دراسة التأثيرات السمية لنواتج تفاعل ميلارد لمحلول الشرش في خطوط الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي

لمى عبد الهادي زوين* عامرة محمد البلداوي**
عبد المجيد حماد السامرائي** ناهي يوسف ياسين***

الملخص

استخدم الشرش المجفد بعد اذابته في الماء المقطر للحصول على محلول بتركيز 1%، ثم ضبط أسه الهيدروجيني على 11 وبعد تعريض المحلول لدرجة حرارة الغليان لمدة 1، 3 و5 ساعات للحصول على نواتج تفاعل ميلارد. تمت دراسة التأثير السمي للنواتج في خطوط الخلايا السرطانية (خلايا سرطان الحنجرة البشري Human Larynx Epidermoid Carcinoma- Hep2 وخلايا سرطان الغدة اللبنية الفأري خط خلايا Ahmed-Mohammod-Nahi (AMN-3). عوملت الخلايا السرطانية بأربعة تراكيز من محلول الشرش 0.625، 1.25، 2.5 و5 ملغم/مل وبثلاث مدد من التعريض بلغت 24، 48 و72 ساعة. بينت نتائج الدراسة ان تركيز 5 ملغم/مل ومدة تعريض 72 ساعة اعطى اعلى نسبة تثبيط في الخط الخلوي السرطاني AMN-3 لتبلغ 86.1، 85.1 و 84.8% للاوقات 1، 3 و5 ساعات على التوالي، في حين بلغت نسبة التثبيط في الخط الخلوي السرطاني Hep-2 التركيز نفسه ومدة التعريض نفسها لتبلغ 86.09، 57.5 و 68.09% للاوقات الثلاثة على التوالي لذا فان الخط الخلوي السرطاني AMN-3 اكثر حساسية من الخط الخلوي السرطاني Hep-2.

المقدمة

تحدث تفاعلات ميلارد (تفاعلات اسمرار غير انزيمية) بشكل خاص في الاغذية في اثناء طبخها او تصنيعها او خزنها نتيجة لعملية تكثيف بين مجموعة الامين للحامض الاميني او البروتينات ومجموعة الكاربونيل للسكريات المختزلة مكونة قاعدة شف (Shiff's base) بعدها تحدث عمليات بلمرة وتكوين مركبات حلقية نتروجينية ومركبات ثنائية الكاربونيل واخيراً تكون مركبات معقدة تدعى بالميلانويدينات (5، 8) ونتيجة لتكون الكم الهائل من المركبات خلال هذه التفاعلات قامت العديد من الدراسات بالبحث في الجوانب الايجابية لهذه المركبات اذ لوحظ ان لها القدرة على تثبيط عدد من الخلايا السرطانية (7، 10) خاصة وان الاورام السرطانية هي واحدة من اخطر الامراض التي تواجه حياة الانسان، فهي تحتل المرتبة الثانية من بين مسببات الموت في العالم الشائعة والخطيرة وقد ازدادت نسبة الاصابة في السنوات الاخيرة بأورام السرطان بشكل ملحوظ ولاسيما سرطان الغدة اللبنيةmammary Adenocarcinoma وسرطانات اخرى مثل الكبد والقولون مما ادى الى وفاة اعداد كبيرة منهم. لذا اهتم بمرض السرطان من عدة نواحي لاسيما الجوانب العلاجية والوقائية، اذ استعملت عدة طرائق علاجية منها العلاج الكيميائي والذي يسبب الكثير من الاثار الصحية السيئة والمشاكل البدنية التي تكون سبباً في وفاة الشخص المصاب (8) لذا اتجهت الابحاث الى ايجاد بدائل اخرى او استعمال اساليب اخرى منها العلاجات الحيوية مثل العلاج الجيني (13) والعلاج المناعي (16) والعلاج بالنواتج الطبيعية مثل استخدام المستخلصات النباتية (5) ونواتج تفاعل ميلارد (7، 11).

جزء من اطروحة الدكتوراه للباحث الاول.

