Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics

التأثير السمي للمستخلص المائي الخام لنبات القيصوم في بعض الخلايا السرطانية

أمال محمد علي، أسماء عامر احمد، أيمن علي حسن، نور ثائر جعفر، زيد عبد المنعم علي
المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية/ الجامعة المستنصرية

الخلاصة :

تم في هذه الدراسة التحري عن تأثير المستخلص المائي الخام لنبات القيصوم Achillea Fragrantisime في نمو الخلايا السرطانية المختلفة , وتكونت من ثلاث اجزاء، تضمن الجزء الاول اختيار اربعة انواع من الخطوط الخلوية المختلفة اثنان منها سرطانية هما خط خلايا سرطان الارومة الدبقية البشري (AGM-3) وخط خلايا سرطان الغدد اللبنية الفاري (AMN-3) واثنان منها متحولة هما خط خلايا الفايبروبلاست لجنين الجرذ REF)) وخط خلايا كلية القرد (VERO) لغرض قياس سمية المستخلص النباتي عليها , وقد اظهرت النتائج ان تاثير المستخلص المائي للنبات يعتمد على نوع الخلايا وتركيز المستخلص وفترة التعريض له ,فقد وجد في الخلايا السرطانية ان التراكيز العالية من المستخلص تعطي اعلى نسبة تثبيط لنمو الخلايا مقارنة بالسيطرة ,بينما تقل نسبة التثبيط لنمو الخلايا في التراكيز الواطئة وبعد 24ساعة من فترة التعريض ثم تبدأ النسبة بالتناقص بعد 48ساعة , أما بعد 72ساعة فلم تلاحظ اية فروقات معنوية مابين عينات السيطرة مع عينات التجربة ,و ظهرت نفس النتائج في الخلايا المتحولة لكن لوحظ ان نسبة التثبيط اقل مما وجدت في الخلايا السرطانية.

اما الجزء الثاني من العمل فقد تم قياس تأثير المستخلص النباتي على أحداث وتحفيز الموت المبرمج في الخلايا السرطانية وذلك من خلال تطبيق تقنية Tunnel assay ,وقد بينت النتائج ان المستخلص حفز عملية الموت المبرمج Apoptosisفي كل أنواع الخلايا السرطانية المستعملة , وخصوصاً في التراكيز العالية منه .

وأخيراً وفي الجزء الثالث من الدراسة فقد تضمن قياس التاثير السمي الوراثي للمستخلص النباتي من خلال اختبار تكوين النوى الصغيرة Micronucleusفي الخلايا اللمفاوية البشرية المحفزة على الانقسام بالمادة المثبطة Phytoheamaglotenine ,وقد اظهرت النتائج انعدام وجود الانوية الصغيرة والتي تعد احد الاختبارات المعتمدة في التحري عن حصول كسر في المادة الوراثية .

هذا فقد كان الأستنتاج من الدراسة هو أن المستخلص المائي لنبات القيصوم يفيد في تثبيط الخلايا السرطانية , ويزيد من تحفيز عملية الموت المبرمج فيها , فضلاً عن أنه غير سام وراثياً للخلايا اللمفاوية الطبيعية مما يرجح أستعماله كعلاج بديل عن العلاجات الكيمياوية والأشعاعية المعتاد أستعمالها بالرغم من أعراضها الجانبية وبعض مضارها .

كلمات دلالية: نباتات طبية، الموت المبرمج، الانوية الصغيرة

المقدمة:

تحوي النباتات الطبية العديد من المركبات الفعّالة التي تجعلها ذات اهمية طبية، وقد أطلقَ مصطلح النباتات الطبية على الكثير من النباتات لاحتوائها على العديد من هذه المركبات التي يعزى اليها الاثر الطبي والفسيولوجي (1) , ونبات القيصوم واحداً منها لذا اختير في هذه الدراسة لمعرفة تأثيره على نمو الخلايا السرطانية عله يصلح كعلاج بديل عن العلاجات الطبية الكيميائية التركيب ذات التأثيرات الجانبية العديدة , ولكي يكون علاجاً مستقبلياً ناجحاً وجب أختبار سميته على الخلايا السرطانية لأنه الاختبار الافضل والاسهل للتاكد من فائدته (2) , كما ويجب قياس تأثيره على تحفيز عملية الموت المبرمج Apopto-sis للخلايا السرطانية ,فان عملية الموت المبرمج عملية منظمة وكفوءة تحدث بصورة طبيعية للخلايا وتساعد في تنظيم نمو الخلايا ,وأحياناً تحدث في غير أوقاتها الطبيعية وذلك بواسطة محفزات عدة من داخل او خارج الخلايا تتسبب في تحطيم مادتها الوراثية ثم موتها كأن تكون علاج بمادة سامة للخلايا أو التعرض للأشعاع (3) .

كما ويفضل قياس سميته الوراثية على الخلايا الطبيعية من خلال أختبار تكوين النوى الصغيرة إذ يعد اختبار الانوية الصغيرة من الطرائق المستخدمة حالياً في تحديد تأثير المواد السامة للخلايا التي تمتلك القدرة على الانقسام مثل للخلايا اللمفاوية وخلايا نخاع العظم (4) أذ توجد الانوية الصغيرة Micronu-cleus في الخلايا المنقسمة التي تحتوي على كروموسوم فاقد للجسيم المركزي او كل كروموسوم لم يتمكن من الحركة الى المغزل خلال الانقسام الخلوي Mi-tosis ، إذ يحاط في الطور النهائي Telophase بغلاف نووي منفصل مكون تراكيب تشبه النواة لكنها اصغر حجماً (5).

