

دراسة مرضية وقائية لتأثير المستخلصات الخام لنبات المرير *Sonchus oleraceus* على خلايا سرطان الغدة اللبنية *in vivo* في الفئران

زينب رزاق زغير

كلية الطب البيطري / جامعة بغداد

الخلاصة

صممت هذه الدراسة للتحري عن التأثير الوقائي والمرضي للمستخلصات الكحولية و المائي (البارد و الحار) لنبات المرير *Sonchus oleraceus* على نمو خلايا سرطان الغدة اللبنية mammary adenocarcinoma داخل الجسم الحي. أجريت دراسة تقييم تأثير المستخلصات الثلاث في الجسم الحي ، و كانت الجرعة المميئة الوسطية (LD₅₀) للمستخلصات الكحولية و المائي الحار و المائي البارد (5غم/كغم و 6 غم/كغم و 8 غم/كغم من وزن الجسم) على التوالي، حيث أعطيت مجاميع الفئران المستخلصات الثلاث لمدة أسبوعين ثم عولجت لمدة أسبوعين بعد غرسها بالخلايا السرطانية. أظهرت الدراسة المرضية النسيجية تغيرات مرضية في الكتلة السرطانية، وكذلك حيث لوحظ تنخر معظم الخلايا السرطانية في المجموعة المعاملة بالمستخلص الكحولي، كذلك أظهرت النتائج المرضية النسيجية بأن مستخلصات نبات المرير قد تسببت في نخر الخلايا السرطانية مع إحداث نخر بسيط في النسيج الطبيعي داخل الجسم الحي.

المقدمة

يعد نبات المرير من الأعشاب والنباتات الحولية، ولها سيقان منتصبية وتتفرع بالقرب من الأزهار الصفراء الشاحبة (1) وتعرف النبتة بنبات الشوك المنثور الناعم sow-thistle يحتوي نبات المرير على العديد من العناصر الغذائية مثل الصوديوم والبوتاسيوم والكالسيوم والمغنيسيوم والحديد والنحاس والزنك والمنغنيز بالإضافة إلى احتوائها على الأحماض الدهنية وفيتامين ج (vitamin c) والكاروتين وحامض الاوكزاليك، وهذا مما يجعل إمكانية استخدام هذا النبات لأغراض التغذية (2) أستعمل نبات المرير كمقوّي عامّ في الطبّ الشعبي في العديد من بلدان العالم مثل البرازيل، وعلى الرغم من هذا، هنالك معلومات علمية نادرة متوفرة بخصوص هذا النوع (3) ، ويحتوي نبات المرير على المكونات الكلايكوسيدية glycoside (4) والفينولات وتشمل الفلافونويدات flavonoid (5). فعالية مضادات الأكسدة لمواد النبات تتعلق باحتوائها على المركبات الفينولية (6). الفينولات المتعددة Polyphenols تعد من الصنف المتباين من المركبات مع تنوع في فعاليتها المضادة للأكسدة (7). الفلافونويدات ممكن أن تعمل كجذور حرة كائنة وتنتهي بتفاعلات السلسلة الجذرية والتي تحدث خلال أكسدة الدهون triglycerides (8). الفعاليات المضادة للأكسدة والمضادة للسرطان لمستخلصات النباتات الطبية والأعشاب لها علاقة بالمركبات الفينولية (9). تعد المنتجات الطبيعية ومنذ زمن طويل مصدر خصب لعلاج مرض السرطان، والذي أصبح من الأسباب الرئيسة للموت في هذا القرن. وعلى أية حال هنالك حاجة مستمرة لتطوير أدوية جديدة مضادة للسرطان (10) . تعرف الفلافونويدات تمتلك فعالية مضادة للسرطان. الفلافونويدات الطبيعية prenylflavonoids من النباتات التي أظهرت قابليتها التثبيطية على مرض سرطان الكبد hepatoma في الانسان، وسرطان خلايا ال epidermoid carcinoma خارج الجسم *in vitro* (10)، وقد صمم هذا البحث لمعرفة التأثير الوقائي للمستخلصات الخام لنبات المرير على خلايا سرطان الغدة اللبنية داخل الجسم في الفئران المختبرية.

