دراسة تأثير مستخلص الهيل *Elettaria Cardamomum* بمذيب الكحول الأثيلي على خطوط الخلايا السرطانية Hep-2 في الزجاج

ناهي يوسف ياسين*, كفاح جبار شاكر اليعقوبي, منار حامد جبر السلطاني ****

* المركز العراقي لأبحاث السرطان والوراثة الطبية / بغداد
** كلية الطب/ جامعة الكوفة

الخلاصة

تم استخلاص المكونات النباتية الفعالة لثمارنبات الهيل *Elettaria Cardamomum* بعدد من المذيبات العضوية، ودراسة تأثير تلك المستخلصات في خطوط الخلايا السرطانية نوع HEp-2-.
استخلصت من ثمار نبات الهيل مجموعة من المستخلصات استعمل منها مذيب الكحول الأثيلي المطلق 95 %، بلغت نسبة الاستخلاص 10 % للمستخلص.
تم الكشف عن المركبات الفعالة لمستخلص الكحول الأثيلي، عن طريق استعمال الكواشف التمهيدية. و اظهر مستخلص الكحول الأثيلي كفاءة عالية في نسبة وجود المركبات الفعالة مثل القلويدات و الفينولات.
قدرت الجرعة الوسطية المميتة (LD-50)، ودرست على ذكور الفئران المختبرية البيض، و كانت النتيجة 5.07 غم / كغم من وزن الجسم و 37. 5 غم / كغم من وزن الجسم.
و تم تنمية خطوط الخلايا السرطانية نوع HEp-2- و إكثارها بطريقة الزراعة النسيجية في ظروف مختبرية معقمة.
درست الفعالية المثبطة لنمو الخلايا السرطانية لسرطان الحنجرة البشري HEp-2 بعد معاملتها بثلاثة مدة 24 ساعة لمستخلص الكحول الاثيلي بتخافيف عشرية ابتداءً بتركيز 0.001 ملغم / مل و انتهاءً بتركيز 100 ملغم/ مل و تم قراءة الكثافة الضوئية لخطوط الخلايا السرطانية المصبوغة بالصبغة الحمراء المتعادلة بطول موجي 492 nm بوصفه مقياساً لنمو الخلايا الحية. كانت النتيجة تثبيطا عالي المعنوية بمستوى 0.05 لمستخلص الكحول الأثيلي و للتراكيز 100,10,1 ملغم لكل مل و 100,10 ملغم لكل مل على التوالي، مقارنة بالسيطرة ويزداد بزيادة مدة الحضن. استعملت بعض التراكيز المحضرة بطريقة التخافيف الثنائية لمعرفة أدنى تركيز يمكنه تثبيط نمو الخلايا السرطانية و هي (1,0.5, 0.25, 0.12) ملغم / مل و كان أدنى تركيز يمكنه تثبيط نمو الخلايا السرطانية هو (0.5) ملغم/ مل لـ مستخلص الكحول الأثيلي. اختبر المستخلص عند الخزن بدرجة- 20 مْ لمدة ثلاثة اشهر و قد اتصف بالثبوتية stability.

المقدمـــــة

كان و مازال مرض السرطان يشكل النسبة الكبيرة للأمراض الشائعة و لاسيما النصف الأخير من القرن العشرين و ذلك بسبب الظروف البيئية المتقلبة و كثرة تعرض الناس إلى مختلف أنواع المطفرات. لذلك أصبح اهتمام الباحثين بذلك المرض و إيجاد العلاج له مرحلة مهمة في الأبحاث الحالية، وذلك من خلال دراسة كثير من أنواع السرطان وتشخيصه ومهمة الوصول إلى كيفية علاجه.

وفي هذا السياق أكدت الدراسة الحقلية لاكتشاف الفوائد الطبيعية للنباتات في أماكن بعيدة من العالم معروفة بإدخال وسائل القياس و التقييم المتقدمة القادرة على تحديد إمكانيات النباتات على إحداث آثار إحيائية قد يسرت الكشف عن الجزيئات الفعالة إحيائيا لما تصنعه النباتات الطبية و بعض هذه الجزيئات, واعدةً بان تكون علاجات محتملة لمجموعة من الأمراض تشمل السرطان.

واليوم اتجه التفكير العلمي لعلاج الكثير من الأمراض المختلفة باستعمال الدواء الشعبي واعتمد بالأساس على العقارات ذات الأصل النباتي.إن إتباع هذا الأسلوب يؤدي إلى التقليل من المضار الجانبية التي تؤدي إلى نجاح العقار المستعمل للعلاج والكلفة الاقتصادية للاستخلاص. و بالنظر لتلك المقدمات جاء اختيار المملكة النباتية عموماً واختيار بذور ثمار الهيل خاصة للدراسة الحالية ,لوجود إشارات في المراجع العلمية بوصفه مضادا للسمية الوراثية، و الانزيمية، و التطفيرية **(Elkady, *et al*, 1993; Banerjee, *et al*, 1994; Abraham, *et al*, 1998)**

وانتخب مستخلص بذور ثمار الهيل للدراسة الحالية وتأثيره في نمو الخلايا السرطانية في الزجاج لعله سيكون ذا فائدة في علاج السرطان.