فالقيصوم (Achillea Fragrantisime) من النباتات العشبية العطرية المعمرة ينتمي الى العائلة المركبة (Asteraceae) , يمتلك ساقا صوفية مكسوة بشعيرات تبرزُ منها اوراق كثيرة الجوانح متقابلة على الساق توزعُ بانتظام على طول الجذعِ وازهاره مستديرة بيضاء او بيضاء مصفرة وقد تكونُ حمراءً، رؤوس الزهرة لَها سطح بشكل القبة (Cory biform)) وتزهرُ بين شهريّ حزيران واب (6). يكثرُ في المناطق المفتوحة ذات الظل و كذلك على المنحدرات الصخرية والمروج الخضراء (7)، اما في العراق فيكثرُ النبات في اربيل وكركوك والموصل(8) ,يمتلك اهمية طبية وعلاجية لكثير من الامراض التي استخدم في علاجها واثبت فعالية كبيرة ضدها مثل ايقاف النزف الدموي وعلاج فقر الدم بمساعدته على تكوين كريات الدم الحمراء كما ويعالج انقطاع الطمث واضطرابات الدورة الشهرية لاحتوائه على احد الزيوت الاساسية التي تساعد على تنظيم الدورة الشهرية ,وفي معالجة التقلصات لاحتوائه على الفلافونات , (9)كما يساعد على معالجة التهابات الحوض وارتفاع ضغط الدم والدوالي ,كذلك يعالج بعض حالات الاسهال والتوتر العصبي ووجد انه مدرر جيد للادرار والطمث ومانعا للحمل (10) .

يحتوي هذا النبات على بعض المركبات الكيميائية الفعالة مثل القلويدات ومن

Corresponding Address:
Asma A. Almukhtar
Iraqi center for cancer and medical genetics researches/ university of AL-Mustinsirya
Email: Asma.amer@iccgmr.org

اهمها Achillen الذي يساعد على تخثر الدم , وكذلك و Stachydrine و Achillitine و Azulenes و Trigonelline , كما ويحوي ثلاثة انواع من الفلافونات وهي Flavonol-3-ogly و Luteolin و Rutin hyprosid , والستيرولات والتربينات α-amyrin Traxasterol , كما ويحتوي على الزيوت الطيارة Eugenol و Furfural و Humulen , كما ويحتوي على مواد تسمى سيسكوتيرين لاكتون فضلاً عن احتوائه على الاحماض الامينية والاحماض الدهنية والسكريات والمواد الصابونية (11) .

وجد ان احتواء النبات على بعض المواد مثل الفلافونات ومنها Apigenin جعله يمتلك قابلية مضادة للتطفير من خلال تثبيطه للمطفر Benzo pyrene لذا استعمل في علاج نوع من أبيضاض الدم في الفئران (12) , وكذلك القابلية على اغلاق فعالية المواد المسرطنة أذ يزيد من فعالية أزالة سميتها من خلال تحفيزه على أصلاح الضرر في دنا الخلايا ,وتثبيط أنزيم Tyrosine kinase الذي يشترك في عملية أنقسام الخلايا الورمية (13),كما ان احتوائه على التانين ساعده في تثبيط الكثير من الطفرات في بكتريا السالمونيلا وفي تثبيط النوى الصغيرة في الفئران المعرضة لاشعة X وله فعالية مضادة لسرطان الكبد (14).

المواد وطرق العمل :

1 - جمع النبات: تم الحصول على النبات من المركز الطبي للاعشاب التابع لوزارة الصحة العراقية (بغداد /ساحة الاندلس)، الذي ضمَّ الاوراق والازهار المجففة والمصنف من المركزنفسه. طحنَ النبات باستخدام مطحنة كهربائية لغرض الحصول على مسحوق ِالنبات الذي استخدمَ لتحضير المستخلص المائي.

2 - تحضير المستخلص المائي للنبات: تم وزن 50 غم من مسحوق النبات ووضع في جهاز الكلافينجر الحاوي على 250 مل من الماء المقطر ,شغل الجهاز بمعدل 4ساعات يومياً لغرض أستخلاص الزيت من النبات, فصل الزيت الناتج وحفظ في قناني محكمة الغلق (15) , وكررت العملية عدة مرات للحصول على كمية من المستخلص كافية لأجراء التجارب .

3 - دراسة التاثيرأت السمية لمستخلص نبات القيصوم في خطوط الخلايا السرطانية في الزجاج

أنواع الخلايا السرطانية المدروسة

1 - AMG3 - خلايا سرطان الأرومة الدبقية البشريGliblastoma

2 - AMN – 3 - خلايا سرطان الغدة اللبنية الفأرية Mouse Mammary adenocarcinoma

3 - REF - خلايا الفابروبلاست لجنين الجرذ المتحولة

4 - Vero - خلايا كلية القرد المتحولة

تم الحصول على الخطوط الخلوية من المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية ، بالتمرير رقم (47) بالنسبة للأول ، والمتزير رقم (195) بالنسبة للثاني وهي منماة بوسط PRMI – 1640 المزود ب (10%) من مصل العجل الجيني (FCS) ، أما الثالث فكان بالتمرير رقم (55) ,بينما الرابع فكان بالتمريرة رقم (325) المنمى بوسط MEM المزود بـ(10%) من المصل نفسه , ثم أتبعت طريقة قياس سمية المستخلص على الخلايا في الزجاج حسب ماجاء في (2) .

زرع الخلايا : زرعت الخلايا في صفيحة مقعرة متعددة الحفر بعد اخذها وقلعها من وعاء الزرع الخاص بها بواسطة مادة التربسين فرسينTV وتوضع في كل حفرة مقدار 200مايكروليتر من الخلايا مع الوسط الزرعي ,ثم غطيت الصفيحة بلاصق بارد وحضنت بدرجة 37 مئوي وتركت لحين نمو الخلايا وتكوين طبقة كاملة من الخلايا .

