



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية العلوم



***Melia* تأثير المستخلص الكحولي و التلويدى لنبات السبج *azedarach* على انقسام الخلايا اللمفاوية و الخلايا السرطانية**

رسالة

مقدمة إلى مجلس كلية العلوم - جامعة ديالى
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل

مريم حكمت عبداللطيف

باشراف

ا.م.د. عامر طالب توفيق

ا.م.د. ابراهيم هادي محمد

2017 م

1438 هـ

اقرار المشرفيين على الرسالة وترشيح لجنة الدراسات العليا

نشهد بأن إعداد هذه الرسالة الموسومة بـ (تأثير المستخلص الكحولي والقلوي لنبات السبج *Melia azedarach* على انقسام الخلايا للمفاوية و الخلايا السرطانية) التي قدمتها طالبة الماجستير (مريم حكمت عبداللطيف) قد جرى تحت إشرافنا وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

التوقيع:

التوقيع:

المشرف: د. عامر طالب توفيق

المشرف: د. ابراهيم هادي محمد

اللقب العلمي: استاذ مساعد

اللقب العلمي: استاذ مساعد

المركز العراقي لبحوث السرطان

كلية العلوم / جامعة ديالى

والوراثة الطبية/الجامعة المستنصرية

التاريخ: / / 2016

التاريخ: / / 2016

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصيات المتوافرة نرشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع:

الاسم: د. منذر حمزة راضي

اللقب العلمي: أستاذ مساعد

رئيس لجنة الدراسات العليا- رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ: / / 2016

إقرار المقوم اللغوي

أشهد بأن الرسالة الموسومة بـ(تأثير المستخلص الكحولي والقلوي لنبات السبجح *Melia azedarach* على انقسام الخلايا المفاوية و الخلايا السرطانية) . التي قدمتها طالبة الماجستير (مريم حكمت عبد اللطيف) قد تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وصحح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الامر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

التوقيع:

الاسم:

التاريخ: / / 2017

إقرار المقوم العلمي

أشهد بأن الرسالة الموسومة بـ(تأثير المستخلص الكحولي والقلوي لنبات السبجج *Melia azedarach* على انقسام الخلايا للمفاوية و الخلايا السرطانية) التي قدمتها طالبة الماجستير (مريم حكمت عبداللطيف) قد تمت مراجعتها من الناحية العلمية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة.

التوقيع:

الاسم:

التاريخ: / / 2017

قرار لجنة المناقشة

نشهد بأننا أعضاء لجنة المناقشة قد اطلعنا على الرسالة الموسومة بـ (تأثير المستخلص الكحولي والقلوي لنبات السبج *Melia azedarach* على انقسام الخلايا اللمفاوية و الخلايا السرطانية) التي قدمتها طالبة الماجستير (مريم حكمت عبداللطيف) وناقشنا الطالب في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ / / 2017 وانها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة.

رئيس لجنة المناقشة

التوقيع

الاسم: د.

المرتبة العلمية:

التاريخ / / 2017

عضو لجنة المناقشة

التوقيع

الاسم: د.

المرتبة العلمية:

التاريخ / / 2017

عضو لجنة المناقشة

التوقيع

الاسم: د.

المرتبة العلمية:

التاريخ / / 2017

عضو لجنة المناقشة

التوقيع

الاسم: د.

المرتبة العلمية:

التاريخ / / 2017

عضو لجنة المناقشة

التوقيع

الاسم: د.

المرتبة العلمية:

التاريخ / / 2017

مصادقة عمادة كلية العلوم

اصادق على ما جاء في قرار اللجنة اعلاه

التوقيع :

الاسم : د.

المرتبة العلمية :

التاريخ : / / 2017

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

{ وَنُنزِّلُ مِنَ الْقُرْآنِ مَا هُوَ شِفَاءٌ وَرَحْمَةٌ
لِّلْمُؤْمِنِينَ وَلَا يَزِيدُ الظَّالِمِينَ إِلَّا خَسَارًا }

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

آيه (82) من سورة (الاسراء)

الإهداء

إلى حافظ سرّ الله و مهبطِ وحيه

الرسول الكريم ﴿صلى الله عليه واله وسلم﴾ و أهل بيته الطيبين الطاهرين

إلى ملاكي في الحياة .. إلى معنى الحب والحنان والتفاني .. إلى بسمّة الحياة وسر الوجود إلى من
كان دعاؤها سرّ نجاحي ، حنانها بلسم جراحي ، إلى أغلى الاحباب أمي الحبيبة ...

""اليك ابي الحبيب""

إلى قدوتي الاولى ، ونبراسي الذي ينير دربي

إلى من علمني أن أصمد امام أمواج البحر الثائرة ..

إلى من اعطاني ولم يزل يُعطيني بلا حدود ..

إلى من رفعت راسي عالياً افتخارا به ..

إلى من افتقده في مواجهة الصعاب

ولم تمهلي الدنيا لأرتوي من حنانه

إليك يا من أفديك برووحي !

أبعث لك باقات حبي واحترامي ، عبارات نابغة من قلبي .. وان كان حبر قلمي لا يستطيع

التعبير عن مشاعري نحوك فمشاعري اكبر من أن اسطرها على الورق .. ولكنني لا املك

الا ان ادعو " الله سبحانه " ان يجمعني بك في الفردوس الاعلى " !

إلى القلوب الطاهرة الرقيقة والنفوس البريئة إلى رياحين حياتي أخي واختي

إلى الأرواح التي سكنت تحت تراب الوطن الحبيب الى ارواح الشهداء ...

