تأثير مستخلصات قشور الرمان *Punica granatum* (L.) الكحولية الخام والقلويدية في الخلايا اللمفاوية لدم الانسان وخطين من خطوط الخلايا السرطانية

ابراهيم هادي محمد[1]، اسراء طارق عاكول[2]، اسماء عمار حسن [3] و زينة طه عبد الحافظ [4]

[1،2،3]قسم علوم الحياة - كلية العلوم - جامعة ديالى

[4]قسم علوم الحياة- كلية التربية ابن الهيثم

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية الى اختبار تاثير المستخلصين الكحولي الخام والقلويدي الخام لقشور نبات الرمان الداخلية في انقسام خلايا اللمفاوية لدم الانسان في الطور الاستوائي . قورنت فعالية المستخلص الكحولي مع فعالية المستخلص القلويدي في تثبيط معامل الانقسام الخلوي في الخلايا اللمفاوية عند التراكيز 125 ، 250 ، 4000,2000,1000,500 مايكرو غرام \مل لكل منهما على التوالي وقورنت هذه التراكيز كل منهما مع مركب الكولجسين . حقق المستخلص القلويدي نسب توقف في الطور الاستوائي اعلى مما حققها المستخلص الكحولي في التركيز المنخفضة وفي اعلى تركيز 400 مايكرو غرام \مل لقد حقق كل منهما نسبة تزيد عن 91% من مقارنة بفعالية الكولجسين . كذلك تم دراسة لمعرفة تاثير بعض المكونات الفعالة الموجودة في مستخلصات قشور الرمان اذ تم استخدام مستخلصات كحولية وقلويدية من قشور الرمان ودراسة التأثير السمي لهذه المستخلصات على نمو الخلايا الورمية المتمثلة بخط خلايا سرطان الرحم Hella cell line وسرطان العضلة البشري RD ومقارنتها في المختبر مع السيطرة . اظهرت النتائج وجود فروق معنوية في التاثير السام للمستخلصات الكحولية على الخطوط السرطانية اعتمادا على التركيز ومدة التعريض حيث شملت الدراسة فترة الحضن الذي يبلغ 24 ساعة. وأظهرت النتائج ان التأثير السمي لكلا المستخلصين اعتمد على التركيز المستخدم وذلك باستخدام سبعة تراكيز لكل منهما وهي 125 ، 250 ، 4000,2000,1000,500 مايكرو غرام/ مل، كان لتراكيز المستخلص القلويدي الخام تأثير معنويً (P<0.05) في خط خلايا (Hella) من تعريضها للتراكيز المستخدمة ، وكانت أعلى نسبة تثبيط نمو عند التركيز (4000) مايكرو غرام/مل للمستخلصين أذ بلغت 50.50% ,75.08% على التوالي بعد فترة حضن 24 ساعة، وبلغت اعلى نسبة تثبيط نمو في خط خلايا (RD) للمستخلص الكحولي 40.15 % عند التركيز (4000)مكغم \مل. وكانت نسبة تثبيط لخط خلايا وللتركيز نفسه 67.75% بعد مدة حضن 24 ساعة.

الكلمات المفتاحية : نبات الرمان :النبيبات الدقيقة :الخلايا السرطانية .

DIYALA JOURNAL FOR PURE SCIENCES

تأثير مستخلصات قشور الرمان (.Punica granatum (L الكحولية الخام والقلويدية في الخلايا اللمفاوية لدم الانسان وخطين من خطوط الخلايا السرطانية

ابراهيم هادي محمد ، اسراء طارق عاكول ، اسماء عمار حسن و زينة طه عبد الحافظ

Effect of Crude alcoholic and alkaloids of plant *Punica granatum*(L.) in Mitotic index and cell line cancer

Ibrahim Hade [1], Israa Tareq AAkool [2], Asma Ammar Hasan[3] and Zena Taha[4]

[1,2 and 3] Department of Biology - College of Science - Diayla University
[4] Collage of Education - Baghdad University

[2]Israairaqi46@gmail.com

Received: 21 December 2017 Accepted: 19 February 2017

Abstract

This research was designed to study the effect of alcohol and alkaloids extract of *Punica granatum* in *vivo* on Lymphoid cell division of human blood in the equatorial phase also this study test toxic extracts in lymphatic cell in human used concentration 125 ,250, 500, 1000, 2000, 4000 µg\ml and compared with colchicine.The results showed that alcohol and alkaloids relatively have acute toxic increased 91% in 4000 µg\ml concentration with colchicien and. This study aimed to investigate the effect of the alcohol and crude alkaloids extracted from *Punica granatum* the on two malignant cell lines Hella and RD. Also this study included evaluation of the effect of these extracts on several cytogenetic parameters .The cytotoxicity of the alcohol extract and crude alkaloids extract was investigated on the cancer cells line, Hella and RD. Toxic effect for both extracts was indicated by rate of proliferation inhibition.The alkaloids extract showed the inhibition of Hella cell line at percentage 18.61-75.08% more than the alcohol extract 7.87- 50.50% at concentrations: 62.5-4000 µg/ml. The rate inhibition of alkaloids extract for RD cell line 10.48.-67.75 was higher than that of the alcohol extract 9.98-40.15 at the concentrations 62.5 and 4000µg/ml.