تعريض المستخلص : بعد التأكد من نمو الخلايا وتكوينها طبقة كاملة سكب الوسط الزرعي من الخلايا واضيف المستخلص النباتي بتراكيزه المثبتة والمحضرة مسبقاً مع عمل ثلاث مكررات لكل تركيز من المستخلص ثم حضنت بدرجة 37 مئوي للفترات (72,48,24) ساعة

الكشف والتلوين: بعد أنتهاء كل فترة تعريض للمستخلص, اخذت الصفيحة الحاوية على الخلايا وهمل الرائق في الحفر الحاوية على الخلايا وغسلت الخلايا بدارئ الفوسفات الدافئ ثم اضيف 100 مايكروليتر من صبغة التريبان الزرقاء لكل حفرة وتترك 20 دقيقة ,بعدها غسلت الصفيحة بالكامل بماء الحنفية وفحصت بجهاز المطياف الكهربائيELAISA microplates spectrophotometer وعلى الطول الموجي 492نانوميتر .

- تم حساب معدل تثبيط نمو الخلايا السرطانية (Inhibitory Rate/I.R) وفق المعادلة المشار اليها في (16) وكالاتي :-

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

كما حُسب معدل تحفيز النمو (Proliferation Rate/ PR) وفقاً ل(17) وكالآتي:-

$$PR\% = \frac{B}{A} \times 100$$

حيث أن :-

IR = النسبة المئوية لمعدل التثبيط.

PR= النسبة المئوية لمعدل التحفيز

A= كثافة ضوئية للسيطرة السالبة

B=كثافة ضوئية لمجموعة الأختبار

4 - الكشف عن الموت المبرمج للخلايا بطريقة Tunnel assay :

زرعت الخلايا في سلايدات خاصة وحضنت بدرجة 37مئوي لمدة 24ساعة ولحين تكون طبقة كاملة من الخلايا ,بعدها تم تعريض الخلايا للمستخلص بتراكيزه المختلفة وللفترات (72,48,24) ساعة , ثم يكون الكشف عن حدوث الموت المبرمج في الخلايا السرطانية بأتباع الطريقة المثبتة في عدة التلوين للخاصة بهذا الغرض (DNA Frag-) Tunel Apoptosis Detection Kit mentation /Fluorescence Staining) Bioassay,USBiological, [Cat;T9162-80].

وبواسطة الفحص المجهري بمجهر متألق Fluorescent حسبت الخلايا التي عانت من الموت المبرمج والتي تعرف بتحطم وتجزء مادتها الوراثية DNA وبعد أضافة أنزيم TdT وبواسطة المعلم dUTPs الموجود في العدة , الذي جعل الخلايا واضحة ومرئية وممكن تمييزها , وحساب نسبتها الى الخلايا في السيطرة (الغير معاملة) .

5 - دراسة سمية النبات على المادة الوراثية:

زرع الدم مع المستخلص : حضرت المحاليل حسب (Verma & Babu 18) .

*تمت إضافة المستخلص النباتي بتراكيز نهائية مقدارها (صفر، 125، 250، 500) ملغم/مل الى أنابيب الزرع المحضرة والحاوية على الوسط الزرعي الكامل RPMI-1640 ، مع مراعاة الحجم النهائي للمزيج.

*أضيف (0.3) مل من العامل المشطر للخلايا اللمفاوية (PHA).

*زرع الدم الكامل (Whole Blood) بإضافة (8-7) قطرات منه إلى كل أنبوبة (أي بحجم مقداره 0.5 مل باستخدام محقنة ذات حجم 5 مل)، ثم مزجت معاً بلطف وحضنت بدرجة حرارة (37)˚ م بصورة مائلة وتم أيقاف أنقسام الخلايا اللمفاوية في الطور الأنفصالي Anaphase بأستعمال مادة السايتوكالازين بي cytochalasin-B بتركيز ثنائي مقداره 4,5 مايكروغرام/مل بعد 44 ساعة من وقت أضافة المادة المشطرة PHA ثم أكمل الحضن لمدة (72) ساعة، مع مراعاة مزج الأنابيب كل (24) كررت التجربة (3) مرات (باختلاف المتبرع بالدم) وبمعدل مكررين للتركيز الواحد.

- حصاد الخلايا

*حصدت الخلايا عن طريق نبذ الأنابيب مركزياً بسرعة (1500) دورة/دقيقة لمدة (10) دقائق، تم التخلص من الراشح ورج الراسب جيداً مع بقايا الوسط الزرعي. أضيف محلول الدافئ (37)˚ م بمقدار (5) مل وتمت الإضافة بشكل قطرات وبصورة تدريجية مع الرج المستمر، ثم أعيدت الأنابيب الى الحاضنة (37)˚ م لمدة (30) دقيقة.

