تأثير المستخلص المائي والكحولي لنبات الصفصاف *Salix acmophylla* في تثبيط نمو الخطوط الخلوية السرطانية في الزجاج(*in vitro*)

أ.د. ناهي يوسف ياسين أ.م.د. هادي رسول حسن م.م. أزهار موسى جعفر
البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثالث

الخلاصة

يعد هذا البحث دراسة استكشافية لفعالية مركبات الأيض الثانوي في مستخلصات نبات الصفصاف *Salix acmophylla* بشكلها الخام في التأثير في نمو الخلايا السرطانية في الزجاج . وتضمنت الدراسة تحضير مستخلصات جزئين رئيسين من النبات هما القلف والأوراق (Bark and Leaves) باستعمال نوعين من المذيبات (الماء المقطر والايثانول) ، وقد تباينت نسب المذيبات وكانت نسبة المستخلص المائي للاوراق L1 (20%) والمستخلص الايثانولي L2 (16%) ، أما المستخلص المائي للقلف B1 فكانت نسبته (6%) في حين كانت نسبة المستخلص الايثانولي B2 (4%). تم الكشف عن المركبات الفعالة للمستخلصات عن طريق استعمال الكواشف التمهيدية وكانت النتيجة احتواء النبات على الكلايكوسيدات ، التانينات ، السابونينات و الفلايفونويدات ولم تظهر مؤشرات لوجود القلويدات والتربين والستيرويد في النبات . أختبرت فعالية المستخلصات الخام لنبات الصفصاف في الخطوط الخلوية السرطانية (Human epidermoid larynx carcinoma) HEP- 2 & (Ahmed Majeed-Nahi 2003)AMN-3 والخلايا الطبيعية REF (Rat Embryo Fibroblast) بسبعة تراكيز مختلفة (1000, 500,250,125 62.5,31.25,15.6, مايكروغرام / مليلتر) . وضمن ثلاث مدد من التعريض (24 ,48 , 72) ساعة ، و72 ساعة فقط عند الخط الخلوي الطبيعي لجنين الجرذ (REF). أظهرت النتائج وجود تأثير تثبيطي معنوي واضح للمستخلصات الخام في نمو الخلايا السرطانية لثلاث مدد من التعريض , ووجد أنَ التأثير التثبيطي للمستخلصات يعتمد على التركيز ومدة التعريض ، في حين لم يكن هناك تأثير واضح وذو معنوية لنفس المستخلصات الخام في نمو الخلايا الطبيعية (REF) . وكان المستخلص المائي أكفأ المستخلصات الخام تأثيراً في الخط الخلوي السرطاني (HEP-2) أما في الخط الخلوي السرطاني (AMN-3) فقد كان مستخلص الايثانول هو الأكفأ ولم تكن هناك فروق معنوية واضحة عند المقارنة بين مستخلصات القلف ومستخلصات الأوراق .

Summary

The present study was explorer to search the activity of secondary metabolites in *Salix acmophylla* crude extracts on the malignant cells growth (*in vitro*). This study includ the preparation of fresh extracts for two main parts of the plant (**Bark** and **Leaves**) by using two types of solvents , distilled water and absolute ethanol . The results from leaves was 20% for L1 and 16% for L2 while from bark is 6% for B1 and 4% for B2 . The active compounds of the extracts was assessed by using the chemical tests and the result showed that a compound contains Glycosides , Tannins , Saponines and Flavonoides , but there is no Alkaloids , Terpenes and Steroids. The action of these crude extracts of *S. acmophylla* was assessed on cancer cell lines (HEP-2 and AMN-3) and on normal cells of (REF) using seven concentrations (1000 , 500 , 250 , 125 , 62.5 , 31.25 , 15.6 µg / ml) through three examination period (24 , 48 , and 72 hrs) for cancer cell lines and 72 hrs only for normal cell line of rat embryo (REF) with three exposure time. The result is a showing cytotoxic activity of these crude extracts with high significances in a two cancer cell lines during the three exposure time , suggesting that the cytotoxic effect of those crude extracts is a dose and time dependent , but in (REF) cell lines , there is no significant effect of those crude extracts reported . The water extract was found to be the most effective especially on the cell lines (HEP-2), while on (AMN-3) cell lines the ethanol extract was more effective. It was non- significant differences were defected when comparing the action of the leaves and the bark on these cell lines .

المقدمة Introduction

يعد السرطان من الامراض الخطيرة والتي تؤدي الى وفاة الآلاف من البشرفي كل عام ، ففي عام 2000 بلغت اعداد الوفيات بسبب السرطان في العالم ما يقارب أكثر من 10 مليون حالة وفاة (Greenlee *et al.* , 2001) .

الأمر الذي دفع الباحثين للاهتمام بهذا المرض ومحاولة إيجاد العديد من الطرق العلاجية له ، موجهين اهتمامهم إلى الطب البديل واستخدام الأعشاب الطبية نظراً لما تتركه بعض العلاجات المصنعة كيميائياً من تأثيرات جانبية قد تعود سلباً على صحة المريض (Sid , 2002) .

ولقد أشتمل تاريخ الطب على آلاف من أنواع النباتات التي يعد (الصفصاف) نوعاً مهماً فيها والذي من المحتمل انه استخدم أو وصف أكثر من أي دواء آخر (Chrubasik , 2000) . ويعد الصفصاف المصدر الأصلي للأسبرين حتى اليوم ، رغم وفرة بدائل الأسبرين (Patrono , 1994) .

يعد ***Salix acmophylla*** احد النباتات الطبية التي تمتلك العديد من الاستطبابات كونه مقوٍ عام ويستخدم لعلاج الروماتزم والأمراض الجلدية وخاصة الفطرية و الفايروسية , وخافض للحرارة وضغط الدم المرتفع ، ومنشط لعمل الكلى ، (Bown , 1995) . إضافة إلى ما أثبتته الدراسات الحديثة في علاج احد أنواعه لأنواع من السرطانات ومنها دراسة في استخدام المستخلص المائي لأوراقه في علاج ابيضاض الدم النخاعيني الحاد (AML) acute myeloid leukemia (EL-Shemy *et al* ., 2003) .

ومن اجل تلك الخواص وأهميتها وضعت البرامج والاستراتيجيات لإجراء مسح أولي لفعالية المركبات الموجودة في النباتات والأعشاب الطبية ضد الخلايا السرطانية عن طريق تحضير مستخلصات خام لتلك النباتات والأعشاب ودراسة التأثير التثبيطي أو السمي لتلك المستخلصات (Sid , 2002) .

المواد وطرائق العمل Material and Methods

1- جمع وتحضير النبات Plant Collection and Preparation

تم جمع نبات الصفصاف *Salix acmophylla* Boiss من منطقة عون التابعة لمحافظة كربلاء ، حيث تم جمع العينات مع بدء فصل الربيع وتحديدا بين شهر نيسان وأواخر آيار، صّنف النبات من قبل أستاذ علم التصنيف الدكتور علي حسين عيسى الموسوي في قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة . فصلت الأوراق والقلف (leaves and bark) عن باقي أجزاء النبات حيث نظفت وغسلت ثم جففت في الظل بعيدا عن أشعة الشمس بدرجة حرارة الغرفة مع التقليب المستمر لمنع تعفنها وبعدها طحنت النماذج النباتية الجافة طحنا خشنا بواسطة مطحنة كهربائية ، ثم حفظت الأجزاء المطحونة في قناني بلاستيكية نظيفة ذات غطاء محكم بعيدا عن الضوء والحرارة والرطوبة لحين الاستعمال ودّون عليها اسم النبات والجزء النباتي المستخدم .