Key word: *Punica granatum*: tumor :alkaloids

DIYALA JOURNAL FOR PURE SCIENCES

المقدمة

نالت الأعشاب الطبية اهتماماً كبيراً منذ القدم وذلك لقدرتها الكبيرة على تسكين الألم والشفاء، ولا زلنا نعتمد عليها حتى يومنا هذا في تحضير عدد كبير من الادوية لأن طب الأعشاب يكمل العلاجات التقليدية في الغالب فيوفر أدوية مأمونة على الرغم من ان بعض النباتات قد تنتج مركباتها الفعالة آثاراً جانبية على غرار كل الأدوية، لذا فمن الضروري ألا تؤخذ الا باشراف مختص. تتوقف قدرة الدواء العشبي على التأثير في أنظمة الجسم على المكونات الكيميائية التي يحتوي عليها لذا بدأ الباحثون في القرن الثامن عشر باستخلاص وعزل هذه المواد من النباتات ومنذ ذلك الوقت أعتدنا النظر الى الاعشاب وتأثيراتها بدلالة المكونات الفعالة التي تحتويها (1). كثر الاهتمام بالمكونات الفعالة (مركبات الايض الثانوي) للنباتات الطبية بوصفها علاجاً للسرطان أذ تمتلك تلك المركبات خصائص علاجية تختلف في تأثيراتها في الخلية السرطانية اذ قد تكون لهذه المركبات فعالية تثبيطية تؤدي الى قتل الخلية الورمية او ايقاف نموها (2)،ومن هذه المركبات التي اثبتت فعاليتها المثبطة لتكاثر الخلايا السرطانية هي المركبات القلويدية وتعد من أهم وأكثر المركبات الفعالة الموجودة في المستخلصات النباتية، أذ تمتاز بسميتها العالية للخلايا نتيجة تأثيرها في عدة آليات في الخلية ومنها الانقسام الخلوي او في مرحلة تسبق الانقسام او تحفيز الخلايا السرطانية للدخول في مرحلة الموت المبرمج Apoptosis (3).ومن أهم هذه القلويدات Vinca alkaloid (Vincistine &Vinblastine)و colchicine و(taxanes ، paclitaxel) وخاصة docetaxel التي تستخدم بشكل كبير بوصفها مركبات مضادة للانقسام من خلال عملها على ديناميكية نبيبات المغزل (خيوط المغزل) التي لها دور مهم في انفصال الكروموسومات خلال الانقسام الخيطي(4) . ونظراً للدور الذي تقوم به النبيبات الدقيقة في انقسام الخلية الامر الذي جعلها الهدف المناسب لتطور ادوية العلاج الكيميائي Chemotherapeutic drugs ضد النمو السريع والتوالد غير الطبيعي للخلايا السرطانية، لذا صار التوجه للبحث عن انواع اخرى من المركبات منها القلويدات لاستخلاصها ومعرفة تاثيرها في الانقسام الخلوي. ونظراُ لاحتواء قشور الرمان على مركبات القلويدية لذا تم اختيار النبات في هذه الدراسة. نبات الرمان الاسم الشائع له *P. granatum* ُطلق على هذا النبات عدة أسماء في اللغة منها جلنار: يصنف نبات الرمان ضمن رتبة اسيات شعبة مغطاة البذور فصيلة الخثرية lythraceae (5) . الرمان من نباتات متوسطة الحجم سريعة النمو وتصل الى ارتفاع 8 متر الاوراق متساقطة الازهار ثنائية الجنس الثمرة كروية تحمل تاجا قشرة الثمرة جلية القوام تحتوي الثمرة على الكثير من البذور، يكثر في مناطق مختلفة من العراق (6). أتجهت أنظار الباحثين في السنوات الأخيرة الى أهمية استخدام بعض الأعشاب الطبية في محاولة لعلاج مرض السرطان منها مادة القلويدات لذا تم اختيار القلويدات المعزول من قشور الرمان *P. granatum* اذ وجد انه يثبط عدة أنواع من الخطوط الخلوية السرطانية البشرية المقاومة للعقاقير المتعددة من خلال منع بلمرة النبيبات الدقيقة وتثبيطه لتكاثر الخلايا وحثها على الموت المبرمج (7).أتجهت أنظار الباحثين في السنوات الأخيرة الى أهمية استخدام بعض الأعشاب الطبية في محاولة لعلاج مرض السرطان منها قلويد Tryptanthrin المستخلص من نبات السبحبح اذ وجد انه يثبط عدة أنواع من الخطوط الخلوية السرطانية البشرية المقاومة للعقاقير المتعددة من خلال منع بلمرة النبيبات الدقيقة وتثبيطه لتكاثر الخلايا وحثها على الموت المبرمج (8). ومن الدراسات العراقية الحديثة التي اهتمت بهذا الجانب ونجحت في استخدام المستخلصات النباتية

في تثبيط نمو خطوط الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي وداخله وشملت نبات المديد *Convolvulues arvensis* (9) إذ توصلت هذه الدراسات إلى ان لهذه المستخلصات تأثيرات سمية في أنواع مختلفة من خطوط الخلايا السرطانية، كذلك لغرض الكشف عن القلويدات من قشور الرمان . ومازالت البحوث جارية ومنها الدراسة الحالية لاختبار فعالية المستخلصات النباتية سعياً ومحاولة لاختبار المستخلصات النباتية على الخلايا السرطانية ودراسة مدى تاثيرها .

