Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics

تأثير حليب التين على خطوط الخلايا السرطانية في المختبر وفي الجسم الحي بالفئران

خليل حسن الجبوري1، باسم جار الله الغزي1، ناهي يوسف ياسين2

1 فرع الامراض كلية الطب البيطري، جامعة بغداد.
2 مركز بحوث السرطان و الوراثة الخلوية، الجامعة المستنصرية.

الخلاصة:

سلطت هذه الدراسة الضوء على مادة حليب التين من خلال عدة إتجاهات, تضمن الإتجاه الأول دراسة سمية مادة حليب التين على خطوط الخلايا السرطانية المزروعة في الزجاج حيث أختبرت على خطي Hep-2, AMN-3 ولفترات تعريض مختلفة (24 ساعة, 48 ساعة) وبتخافيف ثنائية مختلفة, وقرأت النتائج بإستخدام ملون المتعادل الحمراء Neutral red وتم قياس نسبة إمتصاص الملون بإستخدام جهاز ELISA وحللت النتائج إحصائياً بإستخدام فحص تحليل التباين وعلى مستوى ($P < 0.05$) وكانت للخط Hep-2 كالآتي:

أظهر التركيز 312.5 مايكروغرام/ مل صعوداً إلى التراكيز العالية فرقاً معنوياً($P < 0.05$) عن مجموعة السيطرة بعد 24 ساعة من الحضن في حين أظهر التركيز 78.2 مايكروغرام / مل صعوداً إلى التراكيز العالية فرقاً معنوياً عن مجموعة السيطرة بعد 48 ساعة من الحضن.

بالنسبة للخط AMN-3 فقد أظهر التركيز 156.3 مايكروغرام / مل صعوداً إلى التراكيز العالية فرقاً معنوياً عن مجموعة السيطرة بعد 24 ساعة من الحضن, أما التركيز 78.2 مايكروغرام / مل صعوداً إلى التراكيز العالية فقد أظهر فرقاً معنوياً عن مجموعة السيطرة بعد 48 ساعة من الحضن.

الإتجاه الثاني تناول دراسة التأثير العلاجي لمادة حليب التين على سرطان الغدة اللبنية المغروسة في الفئران باستخدام الخط السرطاني AMN 3 حيث قسمت الفئران الحاملة للورم إلى ثلاث مجاميع مجموعة حقنت بمادة حليب التين بتركيز 5 مليغرام / كغم داخل الورم والمجموعة الثانية حقنت بنفس الجرعة داخل الخلب وتركت أربعة فئران بدون حقن كمجموعة سيطرة, وإستمر الحقن لمدة 15 يوم وتم قياس حجم الورم خلال هذه الفترة بعدها ثم قتلت الحيوانات وأخذت نماذج من الورم للدراسة النسيجية, أجري فحص تحليل التباين وبين وجود فرق معنوي بين مجموعتي المعالجة ومجموعة السيطرة على مستوى وكانت نسبة تثبيط حجم الورم 65.7 % لمجموعة الحقن داخل الورم و59 % لمجموعة الحقن داخل الخلب وأظهر الفحص النسيجي وجود مناطق نخر ونزف وإرتشاح كثيف للخلايا الإلتهابية في مجموعة الحقن داخل الورم كذلك أظهرت مجموعة الحقن داخل الخلب تلك التغيرات ولكن بصورة أقل. حيث استنتجت الى ان لمادة حليب التين تأثير مثبط لنمو الخلايا السرطانية المزروعة في الزجاج حيث اظهر التركيز 156.3 مايكروغرام / ملليتر من الوسط الزراعي تاثيراً ساماً على الخلايا صعودا الى التراكيز العالية بعد 24 ساعه واظهر التركيز 78.2 صعوداً الى التراكيز العالية تأثيراً ساماً على الخلايا بعد 48 ساعه ، ان لمادة حليب التين تأثير مثبط لنمو االاورام السرطانية المغروسة في الفئران وبنسبة تجاوزت 55% عند حقنها داخل الورم وداخل الخلب ، كانت نسبة تثبيط حجم الورم اكثر عند حقن المادة داخل الورم مقارنة بنتائج الحقن داخل الخلب .

كلمات مفتاحية:

المقدمة:

حليب التين Ficus Carica latex

يتركب حليب التين من الماء بنسبة 46% والدهون وبروتينات مثل albumin وبعض السكريات المتعددة والمطاط بنسبة 3% وأنزيمات حالة للبروتين Ficin وانزيمات Transferase الذي يدخل في عملية تكوين المطاط الموجودة في حليب التين (1) يوجد حليب التين في الاغصان , سويقات الاوراق والثمار بكميات قليلة جداً ويحمل نفس التركيب في الاجزاء المتواجدة فيها من النبات , لكن تركيز المواد الصلبة فيه يزداد كلما اقترب موسم نضج الثمار (2) .

بالإضافة إلى ذلك فأن مادة حليب التين ذات تأثير مثبط لنمو الخلايا السرطانية في المختبر حيث درست تأثيراتها على خطوط سرطانية عديدة حيث درست فعاليته على مختلف الخطوط السرطانية وظهر له تأثير مثبط على نمو الخلايا لتلك الخطوط السرطانية (3) . وحديثا تم إكتشاف مادة sitosterol ضمن حليب التين والمعزولة ايضا" من نباتات أخرى مثل فول الصويا والبزاليا والتي استخدمت منذ فترات طويلة في علاج سرطان البروستات والثدي وتوجد بنسبة% 0.008 وأشارت الدراسة نفسها إلى ان لهذه المادة تأثير مثبط لنمو الخلايا السرطانية المنماة على الزجاج(4 (in vitro) .

