Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics

التاثير السمي الخلوي للمستخلص الخام الايثانولي لاوراق نبات الشوك المبارك *Cnicus benedictus* (Blessed thistle) في خط خلايا سرطان الغدة اللبنية الفأري AMN-3

صالح محمد رحيم[1]، شلال مراد حسين العتابي[2] ، يوسف شكوري ياسين السامرائي[3]

1 قسم علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة تكريت
2 كلية الصيدلة/ الجامعة المستنصرية
3 الشركة العامة لصناعة الادوية والمستلزمات الطبية-سامراء ، وزارة الصناعة والمعادن

الخلاصة:

تم التحري عن التاثير السمي الخلوي للمستخلص الايثانولي الخام لاوراق نبات الشوك المبارك في خط خلايا سرطان الغدة اللبنية الفأري (AMN-3)، اذ تم اخذ تراكيز عشرية تبدأ من (10000،1000،100،10،1)مايكروغرام/مل، فلوحظ عدم وجود تثبيط عند التراكيز (1،10،100) مايكروغرام/مل اي اقل من 50% مع تسجيل فروق معنوية بين التراكيز، اما التركيزين (1000،10000) مايكروغرام/مل فكانت نسبة التثبيط اكثر من 50% والتي بلغت على التوالي (76.2و50.6)% عند الوقت التعريضي 24 ساعة. توصلت الدراسة الى وجود تاثير سمي قاتل للمستخلص الايثانولي للنبات عند التراكيز المعتمدة وهي (10000، 1000) مايكروغرام/مل، يليها في النتائج التثبيطية عند الوقت التعريضي 72 ساعة عند التركيز (10000) مايكروغرام/مل اذ بلغت نسبة التثبيط (40.9)% كذلك عند نفس التركيز جاءت نسبة التثبيط اقل عند الوقت التعريضي 48 ساعة اذ بلغت زيادة (31.7)%.

اما المقارنات الافقية الاحصائية بين التراكيز للاوقات التعرضية الثلاث فقد اظهرت النتائج الخاصة بالمستخلص الإيثانولي للورقة ان الوقت التعريضي 24 ساعة كان اكثر الاوقات تأثراً بالتثبيط حيث ان التراكيز (1000،10000) مايكروغرام/مل ارتفعت معنوياً بنسب تثبيط على الترتيب (76.2و50.6)% مقارنة بالتراكيز المقابلة لها في الاوقات الاخرى ، كذلك كان الفرق معنوي عند الوقت 72 ساعة للتركيز (100)مايكروغرام/مل مقارنة بالاوقات الاخرى لنفس التركيز، زيادة عند الوقت 72 ساعة لم تكن اي فروق واضحة حيث اشارت النتائج ان نسب التثبيط للتراكيز (1،10) مايكروغرام/مل لم تظهر اي فروق معنوية للاوقات الثلاثة.

من خلال النتائج يمكن الاستنتاج بان نبات الشوك المبارك يعد من النباتات الطبية الواعدة ذات الدور الفعال في معالجة السرطان من خلال تاثيرها التثبيطي والسمي القاتل للخلايا السرطانية.

الكلمات الدلالية: تأثير مستخلص نبات الشوك المبارك Cnicus benedictus على سرطانة الغدة اللبنية الفأري AMN-3 ، المادة الفعالة Cnicin .

المقدمة:

تتجلى الميزة الاساسية للنباتات الطبية بقدرتها على كبح فعالية العديد من انواع البكتريا والفايروسات ومقاومتها وتطهير الجسم منها. ولكي يتم الحصول على افضل نتيجة ممكنة من استعمال النباتات الطبية يجب اخذها بكميات ونسب معينة مسموح بها و معرفة الفترات الملائمة لأخذها واستخدامها(رويحة وامين، 1983).

أتجهت أنظار الباحثين في السنوات الأخيرة الى أهمية استخدام بعض الأعشاب الطبية أو السامة في محاولة لعلاج مرض السرطان (Jimenez-Medina et al., 2006) ولذلك توجهت الأنظار نحو النباتات الموجودة في الطبيعة والتي تقدر بـ 250000 نوع نباتي شُخّص منها اكثر من الف نبات بأمتلاكه مركبات فعالة مضادة للسرطان ومنها مادة Vincristin المستخلصة من نبات الطقوس Vinca rosea اذ استعملت بشكل فعال في معالجة أنواع مختلفة من السرطانات ومنها سرطان الثدي والمبيض (Mukherjee et al., 2001). كما ان اكثر من 50%من العقاقير المعروفة في الوقت الحاضر هي من المنتجات الطبيعية التي لها قدرة السيطرة على الخلايا السرطانية وذلك من خلال تأثيرها في آليات الانقسام الخلوي او في مرحلة ماقبل الانقسام مثل تضاعف الدنا DNA (Mohd et al., 2010).

لقد اعطت تلك النتائج حافزا للبحث عن نباتات محلية اخرى ربما تكون ذات كفاءة عالية في التاثير على الخلايا السرطانية وتثبيط انقسامها. وتعد عملية تثبيط نمو الخطوط الخلوية السرطانية خارج جسم الكائن الحي الخطوة الاولى في استخدام هذه النباتات في علاج السرطان .

