Iraqi Journal of Biotechnology, 2015, Vol. 14, No. 2 , 388-402

التأثير السمي الخلوي للمستخلص المائي الخام لنبات عين البزون *Vinca rosea* في خلايا سرطان عنق الرحم البشري(Hela) خارج الجسم الحي

هند حسين عبيد[1]* لقاء حسون صكبان[2] مصطفى نهاد جمعة الداجي[3] رافد محمد كريم[4]
ديمة نزار باصات[1] داليا أزهر أحمد[1]

[1]*قسم علوم الحياة - كلية العلوم - جامعة بغداد – بغداد – العراق
[2]قسم علوم الحياة- كلية التربية للعلوم الصرفة- جامعة كربلاء- كربلاء - العراق
[3]قسم علوم الحياة - كلية العلوم – جامعة الانبار – الأنبار - العراق
[4]مركزدراسات علوم البحار- جامعة البصرة – البصرة – العراق

الخلاصة: شملت الدراسة التحري عن التأثير السمّي الخلوي للمستخلص المائي الخام لنبات عين البزون (أوراق ، أزهار ، بذور) في خط خلايا سرطان عنق الرحم البشري (Human cervix uteri epitheloid carcinoma(Hela))، وذلك من خلال استعمال عشرة تراكيز (بإجراء تخافيف نصفية) تراوحت مابين (1000- 1.95) مكغم/مل ولفترات تعريض (24،48،72) ساعة.
أظهر الكشف التمهيدي الاستدلالي عن المركبات الكيميائية للأجزاء النبات الثلاثة بانها تحتوي على القلويدات والتربينات والفلافونويدات والكلايكوسيدات.

توصلت الدراسة إلى وجود تأثير سمي لمستخلصات عين البزون المائية في الخلايا السرطانية المدروسة (Hela) ولكنه لم يكن تأثيرا" كبيرا" ، فقد بلغت النسبة المئوية لمعدل تثبيط نمو الخلايا السرطانية Inhibitory Rate (IR) ، (46، 37، 40) % للأوراق والازهار والبذور على الترتيب بعد 72 ساعة من التعريض للمستخلصات عند التركيز 1000مكغم/مل ، في حين اعطت التراكيز الواطئة حسب هذه الدراسة معدل تحفيز نمو Proliferation Rate (PR) بلغ 115% لمستخلص الازهارعند التركيز 1.95مكغم / مل. لذلك وحسب هذه النتائج تعد خلايا سرطان عنق الرحم البشري (Hela) خلايا مقاومة لمستخلصات نبات عين البزون المائية وتمتلك فعالية الـ hormetic effect (Hormesis)، وذلك لانها تمتلك القدرة على تحفيز انقسام الخلايا باستخدام التراكيز الواطئ من المسخلص عند التعريض لمدة 72 ساعة.

الكلمات المفتاحية: Hela , *Vinca rosea*, cytotoxicity, Inhibitory Rate

Cytotoxicity Effect of *Vinca rosea* Aqueous Extracts on Human Cervix Uteri Epitheloid Carcinoma Cell Line (Hela) *In Vitro*

Mustafa N. J. Al-Darraji [3] Liqaa H. Saqban [2] Hind H.Obaid [1*]
Dimah N. Passat [1] Dalia A. Ahmed [1] Rafid M. karim [4]

[1*]Dep. of Biology, College of Science, Baghdad University, Baghdad, Iraq
[2]Dep. of Biology, College of education pure Science, Karbala University, Karbala, Iraq
[3]Dep. of Biology, College of Science, Al-Anbar University, Al-Anbar, Iraq
[4]Marine Science Centre, Basrah University, Al-Basrah, Iraq

Abstract: The present of studying included the cytotoxic effects of aqueous crude extracts of *Vinca rosea* leaves , flowers and seeds on Human cervix uteri epitheloid carcinoma cell line (Hela) *in vitro* , by using double dilution series (concentration between 1.95 – 1000 µg/ ml.

The results showed , the cytotoxic effect of extract dependent on amount of dose and exposure time. The concentration 1000 µg/ml gave higher growth inhibition (IR) , were (46, 37 and 40) % to leafs, rose and seeds respectively compared with control 100% after 72 hours from exposure time.

However low concentrations of aqueous extracts were found to induce the Hela cells growth and proliferation (PR), it was 115% by treatment with rose extract in 1.95 µg/ ml.

According to the results, the Hela cells were resistant to crud aqueous extract of *Vinca rosea*, and also have hormetic effect (Hormesis) , because they induced the proliferation of cancer cells by used low concentration of extract after 72 hours exposure time .

Key Words: Hela , *Vinca rosea*, cytotoxicity, Inhibitory Rate

***E- mail Hind _3000 @Yahoo.com**

المقدمة

برز مرض السرطان بوصفه أحد المسببات الرئيسة للوفيات في العالم ، إذ يعد من الأمراض الخطيرة التي تقضي على حياة الملايين من البشر سنوياً ، ويصيب مرض السرطان رجلاً واحداً من بين كل إثنين منهم خلال فترة حياتهم ، ويصيب امرأة واحدة من ثلاث منهن ، في حين يسبب وفاة امرأة واحدة من بين كل أربع منهن (1) ، لذلك بذل العلماء والباحثون جهوداً كبيرة من أجل تطوير أساليب وأنواع العلاجات ، محاولةً منهم للقضاء عليه وإنقاذ حياة الإنسان. ظلّ مرض السرطان عصياً على العلماء بالرغم من وجود عدة أساليب للعلاج ، فهناك العلاج الكيميائي والفيزيائي والجراحي ، لكن لم تكن هذه العلاجات مقنعة للأطباء ولا للمريض نفسه . لذلك اتجهت المراكز البحثية والباحثون إلى إيجاد علاجات بديلة أخرى للعلاجات الحالية ، و اتخذت منحى آخر ربما يكون فيه الأمل الكبير للقضاء على هذا المرض تكلف الأدوية التجارية مبالغ كبيرة في استيرادها فضلاً عن أن استعمالها المستمر في العلاج يفقدها فعاليتها تدريجياً بسبب مقاومة الخلايا السرطانية لها (2) ، لذا أولت الكثير من دول العالم اهتماماً كبيراً بنباتاتها باعتبارها المصدر الطبيعي للأدوية (3). إن إكتشاف الفعالية المضادة للسرطان