المواد طرائق العمل

1. تحضير المستخلصات النباتية وأتبعت طريقة في تحضير المستخلص الكحولي الخام حسب ما ورد في (10) لغرض إعداد المستخلص الكحولي تم نقع 25 غم من مسحوق الابصال المجففة في 250 مل من الكحول بنسبة 1:10 وزن/حجم في دورق زجاجي مغلق، وتركت لمدة 24 ساعة بعدها رشح النموذج ثم نقل بعد ذلك الى جهاز الطرد المركزي وبسرعة 3000 دورة/الدقيقة لمدة 10 دقائق، جمع الرائق ووزع في اطباق جافة ،تركت في حاضنة للحصول على مستخلص جاف، بعد ذلك تمت اذابة المستخلص الناتج في حجم معلوم من الكحول وعد هذا محلول الخزين حفظ في بدرجة 4°م. جرى تحضير المستخلصات القلويدية الخام للنبات بأستخدام جهاز السكسوليت وحسب الطريقة المتبعة في (11) بأستخدام جهاز السكسوليت التي نفذت للحصول على المستخلص القلويدي الخام إذ أخذت كمية 20 غم من القشور ووضعت في Thimble، ثم وضع في جهاز السوكسليت Soxhlet وأضيف إليه الهكسان لإزالة الدهون والكلوروفيل وأجري الاستخلاص لمدة 12 ساعة في درجة حرارة(40-60)°م وهي درجة حرارة تبخر المذيب المستخدم، بعدها تم نقل المسحوق إلى كحول الميثانول 70% في جهاز reflex ولمدة ثلاث ساعات، ثم رشح المستخلص بعدها تم تركيز المستخلص الكحولي بالحاضنة ولمدة يوم ثم تمت معاملة المستخلص بـ حامض الهيدروكلوريك 1% HCl في جهاز reflex ولمدة نصف ساعة ، جزئت هذه الطبقة إلى طبقتين باضافة الكلوروفورم لها في قمع الفصل مع الرج، فالطبقة العليا هي الطبقة المائية والطبقة السفلى هي طبقة الكلوروفورم الحاوية على القلويدات ، بعد ذلك تم التخلص من الكلوروفورم بتركه في الحاضنة المروحية ليتبخر وعُزلت مجموعة القلويدات بوصفها ناتجاً نهائياً.
2. دراسة تاثير المستخلصات الكحولية والقلويديةعلى وقف نمو الاخلايا في الطور الاستوائي ومقارنتها بالكولجيسين واتبعت طريقة (12).
3. خطوط الخلايا السرطانية اشتملت نوعين من خطوط الخلايا السرطانية
   أ. خط خلايا سرطان الرحم وقد استعمل هذا الخط عند التمريرة 250
   ب. خط خلايا سرطان العضلة البشري وقد استعمل هذا الخط عند التمريرة 235

تم الحصول على هذه الخطوط المذكورة وهي منماة على وسط RPMI1640 المزود 10% مصل العجل البقري واجريت الخطوات بالزرع النسيجي تحت ظروف معقمة بحسب (13)

اختبار السمية الخلوية للمستخلصين الخام في نمو الخطوط الخلوية السرطانية

أضيف (0.2) مل من التراكيز المحضرة آنياً لكل من المستخلص الكحولي والقلويدي باستعمال الوسط الزرعي الخالي من المصل وهي(125 ،250, 500 ، 1000 ، 2000،4000) مايكرو غرام/مل، وبواقع اربعة مكررات لكل تركيز. كما تم عمل اربعة مكررات للسيطرة باستخدام DMSO(dimethal slfoxid) واربعة مكررات للسيطرة اضيف اليها PBS والتي أضيف لها (0.2) مل من الوسط الزرعي الخالي من المصل، وبحسب طريقة (14) أخرج الطبق من الحاضنة وأضيف (50µl) من صبغة البنفسج البلوري لكل حفرة وأعيد الطبق الى الحاضنة ليحضن لمدة 20 دقيقة، بعدها اخرج الطبق وأزيلت محتوياته وغسلت بمحلول (PBS) لحين زوال الصبغة الزائدة وتركت الخلايا لتجف (إذ ان الخلايا الميتة تأخذ الصبغة أما الحية فلا تأخذها، قُرأت النتائج باستخدام جهاز المطياف الضوئي الخاص باطباق المعايرة الدقيقة بطول موجي 492 نانوميتر.تم تحديد معدل تثبيط النمو للخلايا السرطانية على وفق المعادلة المشار اليها من خلال تحويل قيم التأثير السمي للمستخلصين الكحولي والقلويدي لقشور الرمان في الخطوط الخلوية السرطانية الى نسب مئوية .Inhibition Rate (IR)% = (A-B/A) x 100

التحليل الاحصائي

حللت نتائج الدراسة احصائياً باستخدام التصميم العشوائي الكامل Complete Randomized Design (CRD) لغرض أختبار معنوية الفروقات بين معدلات المعاملات باستخدام اختبار دنكن متعدد الحدود Duncan's multiple test وباستخدام البرنامج الاحصائي الجاهز SPSS.