يعتبر نبات الشوك المبارك Cnicus benedictus (Blessed thisth-le) ذا اهمية طبية على الرغم من عدم اخذ اهتمامه البايلوجي في العراق ، لهذا النبات تاريخ طويل وحافل في طب الاعشاب حيث اطلق الاغريق عليه اسم Knekos او الشوك ، والرومان Cnicus. وفي القرون الوسطى كان يطلق عليه اسم Carduus benedictus او الشوك المبارك ، لاعتماده كعلاج شافي ذلك الوقت ، واشارت المصادر بان الاسم العلمي benedictus جاء تشريفاً للقديس بينيدكت "واوضحت المعتقدات

Corresponding Address:
Youssef Shakuri Yasin Al-Samarray
The State company for Drugs and Industry and Medical Appliances, Samarra, Ministry of Industry and Mineral.
Email: youssef_bio@yahoo.com

الشعبية القديمة للرومان بان الاشواك تحمي الانسان من الارواح الشريرة والسحرة (Card,2010).
ونظرا الى ماتقدم اختير نبات الشوك المبارك Cnicus benedictus موضوع البحث ، يعود هذا النبات الى العائلة المركبة Compositae اكبر عوائل المملكة النباتية ، ويعتبر نبات حولي ، ويصل طوله الى 60 سم ، واوراقه بطول 30 سم تتميز بوجود شعيرات واشواك صغيرة في الحافة .الازهار صفراء موضوعة على راس زهري Head (Capitulum) ذات قطر 3 – 4 سم ، محاطة بقنابات شوكية عديدة (Beyerl , 1998).

تأتي اهمية النبات من احتوائه على مواد فعالة كمضادات للتسرطن Anti-carncinogens والسرطان Anti-cancer واهمها مادة (Cnicin) و(Arctigenin) و (Arctiin) التي تتميز بفعاليتها القوية في تثبيط الانقسامات المتعددة لبعض انواع خلايا الخطوط السرطانية، اضافة الى فعاليته خارج الجسم الحي In Vitro وكذلك داخل الجسم الحي In Vivo حيث ساعد النبات معالجة التهاب الدماغ لدى الفئران البيض كذلك فعاليته العالية ضد الفيروسات (Hayashi,2010 Anti-virus).

تصنيف النبات: Plant Taxanomy

Rank	Scientific and Common Name
Kingdom	Plantae – Plants
Subkingdom	Tracheobionta – Vascular plants
Superdivision	Spermatophyte – Seed plants
Division	Magnoliophyta – Flowering plants
Class	Magnoliopsida – Dicotyledons
Subclass	Asteridae
Order	Asterales
Family	Asteraceae / Compositae – Aster family
Genus	*Cnicus* L. – Cnicus
Species	*Cnicus benedictus* L. – Blessed thistle

http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=CNBE
الموقع الرسمي لقسم الزراعة الاميركية

صورة(١): نبات الشوك المبارك *Cnicus benedictus L*.

المواد وطرق العمل:

جمع وتصنيف نبات الشوك المبارك Collection and classifica-tion of the plant Cnicus benedictus L. (Blessed thisthle): (وفقاً لكتاب التوزيع الجغرافي للنباتات العراقية)(Al-Rawi,1988) تم مسح المقاطعات الاتية :. مقاطعة الجزيرة السفلى ، مقاطعة الجزيرة العليا ، مقاطعة كركوك ، مقاطعة الموصل ، مقاطعة جبل سنجار ، مقاطعة اربيل ، مقاطعة السليمانية .
وجمع النبات قيد الدراسة من مقاطعة جبل سنجار ومقاطعة السليمانية ومقاطعة الموصل وذلك خلال مرحلة تزهير النبات (الشهر الخامس – الشهر السادس).
وتم تسجيل النبات قيد الدراسة Cnicus benedictus في معشب كلية العلوم / جامعة بغداد حسب الكتاب المرقم ذي العدد 16ب/1302 في 18/2/2015 حيث حملت العينات الكودات (44858،44857،44856).
تحضير المستخلص الكحولي للنبات Preparation of ethanolic extract the plant
مستخلص الورقة : The extraction of leaf
تم اخذ 50 غراماً من مسحوق الورقة ووضع كل مسحوق داخل كشتبان Thimble وضع في جهاز سكسوليت (Soxhlet) حاوي على 300 مل من الكحول الاثيلي (80%) مدة 4 – 5 ساعات . بعد ذلك اخذ المستخلص الكحولي لكل جزء من النبات الى جهاز المبخر الدوار Rotary evapo-rator المخلخل تحت الضغط بحرارة 45 م° ووضع داخل الحاضنة In-cubator بدرجة حرارة 37 م° حتى اكتمال جفافها من الكحول (Har-borne,1984).
الخط الخلوي السرطاني Ahmed-Mohammed-Nahi-2003 (AMN-3) تم تجهيز هذا الخط من قبل المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية / الجامعة المستنصرية عند التمريرة رقم(184) وهو سرطان الغدة اللبنية Mammary adenocarcinoma لاناث فئران نوع Balb/c المصابة بسرطان الغدة اللبنية التلقائي (In vivo sponta-neous mammary adenocarcinoma) تم استحداث هذا الخط في وسط RPMI-1640 مجهز بـ10% من مصل العجل البقري ، وعند تكون الطبقة الاحادية الكاملة (Confluent monolayer) عوملت الخلايا بمحلول التربسين - فيرسين لتقسيمها على مزرعة ثانوية اخرى.
تحضير الوسط الزرعي للخط الخلوي السرطاني Preparation of medium of cancer cell line
تمت تهيئة الوسط الزرعي وفقاً (Freshney,2000) بخلط مكوناته مع بعضها البعض لتحضير 1 لتر منه ، ومن ثم عقمت باستعمال مرشح ذي ثقوب 0.22 مايكرون ، ثم وزع الوسط الزرعي في قناني زجاجية ذات غطاء محكم سعة 200 مل وحفظت في عبوات معقمة بدرجة حرارة 20- م° الى حين الاستعمال.
حيث تم اجراء الخطوات الخاصة بالزرع النسيجي تحت ظروف معقمة