Anticancer لقلويدات نبات عين البزون أكسبه أهمية طبية كبيرة ، فهذه القلويدات تعد عوامل معالجة كيميائية Chemotherapy agents لمختلف أنـواع السرطانات البشرية (4,5, 6)، إذ اكتشف حوالي 75 نوعاً من القلويدات بعض منها ذو فعالية مضادة للسرطان أهمها الفنبلاستين والفنكرستين (7) ، فضلا" عن إستعمال هذا النبات في معالجة داء السكري(8,9) . كما أُجريت بحوث عديدة لإستعمال مستخلص النبات في معالجة الأمراض المايكروبية مثل الاسهال والأصابات الجلدية (11, 10) . تحتل مثبطات الانقسام الخيطي ومنها قلويدات الفينكا Vinca alkaloids المشتقة من نبات عين البزون *Vinca rosea* (= *Catharanthus roseus*) ، مكانة خاصة بين أصناف العلاج الكيمياوي المستعمله في علاج أنواع عديدة من أمراض السرطان (13 ,5,12) ومن هذا المنطلق ولغرض تعزيز دراسة تأثير مستخلصات النباتات الطبيعية الموجودة في البيئة العراقية ضد بعض خطوط الخلايا السرطانية كخطوة أولى لاستكشاف فعاليتها المضادة للسرطان ،حيث صممت هذه الدراسة لمعرفة تأثيرالمستخلصات الخام لنبات عين البزون *Vinca rosea* الموجودة في البيئة المحلية العراقية في تثبيط نمو خط خلايا سرطان الرحم البشري (Hela – cells).

المواد وطرائق العمل :

- **جمع النبات**

تم جمع نبات عين البزون *Vinca rosea* المزروع بوصفه نبات زينة في حدائق كلية التربية / جامعة كربلاء ، وقد صنف النبات من قبل المعشب الوطني العراقي /الهيأة العامة لفحص وتصديق البذور التابع لوزارة الزراعة. بعد جمع النبات و تنظيفه غُسِل بالماء جيداً ، وفصلت الأجزاء النباتية (الأوراق والأزهار والبذور) وتركت لتجف في الظل وبدرجة حرارة الغرفة ضمن محيط جاف جيد التهوية لمنع تلف النماذج ، وبعد جفاف هذه الأجزاء الثلاثة تم طحنها طحناً ناعماً بمطحنة كهربائية ، ثم حُفظت الأجزاء المطحونة في حاويات بلاستيكية نظيفة بعيداً عن الضوء والحرارة والرطوبة لحين الاستعمال.

- **تحضير المستخلصات المائية الخام لنبات عين البزون**

حُضر المستخلص المائي باردا حسب الطريقة المتّبعة من قبل هاربورن وجماعته (14) ، فقد أخذ 50 غم من المسحوق الجاف لكل جزء من النبات وأضيف اليه 250 من الماء وترك المزيج علي جهاز المحرك المغناطيسي magnetic stirrer بدرجة حرارة الغرفة ولمدة 3 أيام ،بعدها رشح المزيج بالشاش ثم بورق الترشيح (Whatman No.1) ، بعدها جفف الراشح للحصول على المسحوق الجاف والذي حضر منه التراكيز المطلوبة .

- **الكشف الكيميائي الاستدلالي عن المركبات الفعالة**

تم تحديد انواع مركبات الايض الثانوي الكيميائية الموجودة في المستخلصات النباتية المدروسة (القلويدات والتربينات والفلافونويدات والكلايكوسيدات)، إعتمادا" على ماورد في (14).

- **دراسة التاثيرات السمية لمستخلصات نبات عين البزون في نمو خط خلايا سرطان عنق الرحم البشري Hela- cell line**

❖ **نوع الخلايا السرطانية المدروسة**

تم إستعمال خط خلايا سرطان عنق الرحم البشري بالتمريرة رقم (225)، فقد تم الحصول عليه من مختبر الصحة المركزي ، في حين تم إجراء التجربة في المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية. تم تنمية الخلايا بوسط MEM المزود بـ(5%) من مصل العجل الجنيني (FCS).

❖ **التأثيرات السمية الخلوية**

إستخدمت أطباق الزرع النسيجي ذات الحفر المتعددة (96-Microtiter plates) والقعر المسطح (Flat Bottom) لاجراء هذا الاختبار، وتضمنت التجربة ثلاثة مراحل:

1- زرع أو بذار الخلايا Cell Seeding

- بعد ان تمت عملية تنمية وتكثير الخلايا السرطانية، أخذت الاوعية ذات النمو الكامل، وتم قلع(حصد) الخلايا باستعمال محلول الـتربسين – فرسين (T.V).
- أضيف (20) مل من الوسط الزرعي المزود بالمصل الى كل وعاء (حسب نوع الخلايا) ومزج بصورة جيدة، بعدها عُدت الخلايا باستعمال شريحة عد خلايا الدم (Haemocytometer) باستخدام صبغة التريبان الزرقاء (1%) وحسب ماأشار اليه Freshney (15).
- أخذ (0.1) مل بوساطة الماصة الدقيقة من عالق الخلايا ووضع في كل حفرة من حفر الطبق إذ احتوت كل حفرة على (1×10^4) خلية/حفرة، ثم تمت تغطية سطح حفر الطبق بورق لاصق شفاف معقم خاص لهذا الغرض وحُرِّك الطبق بلطف، حضن بعدها بدرجة حرارة (37)° م الى اليوم التالي للسماح بالتصاق الخلايا (Cell attachment).

2- معاملة (تعريض) الخلايا السرطانية بالمستخلص النباتي Exposure

- في اليوم التالي للزرع (Seeding)، تمّ عمل تخافيف نصفية متسلسلة في أنابيب اختبار معقمة لكل نوع من المستخلص النباتي باستعمال الوسط الزرعي الخالي من المصل (SF -MEM)، وبدأت التخافيف من (2/1 ← 1024/1) وبصورة تدريجية التي أعطت التراكيز من(1000 ← 1.95 مكغم /مل)على التوالي، مع مراعاة تحضير التخافيف آنياً عند العمل. سكب الوسط الزرعي من حفر أطباق الزرع النسيجي بعد رفع اللاصق، وعد العمود رقم (1) كسيطرة سالبة، فقد أضيف له (0.2) مل من الوسط الزرعي الخالي من المصل، أما الاعمدة من (2 ← 12) فقدأضيفت لها تخافيف مستخلصات نبات عين البزون المحضرة بحجم (0.2) مل/حفرة/ من كل تركيز) ، ثم أعيد وضع طبقة جديدة من الورق اللاصق على سطح الطبق.
- حضنت الأطباق بدرجة حرارة (37مْ) ، أما فترات التعريض (Exposure time) فكانت (24، 48، 72) ساعة.