*نبذت الأنابيب مركزياً بعدها (1500 دورة/دقيقة/ 10 دقائق)، أهمل الراشح ورج الراسب جيداً ثم ثبتت الخلايا باستعمال محلول التثبيت البارد المحضر آنياً (3 مل مثانول : 1 مل حامض الخليك الثلجي) بإضافة (5) مل منه، على أن تتم

الاضافة تدريجياً وبشكل قطرات على جدران الانبوبة مع الرج المستمر.
*وضعت الأنابيب بدرجة حرارة (4) ° م لمدة ساعة ثم نبذت مركزياً بالظروف نفسها، كررت عملية الغسل (التثبيت) أعلاه (4-3) مرات الى حين الحصول على محلول عديم اللون (رائق جداً)، أهمل الراشح وعلق الراسب بـ(1.5-1) مل من المثبت

- التقطير وتلوين الشرائح الزجاجية

*حضرت شرائح زجاجية نظيفة، رطبة وباردة ثم مزج الراسب المحضر بالخطوة السابقة جيداً باستعمال ماصة باستور نظيفة وجافة، بعدها تم تقطير العالق على الشرائح الزجاجية بمعدل (5-4) قطرات/شريحة وعلى بعد (30-50) سم، وتركت لتجف في الهواء.
*لونت الشرائح الزجاجية بعد جفافها تماماً بصبغة كمزا والمخففة بمحلول دارئ سورنسن الدافئ بنسبة 1: 4 (1 مل صبغة الى 4 مل دارئ) لمدة (2-1.5) دقيقة، ثم غسلت بالدارئ نفسه وتركت لتجف. فحصت الشرائح الزجاجية الملونة أعلاه بالمجهر الضوئي لغرض دراسة تكوين الأنوية الصغيرة والتي حسبت في الخلايا ثنائية النواة ، وفق المعادلة الآتية وحسب (4) :

عدد الأنوية الصغيرة((MN) = [1(1MN) + 2 (MN2) + 3 (MN3) / N) +4 (MN4)]

إذ أن :

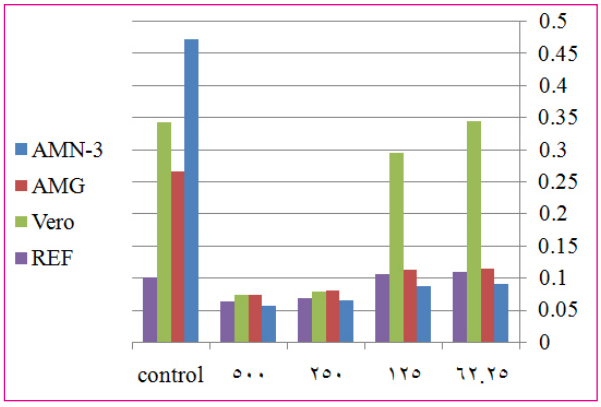
MN تمثل الأنوية الصغيرة .
MN1 الخلايا ثنائية النواة الحاوية على نوية صغيرة واحدة .
MN2 الخلايا ثنائية النواة الحاوية على نويتين صغيرتين .
MN3 الخلايا ثنائية النواة الحاوية على ثلاث نويات صغيرة .
MN4 الخلايا ثنائية النواة الحاوية على أربعة أنوية صغيرة .
N = عدد الخلايا المحسوبة على أن لاتقل عن ألف خلية .

النتائج :

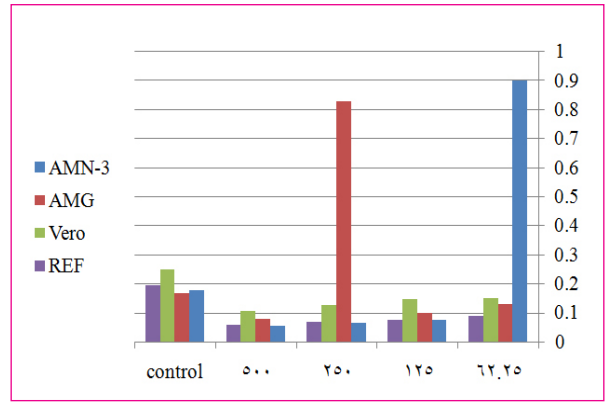
1 - التأثيرات السمية للمستخلص النباتي في خطوط الخلايا السرطانية في الزجاج:

أ- الخلايا السرطانية: درس التأثير السمي لمستخلص نبات القيصوم في خلايا سرطان الأرومة الدبقية البشري بالتمريرة رقم (47) وسرطان الغدد اللبنية الفأري بالتمريرة (195) . بنيت النتائج أن التأثير التثبيطي كان كبيراً , فقد بلغت أعلى قيمة تثبيط عند التراكيز العالية للمستخلص وخاصة التركيز 500مكغم / مل من المستخلص بعد 24 ساعة من التعريض , في حين قلت نسب التثبيط في التراكيز الواطئة له، مقارنة بالسيطرة 100 % .

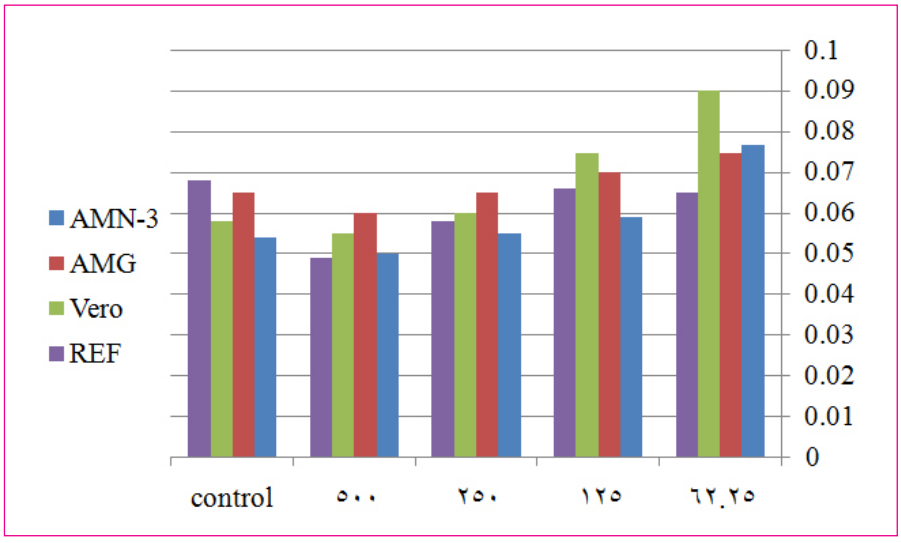
كذلك لوحظ ان التأثيرالسمي التثبيطي بدأ يقل تدريجياً بعد 48 ساعة من المعاملة بالمستخلص النباتي مقارنة بالتعريض لمدة 24 ساعة , في حين لم يلاحظ أي تأثير في نمو الخلايا السرطانية بعد 72ساعة من تعريضها للمستخلص كما موضح في الأشكال (1,2,3) .