مرح

الشكر و التقدير

الحمدُ لله رب العالمين والصلاة والسلام على سيدنا محمد وعلى آله الطيبين الطاهرين وصحبه المنتجبين، الحمد لله على ما أنعم علينا وهدانا إلى طريق العلم والمعرفة ووفقنا إلى إتمام البحث فبجلاله قويت عزيمتي وبه كان توفيقي وعليه توكلت.

أتقدم بالشكر الجزيل والإمتنان الخالص والإحترام الكبير إلى أستاذي ومشرفي الفاضل أ.م. د. ابراهيم هادي محمد لتوجيهاته العلمية السديدة ومتابعته لي وحرصه الشديد على إتمام البحث على نحو علمي فشكراً لك أستاذي وشكراً لصبرك الجميل وجهدك الكبير معي فجزاك الله عني خير الجزاء وأعزك بعزه. كما أقدم شكري واعتزالي الى أ.م.د. عامر طالب توفيق على مساعدته لي في تسهيل مهمة بحثي .

وأتقدم بالعرفان والجميل إلى عمادة كلية العلوم واساتذة قسم علوم الحياة الذين أتاحوا لي فرصة الدراسة وإنجاز متطلبات البحث.

ويمتد شكري وتقديري إلى الدكتور ناهي يوسف ياسين مدير عام المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية ، الى جميع منتسبي المركز لمساعدتهم لي في انجاز البحث.

والشكر والوفاء الى الدكتور احمد فاضل نعمة في مركز بحوث التقنيات الاحيائية /جامعة النهرين ، الى الدكتور علي زيد فاضل في كلية التقنيات الاحيائية/جامعة النهرين ، الى الدكتور خزعل ضبع وادي في جامعة ديالى /كلية العلوم/قسم علوم الحياة ، الى زميلي في الدراسة علي غازي حمدي لجهودهم المشكورة و مساعدتهم القيمة لي في اثناء البحث ، والى جميع الناس الطيبين الذين وقفوا معي طوال مدة الدراسة.

مرحب

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية الى اختبار تأثير المستخلصات الكحولية والقلويدات الخام المستخلصة من نبات السبج *Melia azedarach* في خطين خلويين سرطانيين هما سرطان الكبد البشري HepG2 Liver cancer cells وسرطان المريء Oesophagus cancer cells و SK-GT2 والخط الطبيعي لكبد الانسان WRL68 Liver normal cells . تم الكشف الكيميائي عن بعض المكونات الكيميائية لمستخلص ثمار نبات السبج ، فظهر أن النبات يحتوي على مجموعة من المركبات الكيميائية مثل القلويدات ، الفلافونات ، التانينات ، التربينات والسترويدات.

تضمن الاختبار الاول تأثير المستخلصين الكحولي و القلويدي على انقسام الخلايا للمفاوية لدم الانسان، اذ وجد أن المستخلص الكحولي الخام والقلويدي الخام لثمار السبج أدى الى ايقاف انقسام الخلايا للمفاوية لدم الانسان في الطور الاستوائي، بنسب مختلفة إذ ازدادت النسبة مع زيادة التركيز، و تراوحت نسبة الخلايا المتوقفة في الطور الاستوائي للمستخلص الكحولي بين (0.30%-2.90%) للتركيز من (12.5-400) مكغم/مل ، اما بالنسبة للمستخلص القلويدي كانت نسبة الخلايا المتوقفة في الطور الاستوائي بين (0.56%-3.83%) للتركيز من (12.5-400) مكغم/مل. و الاختبار الثاني تضمن تأثير المستخلصين الكحولي و القلويدي على نمو خلايا الخطوط الخلوية السرطانية HepG2 ، SK-GT2 و الخط الطبيعي WRL68 باستخدام اختبار 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium MTT bromide . اذ وجد ان لكلا المستخلصين سمية خلوية على الانواع المختلفة من الخلايا السرطانية تعتمد درجة تأثيرهما على تركيزه و نوعي المستخلص و الخلايا . فمن ناحية

تأثير التركيز فقد وجد أنّ الفعالية المضادة للاورام تزداد مع ازدياد تركيز المستخلص . ومن ناحية اخرى نوع خلايا الخط السرطاني فقد وجد ان نسب تثبيط نموها بتأثير كل من المستخلصين تختلف باختلافهما، حيث كانت اقل نسبة تثبيط للمستخلص الكحولي هي 9.8% بتركيز 12.5 مكغم/مل واعلى نسبة هي 59.2% بتركيز 400 مكغم/مل لخلايا الخط السرطاني HepG2، اما خلايا الخط السرطاني SK-GT2 فكانت اقل نسبة تثبيط للمستخلص الكحولي هي 4.3% بتركيز 12.5 مكغم/مل واعلى نسبة هي 36.3% وبتركيز 400 مكغم/مل ، بالنسبة للخط الطبيعي WRL68 اقل نسبة تثبيط 3.07% بتركيز 12.5 مكغم/مل ، اعلى نسبة تثبيط 28.11% بتركيز 400 مكغم/مل ، اما للمستخلص القلويدي كانت اقل نسبة تثبيط هي 30.4% بتركيز 12.5 مكغم/مل ، اعلى نسبة هي 65% وبتركيز 400 مكغم/مل لخلايا الخط السرطاني HepG2، اما خلايا الخط السرطاني SK-GT2 فكانت اقل نسبة تثبيط للمستخلص القلويدي هي 3.7% بتركيز 12.5 مكغم/مل ، اعلى نسبة هي 30.8% وبتركيز 400 مكغم/مل ، وللخط الطبيعي WRL68 اقل نسبة تثبيط 0.86% بتركيز 12.5 مكغم/مل و اعلى نسبة تثبيط 14.8% بتركيز 400 مكغم/مل. ومن خلال نتائج الاختبار السابق تم اختيار المستخلص القلويدي للدراسة في اختبار اخر على خلايا الخط السرطاني HepG2. فقد تم استخدام اختبار (HCS) High Content Screening لدراسة سمية المستخلص القلويدي على خلايا الخط السرطاني HepG2 من خلال قياس التغيرات التي تحدث في بعض المؤشرات الخلوية والتي تشمل على: نفاذية الخلية Cell permeability وعدد الخلايا Cell count والمحتوى النووي للخلايا Nuclear intensity ، نفاذية غشاء المايتوكونديريا Mitochondrial membrane potential MMP ، مستوى تحرر سايتوكروم سي Cytochrome C من الخلايا، ومن نتائج هذا الاختبار فقد لوحظ ان

