

تأثير المستخلصات الخام لاوراق الكلغان *Silybum marianum* L. على الخط الخلوي السرطاني RD والخط الخلوي الطبيعي REF خارج الجسم الحي

اسراء صكر سلمان و زهراء رافع طه

قسم علوم الحياة ، كلية العلوم للبنات ، جامعة بغداد.

الخلاصة

استخلصت اوراق نبات الكلغان بنوعين من المذيبات وهي الماء المقطر والكحول الايثيلي. ودرس تأثيرهما في الخط الخلوي السرطاني RD لسرطان العضلة البشرية ولمدة تعريض 48 أو 72 ساعة والخط الخلوي الطبيعي REF لجنين الجرذ ولمدة تعريض 72 ساعة في تجارب خارج جسم الكائن الحي. ظهر التأثير السمي للمستخلص المائي الخام في خط RD ابتداءً من التركيز 10 مايكروغرام/مل صعوداً الى التراكيز العالية بعد تعريض الخلايا للمستخلص لمدة 48 ساعة بالمقارنة مع السيطرة وعند زيادة فترة تعريض الخلايا للمستخلص لمدة 72 ساعة بدأ التأثير السمي من التركيز 1 مايكروغرام/مل صعوداً الى التراكيز العالية، و ظهر فرق معنوي في التأثير السمي بين التراكيز. بدأ تأثير المستخلص الايثانولي الخام في خط RD ابتداءً من التركيز 1 مايكروغرام/مل صعوداً الى التراكيز العالية ولمدتي تعريض 48 او 72 ساعة، كما ظهر اختلاف معنوي في التأثير السمي بين التراكيز. اختلف تأثير المستخلصين المائي والايثانولي في الخط الخلوي السرطاني RD، اذ كانت جميع التراكيز المستخدمة في التجربة ذات تأثير سمي وابتداءً من 1، 10 مايكروغرام/مل ولمدتي تعريض 48 او 72 ساعة. وكان التأثير السمي لجميع التراكيز من المستخلص المائي الخام اعلى في خط خلايا RD بالمقارنة مع المستخلص الايثانولي ولمدتي التعريض.

لم تظهر تأثيرات سمية كبيرة ولم تظهر فروق معنوية مقارنة بالسيطرة عدا التراكيز العالية في الخط الخلوي الطبيعي REF لكن كان المستخلص الايثانولي اكثر حساسية او سمية من المستخلص المائي من حيث شدة التأثير السمي لها. اظهر الفحص المجهرى ان استخدام التراكيز العالية من المستخلصات الخام كانت سامة خلويًا تمثلت باحداث تغيرات واضحة في تقليل نمو الخلايا السرطانية وفقدانها الشكل المميز لها بينما كان التأثير ضئيل جدا في الخط الخلوي الطبيعي ولم تظهر اي تغيرات كبيرة في شكل الخلايا.

الكلمات المفتاحية : الكلغان، المستخلصات الخام، الخط الخلوي السرطاني، الخط الخلوي الطبيعي.

المقدمة

وكذلك يحوي على الاليجينين والهستامين والتايرمين ويحوي زيوت ثابتة بنسبة 20 - 30 % من اهمها Palmitic acid, Oleic acid, Linolic acid كما يحوي النبات على بعض العناصر مثل الزنك و السليم والكالسيوم والحديد والمغنيسيوم [4].

تستهلك اوراق نبات الكلغان كمادة غذائية وتؤكل القمم والسويقات الطازجة اذ انها مستساغة وذات قيمة غذائية مفيدة [5]. اما في الطب الشعبي فينصح لعلاج اعراض الكبد وحصى الصفراء و في ازالة السموم واعادة بناء وتجديد الخلايا المتضررة بعد علاجات السرطان للعلاج الكيميائي والاشعاعي [6]. ومستخلصات النبات استعملت كمضاد للحياة المجهرية مثل [7]. *Staphylococcus aureus*

يعد الكلغان [*Silybum marianum*] من النباتات الطبية والذي ينمو برياً وله عدة تسميات مثل النبات المشوك (milk thistle) والشوك المقدس (blessed thistle) [1]. وينتشر في العراق في العمادية والسهل الرسوبي ويعرف بالكلغان فضلا عن شوك الجمل وكعوب الجمل وخرفاش الجبل [2]. يعود النبات للعائلة Asteraceae و يحتوي على عدة مركبات منها الفلافونويدات (Flavonoids) وهي من المركبات الفعالة الرئيسية في النبات والتي من اهمها Silibinin, Silymarin, Quercetin, Taxifolin, [3]. كما يحوي مواد مخاطية ودهون وسكريات وفيتامينات ومنها A, B12, C, E, K.

اعيد ترشيحه وتعقيمه بورق ترشيح Nalgen filter ذات ثقوب بسعة $0.22 \mu\text{m}$.

تأثير المستخلصان الخام في نمو الخطوط الخلوية السرطانية والطبيعية في المختبر تهيئة الخطوط الخلوية

تم الحصول على نوعين من الخطوط الخلوية وهي: الخط الخلوي السرطاني RD (التمريرة 120) لخلايا العضلة البشرية من مختبرات الصحة المركزية، والخط الخلوي الطبيعي REF لجنين الجرذ (التمريرة 18) من المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية/ الجامعة المستنصرية. تم عمل المزارع الثانوية (passage) (subculture or) لكل خط خلوي وتحت ظروف معقمة وحسب طريقة [15] وتمت متابعة الخطوط الخلوية يومياً للتأكد من خلوها من اي تلوث بفحصها بوساطة مجهر مقلوب الطور Phase inverted contrast microscope. واصبحت الخلايا جاهزة للاستعمال بعد تكوينها عدة طبقات من الخلايا (over growth).