2- تحضير المستخلصات الخام لنبات الصفصاف

A- تحضير المستخلص المائي الخام لأوراق وقلف نبات الصفصاف

لغرض الحصول على مستخلص الماء البارد الخام لأوراق وقلف الصفصاف تم اتباع طريقة Abu-Ghdeib and Shtayeh (1999) مع إجراء بعض التحويرات وعلى النحو التالي :-

- وضع 50 غرام من مسحوق أوراق الصفصاف في دورق حجمي سعة لتر .
- أضيف إليه 500 مليلتر من الماء المقطر وأغلقت الفتحة بواسطة parafilm .
- وضع الدورق على هزاز مغناطيسي Magnetic stirrer وترك ليمتزج جيدا .
- بعد 72 ساعة رشح المحلول باستعمال الشاش الطبي أولا ثم بورق الترشيح Wattman رقم 1 .
- وزع الراشح في أنابيب النبذ المركزي بسرعة (300 دورة / دقيقة) لمدة 10 دقائق
- أهمل الراسب وأخذ الرائق إلى جهاز المبخر الدوار Rotary evaporator لغرض تركيزه ومن ثم وزن المستخلص الخام الناتج .
- أعيدت التجربة باستبدال مسحوق أوراق الصفصاف بدلاً من قلف الصفصاف للحصول على مستخلصه المائي الخام وبذات الآلية .

B- تحضير المستخلص الكحولي الخام (الايثانولي) لأوراق وقلف الصفصاف

أتبعت خطوات تحضير المستخلص الخام في الفقرة السابقة للحصول على مستخلص نباتي جاف ، وقد استخدم الكحول الاثيلي بتركيز 80% بدلا من الماء المقطر ولكل من الأوراق والقلف حسب طريقة (Anessiny and Perez , 1993)

3- الادامة والمحافظة على الخطوط الخلوية السرطانية Maintenance of cancer cell lines

تمت إدامة الخطوط الخلوية السرطانية بملاحظة هذه الخلايا وعند تكوينها لطبقة أحادية كاملة (Confluent monolayer) تم إجراء المزرعة الثانوية (Subculture) ابتداءً بالتخلص من وسط النمو القديم ، ثم أضيف 2 مليلتر من محلول التربسين – فرسين مع تحريك القنينة برفق ، بعدها تم التخلص من التربسين ، ثم حضنت الخلايا في درجة 37 مه لمدة 15 دقيقة لحين انفصال الخلايا الملتصقة من القنينة ، ثم أضيف إلى القنينة الحاوية على الخلايا المفككة حوالي 15 مليلتر من وسط النمو الجديد (RPMI-1640) وأعيد توزيعها في قنينة زرع أخرى جديدة بحيث يكون مستوى الوسط الزرعي مع الخلايا متساوياً بين القنينتين وحفظت في درجة حرارة 37 مه .

4- دراسة تأثير المستخلصات الخام لنبات الصفصاف في نمو الخطوط الخلوية السرطانية

A- تهيئة الوسط الزرعي وخطوط الخلايا Preparation of medium and cancer cell line

تم تهيئة الوسط الزرعي(RPMI-1640) وفقا لـ Freshney, (2000) بخلط مكوناته مع بعضها البعض لتحضير لتر منه : glutamine (10.4)غرام ، Sodium bicarbonat 4.4% (15 مليلتر) ،(0.5 Crystalline penicillin مليلتر) ، Streptomycin (0.5 مليلتر) ،Bovin calf serum (100 مليلتر) .

ومن ثم عقمت باستعمال مرشح ذي ثقوب بقطر 0.4 مايكرون ثم بقطر 0.22 مايكرون لضمان تعقيمه ، وزع الوسط الزرعي في قناني زجاجية ذات غطاء محكم سعة 200 مليلتر وحفظت القناني بدرجة - 20 مه لحين الاستعمال .

a- تمت تنمية الخطوط الخلوية السرطانية (AMN-3 , Hep-2) والخط الخلوي لجنين الجرذ (REF) في قناني الزرع النسيجي بسعة 25 سم2 وذلك بعمل كل ما تحتاجه تنمية الخطوط من عمل مزارع ثانوية ، أو تغيير الوسط عندما تستهلك الخلايا الوسط الذي نُميت فيه ويتم ذلك بالتخلص من الوسط القديم عندما يلاحظ تغير لون الوسط ثم إضافة الوسط الجديد بحوالي 5 مليلتر .

b- أضيف 2 مليلتر من محلول التربسين / فرسين إلى قنينة الزرع النسيجي حجم 25 سم2 الحاوية على الخلايا (الأنواع الثلاثة) بعد تفريغها من الوسط الزرعي القديم ، ثم حركت القنينة برفق بعدها تم التخلص من التربسين وحضنت في حاضنة بدرجة حرارة 37 مه لمدة 15 دقيقة لتفكيك الخلايا الملتصقة .

c- أضيف إلى القنينة الحاوية على الخلايا المفككة حوالي 15 مليلتر من وسط النمو الجديد (RPMI-1640) وتم تحريك القنينة جيدا وبعدها أفرغت محتويات القنينة إلى أخرى جديدة بحيث يكون مستوى الوسط الزرعي مع الخلايا متساوياً بين القنينتين ، وتسمى هذه العملية بالمزرعة الثانوية (Subculture) .

d- حضنت القناني بدرجة حرارة 37 مه لمدة يومين بالنسبة للـ Hep-2 وخمسة أيام للـ AMN-3 ، وتم متابعة القناني يوميا للتأكد من خلوها من أي تلوث وان الخلايا بحالة جيدة وذلك بفحصها بواسطة المجهر المقلوب Inverted microscope . وعندما يصبح النمو داخل القنينة جيداً فأن الخلايا تكون جاهزة لاجراء العلاجات المختلفة عليها .

B- أختبار سمية المستخلصات الخام لنبات الصفصاف على نمو الخطوط الخلوية السرطانية

حضر على وفق طريقة Abdul- Majeed (2000) ; Mahony (1989) كل من المستخلص المائي والايثانولي عن طريق إذابة 0.2 غرام من المستخلص الخام في 10 مليلتر من المذيب **phosphate buffer saline(PBS)** الذي عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 مه لمدة 15 دقيقة في ظروف معقمة .