المواد وطرائق العمل

الإستخلاص

تم تامين بذور ثمار الهيل من الأسواق المحلية المسماة تجاريا بـ FIG وكانت الثمار متوسطة الحجم وذات شكل بيضوي و تم تصنيفها. حُضِّر من بذور ثمار الهيل مستخلص هو: مستخلص الايثانول 95 %.

تحضير المستخلص: لتحضير مستخلص الايثانول اتبعت طريقة **(Ladd, *et al.*, 1978 والربيعي 1999)** إذ تم وزن 20 غم من مسحوق بذور ثمار الهيل, ثم وضعت في داخل ورق ترشيح وبعد ذلك نقلت إلى جهاز السكسوليت soxhelate وزيد 200 مل من كحول الايثانول المطلق 95 %, وشغل الجهاز 24 ساعة. يؤخذ بعد ذلك الراشح ويركز باستعمال المبخر الدوار للحصول على المستخلص الكحولي المجفف, يوضع المتبقي في حاضنة في درجة 45-55 مْ للتخلص من بقايا المذيب و يحفظ في درجة4 مْ إلى حين الاستعمال **(Rojanapo&Tepsuwan,1993)**. تكرر العملية للحصول على الكميات المطلوبة من المستخلص.

تحضير المستخلص لإجراء التجارب: يتم إذابة الوزن الجاف من المستخلص المراد تحضير التركيزات المطلوبة منه لإجراء المعاملات، ويذوب مقدار 1 غم من المادة الجافة بـ 10 مل من Dimethyl (DMSO) Sulphoxid **(Rojanapo & Tepsuwan, 1995)** ، و يفلتر بـ 0.2 ملي مايكرون لغرض التعقيم. يفضل أن تجرى هذه العملية آنيا لغرض المعاملة، و لغرض إجراء أية معاملة دوائية يجب معرفة مدى استقرارية (Stability) المادة العلاجية وبعد ذلك يتم اختبار كفاءتها **(Bruning, *et al.*, 1989)**.

الكشف الكيميائي التمهيدي العمومي عن المركبات الفعالة في المستخلصات النباتية و تشمل:

- **كاشف ماير Mayer's reagent (كما في Sousek, *et al1999*)**
- **كاشف دراكندروف Dragendroff's reagent (كما في Antherden, 1969)** .
- **محلول كلوريد الحديديك FeCl2 (كما في Harborne, 1984)** .
- **محلول خلات الرصاص كما في (Evans, 1997).**
- **محلول كلوريد الزئبقيك HgCl2 كما في (المختار، 1994).**

طرائق الكشف الكيميائي العمومي: تستعمل الكواشف الاستدلالية والترسيبية لتحديد نوعية المركبات الثانوية في المستخلصات المائية والكحولية. و لغرض تحديد نوعية المركبات الثانوية الموجودة في أجزاء النبات المختلفة تمت معاملة مستخلص الايثانول بمجموعة من الكواشف آلاتية:

1- كواشف الفينولات.
a- كاشف كلوريد الحديديك كما في (Harborne, 1984).
b- كاشف خلات الرصاص (المختار, 1994).
c- كاشف هيدروكسيد البوتاسيوم (Harborne, 1984).

2- كواشف التربينات.
a- كاشف الرغوة (Harborne, 1984).
b- كاشف كلوريد الزئبقيك (Shihata, 1951).

3- كواشف القلويدات.
a- كاشف دراكندروف Dragendroff's reagent (المنصور, 1995) (Antherden, 1969).
b- كاشف ماير Mayer's reagent (Harborne, 1984).

خطوط الخلايا السرطانية Tumor cell lines:

خط خلايا HEP-2

تسلم هذا الخط عند التمرير رقم 200 , اصل و توصيف الخط مذكور في **(Moore, *et al.*, 1955)** و هو سرطان حنجرة لرجل يبلغ من العمر 57 سنة، تم استئصال الورم من منطقة الحنجرة، و غرس في حيوانات مختبرية مخفضة مناعيا بالكورتيزونات, وبعد نمو الورم في الجرذان rat، عُمل الزرع الأولي له إلى أن تكونت الطبقة الأحادية الكاملة Confluent monolayer، يتم بعدها معاملة الخلايا بمحلول التربسين / فرسين لعمل المزرعة الثانوية لها Subculture. وهذا الخط منمى على وسط MEM ومجهز بـ 10 % مصل عجل البقر.