اختبار سمية المستخلصات الخام في نمو الخطوط الخلوية السرطانية والطبيعية

حضرت سبعة تراكيز مخففة وفقاً لـ [16]، من المستخلصات الخام وكالاتي: $1000, 100, 10, 1 \mu\text{g/ml}$ و استخدمت انياً 10000، 5000، 2500.

جَهِزَ عَالِقُ الْخَلَايَا عَنْ طَرِيقِ مَعَامَلَةِ وَعَاءِ الزَّرْعِ النَسِيجِيِّ حِجْمَ 25 مل بمحلول التريسين/ فرسين المعقم (20 مل من محلول التريسين (1g :100ml PBS) 10 مل من محلول الفرسين (1g Acetic Acid Ethylene Diamine) 1g 370 PBS:::100 DW ثم اضيف له 20 مل من الوسط الزرعي الجديد الخالي من المصل SFM المعقم (16.4g gentamycin : اكمل الحجم الى 1 لتر باضافة ماء مقطر)، تم مزج عالق الخلايا جيداً وتم نقل 0.2 مل الى حفر طبق معايرة الزرع النسيجي ذو القعر المسطح باستعمال ماصة اوتوماتيكية دقيقة، تركت الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 37° لحين التصاق الخلايا في الحفرة. تم التخلص من

دلت ابحاث عديدة فاعلية المستخلصات الخام لحبوب الكلغان لمدى واسع من الاورام السرطانية. اذ اظهرت المستخلصات المائية والكحولية الخام فاعلية تثبيطية عالية لخط سرطان الحنجرة البشري (Hep-2) وسرطان العظلة البشري (RD) وسرطان الغدة اللبنية (AMN-3) [8]، بالاضافة الى فعاليتها المضادة للفيروسات كفيروس HIV [9]. وقد عزل الباحثون عدة مركبات فعالة من المستخلصات الخام لنبات الكلغان وعزي اليها فعالية النبات المضادة للالتهابات والسرطان ومنها Qercetin, Silibin, والزيوت الثابتة. واوضح [10] وجود فعالية مضادة للسرطان لمركب quercetin من خلال تثبيط نمو وتكاثر الخلايا السرطانية وبالاخص Squamous cell carcinoma والخط Colon carcinoma HT29 والخط الخلوي لسرطان الدم Leukemia .HL-60 وعزل مركب silymarin وهو من المركبات المهمة والفعالة في النبات وله القدرة على تثبيط الاورام السرطانية [11]. اما الزيوت الثابتة فلها دور مهم كمضاد للسرطان بتثبيط نمو ثلاثة من خلايا اورام الدماغ Glioma cell lines وذلك من خلال توجيه الخلية نحو الموت المبرمج [12]، كما ان للحامض الدهني الـ Olenic acid وهو من الزيوت الثابتة القابلة في تثبيط نمو الخلايا السرطانية من خلال ايقاف عملية تكوين الاوعية (Angiogenesis) [13].

المواد وطرائق العمل

جمع النبات وتحضير المستخلصات النباتية

جمعت اوراق نبات الكلغان من حدائق جامعة بغداد - الجادرية في شهري اذار ونيسان 2008. جففت الاوراق وطحنت بجهاز الطحن وحفظت في حاويات بلاستيكية نظيفة بعيدة عن الضوء والحرارة والرطوبة لحين الاستعمال. جرى تحضير المستخلصات الخام بطريقة التثقيب والتحرك وحسب [14]، بوزن 15 غرام من المسحوق النباتي و اضيف له 100 مليلتر من المذيب (الكحول الايثانولي 70% او ماء مقطر). بعد وزن المستخلص قسم الى عدة اقسام وحفظ في قناني زجاجية تحت درجة حرارة 4°م. اذيب 0.1 غم من المستخلص الجاف في 10 مل من الوسط الزرعي RPMI الخالي من المصل (serum free) media، وخفف بالمحلول نفسه ورشح بورق الترشيح Whatman 1 و ثم

مدة التعريض 72 ساعة. كما ظهرت فروق معنوية في التأثير السمي فيما بين التراكيز، بينما لم تظهر فروق معنوية في التأثير السمي على الخلايا بين مدتي التعريض 48 و 72 ساعة بمستوى احتمالية $P \leq 0.01$ جدول (1).

تأثير المستخلص الايثانولي الخام على الخط الخلوي السرطاني RD خلال مدتي التعريض 48 و 72 ساعة

اختلف تأثير المستخلص الايثانولي للنبات بالمقارنة مع المستخلص المائي، فقد ظهر التأثير السمي للمستخلص الايثانولي من التركيز الواطئ $1\mu\text{g/ml}$ خلال مدتي التعريض 48 و 72 ساعة وصعوداً للتركيز العالية. لم تظهر فروق معنوية بمستوى احتمالية $P \leq 0.01$ فيما بين التراكيز عدا التراكيز العالية، و لم تظهر فروق معنوية بين مدتي التعريض 48 و 72 ساعة. ومن المقارنة بين المستخلصات الخام على الخط الخلوي السرطاني RD خلال مدتي التعريض 48 او 72 ساعة، فقد ظهر ان المستخلص المائي اكثر سمية على الخط الخلوي السرطاني RD من الايثانولي جدول (1).