النتائج والمناقشة

دراسة تأثير المستخلص الكحولي الخام لثمار قشور نبات الرمان والمستخلص القلويدي بوصفهما مواد مضادة لأنقسام الخلايا اللمفاوية لدم الانسان لمدة حضن 24 ساعة.

بينت النتائج إن المستخلص الكحولي الخام لقشور الرمان أدى إلى إيقاف انقسام الخلايا اللمفاوية لدم الانسان وبنسب مختلفة كما في الجدول (1) وأزدادت النسبة مع زيادة التركيز كما في الشكل (2).كانت نسبة الخلايا المتوقفة في الطور الاستوائي (0.30% ، 1.10% ، 2.21% ، 2.53% ، 2.43% ، 2.90%) في التراكيز (125، 205، 500، 1000، 2000، 4000) مايكرو غرام/مل على التوالي. إما النسبة في السيطرة المعاملة بالكولجسين فكانت 4.20%. وكان الفرقُ معنوياً بين نسب الخلايا المتوقفة في جميع التراكيز. عند المعاملة بالتركيز 125 مكغم/مل بلغت نسبة الخلايا المتوقفة 7.14% من السيطرة، وأزادت هذه النسبة إلى 50% عند التركيز 1000 ملغم/مل وازدادت إلى 69.04% عند التركيز 4000 مكغم \مل. لإختبار فعالية المستخلص القلويدي الخام في ايقاف انقسام خلايا ادت المعاملة به الى حدوث زيادة في معدل الانقسام للخلايا اللمفاوية كلما زاد التركيز كما موضحة بالجدول(1). كانت نسبة الخلايا المتوقفة في الطور الاستوائي 0.56% و 1.60% ، 2.33% و 3.33% و 3.50% و 3.83% في التراكيز(125، 250، 500، 1000، 2000، 4000) مايكرو غرام/مل على التوالي. إما نسبة الخلايا المتوقفة في السيطرة فكانت 4.20%. وكان الفرق معنوياً بين نسب الخلايا المتوقفة

DOI : http://dx.doi.org/10.24237/djps.1304.299D
P-ISSN: 2222-8373
E-ISSN: 2518-9255

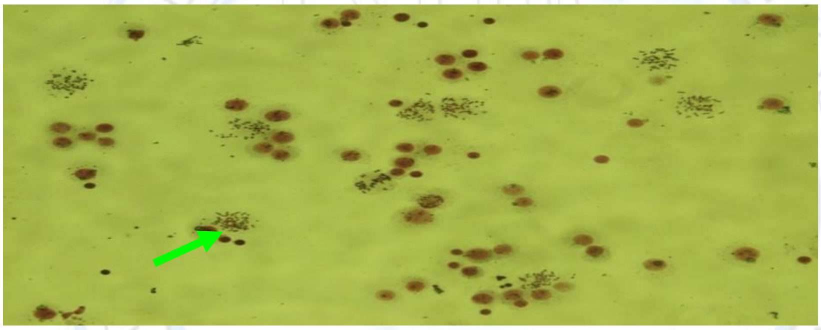
في جميع التراكيز والسيطرة. عند المعاملة بالتراكيز 125 مكغم\مل كانت نسبة الخلايا المتوقفة في الطور الاستوائي 13.33% وازدادت هذه النسبة لتصل 30.09% عند التركيز 250 مكغم\مل واستمرت الزيادة حتى وصلت النسبة.91.19% عند التركيز 4000 مكغم \مل كما موضح بالصور(2,3).

الجدول (1): تاثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي والقلويدي الخام لقشور نبات الرمان في دليل الانقسام الخلايا اللمفاوية لدم الانسان بدلالة الطور الإستوائي المتوقف

التركيز مايكروغرام\مل	المستخلص الكحولي الخام		المستخلص القلويدي الخام	
	نسبة الخلايا في الطور الإستوائي ± الخطا القياسي	النسبة المئوية من السيطرة	نسبة الخلايا في الطور الإستوائي ± الخطا القياسي	النسبة المئوية من السيطرة
السيطرة	0.00±4.20 a		0.00±4.20 a	
125	0.11±0.30 f	7.14	0.56±0.56 f	13.33
250	0.20±1.10 e	26.19	0.11±1.60 e	30.09
*500	0.17±2.21 d	36.42	0.08±2.33 d	55.47
*1000	0.11±2.53 c	50.00	0.08±3.33 c	79.28
2000*	0.17±2.43 c	57.82	0.40±3.50 c	83.33
4000*	0.051±2.90 b	69.04	0.03±3.83 abc	91.19

- **الحروف المختلفة في العمود الواحد تعني وجود فروق معنوية عند مستوى (P<0.05) .**
- **وجود العلامة (*) على الجرعة يعني الاختلاف بين معدل دليل الانقسام لكلا المستخلصين معنويا عند مستوى (P>0.05)**

الصورة (2) طور استوائي متوقف للخلايا اللمفاوية لدم الانسان عند استخدام التركيز 4000 مكغم \مل للمستخلص الكحولي الخام (400X) .