اما في المختبر فقد درست سمية تلك الانزيمات على خطوط خلايا سرطانية (Cancer Cell Line) وثبت تأثيرها المثبط لنمو الخلايا (3) . لوحظ في السنوات الأخيرة هنالك توجهاً كبيراً على إستخدام مستخلصات الأعشاب والنباتات الطبية كمواد مؤثرة على الخلايا السرطانية (5). وفي العراق قطع البعض شوطاً علمياً كبيراً في دراسة تأثير بعض مستخلصات النباتات المحلية فقد أشار (6) الى ان مستخلص اوراق نبات سم الفراخ Withonia somnifera له تاثير مثبط لنمو الخلايا السرطانية المزروعه في الزجاج عند تراكيز معينة . كذلك اشار (7) الى ان جذور نبات السعد Cyperus rotadus له تاثير مثبط على نمو مختلف خطوط الخلايا السرطانية المزروعه في الزجاج ولذلك واستمراراً في كشف المواد الفاعله في النباتات العراقية تم استخدام حليب التين

Corresponding Address:
Khalil H. Al-Jeboori
Dept. of pathology , College of Veterinary Medicine Univ. of Baghdad
Email:khalilhassan1955@Gmail.com

لدراسة فعاليته على خطوط الخلايا السرطانية في المختبر وتاثيره على سرطان الغدد اللبنية المزروعه في الفئران حيث استهدف البحث الى :

1. أختبار سمية مادة حليب التين على خطوط الخلايا السرطانية في المختبر
2. دراسة التاثير العلاجي لمادة حليب التين على سرطان الغدة اللبنية في الفئران.

المواد وطرق العمل:

أختبار سمية مادة حليب التين على نمو الخلايا السرطانية في المختبر cyt-toxic assay of Ficus carica latex on cancer cell lines

اتبعت طريقة (6 ، 7) في تحضير عالق خطي الخلايا السرطانية وتحت ظروف التعقيم في الكابينة المعقمة جهز عالق الخلايا (لحظي AMN-3, Hep-2) عن طريق معاملة وعاء الزرع الذي يحوي الخلايا بمحلول التربسين فرسين وأتبعت الخطوات نفسها التي تجري للحصول على المزارع الثانوية subculture، وبعد أنفصال الخلايا عن السطح الداخلي للوعاء الزرعي اضيف أليها 20 مليلتر من الوسط الزرعي RPMI-1640 ومزج عالق الخلايا جيدا ، ثم سحب 0.2 مل من عالق الخلايا ونقل الى كل حفرة من صفيحة الزرع متعددة الحفر (96حفرة) باستعمال ماصة دقيقة ، بعد أن تم عد الخلايا بواسطة شريحة عدد الكريات الدم البيضاء Neubauer Chamber بأستعمال ملون trypan blue حيث أحتوت كل حفرة على (10000 خلية).

ترك الطبق في الحاضنة بدرجة 37م لمدة 18 ساعة لحين تكون طبقة احادية من الخلايا ، ثم أعيد الى الكابينة المعقمة .حضرت عشرة تخافيف ثنائية من مادة حليب التين ،كما يلي وحسب طريقة (6 ،7) :

1 - سحب 1مل من مادة حليب التين المعقمة وأضيف اليه 1 مل من الوسط الزرعي RPMI-1640 الخالي من المصل البقري في أنبوب أختبار ، وتم مزجه جيدا بأستعمال ماصة دقيقة .

2 - اضيف الى عشرة انابيب اخرى الوسط الزرعي الخالي من المصل وبواقع 1مل لكل انبوب .

3 - سحب 1مل من الانبوب الاصلي الذي يحوي مزيج مادة حليب التين والوسط الزرعي ،وأضيف الى أول انبوب من الانابيب العشرة ومزج جيدا ،ثم اخذ منه 1 مل من أول الأنابيب العشرة وأضيف الى الانبوب الثاني وهكذا إلى آخر أنبوب ملاحظة : أهمل الأنبوب الأصلي والذي يحوي 1 مل من مادة حليب التين و 1 مل من الوسط الزرعي الخالي من المصل .

4 - أصبح تسلسل التراكيز
5000، 2500، 1250، 625، 312.5، 156.25، 78.1،39.05 ، 19.7, 9.8

-5 تم التخلص من الوسط الزرعي القديم في الحفر وأضيف 0.2 مل من الأنبوب رقم واحد من الأنابيب العشرة المحضرة سابقاً وبواقع أربعة مكررات لكل تركيز وهكذا بقية التراكيز .

6 - اضيف الى باقي الحفر 0.2 مل من الوسط الزرعي RPMI-1640 الخالي من مصل العجل البقري بأستعمال ماصة اوتماتيكية دقيقة وتركت كمجموعة سيطرة .

7 - أعيد حضن الخلايا مرة ثانية بدرجة 37 م .

تم أتباع الطريقة أعلاه على خطي Hep-2,AMN-3 ،ولفترات حضن او تعريض مختلفة (24 , 48) ساعة.