الوسط القديم في الحفر، واضيف 0.2 مل من التراكيز المحضرة سابقا من المستخلصات وبواقع 3 مكررات لكل تركيز، فضلا عن مكررات السيطرة (وسط زرعي فقط). حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37°C . بعد مرور مدة التعريض المحددة للحضن (72، 48) ساعة للخط الخلوي السرطاني RD و 72 ساعة للخط الخلوي الطبيعي REF، اخرج الطبقة من الحاضنة وازيل الوسط الزرعي واضيف له محلول صبغة البنفسج البلوري (5g powder crystal violate: 200ml) للحفر الحاوية على الخلايا جميعها ويحجم 0.2 مايكروليتر لكل حفرة، واعد الطبقة مرة ثانية الى الحاضنة ليحضن لمدة 20 دقيقة، اخرج الطبقة وازيلت محتوياته وغسلت الخلايا بالماء المقطر لحين زوال الصبغة، ثم جففت الاطباق وهيات للقراءة بجهاز الاليزا بطول موجي 492 نانوميتر.

تم تحويل قيم التأثير السمي للمستخلصات الخام لنبات الكلغان في الخطوط الخلوية الى نسب مئوية ووفق الشكل الاتي:

النسبة المئوية لحيوية الخلايا = قراءة امتصاصية الخلايا المعاملة لكل تركيز / خلايا السيطرة $\times 1000$ [17].

التحليل الاحصائي Statistical analysis

استعملت تجربة عاملية حسب التصميم العشوائي الكامل CRD في تحليل تأثير التركيز ومدة التعريض في حيوية الخلايا المدروسة وقورنت المتوسطات باختبار اقل فرق معنوي LSD واستعمل البرنامج SAS لهذا الغرض [18].

النتائج

تأثير المستخلص المائي الخام على الخط الخلوي السرطاني RD خلال مدتي التعريض 48 و 72 ساعة

ظهر التأثير السمي للمستخلص المائي على الخط الخلوي السرطاني RD ابتداءً من التركيز الواطئ $10\mu\text{g/ml}$ خلال مدة التعريض 48 ساعة، بينما ظهر التأثير السمي من التركيز الواطئ $1\mu\text{g/ml}$ وصعوداً الى التراكيز العالية وبفرق معنوي بمستوى احتمالية $P \leq 0.01$ بالمقارنة مع السيطرة عند

جدول (1)

النسب المئوية لحيوية الخلايا المعرضة لتراكيز مختلفة من المستخلصين المائي والكحول الايثانولي الخام لاوراق نبات الكلغان في خط خلايا سرطان العظلة البشرية RD ولمدتي تعريض 48 و 72 ساعة.

حيوية الخلايا للمستخلص الايثانولي		حيوية الخلايا للمستخلص المائي		التركيز مايكروغرام/ملييلتر
72 ساعة	48 ساعة	72 ساعة	48 ساعة	
100% A	100% A	100% A	100% A	Control
82± 6.65 B,a	83.66± 3.84 BC,a	72.66± 5.45 BC,a	85±7.0 AB,a	1
84± 4.40 B,b	89.33± 1.20 AB,b	74± 3.60 B,b	82.66± 4.66 B,b	10
76± 3.78 B,c	85± 6.55 BC,c	74.66± 3.17 B,c	74± 7.57 BC,c	100
81± 2.64 B,d	80.66± 3.71 BC,d	61± 6.55 C,d	61.33± 4.33 CD,d	1000
80.33± 3.84 B,e	74.66± 1.85 C,e	65± 3.51 C,e	51± 6.11 D,e	2500
74.33± 5.23 BC,f	74.66± 4.91 C,f	30± 5.50 D,f	31.33± 4.37 E,f	5000
62± 3.46 C,g	60.33± 2.33 D,g	12± 1.66 E,g	13±0.57 F,g	10000

للمستخلصين المائي والايثانولي الخام بشكل منفصل. الاحرف الكبيرة تدل على الفروق بين التراكيز لنفس مدة التعريض، فالاحرف الكبيرة المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية بمستوى احتمالية $P \leq 0.01$. وان الحروف الصغيرة المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية بين مدتي التعريض لكل تركيز.