المواد وطرائق العمل

إختبار ، ثم توضع الإنبوبة في حمام مائي مغلي لمدة (25-30) دقيقة ، بعد إخراجها من الحمام تضاف إليه قطرات قليلة من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم (0.5 عياري) ، سيظهر لون داكن في حال وجود الفلافونويدات (11).

2-3- الكشف عن الكلايكوسيدات Glycosides:

أجري هذا الكشف بإستعمال كاشف فهلنك Fehling reagent الذي تم تحضير جزئيه A و B على النحو الآتي:

- محلول (A) حُضر من إذابة 17.32 غم من كبريتات النحاس في 200 مل من الماء المقطر إذابة جيدة ، ثم أكمل المحلول بالماء المقطر حتى وصل حجمه إلى 250 مل .

1- طريقة تحضير مستخلصات نبات المرير:

تم تحضير المستخلصين الكحولي الايثيلي والمائي البارد من نبات المرير حسب طريقة (11) ، أما المستخلص المائي الحار فقد حضر حسب طريقة (12).

2- طرق فحص المركبات الفعالة في المستخلصات:

1-2- الكشف عن الدباغيات Tannins:

يُحضر المحلول المائي 1% من كلوريد الحديدك وتضاف كمية منه إلى كمية مساوية لها من المستخلص النباتي ، إن ظهور الراسب الأخضر المزرق دلالة على وجود الدباغيات (11).

2-2- الكشف عن الفلافونويدات Flavonoids:

يُجرى هذا الكشف بإضافة 4 مل من الكحول الايثيلي 95 % إلى 1 مل من المستخلص النباتي في إنبوبة

بالتركيز المستعمل عند كل فأرة اعتماداً على النتيجة النهائية للتجريب ، وحسب عدد الفأرات المستعمل في هذه التجربة يتم تثبيت آخر جرعة إستعملت.

3- الخلايا السرطانية:

1- طريقة غرس الخلايا السرطانية في الفئران:

تم الحصول على فأرة مصابة بسرطان الغدة اللبنية Mammary adenocarcinoma نوع (AM3) (16) من المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية ، فقد إستخلص الورم وغرس في إناث سليمة وبالغة من الفئران البيض ، كما هو موضح (Al-Shamery, 2003) ، تم مسك الحيوان الحامل للورم بشكل جيد ، وعُقمت كتلة الورم بكحول أثيلي (70 %) وتم إدخال محقنة قياس 18 في كتلة الورم ورُشفت الخلايا aspirated بمقدار (3-5) مل ثم نُقلت الخلايا بعدها إلى بيكر معقم وأضيف إليها 50 مل من دارئ الفوسفات (PBS) المعقم ، ومُزجت جيداً ثم نقل عالق الخلايا إلى أنابيب وُضعت في جهاز الطرد المركزي المبرّد بسرعة 1000 دورة/دقيقة ولمدة 10 دقائق بدرجة حرارة (18-20) °م ، وذلك للتخلص من الدم وحطام الأنسجة وأهمل الطافي وأعيد تعليق الراسب بحجم مساو له من PBS المعقم وتم حقن 0.25 مل من عالق الخلايا في كل فأرة بإستعمال محقنة قياس 18 ، وذلك بإدخالها من المنطقة الظهرية الفخذية وتحت الجلد وصولاً إلى المنطقة العنقية ، فقد حُفنت الخلايا مع ضغط خفيف على منطقة دخول المحقنة لمنع رجوع العالق الخلوي وخروجه من الفتحة عند سحب المحقنة ، وبعد حوالي 14 يوم من حقن الحيوانات بالعالق الخلوي ينمو الورم السرطاني تم قياس حجم الورم بإستعمال آلة قياس Vernia calipers .