8 - بعد مرور مدة التعريض المحددة ،أعيد صفيحة الزرع إلى الكابينة المعقمة وسكب الوسط الزرعي منها وأضيف إلى كل حفرة 50مايكروليتر من محلول ملون الأحمر المتعادل وأعيد حضن الطبق بدرجة 37 م لمدة ساعتين .

9 - أخرجت صفيحة الزرع مرة اخرى وسكبت الملون وغسلت الخلايا بمحلول PBS لحين زوال الملون حيث تأخذ الخلايا الحية الملون أما الميتة فلاتأخذها

10 - أضيف لكل حفرة 50 مايكروليتر Ethanol/PBS حيث يقوم هذا المحلول بأستخلاص الملون من الخلايا الحية التي اخذت الملون .

11 - قرأت النتائج باستعمال جهاز الاليزا بطول موجي 492نانومتر.

غرس سرطانة الغدة اللبنية في الفئران

Mammary adenocarcinoma allograft in mice

اتبعت طريقة (6) لتحضير خط الخلايا السرطانية AMN 3 ، حيث تم تجهيز الحيوان الحامل للورم من المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية حيث يخدر الحيوان الحامل للورم ثم يتم تعقيم كتلة الورم بالكحول 70% بعد ذلك تدخل ابرة قياس 18 gage في كتلة الخلايا وترشف الخلايا aspirated بمقدار 3-5 مل حيث تنقل الخلايا بعدها الى بيكر معقم ويضاف اليها حجم مساو من PBS معقم وتمزج جيدا , بعدها تغسل الخلايا ولمرة واحدة بنقلها الى انبوبة اختبار معقمة وتوضع في جهاز نبذ مركزي مبرد (1000 rpm لمدة 10 دقائق وبدرجة (18-20c) وذلك للتخلص من الدم وحطام الأنسجة , يهمل الصافي ويعاد تعليق الراسب في حجم مساوي من PBS معقم ثم يحقن كل فار 0.3 مل من العالق تحت الجلد باستعمال ابرة قياس 18 يتم ادخالها من المنطقة الظهرية وصولا الى المنطقة العنقية حيث تحقن الخلايا مع الضغط على منطقة ما قبل العنق لمنع رجوع العالق الخلوي بعد سحب الابرة ثم تعلم الفئران بالوان مختلفة لمتابعة تطور النمو فيها وحسب طريقة (6).

استخدم في هذه التجربة 17 فأر ظهر الورم في 14 فأر بعد مدة اسبوع ، وبعد 15 يوم من الحقن اصبح بالامكان البدء بمعالجة الورم . قسمت الفئران الحاملة لسرطانة الغدة اللبنية والتي نجح نمو الورم فيها الى ثلاث مجموعات :-

المجموعة الاولى :

وتضم 5 فئران تم حقن مادة حليب التين داخل الورم وبجرعة 5 ملغم / كغم من وزن الجسم حيث تم تخفيف المادة بالماء المقطر المعقم للوصول إلى التركيز المطلوب (أذيب 1مل من المادة في 150 مل D.W/ وبالأخذ بنظر الاعتبار أن وزن الفئران المستخدمة مساوياً إلى 25 غم أي أن كل فأر سيأخذ جرعة مساوية إلى 0.13 ملغم لكل فأر وبتحويلها إلى ملغم / كغم سيكون مقدار الجرعة 5 ملغم / غم من وزن الجسم .

المجموعة الثانية :

وتضم 5 فئران تم حقن المادة داخل الخلب وبجرعة 5 ملغم / كغم .

المجموعة الثالثة :

تركت الفئران الأربعة المتبقية كمجموعة سيطرة .

وعلمت الحيوانات بألوان مختلفة لمتابعة تقدم حجم الورم فيها وسجلت النتائج لكل ثلاثة أيام ولمدة أسبوعين .

يقاس حجم الورم باستعمال آلة قياس vernier calipers وياخذ قياسان (الطول , العرض) .

حجم الورم=الطول ×(العرض)2 /2 (8) .

$$\text{نسبة تثبيط حجم} = \frac{\text{حجم الورم في المجموعة غير المعالجة} - \text{حجم الورم في المجموعة المعالجة}}{\text{حجم الورم في المجموعة غير المعالجة}} \times ١٠٠ \quad (9)$$

بعدها تم قتل الحيوانات واخذ نماذج من الورم للدراسة النسيجية (10) .

التحليل الاحصائي : خضعت نتائج التجربة الى اختبار تحليل التباين analysis of variance وعلى مستوى احتمالية ($P < 0.05$).

النتائج:

1 - التأثيرات السمية الخلوية للمادة على خطوط الخلايا السرطانية في المختبر Cytotoxic effect of Ficus carica latex on tumor cell lines in vitro

أ- خط الخلايا Hep2

-1 بعد 24 ساعة من التعرض لمادة حليب التين :-

* ظهر وجود فرق معنوي مهم إحصائياً وعلى مستوى $P<0.05$ بين التركيز (312.5) مايكروغرام / مل صعودا إلى التراكيز العالية ومجموعة السيطرة ولم تظهر التراكيز الأخرى فرقا معنويا على مستوى ($P<0.05$)عن مجموعة السيطرة .حيث كان معدل امتصاص الملون 0.142 للتركيز 5000 مايكرو غرام / مل وللتركيز 2500 (0.145)وللتركيز1250 (0.149) وللتركيز 625 (0.150) وللتركيز 312.5 (0.152) ، في حين كانت نسبة امتصاص الملون من الخلايا الحية لمجموعة السيطرة0.225 .