تحديد الجرعة المميتة الوسطية (غم-50) LD -50: تم تقدير الجرعة المميتة الوسطية للفئران بطريقة الصعود و النزول up & down method **(Dixon, 1980)**. وابتدأت التجربة بالجرعة 5 غم لمستخلص الايثانول لكل 10 مل / كغم من وزن الجسم. و تم إعطاء الجرعة باستعمال محقنة مخصصة لذلك gavage needle. و طبقاً لاستجابة كل فأرة والمتمثلة ببقائها او هلاكها خلال 24 ساعة تتم الزيادة و النقصان في مقدار الجرعة، و كان مقدار الزيادة و النقصان في كل جرعة من الجرع الأخرى ثابتاً، و بمقدار 0.5 غم. تم حساب الجرعة المميتة الوسطية LD-50 طبقاً لطريقة **(Dixon, 1980)**، ملحق رقم 1 باستعمال المعادلة الآتية: **LD 50 = Xf + Kd**

LD-50 = الجرعة المميتة الوسطية.
Xf = آخر جرعة استعملت في التجربة.
K = ثابت جدولي
d= مقدار الزيادة والنقصان في الجرعة المعطاة.

الإدامة والمحافظة على خطوط الخلايا السرطانية في الزجاج

تحضير المحاليل المخصصة بالزرع النسيجي: تم تحضير المحاليل المخصصة بالزرع النسيجي طبقاً لطريقة المركز العراقي لبحوث السرطان و الوراثة الطبية لإجراء عملية الزرع الثانوي sub culture و هي كالآتي:

1- المضادات الحياتية Antibiotics

- **Vancomycin:** أذيبت عبوة من Vancomycin 500 ملغم في 5 مل من الماء المقطر، و حفظت في 20 مْ
- **Streptomycin:** يزاد في عبوة واحدة من streptomycin سعة 1 غم مقدار 5 مل من الماء، وتحفظ في 20 مْ

2- محلول دارئ الفوسفات PBS (pH 7.2) phosphate buffer saline و يتألف من المواد الآتية:
يعقم بالموصدة و يحفظ في 4 مْ.

NaCl	8 gm
KCl	0.20 gm
Na_2Hpo_4	0.92 gm
KH_2po_4	0.20 gm
D.W.	1000 m

3- بيكاربونات الصوديوم Sodium bicarbonate (pH 7.2)

يؤخذ وزن 4.4 غم NaHCO3 و يذاب في 100 مل من الماء المقطر يعقم بالموصدة ويحفظ في 4 مْ.

4- المصل Serum

استعمل مصل العجل البقري Bovine Calf serum الذي جهزّه المركز العراقي لبحوث السرطان و الوراثة الطبية

والمصنّع محليا. و استعمل مصل جنين البقر Fetal Calf Serum الذي جهزّته شركة الكندي. وثبط حراريا في درجة 56 مْ لمدة 30 دقيقة في حمام مائي, ثم وزع في عبوات 50 مل وخزن في درجة 20- مْ لحين الاستعمال.

5- وسط النمو Growth Media ويحضر كالآتي :

1. 10.4 غم من وسط النمو RPMI-1640 مع L-glutamine و منظم الحامضية hepes buffer.
2. بيكاربونات الصوديوم 4.4% 15 مل.
3. Vancomycin 1 مل.
4. Streptomycin 0.2 مل
5. مصل 10 %

يكمل الحجم إلى 1 لتر بزيادة الماء المقطر و يعقم بالترشيح باستعمال فلتر 0.22 ملي مايكرون.

6- الوسط الحافظ Maintenance Media

يشابه الوسط الزرعي ولكنّه يخلو من المصل **(Freshney, 1994)**.

7- التربسين Trypsin

يحضر بإذابة 1غم من مسحوق التربسين و يزاد في مقدار 100 مل منP.B.S و يخلط جيداً بالمازج في درجة حرارة

الغرفة، و يعقم بالترشيح باستعمال نالجين فلتر 0.22 ملي مايكرون، ثم يوزع في أنابيب 20 مل و يحفظ في 20- مْ.

8-الفرسين Versene

يزاد 1 غم من مسحوق املاح الصوديوم الثنائية Ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) في 100 مل من الماء المقطر ويذاب جيدا ثم يعقم بالموصدة لمدة 10 دقائق ، يوزع في أنابيب 10 مل ويحفظ في 4 مْ.

9-محلول التربسين – فرسين Trypsin- versen solution ويحضر من:

- **التربسين Trypsin** 20 مل
- **الفرسين Versene** 10 مل
- **محلول دارئ الفوسفات PBS** 370 مل

تمزج قبل الاستعمال في الكابينة المعقمة و تحفظ في 4 مْ بعد الاستعمال.

الإذابة Thawing:

تحتاج هذه العملية إلى ظروف معينة و دقيقة للحصول على خلايا ذات فعالية حيوية و ذلك بالطريقة الآتية **(Fresheny, 1994)**:

1- تم وضع الأنابيب الحاوية على العالق في حمام مائي في درجة 37 مْ لإذابة العالق, و نقلت محتويات الأنبوب إلى أنبوبة أخرى معقمة حاوية على وسط زرعي معقم 15مل لغسل الخلايا من بقايا الـ DMSO مع مراعاة وضع الوسط الزرعي ببطء لتجنب حدوث تأثير للضغط الازموزي Osmotic shock (Darling and Morgan 1994).