* كلية التربية (ابن الهيثم)– جامعة بغداد– بغداد، العراق.

**كلية الزراعة– جامعة بغداد– بغداد، العراق.

***المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية، الجامعة المستنصرية– بغداد، العراق.

لذا هدفت الدراسة الحالية الى بيان تأثير نواتج تفاعل ميلارد من محلول الشرش المجفد في تثبيط بعض الخلايا السرطانية.

المواد وطرائق البحث

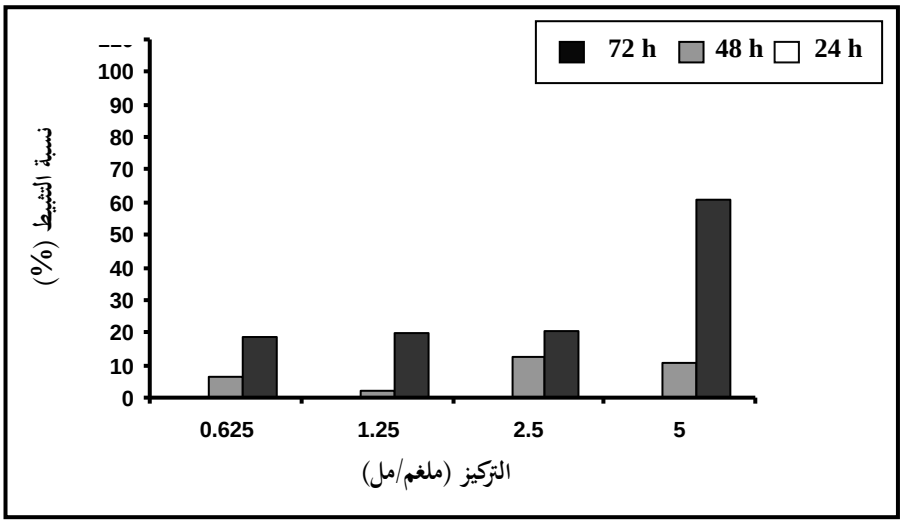
اتبعت الطريقة المتبعة في المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية (14). اذ فرغت قناني الزرع النسيجي الحاوي على الخلايا السرطانية Hep-2 وAMN-3 المجهزة من المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبيعية من وسط RPMI-1640 وغسلت بمحلول دارئ الفوسفات، حضر بأذابة 6 غم NaCl، 0.2 غم KCl، 0.9 غم Na_2HPO_4 و 0.2 غم KH_2PO_4 في لتر ماء مقطر وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121م ولمدة 15 دقيقة). ثم اضيف 2 مل من محلول تربسين – فرسين، حضر بمزج 20 مل من 2% تربسين، 10 مل من 1% EDTA و 370 مل محلول دارئ الفوسفات وعقم باستخدام مرشح بكتريولوجي ذي مسامات بقطر 0.22 مايكرون) ثم وضعت في حاضنة بدرجة حرارة 37 م لمدة 3 دقائق. واضيف الى القناني 15 مل من وسط RPMI-1640 الخالي من السيروم ثم نقل 200 مايكرولتر من قنينة الزرع الى حفر الطبق Microlitter plate 96 well وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37م لمدة 18– 24 ساعة ثم فرغت واضيف لها 200 مايكرولتر من وسط RPMI-1640 الذي يحتوي على تركيز 0 ، 0.625 ، 1.25، 2.5 و5 ملغم/مل من محلول الشرش (حضر باذابة 1 غم من الشرش المجفد في 100 مل ماء مقطر بعد ضبط الاس الهيدروجيني الى 11 وعومل بالغليان لمدة 1، 3 و 5 ساعات وعدل الاس الهيدروجيني ثانية الى 7. ثم عقم باستخدام مرشح ذي مسامات بقطر 0.22 مايكرون). ثم وضعت في حاضنة بدرجة حرارة 37م لمدة 24، 48 و72 ساعة. ثم فرغت الاطباق بعد انتهاء مدة الحضن من الوسط. واضيف لها 50 مايكرولتر من صبغة Crystal violat. وغسلت الخلايا وحسبت النتائج باستعمال جهاز الاليزا على موجة طولها 492 نانومتر. فحسبت نسبة التثبيط حسب الصيغة الآتية:

$$\text{نسبة التثبيط (\%)} = \frac{\text{قراءة امتصاصية لخلايا السيطرة} - \text{قراءة امتصاصية لخلايا المعاملة}}{\text{قراءة امتصاصية لخلايا السيطرة}} \times 100$$