للمستخلص القلويدي تأثيراً واضحاً على نفاذية الخلايا السرطانية بسبب الاضرار التي تحدث في الغشاء الخلوي للخلايا والمؤدية الى زيادة نفاذية الاغشية الخلوية ، و على المسارات الايضية للمايتوكوندريا داخل الخلية من خلال مراقبة التغيرات التي تحدث في نفاذية اغشية الماتوكوندريا وقياس مستوى تحرر السايتركروم C، و كذلك على الكثافة النووية للخلايا السرطانية عند التركيز العالي 400 مكغم/مل ، بينما لوحظ التأثير اقل على الخلايا عند التراكيز الأخرى 200,100 مكغم/مل.

قائمة المحتويات

الصفحة	الموضوع	ت
I	الاية القرآنية	
II	الاهداء	
III	الشكر والتقدير	
IV	الخلاصة	
VII	قائمة المحتويات	
XIV	قائمة الاشكال	
XVI	قائمة الجداول	
XVIII	قائمة المختصرات	
1	الفصل الاول : المقدمة	
3	الفصل الثاني : استعراض المراجع	
3	الاورام السرطانية	1.2
3	انواع الاورام	2.2
3	الاورام الحميدة	1.2.2
4	الاورام الخبيثة	2.2.2

5	عملية التسرطن	3.2
6	مرحلة البدء	1.3.2
6	مرحلة التحفيز	2.3.2
7	مرحلة التقدم	3.3.2
7	الموت المبرمج للخلايا	4.2
9	علاج السرطان	5.2
10	العلاج الجراحي	1.5.2
10	العلاج الاشعاعي	2.5.2
10	العلاج الكيميائي	3.5.2
11	العلاج الاحيائي	4.5.2
11	العلاج المناعي	1.4.5.2
11	العلاج الجيني	2.4.5.2
12	المواد المضادة للنبيبات الدقيقة	6.2
14	الفعل الوقائي للنباتات الطبية من السرطان	7.2
16	الدور الواعد للنباتات الطبية في علاج السرطان	8.2
17	نبات السبجج	9.2

17	تصنيف النبات	1.9.2
18	التسمية	2.9.2
18	الانتشار	3.9.2
18	الوصف	4.9.2
19	المركبات الفعالة في نبات السبج	5.9.2
19	الاهمية الطبية لنبات السبج	6.9.2
21	الفصل الثالث: المواد وطرائق العمل	
21	المواد	1.3
21	الاجهزة و الادوات	1.1.3
23	المواد الكيميائية و البيولوجية	2.1.3
23	العدة التشخيصية الجاهزة kit	3.1.3
23	جمع عينات النبات	2.3
24	تحضير المستخلصات	3.3
24	تحضير المستخلص الكحولي الخام لثمار نبات السبج	1.3.3
24	تحضير المستخلص القلويدي الخام لثمار نبات السبج	2.3.3
25	المحاليل والكواشف	4.3

25	الكشف الكيميائي التمهيدي لبعض المكونات الكيميائية في ثمار نبات السبج	1.4.3
26	المحاليل الخاصة باختبار السمية الخلوية على الخلايا اللمفاوية	5.3
26	الوسط الزراعي الكامل	1.5.3
27	مصل العجل الجنيني	2.5.3
27	الملزن النباتي	3.5.3
27	الكولجسين	4.5.3
27	محلول واطئ التوتر	5.5.3
27	المحلول المثبت	6.5.3
27	محلول دارئ سورنسن	7.5.3
28	ملون كمزا	8.5.3
28	جمع عينات الدم	9.5.3
28	تحضير الشرائح الزجاجية	10.5.3
28	دراسة تأثير تراكيز مختلفة من المستخلصين الكحولي و القلويدي الخام في معامل الانقسام الخلوي في الخلايا	6.3

	اللمفاوية لدم الانسان	
30	محاليل وكواشف الزراعة الخلوية	7.3
30	بيكربونات الصوديوم	1.7.3
31	الوسط الزراعي	2.7.3
31	المحلول الملحي الفسيولوجي	3.7.3
31	محلول التريسين-فيرسين	4.7.3
32	خطوط الخلايا السرطانية المستخدمة	8.3
32	الخط الخلوي لسرطان الكبد في الانسان HepG2	1.8.3
32	الخط الخلوي لسرطان المرئ SK-GT2	2.8.3
32	الخط الخلوي الطبيعي لكبد الانسان WRL68	3.8.3
32	تتمية خلايا خطوط الخلوية السرطانية HepG2 و SK- GT2 و الخط الطبيعي WRL68	4.8.3
34	اختبار MTT لفحص حيوية الخلايا	9.3
34	طريقة العمل	1.9.3
34	اختبار High Content Screening (HCS) لتقييم السمية الخلوية	10.3