3- الكشف عن التأثير السمي Cytotoxicity Assay

إستخدمت صبغة البنفسج البلوري (crystal violet stain) للكشف عن التأثير السمي الخلوي للمستخلصات في الخلايا السرطانية وعلى وفق الآتي :

- بعد انتهاء كل فترة حضن، أخذت الأطباق وسكبت محتوياتها، ثم غسلت بمحلول دارئ الفوسفات (PBS)، ثم أضيف (0،1) مل من صبغة البنفسج البلوري (المحضرة حسب ماجاء في (16)) ،الى كل حفرة من حفر الطبق ،وتركت لمدة (20) دقيقة.غسلت بعدها الخلايا بمحلول PBS مرات عدة لحين زوال الصبغة الزائدة، بعد جفاف الأطباق تماما قرئت النتائج باستخدام جهاز المطياف الضوئي الخاص بأطباق المعايرةالدقيقة (ELISA microplate spectrophotometer)، عند طول موجي مقداره (492) نانوميتر.
- تم حساب معدل تثبيط نمو الخلايا السرطانية (Inhibitory Rate/I.R) وفق المعادلة المشار اليها في (17) وكالاتي :

$$IR\% = \frac{A - B}{A} \times 100$$

كما حُسب معدل تحفيز النمو (Proliferation Rate/ PR) وفقاً لـ (18) وكالآتي:

$$PR\% = \frac{B}{A} \times 100$$

حيث ان:

IR = النسبة المئوية لمعدل التثبيط

PR= النسبة المئوية لمعدل التحفيز.

A = الكثافة الضوئية للسيطرة السالبة.

B = الكثافة الضوئية لمجموعة الاختبار.

النتائج :

- **الكشف الاستدلالي للمركبات الكيميائية الفعالة**

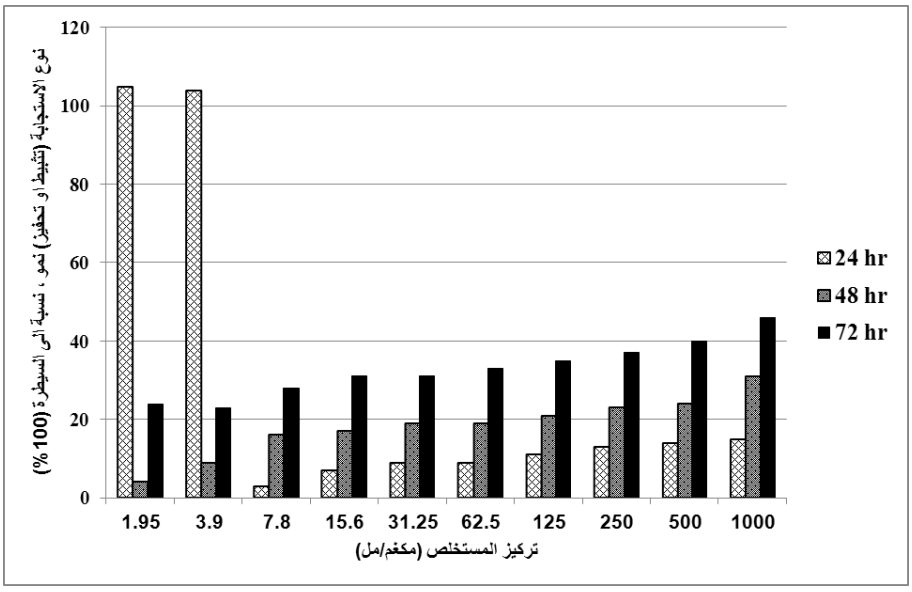
أظهرت نتائج الكشف عن المواد الكيميائية في مستخلصات نبات عين البزون المائية أنها تحتوي على القلويدات والتربينات والفلافونويدات والكلايكوسيدات.

- **التأثيرات السمية لمستخلصات نبات عين البزون في خلايا سرطان عنق الرحم البشري (Hela).**

- التأثير السمي لمستخلص الأوراق.

درس التأثير السمي لمستخلص أوراق نبات عين البزون في خلايا سرطان عنق الرحم البشري بالتمريرة رقم (225) . بنيت النتائج الموضحة في الشكل (1) أن التأثير التثبيطي لم يكن كبيراً ، فقد بلغت أعلى نسبة مئوية لتثبيط النمو 46 % عند التركيز 1000مكغم / مل من المستخلص بعد 72 ساعة من التعريض ، ويبدأ التثبيط يقل كلما انخفض التركيز.أما التراكيز الواطئة فأنها أدت الى تحفيز نمو الخلايا ، فقد بلغت نسبة الخلايا الحية 105 % عند التركيز1,95 مكغم / مل بعد 24 ساعة من المعاملة مقارنة بالسيطرة 100 % .

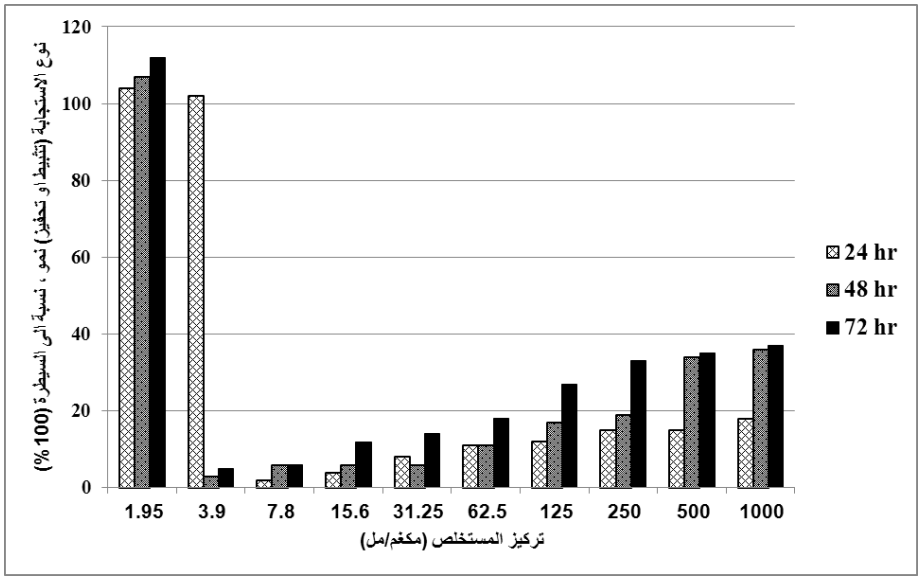
كذلك يلحظ ان التأثيرالسمي التثبيطي بعد 24 و 48 ساعة من المعاملة بالمستخلص النباتي كان ضعيفا" حتى عند استعمال التراكيز المرتفعة فقد بلغت أعلى نسبة تثبيط نمو 31% (نسبة عيوشية viability مقدارها 69 %) عند التركيز 1000مكغم /مل و48 ساعة من المعاملة.



الشكل (1): تأثير مستخلص الأوراق المائي لنبات عين البزون في النسبة المئوية لحيوية خلايا سرطان عنق الرحم البشري Hela بعد التعريض لفترات زمنية مختلفة.