كالاتي :

1 - اضيف 2 مل من محلول التربسين-فيرسين الى قنينة الزرع النسيجي بحجم 25سم3 الحاوية على الخلايا بعد تفريغها من الوسط الزرعي القديم ثم حركت القنينة برفق وحضنت في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م° مدة 15 دقيقة لتفكيك الخلايا الملتصقة وكذلك خلخلة التصاقها بجدار القنينة للحصول قدر الامكان على خلايا احادية مفردة.

2 - اضيفت الى القنينة الحاوية على الخلايا المفككة مايقارب 15 مل من وسط نمو جديد (RPMI-1640) وتم تحريك القنينة جيداً وبعدها افرغت محتويات القنينة الحاوية على الوسط الزرعي الجديد مع الخلايا الى قنينة اخرى جديدة بحيث يكون مستوى الوسط الزرعي مع الخلايا متساو بين القنينتين اي كل قنينة وضع فيها نفس الحجم تقريباً من الوسط الزرعي مع الخلايا وتسمى هذه العملية بالمزرعة الثانوية (Subculture).

3 - حضنت القناني بدرجة 37 م° مدة خمسة ايام (الطبيعة اللوغارتمية لنمو الخلايا) (فريق عمل المركز العراقي لابحاث السرطان والوراثة الطبية) بعد ان كتب عليها معلومات كاملة عن نوع الخلايا ونوع التمريرة الجديدة (New passage) وتم اجراء المزرعة الثانوية ، وتمت متابعة القناني يومياً للتاكد من خلوها من اي تلوث وان الخلايا بحالة جيدة وذلك بفحصها بواسطة المجهر المقلوب Inverted microscope /Olym-pus / Japan .وعندما يصبح النمو داخل القنينة جيداً فان الخلايا تكون جاهزة للاستعمال.

المحاليل الخاصة بدراسة تاثير تراكيز المستخلص الايثانولي في نمو الخط الخلوي السرطاني:

Specific solutions for Study the effect of alcoholic extraction concentrations on cancer cell lines

حُضرت الاوساط والمحاليل المستعملة بحسب الطرائق المتبعة في المركز العراقي لابحاث السرطان والوراثة الطبية وكالاتي:

الوسط الزرعي الخالي من المصل Serum Free Medium (SFM) حُضر بالطريقة نفسها لتحضير (RPMI) لكن دون اضافة المصل. يُستعمل هذا الوسط في تحضير التراكيز المختلفة للمستخلص (الايثانولي).

تحضير صبغة(Methyl Thiazolyl Tetrazolium (MTT

حُضر المحلول بحسب طريقة (Betancur-Galvis et al.,2002) وذلك باذابة 0.005 غم من مسحوق الصبغة في1 مل من المحلول الدارئ(PBS) الدافئ في دورق. وضع الدورق على صفيحة مغناطيسية هزازة، ومن ثم رُشحت الصبغة عبر امرارها في المرشح الغشائي(نوع Syringe filter 0.2 µm) لإزالة البلورات الزرقاء المتشكلة عنها. حُضرت الصبغة حُفظت في ظروف معقمة وفي مكان مظلم لتجنب تأكسدها في الضوء. (ويتم تحضير الصبغة بشكل آني للحصول على نتائج أفضل).

تحضير تراكيز المستخلص (الايثانولي)

حُضر المستخلص الايثانولي وفق طريقة (Abdul-Majeed,2000;Mahony et al.,1989):

بإذابة 0.1 غم من مسحوق المستخلص الخام في 1 مل من الوسط الخالي من المصل (SFM) المحضر سابقاً والمعقم باستعمال مرشح ذي ثقوب بقطر0.22 مايكروميتر. و حُضر منها التركيز الاصل stock ، و عُقم باستعمال مرشح. وحُضر بعد ذلك من كل مستخلص خمسة تراكيز باستعمال الوسط الخالي من المصل free media RPMI-1640 وهي(1 ، 10 ، 100 ، 1000 ، 10000) مكغم/مل وتحت ظروف معقمة. واستخدمت هذه التراكيز جميعها مباشرة وعند تحضير التراكيز المستعملة لاختبارات السمية الخلوية Cytotoxic assay .