-2 بعد 48 ساعة من التعرض لمادة حليب التين تبين وجود فرق معنوي

مهم إحصائياً وعلى مستوى P<0.05 بين التركيز (78.3) صعودا إلى التراكيز العالية ومجموعة السيطرة .حيث كان مستوى إمتصاص الملون للتركيز5000مايكروغرام/ مل من الوسط الزرعي (0.138)وللتركيز 2500(0.140)وللتركيز 1250 (0.146) وللتركيز 625 (0.148) وللتركيز312.5 (0.149)وللتركيز 156.25 (0.153)وللتركيز78.3 (0.158)، في حين كان مستوى إمتصاص الملون لمجموعة السيطرة 0.225 .
وعند مقارنة التراكيز فيما بينها لوحظ :
*عدم وجود فرق معنوي مهم إحصائياً على مستوى (P<0.05) بين التراكيز (78.3,156.3,312.5,625) والتي أظهرت فرقاً معنوياً عن تراكيز (5000, 2500 ,1250) عند مقارنتها مع بعضها البعض وعلى مستوى معنوي (P<0.05) .

ب- خط الخلايا AMN-3

1- بعد24 ساعة من التعرض لمادة حليب التين هنالك وجود فرق معنوي وعلى مستوى P<0.05 بين التركيز(156.3)صعودا إلى التراكيز العالية ومجموعة السيطرة حيث كان مستوى إمتصاص الملون للتركيز 5000مايكروغرام/ مل من الوسط الزرعي (0.146) وللتركيز 2500 (0.147)وللتركيز1250 (0.148)وللتركيز 625 (0.1485)وللتركيز 312.5 (0.150)وللتركيز156.25 (0.155) في حين كان معدل إمتصاص الملون لمجموعة السيطرة 0.224 .
وقد أظهرت التراكيز (1250,2500,5000,625) فرقاً معنويا مهم إحصائياً وعلى مستوى (P<0.05) عن التركيزين (156.3,312.5) واللذان لم يظهرا فرقا مهما إحصائياً وعلى نفس المستوى فيما بينهما .

لم تظهر التراكيز الاخرى (9.8 , 19.5 , 39.1 , 78.2) فرقا معنويا مهم إحصائياً على مستوى (P<0.05) عن مجموعة السيطرة.

2 - بعد 48 ساعة من التعرض لمادة حليب التين.

أظهرت التراكيز (78.2,156.3,312.5,625,1250,2500,5000) فرقا معنويا مهم إحصائياً على مستوى (P<0.05) عن مجموعة السيطرة وكانت نسبة إمتصاص الملون للتركيز 5000 مايكروغرام / مل (0.135) وللتركيز 2500 (0.142) وللتركيز 1250 (0.146) وللتركيز 625 (0.148) وللتركيز 312.5 (0.150) وللتركيز 156.25 (0.165) وللتركيز 78.2 (0.185). كذلك تبين وجود فرق معنوي وعلى نفس المستوى بين التركيزين (2500و5000) مايكرو غرام/ مليلتر والتركيزين (625و1250) .

في حين لم تظهر بقية التراكيز (9.8,19.5,39.1) فرقا معنويا عن مجموعة السيطرة على مستوى (p<0.05)

التاثير العلاجي لمادة حليب التين على سرطانة الغدة اللبنية في الفئران :

Therapeutic effect of latex on murine mammary adeno-carcinoma

تم قياس حجم الورم للمجاميع الثلاثة (السيطرة , مجموعة الحقن داخل الورم , مجموعة الحقن داخل الخلب) حيث كان هنالك فرق معنوي في حجم الورم (P < 0.05) بين مجموعتي السيطرة , وكان حجم الورم في مجموعة السيطرة كما في الجدول رقم (1) وحجم الورم في مجموعة الحقن داخل الورم كما مبين في الجدول رقم (2) ويمثل الجدول رقم (3) حجم الورم في مجموعة الحقن داخل الخلب طيلة فترة المعالجة .

جدول رقم (١) يبين حجم الورم في مجموعة السيطرة حيث يشير الحرف d الى فترات قياس حجم الورم بالايام وتشير الارقام الى حجم الورم بالمليمتر

1d	3d	6d	9d	12d	15d
252	359	591	717	1801	2360
222	399	602	737	2150	3125
180	379	611	690	1953	2525
275	401	699	825	2101	3525
المعدل	384.5	625.8	742.3	1821.3	2883.7

232.3

جدول رقم (٢) يبين حجم الورم في مجموعة الحقن داخل الورم حيث يشير الحرف d الى فترات قياس حجم الورم بالايام وتشير الارقام الى حجم الورم بالمليمتر

1d	3d	6d	9d	12d	15d
255	315	419	565	601	950
270	340	421	570	721	910
174	235	399	509	678	850
225	345	405	581	701	869
221	355	459	578	891	1367
المعدل	318	420.6	560.6	718.4	989.2

229

جدول رقم (٣) يبين حجم الورم في مجموعة الحقن داخل الخلب حيث يشير الحرف d الى فترات قياس حجم الورم بالايام وتشير الارقام الى حجم الورم بالمليمتر