36	تحضير المحاليل المستخدمة	1.10.3
37	طريقة العمل	2.10.3
38	التحليل الاحصائي	11.3
39	الفصل الرابع: النتائج والمناقشة	
39	تحضير المستخلصات الخام لثمار نبات السبج	1.4
39	الكشف الكيميائي التمهيدي لبعض مركبات الايض الثانوي في مستخلصات نبات السبج	2.4
41	دراسة تأثير المستخلص الكحولي الخام لثمار نبات السبج و المركب القلويدي بوصفهما مواد محفزة او مضادة لانقسام الخلايا للمفاوية لدم الانسان	3.4
41	تأثير المستخلصات النباتية بوصفها مواد محفزة لانقسام الخلايا للمفاوية لدم الانسان	1.3.4
41	تأثير المستخلصات النباتية بوصفها مواد مضادة لانقسام الخلايا للمفاوية لدم الانسان	2.3.4
47	التأثير السمي للمستخلص الكحولي الخام و المستخلص القلويدي الخام للثمار الجافة لنبات السبج في نمو خطين من الخطوط السرطانية و خط طبيعي	4.4
48	تأثير المستخلص الكحولي الخام لثمار نبات السبج على خلايا الخطوط الخلوية السرطانية و الطبيعية	1.4.4

52	تأثير المستخلص القلويدي الخام لثمار نبات السبجح على خلايا الخطوط الخلوية السرطانية و الطبيعية	2.4.4
61	تأثير المستخلص القلويدي لثمار نبات السبجح على الخط السرطاني HepG2 باستخدام فحص High Content Screening (HCS)	5.4
68	الاستنتاجات	
69	التوصيات	
70	المصادر العربية	
72	المصادر الاجنبية	

قائمة الأشكال

الصفحة	العنوان	رقم الشكل
7	عملية التسرطن بمراحلها الثلاثة	1.2
9	عملية الموت الخلوي المبرمج	2.2
18	نبات السبحيح	3.2
44	طور استوائي متوقف للخلايا اللمفاوية لدم الانسان عند استخدام التركيز 400 مكغم/مل للمستخلص الكحولي الخام (400X)	1.4
44	طور استوائي متوقف للخلايا اللمفاوية لدم الانسان عند استخدام التركيز 400 مكغم/مل للمستخلص القلويدي الخام (400X)	2.4
51	تأثير المستخلص الكحولي الخام لثمار نبات السبحيح على الخط الخلوي السرطاني HepG2 لفترة 24 ساعة و بدرجة حرارة 37م باستخدام اختبار MTT	3.4
51	تأثير المستخلص الكحولي الخام لثمار نبات السبحيح على الخط الخلوي السرطاني SK-GT2 لفترة 24 ساعة و بدرجة حرارة 37م باستخدام اختبار MTT	4.4
52	تأثير المستخلص الكحولي الخام لثمار نبات السبحيح على الخط الطبيعي WRL68 لفترة 24 ساعة و بدرجة حرارة 37م باستخدام اختبار MTT	5.4
55	تأثير المستخلص القلويدي الخام لثمار نبات السبحيح على الخط الخلوي السرطاني HepG2 لفترة 24 ساعة و بدرجة حرارة 37م باستخدام اختبار MTT	6.4
56	تأثير المستخلص القلويدي الخام لثمار نبات السبحيح على الخط الخلوي السرطاني SK-GT2 لفترة 24 ساعة و بدرجة حرارة 37م باستخدام اختبار MTT	7.4

56	تأثير المستخلص الكحولي الخام لثمار نبات السبجج على الخط الطبيعي WRL68 لفترة 24 ساعة و بدرجة حرارة 37م باستخدام اختبار MTT	8.4
57	مقارنة بين خلايا HepG2 عند تركيز 400 مكغم/مل بعد 24 ساعة للمستخلص الكحولي و القلويدي لنبات السبجج (400x)	9.4
57	مقارنة بين خلايا SK-GT2 عند تركيز 400 مكغم/مل بعد 24 ساعة للمستخلص الكحولي و القلويدي لنبات السبجج (400x)	10.4
64	تأثير التراكيز المختلفة للمستخلص القلويدي على المحتوى النووي و نفاذية الاغشية الخلوية و نفاذية غشاء المايتوكوندريا و مستوى تحرر السايتركروم سي لخلايا الخط السرطاني HepG2 بعد الحضان لمدة تعريض 24 ساعة و بدرجة حرارة 37م	11.4

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
1.3	الأجهزة والأدوات.	21
2.3	المواد الكيميائية والبيولوجية	23
3.3	العدة التشخيصية الجاهزة	23
4.3	الوسط الزراعي.	31
5.3	مكونات العدة التشخيصية لاختبار HCS	35
6.3	تحضير المحاليل المستخدمة لاختبار HCS	36
1.4	الكشوفات الكيميائية لبعض المركبات الكيميائية في مستخلص ثمار نبات السبجج	40
2.4	تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي والقلويدي الخام لثمار نبات السبجج في دليل انقسام الخلايا للمفاوية لدم الانسان بدلالة الطور الاستوائي المتوقف	43
3.4	نسب التثبيط في الخط الخلوي السرطاني HepG2 بتأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي الخام لثمار نبات السبجج لمدة تعريض 24 ساعة و درجة حرارة 37م باستخدام اختبار MTT	49
4.4	نسب التثبيط في الخط الخلوي السرطاني SK-GT2 بتأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي الخام لثمار نبات السبجج لمدة تعريض 24 ساعة و درجة حرارة 37م باستخدام اختبار MTT	50
5.4	نسب التثبيط في الخط الطبيعي WRL68 بتأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي الخام لثمار نبات السبجج لمدة تعريض 24 ساعة و درجة حرارة 37م باستخدام اختبار MTT	50