قياس السمية الخلوية بدلالة MTT MTT- based cytotoxic assay

• جُهز عالق الخلايا بوساطة معاملة طبقة الخلايا المزروعة في قنينة الزرع النسيجي حجم 50 سم3 بمحلول التربسين- فرسين ، ثم أضيف إليه 20 مل من الوسط الزرعي الحاوي على المصل بنسبة 10 % . تم مزج عالق الخلايا جيداً ونقل 0.2 مل بعد كل مزج جيد إلى حفر طبق معايرة الزرع النسيجي ذي القعر المسطح باستعمال ماصة أوتوماتيكية دقيقة Micropipette .

• تُرك الطبق في الحاضنة بدرجة حرارة 37 °م لمدة تتراوح بين (12-18) ساعة إلى حين التصاق الخلايا في الحفرة وبعدها تم التخلص من الوسط الزرعي القديم في الحفر وإضافة 0.2 مل من التراكيز المحضرة سابقاً لكل من المستخلصات وبواقع أربعة مكررات لكل تركيز. كما تم عمل أربعة مكررات للسيطرة Control وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 °م .

• بعد مرور مدة التعريض Exposure time المحددة للحضن ، أُخرج الطبق من الحاضنة وأزيل الوسط الزرعي وغسلت الخلايا بمحلول دارئ الفوسفات المحضر(PBS) ، بعدها أضيف لكل حفرة 0.1 مل من صبغة MTT stain وتركت لمدة 3 ساعات ، ثم تهمل محتويات الصفيحة من الصبغة بعد انتهاء الوقت في الحاضنه حيث تصطبغ الخلايا الملتصقة بقاع الحفرة باللون الاصفر بعدها يتم اضافة 0.1 مل من محلول DMSO ، ليتم قراءة النتائج باستخدام جهاز الإليزا Microplate Reader عند طول موجي 550 نانومتر .

• أجريت الخطوات السابقة على الخط الخلوي السرطاني AMN-3 بثلاث مدد تعريض وهي 24 و 48 و 72 ساعة .

• تم حساب النسبة المئوية لتثبيط نمو الخلايا Growth inhibition percentage لكل تركيز من تراكيز المستخلصات النباتية بحسب ما جاء في (Gao et al.,2003) عن طريق المعادلة الآتية:

نسبة التثبيط % = (قراءة السيطرة – قراءة المعاملة لكل تركيز) / قراءة السيطرة x 100%

كما تم حساب معدل تحفيز النمو وفقاً لـ (Chumchalova and Sa-marda,2003) وكالآتي:

Proliferation Rate (PR)% = (B/A) x 100

حيث ان: PR: النسبة المئوية لمعدل التحفيز، B: قراءة المعاملة لكل تركيز، A: قراءة السيطرة.

التحليل الاحصائي :

حللت النتائج احصائياً باتباع التصميم العشوائي الكامل Complete Randomize Design (CRD) ولمعرفة فيما اذا كانت الفروقات معنوية بين المعاملات ، استعمل اختبار دنكن متعدد الحدود (Dun-cun multiple test) من خلال البرنامج الاحصائي الجاهز SPSS ((SAS,2012.

النتائج والمناقشة:

التاثير السمي للمستخلص الايثانولي لاوراق نبات الشوك المبارك في نمو خلايا الخط الخلوي السرطاني :

تم اختبار قدرة المستخلص الايثانولي لاوراق نبات الشوك المبارك على تثبيط نمو الخلايا السرطانية خارج جسم الكائن الحي وقد عوملت هذه الخلايا بتراكيز مختلفة من المستخلص الايثانولي بدءاً من التركيز 1 مايكروغرام/مل الى التركيز 10000مايكروغرام/مل وقد تم اعتماد التراكيز 1000،10000مايكروغرام/مل لنسبة القتل العالية التي امتازت بها ، اما التراكيز القليلة فكانت نسب التثبيط اقل من 50% .

لذلك اعتمدت التراكيز الاعلى التي امتازت بنسبة قتل من (50-76.2%) ولثلاثة اوقات هي 24 و 48 و 72 ساعة واعتمد اختبار السمية الخلوية

Cytotoxicity assay لتقويم تأثير تراكيز المستخلص في نمو الخلايا بدلالة النسبة المئوية لمعدل التثبيط IR% ، والذي يستخرج من المعادلة الاتية :

$$\% \text{ IR} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

حيث A تعني B.Control تعني Test.