تأثير المستخلص المائي والايثانولي على الخط الخلوي

الطبيعي REF

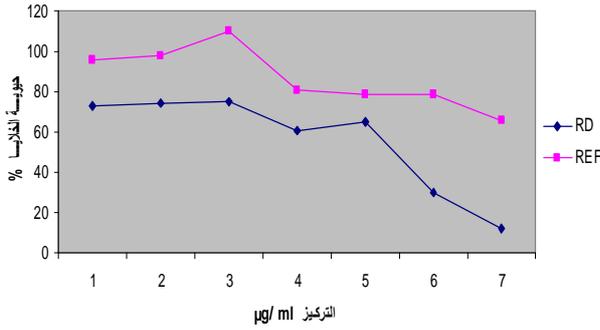
لم يظهر اي تأثير سمي للمستخلصات الخام على الخط الخلوي الطبيعي عدا التراكيز العالية، فقد وصلت اعلى نسبة تثبيط لها 22% اي بنسبة حيوية خلايا 68% عند التركيز العالي 10000 $\mu\text{g/ml}$ للمستخلص الايثانولي. اما المستخلص المائي فقد وصلت فيه حيوية الخلايا الى 65%. اما بالنسبة الى المقارنة ما بين تراكيز المستخلص الايثانولي، فقد اظهرت التراكيز الوطئة فرقا معنويا بالمقارنة مع السيطرة عند التركيز 100 $\mu\text{g/ml}$ بنقصان في حيوية الخلايا وصعوداً الى التراكيز العالية. بينما ظهر المستخلص المائي فرقا معنويا عند التركيز 100 $\mu\text{g/ml}$ لكن نحو زيادة في حيوية الخلايا اما بقية التراكيز العالية فقد اعطت فرقا معنويا بالمقارنة مع السيطرة بنقصان في حيوية الخلايا جدول (2).

جدول (2)

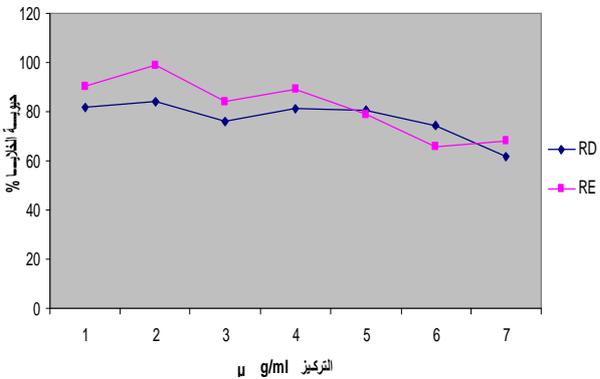
النسب المئوية لحيوية الخلايا المعرضة لتراكيز مختلفة من المستخلص المائي والايثانولي الخام لاوراق نبات الكلغان في خط الخلايا الطبيعية لجنين الجرذ ولمدة تعريض 72 ساعة.

التركيز مايكروغرام / مليلتر								حيوية الخلايا للمستخلص
10000	5000	2500	1000	100	10	1	0	
68±1.15 D,h	66±0.57 D,f	79±0.57 DC,e	89.33±5.84 BC,d	84± 10.00 BC,b	99± 7.02 A,b	90.3±6.33 A,a	100% A	الايثانولي
65.6±2.18 C,h	78.3±2.72 A,g	78.8±4.37 A,e	81± 4.50 A,d	110±18.02 B,c	97.7±22.69 A,b	95.9±13.25 A,a	100% A	المائي

الحرف الكبيرة تدل على الفروق بين التراكيز لنفس مدة التعريض، فالاحرف الكبيرة المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية بمستوى احتمالية $P \leq 0.01$. وان الحرف الصغيرة المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية مابين المستخلصات الخام.



شكل (1) التأثير السام لتراكيز مختلفة من المستخلص المائي الخام في خط خلايا سرطان العضلة البشري RD وخط الخلايا الطبيعي REF ولمدة تعريض 72 ساعة.



شكل (2) التأثير السام لتراكيز مختلفة من المستخلص الايثانولي الخام في خط خلايا سرطان العضلة البشري RD وخط الخلايا الطبيعي REF ولمدة تعريض 72 ساعة.

الفحص الخلوي Cytological examination

الخط الخلوي السرطاني RD

اظهرت خلايا السيطرة السرطانية محافظتها على شكلها الخلوي المتعاير cellular pleomorphism. مع ازدياد نسبة حجم النواة الى حجم الساييتوبلازم الى مايقارب 1:1 واحتواء النواة على اكثر من نوية واحدة وظهور الطبقة

المقارنة بين تاثير المستخلصات الخام في الخط الخلوي السرطاني RD والخط الخلوي الطبيعي REF

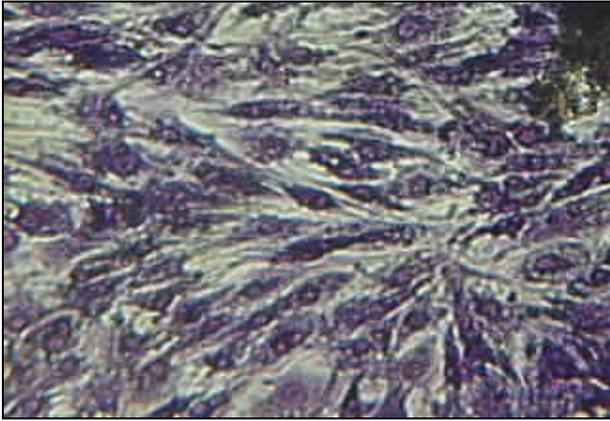
اظهرت النتائج وجود فروق معنوية بمستوى احتمالية $P \leq 0.01$ للمستخلصات الخام في نمو الخط الخلوي السرطاني RD ونمو الخط الخلوي الطبيعي REF خلال مدة التعريض 72 ساعة.

