($P<0.05$) عند التركيز 10 مكغم/مليلتر وباتجاه التراكيز العالية عند التركيز 10000 مكغم/مل، اذ كان هناك انخفاض في النسبة المئوية لحيوية الخلايا من (57 –32)%اي بنسبة تثبيط تراوحت بين (68 -43) % ، اما عند التعريض لمدة 72 ساعة فيبدأ التاثير السمي المعنوي من التركيز 5 مكغم/مل نحو أعلى تركيز 10000 مكغم/مل، اذ تراوحت النسبة المئوية لحيوية الخلايا ما بين (25-60) % اي بنسب تثبيط نمو ما بين (40 - 75)%. كما أظهرت فروقاً معنويةً بمستوى ($P<0.05$) ما بين التراكيز المستخدمة لكل مدة تعريض،و فضلا عن ذلك فقد سجلت فروقا معنويةً بين التركيز الواحد ضمن اوقات التعريض الثلاثة (24،48، 72) ساعة. وتوضح الصورة (1) الفرق ما بين خلايا الـ Hep-2 في مجموعة السيطرة وتلك المعاملة بالمستخلص المائي الخام لنبات الكلغان والتي تتميز الخلايا بتفجي السايتوبلازم ووجود كمية من الحطام الخلوية cellular debris وتحلل الانوية.

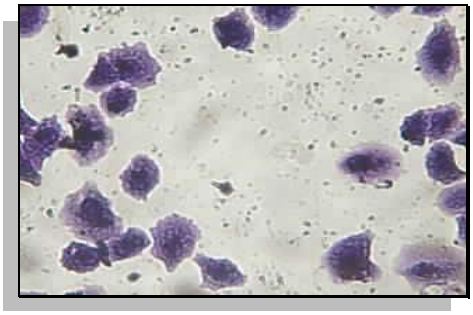
جدول (1): معدلات التثبيط للخط الخلوي السرطاني (Hep-2) بعد التعريض لمدد (24، 48 ،72) ساعة وباستخدام المستخلص المائي الخام لحبوب الكلغان .

مدة التعريض Time exposure	تركيزالمستخلص Concentrationof extract (µg/ml) مايكروغرام/مليليتر									
	معدل النسبة المئوية لثبيط الخلايا (المعدل±الخطا القياسي)									
	0.1	1	2.5	5	10	100	250	500	1000	10000
24 ساعة	0.44±14.36 g , A	0.69±13.04 g , A	1.52±22.28 F , A	1.69±32.99 e , A	0.62±31.18 e , A	0.73±37.53 d , A	0.97±43.40 c , A	0.91±52.63 b , A	1.72±67.30 a , A	0.95±69.64 a , A
48 ساعة	1.99±27.21 g , B	0.74±28.32 g , B	1.50±36.55 F , B	1.37±39.08 ef , B	1.34±43.35 cde, B	1.67±41.29 cd ,A	1.27±45.09 cd,A	2.89±46.57 c,AB	3.95±62.97 b , A	0.32±68.82 a,A
72 ساعة	1.80±33.07 e , C	1.86±33.21 e , C	1.92±33.07 E , B	1.92±40.00 d , B	1.70±40.84 d , B	1.70±41.67 d , A	0.92±52.40 c , B	21.7±57.40 c, B	1.62±66.28 b , A	4.00±75.02 a , B

- الأحرف المختلفة الكبيرة تعني وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية $P<0.05$ بين معدل العمود الواحد.
- الأحرف المختلفة الصغيرة تعني وجود فروق معنوية عند مستوى $P<0.05$ بين معدل الصف الواحد بحسب اختيار دنكن متعدد الحدود.



أ-



ب-

الصورة (1)المقارنة بين خلايا Hep-2 ، عند التركيز 10000 مايكروغرام /مل بعد 72 ساعة من التعريض (Crystal violet , 100x).

أ- تمثل الطبقة الاحادية monolayer السيطرة (غير المعاملة).(100X)

ب - الخلايا المعاملة بالمستخلص المائي لحبوب الكلغان تتميز بتفجي السايتوبلازم وتحلل الانوية (100X).