الخط الخلوي السرطاني AMN-3 :

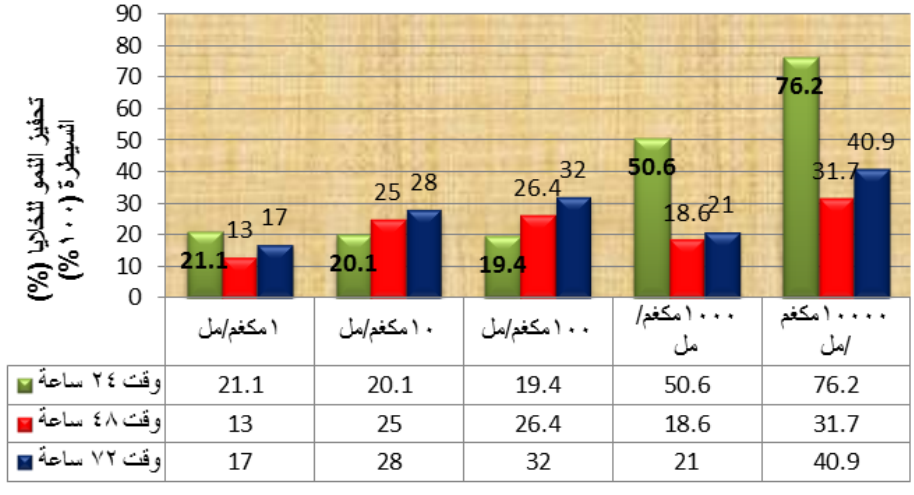
عند معاملة الخط الخلوي السرطاني AMN-3 عند التمريرة (184) بتراكيز مختلفة من المستخلص الايثانولي لاوراق نبات الشوك المبارك ولفترة تعرض 24 و48 و72 ساعة اشارت النتائج الى وجود تثبيط في تكاثر الخلايا عند التراكيز الست الماخوذة ويزداد هذا التثبيط بزيادة التركيز وفترة التعرض .

يبين الجدول والشكل(1) ان لهذا المستخلص تاثير تثبيطي في نمو الخط الخلوي السرطاني AMN-3 وللتراكيز الخمسة الماخوذة وبفروق معنوية كبيرة عن مجموعة السيطرة حيث بلغت اعلى نسب لتثبيط نمو الخلايا عند التراكيز 1000،10000مكغم/مل وكانت نسبة التثبيط عند هذا التركيز على الترتيب %(76.2 و50.6 (ولفترة تعرض 24 ساعة ،وبلغت نسبة التثبيط % (31.7) عند فترة التعرض 48 ساعة ووصلت الى %(40.9) عند فترة التعرض 72 ساعة ، لذلك تعد الجرعة او التركيز مع عامل الوقت الظاهرة الاساسية في شدة التاثير السمي وتسمى هذه الظاهرة بـ Dose and time dependent phenomenon .

في حين اظهر التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية بين التراكيز المستخدمة والسيطرة بمستوى معنوية (P<0.05) للتراكيز (100,1000,10000) مايكروغرام/مل في حين لم تشير نتائج التحليل الاحصائي الى وجود فروق معنوية عند التراكيز (1,10,100) مايكروغرام/مل.

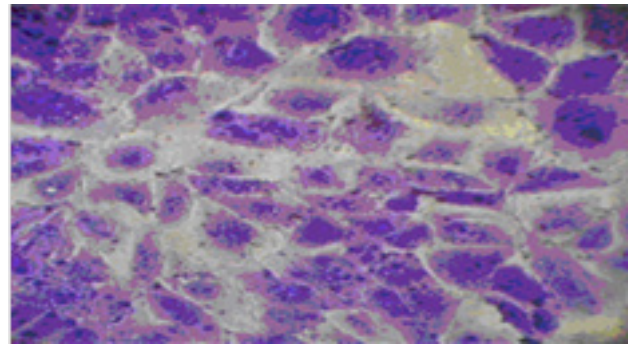
جدول (1) يبين تاثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لاوراق نبات الشوك المبارك ولفترات التعرض الثلاث 24و48و72 ساعة للخط الخلوي السرطاني AMN-3.

Inhibition effect of Leafs alcoholic extract on cell viability				LSD value
Conc. (µg/ml)	24 hr.	48hr.	72hr.	
1	C 21.1 a	B 13 .0 b	D 17.0 ab	* 5.63
10	C 20.1 b	AB 25.0 ab	BC 28.0 a	6.22 *
100	C 19.4 b	AB 26.4 a	AB 32.0 a	6.75 *
1000	B 50.6 a	B 18.6 b	CD 21.0 b	10.92 *
10000	A 76.2 a	A 31.7 b	A 40.9 b	9.84 *
LSD value	9.46 *	9.55 *	11.04 *	---
* (P≤0.05).				



	١مكغم/مل	١٠مكغم/مل	١٠٠مكغم/مل	١٠٠٠مكغم/مل	١٠٠٠٠مكغم/مل
وقت ٢٤ ساعة	21.1	20.1	19.4	50.6	76.2
وقت ٤٨ ساعة	13	25	26.4	18.6	31.7
وقت ٧٢ ساعة	17	28	32	21	40.9

الشكل(1) يوضح تاثير المستخلص الايثانولي لاوراق نبات الشوك المبارك بفترات تعرضية 24و48و72 ساعة في الخط الخلوي السرطاني AMN-3.



صورة (2): تمثل الطبقة الاحادية الكاملة لخط خلايا AMN3 لسرطانة الغدة اللبنية الفأري غير المعرضة للمستخلص (السيطرة) (X100).