عند المقارنة بين تاثير المستخلص المائي الخام على الخط الخلوي السرطاني والطبيعي، اظهرت النتائج وجود فرقا معنويا بمستوى احتمالية $P \leq 0.01$ بين الخطين من حيث شدة التأثير السمي وبدا التأثير المعنوي في التأثير السمي على الخلايا، فبدا التأثير السمي للمستخلص المائي على الخط الخلوي السرطاني RD عند التركيز الواطئ $1 \mu\text{g/ml}$ وصعودا الى التراكيز العالية، بينما بدا التأثير السمي للمستخلص على الخط REF عند التركيز $100 \mu\text{g/ml}$ واعلى نسبة للتاثير السمي للمستخلص المائي على RD عند التركيز العالي $1000 \mu\text{g/mL}$ فقد بلغت نسبة حيوية الخلايا فيها 12% والخط الطبيعي REF كانت 65% (شكل 1). اما بالنسبة الى تاثير المستخلص الايثانولي على الخط الخلوي السرطاني RD والخط الخلوي الطبيعي REF، فقد كان الفرق بينهما اقل من المستخلص المائي لكن ظهر فرق معنوي بمستوى احتمالية $P \leq 0.01$ بين الخطين، فبدا التأثير السمي للمستخلص الايثانولي على RD عند التركيز $1 \mu\text{g/ml}$ وللخط REF عند التركيز $100 \mu\text{g/ml}$ واعلى نسبة للتاثير السمي على الخط السرطاني عند التركيز العالي بلغت فيه حيوية الخلايا 62% والخط الخلوي الطبيعي عند التركيز العالي وصلت فيه حيوية الخلايا الى 68% (شكل 2).

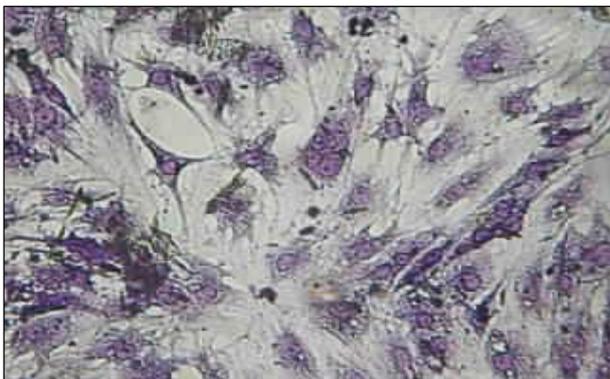
صورة (3) توضح اعداد من الخلايا الميتة لخط RD مع وجود فضلات خلوية وفقدان التصاق الخلايا بعد التعرض للمستخلص الايثانولي لمدة 72 (Crystal violet, 100X).

الخط الخلوي الطبيعي REF

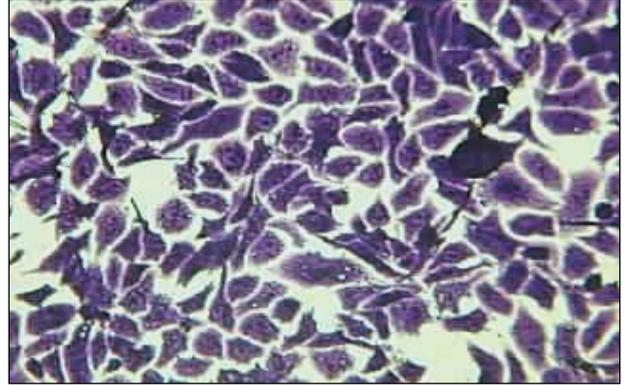
اظهرت خلايا السيطرة محافظة على شكلها الخلوي يسود الشكل المسطح الليفي fibrous shape وتكون الطبقة الاحادية (الصورة4). وعند معاملة الخلايا للمستخلصات الخام لم يظهر تغيرات كبيرة في شكلها الخلوي فقط قلة في عدد الخلايا (الصورة 5 و6).



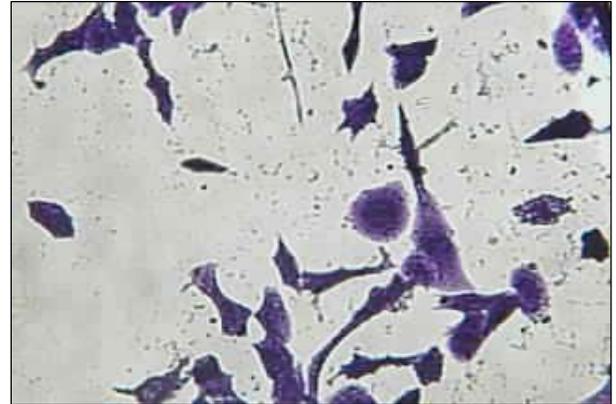
صورة (4) الطبقة الاحادية الكاملة لخط خلايا REF غير المعرضة للمستخلصات (السيطرة) (Crystal violet, 100X).