تم الحصول على أربعة من المستخلصات (المائي والايثانولي) لجزئين من النبات (القلف والاوراق) , L2 , B1 , B2 L1 . عقمت المستخلصات الأربعة باستعمال مرشح ذي ثقوب بقطر 0.4 ثم بقطر 0.22 مايكرون وحضرت من كل مستخلص سبعة تراكيز بشكل ثنائي وهي 15.62 , 31.25 , 62.5 , 125 , 250 , 500 , 1000 مايكروغرام /مليلتر وتحت ظروف معقمة . استخدمت جميع التراكيز المحضرة مباشرة بعد إكمال عملية التحضير.

a- جهز عالق الخلايا عن طريق معاملة قنينة الزرع النسيجي حجم 25 سم2 بمحلول التربسين / فرسين بعد تفريغ الوسط الزرعي القديم وتحريك القنينة برفق ثم حضنت في الحاضنة 37 مْ لمدة 15 دقيقة ثم أضيف إليه 20 مليلتر من الوسط الزرعي الخالي من المصل (SFM Serum Free Media) . تم مزج عالق الخلايا جيدا ثم نقل 0.2 مليلتر إلى حفر طبق معايرة الزرع النسيجي ذي القعر المسطح Microtiter plate for tissue culture الحاوي على 96 حفرة باستعمال ماصة أوتوماتيكية دقيقة واستعملت الحفر جميعها .

b- يترك الطبق في الحاضنة بدرجة حرارة 37 مه لمدة 24 ساعة إلى حين التصاق الخلايا في الحفرة وبعدها تم التخلص من الوسط الزرعي القديم الموجود داخل الحفر ومن ثم إضافة 0.2 مليلتر من التراكيز المحضرة سابقا لكل من المستخلص (المائي والايثانولي) وبواقع ثلاثة مكررات لكل تركيز . إضافة إلى انه تم عمل مكررين للسيطرة (خلايا فقط) وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 مه في حاضنة مزودة بـ 5% من غاز ثاني اوكسيد الكاربون .

c- بعد مرور مدة التعريض (Exposure time) المحددة للحضن (24 ، 48 ،72) ساعة اخرج الطبق من الحاضنة وأضيف إليه محلول صبغة البنفسج البلوري لجميع الحفر الحاوية على الخلايا بمقدار 0.2 مايكرون لكل حفرة

d- أعيد الطبق مرة ثانية إلى الحاضنة ليحضن لمدة ساعتين . بعدها أخرج الطبق وأزيلت محتوياته وغسلت الخلايا بمحلول (PBS) لحين زوال الصبغة الزائدة ,إذ إن الخلايا الحية تأخذ الصبغة أما الميتة فلا تأخذها .

e- قرأت النتائج باستخدام جهاز الالايزا بطول موجي 492 نانوميتر .

f- أجريت الخطوات السابقة على كل من الخطوط الخلوية السرطانية Hep-2 و AMN-3 باستعمال المستخلصين الخام (المائي ، الايثانولي) بثلاث مدد تعريض وهي على التوالي 24 , 48 , 72 ساعة ، أما المزرعة الطبيعية REF فقد استعملت نفس المستخلصات الخام السابقة ولكن بوقت تعريض واحد وهو 72 ساعة .

g- طبقت التجربة أعلاه باستخدام الجزء النباتي (الاوراق L) وأعيدت خطواتها مرة ثانية باستخدام الجزء النباتي الاخر (القلف B) .

h- تم تحويل قيم التأثير التثبيطي للمستخلصات الخام لنبات الصفصاف في الخطوط الخلوية إلى نسب مئوية : قراءة المعاملة لكل تركيز / قراءة السيطرة × 100 (Betancr *et al.* , 1999) .

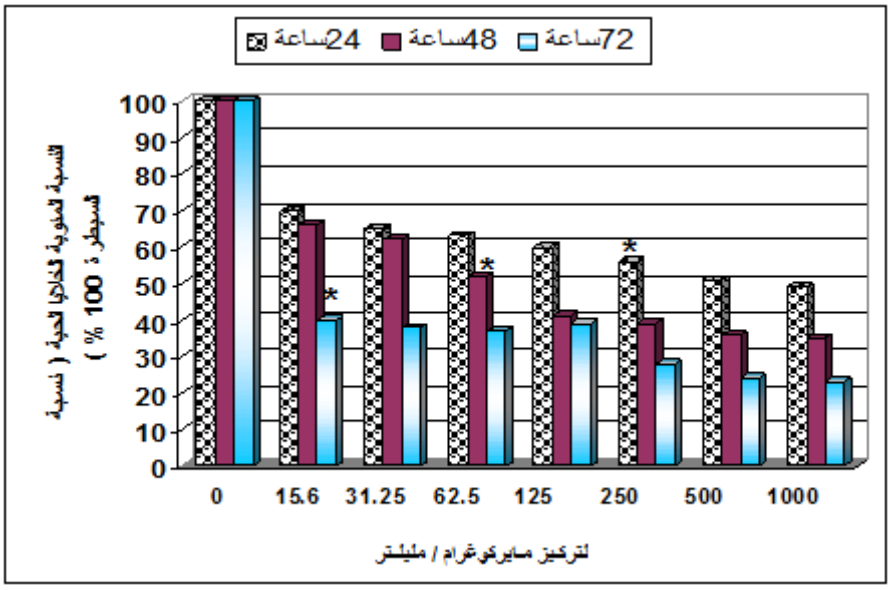
وعدت الفروق مهمة إحصائيا وعالية المعنوية على مستوى 5% لاحتمال الخطأ ، وأجري اختبار التصميم العشوائي الكامل The completely Randomized Design ، واختبار الفرق المعنوي الأصغر Least Significant Difference (LSD) باستعمال برنامج SPSS 10.0 الإحصائي .

النتائج Results

A- الخط الخلوي لسرطان HEP-2

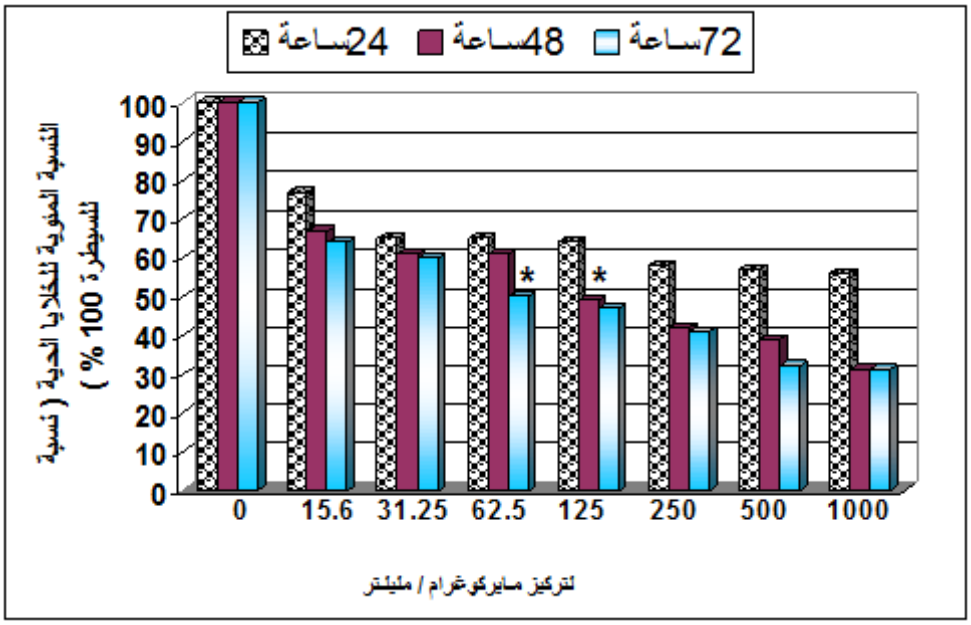
تمت معاملة الخط السرطاني HEP-2 عند التمريرة (218) بتراكيز مختلفة للمستخلصين المائي والايثانولي لكل من القلف والأوراق وضمن مدد التعريض الثلاث , فكانت النتائج الإحصائية تشير إلى وجود تأثير تثبيطي ملحوظ في تراكيز تلك المستخلصات الخام في نمو الخط السرطاني ابتداءً من التراكيز الواطئة ويستمر باتجاه التراكيز العالية , ودلت النتائج أيضاً على وجود تباين في التأثير التثبيطي لتلك المستخلصات الخام فيما بينها من جهة وفيما بين المستخلص الواحد نفسه أو الجزء النباتي نفسه من جهة أخرى .