صورة (3): خلايا AMN3 بعد 24 ساعة من التعريض عند التركيز 10000 مايكروغرام / مل. الخلايا المعاملة بالمستخلص الايثانولي للاوراق الخام ,(X 100).

اما المقارنات الافقية الاحصائية بين التراكيز للاوقات التعرضية الثلاث فقد اظهر الجدول (1) الخاص بالمستخلص الايثانولي للورقة ان الوقت التعريضي 24 ساعة كان اكثر الاوقات تاثيرا بالتثبيط حيث ان التراكيز (1000،10000)مايكروغرام/مل ارتفعت معنوياً بنسب تثبيط على الترتيب %(76.2و50.6) مقارنة بالتراكيز المقابلة لها في الاوقات الاخرى ، كذلك كان الفرق معنوي عند الوقت 72 ساعة للتركيز (100)مايكروغرام/مل مقارنة بالاوقات الاخرى لنفس التركيز، ايضا عند الوقت 72 ساعة لم تكن اي فروق واضحه حيث اشارت النتائج ان نسب التثبيط للتراكيز (1،10)مايكروغرام/مل لم تظهر اي فروق معنوية للاوقات الثلاثة.

اظهرت النتائج سابقة الذكر للخط الخلوي السرطاني (AMN-3) ان تاثير المستخلص الخام الايثانولي للاوراق استمر عند اعلى مدة تعريض خلال وقت (24ساعة) مع زيادة واضحة في نسبة التثبيط عند الوقت (72 ساعة) اكثر من الاوقات السابقة مما يدل ان المركبات الموجودة في المستخلص الخام لم تفقد فعاليتها بالاضافة الى ان الخلايا السرطانية لم تبدي مقاومة تجاه المركبات الفعالة .

أظهرت النتائج نسب تثبيط مختلفة وتحفيزاً لبعض التراكيز أيضاً، وقد وجد أن التأثير السمي للمستخلص يعتمد على نوع الخلايا السرطانية، وتركيز المستخلص، والمدة الزمنية للتعريض.

للمستخلصات الخام القدرة على تثبيط تكاثر الخلايا السرطانية كما بين كل من ابراهيم الشيباني(2006) والجبوري(2006) والطائي (2007) في دراسة تأثير المستخلصات النباتية الخام لنبات الميرمية الدفلة Nerium ole;er وعين البزون Vinca rosea والقريص Ur-tica dioica على الخطوط الخلوية السرطانية الـ Hep-2والـ-AMN 3و RDان التراكيز الواطئة تعمل على نمو الخلايا Proliferation والزيادة بنسبة تراوحت ما بين 10-30% مقارنة بمجموعة السيطرة في الدراسة الحالية بينما التراكيز العالية تثبط الخلايا كليا او جزئيا هذه الظاهرة تعرف بالتضادية في تأثير الجرعات Hormotic effect، يلاحظ وجود تبايناً بين تأثير المستخلصات الخام فيما بينها، والسبب في ذلك قد يعود إلى طبيعة المركبات الموجودة في كل مستخلص خام وتفاعلها مع الطبيعة الايضية لكل نوع من الخطوط الخلوية السرطانية ، كما لوحظ ان الخط الخلوي السرطاني AMN3 اكثر الخطوط حساسية للتأثير السُمي للمستخلصين الخام وقد يعود السبب إلى وجود مركبات تمتلك فعالية مؤثرة ضد هذا النوع من الخلايا السرطانية أو قد تكون هذه الحساسية ناتجة بسبب الزيادة في نشاط أنزيمات معينة والتي تعمل مضادات للأكسدة وبشكل فعّال سيما في الخلايا السرطانية (Shoieb et al., 2003).

بعض مركبات الأيض الثانوي في النباتات تتميز ببعض الانتقائية (Se-lectivity) في التأثير في الخلايا السرطانية مقارنة بالخلايا الطبيعية وقد يرجع سبب ذلك الى عدد من الخواص الأيضية التي تمتلكها الخلايا السرطانية مثل الطبيعة الأيضية لتكوين الأوعية الدموية الجديدة، وكذلك شكل وطبيعة المستقبلات الموجودة على سطح الخلية السرطانية وامكانية ارتباطها بالمركبات المختلفة (Moteki et al.,2002). كما ان شريط الـ DNA يتخذ شكلاً منبسطاً Relaxant في الخلايا السرطانية كلها تكون غير مستقرة بسبب تباعد الأواصر الهيدروجينية H-bonds التي تربط شريطا الـ DNA، مما يسهل عملية ارتباط المركبات الداخلية او الخارجية بسلسلتي الـ DNA، في حين يكون الـ DNA في الخلايا الطبيعية قوي التراص والأواصر الهيدروجينية متقاربة مما يعيق ارتباط المركبات المختلفة به والتأثير في الخلية (Belijanski,2000) . فضلاً عن ذلك فأن الخلايا السرطانية تكون أكثر حساسية للعقاقير والاشعاع من الخلايا الطبيعية، ويعود ذلك الى الانقسامات الأسرع في الخلايا السرطانية مقارنة بالخلايا الطبيعية (Karp,2003)، يضاف الى ذلك تميز الخلايا السرطانية بصفات أيضية غير موجودة في الخلايا الطبيعية، كما توجد بعض العوامل او الجينات او البروتينات بشكل مختلف عما هي عليه في الخلية الطبيعية ويمكن ان تكون هدفاً لمركبات الأيض الثانوي في التأثير على الخلايا السرطانية ومنها الانزيم Telomerase الموجود في الخلية السرطانية الذي يعمل على ادامة تصنيع الـ DNA فيها (Thelen et al.,2004) وكذلك لها قدرة تثبيط انزيم Topoi-somerase وعند ذلك يتوقف نمو الخلية السرطانية لتدخل مرحلة الموت المبرمج (Holm et al.,1989).