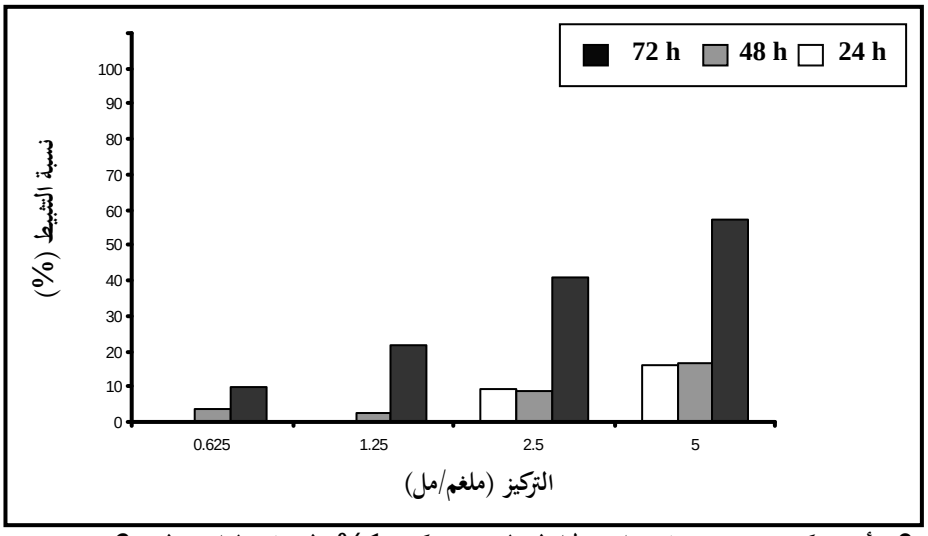
النتائج والمناقشة

دراسة التأثير السمي لنواتج تفاعل ميلارد لمحلول الشرش في خلايا سرطان الحنجرة البشري خط خلايا Hep-2

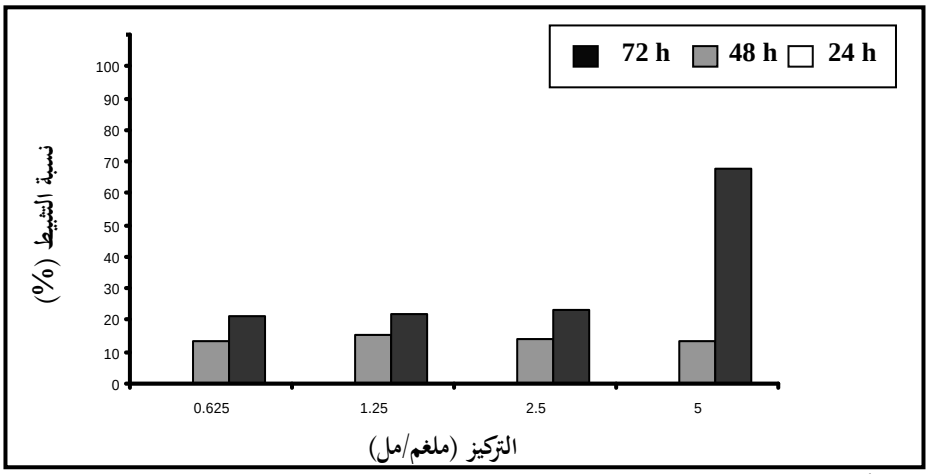
وجد عند استعمال نواتج تفاعل ميلارد لمحلول الشرش المعامل بالغليان عند أس هيدروجين 11 (شكل 1، 2 و3) ان تركيز 5 ملغم/مل وحضن الخلايا لمدة 72 ساعة اعطى اعلى نسبة تثبيط اذ بلغت 60.9، 57.5 و68.09 % للأوقات الثلاثة على التوالي. اما التراكيز الاخرى فكان تأثيرها التثبيطي منخفضاً. اذ تمكنت نسبة كبيرة من الخلايا من مقاومة التأثير السمي لنواتج تفاعل ميلارد حتى وصلت نسبة التثبيط صفراً او قريباً منه عند بعض التراكيز المنخفضة ومدة تعريض 24 ساعة.