ب- التجربة الوقائية ضد الخلايا السرطانية داخل الجسم:

تم إيجاد الجرعة المميتة الوسطية (LD50) حيث كانت الجرعة العلاجية للمستخلص الكحولي (500 ملغم/كغم) والمستخلص المائي البارد (800 ملغم/كغم) والمستخلص المائي الحار (600 ملغم/كغم) ، ثم قسمت أربعة مجاميع من الفئران كل مجموعة تحتوي على 10 إناث من الفئران المختبرية، كل مجموعة من الفئران حقنت بنوع واحد من المستخلصات الثلاث لمدة أسبوعين بالجرعة الوقائية تحت الجلد وبعدها تم غرس الخلايا السرطانية لهذه الحيوانات مع التوقف عن إعطاء المستخلصات وبعد 10 أيام من الغرس تم حقن الحيوانات مرة أخرى بالمستخلصات الثلاث وبنفس الجرعة لمدة أسبوع ، أما المجموعة الرابعة لم تعامل بأي مستخلص فقط غرست بالخلايا السرطانية، وبعد ذلك قُتل حيوانات التجربة لغرض اخذ المقاطع النسيجية.

- محلول (B) أُذيب 35 غم من هيدروكسيد الصوديوم مع 86.5 غم من ملح روشل في 100 مل من الماء المقطر ، ثم أكمل الحجم حتى 250 مل بالماء المقطر. مُزجت أحجام متساوية من هذا الكاشف مع المستخلص النباتي ، ثم وُضع المزيج في حمام مائي مغلي لمدة 10 دقائق ، إن ظهور الراسب الأحمر هو دلالة على وجود الكلايكوسيدات (13).

2-4- الكشف عن التربينات Terpenes: يتم إجراء الكشف بإضافة 1 مللتر من مادة antimon chloroform 20% إلى 5 مللتر من المستخلص النباتي، وعندما يظهر راسب أبيض يدل على وجود مادة التربينات (11).

2-5- الكشف عن القلويدات Alkaloids:

- كاشف ماير Mayer's reagent:

يُحضّر الكاشف من إستخدام المحلولين A و B على النحو الآتي :

محلول A حُضِر بإذابة 1.58 غم من كلوريد الزئبقيك HgCl₂ في 60 مل من الماء المقطر . محلول B تم تحضيره بإذابة 5 غم من يوديد البوتاسيوم KI في 10 مل من الماء المقطر . قبل الكشف مباشرة مُزج محلول A و B ثم أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر ، تم الكشف بمزج 1 مل من هذا الكاشف مع 5 مل من المستخلص النباتي في زجاجة ساعة ، إن ظهور الراسب الأبيض دلالة على وجود القلويدات (14).

2-6- الكشف عن الفينولات:

يتم بإضافة كميات متساوية من خليط (كلوريد الحديد المائي 1% aqueous ferric chloride مع 1% potassium iron cyanide) إلى المستخلصات الخام للنبات، وعند ظهور لون أزرق مخضر يدل على وجود الفينول (11).

2- تحديد الجرعة المميتة النصفية LD50 للمستخلصات في الفئران :

إعتمدت طريقة الصعود والنزول Up & down method التي ذكرها (15) لتحديد الجرعة المميتة النصفية للفئران البيضاء ، تمت تهيئة عدد من الفئران (40 فأرة) تراوحت أوزانها بين (20-25) غرام ، كما تمت تهيئة التراكيز المستعملة للمستخلصات التي أعطيت للفئران .

في هذه الطريقة تُحقن الفأرة بالمستخلص النباتي وتتؤخذ النتيجة النهائية لهذه المعاملة (وهي إما هلاك الفأرة أو بقاؤها على قيد الحياة) خلال 24 ساعة من التجريب ، فإذا بقيت الفأرة على قيد الحياة تتؤخذ فأرة أخرى وتُجرّع بتركيز أعلى ، أما إذا هلك الفأرة فيجب أخذ فأرة أخرى وتجرعها بتركيز أقل ، ثم تتابع حالة الفأرة الثانية وهكذا تستمر العملية صعوداً أو نزولاً

النتائج

البارد يحوي على التانين بينما المستخلص المائي الحار لا يحوي على التانين، ومن الجدول يتبين أن المستخلص الكحولي أكثر فعالية من المستخلصات المائي البارد والحار.