وقد أظهر Cnicin الذي يعتبر من اهم المواد الفعالة في النبات قيد الدراسة فعالية واضحة وقدرته المضادة للسرطان عن طريق تثبيط الاستجابات الالتهابية, منع الاورام الخبيثة وإحداث موت الخلايا المبرمج. ايضا، وضعنا الخطوط العريضة للآليات الجزيئية المتضمنة في فعالية Cnicin المضادة للسرطان, وفي الأخص, تفاعل الثايول SH-Cnicin وتأثير Cnicinعلى مسارات الخلية كعامل النسخ النووي كابا بي (NF-kappa B) وانزيم البروتين كاينيز المنشط للمايتوجين (MAPK). وأخيراً ، قمنا بتلخيص بعض خصائص Cni-

cin المهمة مع الاشارة الى فعالياتها المضادة للسرطان وامكانياتها في معالجة السرطان, فضلاً عن أن بعض المواد الفعالة مثل Cnicin تعد واعدة كمضاد للسرطان مع امكانية تطبيقها في كل من العلاج الكيمياوي للسرطان والوقاية الكيمياوية (Maria et al.,2012).

References:

1. رويحة وأمين (1983).التداوي بالاعشاب.الطبعة السابعة. دار القلم –بيروت.
2. Jiménez-Medina, E. ; Garcia-Lora, A. ; Paco, L. ; Algarra, I. ; Collado, A. and Garrido, F.(2006). A new extract of the plant Calendula officinalis produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. BMC Cancer, 6:119-132.
3. Mukherjee ,A.; Sourar,B.; Nabainta,S.;and Anil,C.(2001). Advance in Cancer Therapy With Plant Based Natural Product.Curent Medicinal Chem.. 1467-1486.
4. Mohd, F.; Abu, B.; Maryati, M.; Asmah R.; Steven A. B. and Jeffrey R. F. (2010). Cytotoxicity and polyphenol diversity in selected parts of Mangifera pajang and Artocarpus odoratissimus fruits, Malaysia, Journal:Nutrition & Food Science. 0034-6659.
5. Card ,D.R.(2010). The benefits of Blessed thistle in herbal preparations .Thesis on Blessed thistle.p.;3.
6. Beyerl, P., (1998). A compendium of herbal magick. Phoenix publishing .
7. Hayashi, K.; Narutaki, K.; Nagaoka, Y.; Hayashi, T.; Uesato, S. (2010). "Therapeutic effect of arctiin and arctigenin in immunocompetent and immunocompromised mice infected with influenza a virus". Biological & pharmaceutical bulletin 33 (7): 1199–1205.
8. Al-Rawi,A.(1988). Wild plant of Iraq with their distribution , division of botany and range management (3rd .ed.) Baghdad .
9. Harborn,J.B.(1984).Phytochemical methods:A guide to modern techniques of plant analysis 2nded.chapman and Hall,NewYork.
10. Freshney, R. I. (2000). Culture of Animal Cell. A Manual of Basic Technique; 4th ed, New York, NY, USA: Wiley-Liss. Pp:486.
11. Betancur-Galvis, L. A.; Morales, G. E.; Forero, J. E. and Roldan, J. (2002). Cytotoxic and Antiviral Activity of Colombian Medicinal Plant Extract of the Euphorbia Genus. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 97(4): 541-546.
12. Abdul-Majeed,M.R.(2000).Induction and characterization of SU-99 Plasmacytoma cell line and it is effect on Mice immune response.Ph D thesis,Nahrain University.
13. Mahony, D. E.: Gilliatt, E.: Dawson, S.: Stockdale, E. and Lee, S .H .S. (1989). Cell assay for rapid detection of Clostridium Perfringens enterotoxin. Applied and Environmental Microbiol. 2141-2143.
14. Gao, S.; Yu, B.; Li, Y.; Dong, W. and Luo, H. (2003). Antiproliferative effect of Octreotide on gastric cells mediated by Inhibition of Akt/PKB and telomerase. World J. Gastroentrol., 9: 2362-5.
15. Chumchalova, J. and Smarda, J. (2003). Human Tumor Cells are Selectively Inhibited by Colicins. Folia Microbiol. 48: 111-5.
16. SAS. (2012). Statistical Ananlysis System , User Guide. Statistical. Version 9.1th ed. SAS.Inst.Inc. Cary.N.C. U.S.A.
17. الشيباني, رغد ضياء عبد الجليل (2006).تأثير مستخلصات نبات الدفلة Nerium oleander الخام والنقية في الخلايا الطبيعية وخطوط الخلايا السرطانية النامية في المختبر وفي الحيوانات المختبرية .اطروحة دكتوراه , كلية العلوم – الجامعة المستنصرية.
18. الجبوري، لقاء حسون صكبان (2006). دراسة تأثير المستخلصات الخام لنبات عين البزون Vinca rosea في نمو بعض الخلايا السرطانية والطبيعية لبعض اللبائن خارج الجسم، رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة كربلاء.
19. الطائي، ايمان هاشم يوسف (2007). دراسة التأثير السمي للمستخلصين المائي الخام والكحولي الخام لنبات القريص Urtica dioica في الخلايا الطبيعية والسرطانية داخل وخارج الجسم الحي. اطروحة دكتوراه، كلية الطب البيطري/ جامعة بغداد.
20. Shoieb, A.M.; Elgayyar, M.; Dudrick, P.; Bell, E. and Titnof, P.K. (2003). Inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by Thimoquinol. Int. Oncology, 22: 107-113.
21. 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.
22. Belijanski, M. (2000). The anticancer agent PB-100 selectivity active malignant cell inhibits multiplication of sixteen malignant cell lines, even multidrug resistant. Genet. Mol. Biol., 23:224-235.
23. Karp, Geraled. (2003). Cell and molecular biology concepts and experiments. 3th ed. Inc. USA.
24. Thelen, P.; Wuttk, W.; Jarry, H.; Grzmil, M. and Ringert, RH. (2004). Inhibition of tetomeras activity and secretion of prostate specific antigen by silibinin in prostate cancer cells. JUrol; 171(5): 1934-8.
25. Holm, C.; Stearns, T. and Botstein, D. (1989). DNA topoisomerase II must act at mitosis to prevent nondisjunction and chromosome breakage. Mol Cell Biol; 9: 159-68. Cited by Davis, P.R.; Nakanishi, Y.; Kim, N-C.; Graf, T.N.; Oberlies, N.H.; Wani, M.C.; Wall, M.E.; Agarwal, R. and Kroll, D.J. (2005). Milk Thistle and prostate cancer: Differential effects of pure Flavonolignans from Silybum marianum on Antiproliferative End points in Human Prostate Carcinoma Cells. Cancer Research, 65: 4448-4457.
26. Maria Regina; Orofino Kreuger; Sasker Grootjans; Maique W. Biavatti; Peter Vandenabeele; Katharina D'Herde.(2012). Sesquiterpene lactones as drugs with multiple targets in cancer treatment: focus on parthenolide. Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