شكل 1: تأثير تراكيز نواتج تفاعل ميلارد لمحلول الشرش بتركيز 1% المعامل بالغليان لمدة 1 ساعة اس هيدروجيني 11 في الخلايا السرطانية Hep-2 خلال 24، 48 و72 ساعة من التعرض.



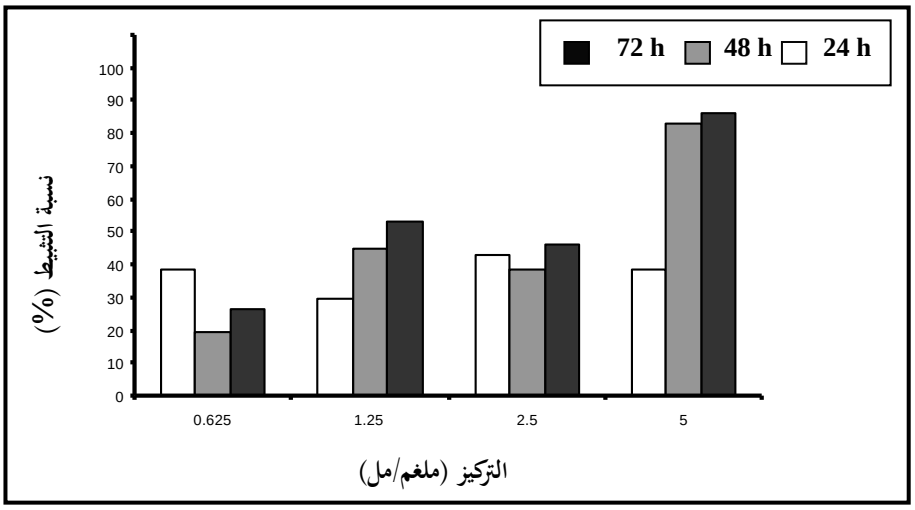
شكل 2: تأثير تراكيز نواتج تفاعل ميلارد لمحلول الشرش بتركيز 1% المعامل بالغليان لمدة 3 ساعات اس هيدروجيني 11 في الخلايا السرطانية Hep-2 خلال 24، 48 و72 ساعة من التعرض.



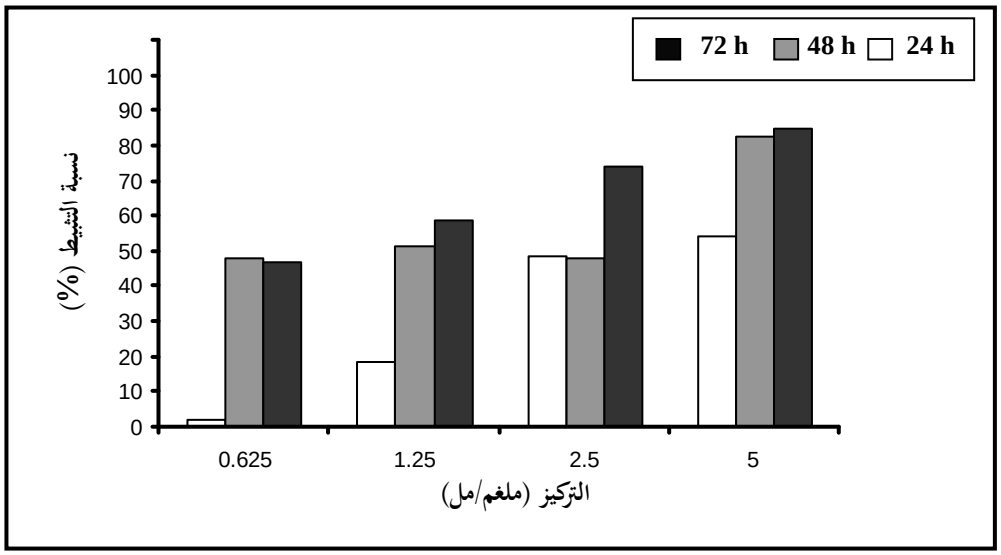
شكل 3: تأثير تراكيز نواتج تفاعل ميلارد لمحلول الشرش بتركيز 1% المعامل بالغليان لمدة 5 ساعات اس هيدروجيني 11 في الخلايا السرطانية Hep-2 خلال 24 ، 48 و72 ساعة من التعرض.