1- المستخلص المائي لأوراق الصفصاف (L1)



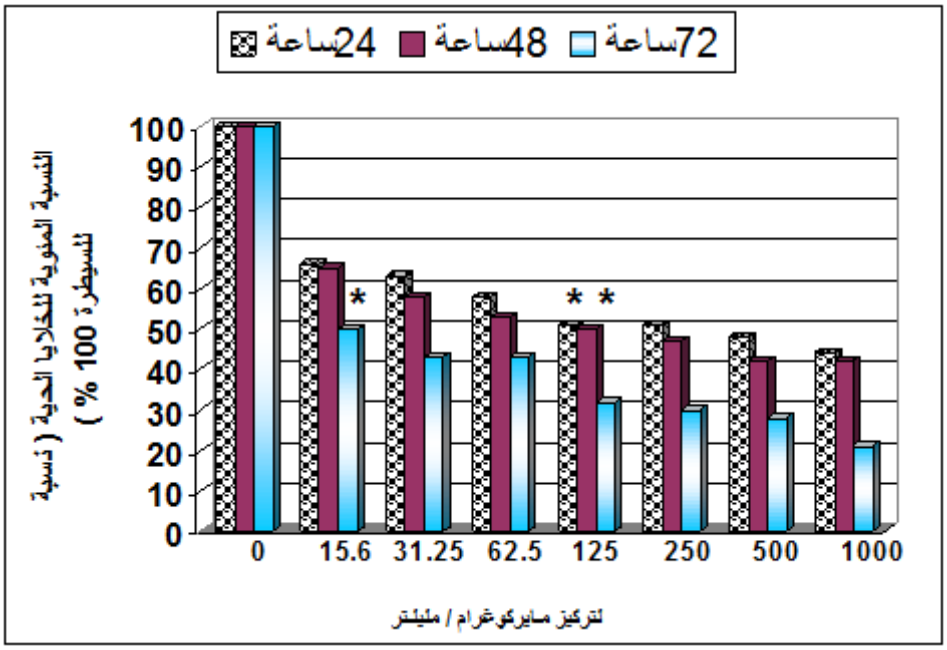
شكل (1) تأثير مستخلص L1 في نمو خلايا سرطان الحنجرة البشرية HEP-2 عند مدد التعريض الثلاثة
العلامة * تشير إلى بدء الفرق المعنوي

2- المستخلص الايثانولي لأوراق نبات الصفصاف (L2)



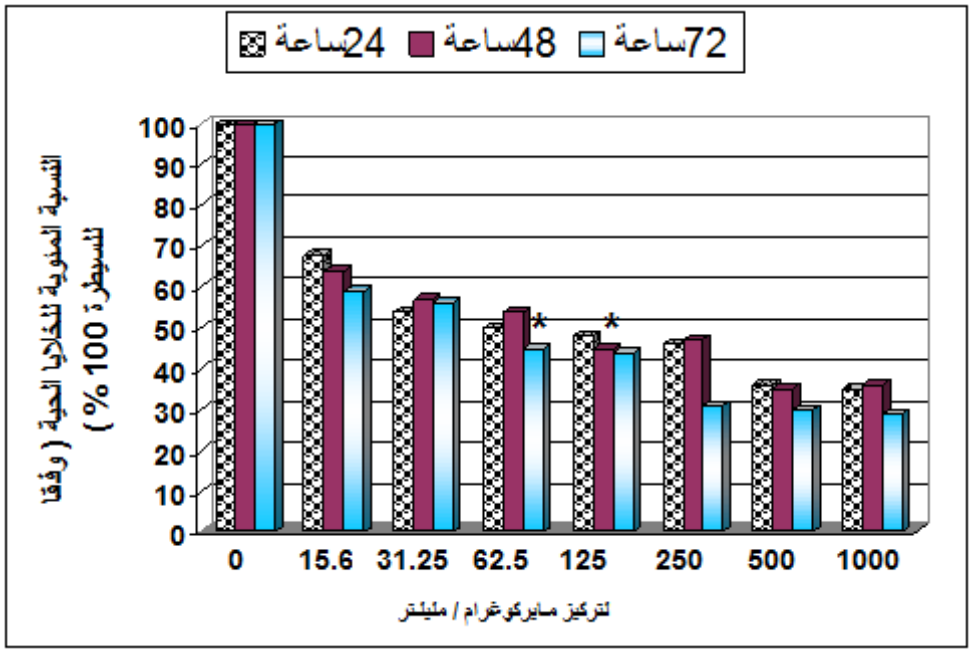
شكل (2) تأثير المستخلص L2 في نمو خلايا سرطان الحنجرة البشرية HEP-2 عند مدد التعريض الثلاثة
العلامة * تشير إلى بدء الفرق المعنوي

3- المستخلص المائي لقلف نبات الصفصاف (B1)



شكل (3) تأثير المستخلص B1 في الخط الخلوي السرطاني HEP-2 ولثلاث مدد من التعريض
العلامة * تشير إلى بدء الفرق المعنوي

4- المستخلص الايثانولي لقلف نبات الصفصاف (B2)

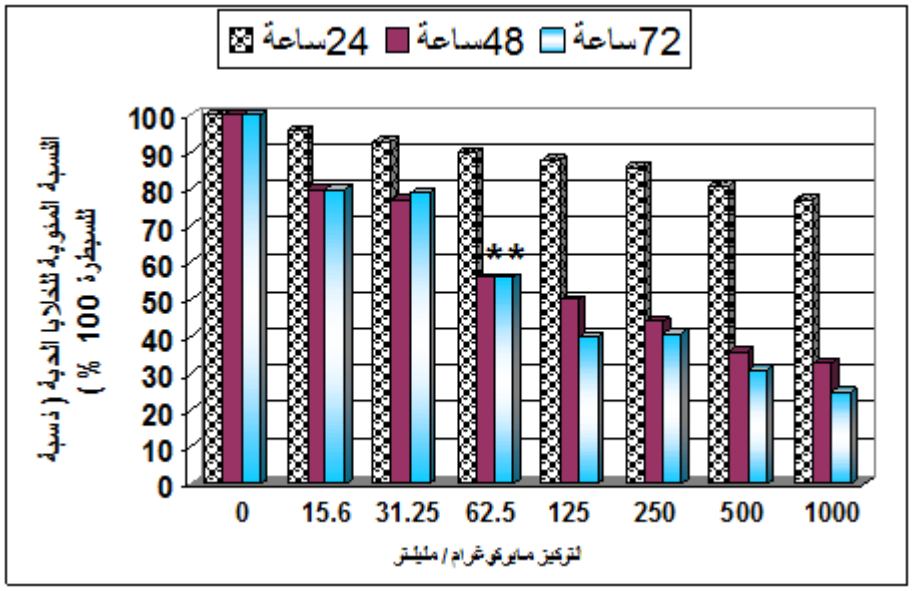


الشكل(4) يوضح التأثير التثبيطي للمستخلص B2 في الخط السرطاني HEP-2 لثلاث مدد من التعريض
العلامة * تشير إلى بدء الفرق المعنوي