1- تحديد المركبات الفعالة لمستخلصات نبات المرير:
يشير جدول رقم (1) إلى وجود الكلايكوسيدات glycosides في المستخلصات الثلاث لنبات المرير، المستخلص الكحولي يحتوي على الفلافونويدات flavonoid والتانين tannins، المستخلص المائي

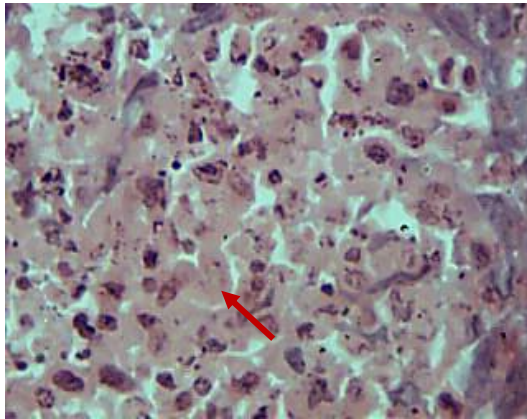
جدول (1): يوضح نتائج بعض المركبات الفعالة المحددة للمستخلصات الخام نبات المرير

المركبات الكيميائية	المستخلص الكحولي	المستخلص المائي البارد	المستخلص المائي الحار
التانين Tannins	+	+	-
الفلافونيدات Flavonoids	+	-	-
الكلايكوسيدات Glycosides	+	+	+
التربينات Terpenes	-	-	-
القلويات Alkaloids	-	-	-
الفينولات Phenols	-	-	-

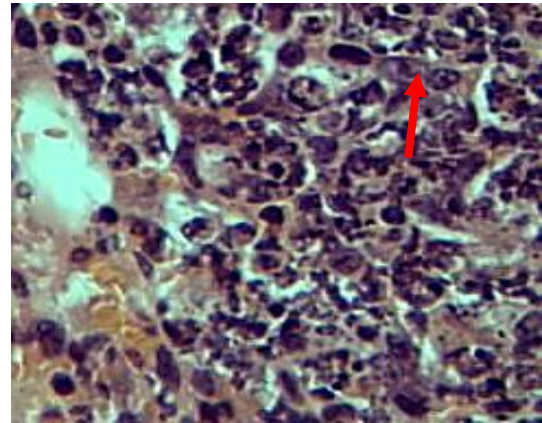
الأوعية الدموية في بقية الأعضاء بالنسبة للمجاميع المحقونة بمستخلصات نبات المرير، وخاصة المعاملة بالمستخلص الكحولي كما هو مبين في الشكل رقم (1، ب) وصورة رقم (2) مقارنة بمجموعة السيطرة (شكل رقم 1، أ) وصورة رقم (1).

نتائج تأثير المستخلصات الخام لنبات المرير على الخلايا السرطانية:

تشير النتائج بعد إجراء التقطيع النسيجي لمجاميع حيوانات السيطرة والمجاميع المحقونة بالمستخلصات الخام لنبات المرير، حيث لوحظ تنخر الورم السرطاني مع ارتشاح الخلايا اللمفية حول



ب



أ

شكل 1: التغيرات المرضية النسيجية للكتلة السرطانية في الشكل (أ) لمجموعة السيطرة، يلاحظ وجود خلايا غير متميزة ذات أنوية متعددة الأشكال تعاني من فرط الصبغة مع بعض الانقسامات الخيطية للنواة (mitotic figure) (ب) التغيرات المرضية النسيجية للكتلة السرطانية للمجموعة المعاملة بالمستخلص الكحولي يلاحظ وجود نخر في معظم الخلايا السرطانية (↑).



(2)



(1)

صورة (1) فأرة من مجموعة السيطرة (قبل العلاج) يظهر الورم بشكل كتلة كبيرة.
صورة (2) يظهر الورم في المجموعة المعالجة بالمستخلص الكحولي متتخر واصغر حجما.