الشكل رقم (1) يبين تأثير المستخلص النباتي لفترة تعريض 24 ساعة



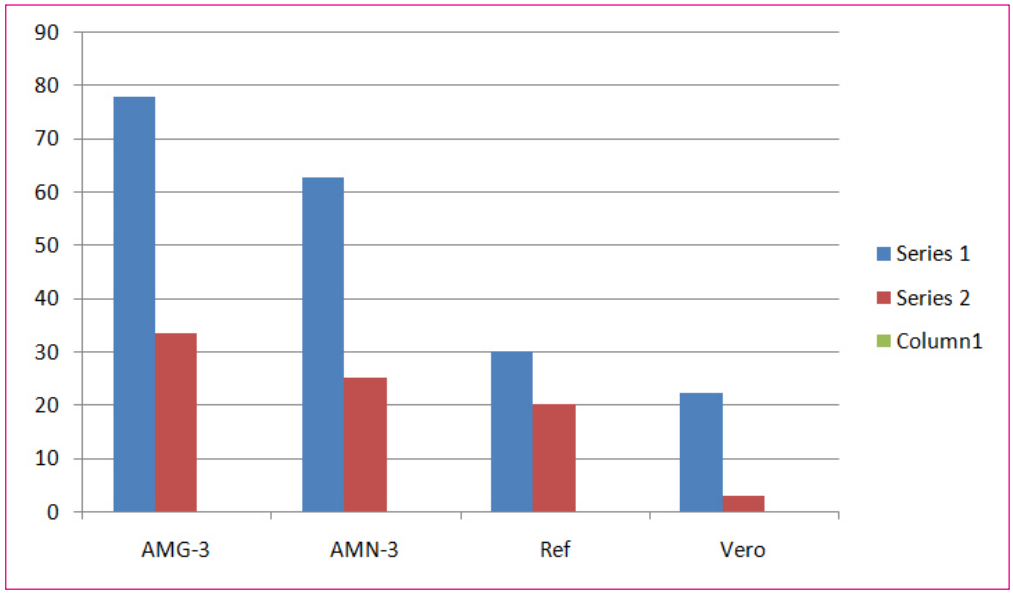
الشكل رقم (2) يبين تأثير المستخلص النباتي لفترة تعريض 48 ساعة



الشكل رقم (3) يبين تأثير المستخلص النباتي في فترة تعريض 72 ساعة

ب- الخلايا المتحولة: كانت نتائج سمية المستخلص في الخلايا المتحولة وهي خلايا الفايبروبلاست لجنين الجرذ في التمرير (55) وخلايا كلية القرد في التمرير (325) مشابهة لنتائج التاثير التثبيطي للمستخلص في الخلايا السرطانية, أذ كان تأثير تثبيطه لنمو الخلايا واضحاً مقارنة بالسيطرة ولكن بصورة اقل مما كان عليه في الخلايا السرطانية ونفس الملاحظات لتراكيز المستخلص المستخدمة وفترات التعريض.

2 - الكشف عن الموت المبرمج للخلايا بطريقة: بينت الدراسة أن المستخلص النباتي الخام لنبات القيصوم وبكل تراكيزه يحفز عملية الموت المبرمج Apoptosis في الخلايا السرطانية والخلايا المتحولة, لكن لوحظ أن التراكيز العالية التي سببت تثبيطاً أعلى للخلايا هي التي تسبب تحفيزاًاكبر للموت المبرمج للخلايا وخصوصاً التركيز 500ملغم/مل مقارنة بالسيطرة, وكما مبين في الشكل (4) الذي يبين نسبة عدد الخلايا التي عانت من الموت المبرمج الى الخلايا الحية في المستخلص وبتركيز 500 ملغم /مل ولكل انواع الخلايا المستعملة.



الشكل رقم (4) يبين عدد الخلايا التي عانت من الموت المبرمج في المستخلص بتركيز 500ملغم /مل

3 - دراسة سمية المستخلص على المادة الوراثية :

توصلت الدراسة الى ان مستخلص نبات القيصوم لا يؤدي الى حصول كسور كرموسومية في الخلايا اللمفاوية البشرية المحفزة على الانقسام بالمادة المشطرة PHA, اذ لم يسبب ظهور الانوية الصغيرة وبالتراكيز المدروسة جميعها وقد جاءت هذه النتائج ضرورية لضمان أستعمال النبات لعلاج للخلايا السرطانية.

المناقشة:

نظراً لأهمية بعض النباتات من الناحية الطبية فقد تنوعت استعمالاتها وكثرت وصفاتها الشعبية وذلك لفعاليتها الدوائية وسرعة تأثيرها العلاجي عند استعمالها بصورة أعشاب كاملة، مساحيق أو تحضيرات مشتقة منها في علاج الكثير من الأمراض التي تصيب الإنسان ودون الاعتماد على المركبات المخلقة صناعياً(19) لذا أختير نبات القيصوم Achillea millefolium في هذه الدراسة وهو أحد نباتات العائلة المركبة Astereasea و يحتوي على العديد من المركبات التي يعزى اليها الاثر الطبي والعلاجي, والتي تعمل على الحماية والوقاية من الاورام (13).