B- الخط الخلوي لسرطان AMN-3 (Ahmed Majeed-Nahi 2003)

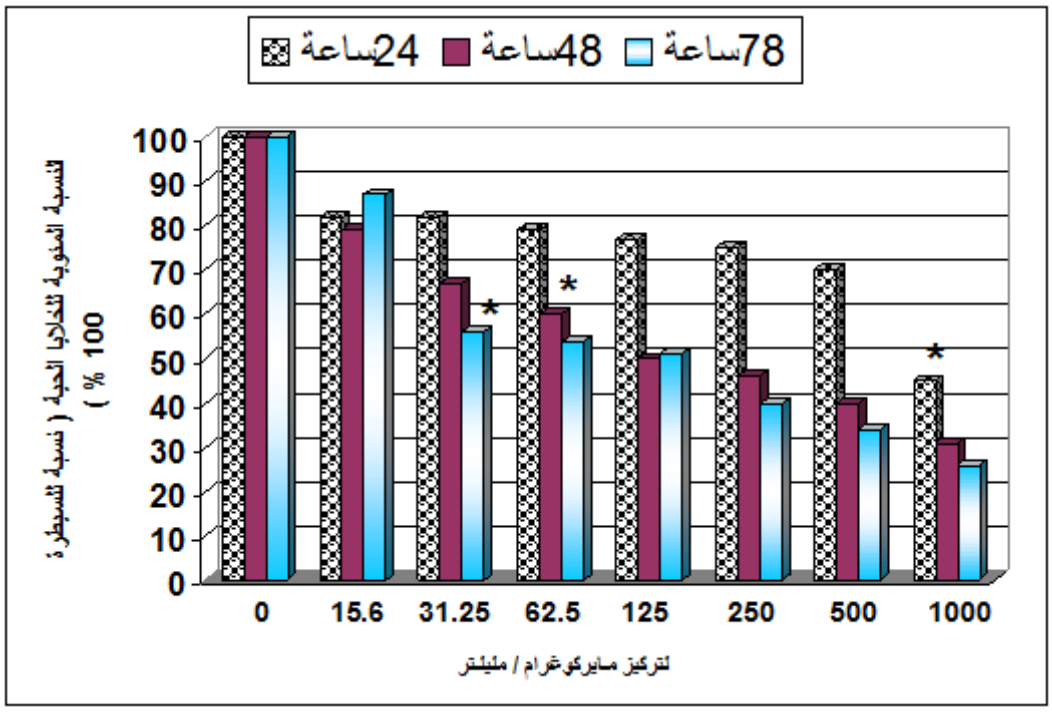
تمت معاملة الخط الخلوي لسرطان AMN-3 عند التمريرة (46) بالتراكيز السبعة المحضرة للمستخلصين الخام (المائي والايثانولي) لكل من الجزئين النباتيين (القلف والأوراق) , وخلال ثلاث مدد من التعريض (24 , 48 , 72 ساعة) على التوالي , فكانت النتائج الإحصائية تشير إلى وجود تأثير تثبيطي ملحوظ لتراكيز تلك المستخلصات (ولاسيما التراكيز العالية منها) في نمو هذا الخط السرطاني , ووجد أيضا أن هناك اختلافاً في التأثير التثبيطي للمستخلصات الخام في ما بينها من جهة وفي ما بين المستخلص الواحد نفسه من جهة أخرى عند مدد التعريض المختلفة .

1- المستخلص المائي لاوراق نبات الصفصاف (L1)



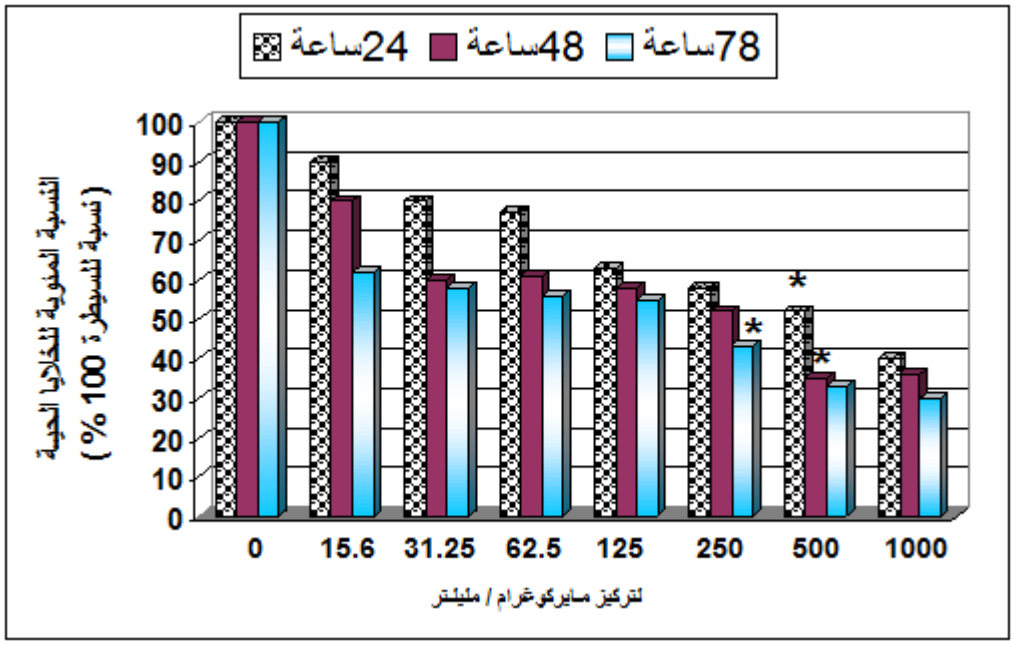
الشكل(5) التأثير التثبيطي للمستخلص L1 في الخط الخلوي السرطاني AMN-3 ولثلاث مدد من التعريض

2- المستخلص الايثانولي لأوراق الصفصاف (L2)