- **التأثير السمي لمستخلص الأزهار.**

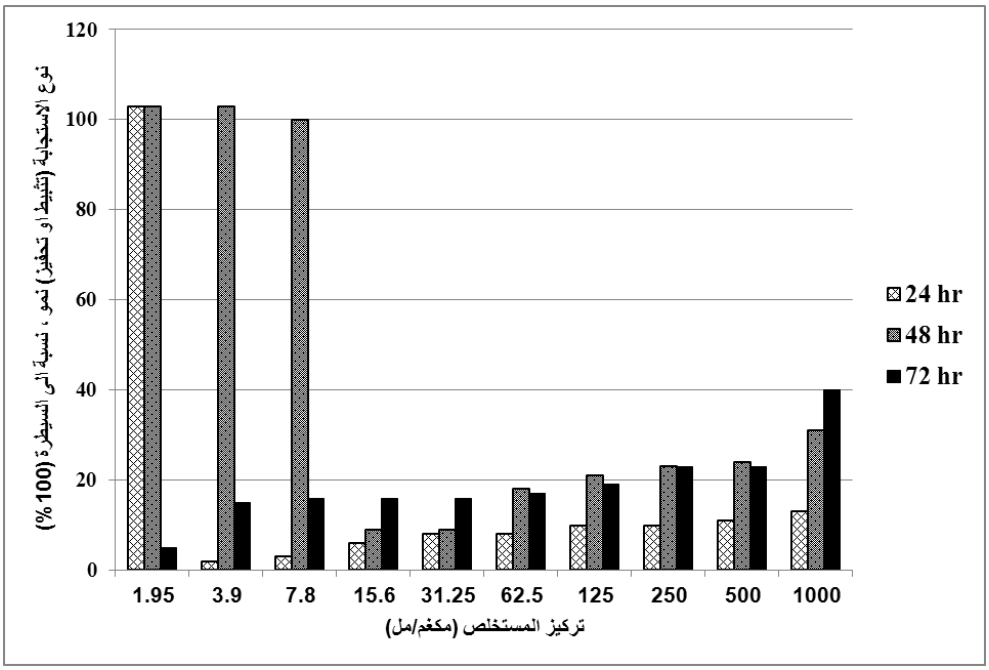
أظهرت نتائج معاملة خلايا Hela بمستخلص أزهار نبات عين البزون ، أن التأثير السمي التثبيطي يكون في اليوم الثاني والثالث للتعريض وبالتراكيز المرتفعة فقط (500 و1000) مكغم /مل ، اذا تراوحت نسبة تثبيط النمو مابين (34-37) % ، الشكل (2). أما نسبة تثبيط النمو بعد 24 ساعة من التعريض فقد كانت ضعيفة ولجميع التراكيز المستعملة. اما فيما يخص تحفيز النمو (معدل التكاثر Proliferation Rate) فقد بلغت أعلى قيمة له 112% نسبة الى السيطرة 100% عند استخدام أقل التراكيز حسب هذه الدراسة 1.95 مكغم / مل بعد 27 ساعة من التعريض للمستخلص.



الشكل (2) :تأثير مستخلص الأزهار المائي لنبات عين البزون في النسبة المئوية لحيوية خلايا سرطان عنق الرحم البشري Hela بعد التعريض لفترات زمنية مختلفة.

- **التأثير السمي لمستخلص البذور.**

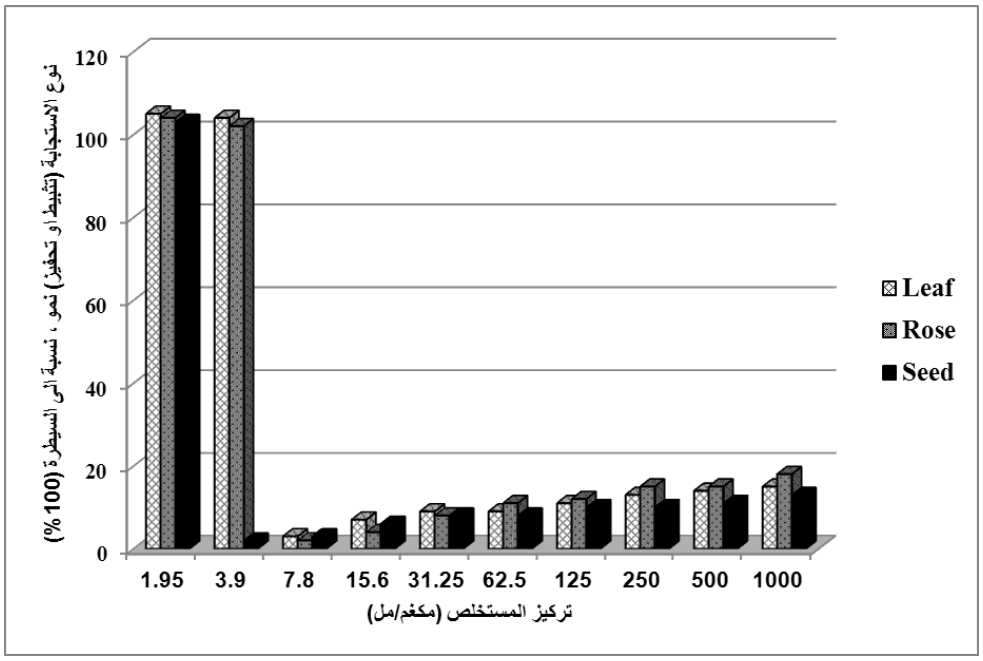
تأثير مستخلص بذور نبات عين البزون في خلايا سرطان الرحم البشري شابه في إطاره العام نوعي المستخلصين السابقين (الاوراق والازهار) .فقد ظهر التأثير السمي الأفضل بعد 72 ساعة من المعاملة، وبلغ 40% اي بنسبة حيوية 60% عند أعلى التراكيز المستخدمة 1000مكغم / مل اي انه كان ضعيفا". فضلا" عن ذلك كان التأثير المحفز للنمو ضعيفا" كذلك ، فقد بلغ 103% عند أوطأ التراكيز بعد 24 و48 ساعة من المعاملة.شكل (3).