ويعُد اختبار الكشف عن التأثيرات السمية لمادة ما في الخلايا السرطانية في الزجاج احد االتقنيات المهمة التي يتم اعتمادها مبدئياً في التحري عن امتلاك تلك المواد تأثيراً قاتلاً تجاه هذه الخلايا الخبيثة , والتي قد تعقد عليها الامال لعلاج مستقبلي (2) فقد بينت نتائج هذه الدراسة أن المستخلص المائي الخام لنبات القيصوم فعال في تثبيط نمو الخلايا السرطانية بأختلاف أنواعها , ولوحظ ذلك من الفرق المعنوي مابين نمو الخلايا السرطانية في السيطرة ونموها مع تراكيز ثنائية تدريجية من المستخلص تراوحت مابين (62,25-500 ملغم /مل) , وإستخدمت طريقة التلوين بالبنفسج البلوري في الكشف عن التأثير السمي , من خلال التحري عن عدد الخلايا الحية , ولأجله قيست الكثافة الضوئية عند طول موجي 492 نانوميتر, و شدة اللون هو تعبيرعن عدد الخلايا الحية .

اما تقييم مدى التأير السمي , فتم اعتماداً على استخراج النسبة المئوية لمعدل تثبيط النمو (IR) مقارنة بالسيطرة التي يعد معدل نموها (100 %) , كما إستخرج معدل تحفيز النمو (Proliferation Rate) حسب المبدأ نفسه , وقد كانت نسبة التثبيط في التراكيز العالية للمستخلص أعلى من التراكيز الواطئة له وبعد فترة تعريض الخلايا 24ساعة للمستخلص ثم بدأت النسبة بالتناقص بعد 48 ساعة من تعريض الخلايا للمستخلص ,

أما بعد 72ساعة من التعريض فلم يلاحظ أي فرق معنوي مابين خلايا السيطرة وعينات التجربة ولم تأخذ هذه النتيجة بنظر الأعتبار لعدم أستمرار الخلايا في النمو حتى في عينات السيطرة .

تشير تلك النتائج الى أن عمل هذا المستخلص يكون خلال الـ 24 ساعة الاولى من التعريض و بالتراكيز المرتفعة ، لذلك عند زوال تأثيره تبدأ الخلايا الحية بمعاودة نشاطها وانقسامها,مما يُظهرأهمية إعطاء جرعات مرتفعة متكررة ومستمرة لضمان قتل الخلايا السرطانية المتبقية جميعها.

وقد يكون سبب هذا لأنه يحوي على مواد توقف نمو الخلايا في طور الـ G1 من الدورة الخلوية إذ يكون التأثير على مستقبل الاندروجين (AR) Androgen Receptor الذي يتوسط عملية تكاثر وتمايز هذه الخلايا من خلال تثبيط مستوى mRNA و بالتالي تثبيط تعبير expression الـ (AR) وهذا يحصل بعد 12 ساعة من التعريض (20) ومن خلال التأثير في جينات الدورة الخلوية نفسها, لذا يجب عند أستعماله كعلاج تكرار الجرعة المعطاة كل 24ساعة ليستمر عمل المستخلص .

يعزى التأثير التثبيطي للمستخلص النباتي الى أحتوائه على عدة مركبات كيميائية تفيد في تثبيط نمو الخلايا السرطانية أو توقف نموها ,(21) ومن دراسة سابقة (11) اظهرت نتائج الفحص الكيميائي العام لبعض المكونات الفعّالة لنبات للقيصوم أحتوائه على بعض منها مثل (القلويدات Alkaloids، الفلافونات Fla-

vonoids، الدباغيات Tannins) .

ومن دراسات سابقة لوحظ ومن خلال فصل المركبات الفعالة من المستخلص النباتي وتجريبها على الخلايا السرطانية المختلفة أتضح ان المركبات الفلافونية تحديداً هي التي تسبب فعالية سامة للخلايا (22 ,21), كما ووجد ان مركبات السيتوستيرول وهي أحد انواع الفلافونويدات الموجودة في بعض انواع النباتات تثبط سرطان البروستات (22)

أن مركبات Flavonoids هي المسؤولة عن تثبيط نمو الخلايا السرطانية في المستخلص لانها فعالة جداً ومتنوعة وتعمل على الحماية والوقاية من الأورام السرطانية لعدة أسباب أولها أنها تعمل مواد مضادة للاكسدة Antioxidantes 9,22)) وذلك بمساعدة تركيبها الجزيئي وباقي صفاتها التي ساعدتها في أن تعمل توازن مابين تفاعلات الأوكسجين الحر الذي يقود الى تحطيم الخلايا فتحمي الخلايا , كما وتمتلك هذه المركبات فعالية مضادة للأكسدة غير مباشرة من خلال تفعيل الأنزيمات المضادة للسمية (PhaseII detoxifying enzymes 22) , لذا فأن عدم تناول الاغذية الحاوية على هذه المركبات يؤدي الى تجمع المواد المسرطنة والمطفرات ويقود الى حدوث السرطان ,والعكس صحيح فأن المدخنين المعرضين الى حدوث سرطان الرئة وغيرها الذين يتناولون أغذية حاوية على هذه المركبات مثل Catechins الموجود في الشاي والستروبري وغيرها يقيهم من حدوث هذه الأمراض (12) ,

فضلاً عن ذلك فان هذه المركبات توقف عملية صنع الـ DNA و الانقسام من خلال تثبيط انزيم Topoisomerase DNA للخلايا السرطانية ويحث طفرات الدنا في جين MLL الموجود في حديثي الولادة المصابين بسرطان الدم الحاد Acut leukemia وبالتالي تحطيم دنا هذه الخلايا والتخلص منها ,لذا اشارت العديد من الدراسات الى أن تناول الأطعمة الحاوية على هذه المركبات يقود الى طول العمر والحماية من الأصاب بنوبات القلب وحدوث السرطان (13,14) .