ب



ا

صورة (3 ا،ب) حجم الورم في إحدى فئران المجموعة المعالجة بالمستخلص المائي البارد حيث يظهر الورم اصغر حجما مقارنة بمجموعة السيطرة.

المناقشة

الفلافونويدات مقارنة بالمستخلصين المائي الحار والبارد. وقد أوضحت الدراسات بان مستخلص نبات الميرير ممكن أن يستخدم كمصدر مقوي من مضادات الأكسدة الطبيعي (17) . الفعاليات المضادة للاكسدة لمستخلص نبات الميرير، تشمل فعاليات الجذور الحرة الكانسة والفعاليات الكانسة (17) . مضادات الأكسدة تؤخر أو تمنع تأكسد المواد (18) . إن تفسير تثبيط نمو الورم في الفئران بفعل مستخلصات نبات الميرير يتوافق مع ما جاءت به بعض الدراسات التي اقترحت آليات الفعالية المضادة للسرطان لبعض المركبات المعزولة من النباتات الطبية . تشتمل آليات تأثير مركبات الايض الثانوي على مضادات الاكسدة والتي تعمل على إزالة (كنس Scavenging) المواد المتكونة بوساطة الأنزيمات ، فضلا عن بعض الفيتامينات مثل فيتامين E و C (19)، ومن مضادات

استعمل في هذه البحث المستخلصات الخام لنبات الميرير وذلك لأنها دراسة أولية كان الهدف منها التحقق من امتلاك نبات الميرير فعالية مضادة للسرطان ، إذ تحتوي النباتات بأجزائها المختلفة على الكثير من المركبات والجزيئات الصغيرة Small molecules التي قد تعطي نتائج جيدة. وكما هو مبين في جدول رقم (1) يحتوي المستخلص الكحولي لنبات الميرير على اكبر كمية من المركبات الفينولية phenolic والفلافونويدات flavonoid. إن نجاح ظهور الورم السرطاني في الفئران يعود الى غرسها بنفس نوع الخلايا السرطانية التي ممكن ان تصاب بها والمعزولة من نفس النوع الذي يصيب الفئران . المستخلص الكحولي يمتلك فعالية أفضل ضد نمو الخلايا السرطانية للمعدة، وقد يعزى سبب امتلاكه التأثير الاقوى ضد الخلايا السرطانية الى احتوائه على

جراء تكون أوعية دموية جديدة (20) . وهذا ما يفسر وجود نخر في معظم الخلايا السرطانية في الشكل (1،ب)، بالإضافة الى نقص الحجم الورم في الصورة (3،ب).

الايض الثانوي مضادات الأوعية الدموية الجديدة Antiangiogenesis حيث تساعد مركبات الايض الثانوي على إبطال قابلية الخلايا الطلائية الداخلية من تفعيل آلية المقاومة المتعددة للعلاج Multi-Drug Resistance (MDR) التي تظهرها تلك الخلايا الورمية وأضعاف قابلية التسرطن من