54	نسب التنشيط في الخط الخلوي السرطاني HepG2 بتأثير تراكيز مختلفة من المستخلص القلويدي الخام لثمار نبات السبج لمدة تعريض 24 ساعة و درجة حرارة 37م باستخدام اختبار MTT	6.4
54	نسب التنشيط في الخط الخلوي السرطاني SK-GT2 بتأثير تراكيز مختلفة من المستخلص القلويدي الخام لثمار نبات السبج لمدة تعريض 24 ساعة و درجة حرارة 37م باستخدام اختبار MTT	7.4
55	نسب التنشيط في الخط الطبيعي WRL68 بتأثير تراكيز مختلفة من المستخلص القلويدي الخام لثمار نبات السبج لمدة تعريض 24 ساعة و درجة حرارة 37م باستخدام اختبار MTT	8.4
63	قيم المعالم الخلوية المستخدمة للكشف عن فعالية المستخلص القلويدي على خلايا الخط الخلوي HepG2 باستخدام جهاز HCS و لفترة 24 ساعة بدرجة حرارة 37م	9.4

قائمة المختصرات

A375	Skin cancer cells
A549	Lung cancer cells
AMN-3	Ahmed-Mohammad-Nahi-2003
Apaf-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia related
Bax	BCL2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
BH3	Bcl-2 homology domain 3
caspase	cysteine-dependent aspartate-specific proteases
DMSO	Di methyl sulfoxide
DNA	Deoxyribose nucleic acid
ECM	Extra-cellular matrix
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	Fetal Calf Serum
HCT-116	Human colon carcinoma

HCS	High Screening Content
Hela	Henrietta Lacks Cervix Carcinoma
Hep-2	Human Larynx epidermoid carcinoma
HepG2	Liver cancer cells
HL-60	Human leukemic cell line
IR	Inhibition rate
MCF-7	Human caucasian breast adenocarcinoma
MEM	Minimum Essential Media
MI	Mitotic Index
MMP	Mitochondrial membrane potential
M phase	Mitosis phase of the Cell Cycle
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol- 2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
PBS	Phosphate buffer saline
Pc3	Prostate cancer cell
PCD	Programmed Cell Death
PHA	phytohaemagglutinin

PTP	Permeability Transition Pore
RPMI	Rosswell Park Memorial Institute
SAS	Statistical analysis system
SFM	serum free media
SKGT2	Oesophagus cancer cells
SKOV-3	Human caucasian ovary adenocarcinoma
T47D	Human breast tumour
TCC	tubulin colchicines complex
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
TNFR-1	Tumor Necrosis Factor Receptor-1
T/V solution	Trypsin / Versene Solution
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WRL68	Liver normal cells

المقدمة Introduction

إنّ السرطان من المشاكل الصحية الرئيسية والكبرى في العالم، فهو من المسببات المهمة في زيادة حالات الوفيات بين الأطفال والبالغين، ينتشر على نحو كبير بين سكان العالم ، ويحتل المرتبة الثانية للأمراض بعد امراض القلب والشرابين. على الرغم من وجود العديد من العلاجات له كالعلاج الكيميائي والجراحي والفيزيائي لكنها لم تحقق النتائج المطلوبة ولها اضرار جانبية، لذلك اتجه الباحثون الى ايجاد طرق علاجية جديدة وبديلة من خلال استعمال المصادر الطبيعية كالنباتات والاعشاب الطبيعية الحاوية على كثير من المركبات الكيميائية ذات الفاعلية العالية في علاجه (Demark *et al.*,2015). ان استخدام المنتجات الطبيعية لاسيما النباتية منها لم يكن بالشيء الجديد على الانسان فقد استعملها منذ القدم اذ كان الاستطباب بالأعشاب من الامور المعروفة جيدا لدى العرب والاعريق والصينيين في العالم القديم، وعند الهنود الحمر في العالم الحديث (Azaizeh *et al.*,2006).

تلعب المركبات المشتقة من النباتات دوراً مهماً في تطوير العديد من المواد المضادة للسرطان، ومنها المواد المستخدمة حالياً هي Taxol و Vinblastine و Topotecan وغيرها (Rajandeeep *et al.*,2011). ولقد اثبتت النباتات الطبية والمواد المشتقة منها فعاليتها في علاج السرطان، و تشكل خطورة اقل بأثارها الجانبية وامانها في العلاجات الدوائية للسرطان. وان الدراسات في وقتنا الحاضر لإيجاد علاج للسرطان تنتج نحو النباتات والمنتجات الطبيعية المشتقة منها وقد تم تحديد العديد منها كعوامل فعالة ضد السرطان (Om *et al.*,2013). هناك ما لا يقل عن 250000 نوع من النباتات الطبية منها اكثر من 1000 نبات يمتلك خواص مضادة للسرطان (Aggarwal and Shishodia, 2006). وكما ان أكثر من 50% من العقاقير المستخدمة في الوقت الحاضر هي من المنتجات الطبيعية التي لها قدرة السيطرة على الخلايا السرطانية من خلال تأثيرها على آليات الانقسام الخلوي او على مرحلة ما قبل الانقسام كتضاعف الدنا (Mohd *et al.*,2010).