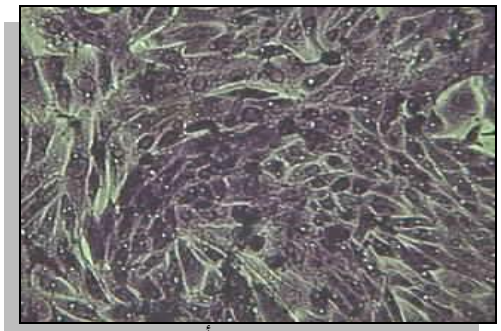
تأثير المستخلص المائي الخام لحبوب الكلغان في خلايا سرطان الغدة اللبنية الفأري (AMN- 3):

ان المستخلص المائي لحبوب الكلغان له تأثير سمياً على خلايا سرطان الغدة اللبنية الفأري وهومماثل تقريباً لتأثيره على خلايا سرطان الحنجرة البشري (Hep-2)، فبعدمدة تعريض 24 ساعة لم تظهر التراكيز الواطئة فروقاً معنوية، فيما ظهرت فروق معنوية بمستوى احتمالية $P<0.05$عند استخدام التراكيز العالية ابتداءاً من التركيز 250 مكغم/مل وصولاً الى أعلى تركيز مستخدم (10000 مكغم/مل)، اذ تراوحت النسبة المئوية لانخفاض حيوية الخلايا ما بين هذين التركيزين من (38-56) % ، اي بنسبة تثبيط نمو ما بين (44-62) %. كما ظهرت فروقاً معنوياً $P<0.05$ في النسب المئوية لحيوية الخلايا عند استخدام التراكيز المختلفة ولكل مدة تعريض للمستخلصات الثلاثة وليست في التراكيز كلها، كما مبين في جدول (2). فبزيادة التركيز ومدة التعريض تزداد نسبة انخفاض حيوية الخلايا وترتفع نسبة التثبيط، فبعد مدة تعريض 48 ساعة ظهر التأثير السمي بشكل فرق معنوي مقارنة مع السيطرة ابتداءاً من التركيز 100 مكغم/مل وباتجاه التراكيز الأعلى وبنسبة انخفاض في حيوية الخلايا تراوحت ما بين (59-36) %، اي بنسبة تثبيط تراوحت ما بين (41 -64) %، اما عند تعريض الخلايا لمستخلص ولمدة 72 ساعة، فيبدأ التأثير السمي باظهار فرقاً معنوياً بمستوى $P<0.05$ عند التركيز 10 مكغم/مل وباتجاه التركيز الأعلى عند 10000 مكغم/مل بنسبة تثبيط تراوحت ما بين (44-67) %. و توضح الصورة (2) الفرق بين خلايا AMN-3 في مجموعة السيطرة مقارنة مع الخلايا المعاملة بالمستخلص المائي الخام التي تميزت فيها الخلايا بقلة العدد وفقدان الالتصاق وتغلظ النواة وتحلل الانوية .

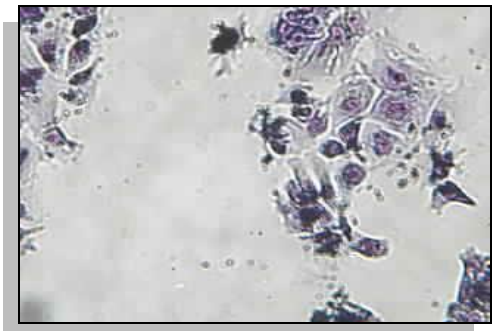
جدول (2): معدلات التثبيط للخط الخلوي السرطاني (AMN-3) بعد اوقات التعريض الثلاثة (24، 48 ،72) ساعة وباستخدام المستخلص المائي الخام لحبوب الكلغان