The Cytotoxicity Effect of Ethanolic Crude Extract of Cnicus benedictus Leaves on the Murine mammary adencarcinoma Cell Line AMN-3

Saleh M.Rahem[1], Shalal Murad Hussian Al-Ataby[2], Youssef Shakuri Yasin Al-Samarray[3]

1 Department of Biology,Faculty of Education for Pure Sciences,University of Tikrit
2 College of Pharmacy , University of Al-Mustansiriyah.
3 The State company for Drugs and Industry and Medical Appliances, Samarra, Ministry of Industry and Mineral

Abstract:

This study aimed to investigate the effects of Ethanolic crude extract Cnicus benedictus leaves on the proliferation of the cancer cell line (AMN-3), as it has been taking the start of the decimal concentrations (1,10,100,1000,10000) µgm / ml, showed there was no inhibition at concentrations (1,10,100) µgm / ml, less than 50%, but there are significant differences between the concentrations, either concentrations (1000, 10000) µgm / ml inhibition rate was more than 50%, reaching respectively damping ratios (76.2 , 50. 6)% at after 24 hrs. The study found the presence of toxic effect murderer to extract ethanolic plant at concentrations approved, concentrations (1000 , 10000) µgm / ml, followed by the inhibitory results when after 72 hrs., the concentration (10000) µgm / ml, with total inhibition rate (40.9%) as well as at the same concentration came When the damping ratio less time after 48 hrs., amounting to increase (31.7 (%..

The comparisons horizontal statistical between concentrations three times susceptibility, the results for ethanolic of the leaves showed that the time after 24 hrs. was more times influence inhibition as the concentrations (1000, 10000) µgm / ml high significant rates discourage respectively (76.2 , 50.6%) compared to concentrations interview at other times, as well as the difference was significant at after 72 hrs. of concentration (100) µgm / ml compared to the times the other for the same concentration, increase at after 72 hrs. were not any obvious differences in terms of results indicated that the damping ratios of concentrations (1 , 10) µgm / ml It showed no significant differences for the three times.

It was obtained on these results it can be concluded that this plant blessed thistle is one of the most promising medicinal plants with the active role in the treatment of cancer through its influence inhibitory and toxic effects of cancer cells.

Keywords: *Effect extracted of Cnicus benedictus on cancer cell line AMN-3,Cnicin.*