1d	2d	6d	9d	12d	15d
259	316	429	611	815	1015
221	298	439	679	913	1225
223	314	499	625	728	1196
219	320	433	476	891	1095
233	325	426	612	921	1367
المعدل	312.8	445.2	645	853.6	1179.6

231

واجرى فحص تحليل التباين Analysis of Variance حيث قورن حجم الورم للمجاميع الثلاثه مع بعضها البعض لقراءة النتائج وكانت كالاتي :

1. لم يظهر فرق معنوي مهم احصائياً على مستوى (P<0.05) بين مجموعتي المعالجة ومجموعة السيطرة لحد اليوم السادس من بدء الحقن .
2. ظهر فرق معنوي مهم احصائياً وعلى مستوى (P<0.05) بين مجموعتي المعالجة ومجموعة السيطرة في اليوم التاسع من الحقن .
3. تبين وجود فرق معنوي مهم احصائياً وعلى مستوى (P<0.05) بين مجموعتي المعالجة ومجموعة السيطرة وكذلك بين المجموعتين (الحقن داخل الورم , الحقن داخل الخلب) عند اليوم الخامس عشر من الحقن.

كذلك تم قياس نسبة تثبيط الورم لمجموعة الحقن داخل الورم كما في الجدول رقم (4) ولمجموعة الحقن داخل الخلب كما مبين في الجدول (5)

جدول رقم (4) يبين نسبة تثبيط حجم الورم في مجموعة الحقن داخل الورم حيث يشير الحرف d الى فترات قياس حجم الورم بالايام وتشير الارقام الى النسبة المئوية لتثبيط حجم الورم

3d	6d	9d	12d	15d
18.2	33.1	23.9	70	67.1
11.7	32.7	23.2	63.9	68.4
39	36.3	31.4	66.1	70.5
10.4	35.3	22	65	69.9
7.8	26.7	22.1	55.5	52.6
المعدل 19.42	32.8	24.5	64.1	65.7

جدول رقم (5) يبين نسبة تثبيط حجم الورم لمجموعة الحقن داخل الخلب حيث يشير الحرف d الى فترات قياس حجم الورم بالايام وتشير الارقام الى النسبة المئوية لتثبيط الورم بالمليمتر .

3d	6d	9d	12d	15d
17.9	31.5	17.7	59.2	64.8
24.9	29.9	8.5	54.4	57.5
18.4	20.3	15.8	63.3	58.5
17.1	30	17.2	55.5	62
15.6	31.9	17.5	54	52.6
المعدل 18.8	28.7	15.3	57.3	59

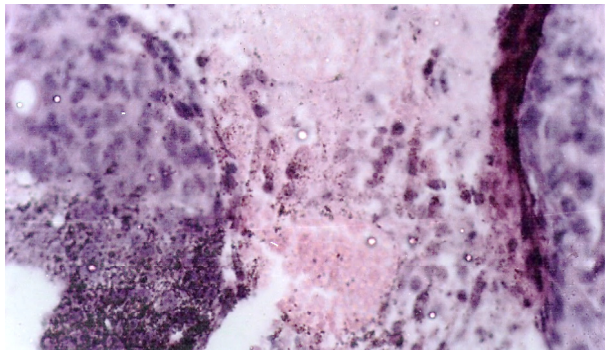
ولوحظ من خلال النتائج بعد التحليل الاحصائي عدم وجود فرق معنوي مهم احصائياً وعلى مستوى (P<0.05) بين مجموعتي المعالجة حتى اليوم التاسع من الحقن .

1. ظهر وجود فرق مهم احصائياً وعلى مستوى (P<0.05) بين مجموعتي المعالجة عند اليوم الخامس عشر من المعالجة وكانت نسبة تثبيط الورم في داخل الخلب 59%بينما كانت نسبة تثبيط الورم في مجموعة الحقن داخل الورم 65.7% .

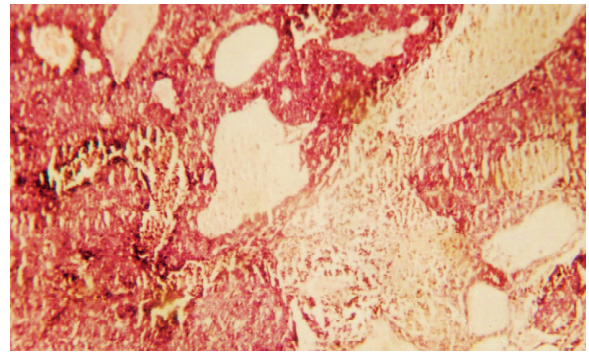
الفحص النسيجي للورم histopathological examination of tumor

***مجموعة الحقن داخل الورم :**

بعد إجراء الفحص النسيجي للورم المأخوذ من هذه المجموعة ظهر وجود مناطق مختلفة من التقرح ulcer ونزف وإرتشاح للخلايا الإلتهابية متعددة النوى ، وكانت الخلايا السرطانية ذات أشكال غير متجانسة مع زيادة في نسبة الكروماتين إضافة إلى زيادة الاشكال الخيطية (Mitotic figures) كما هو ظاهر في الصورة رقم (1) حيث يلاحظ وجود مناطق نخر واسعة في نسيج الورم ونزف وإرتشاح الخلايا الإلتهابية كما في الصورة رقم (2). حيث كان النزف شديد لهذه المجموعة مع ملاحظة تحطم جزء كبير من نسيج الورم بفعل مادة حليب التين كما هو ظاهر في الصورة رقم(2) عند اليوم الخامس عشر من الحقن .