تركيز المستخلص Concentration of extract (µg/ml)										وقت التعريض
معدل النسب المئوية لتثبيط الخلايا (المعدل±الخطا القياسي)										Time exposure
10000	1000	500	250	100	10	5	2.5	1	0.1	
1.96±62.97 a , A	51.98 4.82± ab , A	51.86 4.93± ab , A	44.60 3.90± b , A	33.33 3.75± c , A	23.70 1.13± cd , A	1.25±22.38 cd , A	3.41±18.53 d , A	3.41±15.53 d , A	3.95±12.51 d , A	24 ساعة
1.02±64.35 a, A	53.10 3.64± ab , A	52.37 3.74± ab,A	49.81 4.82± abc,A	41.11 6.05± bc ,A	39.05 5.45± bcd, B	9.61±38.19 bcd , A	2.49±36.25 cd , B	0.93±24.45 de , A	3.93±15.14 e , A	48 ساعة
1.16±67.74 a , A	61.69 3.07± a , A	52.41 4.19± b, A	48.38 3.35± b , A	46.10 2.94± bc , A	44.35 2.51± bc , B	0.69±37.50 cd , A	2.68±39.91 cd , B	2.74±39.51 cd , B	0.58±34.54 d , B	72 ساعة

- الأحرف المختلفة الكبيرة تعني وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية $P<0.05$ بين معدل العمود الواحد.
- الأحرف المختلفة الصغيرة تعني وجود فروق معنوية عند مستوى $P<0.05$ بين معدل الصف الواحد بحسب اختيار دنكن متعدد الحدود.



ب-   أ-



الصـورة (2)المقارنـة بـين خلايـا AMN-3، عنـد التركيـز 10000 مـايكروغرام /مـل بعـد 72 سـاعة مـن التعريض (Crystal violet , 100x).

أ- تمثل الطبقة الاحادية monolayer السيطرة (غير المعاملة).(100X).

ب - الخلايا المعاملة بالمستخلص المائي لحبوب الكلغان تتميز بفقدان التصاق الخلايا وتغلظ النواة وموت الخلايا (100X).

تأثير المستخلص المائي الخام لحبوب الكلغان في خلايا العضلة البشرية (RD).

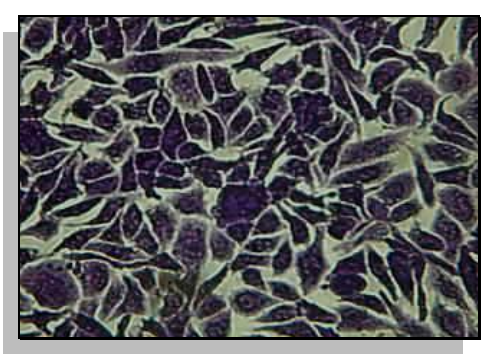
أوضحت النتائج الاحصائية المثبتة في الجدول (3) ظهور التأثير السمي للمستخلص المائي بعد مدة تعريض 24 ساعة ابتداءاً من التركيز 100 مكغم/مل وباتجاه التراكيز العالية بمستوى احتمالية P<0.05 مقارنة مع مجموعة السيطرة، اذ بلغت نسبة انخفاض حيوية الخلايا ما بين التراكيز (100-10000) مكغم/ملمـــن (54-59) %اي بنسبة تثبيط نمو تراوحت ما بين (41-46)% ، وعند زيادة مدة التعريض الى 48 ساعة بدأ التأثير السمي لهذا المستخلص بفروق معنوية مشابهة لما هو عليه في مدة 24 ساعة ولكن عند التركيز الأعلى والأخير، اذ بلغت النسبة المئوية لانخفاض حيوية الخلايا 44 % ، اي بنسبة تثبيط 56 %.

وبزيادة مدة التعريض تزداد نسبة التثبيط وتقل حيوية الخلايا. وبلغت نسبة انخفاض حيوية الخلايا عند التركيز 10000 مكغم/مل الى 28 % وبنسبة تثبيط 72 % بعد ان عُرضت الخلايا الى المستخلص ولمدة زمنية وصلت الى 72 ساعة. كما أظهر استخدام التراكيز الثلاثة ولمدة تعريضية واحدة فروق معنوية بمستوى احتمالية P<0.05 وكذلك بين التركيز الواحد وبثلاثة أوقات تعريضية مختلفة عند التركيز 500 مكغم/مل توضح الصورة (3) الفرق. توضح الصورة (3) الفرق بين خلاياRD في مجموعة السيطرة مقارنة مع الخلايا المعاملة بالمستخلص المائي الخام التي تميزت فيها الخلايا بوجود Apoptosis Cell وتحلل الانوية وتحذف الاغشية الخلوية وظهور بعض الخلايا المنية.