تعد النباتات مصدراً مهما للمركبات الفعالة بايولوجياً و ان نسبة منها قد تم فحصها وتأصيلها لتكون مصدراً مهماً من المواد المضادة للسرطان (Dhanamani *et al.*,2011). وفي العراق تم الكشف عن عدد من المستخلصات النباتية التي تمتلك فعالية مضادة للسرطان

التي تعتمد بشكل اساس على تراكيز المستخلص ومدة التعريض ونوع الخلايا. فقد اشار (عبد الرضا، 2012) الى أن مستخلصات قشور الليمون تمتلك تأثيرا مثبطا لنمو الخطوط الخلوية السرطانية وقد يعود هذا التأثير الى احتوائها على الفلافونويدات والتربينات التي هي من المركبات الفعالة المضادة للأكسدة. كما وجد (سلمان و اخرون، 2014) بأن المستخلص المائي لنبات البريين *Portulaca oleracea* يمتلك فعالية تثبيطية لنمو خلايا الخط الخلوي السرطاني Hep-2. ولقد اعطت تلك النتائج حافزا للبحث عن نباتات محلية اخرى التي ربما تكون ذات كفاءة عالية في التأثير على الخلايا السرطانية وتثبيط انقسامها، و تعتمد عليه المراكز العالمية للسرطان حول النباتات المحلية في بلدانهم. تعد عملية تثبيط نمو الخطوط الخلوية السرطانية خارج جسم الكائن الحي الخطوة الاولى في استخدام هذه النباتات في علاج السرطان. تأتي هذه الدراسة ضمن اطار الدراسات المذكورة اعلاه وذلك من خلال قدرة ثمار نبات السبج على تثبيط نمو الخلايا السرطانية.

اهداف الدراسة

1. استخلاص القلويدات من ثمار نبات السبج *Melia azedarach*.
2. استخدام المستخلصات الكحولية و القلويدية في ايقاف نمو الخلايا للمفاوية لدم الانسان في الطور الاستوائي ومقارنتها بالكولجسين.
3. التحري عن السمية الخلوية للمستخلصين الكحولي و القلويدي لثمار نبات السبج خارج الجسم الحي *in vitro* على نوعين من الخطوط الخلوية وهي خط خلايا سرطان الكبد HepG-2 وخلايا سرطان المريء SK-GT2 و الخط الطبيعي WRL68 باستخدام اختبار . MTT
4. الكشف عن تأثير المستخلص القلويدي على خلايا الخط الخلوي السرطاني HepG-2 باستخدام اختبار High Content Screening (HCS) و دراسة المؤشرات الخلوية التي يتم بها التثبيط .

2. استعراض المراجع Literature review

1.2 الاورام السرطانية Tumors

الورم عبارة عن كتلة نسيجية تنمو بصورة غير طبيعية وبمعدل يفوق الحد الطبيعي اذ تستمر بالنمو حتى بعد زوال المؤثر. ينشأ الورم نتيجة تعرض الخلية الطبيعية إلى بعض المؤثرات أو التغييرات مما يجعلها تختلف عن الخلية الطبيعية التي نشأت منها كما انها لا يمكن أن تعود إلى أصلها بعد زوال المؤثر، لذلك فان الأورام سلسلة من الأمراض الخبيثة المتميزة بالنمو غير الطبيعي للخلايا الغازية للأنسجة المجاورة وحتى الأنسجة البعيدة قد تكون مؤدية إلى موت المريض (Andersen *et al.*, 2014).

إن العديد من خلايا الجسم البشري تستمر بالنمو بواسطة الانقسام الخلوي غير المباشر (Mitosis) لمدة طويلة حتى بعد اكتمال تكوين ونضوج الجسم، والسبب في ذلك إن هذه الخلايا تقع في مناطق الجسم التي تتعرض إلى ضرر مما يؤدي إلى موت الخلية، وعندها تستبدل بخلية أخرى عن طريق الانقسام (Visovsky and Workman, 2000). إن نمو هذه الخلايا الطبيعية في الجسم مسيطرٌ عليه بواسطة أنواع من الاشارات مثل التثبيط بواسطة الاتصال بين خلية وأخرى، وعندما تفقد اليات السيطرة على النمو الطبيعي والوظائف للخلايا تنقسم الخلايا من دون الحاجة إلى النمو أو استبدال خلايا ميتة وعندها يكون نمواً غير طبيعي يسهم في عملية تكوين الورم، أي ان الاورام تنتج عن فقدان السيطرة على انقسام الخلايا فيكون الورم اما ورم حميد او ورم خبيث (Wang *et al.*, 2014).

2.2 انواع الاورام

1.2.2 الأورام الحميدة Benign tumor

تتألف هذه الاورام من خلايا تمتلك خصائص الخلايا الطبيعية ولكنها لا تستجيب لمدة طويلة لسيطرات النمو الطبيعية، هذه الخلايا تكون فاقدة القدرة على اجتياح الأنسجة الطبيعية أو الانتشار إلى مواقع بعيدة لكن نموها يكون بمعدل غير طبيعي وفي مكان غير طبيعي وان اغلب الأورام الحميدة لا تسبب مشاكل حقيقية ومن الممكن إزالتها عن طريق الجراحة (Bower, 2014). هذا النوع من الورم يتميز بعدم انتشاره وتموضعه في المكان الذي نشأ منه كما انه يكون تمايزاً وسهل الاستئصال دون عودته إلى النمو ثانية (Bailey and

(Loves, 2010) . الاورام الحميدة غالبا تكون محاطه بأنسجة ليفية تفصلها عن الأنسجة الطبيعية لتبقى تموضعه في موقعها الأصلي كما هو الحال في أورام الرحم الليفية واورام المستقيم الحميدة والشامات ،ان بعض هذه الأورام يسبب مشاكل بسبب كبر حجمها حيث تؤدي إلى الضغط على العضو المصاب أو الأعضاء القريبة منها مما يمنعها من العمل على نحو طبيعي ، لذلك يتم استئصالها بسهولة ولا يعود الى النمو ثانية وان المصاب يعيش مدة طويلة طبيعي .(Kummerow *et al.*.,2015).