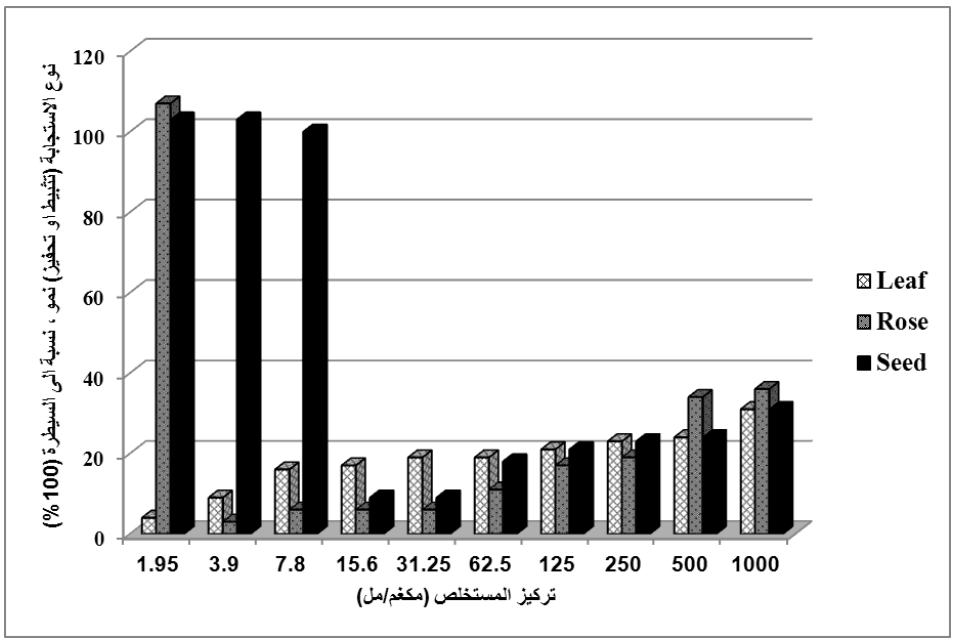
الشكل (3) :تأثير مستخلص البذور المائي لنبات عين البزون في النسبة المئوية لحيوية خلايا سرطان عنق الرحم البشري Hela بعد التعريض لفترات زمنية مختلفة.

- **مقارنة تأثير فترة التعريض في حيوية خلايا سرطان عنق الرحم البشري لأنواع المستخلصات الثلاث المدروسة .**

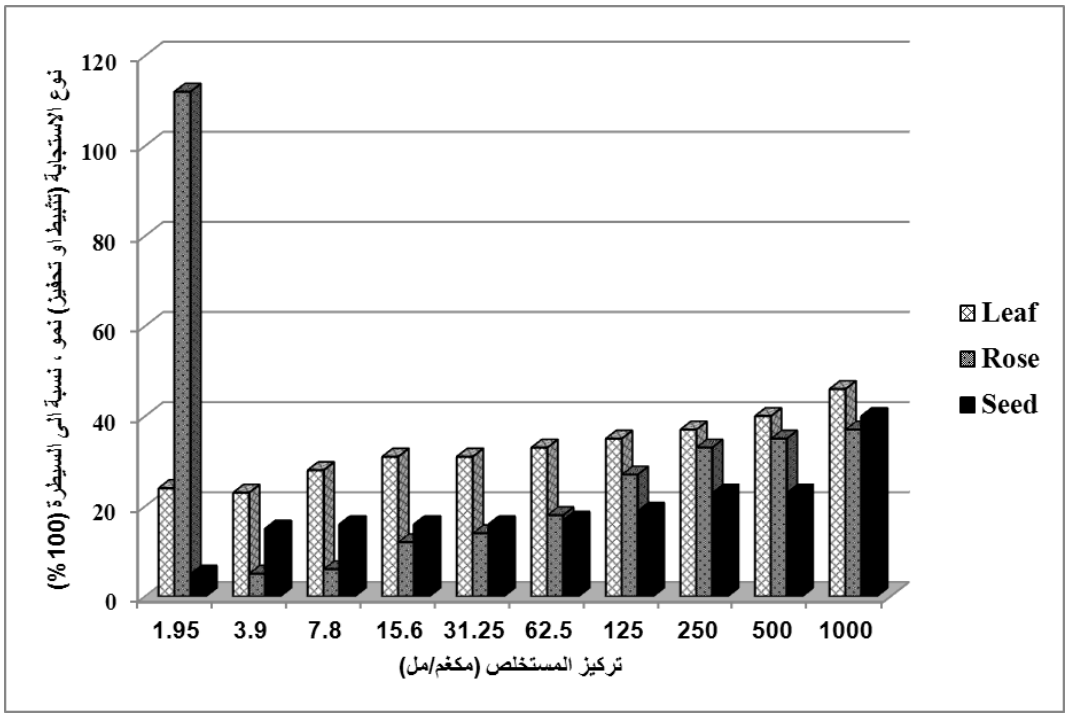
عند اجراء مقارنة بين حيوية انواع المستخلصات الثلاث المدروسة (الأوراق و الأزهار و البذور) في كل فترة زمنية للتعريض ، وجد بعد الـ 24 ساعة الأولى من المعاملة أن نسب التثبيط كانت منخفضة جدا" ، فقد بلغت حيوية الخلايا (85 و 82 و 87)% اي بنسب تثبيط نمو مقدارها (15 و 18 و13)% للمستخلصات الثلاث المدروسة على الترتيب وعند أعلى التراكيز المعاملة بها 1000مكغم / مل (الشكل 4) . فضلا" عن ذلك كانت نتائج التعريض لمدة 48 ساعة مشابها في أطارها العام لنتائج التعريض بعد 24 ساعة، فقد بلغت نسب تثبيط النمو (31 و 36 و 31)% لأنواع المستخلصات الثلاث على الترتيب (الشكل 5).أما عن افضل نسبة تُثبيط نمو فقد ظهرت خلال 72 ساعة من المعاملة ، وان التركيز 1000 مكغم/ مل قد أعطى أفضل النتائج لنسبة التثبيط (46 و 37 و 40) % أي بنسبة عيوشية مقدارها (54 ، 63 و 60) % على الترتيب مقارنة بالسيطرة 100% (الشكل 6) .لذلك تعد خلايا سرطان عنق الرحم البشري المدروسة خلايا مقاومة للمستخلصات المستعملة بسبب بقاء حيوية الخلايا السرطانية بنسب مرتفعة.



الشكل (4) : مقارنة تأثير المستخلصات المائية لنبات عين البزون في النسبة المئوية لحيوية خلايا سرطان عنق الرحم البشري Hela بعد 24 ساعة من المعاملة.



الشكل (5) : مقارنة تأثير المستخلصات المائية لنبات عين البزون في النسبة المئوية لحيوية خلايا سرطان عنق الرحم البشري Hela بعد 48 ساعة من المعاملة.



الشكل (6) : مقارنة تأثير المستخلصات المائية لنبات عين البزون في النسبة المئوية لحيوية خلايا سرطان عنق الرحم البشري Hela بعد 72 ساعة من المعاملة.

المناقشة

نظراً لأهمية إيجاد مواد فاعلة ضد مرض السرطان وإيجاد المزيد من أنواع النباتات التي تمتلك تلك المواد ، فقد تم اختيار نبات عين البزون *Vinca rosea* الذي يعد واحداً من النباتات الطبية المتوفرة محلياً الذي يمتلك خواص علاجية مختلفة ، وذلك للتعرف على تأثيرات المستخلصات المائية الخام في خلايا سرطان عنق الرحم البشري ومدى إمكانية استخدام هذه المستخلصات كمواد علاجية طبية ضد السرطان مستقبلاً.

يعُد إختبار الكشف عن التأثيرات السمية لمادة ما في الخلايا السرطانية في الزجاج أحد االتقانات المهمة التي يتم اعتمادها مبدئياً في التحري عن امتلاك تلك المواد تأثيراً قاتلاً تجاه هذه الخلايا الخبيثة ، التي قد تعقد عليها الآمال كعلاج مستقبلي .