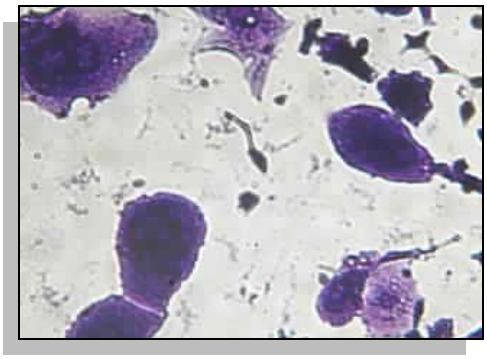
جدول (3): معدلات التثبيط للخط الخلوي السرطاني (RD) ولاوقات تعريضية ثلاث (24، 48 ،72) ساعة وباستخدام المستخلص المائي الخام لحبوب الكلغان.

تركيز المستخلص Concentration of extract (µg/ml)										وقت التعريض
معدل النسب المئوية لتثبيط الخلايا (المعدل±الخطا القياسي)										Time exposure
10000	**1000**	**500**	**250**	**100**	**10**	**5**	**2.5**	**1**	**0.1**	
1.00±46.03 a , A	±43.65 1.72 ab , A	43.12 2.02± ab , A	42.32 2.42± ab , A	41.00 2.40± bc , A	37.30 0.66 cd , A	0.66±36.77 d , A	0.31±36.15 d , A	0.52±34.39 d , A	0.30±33.86 d , A	**24ساعة**
0±56.81 a, B	±44.65 0.44 b , A	44.30 0.36± b ,A	42.89 0.26± c ,A	40.95 0.50± d ,A	37.48 0.45± e, A	0.44±37.77 e , A	0.58±37.13 e , A	0.30±37.07 e , A	0±35.48 e , A	**48 ساعة**
1.16±72.42 a , C	±61.46 0.50 b , B	54.31 0.59± c,B	43.52 1.15± d , A	41.02 0.47± e , A	38.20 1.00± ef, A	0.99±38.37 ef , A	0.99±38.20 ef , A	0.91±38.53 f , A	0±38.53 f , A	**72ساعة**

- الأحرف المختلفة الكبيرة تعني وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية P<0.05 بين معدل العمود الواحد.
- الأحرف المختلفة الصغيرة تعني وجود فروق معنوية عند مستوى P<0.05 بين معدل الصف الواحد بحسب اختيار دنكن متعدد الحدود،



أ-



ب-

الصورة (3)المقارنة بين خلايا RD ، عند التركيز 10000 مايكروغرام /مل بعد 72 ساعة من التعريض (Crystal violet , 100x).

أ- تمثل الطبقة الاحادية monolayer السيطرة (غير المعاملة).(100X)

ب- خلايا الـ RD المعاملة بالمستخلص المائي لحبوب الكلغان تتميز بوجود Apoptotic cell تحلل النواة وتمزق الاغشية الخلوية وظهور بعض الخلايا الميتة (100X).

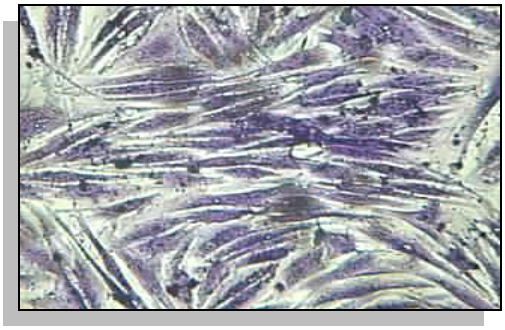
تأثير المستخلص المائي الخام على الخط الخلوي الطبيعي للأرومة الليفية لجنين الجرذ (REF) Rat Embryo Fibroblast:.