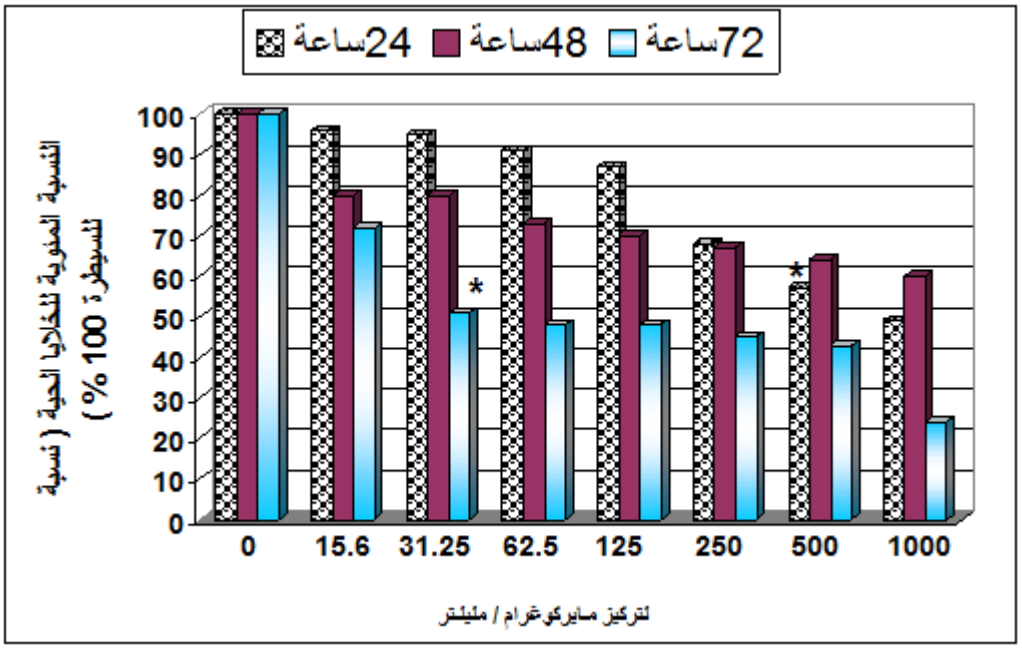
شكل (6) يوضح التأثير التثبيطي للمستخلص L2 في الخط الخلوي السرطاني AMN-3 لثلاث مدد من التعريض
العلامة * تشير إلى بدء الفرق المعنوي

3- المستخلص المائي لقلف الصفصاف (B1)



الشكل (7) يوضح التأثير التثبيطي للمستخلص B1 في الخط الخلوي السرطاني AMN-3 عند ثلاث مدد من التعريض
العلامة * تشير إلى بدء الفرق المعنوي

4- المستخلص الايثانولي لقلف الصفصاف (B2)



الشكل (8) يوضح التأثير التثبيطي للمستخلص B2 في الخط الخلوي السرطاني AMN-3 لثلاث مدد من التعريض

العلامة * تشير إلى بدء الفرق المعنوي

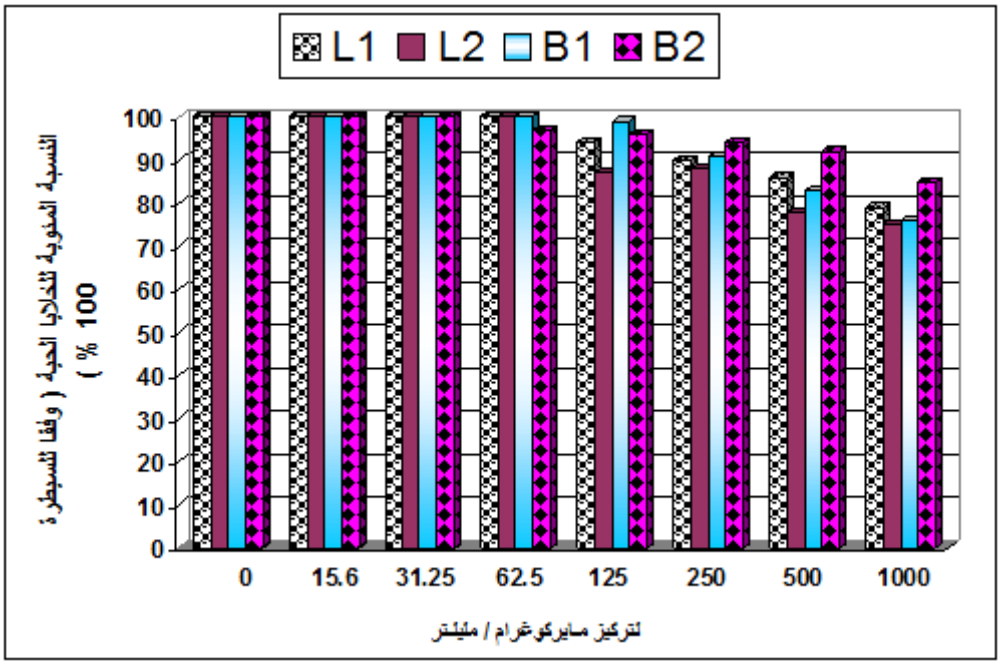
عند المقارنة بين كل من جزئي النبات (القلف والأوراق) والأثر التثبيطي لكل منهما أظهرت النتائج الإحصائية وجود فروقات طفيفة غير معنوية بين الجزأين سواءً عند المستخلص المائي أم الايثانولي . وتجدر الإشارة أيضاً إلى أن أشد الفروقات المعنوية للمستخلصين الخام (المائي والايثانولي) وللجزأين القلف والاوراق كانت تقع في مدة التعريض 72 ساعة لذلك أظهرت المقارنات الإحصائية عند المقارنة بين المستخلصين المائي والايثانولي لمدة التعريض 72 ساعة أن

المستخلص المائي للأوراق L1 أظهر فرقاً معنوياً مقارنة مع الايثانولي L2 ($P<0.05$) , وعند مقارنة المستخلصين للقلف أظهر المستخلص المائي B1 فرقاً معنوياً عالياً أيضاً عند المقارنة مع الايثانولي B2 ($P<0.05$) للخط الخلوي HEP-2 .

أما عند إجراء المقارنة بين المستخلصين عند الخط السرطاني AMN-3 فقد أظهرت أنَ المستخلص الايثانولي الخام ذو فرق معنوي عالٍ مقارنة مع المستخلص المائي للأوراق ($P<0.05$) ، وكذلك كان المستخلص الايثانولي للقلف ($P<0.05$).

C- الخط الخلوي الطبيعي لجنين الجرذ Rat Embryo Fibroblast (REF)

يبين الشكل (9) نتائج تأثير المستخلصات على الخط الطبيعي (REF) لكل من المستخلص المائي والايثانولي للقلف والأوراق عند التمريرة (18) وكانت جميعها تقع في مدة تعريض واحدة 72 ساعة ، وتشير إلى عدم وجود فروقات معنوية عند المقارنة مع السيطرة . أي ليس هناك تأثير تثبيطي واضح لتراكيز المستخلصات الخام في ذلك الخط الطبيعي لجنين الجرذ .