تم في هذة الدراسة التحري عن مدى التأثيرات السمية للمستخلصات المائية لنبات عين البزون بأنواعها الثلاث (اوراق ، أزهار ، بذور) في خلايا سرطان عنق الرحم البشري Hela ، خلال ثلاث فترات زمنية للتعريض (24 ، 48 ، 72) ساعة، بأستخدام سلسلة تخافيف ثنائية بتراكيز تدريجية تراوحت ما بين (1.95 – 1000) مكغم / مل.

إستخدمت طريقة التصبيغ بالبنفسج البلوري في الكشف عن التأثير السمي ، من خلال التحري عن عدد الخلايا الحية ، ولأجله قيست الكثافة الضوئية عند طول موجي 492 نانوميتر و شدة اللون هو تعبيرعن عدد الخلايا الحية . اما تقييم مدى التأير السمي ، فتم اعتماداً على استخراج النسبة المئوية لمعدل تثبيط النمو (IR) مقارنة بالسيطرة التي يعد معدل نموها (100 %) ، كما إستخرج معدل تحفيز النمو(PR) حسب المبدأ نفسه .

تحتوي مستخلصات نبات عين البزون على العديد من المركبات وحسب ماظهر في الكشف الكيميائي الاستدلالي وجود القلويدات واالتربينات والفلافونويدات والكلايكوسيدات التي قد تساهم معاً بقتل الخلايا السرطانية بفعالية أفضل نتيجة العمل التآزري فيما بينها مما قد يقلل من سمية المركبات النقية المستعملة.

وُجد من خلال نتائج الدراسة أن المستخلصات الخام لعبت دوراً في قتل الخلايا السرطانية وتثبيط نموها وانقسامها خارج الجسم الحي ، فقد أشارت النتائج أن التأثير السمي لنبات عين البزون في خلايا سرطان عنق الرحم البشري (Hela) إعتمد بصورة أساس على التركيز المستخدم ومدة التعريض ، ولم يكن لنوع المستخلص المستعمل دوا" في التأثير، بمعنى آخر ليس هناك فرق ملحوظ مابين مستخلص الأوراق والازهار والبذور. من جانب آخر يلحظ ان هذا النوع من الخلايا السرطانية وحسب نتائج هذه الدراسة تعد مقاومة للمستخلاصات المائية العلاجيية المحضرة ، فبالرغم من أنها سببت تثبيط نمو الخلايا ، إلا أن التثبيط لم تتجاوز نسبته المئوية الـ 46% في مستخلص الأوراق وبعد 72 ساعة من المعاملة.

توصلت دراسة اجريت من قبل ياسين وجماعته (19) تم فيها المقارنة بين نوعي المستخلصين الكحولي والمائي ، فوجد أن المستخلصات الكحولية أكثر فعالية من مثيلاتها المائية في خلايا Hep-2 .قد يعود ذلك الى إن نسبة المادة الفعالة التي تم استخلاصها بالكحول الاثيلي (70 %) تكون اكبر مما هو عليه عند استخدام المستخلص المائي وهذا ما أشار إليه هاربورن وجماعته (14) .

تحتوي المستخلصات الخام لنبات عين البزون على نسبة مرتفعة من القلويدات، إذ تعد خزيناً لأكثر من 75 نوعاً منها (20) ، فضلاً عن وجود التربينات والفينولات (21) والكثيرمن العناصر المعدنية (22) . تتباين نسبة النواتج الأيضية الثانوية الموجودة في النبات تبعاً لنوع العضو النباتي (أوراق ، أزهار ، بذور) ، كما تتأثر هذه النسبة بألعوامل البيئية المحيطية (21).

تعد القلويدات من أهم وأكثر المواد الفعالة الموجودة في تلك المستخلصات ، أما آلية عملها فتكون من خلال تثبيط عملية الإنقسام الخيطي ، لتبقى الخلايا في الطور الإستوائي Metaphase وذلك بوساطة منع بلمرة بروتين التيوبيولين Tubulin المسؤول عن تكوين خيوط المغزل (13,23,24) . فضلاً عن ذلك تعمل القلويدات على تثبيط بناء الأحماض النووية خارج الجسم الحي (25,26).

كما أشارت العديد من الدراسات السابقة التي قام بها الباحثون الى امتلاك قلويدات عين البزون فعالية ضد الخلايا السرطانية ، ومنها خلايا سرطان عنق الرحم البشري Hela cells، إذ تسبب التراكيز الواطئة منها تثبيط عمل خيوط المغزل (27,28) .

من جانب آخر أكد الباحثان Parekh و Simpkins (29) إن هذه القلويدات تؤثر في خطوط الخلايا اللمفاوية السرطانية للجرذ وفي خطوط خلايا سرطان المبيض البشري التي تتميز بمقاومة العلاجات الكيميائية الشائعة الاستعمال كالـ Cisplatin ، فضلاً عن كونها أكثر فعالية من الـ Taxol و Adriamycin . أما سمّية هذه المركبات تجاه خلايا سرطان الدم Leukemia L1210 فهي مرتبطة بدرجة تأثيرها على بروتين Tubulin T وترتيبه المغزلي (30,31) .

أما فعالية المركبات الفينولية ومنها الفلافونويدات (Flavonoids) فيكون من خلال إمتلاكها فعالية مضادة للأكسدة (Antioxidant) إذ تعمل على إزالة الجذور الحرة المتولدة ، وتُوَّجه الخلية للدخول في مرحلة الموت المبرمج (32) ، ومن الأمثلة عن الخلايا السرطانية التي وجد أنها حساسة للمركبات الفينولية هي خلايا سرطان الحنجرة

البشري Hep-2 وخلايا سرطان عنق الرحم Hela وسرطان الدماغ البشري AMGM والقولون والبروستات البشرية(30 ,33 ، 34).

تعمل العديد من المركبات الفعالة باتجاهين متعاكسين اعتمادا على التركيز المستخدم ، فكما يلحظ من خلال النتائج المذكورة إن التراكيز المرتفعة قد ثبطت نمو خلايا Hela ، في حين حفزت التراكيز الواطئة من نمو تلك الخلايا فإزدادت الحيوية وإن كانت الزيادة بنسب قليلة تراوحت مابين (103- 112)% نسبة الى السيطرة (100%) ، وهذا يشير الى ان المستخلص قيد الدراسة يمتلك تأثير (Biphasic effect) [35]. او مايسمى Hormetic effect ، فهناك الكثير من المركبات الكيميائية العلاجية و المضادات الحياتية والسموم تنقاد في عملها لظاهرة الـ Hormesis(هي ظاهرة بايولوجية شائعة في علم السموم) ، اذ تعمل بتراكيز واطئة على التحفيز مماقد يكون مفيداً للكائن الحي لاسيما عند تنشيط الخلايا المناعية ، في حين تسبب الجرعات العالية تثبيط جزئي او كلي للخلايا (36) تظهر هذه الحالة نتيجة فعل بعض المركبات المضادة للسرطان مثل Mitomycin C و Bleomycin و Actinomycin والمضادات الحيوية والمضادات الفيروسية (37) ، فضلا" عن مبيدات الأعشاب والمبيدات الحشرية والفطرية والطفيلية(38) وبعض الهيدروكربونات والعناصر المعدنية (39) ، كذلك ينتج عن بعض العوامل الفيزيائية كالأشعة المؤينة (40) والأشعة الكهرومغناطيسية (41) ،ودرجات الحرارة الواطئة (42) وغيرها من العوامل.