اظهرت النتائج الاحصائية لخلايا الأرومة الليفية لجنين الجرذ الطبيعية بعد التمريرة 16 بدءاً من تراكيز المستخلص المائي الخام ولمدة تعريضية 72 ساعة عدم وجود فروق معنوية بمستوى احتمالية $P<0.05$ عند التراكيز المستخدمة للمستخلص المائي الخام مقارنة مع مجموعة السيطرة، وهذا يعني عدم وجود تأثير سمي واضح لذلك المستخلص على الخط الخلوي للأرومة الليفية الطبيعي لجنين الجرذ (REF) عند استخدام التركيز نفسه. كما هو مبين في الجدول (4).

والصورة (4) توضح الفرق بين خلايا الأرومة الليفية الطبيعي (REF) في مجموعة السيطرة مع المعاملة بالمستخلص المائي الخام لنبات الكلغان.

جدول (4): معدلات التثبيط للخط الطبيعي (REF) خلال مدة تعريض 72 ساعة وباستخدام المستخلص المائي الخام.

المادة المستخلص	تركيز المستخلص Concentration of extract (µg/ml)									
Extract	معدل النسب المئوية لتثبيط الخلايا(المعدل±الخطأ القياسي)									
	10000	1000	500	250	100	10	5	2.5	1	0.1
الماني	1.66±7.69 A	0.96±4.80 A	2.41±2.88 A	1.92±1.92 A	2.41±0.96 A	0 A	0 A	0 A	0.32±0.32 A	0.32±0.64 A



أ-

الصورة (4) مقارنة بين خلايا الـREF في معاملة السيطرة (غير المعاملة) مع أخرى تمت معاملتها بالمستخلص المائي الخام لحبوب الكلغان ،عند التركيز10000 مايكروغرام /مل بعد ساعة 72من التعريض(Crystal violet, 100X).

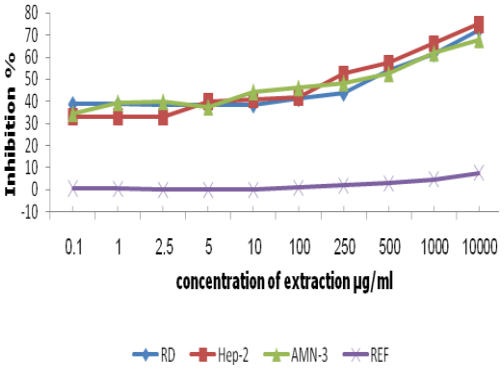
أ- خلايا الـ REF السيطرة

ب- خلايا الـ REF المعاملة بالمستخلص المائي .

المقارنة بين الخطوط الخلوية :

وفي تجربة مقارنة لدراسة تأثير كل من المستخلص المائي الخام على الخطوط الخلوية السرطانية الثلاثة والخط الخلوي الطبيعي بعد مدة تعريض 72 ساعة، مع عد الخلايا الطبيعية لجنين الجرذ مجموعة السيطرة عند المقارنة. لوحظ ان هنالك

تأثير سمي واضح للمستخلص المائي الخام في نمو الأنواع الثلاثة من الخلايا السرطانية مقارنة مع خلايا مجموعة السيطرة (الخلايا الطبيعية REF)، فقد كان الخط الخلوي السرطاني الـ Hep-2 هو أكثر الخطوط حساسية للمستخلص المائي يليه الخط الخلوي السرطاني الـ RD ثم الـ AMN-3.في حين لم يظهر اي تاثير سمي على الخط الخلوي الطبيعي. كما هو موضح في الشكل (1).



شكل(4) مقارنة التاثير السمي لمستخلصات حبوب الكلغان المائية في انواع خطوط الخلايا المدروسةRD,Hep-2,AMN-3,R

المناقشة :

اوضحت النتائج ظهور تاثيرات سمية عالية ولجميع التراكيز ولاسيما العالية من المستخلص المائي الخام ولكل من مدد الحضن 24، 48، 72 ساعة، اذ اشارت نتائج الدراسة ان التاثير السمي للمستخلص المائي الخام لحبوب الكلغان في خلايا سرطان الحنجرة البشري Hep-2 وسرطان الغدد اللبنية الفاري AMN-3 و وسرطان العظلة البشري RD وخلايا جنين الجرذ الطبيعية REF اعتمد بصورة اساسية على التركيز المستخدم ومدة التعريض ونوع الخلايا المعرضة خارج الجسم الحي.