الصورة (3) طور استوائي متوقف لخلايا اللمفاوية لدم الانسان عند استخدام التركيز 4000 مكغم \مل للمستخلص القلويدي الخام (400X) .

من خلال النتائج يمكن الاستدلال على ان المستخلص الكحولي الخام والقلويدي الخام لقشور نبات الرمان له القابلية على ايقاف الخلايا اللمفاوية في الطور الاستوائي ، في هذه الدراسة اثبتت النتائج امكانية استخدام المستخلص الكحولي والقلويدي على استخدامه بوصفه مضادا للسرطانات الصلبة، قد يكون هذا المستخلص او القلويد مشابها للقلويدات المستخدمة في صناعة العقاقير المضادة للسرطان، وقد شاع استخدام القلويدات مثل مركبات paclitaxol المشتق من Taxol الموجود في نبات الطقوس لايقاف الانقسام الخلوي في الطور الاستوائي من خلال عملها على منع ازالة بلمرة النبيبات الدقيقة مسببة اعاقة الدورة الخلوية وايقافها في مرحلة الانتقال بين الطور الاستوائي والانفصالي الذي يصاحبه عدم انتظام اصطفاف الكروموسومات في خط استواء المغزل وتغيير في ترتيب المغزل(15) . يحفز ذلك التأثيرات المباشرة للعقار في المايتوكوندريا اذ يرتبط بالجين Bcl-2 وهذا الارتباط يحفز فسفرة Bcl-2 مما يؤدي الى فتح مسام انتقال النفاذية في المايتوكوندريا PTP (permeability transition pore) مما يسبب تحرير السايتوكورم C ويؤثر ايضاًفي تحرير ايونات الكالسيوم من المخزون داخل الخلوي (16).

استخدمت(17) المستخلصات الخام (المائي، الميثانولي) لأوراق نبات الدفلة *Nerium oleander* والمركب المشخص من هذا النبات هو الأولندرين Oleandrin بدلاً من الكولجسين، سجل وجود انقسام خلوي متوقف في الطور الاستوائي في الخلايا اللمفاوية لدم الإنسان، بنسبة 1.14 عند استخدام المستخلص الكحولي الذي سجل أعلى نسبة مئوية من السيطرة إذ كانت(22.75%).هذا يدل على ان عدد الخلايا المتوقفة في الطور الستوائي كانت اقل مما اثبت في هذه الدراسة.

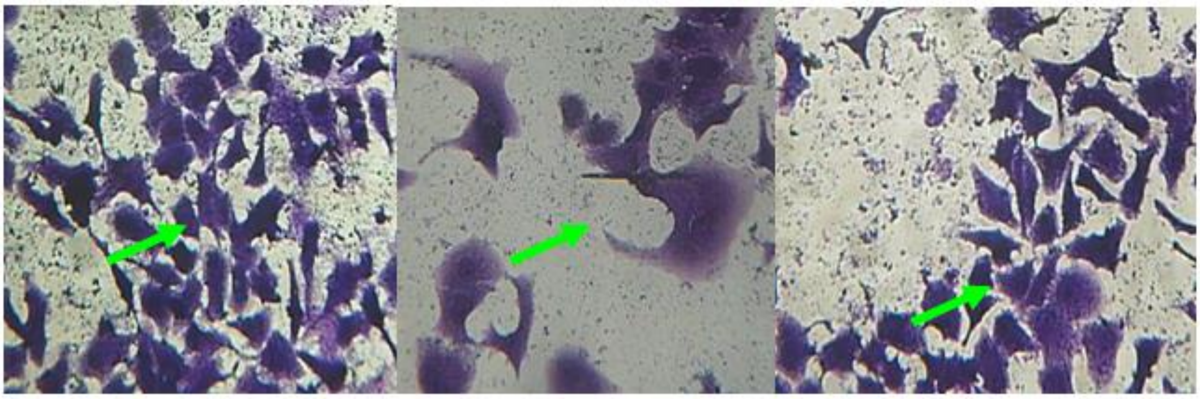
الخط الخلوي السرطاني Hella

يبين الجدول (2) إن لهذا المستخلص الكحولي تأثيراً مثبطاً في نمو الخط الخلوي السرطاني Hella ولمدة حضن 24 ساعة ، بدأ بالتركيز 62.25 مايكرو غرام/مل وبفرق معنوي عن السيطرة إذ بلغت نسبة التثبيط 7.8% عند التركيز 62.25 مكغم\مل وأزدادت إلى 41.28% و 50.50% عند إستخدام التركيزين2000 و4000 مكغم/مل على التوالي، وكانت الفروق معنوية بين جميع التراكيز المستخدمة والسيطرة ما عدا التركيزين 500 و1000 وبين التركيزين 1000و2000 مكغم \مل على التوالي .يبين الجدول نفسه إن للمستخلص القلويدي تأثيراً مثبطاً في نمو الخط الخلوي السرطاني Hella ولمدة تعريض 24 ساعة، بدءاً بالتركيز 62.5 مايكروغرام/مل وبفرق معنوي عن السيطرة إذ بلغت نسبة التثبيط 18.61%، وإزدادت النسبة إلى 61.62% عند التركيز1000 مكغم/مل وتدريجيا إلى 75.08% عند التركيز4000 مكغم/مل. وكان هناك فرق معنويّ بين التراكيز المستخدمة والسيطرة ولم يكن الفرق معنوياً بين التركيزين 62.5 و 125 مايكرو غرام \مل وهناك فرق معنوي بين كافة التراكيز الاخرى كما موضحة بالصورة(4).