أوضحت النتائج إن الفترة الزمنية التي تتعرض خلالها الخلايا السرطانية للمستخلصات تلعب دوراً في تحديد شدة التأثير التثبيطي ، إذ يزداد التأثير السمي بزيادة الفترة الزمنية ، فقد كانت النسب المئوية للتثبيط قليلة جدا بعد 24 ساعة الأولى من التعريض ثم أرتفعت بصورة ضئيلة بعد 48 ساعة ، في حين ظهر التثبيط بنسبة أعلى بعد 72 ساعة وفي الجرع المرتفعة فقط.

ومن الجدير بالذكر ان المستخلص المستخدم في هذهِ الدراسة هو مستخلصاً خاماً ، اي انه يحوي العديد من انواع المركبات الفعالة التي تم التطرق الى فعاليتها او التي لم يرد ذكرها ، مما يدعم نتائج ظهور التضادية في التأثير على الخلايا السرطانية اعتماداً على التركيز المستخدم. فمن المحتمل ان يكون تأثيره على المادة الوراثية باتجاهين ، الاول يسبب تثبيط لجينات معينة ، في حين يحفز الاخر النمو و التضاعف.

ومما يجب التطرق اليه ، ان تاثير المواد المضادة للسرطان لايختلف حسب نوع الخلايا فقط ، و انما حسب تمريره الخلايا Passag وذلك بسبب حدوث طفرات بالمادة الوراثية بعد عدة تمريرات (43).وبذلك سوف تختلف المستضدات الخلوية للخلايا السرطانية فضلاً عن خصائصها الاخرى. اما عالمياً فتدرس الخلايا الام او التمريرات القريبة منها تلافياً لذلك .فضلاً عن ان الخلية السرطانية الام المعزولة من المريض تتلف وراثياً ومستضدياً عن تلك التي نميت لفترات طويلة فالهيئة الكروموسومية لاتشبه ماموجود في الخلايا الاصل التي نشات منها، مما ينتج عنها اختلاف الاستجابة للمادة العلاجية المدروسة (44). لذلك تعد هذهِ النتائج دليل اولي على وجود التأثير التثبيطي خارج الجسم الحي ، ومن ثم اختبار الكفاءة العلاجية داخل الجسم الحي.

المصادر:

1. American Cancer Society (2015). Cancer Facts and Figures 2015 American Cancer Society, Atlanta.
2. Murray, R.K.(1996). Cancer, Cancer Genes, and Growth Factors. In: Harper's Biochemistry. (24th Ed). R.K. Murray, D.K. Granner, P.A. Mayes, V.W. Rodwell (Eds.), Appleton and Lange, Stamford . pp. 757-778.
3. Safarzadeh, E; Shotorbani, S.S and Baradaran, B.(2014). Herbal Medicine as Inducers of Apoptosis in Cancer Treatment. Adv Pharm Bull, 4(1), 421-427.
4. Lobert, S. ; Fahy, J. ; Hill,B.T. ; Duflos, A. ; Etievant, C and Correia, J.J. (2000). Vinca alkaloid-induced tubulin spiral formation correlates with cytotoxicity in the leukemia L 1210 cell line. Biochemistry, 39:12053-12062.
5. Aslam, J, H. K.; Sheba, H. S; Zahid , F; Zohra , M, Mehpara and Mukthar, A .(2010). *Catharanthus roseus* Don. L an Important Drug IT'S Applications and Production, Pharmacie Globale (IJCP),4:12.
6. Al-Azawee, N.H.I.(2015). The cytotoxic effect of some chemotherapti drugs & functional activity of breast cancer patients peripheral blood lymphocytes. *International Journal of Advanced Research*), 3 (1), 81-86.
7. Almagro, L.; Fernandez-Perez, F. and Pedreno, M.A. (2015). Indole Alkaloids from *Catharanthus roseus*: Bioproduction and Their Effect on Human Health, *Molecules*, *20*, 2973-3000.
8. Ghosh, S.; Suryawanshi, S.A. (2001). Effect of *Vinca rosea* extracts in treatment of alloxan diabetes inmale albino rats. Indian J. Exp.Biol, *39*,748–759.
9. Ahmed, M.F; Kazim,S.M; Ghori,S.S; Mehjabeen, S.S; Ahmed, S.R; Ali,S.M and Ibrahim, M.(2010) . Antidiabetic activity of *vinca rosea* extracts in alloxan – induced diabetic rats.Int. J. Endocrinology., vol, article ID 841090, 6.
10. Raza, M. L ; Nasir, M ; Abbas, T. and Naqvi, B. S. (2009). Antibacterial activity of different extracts from the *Catharanthus roseus*. CEMED,3(1): 81-85.
11. AL-makhzumi, A. A. ; AL-dulaimy, H. H. and Jawaad, A. M. (2015).In vivo effect of *Catharanthus roseus crude* extracts on pathogenic bacteria isolated from skin infections.Iraqi Journal of Science, 56(1) : 656-664.

12. Fattorusso, E. and T. Scafati. (2008). Modern Alkaloids Structure. 12 – WILE -VCH Verlag Cmb H. and kga A Co., Germany:28-41.

13. Mohammed, I. H.(2012). Effect of Vincristine and Vinblastine from *Vinca rosea* on Microtubules of Tumor H22 Cell line.Diyala Journal of Medicine, 3 (1):97–104.

14. Harborne J.B. (1984). Phytochemical Methods . (2nd ed.) Chapman and Hall, H. p. London,193 .

15. Freshney, R.I. (2000). Culture of animal cells: A manual for basic technique. 4th ed. Wiley-Liss, A John Wiley and Sons, Inc. Publication, New York.

16. Mather K.E. (2000) . Principles of radation therapy. *In: B.M. Nevidjon and K.M. Sowers(ed).A nurse's guide to cancer care*. Lippincott, philadelpphia,pp:215.

17. Gao, S.; Yu, B.; Li, Y.; Dong, W. and Luo, H. (2003). Antiproliferative effect of Octreotide on gastric cells mediated by Inhibition of Akt/PKB and telomerase. World J. Gastroenterol, 9: 2362-5.