لقد حققت التراكيز العالية للمستخلص المائي الخام تاثير سمي عالي في حين كانت التراكيز الواطئة اقل تاثيرا، اي انها تعتمد على الجرعة والوقت Time and dose dependent phenomenon اي ان مدة التعريض والتركيز عامل مهم من العوامل المؤثرة والاساسية في مدى شدة التاثير التثبيطي للمستخلص الخام في الخلايا الخلوية السرطانية ، بينت النتائج ان التعريض لمدة 72 ساعة كان اكثر سمية على الخلايا من مدتي التعريض 24، 48 ساعة وكذلك التراكيز العالية اكثر سميا من التراكيز الواطئة ، وهذا يؤكد لما جاؤا به [16] في دراستهم للتاثير التثبيطي لمركب silymarin المعزول من حبوب نبات الكلغان في الخط الخلوي السرطاني preneoplastic epidermal cell line (JB6C14) ، حيث اعتمد التاثير السمي على شدة تركيز المستخلص ومدة التعريض.

اما في تجربة المقارنة بين الخطوط ، فان الاختلاف بين حساسية الخطوط الخلوية السرطانية فيما بينها تجاه المستخلص المائي الخام قد يعزى الى استجابة الخطوط الخلوية تجاه ذلك المستخلص وربما يكون نتيجة تباين المستقبلات الموجودة على سطح الخلية بين نوع واخر، ففي هذه الدراسة كان اكثر الخطوط حساسية تجاه المستخلص المائي هو الخط الخلوي السرطاني Hep-2 اذ اظهر الفحص المجهري تفجي السايتوبلازم وفي بعض الحالات ظهور كمية من الفضلات الخلوية ، يليه الخط الخلوي السرطاني RD، والذي لوحظ فيه وجود الخلايا العملاقة بعدها الخط الخلوي السرطاني AMN-3 وذلك بظهور فقدان لالتصاق الخلايا وتغلظ الانوية. وهذه النتيجة جاءت متوافقة مع ما اشاروا اليه [17] لكن باستعمال مستخلصات نباتية وخطوط خلوية سرطانية مختلفة.

اما بالنسبة الى سبب اختلاف التاثير السمي للمستخلص المائي في الخطوط السرطانية دون تاثرها في الخط الخلوي الطبيعي ، فقد يعزى الى عدد من الخواص الايضية التي تمتلكها الخلايا السرطانية مثل الطبيعة الايضية لتكوين الاوعية الدموية الجديدة Angiogenesis المغذية للاورام و شكل وطبيعة المستقبلات الموجودة على سطح الخلية السرطانية وامكانية ارتباطها بالمركبات المختلفة [18] .وربما الى حساسية الخلايا السرطانية تجاه العقاقير والاشعاع اكثر كما في الخلايا الطبيعية [19].

اما الفعالية السامة للمستخلص المائي الخام فقد تعزى الى احتواء النبات على الكثير من المركبات الفعالة، والتي تكون ذات تاثير سمي على ادامة الخطوط الخلوية السرطانية خارج جسم الكائن الحي وداخله وعدت على اساسها مواد علاجية للسرطان [20]. ومن اهم هذه المركبات الموجودة في نبات الكلغان الفلافونيدات Kampferol و Quercetin و Taxifolin و Flavolignan. أما آلية تأثيرها على الخلايا السرطانية فقد يكون من خلال: دخولها الموت المبرمج Apoptosis وتوقف الدورة الخلوية Cell Cycle arrest عند أحد أطوار المرحلة البينية (G_2 و S و G_1) او مرحلة الانقسام M phase [21]. اذ توصل [21] الى ان مركب السليمارين Silymarin (من أهم الفلافونيدات) له القابلية في التأثير على الخطوط الخلوية السرطانية من المبيض والصدر والبروستات والمثانة والقولون اذ يعمل هذا المركب على ايقاف الدورة الخلوية عند الطور G_1/ phase وحث مثبطات انزيمات السايكلينات مثل