2.2.2 الأورام الخبيثة Malignant tumor

خلايا هذا النوع تكون غير طبيعية بعدة خصائص إلى جانب تكاثرها المفرط، ويعزى هذا إلى احتمال امتلاك هذه الخلايا السرطانية لعدد غير طبيعي من الكروموسومات ووجود تغيرات غير طبيعية في أسطحها وداخلها إذ تفقد التصاقها إلى الخلايا المجاورة وعندها تستطيع أن تنتشر إلى الأنسجة المجاورة مسببة ضعف وظائف عضو أو أكثر من الأعضاء ثم الانتشار (Lester *et al.*.,2015).

يتباين في هذا النوع شكل الخلايا من جيدة التمايز الى عديمة التمايز مما يجعلها تتصف بتغيرات في شكلها وحجمها ووظيفتها لتصبح عديمة الفائدة وعالة على الجسم ، والذي يميزها عن الخلايا الطبيعية وجود نواة كبيرة الحجم مقارنة بالسييتوبلازم فضلا عن زيادة قاعدية السييتوبلازم ، كبر حجم الخلايا العملاقة ،اختلافها بالشكل والحجم وتعدد الانوية. تتم تلبية الحاجة المستمرة للطاقة اللازمة للانقسام الزائد عن طريق ارتفاع معدلات التحلل السكري الذي ينتج عنه زيادة في إنتاج حامض اللبنيك (Krupe *et al.*.,2014). إن الايض للخلايا السرطانية يحدث غالبا في ظروف لاهوائية اكثر مما هو عليه للانقسام الاعتيادي للخلايا الطبيعية. بإمكان هذه الخلايا ان تستهلك مستويات عالية من الكلوكوز والاحماض الامينية لزيادة حاجتها لبناء المادة الوراثية الضرورية لانقسامها المتكرر لذلك تكون فيها مستويات عالية من Hexokinase (Maldosievicova, 2011) . ويصعب تمييز الأورام الخبيثة عن النسيج الذي نشأت منه، وذلك لأنها تقتقر لوجود الحاجز الفاصل بين الورم والأنسجة ، فضلاً عن امتلاكها عدة أنزيمات تقوم بهضم الأغشية القاعدية للخلايا مما يساعدها على الانتقال وغزو الأنسجة أو الأعضاء الحيوية سواء المجاورة لموضع نشوئها أو البعيدة عنها والتأثير فيها وقد تسبب تدميرها . خلايا الورم تنتقل في أغلب الأحيان إلى المواقع البعيدة عبر الدورة الدموية

والجهاز اللمفاوي لتكوين الأورام الثانوية (Wang *et al.*, 2014)، فهي تهاجم وتدمر الخلايا والأنسجة المحيطة بها ، وايضا لها قدرة عالية على الانتشار ، فالخلايا السرطانية التي يتكون منها الورم هي خلايا مشوهة ، تتكاثر بسرعة وتكيف نفسها حسب الظروف التي تجابهها (Boissel and Sender, 2015) . إن عملية الانتشار هذه تسمى (Metastasis)، وترتبط احد الاسباب التي تزيد من انتشار الخلايا السرطانية بزيادة كمية بروتينات التقلص (Contractile proteins) في الخيوط الدقيقة (Microfilament) مع فقدان عوامل تثبيط الالتصاق الناتج عن التغيير في تركيز ايونات الكالسيوم في غشاء الخلية السرطانية ويحصل التغيير في كفاءة عوامل الالتصاق الخلوية وعوامل تثبيط الالتصاق نتيجة لتغير تركيب البروتينات السكرية (Glycoproteins) الموجودة على السطوح الخلوية التي تزيد على نحو محدود جدا من الارتباطات المحكمة (Demark *et al.*, 2015). ان نمو الورم وانتشاره يعتمد على تكوين الاوعية الدموية التي تمد الخلايا السرطانية بالمواد الغذائية والاكسجين الضروريين لنموها وتكاثرها وتسمى هذه العملية بالتكوين الوعائي (Angiogenesis) ، اذ تبقى معظم الاورام التي تصيب الانسان في حالة سكون ولا وعائية لمدة طويلة تمتد من شهر الى سنوات وخلال هذه المدة لا يتجاوز عدد الخلايا السرطانية ضمن الورم بضع ملايين قبل ان يتغير التوازن بوجود منظمات تكوين الاوعية الموجبة والسالبة مثل Ang-2 (Angiopoietin) و VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) التي تسهم بتنظيم تكوين ونفاذية الاوعية، وحينها يبدأ الورم بالنمو السريع (Anderson, 2011). ويبدو أن الاورام قادرة على التحكم بمثبطات ومستحثات تكوين الاوعية الدموية (Angiogenesis) عن طريق تغيير التعبير الجيني (Van *et al.*, 2014).