2- تفصل الخلايا بجهاز الطرد المركزي 800 rpm في 3-5 دقيقة (من الممكن أيضا الاستغناء عن هذه الخطوة للحفاظ على كمية الخلايا وذلك بتبديل الوسط الزرعي كل 24 ساعة لحين استرجاع فعاليتها).

3- يطرد الراشح ويؤخذ الراسب (العالق) و يزاد فيه وسط زرعي جديد.

4- تنقل محتويات الأنبوب إلى وعاء الزرع 25 سم^2 في ظروف معينة، ومعقمة، و تمزج جيدا, و بعدها تحضن في درجة 37 مْ لحين معاودة نشاطها من جديد.

5- يتم استبدال الوسط الزرعي كل 48 ساعة لحين تكون الطبقة الأحادية confluent monolayer.

الزرع الثانوي: Subculture
عند تكون الطبقة الأحادية للخلايا السرطانية confluent monolayer تجرى عملية الزرع الثانوي بالخطوات الآتية **(Fresheny, 1994)** :
1- يتم التخلص من الوسط الزرعي القديم في ظروف بيئية معقمة، وتغسل بالـ PBS المعقم مرة إلى مرتين.
2- يزاد 2-3 مل من محلول التربسين – فرسين ويحرك الوعاء برفق. تحضن في درجة 37 مْ، إلى أن تنفصل الطبقة الأحادية عن سطح الوعاء.
3- يسكب مقدار 0.2-0.1 مل/سم2من الوسط الزرعي ويضرب الوعاء لتتفكك الخلايا وتصبح مفردة، يكمل الحجم الى 5 مل ويحفظ في الحاضنة في درجة 37 مْ.

اختبار السمية الخلوية Cytotoxicity Assay لمستخلص الايثانول في خط خلايا سرطان الحنجرة البشرية HEp-2:
لدراسة تأثير مستخلص الايثانول في الخلايا السرطانية تم تحضير عالق من خلايا سرطان الحنجرة البشرية HEp-2 و تم معاملتها بالطريقة الاتية **(Mahony, *et al.*,1989)**:-
1- تم الحصول على عالق الخلايا السرطانية HEp-2 بمعاملة وعاء الزرع الحاوي على خلايا سرطانية كثيفة النمو بمادة التربسين-فرسين. وبعد تفكيكها جيدا زيد فيها 15 مل من وسط الـ RPMI المعقم مع مراعاة مزجها جيدا بواسطة الماصة الدقيقة Micropipet.
2- يوزع العالق بعد التأكد من حيوية الخلايا على أطباق المعايرة للزرع النسيجي متعددة الحفر (96 حفرة) مسطحة القعر. كل حفرة تحتوي على 0.2 مل من العالق. و توضع في الحاضنة 37 مْ لمدة 24 ساعة لحين تكّون الطبقة الأحادية من الخلايا.
3- تحّضر ستة تركيزات من مستخلص الايثانول و لخمسة مكررات بدءً بالتركيز 100 ملغم لكل مل وانتهاء بالتركيز 0.001 ملغم لكل مل وبطريقة التخفيفات العشرية.
اجريت التخفيفات للمستخلص بوسط زرعي حافظ خالٍ من المصل **(Bruning, *et al*, 1989)**.
4- تم تحضير خمسة تركيزات أخرى بطريقة التخفيفات الثنائية لمستخلص الايثانول (0.12, 0.25, 0.5, 1) ملغم لكل مل و (1.25, 2.5, 5, 10) ملغم لكل مل على التوالي.
5- بعد اكتمال الطبقة الأحادية من الخلايا في خلال 24 ساعة تسكب بقايا الوسط الزرعي و يزاد 0.2 مل من التركيزات المحضرة سابقا في كل حفرة بمعدل ستة أعمدة (خمسة مكررات مع واحد سيطرة مزيد فيها مادة DMSO المستعملة لإذابة المستخلص الجاف **(Rojanapo & Tepsuwan, 1995)**.
6- تحضن الخلايا المعاملة بالمستخلص في درجة37 مْ، بحسب الوقت المحدد للتعرض exposure time و هو 24 ساعة.
7- تسكب التخفيفات بعد انتهاء وقت التعرض وتزاد إلى كل حفرة وسط زرعي حافظ خالٍ من المصل لمدة 16 ساعة لحساب مدة النقاهة recovery time.
8- عند انتهاء وقت النقاهة يسكب الوسط الحافظ القديم لتعامل الخلايا بمحلول الصبغة الحمراء المتعادلة لجميع الحفر الحاوية على الخلايا بمقدار 0.2 مل لكل حفرة.
9- تعاد أطباق المعايرة للزرع النسيجي إلى الحاضنة 37 مْ مزودة بـ 5 % غاز CO_2 وتبقى فيها ساعتين. بعدها تخرج الأطباق مرة أخرى وتزال محتوياتها.
10- تغسل الخلايا الملتصقة في الحفر وتغسل بـ PBS معقم لحين زوال الصبغة الزائدة.
11- زيد في كل حفرة من حفر أطباق الزرع 50 مايكروليتر من مزيج الـ PBS مع الايثانول المطلق و المحضر بنسبة 1:1 حجم / حجم، ثم تقرأ النتيجة عياناً أو باستعمال جهاز الـ ELISA بطول موجي 492 نانوميتر حسب الطريقة المحورة.
(Mahony, *et al*, 1989 & Abdul-Majeed 2000).