التأثير السمي لنواتج تفاعل ميلارد لمحلول الشرش في خلايا سرطان الغدة اللبنية الفأري خط خلايا AMN-3

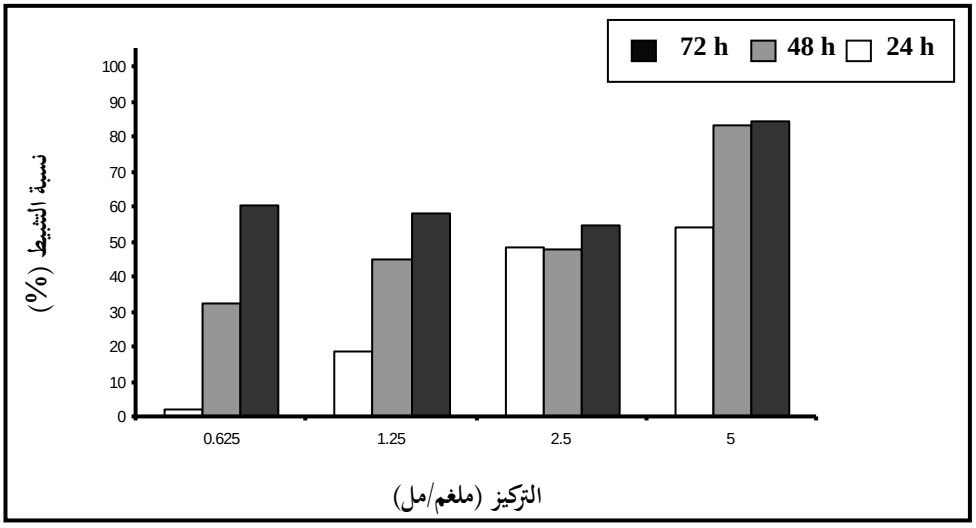
اوضحت الاشكال (4، 5 و6) ان نسبة التأثير التثبيطي لنواتج تفاعلات ميلارد المحضرة من محلول الشرش المعامل بالغليان عند أس هيدروجيني 11 بلغ 86.5، 85.1 و 84.8% للأوقات الثلاثة على التوالي عند تركيز 5 ملغم/مل ومدة تعريض 72 ساعة. في حين لوحظ ان تركيز 0.625 و1.25 ملغم/مل ومدة تعريض 24 ساعة لم تظهر فعالية تثبيطية مقارنة بمدة التعريض 48 ساعة، فضلاً عن عدم ملاحظة ازدياد نسبة التثبيط بازدياد مدة الغليان لمحلول الشرش عند المقارنة بين محلولي الشرش المعامل بالغليان لمدة 3 و 5 ساعات عند التراكيز ومدة التعريض ونفسها، اما تركيز 2.5 ملغم/مل فقد كان قاتلاً لنصف عدد الخلايا السرطانية CC_{50}.