شكل (9) يوضح تأثير المستخلصات الخام (L1 , L2 , B1 , B2) لمدة التعريض 72 ساعة في الخط الطبيعي لجنين الجرذ

المناقشة Discussion

اختير نبات الصفصاف *Salix acmophylla* بسبب كونه واحداً من النباتات الطبية المتوفرة ، ويمتلك خواصاً طبية وعلاجية متعددة , فضلا عن احتوائه على عدد من المكونات التي لها تأثيراً مضاداً للخلايا السرطانية (Lee , 2005) . وقد تم أخذ نوعين من المذيبات لإجراء الاستخلاص وهما (الماء والايثانول) وذلك لبيان الفرق في تأثيرهما في الخلايا السرطانية والخلايا الطبيعية ، حيث أوضح Edenharder *et al.*, (2002) بأن فعالية المستخلصات النباتية تختلف باختلاف المذيب . أتضح من خلال دراسة تأثير التراكيز المختلفة للمستخلصات الخام (المائي والايثانولي) أن لمستخلصات قلف وأوراق نبات الصفصاف تأثيراً تثبيطياً واضحاً ذو فرق معنوي في نمو كل من سرطان الحنجرة البشري (HEP-2) وسرطانة الغدة اللبنية الفأري (AMN-3) في الزجاج in vitro لثلاث مدد مختلفة (24 , 48 , 72 ساعة على التوالي) ، ويتوقف هذا التأثير على التركيز المستخدم ومدة التعريض ، حيث انخفضت النسبة المئوية لحيوية الخلايا عند التراكيز العالية مقارنة مع السيطرة بنسب متفاوتة اعتماداً على نوع الخلايا ونوع المستخلص والجزء النباتي ، وكان التأثير واضحاً لكلا النوعين من المستخلصات (المائي والايثانولي) . أما الخلايا الطبيعية لجنين الجرذ (REF) فلم يلاحظ أي فرق معنوي في تثبيط المستخلصات الأربعة لكلا الجزئين النباتيين (القلف والأوراق) .

يعزى الدور التثبيطي في نمو الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي إلى دور المركبات الفعالة التي تحويها تلك المستخلصات فقد يرجع الدور إلى الكلايكوسيدات الفينولية الموجودة في المستخلصات وخاصة مركب astylsalicin المشتق من الـ Salicin الموجود في جميع أنواع الصفصاف والذي قد يتحلل إلى حامض الـ Salicylic acid حيث وجد

, Drew *et al.* (2005) أن المركب يعمل على تعديل عملية الأكسدة في خلايا سرطان القولون عند الفأر من خلال قيامه بتعديل ظهور العديد من الانزيمات التي تعمل بشكل مضاد للأكسدة antioxidant activity ومنها إنزيم glutathione peroxidase . ووجد أن الـ Salicylic acid يقلل من صناعة البروستوكلاندينات السرطانية والالتهابية Pro-inflammatory and potentially neoplastic prostaglandins من خلال تثبيط عمل النظام الإنزيمي COX الذي يتضمن اثنين من الـ iso-enzymes هما COX-I و COX-II ومن ثم منع عملية تكوين الأوعية الدموية المغذية للخلايا السرطانية Angiogenesis مما يؤدي إلى تثبيط نمو الخلايا و تحفيز عملية الموت المبرمج لها Apoptosis (Ashktorab *et al* ., 2005) .

ويمتلك المركب أيضاً فعالية تثبيطية خارج الجسم الحي (*in vitro*) في قتل الخلايا المتحولة الاورمية لابيض الدم النخاعيني (AML) وبنسبة (73.8%) (EL-Shemy *et al.* , 2003) .

كذلك يحتوي نبات الصفصاف على مركبات الفلافونويدات (Flavonoids) التي تعمل بوصفها مركبات ضد عملية الأكسدة (Antioxidation) في تأثيرها على الخلايا السرطانية (Lopez - Lazaro *et al.* ,2001) ، وقد أوضح Elangovan *et al.* , (1994) أن لمركبات الفلافونويد تأثيراً تثبيطياً شديداً في نمو خلايا الخط السرطاني HEP-2 وكذلك الخط السرطاني Sarcomy-L80 (S-L80) وذلك عن طريق إيقاف عملية تضاعف الـ DNA عند مرحلة S-phase خلال دورة حياة الخلية .

أظهرت النتائج أن التأثير التثبيطي كان أكثر وضوحاً عند مدة التعريض 72 ساعة للمستخلصات الخام (المائي والايثانولي) في الخطوط الخلوية السرطانية بالمقارنة مع مدد التعريض الأخرى (24 , 48) ساعة . ويعد التركيز مع عامل الوقت عوامل مؤثرة أساسية في شدة التأثير التثبيطي للمستخلصات الخام لنبات الصفصاف في الخطوط الخلوية السرطانية وتسمى هذه الظاهرة بـ Dose and time dependant phenomenon وهذه النتيجة جاءت متطابقة مع ما أشار إليه الباحث , Huang *et al.* (2004) الذي درس التأثير التثبيطي للمستخلص المائي الخام لعشب *Phylanthus urinaria* عند الخط السرطاني لسرطان الدم HL-60 ، بشكل عام كان التأثير التثبيطي واضحاً منذ مدة تعريض 24 ساعة والى 72 ساعة مع ازدياد في شدة السمية كلما زاد التركيز ومدة التعريض ، أي إن مدة التعريض 72 ساعة أعطت أعلى شدة قتل من الناحية الإحصائية .

وتطابقت النتائج أيضاً مع نتائج العديد من الباحثين في دراسات محلية حول امتلاك المستخلصات النباتية مركبات الايض الثانوي ذات الفعالية المضادة للخلايا السرطانية التي أعتمد تأثيرها على التركيز ومدة التعريض ، فقد توصل العقابي (2001) إلى أن مستخلص نبات سم الفراخ *Withania somnifera* يمتلك تأثيراً مثبطاً لنمو سرطان الخلية البلازمية SU-99 إذ يعزى ذلك التأثير لمركبات الوذا فرين المثبطة لانقسام الخلايا في طورها الاستوائي . وأكدت الباحثتان اليعقوبي (2004) و قدوري (2004) في دراستين منفصلتين امتلاك مستخلصات نبات الهيل والحرمل على الترتيب فعالية مثبطة لنمو سرطان الحنجرة البشري (HEP-2) وخلايا سرطان العضلات البشري RD .

كذلك أكدت دراسة الحلي (2004) دور المركبات الفينولية المتعددة Polyphenol ومن ضمنها الفلافونويدات Flavonoids لعشب السعد في عملها المضاد للأكسدة antioxidant على الخلايا السرطانية HEP-2 و RD و AMN-3 معتمداً أيضاً على التركيز ونوع المستخلص ، في حين لم يكن لها تأثير واضح في الخلايا الطبيعية, ووجد Sa'eed (2004) أن لبوليفينولات الشاي الاخضر تأثيراً تثبيطياً يفوق تأثير الشاي الأسود .

وتجدر الإشارة إلى أن هنالك تبايناً بين تأثير المستخلصات الخام فيما بينها ، والسبب في ذلك يعود إلى طبيعة المركبات الموجودة في كل مستخلص خام وتفاعلها مع الطبيعة الايضية لكل نوع من الخطوط الخلوية السرطانية (Shoieb *et al.* , 2003) لذلك تم تشخيص المستخلصات الخام لنبات الصفصاف من ناحية ابتداء التأثير التثبيطي بالمعنوية العالية عند الخطوط الخلوية السرطانية المختلفة .