18. Chumchalova, J. and Smarda, J.(2003)**.** *Human Tumor Cells are Selectively* Inhibited by Colicins. Folia Microbiol.,48: 111-5.

19. ياسين، ناهي يوسف ; حسن ، هادي رسول و صكبان، لقاء حسون.(2009)، دراسة تأثير المستخلصات الخام لنبات عين البزون *Vinca rosea* على نمو الخطوط الخلوية السرطانية والطبيعية لبعض اللبائن خارج الجسم الحي *In vitro*.مجلة جامعة كربلاء العلمية (عدد خاص ببحوث المؤتمر العلمي الخامس للجامعة).

20. Mukherjee, A.K. ; Basu, S. ; Sarkar, N. and Ghosh,C.A.(2001). Advances in cancer therapy with plant based natural products.Current Medicinal Chemistry, 8:1467-1486.

21. Vazquez-Flota, F. ; Carrillo-Pech, M. ; Minero-Garcia, Y. and Miranda-Ham,M.(2004). Alkaloid metabolism in wounded *Catharanthus roseus* seedlings. Plant Physiology and Biochemistry, 42:623-628.

22. Sahito, S.R. ; Kazi, T.G. ; Kazi, G.H. ; Jakhrani, M.A. and Shaik, M.S.(2001). Trace elements in two varieties of indigenous medicinal plant *Cathranthus roseus* (*Vinca rosea*). The Science,:74-77.

23. Pourroy, B. ; Carre, M. ; Honore, S. ; Bourgarel-Rey, V.; Kruczynski, A. ; Briand, C. and Braguer, D. (2004). Low concentrations of vinflunine induce apoptosis in human SK-N-SH neuroblastoma cells through a postmitotic G1 arrest

and a mitochondrial pathway . Mol. Pharmacol., 66:580-591.

24. Ngan, V.K. ; Bellman, K. ; Hill, B.T. ; Wilson, L. and Jordan,M.A. (2001) . Mechanism of mitotic block and inhibitionof cell proliferation by the semisynthetic vinca alkaloids vinorelbine and its new derivative vinflunine. Molecular Pharmacology, 60:225-232.

25. Medinger,M. ; Unger,C. and Drevs,J.(2003). Pflanzliche Zytostati Forschung and klinik . Bundesgesund Heitsbl-Gesundheits Forsch-Gesundheitsschutz .46:1050-1054.

26. Gascoigne, K.E and Taylor, S.S. (2009). How do anti-mitotic drugs kill cancer cells?. *Journal of Cell Science*, 122, 2579-2585.

27. Jordan, M.A. ; Thrower, D. and Wilson, L.(1991). Mechanism of inhibition of cell proliferation by vinca alkaloids . Cancer Research, 51:2212-2222.

28. Becvarova, P.; Skorp Ikova, J.1.; Janisc h. R and Novy, J. (2006). Avinca Alkaloids Effect on Microtubules of HeLa Cells. SCRIPTA MEDICA (BRNO), 79 (1):19–34.

29. Parekh, H.R. and Simpkins, H.(1996). Cross-resistance and collateral sensitivity to natural product drugs in cisplatin-sensitive and resistant rat lymphoma and human ovarian carcinoma cells. Cancer Chemother. Pharmacol. , 37:457-462 .

30. Lopez-Lazaro, M.(2002). Flavonoids as anticancer agents : Structure- activity relationship study . Curr. Med. Chem., 2:691-714 .

31. Ahmad, N.H; Abdul Rahim , R and Mat,I.(2010). *Catharanthus roseus* Aqueous Extract is Cytotoxic to Jurkat Leukaemic T-cells but Induces the Proliferation of Normal Peripheral Blood Mononuclear Cells. Tropical Life Sciences Research, 21(2), 101–113. Sathiya, S ; Karthikeyan, B ; Jaleel, C. A ; Azooz, M. M. and Iqbal, M. (2008). Antibiogram of *Catharanthus roseus* extracts. Global J. Mol. Sci., 3(1) : 1-7.

32. Forkmann, G. and Martens, S.(2001). Metabolic engineering and application of flavonoids . Curr. Opinion Biotech. , 12:155-160.

33. سلمان، إسراء صكر; ياسين، ناهي يوسف ; أحمد ،أيسر عايد و حسين، لقاء مائدة ; طه، زهراء رافع ;شاكر ;هبة كريم; حسن، أيمن علي.(**2011**).تأثير الفلافونيدات على الخطوط الخلوية السرطانية والطبيعية خارج الجسم الحي.المجلة العراقية لبحوث السرطان والوراثة الطبية ، 4(1): 94-100.

34. Pedra , M ; ferreira , M , M ; cidade H , ; Kijjoa , A. ; Bronze –da– rocha , E and Nascimento, M. S. J.(2005) . *Artelastin is a cytotoxic prenylated Flavone that disturbs microtubules and interferes with DNA replication in MCF -7 human breast cancer cells*. Life Sciences,77:993- 311.

35. Calabrese E . J . and Baldwin , L .A., (2003). *Hormesis :* the dose - response revolution. Annu. Rev .Pharmacol. Toxicol., 43 : 175 – 197 .

36. Calabrese, E. J. and Baldwin, L. A. (2003). Chemotherapeutics and hormesis . Crit. Rev. Toxicol., 33:305-353 .

37. Zheng, T. 29; Holford, T.R. ; Mayne, S.T. ; Ward, B. ; Carter, D. and Owens, P.H. (1999). DDE and DDT in breast adipose tissue and risk of female breast cancer . Am. J. Epidemiol., 150:453-458.

38. Calabrese, E.J. and Baldwin, L. A.(2003). Inorganics and hormesis . Crit. Rev. Toxicol., 33:215-304. Feinendegen, L.E. and Neumann, R.D.(2005). Physics must join with biology in better assessing risk from low-dose irradiation . Radiat. Prot. Dosimetry, 33:105-153.

39. Pollycove, M. and Feinendegen, L.E.(2003). Radiation-induced versus ndogenous DNA damage: possible effect of inducible protective responses in mitigating endogenous damage . Hum. Exp. Toxicol., 22:290-306.

40. Rattan, S.I.(2004). Hormetic mechanisms of anti-aging and rejuvenating effects of repeated mild heat stress on human fibroblasts *in vitro*. Rejuvenation Res., 7:40-48.

41. علي ، آمال محمد ،(2004)، دراسة وراثية خلوية ومناعية لخط خلايا سرطان الحنجرة Hep-2 . رسالة ماجستير . كلية العلوم – جامعة بغداد .

42. Bruserud , O . ; Gjertsen , B.T ; Foss , , B . and Huang , T. (2001) . New Strategies in the treatment of acate Myelogenous leukemia (AML) : In vitro culture of AML cells the present use in Expermental Studies and the possible Importance for future Therapeutic Approaches . Stem cells , 19 : 1 – 1.