شكل 4: تأثير تراكيز نواتج تفاعل ميلارد لمحلول الشرش بتركيز 1% المعامل بالغليان لمدة ساعة واحدة اس هيدروجيني 11 في الخلايا السرطانية AMN-3 خلال 24، 48 و72 ساعة من التعرض.



شكل 5: تأثير تراكيز نواتج تفاعل ميلارد لمحلول الشرش بتركيز 1% المعامل بالغليان لمدة 3 ساعات اس هيدروجيني 11 في الخلايا السرطانية AMN-3 خلال 24، 48 و72 ساعة من التعرض.



شكل 6: تأثير تراكيز نواتج تفاعل ميلارد لمحلول الشرش بتركيز 1% المعامل بالغليان لمدة 5 ساعات اس هيدروجيني 11 في الخلايا السرطانية AMN-3 خلال 24، 48 و72 ساعة من التعرض.

ومن خلال هذه النتائج يمكن الاستنتاج ان الخلايا السرطانية كانت ذات حساسية حيال تلك المواد، وهذا ما اشار اليه العديد من الباحثين في أن لنواتج تفاعل ميلارد تاثيراً واضحاً في العديد من الخلايا السرطانية، ومنها خط خلايا LXFL529L (سرطان الرئة Lung Carcinoma) وخط خلايا GXF251L (سرطان الامعاء Gastric Carcinoma) وخط خلايا CXF97 (سرطان القولون والشرج Colorectal (11).

كما لوحظ ان التركيز العالي (5 ملغم/مل) ومدة تعريض 72 ساعة كانت اكثر المعاملات سمية لخط خلايا Hep-2 و AMN-3 وهذا ما اشار اليه Marko وجماعته (11) من ان فعالية نواتج تفاعل ميلارد تختلف بأختلاف نوعها وتركيزها، فقد اشارا الى ان مركب 3-hydroxy-(2-furyl)methyl-3-cyclopentene المنقى من محلول الزايلوز والالنين المعامل بالغليان لمدة 10 دقائق، اعطى اعلى نسبة تثبيط عند استخدامه بتركيز 50 مايكرومولار في حين لم يمتلك مركب 1,2,3-trihydroxy-pyrrolidinium-2-4-dihydroxy-2,5-dimethyl-1-carboxymethy-pyrrole المنقى من المحلول ذاته أية فعالية تثبيطية عند تركيز 100 مايكرومولار. اما مركب 2-methoxy-(2-furyl)-methyl pyrano فقد اظهر فعالية تثبيطية تجاه سرطان الرئة وسرطان المعدة، وبشكل اقل تأثيراً في سرطان القولون وسرطان الشرج، في حين امتلك مركب 4-hydroxy-5-methyl-furan فعالية تثبيط هذا السرطان وسرطان المعدة، في حين لم يلاحظ Faist وجماعته (4) حدوث تثبيط في الخط الخلوي Caco-2 (سرطان القولون Colon adenocarcinoma) عند حضنه مع نواتج تفاعل ميلارد لمدة 48 ساعة عند مقارنتها مع السيطرة، وقد اظهرت تلك النواتج فعالية عند مدة تعريض 72 ساعة.

وقد فسرت آلية عمل نواتج تفاعل ميلارد تجاه الخلايا السرطانية بتأثيرها في الدورة الخلوية للخلايا السرطانية فتسبب تثبيط انقسامها، اذ لاتستطيع الوصول الى الاطوار M, G_2, S وتتجمع بطور G_1 (10) كما في حالة مركبات furanone وpyranopyranose فضلاً عن امتلاكهما فعالية التأثير في DNA وتكسيره الى قطع مما يسبب موت الخلايا السرطانية من خلال الموت الخلوي المبرمج (6، 9).