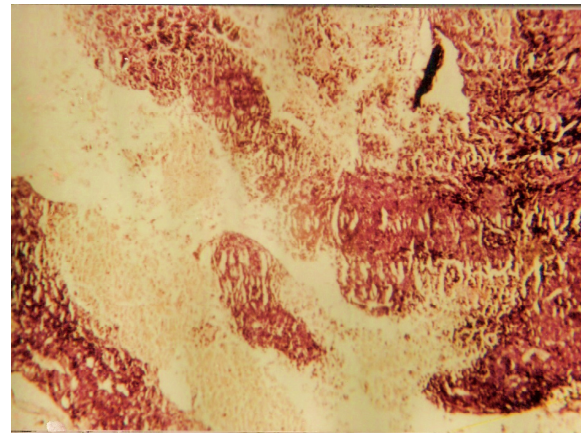
صورة رقم (1) مقطع نسيجي للورم من مجموعة الحقن داخل الورم Intrat-mor injection يوضح التقرح Ulceration ونزف ووجود الخلايا الالتهابية متعددة النوى في منطقة التقرح، بعد 15 يوم من الحقن (H & E) X 200



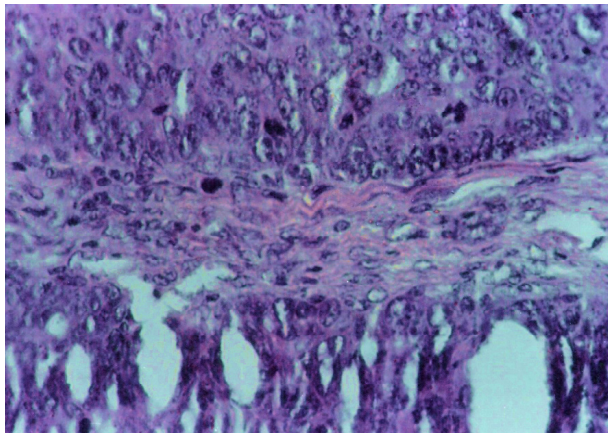
صورة رقم (2) مقطع نسيجي للورم من مجموعة الحقن داخل الورم يبين منطقة نزف واسعة جدا وارتشاح خلايا التهابية infiltration of inflammatory cells مع وجود نخر داخل الورم ، بعد 15 يوم من الحقن. (H & E (X 50

**مجموعة الحقن داخل الخلب

لوحظ وجود مناطق نزف وإرتشاح الخلايا الإلتهابية متعددة النوى ونخر كما فـي الصورة رقم (3) وجود مناطق وذمة واسـعة جداً ويتوقع انها ناتجة بسـبب ذوبـان افرازات الغدد اللبنية أثناء عملية تحضير المقاطع النسـيجية ،اضافة إلى ذلك لوحظ وجود النسيج الليفي fibrous tissue محيط بكتلة الورم وهي صفة لم تلاحظ في مجموعة الحقن داخل الورم أو مجموعة السيطرة الصورة رقم (4) .



صـورة رقم (3) مقطع نسـيجي للورم يوضح منطقة نزف واسـعة جدا حيث يلاحظ حطام الخلايا الالتهابية واضحة مع نخر في نسيج الورم. المقطع مأخوذ من مجموعة الحقن داخل الخلب Intraperitoneal injection بعد 15 يوم من الحقن . (H & E (X 50



صورة رقم (4) مقطع نسـيجي مأخوذ من مجموعـة الحقن داخل الخلب Intr-peritoneal injection يلاحـظ وجود مسـاحات فارغة في الغدد اللبنية ناتجة بسبب ذوبان إفرازات الغدد أثناء تحضير النماذج , كذلك يلاحظ منطقة نسيج ليفي وإرتشاح بعض الخلايا الالتهابية متعددة النوى (H & E (X 200

المناقشة:

التاثيرات السمية للمادة على خطوط الخلايا السرطانية في الزجاج

Cytotoxic effect of figs latex on tumor cell line in vitro

ومن خلال قراءة النتائج وجد ان التركيز (312.5) مايكروغرام / مل صعوداً الى التراكيز العالية ذات تاثير مثبط لنمو الخلايا السرطانية على الزجاج على كلا الخطين المسـتخدمين للدراسة (AMN3 , Hep-2) , اشار (3) ان لمادة حليب التين تاثير مثبط على نمو مختلف الخطوط السـرطانية في المختبر . فوجد انزيم Ficin الـذي يعتبـر من Proteolytic enzyme ضمـن تركيبة حليب التين , وممـا هو معـروف فان جدار الخلية يتركب من بروتيـن ودهون (11) لذلك فان هذا الانزيم سـيعمل على تحطيم الجدار الخلوي وهذا يقود الى عدم توازن تبادل الصوديوم والبوتاسيوم داخل الخلية وخارجها مما يؤدي الى انتفاخ الخلية وسلسلة من التغيرات الداخلية التي تنتهي بطرح الانزيمات الموجودة داخل الاجسام الحالة وبالتالي قتل الخلايا السـرطانية , من جانـب اخر فان المعالجة بالانزيمات تحفز عمليـة الموت المبرمـج للخلايا apoptosis في الخلايا السـرطانية المزروعه داخل الجسـم الحي لهذا فهي قد تقود الى ذلك على الخلايا المزروعه في الزجاج ايضـاً (12) . اضافة الـى ماذكر اعلاه فوجود مادة Sitosterol التي تسـتخدم كمادة علاجية لعدة انواع من سرطان البروستات والمبيض في حليب التين والتي ثبت انها سامة للخلايا فهذا يعزز من دعم النتائج التي تم الحصول عليها من هذه الدراسة حيث يوجد في مختلف النباتات ومن ضمنها حليب التين للنوع (Ficus carica) (4) .