النتائـــج

الاستخلاص Extraction
نتج من عملية الاستخلاص بالايثانول المطلق 96 % لبذور ثمار الهيل على وزن جاف معين 2 غم من 20 غم من مسحوق بذور الهيل، و كانت نسبة الاستخلاص بمذيب الايثانول 10 %، و المستخلص ذو قوام لزج، و لون بني أدكن.

الكشف الكيميائي التمهيدي العمومي عن المركبات الفعالة
دلت النتائج على أن بذور ثمار الهيل تحتوي على نسبة عالية من المركبات الفعالة المختلفة مثل الفينولات و القلويدات و التربينات كما هو مبين في جدول (1).

جدول(1) الكشف الكيميائي التمهيدي العمومي لمستخلص بذور ثمار الهيل

المركب	الكاشف المستعمل	دليل الكشف	بذور الهيل مستخلص الايثانول
التانينات Tannins	a- خلات الرصاص 1 % b- كلوريد الحديديك 1 %	راسب هلامي لون ازرق مخضر	+ +
الكلايكوسيدات Glycosides	كاشف فهلنك + غليان	راسب احمر	++
القلويدات Alkaloids	a- كاشف ماير b- حامض البكريك 50 %	راسب ابيض راسب ابيض	++ ++
الصبونيات Saponins	a- رج المستخلص b- كلوريد الزئبقيك 1 %	رغوة كثيفة راسب ابيض	+ +
الراتنجات Resins	كحول اثيلي ← غليان ← ماء مقطر	راسب ضبابي	+
الفلافونات Flavonoids	كحول اثيلي+ هايدروكسيد البوتاسيوم	لون اصفر	+
الفينولات Phenols	كلوريد الحديديك 1 %	لون اخضر مزرق	++
الكومارينات Coumarins	هايدروكسيد البوتاسيوم	راسب ابيض هلامي	+

إشارة (+) تدل على ايجابية الكشف

تقدير الجرعة المميتة الوسطية (غم-50) LD 50

لغرض تقدير الجرعة المميتة الوسطية LD-50 لمستخلص الايثانول جرعت الفئران البيض عن طريق الفم باستعمال محقّنة التجريع gavage needle .إذ أظهرت النتائج أن الجرعة المميتة الوسطية (غم-50) LD50 مساوية إلى 5.07 غم لكل كغم من وزن الجسم و 5.37 غم لكل كغم من وزن الجسم. و كما موضح في جدول رقم (2).

جدول (2) الجرعة المميتة الوسطية LD-50 لمستخلص الايثانول في ذكور الفئران البيض

النتائج بعد 24 ساعة	عدد الحيوانات	LD-50 غم لكل كغم من وزن الجسم	المعاملات
XOOXO	5	5.07	الايثانول

O= بقاء الحيوان بعد 24 ساعة X= هلاك الحيوان بعد 24 ساعة

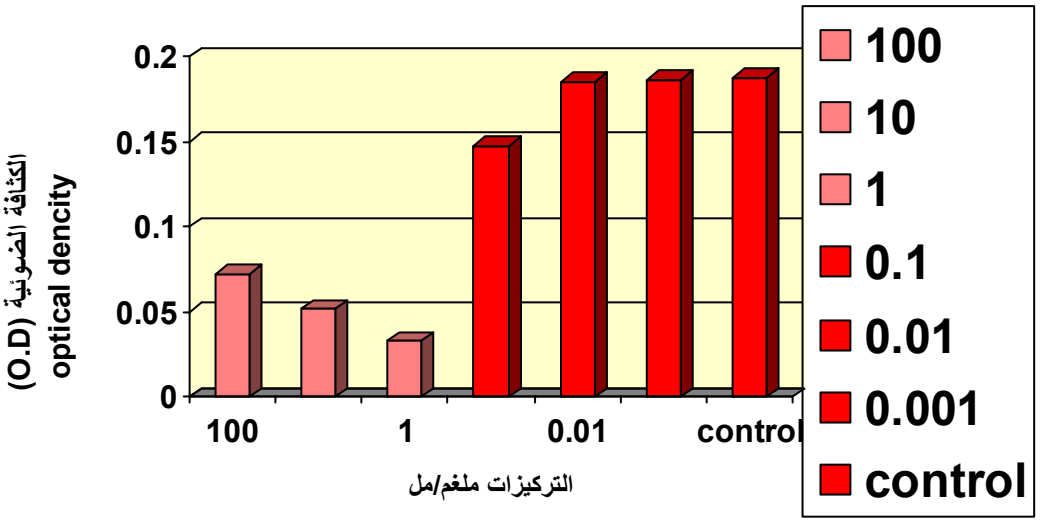
الإدامة والمحافظة على خطوط الخلايا السرطانية في الزجاج:

تم الحصول على نمو كثيف من خلايا سرطان الحنجرة البشرية HEP-2 و خلايا سرطان العضلة البشرية RD بعد تنميتها في الوسط الزرعي ثلاثة أيام، و أعطيت نمواً يغطي قعر قنينة الزرع، و كانت الخلايا ذات أشكال مختلفة منها الشكل ألطلائي، و الدائري للـ HEP-2 و الشكل المتطاول، و المغزلي للـ RD على التوالي.