واشار Marko وجماعته (10) الى تداخل نواتج تفاعل ميلارد مع بلمرة بروتين التيوبيولين، المكون لخيوط المغزل مسبباً فقدان استقرارية النبيبات الدقيقة (2، 15) ، او لفعالية نواتج محلول الشرش كمضاد للاكسدة (Antioxidant) الذي قد تؤثر بشكل مباشر وشديد في نمو الخلايا السرطانية من خلال كنس الجذور الحرة (Free

radical Scavenging)، اذ اشار Chevalier وجماعته (3) الى امتلاك محلول بيتالاكتاالبومين والسكر فعالية في تثبيط 60% من خلايا خط Cos-7 (Kidney fibroblast) وخط خلايا HL-60 (Human promyeloblast)، وفعالية تثبيط اكسدة الدهون، في حين لم تلاحظ تلك الفعاليات للمحلول المكون من المصل البقري (Bovine Serum) والسكر.

لقد اوضحت النتائج وجود تباين واضح في التأثير السمي لنواتج تفاعلات ميلارد المحضرة من محلول الشرش في الخطوط السرطانية. فقد اظهر الخط الخلوي السرطاني AMN-3 حساسية تجاه نواتج تفاعل ميلارد اكثر من الخط الخلوي السرطاني Hep-2. وهذا يدل على امتلاك النواتج او بعض منها فعالية مؤثرة ضد هذا النوع من الخلايا دون الاخرى. وقد اشار الحلي (1) الى ان الخط الخلوي السرطاني Hep-2 هو اقل الخطوط الخلوية السرطانية حساسية، ويعود السبب الى التعبير المفرط (Over expressing) لبعض الجينات المسؤولة عن مقاومة المركبات والمواد الغريبة التي تدخل الى داخل الخلية السرطانية او ترتبط بها، ومن ثم تمنع من تأثير تلك المركبات في الخلايا السرطانية، وتسمى هذه الخاصية بالمقاومة المتعددة للادوية (Multi Drug Resistance) ومن اهم تلك الجينات هو جين *mdr-1*، وهو الذي يسيطر على تعبير جين *P-gp* المسؤول عن اظهار المقاومة. او ربما تعود المقاومة الى اختلاف طبيعة المستقبلات receptors الموجودة في الاغشية الخلوية للخلايا السرطانية التي تختلف تبعاً لاختلاف الخلايا السرطانية ومنشَئها (12).

المصادر

1- الحلي، زيد عبد المنعم علي (2004). تأثير المستخلصات الخام لعشب السعد. *Cyperus rotundusl* في نمو الخطوط الخلوية السرطانية. رسالة ماجستير–كلية العلوم – جامعة بغداد، 88–98.

2- Becker, W. M.; L. J. Kleinsmith and J. Hardin (2003). The World of Cell (5th ed). Benjamin Cummings Publishing Company Inc. New York. USA.

3- Chevalier, F.; J. M. Chobert; G. Genot and T. Haerle (2001). Scavenging of free radicals, antimicrobial and cytotoxic activies of the maillard reaction products of B-lactoglobulin glycated with several sugars. J. Agric. Food Chem., 49: 5031-5038.

4- Faist, V.; M. Lindenmeier; C. Geisler; H. F. Erbersdobler and T. Hofmann (2001). Influence of molecular weight fraction isolated from roasted malt on the enzyme activities of NADPH- cytochrome- c-reductase and glutathione –S– transferase in Caco-2 cells, J. Agric. Food Chem., 50(3): 602-606.

5- Fiquero - Hernandez, J. L.; G. Sandoval- Gonzalez; V. J. Ascencio; J. L. Figueroa - Espitia and G. Fernandez- Saavedra (2006). Plant products with anticancer properties employed in the treatment of bowel cancer. Proc West Pharmacol Soc., 48: 77-83.

6- Hiramoto, K.; R. Aso-O; H. Ni–Iyama; S. Hikage; T. Kato and K. Kikugawa (1996). DNA strand break by 2, 5-dimethyl 4-hydroxy-3(2H)-furanone a frayrant compound in various Food. Stuffs. Mutat. Res., 359: 17-24.

7- Ing, H. and D. D. Kitts (2004). Redox-Velated cytotoxic responses to different casein glycation products in Caco-2 and Int-407 cells. J. Agric. Food Chem., 52(1): 3577-3582.