التجارب العلاجية لمادة حليب التين على سرطان الغدة اللبنية في الفئران

Therapeutic studies of figs latex on murine mammary adenocarcinoma

عنـد قياس معدل الحجـم النهائي للورم في المجموعتيـن المعالجتين ومقارنته بمجموعة السيطرة , لوحظ التاثير المثبط لمادة حليب التين حيث كانت نسبة تثبيط الـورم في مجموعة الحقـن داخل الخلب 59% في حين كانت نسـبة تثبيط حجم الورم في مجموعة الحقن داخل الورم 65.7% ويرجع السبب في اختلاف التاثير بيـن طريقتـي اعطاء المادة الى التاثير المباشـر للمادة على الـورم في مجموعة الحقـن داخل الورم في حيـن ان فعالية المادة تكون اقل بفعـل عدة عوامل اهمها الايـض الذي يحصل لها داخل الكبد , الطـرح الكلوي , واحتمال عدم امتصاص المـادة بشـكل كامل عن طريـق الخلب وهذا كان واضحاً عند الفحص النسـيجي للـورم , فمجموعـة الحقـن داخل الورم لوحـظ فيها ان كتلة الـورم تحتوي على مناطق نزف ونخر واسـعة جداً بالاضافة الى مناطق تقرح والتي كانت اقل حدة فـي مجموعة الحقن داخل الخلب . فقد اشـار (2) الـى ان لمادة حليب التين تاثير مثبط على نمو الاورام الجلدية والثآليل . وقد اسـتخدم (13) مادة حليب التين في عـلاج الثآليل Warts في الابقار واجرى دراسـة مقارنة مـع مادة Salicylic acid حيث تعمل مادة Salicylic acid على حل الخلايا المتقرنة keratolytic agent وهي تستعمل كمرهم لعلاج التقرنات الجلدية , وظهر ان لمادة حليب التين فعل مشـابه لمادة Salicylic acid وادت المعالجة اليومية الى شـفاء التام بعد 15 يوم . وكما اشـار فان ثمار التين تحتوي نسـبة من مادة حليب التين , فقد استخدمت عصارة الثمار في علاج بعض الاورام الجلدية في الفئران وكانت نسبة تثبيـط حجم الورم45% (14) .يمكن ان يعزى التاثير الايجابي للمادة في معالجة الاورام الـى وجود عـدة عوامل اهمها انزيم ficin حيث اسـتخدمت الانزيمات الحالة للبروتين في علاج الاورام منذ العام 1914 ومن الاسـباب المهمة لفشـل الجهاز المناعي في القدرة على قتل الخلايا السـرطانية هو سـمك الجدار الخلوي Plasma membrane للخلايا السـرطانية والذي يبلغ 13 مرة اكبر من الخلية الطبيعية (15) , لذلك تعطى الانزيمات كعوامل مساعدة للجهاز المناعي للقضاء على الخلايا السرطانية حيث تحلل الجدار الخلوي للخلية السرطانية ولو بصورة جزئيـة . كذلـك حقنت الانزيمات الحالة للبروتين مثـل (Trypsin , Papain , Ficin) في كتلة الورم قبل حقن الاجسام المضادة Antibodies في سرطان الكبـد Hepatoma فـي خنازير غينيا حيث سـهلت وصول الاجسـام المضادة للنسـيج الورمي كذلك فان هـذه الانزيمات تعتبر كعامل جـذب كيمياوي للخلايا المناعية , وهذا ما لوحظ ايضاً عند اسـتخدام انزيم Papain الموجود في حليب التين نوع Ficus papaya بعد عمليات ازالة سرطان الثدي (16) وهذا يفسر وجود الخلايا الالتهابية ومناطق النخر الواسـعة في النسيج الورمي في مجموعة

الحقـن داخل الورم , واشــار (17) الــى ان الانزيمات الموجـودة في ثمار التين لهـا تاثيـر مضاد للســرطان . واكد (12) ان الانزيمات الحالة للبروتين تسـبب الموت المبرمج للخلايا السرطانية Apoptosis for cancer cells فضلا عن دور مادة Sitosterol في قتل الخلايا السـرطانية , حيث تسـتخدم بصورة نقية فـي علاج الاورام وخاصة سـرطان الثدي والبروسـتات (18). وقد اكد (3) ان هذه المادة سـامة للخلايا Cytotoxic وهـي توجد بتركيز 0.008% في حليب التين .