جدول 1 : تاثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي والقلويدي لقشور الرمان على نسب التثبيط في الخط السرطاني Hella لمدة تعريض 24 ساعة (المتوسط ± الخطا القياسي).

المستخلص القلويدي الخام نسبة التثبيط± الخطأ القياسي	المستخلص الكحولي الخام نسبة التثبيط ±الخطأ القياسي	التركيز µg/ml
j 0.00± 1.17	h 0.00±1.15	السيطرة
g 0.81± 18.61	g 0.81±7.86	*62.5
f 0.30±20.95	f 0.30± 13.16	*125
e 0.23±34.90	e 0.23±24.89	250
d 0.33±47.73	d 0.33± 31.28	*500
c 1.12± 61.62	c 1.12± 36.21	*1000
b 0.37± 70.46	b 0.37± 41.28	*2000
a 0.60± 75.08	a 0.60±50.50	*4000

- **الحروف المختلفة في العمود الواحد تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى ($P<0.05$)**



A B C

الصورة(4) مقارنة بين خلايا Hella عند تركيز 4000 مكغم/مل بعد 24 ساعة للمستخلص الكحولي والقلويدي.(A) الخط الخلوي السرطاني Hella الذي يمثل السيطرة (B) الخط الخلوي Hella المعامل بالمستخلص الكحولي عند تركيز 4000مكغم/مل ويوضح الفراغات بين الخلايا . (C)الخط Hella المعامل بالمستخلص القلويدي عند تركيز 4000 مكغم/مل ويوضح الفراغات بين الخلايا 400X.

الخط الخلوي السرطاني RD

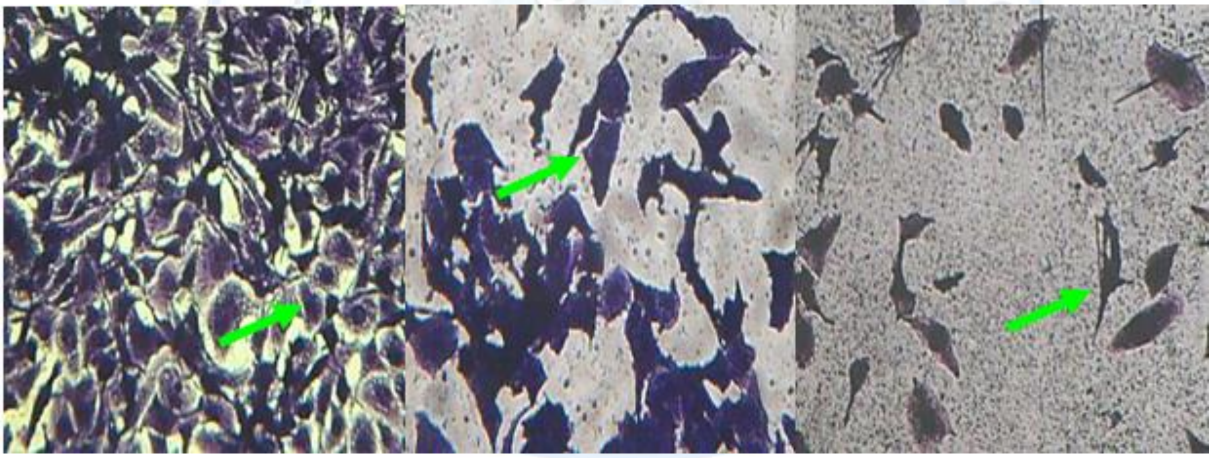
المستخلص الكحولي والقلويدي لقشور نبات الرمان لمدة تعريض 24 ساعة

يبين الجدول (3) إن لهذا المستخلص تأثيراً مثبطاً في نمو الخط الخلوي السرطاني RD بدءاً بالتركيز 62.5 مكغم/مل وبفرق معنوي كبير عن السيطرة بنسبة تثبيط 8.98% وتزداد نسبة التثبيط لتصل إلى 40.15% بفرق معنوي عند التركيز 4000 مكغم/مل. بينما لم يلاحظ فرق معنوي بين التركيزين 62.5 و125 وبين التركيزين 500 و1000وبين التركيزين 1000 و2000 مكغم \مل على التوالي ،اما باقي التراكيز لوحظ فرق معنوي بين التراكيز وبين السيطرة.اوضحت نتائج التحليل الاحصائي إن للمستخلص القلويدي تأثيراً مثبطاً في نمو الخط الخلوي السرطاني RD بدءاً بالتركيز 62.5 مكغم/مل، وبفرق معنوي عن السيطرة بنسبة تثبيط 10.48 %.وازدادت النسبة اذ بلغت67.75 % عند التركيز 4000 مكغم/مل. هناك الفرق معنوياً بين التراكيز كافة والسيطرة كما موضحة بالصورة(5) .