P21 فضلا عن عمله كمضاد لجينات الموت المبرمج كما في Bcl-2 وتثبيط عوامل الاستنساخ كما هو الحال في NF-KappB،كما وجد ان هذا المركب يتسبب في تثبيط الـ Angiogenesis والانبثاث Metastasis. كما يعمل كل من السليمارين والسلبين على اختزال وتقليل مستوى بروتين الـ Cyclin D1 الذي يلعب دوراً في الدورة الخلوية Cell Cycle لسرطان بروستات البشر [22]. كما أشار [23] الى ان السلبين يعمل على تثبيط الأوعية الدموية Angiogenesis للخط الخلوي السرطاني Human Umbilical Vein endothelial Cell line (ECV304). بين [24] ان مركبات السيليمارين Silymarin والسلبين Silibin ذات دور تثبيطي للخط الخلوي السرطاني لبروستات البشر خارج الجسم وداخله، وذلك من خلال تأثير تلك المركبات على الخلايا السرطانية المتمثلة في تغيير مرحلة progression من تطور السرطان، وتثبيط مسقبل عامل النمو البشري epidermal growth factor receptor، وتثبيط عامل Nuclear Factor KappB (NF-KB) ، وعامل تكوين الأوعية الدموية الاولي proangiogenesis factor. وربما تعزى الفعالية السامة للخلايا السرطانية الى احتواء النبات الى مركبات الـ polyphenols التي تعمل على تثبيط الخطوط الخلوية السرطانية لسرطان البروستات وهي : DU145 و LNCaP و PC3 [25].

المصادر :

1. Cammie, A. and Burges, B.B.A. 2003. *Silybum marianum* (Milk Thistle). J. Pharmacy Society of Wisconsin.

2. يحيى،توفيق الحاج. 2003. النبات والطب البديل، الدار العربية للعلوم. مطبعة المتوسط- جامعة بيروت-لبنان.

3. Flora, K.M.; Hahn, H.; Rosen, K. and Benner 1993. Milk thistle the (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. American Journal of Gastroenterology, 93: 139-143.

4. Fraschini, F.; Dermartini, G. and Esposti, D. 2002. Pharmacology of Silymarin. Clin Drug Invest, 22: 51-65.

5. Duke ,J.A. 2004.Milk Thistle seed chemical constituents.Sky herbals. J. 08:27:31.

6. الأيوبي،عمر. 2003. الطب البديل/ التداوي بالاعشاب والنباتات الطبية، أكاديمية انترناشيونال.

7. Narayana, K.R.; Reddy, M.S.; Chaluvadi, M.R. and Krishna, D.R. 2001. Bio flavonoid classification, pharmacological, Biochemical effects and theraputic potent. Indian. J. pharmol. 33: 2-16.

8. Katz, A.E. 2002. Flavonoid and botanical approaches to prostate health. J. Atern. Complement. Med., 8: 813-821.

9. Chu, SC.; Chiou, HL.; Chen, PN.; Yang, SF. and Hsieh, YS. 2004. Silibinin inhibits the invasion of human lung cancer cells via decreased productions of urokinase- plasminogen activator and matrix metalloproteinase-2 Mol carcinog. Jul; 40(3):143-9

10. Zi, X.; Grasso A.W.; Kung, H.J. and Agarwal, R. 1998. A Flavonoid antioxidant, Silymarin, inhibits activation of erb B1 signaling and induces cyclin-dependent kinase inhibitors, G1 arrest, and anticarcinogenic effects in human prostate carcinoma DU145 cells. Cancer Res, May1; 58(9): 1920-1929.

11. Li, J.; Guo, W.J. and Yan, Q.Y. 2002. Effect of urosolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCTIS. World Gastreonteral., 8: 493-495.

12. الجنابي، علي عبد الحسين صادق. تاثيربعض المستخلصات النباتية على نمو بعض الفطريات الممرضة لجلد الانسان . 1996 ، رسالة ماجستير، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية، جمهورية العراق.

13 - Freshney, R.I. Culture of animal cells: A manual for basic technique (4th ed Wiley –liss, a John Wiley & sons, Inc. Publication, New York, 2000. P.566.

14- Abdul –Majeed, M.R. Induction & characterization of SU-gg plasmacytoma cell line & its effect

on mice immune response, 2000, PhD. Thesis Nahrain University.