تتميز بعض مركبات الايض الثانوي النباتية ببعض الانتقائية (Selectivity) في التأثير في الخلايا السرطانية ، لذلك تمت دراسة سمية المستخلصات الخام في الخلايا الطبيعية لجنين الجرذ Rat Embryo Fibroblast (REF) لمعرفة تأثيرها على الخلايا الطبيعية, ومن خلال النتائج لم يكن هنالك تأثير ذو فرق معنوي في خلايا (REF) ، وقد يرجع سبب ذلك إلى عدد من الخواص الايضية التي تمتلكها الخلايا السرطانية ولاتمتلكها الخلايا الطبيعية ، مثل الطبيعة الايضية لتكوين الأوعية الدموية الجديدة وكذلك شكل وطبيعة المستقبلات الموجودة على سطح الخلية السرطانية وإمكانية ارتباطها بالمركبات المختلفة (Folkman , 2000 ; Moteki *et al.* , 2002) .

المصادر References

• الحلي ، زيد عبد المنعم (2004) . تأثير المستخلصات الخام لعشب السعد *Cyperus rotundus L.* في خطوط الخلايا السرطانية . رسالة ماجستير ، كلية العلوم – جامعة بغداد .

• العقابي ، شلال مراد (2001) . تأثير المستخلص الكحولي الخام لاوراق نبات سم الفراخ *Withania somnifera Dun* في نمو الخلايا السرطانية في الزجاج وفي بعض المعايير الفسلجية في الفئران . أطروحة دكتوراه ، الطب البيطري – جامعة بغداد

• اليعقوبي ، كفاح جبار شاكر (2004) . دراسة تأثير الكحول الاثيلي والهكسان لثمار نبات الهيل *Elettaria cardamom* في خطوط الخلايا السرطانية والخلايا اللمفاوية للدم المحيطي للانسان خارج الجسم . رسالة ماجستير ، كلية العلوم – جامعة الكوفة .
• قدوري ، جيهان فاضل أشرف (2004) . تأثير بعض المستخلصات النباتية المحلية على الخلايا الطبيعية والسرطانية (خارج الجسم) . رسالة ماجستير ، كلية العلوم – جامعة النهرين .
-Abdul-Majeed,M.R.(2000).Induction and characterization of Su.99 plasmacytoma cell line and its effect on mice immune response . Ph D thesis ,Nahrain University Iraq .
- Abu Ghdeib,S.I. and Shtayeh, M.S.A.(1999).Anti Fungal activity of plant extracts against dermophytes . Mycoses,42:665-672.
-Anessiny,C and Perez,C.(1993).Screeieng of plants used in Argentine Folk medicine for anti microbial activity .J.Ethnopharmacology . 39 :119-128.
-Ashktorab,H.;Dawkins,F.W.; Mohamed,R.; Larbi,D and Smoot,D.T.(2005).Apoptosis induced by aspirin and 5- fluorouracil in human colonic adenocarcinoma cell .Depatment of Medicine, Division of Hematology/Oncology,Howard University Cancer Center,Howard University , Washington,50 : 1025-32.
-Betancur-Galvis,L.A. ; Saez,J. ; Granades ,H.. ; Salazer,A. and Ossa,J.E.(1999).Antitumer and antiviral activity of Colombian medicinal plant extracts .Mem.Inst. Oswaldo Cruz,94:531-535.
-Bown, D.(1995). Encyclopaedia of Herbs and their uses. Dorling Kindersley , London .ISBN . 0-7513 -020-31.
-Chrubasik , S.(2000). Pain therapy using herbal medicines .Gynakologe , 33 :59-64.
-Drew, J.E. ;Arthur, J.R.;Farquharson, A.J. ;Russell,W.R.; Morrice,P.C.and Duthie,g.g.(2005) .Salicylic acid modulates oxidative stress and glutathione peroxidase activity in the rat colon.70 (6) ; 888-93 .
-Edenharder,R.;Sager,J.W.;Glatt,H.;Muckel,E. and Platt , K.L (2002). Protection by beverages ,fruits , vegetables, herbs, and flavonoids against genotoxicitiy of 2-acetylaminoflurorine and amino-1-methyl-6-phenylimidazol (4,5-b) pyridine (PHIP) in metabolically competent V79 cell.Mutat.Res.23 :57-72 .
-Elangovan,V. ; Ramamrthy,N. ; Balasubramabian,S.; Sekar,N.and Govidsany .(1994). Studies on the anti prolifrative effect of some naturally occurring bioflavonoidal compounds against human carcinoma of larynx and sarcoma-180 cell lines . India J.Pharm.,26:266-269.
-EL-Shemy, HA. ; Aboul-Enein AM. ; Aboul-Eneien MI. ;Issa SI. and Fujita K .(2003) .The effect of willow leaf extracts on human leukemic cells *in vitro* ,36(4) : 387-9 .
-Folkman,J.(2000).Tumor Angiogenesis .In Bast,R.C. ; Kufe,D.W. ; Pollock,R.F. ; Weichselboum,R.R.; Holland,J.F. ; Ferri III ,E. and Ganster,T.E.(eds).Cancer Medicine (5^{th} ed.) . BC.Decker Inc.Canada.
-Freshney ,R.I.(2000).Culture of animal cell :Amanual for basic technique (4^{th} ed).Wileyliss,A John Wiley and Sons.Inc.Publicatio Newyork.
-Greenlee, R.T. ; Hill –Hamon, M.B.; Murray, T. and Thun, M. (2001) . Cancer Statistics .Cancer J Clin . 51 : 15-36 .
-Hung,S.T. ; Yang,R.C. ; Chen,M.Y. and Pang,J.H.(2004).Phyllanthus urinaria induces the Fas receptor/ lig and expression and ceramide mediated apoptosis in HL-60 Cell : Life Sei.,75:339-340.
-Lee, C.O.(2005) .Communicaing facts and knowledge in cancer complementary and alternative medicine .Semin Oncol Nurs ,21 (3) : 201-14 .

-Lopez-Lazaro,M.; Galvor,M.; Martin-Lorder,C.and Ayuso,M.J.(2001).Cytotoxicity of flavonoids on cancer cell lines .Structure – activity relation-ship.Curr.Med.Chem.,1:82-114.

-Mahony,D.E.; Gilliatt,E.; Dawson,S.; Stockdal,E. and Lee,S.H.S.(1989).Vero cell assay for rapid detection of *Clostridium* perfringins enterotoxin. Appl. Environ.Microbiol.,55:2141-43.

-Moteki,H. ; Hibasmai,H. ; Yamada,Y. ; Katsuzaki,H. ; Imai,K. and Komiya,T.(2002). Specific induction of apoptosis 1,8-cineole in two sshuman leukemia cell line, but not in a human stomach cancer cell lines. Oncology Reports, 9:757-760.

-Patrono, C. (1994) .Aspirin as anti platelet drug .N. Engl. J. Med .330 : 127- 94.

-Sa'eed ,O.F.(2004). The Effect of Green and Black Tea Extracts on Different Cell Lines *in vitro* . Athesis of Master in Clinical Pharmacy . University of Mosul .

-Shoieb,A.M. ; Elgayyar,M. ; Dudrick,P. ; Bell,E. and Titnof , P.K. (2003).Inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thimoquinol. Int.Oncology,22:107-113.

-Sid Katz.(2002).Beneficial uses of plant pathologens: anticancer and drug agents derived from plant pathogens, University of British Columbia, Vancouver,Canada 24:10-13.