كما وان هنالك انواع عديدة من الفلافونويدات والسيسكويتيربين الموجودة في القيصوم توقف نمو الخلايا الورمية بشكل نهائي مثل (centaureidin apigenin, luteolin, casticin)) من الفلافونويدات ,ونوعان من sesquit- erpenoids وهي ((21) paulitin, isopaulitin) , ويفسر عملها هذا في انها قد تكون تأثر في عمل بعض الانزيمات المهمة في أنقسام الخلايا الورمية لأن أحد ميزات الفلافونويدات هو التأثير في عمل الأنزيمات المهمة لأنقسام الخلايا مما يسبب توقف انقسامها بالكامل (13) .

كذلك فأن المركبات Genistein وQuercetin (نوع من الفلافونويدات) لها فعالية سمية ضد الخلايا الورمية ولكنها لاتأثر في الخلايا الطبيعية , مما جعلها تكون احد العلاجات المستقبلية المفيدة للسرطان مقارنةً بالعلاجات الكيميائية كالعلاج الكيميائي والعلاج الأشعاعي الذي يؤذي الخلايا الطبيعية في الجسم الحاوي على الخلايا الورمية (23) .

وتتفق نتائج هذه الدراسة مع (9)الذي أثبت ان المستخلص النباتي له فعالية تثبيطية ضد ستة أنواع من الخلايا السرطانية المختلفة .

وتحوي مركبات النبات على انواع من الفلافونات مثل Apigenin الذي يؤثر على حيوية الخلايا ويحطم مادتها الوراثية ويثبط نواتج الجينات البروتينية Bax و يحفز ويفعل3 - Caspase وكذلك Caspase-9 ,كما أن ويفعل Caspase-8 وهذه كلها تحث على حدوث عملية الموت المبرمج (24), وقد أستخدمت في علاج أمراض الدم السرطانية ونجحت في الحد من أستمراره (3) وتعتمد العملية للى عدد مجاميع الهيدروكسيل OH في 2-phenyl المتحررة من 3-hydrox- yl ,وأستفيد من هذه الخاصية في الوقاية من العلاجات الكيميائية المستخدمة ضد مرض السرطان (24,3) ,كما وأستخدمت هذه المركبات في علاج أورام الدماغ Gliblastoma وعن طريق أنتاج انزيم ROS الذي يحفز عملية فسفرة P38 وبدوره يفعل MAPKرodex الذان يحثان عملية الموت المبرمج للخلايا (24) .

هذا ولم تشير النتائج الى امتلاك مستخلص نبات القيصوم تأثيراً سمياً على المادة الوراثية للخلايا اللمفاوية البشرية على مستوى الاختبار الذي استعمل في هذه الدراسة وهي تكوين الانوية الصغيرة (Micronucleus(MN إذ يعد اختبار الانوية الصغيرة من الطرائق المستخدمة حالياً في تحديد تأثير المواد السامة للخلايا التي تمتلك القدرة على الانقسام مثل الخلايا اللمفاوية وخلايا نخاع العظم (5) , أذ توجد الانوية الصغيرة Micronucleus في الخلايا المنقسمة التي تحتوي على كروموسوم فاقد للجسيم المركزي ، او كل كروموسوم لم يتمكن من الحركة الى للمغزل خلال الانقسام الخلوي Mitosis ، إذ يحاط في الطور النهائي Telo- phase بغلاف نووي منفصل مكون تراكيب تشبه النواة لكنها اصغر حجماً .

ولانها مركبات غير مطفرة وغير سامة لذا فمن الممكن أعتبارها مواد علاجية امنة الاستعمال.

و مايجب التطرق اليه ، ان تاثير المواد المضادة للسرطان لايختلف حسب نوع الخلايا فقط ، و انما حسب تمريره الخلايا Passag وذلك بسبب حدوث طفرات بالمادة الوراثية بعد عدة تمريرات (25) 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 نشات منها, مما ينتج عنها اختلاف الاستجابة للمادة العلاجية المدروسة (26) لذلك تعد هذه النتائج دليل اولي على وجود التأثير التثبيطي خارج الجسم الحي ، ومن ثم اختبار الكفاءة العلاجية داخل الجسم الحي.

المصادر:

1. 1-Miraldi E, Ferri S, Mostaghimi V. (2001). Botanical drugs and preparations in the traditional medicine of West Azerbaijan (Iran). J.Ethnopharmacol.,75;77-87.
2. Freshney, R.I., 2000. Culture of animal cells: A manual for basic technique. 4th ed. Wiley-Liss, A John Wiley and Sons, Inc. Publication, New York.
3. Wang I.K. et al, (1999) ,Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells . European J.of cancer, V35,N10.
4. Fenech, M., and Morley, A.A.(1985). Measurement of micronuclei in lymphocyte. Mutat. Res. 147: 29- 39.
5. Fenech, M.(2000). The in vitro micronucleus technique. Mutat. Res. 455: 81- 95.
6. M.Kaneva .(2010) . Comparative investigation on the composition and properties of extracts of different Achillea Millefolium TAXA. Proceeding of the International Conference BIOATLAS 2010.
7. Ochir, G.; Bude, M. and Motl, O. (1991). 3-oxyaguainolieds from Achillea millefolium. Photochemistry, 30(12) :4163-4165.
8. مجيد، سامي هاشم ومحمود، مهند جميل (1988) . النباتات والاعشاب العراقية بين الطب الشعبي والبحث العلمي ، مجلس البحث العلمي ، مركز بحوث علوم الحياة ، قسم العقاقير وتقسيم الادوية .
9. Ghazaleh Ghavami (2010) . Anticancerous potentials of Achillea species against selected cell lines , Journal of Medicinal Plants Research Vol. 4(22), pp. 2411-2417, 18 November .
10. Boswell-Ruys, C (2003). Preliminary screening study of reproductive outcomes after exposure to Yarrow in the pregnant rat. Birth Defects Res. B Dev. Reprod.Toxicaol. 68: 416-420.
11. العبيدي ,شيماء يوسف عبد الفتاح, 2008, تقييم بعض التأثيرات الوراثية الخلوية والمناعية للمستخلص الكحولي لنبات القيصوم في الحي (ذكور الفأر الأبيض) والزجاج (خلايا لمفية بشرية)رسالة ماجستير /كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد .

12. Saigusa, S.; et al. (1987).Anti-mutagenic activity of herbal extract. □□. Mechanism and DNA repair enhancement. Mutat. Res. 182:375.
13. Samajima, Ket al. (1995). Luteolin: a astrong antimutagen against dietary carcinogen 3-amino-1- methyl-5H- pyrido{4,3-10} indol (Trp-P-2). Journal of Agriculture and food chemistry. 46: 4864-86.
14. Liang-Tzung,et al (2002). In vitro anti-hepatoma activity of fifteen natural medicines from Canada.Vol. 16(5): 440-4.
15. Harborn, J. B. (1984). phytochemical methods.2ed (Ed.).Chapman and Hall.P.288.
16. Gao, S.; et al, 2003. Antiproliferative effect of Octreotide on gastric cells mediated by Inhibition of Akt/PKB and telomerase. World J. Gastroenterol, 9: 2362-5.
17. Chumchalova, J. and Smarda, J., 2003. Human Tumor Cells are Selectively Inhibited by Colicins. Folia Microbiol.,48: 111-5.
18. Verma, R. and Babu, A.(1989). Human chromosomes: Manual of Basic Techniques. Preqramon press.
19. Brito, M. T.; Martinez, A. and Cadavid, N. F. (1990). Mutagenic activity in regional food and beverages from Venzuelan Andean region. Mutation Res. 243: 251-255.
20. HSU , et al ., 2005 . Inoble 3 – carbinol inhibition of androgen receptor expression and downregulation of androgen response – veness in human prostate cencer cells . Carcinogenesis 26 : 1896 – 1904
21. Boglárka Csupor ,(2009), Antiproliferative effect of flavonoids and sesquiterpenoids from Achillea millefolium s. on cultured human tumour cell lines, Phytotherapy Research Volume 23, Issue 5,
22. Saeidnia S,(2009), Cytotoxic Flavonoid from Achillea talagonica Bioss. Journal of Medicinal Plants.
23. Calabrese E . J . and Baldwin , L .A., 2003 . Hormesis : the dose - response revolution . Annu . Rev .Pharmacol . Toxicol. , 43 : 175 – 197 .
24. Arabinda Das et al, (2010), Flavonoids activated caspases for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells but not in human normal astrocytes.J.Cancer.V116.
25. علي, امال محمد علي , (2004), دراسة وراثية ومناعية لخط خلايا سرطان الحنجرة HEp-2 ,جامعة بغداد –كلية العلوم رسالة ماجستير.
26. Bruserud , et al .(2001). New Strategies in the treatment of acate Myelogenous leukemia (AML) : In vitro culture of AML cells the present use in Expermental Studies and the possible Importance for future Therapeutic Approaches . Stem cells , 19 : 1 – 1.

investigation for the effect of crude aqueous extract of Achillea Fragrantisime on the cytotoxicity of different cancer cell lines

Amal M. Ali, Asma A. Almukhtar, Aymn A. Hassan, Noor T. Jafar, Zaid A. Ali

Iraqi Centre for Cancer and Medical Genetics Research, Al-Mustansiriya University

Abstract:

In this study , investigation done on the effect of crude aqueous extract of Achillea Fragrantisime on the cytotoxicity of different cancer cell lines .

This study containing three parts, first one including selection of four types of different cancer cell lines, two types of these are cancer cell line which are (AGM-3) and (AMN-3) and the other tow types are transformed which (REF) and (VERO) for measuring the cytotoxicity of crude extract on them, The results showed that the effect of crude aqueous extract of this plant depends on the type of cell line concentration of extract and exposure time , it was found in cancer cell lines that the high concentrations of extract investigating the highest inhibition percentage of growth cell when compared with Control, while this percentage was less in inhibition of growth cell at low concentrations after 24 hours and then this percentage be lower after exposure for 48 hours, while after exposure for 72 hours there was no significant differences when compared with control.

Same results where appeared in transformed cell line but the inhibition percentage was less from what is found in cancer cell line.

Second part of this study has been measured the effect of plant crude extract on form and stimulate an apoptosis in cancer cell lines and that was happened through application of Tunnel assay technology and, the results appeared that this crude extract was stimulated on Apoptosis process in all used types of cancer cell lines .

Finally, at the third part of this study was included measurement of genetic toxic effect of the plant crude extract through analysis micronucleus assey in human lymphocyte stimulated by Phytoheamaglotenine, and the Results appeared lack of MN which is one of certified analysis to investigation of breaking genetic material.

The conclusion of the study that the crude aqueous extract of Achillea Fragrantisime was useful in inhibition of growth cancer cells, and increases stimulate appaptosis process , as well as it non toxic in normal lymphocytes and that make it outbalance to use it as alternative treatment to chemotherapy and radiotherapy habitual use in spite of there side effects and some disadvantage