اختبار السمية الخلوية Cytotoxicity assay لمستخلص الايثانول في خط الخلايا السرطانية للحنجرة البشرية HEP-2:

تمت قراءة النتائج لاختبار السمية الخلوية لمستخلص الايثانول بجهاز Micro- ELIZA Reader بطول موجي 490 نانوميتر، و كانت هنالك علاقة مباشرة بين الكثافة اللونية للصبغة وعدد الخلايا الحية. و بينت النتائج أن التركيزات العالية لمستخلص الايثانول ذات تأثير تثبيطي في نمو الخلايا السرطانية HEP-2 بعد مرور يوم واحد من الحضن كما في الشكل(1) صورة(1).

و بعد دراسة النتائج السابقة تم اختيار التركيزات المثبطة بناءً على التغيرات الحاصلة في كل من قيمة الكثافة الضوئية Optical Density (O.D) و التي تقرأ نسبة الخلايا الحية باستعمال الصبغة الحمراء Neutral red dye أو عيانًا من خلال تفاعل الصبغة **(Mahony, *et al*, 1989)**، فكانت التركيزات العالية (100,10,1) ملغم / مل و لاسيما التركيز 1 ملغم / مل ذات تأثير تثبيطي قوي، مقارنة بالتركيزات الواطئة (0.01, 0.01, 0.001) ملغم / مل التي أثرت تأثيرا طفيفا في نمو الخلايا السرطانية جدول (3).



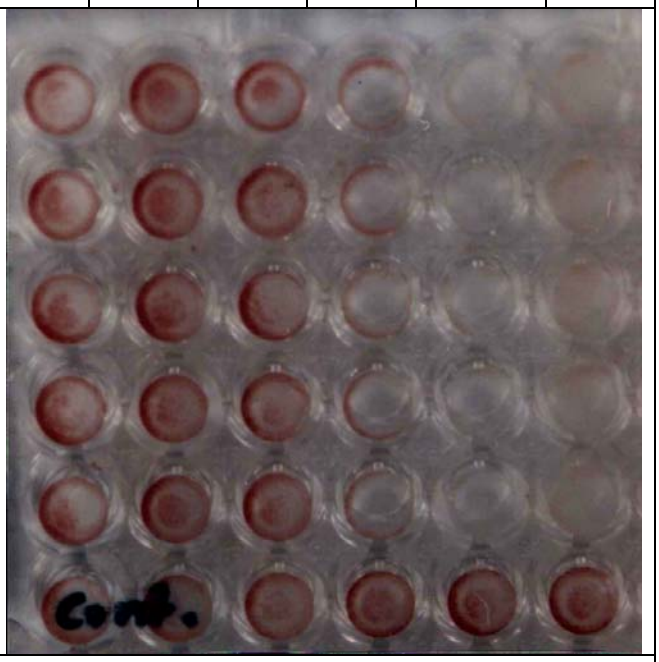
شكل (1)

تأثير مستخلص **الايثانول** في نمو خلايا سرطان الحنجرة البشرية **HEP-2** بعد مرور 24 ساعة من الحضن

الأعمدة تمثل المعدل (خمسة مكررات لكل تركيز)

0.017= LSD A A تمثل مدة التعرض معنوية بمستوى 0.05 مقارنة بالسيط

0.001 ملغم/مل	0.01 ملغم/مل	0.1 ملغم/مل	1 ملغم/مل	10 ملغم/مل	100 ملغم/مل
-	-	-	++	+	+



Control=DMSO +Growth media

+ تدل على استجابة الخلايا للمستخلص

صورة (1)

تأثير مستخلص **الايثانول** في نمو خلايا سرطان الحنجرة البشرية **HEp-2** بعد مرور 24 ساعة من الحضن

جدول (3)
يوضح التركيزات الفعالة لمستخلص**الايثانول** في تثبيط نمو خلايا سرطان الحنجرة البشرية **HEp-2**

الوقت /الساعة التركيز ملغم / مل	24ساعة
100	0.072
10	0.051
1	0.033
0.1	0.147
0.01	0.185
0.001	0.186
Control	0.187

المنـــــاقشة

إن ما سببته الأدوية التقليدية لعلاج السرطان من أضرار جانبية، كاستعمال الإشعاع، و العلاج الكيميائي الذي يتصف بسمية و انتقائية واطئة يؤثر في نمو الخلايا السرطانية و غير السرطانية أدى إلى اهتمام الباحثين للبحث عن طرق علاجية جديدة أكثر أماناً وأكثر فاعلية، فكانت النباتات الطبية احد هذه الطرق العلاجية و التي لعبت دوراً مهماً في الحفاظ على صحة الإنسان **(Plotinkoff and Jonathan George, 1999)**، إذ قدرت منظمة الصحة العالمية WHO أن 80% من سكان الأرض يتخذون الأعشاب الطبية كأحد المتطلبات الضرورية للعناية بالصحة العامة، وان معظم العلاجات المستعملة تتضمن استعمال المستخلصات النباتية أو مكوناتها الفعالة للعلاج **(Craig, 1999)**.