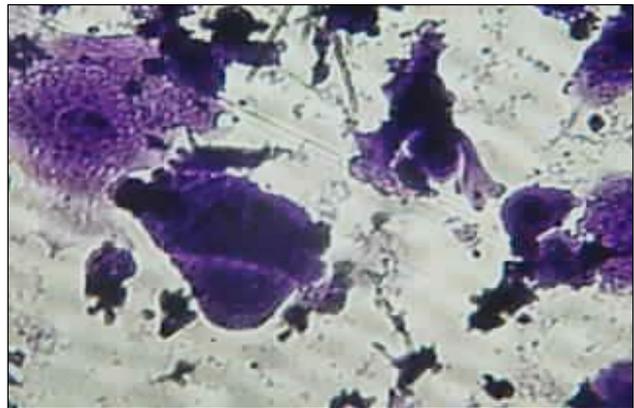
الاحادية للخلايا عند زرعها وحضانها (الصورة 1). وعند معاملة الخلايا بالمستخلص المائي ولمدة 72 ساعة لوحظت ان الخلايا مالت الى التجمع والتي تميزت بتورم الخلايا swelling، وتكون ظاهرة الالتحام formation syncytia وتكوين خلايا عملاقة متعددة الانوية multinucleated giant، (الصورة 2). اما عند معاملة الخلايا للمستخلص الايثانولي ولمدة 72 ساعة لوحظت ظهور اعداد من الخلايا الميتة وتغلظ الانوية وفقدان التصاق الخلايا مع وجود فضلات خلوية (الصورة 3).



صورة (1) الطبقة الاحادية الكاملة لخط خلايا RD غير المعرضة للمستخلصات (السيطرة) (Crystal violet, 100X).



صورة (2) توضح ظاهرة الالتحام وتكوين خلايا عملاقة متعددة الانوية تتميز بتغلظ الانوية multinucleated وتحلل الانوية وتمزق الاغشية الخلوية لخط RD بعد التعرض لمدة 72 ساعة للمستخلص المائي الخام ساعة (Crystal violet, 100X).

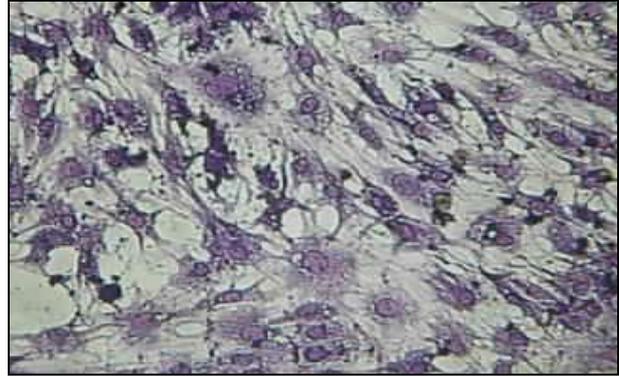


silymarin المعزول من حبوب نبات الكلغان في الخط الخلوي السرطاني Preneoplastic epidermal cell line (JB6C14) اعتمد التأثير السمي على شدة تركيز المستخلص ومدة التعريض.

ربما يعزى الاختلاف في تأثير المستخلصات الخام على الخلايا السرطانية الـ RD الى طبيعة المركبات الموجودة في كل مستخلص وتفاعلها مع الطبيعة الايضية للخطوط السرطانية [20]. بينما تعزى الفعالية السامة للمستخلصات الخام لنبات الكلغان في الخط الخلوي السرطاني في التجربة الى احتواء النبات على الكثير من المركبات الفعالة التي تم الكشف عنها محلياً من خلال الكشوفات التمهيدية التي قام بها كل من [21] و [8]، حيث وجد ان اوراق نبات الكلغان تحوي مجموعة من المركبات من بينها التربينات و الفلافونيدات و الصابونينات و الرتجات و الزيوت، كما تحوي على مجموعة من العناصر اهمها الكالسيوم ووالفوسفات و السليم selenium بالاضافة الى احتواء الاوراق على المادة الخضراء الكلوروفيل التي تقوم بصنع الغذاء للنبات [4].

ان لكل واحد من هذه المركبات دور مهم في تثبيط نمو الخلايا السرطانية خارج وداخل جسم الكائن الحي، فقد وجدت فعالية مضادة للسرطان لمادة الكلوروفيل فهذه المادة تكون سامة للخلايا السرطانية وغير سامة للخلايا الطبيعية [22] كما تعمل العناصر الموجودة في النبات والتي من اهمها الـ Selenium على اختزال سرطان الثدي والبروستات والقولون والرئة. فالجرعة اليومية selenium هي 200mcg/days [23]. كما وجد [24] ان للتربينات دور مضاد للسرطان من خلال تثبيط عامل التخر الورمي Necrosis Factor NF-Kappa signaling. من اهم المركبات التريينية الـ Uroslic acid و Leanolic acid لهما دوراً في تثبيط الاورام السرطانية لسرطان الدم للمفاوي U937 عند اضافتها بتركيز وصلت $IC_{50} = 3.51 \mu g/ml$ [25] وربما تعزى الفعالية السامة للخلايا السرطانية على احتواء النبات الى مركبات الـ polyphenols التي تعمل على تثبيط الخطوط الخلوية السرطانية لسرطان البروستات وهي : DU145 و LNCaP و PC3 وذلك عند استعمالها بتركيز وصلت 50، 75، 100، $\mu g/ml$ على التوالي [26]. كما ان للصابونينات Saponins احدى المركبات الموجودة في النبات دور مضاد للخلايا السرطانية

صورة (5) خلايا REF المعرضة للمستخلص الايثانولي لمدة 72 ساعة، تتميز بقلة في عدد الخلايا مقارنة بالسيطرة بوجود فراغات بين الخلايا (Crystal violet, 100X).



صورة (6) خلايا REF المعرضة للمستخلص المائي، تتميز بقلة بسيطة في عدد الخلايا مقارنة بالسيطرة بوجود فراغات بين الخلايا لمدة 72 ساعة (Crystal violet, 100X).