8- Kirn, D. H. (2000). Replication- selective microbiological agents: Fighting cancer with tarageted germ warfare. J. Cline. Inresl., 105: 837-839.

9- Li, X.; K. Hivamoto; M. Yoshida; T. Kato and K. Kikugawa (1998). Identification of 2, 5-dimethy 1-4-hydroxy-3-furanone (DMHF) and 4-hydroxy- 2-ethyl- 5-methyl- 3-(2H)-furanone (HEMF) with DNA breaking activity in soy sauce. Food Chem. Toxicol., 36: 305-314.

10- Marko, D.; M. Kemeny; E. Bernady; M. Habermeyer; U. Weyand; S. Meiers; O. Frank and T. Hofmann (2002). Studies on the inhibition of tumor cell growth and microtubule assembly by 3-hydroxy-4(E)-2-Furyl methylidene] Methyl-3-cyclopentene 1-2-dione, an intensively coloured maillard reaction product. Food Chem. Toxicol., 40: 9-18.
11- Marko, D.; M. Habermeyer; M. Kemeny; U. Weyand; E. Niederberger; O. Frank and T. Hofmann (2003). Maillard reaction products modulating the growth of human tumor cells in vitro. Chem. Res. Toxicol., 16(1): 48-51.
12- Moteki, H.; H. Hibasmai; X. Yamada; H. Katsuzaki; K. Lmai and T. Komiya (2002). Specific induction 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.
13- Norris, J. S.; A. Bielawska; T. Day; A. El- Zawahri; Elojeimys; C. Landon; S. Lowe; Ty. Dong; J. Mckillop; K. Norris; L. Obeid; S. Rubinchik; M. Tarassoli; S. Tomlinson; C. Voelkel- Johnson and X. Liu (2006). Combined therapeutic use of AdGFPfasl and small molecule inhibitors of ceramide metabolism in prostate and head and neck canceria status report. Cancer Gene Ther., 9 [Abstract].
14- Rooney, D. E. and B. H. Czepulkowski (1992). Human Cytogenetics. A practical approach. Oxford, New York, Tokyo.
15- Taylor, L. (2000). Plant Based Drugs and Medicines. Lancet, 40 (3):1257-1259.
16- Zhong, R.; L. Rassenti; T. Kipps; J. Chen; Law P. and J. Yu (2002). Sequential modulation growth factors: a novel stvategy for adoptive immunotherapy of acute myeloid leukemia. Biology of Blood and Marrow Transpiantion, 8: 557-568.

THE CYTOTOXIC EFFECT OF MAILLARD REACTION PRODUCTS FOR WHEY ON THE CANCER CELL LINES *In vitro*

L. A. Zwain* **A. M. Al-Baldawy****
A. H. Al-Samarraie** **N. Y. Yaseen*****

ABSTRACT

A lyopholized whey solution at 1% concentration and pH 11 was subjected to boiling for 1, 3, 5 hours to obtain maillard reaction products. The cytotoxic effect of whey products was tested on cell line (Human Larynx Epidermoid carcinoma Hep-2 and Mouse Mammary Adenocarcinoma Ahmed Mohammd Nahi 2003 AMN-3). Four concentrations (0.625, 1.25, 2.5, 5) mg/ml for 24, 48, 72 hours were used.

The result showed that the highest inhibition on cancer cell line AMN-3 was appeared with 5 mg/ml concentration, 72 hour exposure time being, 86.1, 85.1, 84.8 % for 1, 3, 5 hour respectively . The inhibition percent on cancer line Hep-2 was 68.069, 57.5, 60.9% respectively, when the same concentration and exposure period were used. The cell line AMN-3 was more sensitive than Hep-2.

Part of Ph D. Thesis of the first author.

*** College of Education, Ibn Al-Haithem, Baghdad Univ., Baghdad, Iraq.**
**** College of Agric., Baghdad Univ., Baghdad, Iraq.**
*****Iraqi Cent. for Cancer and Med. Genetic Res., Al-Mustansiriyah Univ., Baghdad, Iraq.**