References:

1. Kang , H. Kang , M. Y. and Han , K. H. (2000) Identification of natural rubber and characterization of rubber . Plant physiol . 123 : 1133 – 1142 .
2. Houlton , S. (2001) medicinal figs. J. British pharm. 96 : 632-635 .
3. Robnov, S. Kashman , K. and Rabinowits , R. (2001) Cytotoxic effect of Ficus carica latex on defferent cancer limes . J. Nat . prod. 64(7) : 993-996 .
4. Rephael , M. (2001) . Isolation of potent cytotoxic compound from figs latex . J. Nat. prod . 64: 993 .
5. Dennis , R. Adriana , B. and Rocha , G. (2000) Anticancer drug discovery and pewla pmut- Brazil : torgetal plant collection candidate anto – cancer compounds, oncologist 5 : 185-198)
6. Al - Ekabi , S. M. (2001) , Effect of Withania somniferous leaves extract on tumor cells lines invitro and some physiological paramenters in rats . Ph. D. Thesis , college of Vet. Medicine , Baghdad Univ.
7. Al – Hilli . Z. A. (2005) . Effect of crude extracts of cyperus rotendus root on tumor cell lines invitro , M. Sc thesis , college of science , Baghdad University .
8. Corbett , T. H, Robert , B.J. Leopold , W.R. Pockham, J. C. Wikoft , L. J. Gioswold , D. P. and schobel , F. M. (1984) introduction and . chemotherapeutic response of two transplantable ductel adenocarcinoma of the pancereuse in C57BL 16 mice . cancer Research 44:717-726 .
9. Bluementhal , R. M. Sharkey . R.M. Natale , A.M, Kashi , R. Wong , G. and Goldenbery , D.M. (1994) comparison of equitoxic radioimmunotherapy and chemotherapy in treatment of human colonic cancer xenografts , cancer Research 54: 142 – 151 .
10. Luna L. G (1968) manual of histological staining methods of armed forces institute of pathology 3rd. ed . New York : McGraw-Hill Book company .
11. Jones , T. C. Hunt , R. D.King , W.W (1997) Veterinary pathology , Philadelphia , Lippincott Williams and Wilkins .
12. Brewer , K. (1984) the high ph therapy for cancer, tests on mice and human pharm . Biochem. And Behavior 21: 1-5 .
13. Hemmatazadeh , F. (2004) . Therapeutic effect of fig tree latex on Bovine papillomatosis in cow. J . Vet. Med 10 : 473 – 474 .
14. Mitsubishi center for biological scientific Research (2004) . (M. K. I. L. S. 2004).
15. Boyce, R. (1995) enzyme discovery could lead to cancer treatment Washington post 114 No: 20 .
16. Benth , J. pakdamam , A. and Schneider B. (2001) impact of complementary oral enzyme application in post operation treatment of breast cancer patient . Cancer chemotherapy and pharm . 97: 545 – 554 .
17. Michele , J. P. Reilly , R. T (2001) cyclophosamide , Deoxorubicin and paclitaxel enhance the anti-tumor immune response in mice. Cancer Res. 61 : 3689 – 3697 .
18. Klippel , K. Hihi , D. and schipp , B. (1997) Beta sitosterol in treatment of prostate cancer British , T. of Urolo . 80: 427 – 432 .

Effect of Ficus carica latex or tumor cell lines in vitro and in vivo in mice

Khalil H. Al - Jeboori[1], Basim A.H. Al . Ghezi[1], Nahi Y. Yassin[2]

1 Dept. of Pathology, College of Veterinary Medicine Univ. Of Baghdad
2 Institute of Cancer and Cytogenetic Researches Univ. of Al-Mustansirya

Abstract:

This study shed the light upon Ficus carica latex from many aspects. The first aspects include the study of the material toxicity on cancer cell lines cultured in vitro which tested on two cancer cell lines which are Hep-2 , AMN-3 with different time of exposure (24 hr. and 48 hr.) and using two fold dilution . The results were read by using neutral red stain and the ratio of absorbance of stain was measured by using ELISA. The result were analyzed by using analysis of variance on level ($P<0.05$) which were for Hep-2 as follow.

The concentration 312.5 up to high concentration show significant difference as compared with control group after 24 hr. of incubation while the concentration 78.2 up to high concentration state significant difference from control group after 48 hr. of incubation. While the line AMN-3 results revealed that the concentration 156.3 up to high concentration show significant difference as compare with control group after 24 hr. while the concentration 78.2 up to high concentration show significant difference from control group after 48 hr. from incubation.

The second aspect aimed to study of therapeutic effect of the ficus carica latex on mammary Carcinoma cell line ANM 3 in mice . The mice have successful tumor growth on were classified into (3) groups injected with the same dose which is 5 mg/kg body weigh intra tumor & the 2nd group intra peritoneal & the last lifted as control group . The injection continues for (15) days . The size of tumor was measured along this period . Samples were obtained for histopathological study & the results were analyzed by using analysis of variance where show presence of significant difference between the two treated groups & control group on the level ($P < 0.05$).

The tumor size inhibited ratio was 65.7 % for the intratumor injected group & 59 % for intraperitoneally injected group. The histopathological examination state presence of areas of necrosis, hemorrhage, edema, inflammatory cell infiltration in intratumour injection group and, less extent in intraperitoneally injected group. The study concluded that the Ficus latex had regressive effect on tumor cells lines . Ficus latex had regressive effect on mammary tumor cells inoculated in mice . The regressive ratio of tumor size was more in intratumor injection of Ficus latex than in intraperitoneally injected group .