المناقشة

اوضحت النتائج ظهور تأثيرات سمية عالية ولجميع التراكيز ولاسيما العالية من المستخلصين المائي والايثانولي الخام ولكلا مدتي الحضانة (48 او 27) ساعة في الخط الخلوي السرطاني RD. لم يختلف تأثير المستخلص الخام المائي والايثانولي في تأثيرهما على الخط الخلوي السرطاني فكلاهما نفس التأثير، فقد حققت التراكيز العالية ولكلا المستخلصين تأثير سمي عالي في حين كانت التراكيز الواطئة اقل تأثيراً في اضرار شدة التأثير، فقد كان المستخلص المائي اكثر سمية في التأثير التثبيطي من الايثانولي من حيث بدا التأثير السمي واعلى نسبة تثبيط على الخط الخلوي السرطاني، وهذه الحلة تسمى بظاهرة الاعتماد على الجرعة والوقت Time dependent Phenomenon. اي ان مدة التعريض والتركيز عامل مهم من العوامل المؤثرة والاساسية في مدى شدة التأثير التثبيطي للمستخلصات الخام في الخط الخلوي السرطاني، حيث ان مدة التعريض 72 ساعة كانت اكثر سمية على الخلايا من مدة التعريض 48 ساعة وكذلك التراكيز العالية اكثر سمية من التراكيز الواطئة، فمثلا وجد [19] في دراستهم للتأثير التثبيطي لمركب

- uses Darien (CT): Hafnev publishing company, 1931.
- [6] Greenle, H.; Abascal, K.; Yarnell, E. and Ladas, E. Clinical application of *Silybum marianum* in oncology. *Integr Cancer Ther.*, J. 6(2): 2007, 104-109.
- [7] Narayana, K.R.; Reddy, M.S.; Chaluvadi, M.R and Krishna, D.R. Bioflavonoid classification, pharmacological, Biochemical effects and therapeutic potent. *Indian J.pharmol.*33: 2001, 2-16.
- [8] سلمان، اسراء صكر. تاثير المستخلصات الخام لحبوب الكلغان *Silybum .marianum* على الخطوط الخلوية السرطانية والطبيعية. رسالة ماجستير، كلية العلوم للنبات، جامعة بغداد، جمهورية العراق.
- [9] Dillon, D.M. B.; Penzak, C.R. and Klepser, J.B. The use of herbals by patients with HIV. *J.Pharmacy.* 2(1): 2004, 41-61.
- [10] Kuo, S.M. Antiproliferation pote dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Lett*, 110: 1996, 41-48.
- [11] Comill, M.C.; Mengs, U.; Schneider, C. and Prosdoci, M. Towardthe definition of the mechanism of action of silymarin: activites related cellular protection from toxic damage induced by chemotherapy. *Integer Cancer Ther.*, 6 (2): 2007, 120-129.
- [12] Leaver, H. and Whittle, I.R. Comparative pharmacodynamics and bioavailability of a novel anti-tumor agent, gama linilic acid, in the three glioma models: Effect on tumor biomass, apoptosis and normal neuronal tissue. *Cancer Detec. Reviews.* 22: 1998, 7-10.
- [13] Li, J.; Guo, W.J. and Yan, Q.Y. Effect of Urosolic acid & oleanolic acid on human colon carcinoma cell lin HCTS. *Word Gastroenteral .J.*8: 2002, 493-495.
- [14] الجنابي، علي عبد الحسين صادق. تاثير بعض المستخلصات النباتية على نمو بعض الفطريات الممرضة لجلد الانسان. 1996، رسالة ماجستير، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية، جمهورية العراق.
- [15] Freshney, R.I. Culture of animal cells: A manual for basic technique (4th ed. Wiley – liss, a John Wiley & sons, Inc.Publication, New York, 2000.P.566.

من خلال استعمالها بتركيز 26، 30، 10 µg/ml [27]. كما ان للمركبات الفلافونيدية والتي من اهمها الـ silymarin و silibin دور في تثبيط الاورام السرطانية، حيث تعمل كمضاد للاكسدة ودخول الخلايا للموت المبرمج من خلال تثبيط عامل تكوين الاوعية الدموية الجديدة Angiogenesis factors واحداث تغير وتوقف في مرحلة تقدم السرطان Progression [28].

اما بالنسبة الى سبب اختلاف التأثير السمي للمستخلصات الخام على الخط الخلوي السرطاني دون تاثيرها على الخط الخلوي الطبيعي، ربما يعزى الى عدد من الخواص الايضية التي تمتلكها الخلايا السرطانية مثل الطبيعة الايضية لتكوين الاوعية الجديدة Angiogenesis وكذلك شكل وطبيعة المستقبلات receptors الموجودة على سطح الخلايا السرطانية وامكانية ارتباطها بالمركبات المختلفة، وكذلك شكل شريط الـ DNA وحساسية الخلايا السرطانية تجاه العقاقير والاشعاع اكثر من الخلايا الطبيعية [29].

يستنتج من هذا ان للمستخلصات الخام لاوراق الكلغان تاثير سام على الخط الخلوي السرطاني، وان المستخلص المائي اكثر سمية من المستخلص الايثانولي. في حين لم تظهر تاثيرات سمية كبيرة للمستخلصات في الخط الخلوي الطبيعي.