15- SAS. Statistical Analysis system, users Guide. Statistical Version 7th ed. SAS. Inst. Inc. Carj. N. C. USA, 2004.

16- Katiyar, S.K.; Anshu, M.R. and Manjeshwar, S.B. 2005. Silymarin induces apoptosis primarily through a P53- dependent pathway involving Bcl-2/ Bax, cytochrome C release and Caspase activation. Mol Cancer Ther; 4: 207-216.

17-Chen,F.D.; Wu,M.; Wang ,H.E.; Hwang ,J.J.; Hong ,C.Y.; Huang ,Y.T.; Yen ,S.H.and Ou, Y.H.2001. Sensitization of tumor but not normal tissue to the cytotoxic effect of ionizing radiation using *Panax notoginseng* extract .Am.J.Chin.Med., 16:234-242.

18-Moteki, H.; Hibasmai, H.; Yamada,; Katsuzaki, H.; Imai, K. and Komiya, T. 2002. Specific of apoptosis 1,8 –cineole in two human Leukemia Cell line, but not in a human stomach cancer Cell lines. Oncology Reports, 9: 757-760.

19-Karp, Geraled. 2003. Cell and molecular biology concepts and experiments. 3th ed. Inc. USA.

20-Birt, F.D.; Hendrich, S. and Wang, W. 2001. Dietary agents in cancer prevention: Flavonoids and isoflavonoids. Pharmacology and Therapeutics, USA; 90: 157-177.

21-Agarwal, R.; Agarwal, C.; Lchikawa, H.; Singh, R.P. and Agarwal, B.B. 2006. Anticancer potential of Silymarin: from bench to bed side. Anticnacer Res; 26(6B): 4457-98.

22-Kohno, H.; Suzuki, R.; Sugie, S.; Tsuda, H. and Tanaka, T. 2005. Dietary supplementation with silymarin inhibits 3,2-Dimethyl -4-Aminobiphenyl – Induced prostate carcinogenesis in Male F344 Rats. Clin Cancer Res; 11(13).

23-Yoo, HG.; Jung, SN.; Hwang, YS.; Park, JS.; Kim, MH.; Jeong, M.; Hhn, S.J.; Ahn, BW.; Shin, BA.; Park, RK. and Jung, YD. 2004. Involvement of NF-KB and Caspase in Silibinin- induced apoptosis endothial cell. Int J Molec Med. 13: 81-86.

24-Singh, R.P. and Agarwal, R. 2004. Prostate cancer prevention by silibinin Curr cancer Drug Target.,4: 1-11.

13. 25-Bennani, H.; Drissi, A.; Giton, F.; Kheuang, L.; Fiet ,J. and Adlouni, A. 2006. Antiproliferative effect of polyphenols and sterols of virgin organ oil on human prostate cancer cell lines. Cancer Detection and prevention., J.331: (6).

The Effect of *Silybum marianum* L. aquatic crude extracts on the cancer cell lines and normal cell line *in vitro*

*Israa Sekar Salmman** *Mohammed Abdul-Hadi Gali**

*Nahi Yousif yaseen***

*Biology department- College of science for Women /Baghdad university
** Iraqi center for cancer research and medical genetics

Abstract:

The aquatic crude extract of *Silybum marianum* dry grains prepared by melting them in distil water by the method of soak and shake. The effect of *Silybum marianum* crude extract studied *in vitro* on three tumor cell line the Hep-2, AMN-3 and RD for 24, 48 and 72 hours of exposure, and one cell line of normal cells REF for 72 hr exposure. The results showed that the prescence of toxic effect of the aquatic crude extract on the cell lines of Hep-2, AMN-3 and RD at 10 and 100 µg/ ml upto the higher concentrations when they exposed to the extract for 48 hr. as compared with the control treatment, and when the exposure period increased to 72 hr. the toxic effect started at low concentrations (5 and 10 µg/ ml) as compared with the control group. Results comparision showed that the AMN-3 cell line was the most affected ane by the aquatic extract then the Hep-2 and RD, while normal REF was never affected. The microscopic test showed toxic effect for the low and high concentration of aquatic extract on the cells which was presented by obrious changes on the cell lines growth and loosing their distingwish cellular form.