جدول (3): نسب التثبيط في الخط الخلوي السرطاني RD بتأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي الخام والمستخلص القلويدي الخام لقشور الرمان لمدة 24 ساعة.

التركيز µg/ml	المستخلص الكحولي الخام نسبة التثبيط ± الخطأ القياسي	المستخلص القلويدي الخام نسبة التثبيط ± الخطأ القياسي
السيطرة	J 0.00±1.14	h 0.00± 1.15
*62.5	fg 0.33±8.98	g 0.36± 10.48
*125	f 0.33± 9.99	f 0.31±13.13
*250	e 1.40±12.53	e 0.79±17.08
500	d 0.33± 17.53	d 0.63±21.35
1000	c 3.18± 23.82	c 1.36± 32.81
*2000	b 0.48± 31.71	b 1.20±52.86
*4000	a 1.99±40.15	a 0.59± 67.75

- الحروف المختلفة في العمود الواحد تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى (P>0.05) بحسب اختبار دنكن متعدد الحدود.



A B C

الصورة (5) المقارنة بين خلايا RD عند تركيز 4000 مكغم/مل بعد 24 ساعة تعرض للمستخلصين الكحولي والقلويدي لقشور الرمان. (A) الخط الخلوي RD الذي يمثل السيطرة ويوضح خلايا الخط الكثيفة. (B)الخط الخلوي RD المعامل بالمستخلص الكحولي عند تركيز 4000 مكغم/مل ويوضح الفراغات بين الخلايا . (C)الخط الخلوي RD المعامل بالمستخلص القلويدي عند تركيز 4000 مكغم/مل ويوضح الفراغات بين الخلايا 400X.

ان نتائج هذه الدراسة تؤيد ما توصلَ إليه العديد من الباحثين في دراسات محلية حول امتلاك المستخلصات النباتية فعالية مضادة للخلايا السرطانية، وتعتمد هذه الفعالية بشكل أساس على التركيز المستخدم من هذه المركبات ونوع المستخلص ومدى حساسية الخلايا السرطانية..وجدَ تباينٌ بين تأثير المستخلصات الخام في خطوط الخلايا المدروسة، قد يعود إلى طبيعة المركبات الموجودة في كل مستخلص وتفاعلها مع الطبيعة الايضية لكل نوع من الخلايا (19)، كما يعزى التباين في استجابة الخلايا السرطانية تجاه المستخلصات المستخدمة إلى تباين المستقبلات الموجودة على سطح الخلايا بين نوع وأخر من المستخلصات(20). أظهرت المستخلصات الخام بشكل عام تأثيرات تثبيطية في خلايا Hella وRD معتمدة التركيز وعلى مدة التعريض ، فقد كانت حيوية هذه الخلايا تنخفض بشكل معنوي مع إزدياد التركيز ، إذ يلاحظ فيها ارتفاع الفعالية التثبيطية لتلك المستخلصات مع زيادة التركيز ، وهذا كان واضحاً ولا سيما في حالة المستخلص القلويدي الذي أبدى فعالية أعلى من المستخلص الكحولي في هذه الخلايا . و يرجع سبب ذلك إلى احتواء هذه المستخلصات على مركبات تؤثر في الحالة الفسلجية لهذه الخلايا ، و احتوائها على مركبات تعمل على إيقاف دورة الخلايا السرطانية Arrest cell cycle عند طور معين وتمنعها من الانقسام(21) ، أو احتوائها على مركبات تحفز الخلايا السرطانية على الموت المبرمج Apoptosis. قد تؤثر المستخلصات في كل من الخلايا الطبيعية والسرطانية (22) وقد يتباين تأثرهما. في هذه الدراسة حقق كل من المستخلصين الكحولي الخام والقلويدي الخام، أعلى نسبة تثبيط في خلايا Hella عند التركيز 4000 مكغم/مل إذ كانت 50.50% و 75.08% على التوالي، بينما كانت نسبة التثبيط في الخط الخلوي RD 40.42% و 67.85% على التوالي. وكان الفرق بينهما معنويا في الجرعات الأدنى من ذلك فقد حقق المستخلص الكحولي الخام نسبة تثبيط أعلى من القلويدي الخام ويعزى ذلك إلى اختلاف كمية المكونات الموجود في وحدة الحجم في كل منهما، كما إن تقارب المستخلصين في الجرعات العالية يعود إلى مركبات أخرى تعمل تآزرياً مع القلويدات عند تلك الجرعات وهذا يشير إلى إن فضل المستخلص قد يعود إلى القلويدات أيضاً (23). لا يقتصر احتواء قشور الرمان على المركبات الفلافونيدية والصابونينات بل يحتوي على مركبات أخرى تزيد من فعاليته في تثبيط الخلايا السرطانية ومن هذه المركبات التربينات والقلويدية (24). ان الميزة المهمة في أدوية العلاج الكيميائي هي تهديفها الخلايا السرطانية دون الخلايا الطبيعية، لذا ففي دراستنا الحالية، وجدنا إن مستخلصات قشور الرمان تؤثر في دورة انقسام الخلية وبأكثر من آلية، كما إنها تؤثر في الخلايا السرطانية من نوع Hella و RD وتؤثر بنسبة اقل في نمو الخلايا الطبيعية عند التراكيز العالية مما يجعل هذا النبات واعداً في علاج السرطان، فضلا عن توافره وسهولة الحصول عليه.