References

- [1] Greenlee, H.K.; Yarnell, A.E.; Ladas, E. Clinical applications of *Silybum marianum* in oncology. *Integer Cancer Ther.*, 6(2):2007, 158-165.
- [2] يحيى، توفيق الحاج. النبات والطب البديل، الدار العربية للعلوم. 2003، مطبعة المتوسط-جامعة بيروت -لبنان.
- [3] Fraschini, F.; Dermartini, G. and Esposti, D. Pharmacology of silymarin. *Journal of Clin Drug Invest.*, 22 : 2002, 51-65.
- [4] Duke, J.A. Milk Thistle seed chemical constituent. *Journal of Sky herbals.*, 8: 2004, 27-31.
- [5] Grieve, M. A. Modern herbal: the medicinal, culinary, cosmetic and economic properties, cultivation, and Folklore of herbs, grasses, Fungi, Shrubs and tress with all their modern scientific

- [26] Bennani, H.; Drissi, A.; Giton, F.; Kheuang, L.; Fiet, J. and Adlouni, A. Antiproliferative effect of polyphenols and sterols of virgin organ oil on human prostate cancer cell lines. *Cancer Detection and prevention.*, J.331: (6) 2006.
- [27] Drissi, A.; Bennani, H.; Giton, F.; Charrouf, Z.; Fiet, J. and Adlouni, A. Tocopherols & Saponins derived from *Argania spinosa* exert, an antiproliferation effect on human prostate cancer. *Cancer Investigation.*, 24: 2006, 588-592.
- [28] Davis, P.R.; Nakanishi, Y.; Kim, N.C.; Graf, T.N.; Oberlies, N.H.; Wall, M.E.; R. and Kroll, D.J. Milk Thistle and prostate cancer differential effect of pure flavonolignans from *Silybum marianum* on antiproliferative End point. *Cancer Reserch* 65, 2005, Pp. 4448-4457.
- [29] Motieki, H.; Hibasmai, H.; Katsuzaki, H.; Imai, K. and Komiya, T. Specific of apoptosis 1,8 -cineole in two human leukemia cell line, but not in a human stomach cancer cell line. *oncology Reports.*, 9: 2002, 757-760.
- [16] Abdul -Majeed, M.R. Induction & characterization of SU-gg plasmacytoma cell line & its effect on mice immune response, 2000, PhD. Thesis Nahrain University.
- [17] Betancur Glavis, L.A.; Saez, J.; Granados, H.; Salazar, A. and Ossa, J.E. Antitumor & antiviral activity of Colombian medicinal plant extract. *Men. Inst. Oswaldo crez*, 94: 1999, 531-535.
- [18] SAS. Statistical Analysis system, users Guide. Statistical Version 7th ed. SAS. Inst. Inc. Carj. N. C. USA, 2004.
- [19] Katiyar, S.K. Silymarin & skin cancer prevention anti-inflammatory, antioxidant and immunodulatory effects. *Inc.J. Oncol*, 26: 2005, 169-176.
- [20] Shoieb, A.M.; Elgayyar, M.; Dudrick, P.; Bell, E. and Titnof, P.K. Inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thimoquinol. *Int. Oncology*. 22: 2003, 107-113.

[21] الدليمي، ابراهيم جابر عبد. دراسة التأثير التثبيطي لبعض مستخلصات نبات الكلغان *Silybum marianum* في نمو الاحياء المجهرية الممرضة، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بغداد.

Abstract

This study was carried to investigate the antitumor effect of *Silybum marianum* aqueous and ethanolic leaf extracts on tumor cell line RD and normal cell line REF. Results revealed that aqueous and ethanolic leaf extracts showed a significant inhibitory effect at 1µg/ml concentration on RD cell line after 72 hours incubation period and the effect was dose and time dependent. Results showed on inhibitory effect of the aqueous extract on RD cell line, which was significantly higher than that of ethanolic extract. Aqueous and ethanolic extracts showed no significant cytotoxic effect on normal cell lines REF at low concentrations.

Results also showed that RD cell line treated with high concentration of aqueous and ethanolic extracts exhibited different signs of morphological deterioration in comparison with REF cell line after microscopic examination.

Keywords: milk thistle, crud extraction, cancer cell line, normal cell line.

- [22] Arbogast, D.; Bailey, G.; Breinholt, J. and Pereira, C. Dietary chlorophyllin is a potent inhibitor of Aflatoxin B1 Hepatocarcinogenesis in Rainbow Trout. *Cancer Reserch.*, 55: 1995, 57-62.
- [23] Yusy. Apreliminary report on the intervention trials of primary liver cancer in high-risk populations with nutritional supplementation of selenium in china, *Biol Trace Elements Res.*, 29: 1991, 289-294.
- [24] Aneja, R.; Zhou, J.; Zhou, B.; Chandra, R. and Joshi, H.C. Treatment of hormone refractory breast cancer :apoptosis & regression of human tumors implanted in mice. *Mol> Cancer Ther.*, 5: 2006, 2366-77.
- [25] Salminen, A.; Lehtonen, M.; Suuronen, T.; Kaarniranta, K. and Huuskonen, J. Triterpenoids: natural inhibitors of NF-Kappa B Singnaling with anti-inflammatory anticancer potential. *Cell Mol life Sci .*, 65:(19) 2008, 2979-99.