جاءت نتائج الكشف التمهيدي للمركبات الفعالة لمستخلص بذور ثمار الهيل في هذه الدراسة بان مستخلص الايثانول يمتلك معظم المركبات الثنائية الفعالة (القلويدات والتربينات والفلافونات) مع اختلافات نسبية بينهما. إذ اظهر مستخلص الايثانول كفاءة عالية لجميع الكواشف المستعملة، و هذا يفسر امتلاكه معظم المركبات الفعالة.

و اظهر المستخلص الخام لبذور ثمار الهيل عموماً سلامته في الفئران مع تداخلات جانبية طفيفة تظهر على الفئران في اختبارات التجريع عموماً. إذ كانت الجرعة المميتة الوسطية LD-50 لمستخلص الايثانول بحدود 5.37 غم لكل كغم من وزن الجسم. و لعل هذا يتفق مع ما جاء به الباحث **(Uragoda, 1992)** في إن نبات الهيل هو التابل الوحيد الذي لا يسبب أية تأثيرات جانبية مؤذية.

و أشارت نتائج دراسة تأثير المستخلص الايثانولي للهيل في تثبيط نمو الخلايا السرطانية إن المعاملات المتمثلة بـ a, b, c (زمن التعرض و التركيز ونوع المذيب) على التوالي، أوضحت فرقاً معنوياً بمستوى 0.05 و هذا يعني أن تلك العوامل تؤثر تأثيراً مباشراً في نسبة التثبيط. و عموماً إن المستخلص الخام لبذور ثمار الهيل قد أحدث تثبيطا معنويا في خطوط الخلايا السرطانية HEP-2 و الـ RD بالموازنة مع السيطرة غير المعاملة بالمستخلص حيث اختلف التثبيط باختلاف المذيب المستعمل للاستخلاص و التركيز ومدة الحضن.

إن التثبيط الذي حصل في الخلايا السرطانية من الممكن أن يرجع إلى أن المستخلصات النباتية تحتوي على مركبات كيميائية ذات طبيعة سامة و لاسيما عند التركيزات العالية التي من خلالها تؤثر إما في عملية بلمرة خيوط المغزل وهذا يؤدي إلى خفض نسبة معامل الانقسام، أو ربما تؤثر تلك المركبات بشكل مباشر في البروتينات المحفزة لعملية الانقسام **(Shiraishi, 1978)**

وقد يعزى العمل التثبيطي لبذور ثمار الهيل للخلايا السرطانية إلى أن بذور الهيل غنية جدا بالزيوت الرئيسة والفلافونات والتربينات ولاسيما المركب α-terpenyl التي لها فعل تثبيطي خارج جسم الكائن الحي في الخلية السرطانية **(Ulubelon, *et al*, 1999)**, كما أوضح الباحث **(Masaki, *et al*, 1995)** أن الزيوت الرئيسة و مركبات الفلافونات والتربينات الثنائية تمتلك القابلية على كسح الجذور الحرة وبالتالي فهي ذات فعالية مضادة للأكسدة Antioxidants.

الإستنتاجات و التوصيات

خرجت الدراسة الحالية بجملة من الاستنتاجات فيما يأتي أهمها :

1. تعد هذه الدراسة الأولى لتأثير المستخلص الخام لبذور ثمار الهيل في خطوط الخلايا السرطانية.
2. عدم امتلاك مستخلص الهيل بمذيب الكحول الاثيلي أي تأثيرات سمية في الفئران المختبرية البيض بدراسة الجرعة المميتة الوسطية LD-50.
3. أظهر مستخلص الهيل بمذيب الكحول الاثيلي كفاءة عالية في تثبيط نمو الخلايا السرطانية HEP-2 و RD في حدود التركيزات العالية و هي (100,10,1) ملغم / مل.
4. على الرغم من تأثير مستخلص الهيل بمذيب الكحول الأثيلي تأثيرا معنويا في خطوط الخلايا السرطانية, كان لهما تأثير غير معنوي في الخلايا اللمفاوية للدم المحيطي في الإنسان.
5. يمكن أن تصنف بذور ثمار الهيل ضمن المركبات المضادة للسرطان Anti Tumor خارج جسم الكائن الحي in vitro فضلا عن كونها مضادة للأكسدة.
6. يمتاز مستخلص الهيل بخصيصة الثبوتية أثناء الخزن في 20 - م من دون تغير في الفعالية.