References

1. Quereshi S. J. , Awan A. G. , Khan M. A. and Bano S. (2002). Taxonomic study of the genus *Sonchus* L. from Pakistan , Journal of Biological Science , 2 : 309 – 314.
2. Guil-Guerrero J.L.; Gimenez-Gimenez A.; Rodriguez-arcaia and Torija Isasa M.E.; (1998). Nutritional composition of *Sonchus* species (*S. asper* L, *S. oleraceus* L and *S. tenerrimus* L). Journal of the science of food and agriculture. vol. 76(4), pp. 628-632.
3. Cardoso Vilela F, Soncini R and Giusti-Paiva A. (2009). Anxiolytic-like effect of *Sonchus oleraceus* L. in mice. J. of Medici. Food, 124(2):325-7.
4. Shimizu S. , Miyase T. , Ueno A. and Usmanghani K. (1989). Sesquiterpene lactone glycosides and ionones derivative glycosides from *Sonchus asper* , Phytochemistry , 28 : 3399 - 3402.
5. Mansour R. M., Saleh N. A. and Boulos L. A. (1983) Chemotaxonomic study of the phenolics of *Sonchus* , Phytochemistry , 22 : 489 - 492.
6. Velioglu Y.S, Mazza G, Gao L. and Oomah B.D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. J. Agric Food Chem. 46:4113-4117.
7. Singh R.P, Murthy K.N.C and Jayaprakasha G.K. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using *in vitro* models. J. Agric Food Chem. 50:81-86.
8. Das N.P and Pereira T.A. (1990). Effects of flavonoids on thermal autoxidation of palm oil: structure- activity relationships. J. Am Oil Chem Soc. 67:255-258.
9. Cai Y, Luo Q, Sun M and Corke H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Sci. 74:2157-2184.
10. Mukherjee A. K, Basu S., Sarkar N. and Ghoshb A.C. (2001). Advances in Cancer Therapy with Plant Based Natural Products. Current Medicinal Chemistry 8, 1467-1486.
11. Harborne J B (1984). Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis. (2nd ed.). Chapman and Hall New York. Pp: 1-4.
12. Timberlake C and Henry B (1988). Anthocyanins as Natural Food Colorants, Plant Flavonoids in Botanical Medicine II: Biochemical Cellular and Medicinal properties. p. 107-121. Alan R. Liss.
13. Shihata, I.M. (1951). A pharmacological study of *Anagallis arvensis*. M.D. Thesis, Cairo University, Egypt.
14. Sousek, J. ; Guedon, D. ; Adam, T. ; Bochorakova, H. ; Taborska, E. ; Valka, I. and Simanek, V. (1999). Alkaloids and organic acid content of eight *Fumaria* species. *Phytochemical Analysis*, 10:6-11. Cited in : Sa'eed, O.F. (2004). The effect of green and black tea extracts on different cell lines *in vitro*. M.Sc. Thesis, College of

- Pharmacy, University of Mosul, Mosul, Iraq .
15. Dixon W J (1980). Efficient analysis of experimental observations. *Ann Res Pharmacol Toxicol* 20: 441-462.
 16. Al-Shamery, A. M. H. (2003). The study of Newcastle disease virus effect in the treatment of transplanted tumor in mice. M.Sc. Thesis. College of veterinary medicine, University of Baghdad, Iraq.
 17. Yin, J.; Kwon, G.J. and Wang, M.H. (2007). The antioxidant and cytotoxic activities of *Sonchus oleraceus* L. extracts. *Nutrition Research and Practice*. 1: 189-194.
 18. Halliwell B (1995). Antioxidant characterization: methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol* 49:1341-1348.
 19. Roomi, M.W. ; Ivanov, V. ; Kalinovsky, T. ; Niedzwiecki, A. Rath, M. (2005). *In vitro* and *in vivo* antitumorigenic activity of a mixture of lysine, proline, ascorbic acid, and green tea extract on human breast cancer lines MDA-MB-231 and MCF-7. *Med. Oncol.*, 22: 129-38.
 20. Tosetti, F.; Ferrari, N.; Deflora, S. and Albini, A. (2002). Antioprevention: Angiogenesis is a common and key target for cancer chemopreventive agents. *FASEB*, 16:2-14.

Abstract

This study was designed to evaluate the prophylactic and pathological effect of the ethanolic (EE), cold aqueous (CAE), and hot aqueous (HAE) extracts of the *Sonchus oleraceus* on cancer cells growth of mammary adenocarcinoma as *in vivo*. The *in vivo* study was performed to evaluate the effect of the three types of the extracts. The LD₅₀ was (5 g/kg, 6 g/kg and 8 g/kg) for ethanolic, hot aqueous and cold aqueous extracts respectively. The mice groups were given doses of the three extracts at period of two weeks, and were treated for two weeks after that the groups of mice were transplanted with the cancer cells. The histopathological study revealed pathological changes in tumor mass, and noticed necrosis in most of the cancer cells in the group that treated with ethanolic extract. The histopathological results showed that the extracts of *Sonchus oleraceus* were induced necrosis in the cancer cells and also caused few necrotic changes in the normal tissue in the *in vivo* study