المصادر

1. Toshio,N:Akiko,K.;Yuasa,M.;and David,o.(2008) Mechanism of growth of inhibitory effect of *blume*.Biochem.772(5)1183-1189.
2. Schmidt,M: and Bastians, H. (2007). Mitotic drug target and development of novel anti-mitotic anticancer drugs. Drug Resistance Updates .10: 162-181.
3. Lopus, M: panda, D. (2006).the enzophenanthridine alkaloid sanguinarine perturbs microtubule assembly dynamic through tubulin binding .A possible mechanism for its antiproliferative activity. J. FEBS. 273 (10): 2139-50.
4. Chakravarty: H.L. (1976).Plant wealth of Iraq A dictionary of economic plants), 1, Botany Directorate, Ministry of Agriculture and Agrarian reform, Baghdad, Iraq.
5. Supayang PV: Treechada S,Surasak L,(2005).Inhibitory effects of active comound from punica granatum pericarp on verocytotoxi production by enderohemorrhagic E colia. J health Sci.51:590-6.
6. Chidambara MK: JayaprakashaGK and Singh RP.(2002).AStudies on antioxidant activity of pomegranate(punica granatum)peel extrac using in vivo models.JAgric food chem.:504791-5.
7. Ricci D:Giamperi L, Bucchini A and Fraternal D.(2006). Antioxidant activity of punica granatum fruits filteapia.77:310-12.
8. Kikuchi, T: Pan, X.andIshi,K.(2013).Cytotoxic and Apoptosis- ctivities of 12-O-Acetylazedarachin B from the Fruits of Melia azedarach Human Cancer Cell Lines.Biol. Pharm. Bull, 36(1): 135–139 .

9. الربيعي ،ابراهيم هادي محمد (2009). تأثير المستخلص المائي والقلويدي الخام للمديد *Convolvulus arvensis* L. في تثبيط الخلايا السرطانية داخل وخارج الجسم، رسالة دكتوراه، كلية العلوم للبنات، جامعة بغداد.

10. Harborne, J.B. (1984). Phytochemical Methods. (2nd ed.), Chapman & Hall, London, P.5 .
11. Cannell: R.J.P.(1998). Natural product isolation, Humana Press, New Jersey, U.K.
12. Freshney, R.I. (2001). Application of cell culture to toxicology. Cell Biology and Toxicology, 17: 213-230.
13. Verma, R.S. and Babu, A. (1989). Human Chromosomes : Manual of Basic Techniques. Pregramon Press, New York.pp.240.

14. Zhu, Huijun, Gooderham. and Nigel, J. (2006). Mechanisms of Induction of cell cycle Arrest and cell Death by cryptolepine in Human lung Adenocarcinoma A549 cells. Toxicological Science.9 : 132-139.

15. Meijer,L.;Shear,J. and Bettayeb,K.(2006)Diversity of intra cellular mechanism inderlying the ant-tumor of indirbin.Roscoff Press.235-246.

16. Hoi,L.;Chan,H.;Nai,K,:and Kwork,N.(2009)Modulatory effect andaction mechanisms of try ptanthrin on murine myloid leukemia cells .cellular and molecular immunology.6(5)335-342.

17. الشيباني، رغد ضياء عبد الجليل (2006).تأثير مستخلصات الدفلة Nerium oleander الخام والنقية في الخلايا الطبيعية وخطوط الخلايا السرطانية النامية في المختبر وفي الحيوانات المختبرية .اطروحة دكتوراه ، كلية العلوم – الجامعة المستنصرية.

18. Dharani: B., (2014). In Vitro Apoptotic And Anticancer Effects Of Prosopis Cineraria Leaves In Breast Cancer.(D. M), India Avinashilingam University For Women.

19. Liu: R.H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. J. Nutr., 134:3479S-3485S .

20. Tor Y: Yazan S., Foo J., Armania N., Cheah Y.K., Abdullah R., Imam U., Ismail N. and Ismail M., (2014) Induction of apoptosis through oxidative stressrelated pathways in MCF-7, human breast cancer cells, by extraction from Punica granatum, BMC Complem. Altern. Med., 14, doi: 10.1186/1472- 6882-14-55.

21. Rao S: and Prasad M., (2013) Punica granatum extract induces apoptosis in the human multiple myeloma cell line - U266B1, Cell Biochem. Biophys., 66, 443 - 450.

22. Sasan,M: Leila, N., and Zahra,A.(2009).Cytotoxic activity of Punica granatum an Iranian endemic plant on human cancer cell line.J.cell and molecular reseatch.8.51-56.

23. Krifa M: Alhosin M., Muller D., Gies J., Chekir- Ghedira L., Ghedira K., Mely Y., Bronner C. and Mousli M., (2013). Punica granatum aqueous gall extract induces apoptosis in human cervical cancer cells involving p16INK4A re-expression related to UHRF1and DNMT1 down-regulation, J. Exp. Clin. Cancer Res. 23-30