وعلى ضوء الاستنتاجات أعلاه نوصي بما يلي:
1- تنقية بعض المركبات لعزل القلويدات و التربينات و الزيوت الأساس و معرفة تأثير كل منهما في نمو الخلايا السرطانية فضلا عن تأثيرها في الخلايا اللمفاوية للإنسان أو أية خلايا طبيعية, و بذلك تتضح الكفاءة التثبيطية بصورة اشمل لتلك المركبات.
2- إجراء دراسات جزيئية لمعرفة إلية عمل مستخلص الهبل في الخلايا السرطانية.
3- محاولة سريريه لإعطاء مستخلص بذور ثمار الهبل إلى مرضى السرطان الذين يتناولون العلاجات التقليدية.

References

1- Antherden ,L .M(1969).Benthy and Davis text boo k of pharmacential chemistry oxford university press,London,8th ,Pp.916

2- Bruning J.H;liana Corliss,ms.;hatch,m.h;who.assistance.(1989).lab oratory method for the titration of live virus vaccines using cell culture techniques world health organization p 28.

3- Craig WJ(1999) health-promoting properties of common

4- EL-KADY, LA.;EL-maraghy, S.S. and mohammed, E.M (1993)Antibacterial and antidermatophyte activities of some essential oils frome ,Qatar univ :sci.j.,13:63-69

5- Dixon,W.J.(1980).efficient analysis of experimental observations.Ann Rev .pharmacol toxicol.20:441-62.

6- Darling DC,Morgan SJ(1994) Animal cell: culture and media, essential data .John Wily &sons,Chichestre,Pp:90-116.

7- Evan WC(1997)Trease and Evans pharmacognosy,(4th ed).PpW.B.Saunders Company, a division of Harcout brace& company, Asia Pp3;225-227.

8- Freshney,R.L(1994).Culture of animal cell A manual of basic technique.(3rd ed) Wiley-liss,newyork.

9- Harborne,J.B.(1984).phytochemical methods,Aguide to modern techniques of plant Analysis 2nd Edition,London newyork.

10- Moore,A.E.;Sabachewsky,L.and Toolan, H.W.(1955):Culture characteristics four permanent lines of human cancer cell.Cancer research, 15:598-605.

11- Masaki, H.;Sakaki,S.;Astumi, T.and Sakurai H.(1995).Active oxygen scavenging activity of plant extracts .Biol. pharm.Bull.1816266.

12- mahony,d.e.;gilliatt,e.;dawson,s.;stockdale,e. and lee,S.H.S.(1989).Vero cell assay for rapid detection of clostridium perfringens enterotoxin.Applied and Environmental microbial. 21412143.

13- masaki,.;Sakaki,S.;Astumi,T.and Sakurai H.(1995).Active oxygen scavenging activity of plant extracts.biol.pham.Bull.1816266.

14- 'Hara M,Kiefer D,Farrell K,Kemper K(1998)A Review of 12 commonly used medicinal herbs. JAMA,7:523-540

15- Shirashi,Y.(1978).chromosome aberrations induced germ cell of mice mutat.Res.57:313-324.

16- Shihata,I.M.(1951) Apharmacologicol study of Anagallis arvensis.M.D.Thesis Cairo Univrsity.

17- Sousek J.; Guedon , D.;Adam,T.;Bochorakova,H.;Taborska,E.;Valka,I.and Simanek,V.(1999)Alkaloid and organic acid content of eight FUMARIA species.phytochemical Analysis,10:6-11.

18- Ulubeloen, A.;Topc,G.chai ,H.B. and pezzuto,J.M.(1999).Cytotoxic activity of diterpenoids isolated from saliva hyporgeia pharmaceutical. Biology.37:148-51.

19- Plotnikoff,GA and Jonathan G eorge BA (1999)Herbalism in Minnesota what should physicians kow ?puplished monthly by the Minnesota medical association,:vol.82.

20- Rojanapo, W.&Tepsuwan,A.(1993). Anti mutagenic and mutagenic potentials of Chinese radish. Environ health perspect 101:247-252.

21- Uragrode, C.G.(1992):symptoms in spices Workers j. Trop. Med Hyg.,95:136-139(Abstract)

22- Ulubeloen,a.;Topc , G.chai ,H.B. and pezzuto,J.M.(1999).cytotoxic activity of diterpenoids isolated from saliva hyporgeia pharmaceutical.Biology.37:148-51.

المصادر العربية

1- الربيعي, هادي مزعل خضير(1999).تاثير مستخلصات نبات الداتورة ,Dayra inoximil في جوانب الاداء الحياتي الذبابة المنزلية Musca domesticael رسالة دكتوراه كلية العلوم- جامعة بابل

2- المختار،انتصار جواد عبد ،(1994) دراسة بعض الخصائص الدوائية لبعض النباتات الطبية في بعض الديدان الطفيلية في الفئران المختبرية. رسالة ماجستير كلية الطب البيطري – جامعة بغداد.