3.2 عملية التسرطن Carcinogenesis

وهي سلسلة من العمليات التي تحدث عند تجمع وتراكم عدد من الطفرات الوراثية الموروثة أو المكتسبة التي تؤدي إلى تنشيط غير طبيعي او تنشيط للجينات الخلوية (Gene activation) المسيطرة على نمو وانقسام الخلية، اذ يتولد السرطان عند تحول خلية مفردة سوية إلى خلية سرطانية نتيجة تلك الطفرات (Guy *et al.*, 2015) .

مراحل نشوء السرطان تقسم على ثلاث مراحل رئيسية (Skolarus *et al.*, 2014) كما مبينة في الشكل (1-2) :

1.3.2 مرحلة البدء Initiation

حيث تبدأ على مستوى الخلية عند تعرضها لأحد العوامل المسرطنة وبشكل كافٍ لحدوث تغيير في مادتها الوراثية إذ يحصل فيها تغيير مصحوبا بكسر أحد خيطي الحلزون المزدوج (DNA double helix breakage) ، مما يؤثر في بيولوجية الخلية ويحولها إلى خلية طافرة (Hanna and Einhorn .,2014) .

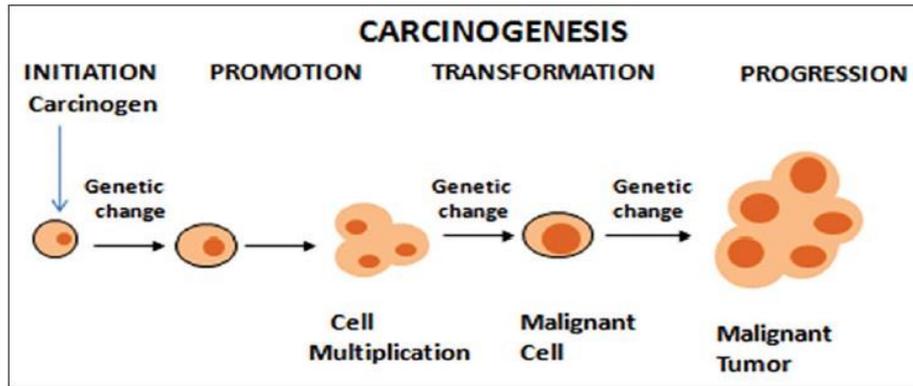
وبشكل طبيعي يمتلك الجسم آليات إصلاح إنزيمية تعمل على إصلاح الخطأ الجيني، فتمنعه من التحول إلى الطفرة. أما إذا بقي الجين الذي يحوي الطفرة غير مكتشف أو لم يتم إصلاحه لمدة معينة أي لخمسة أو ستة انقسامات خلوية فسوف تتكون خلايا غير طبيعية أو خلايا من المحتمل أن تصبح سرطانية (Precancerous)، إذ يستمر جهاز المناعة الفعّال في تحطيم هذه الخلايا لكن إذا لم يحدث هذا الشيء فعندها تدخل الخلايا في المرحلة الثانية (Ogrady *et al.*,2015) .

2.3.2 مرحلة التحفيز Promotion

إذ تتحول الخلايا الطافرة إلى خلايا سرطانية بعملية تدعى " التحول (Transformation) بفعل عوامل خارجية تدعى " المحفزات (Promoters) . وإن هذه المحفزات هي عوامل غير مسرطنة لأنها لا تؤثر في المادة الوراثية بشكل مباشر ولكنها تجعل الخلية عرضة لطفرات إضافية تفقدها وظيفتها المتميزة وتنشط النمو والتكاثر (Juste, 2005). يطلق على الوقت الذي تستغرقه عملية ابتداء الخلية الطبيعية بالتحول إلى خلية طافرة لتصبح خلية سرطانية ومن ثم تطورها إلى ورم ملحوظ بمدة الكمون Latency period، وهذه المدة تختلف باختلاف نوع السرطان، فقد تستمر لمدة شهر أو سنة. وتلعب العوامل المسماة بالمحفزات (المسرعات) Promoted دوراً أساسياً في مدة الكمون مثل العقاقير، الهرمونات وبعض المواد الكيميائية. وتعد المعززات بحد ذاتها غير مسرطنة لأنها لا تؤثر بالمادة الوراثية بشكل مباشر لكنها تجعل الخلية عرضة لطفرات إضافية تفقدها وظيفتها المتميزة وتنشط النمو والتكاثر (Schmid *et al.*,2015).

3.3.2 مرحلة التقدم Progression

تحدث عندما تصبح الخلية السرطانية أكثر ضراوة من خلال امتلاكها خاصية تسمى الانتشار (Metastasis) إذ تترك الخلية موقع الورم الأصلي وتهاجر عن طريق مجرى الدم أو اللمف إلى أجزاء أخرى من الجسم ، ويتم ذلك عندما تنفصل الخلية السرطانية عن الورم الأولي وتحلل البروتينات المكونة للحشوة المحيطة خارج الخلية Extra-Cellular matrix (ECM) التي تفصل الخلايا المتجاورة عن بعضها ، وبتحطم هذه البروتينات فان الخلايا السرطانية تكون قادرة على اختراق ECM ومغادرة النسيج (Demark *et al* .,2015). إن من أكثر المناطق المعرضة لانتقال الاورام اليها هي العقد اللمفاوية ، كما في انتقال خلايا سرطان الثدي إلى العقد اللمفاوية الإبطية ، وعندما تستقر الخلية السرطانية في الموقع الجديد فأنها تستمر بالتكاثر وفي نهاية المطاف يكون قد نشأ ورم جديد في مكان آخر وهذا الورم يسمى بالورم الثانوي (Kummerow *et al* .,2015).



الشكل (1-2) عملية التسرطن Carcinogenesis بمراحلها الثلاثة (Guy *et al* .,2015)

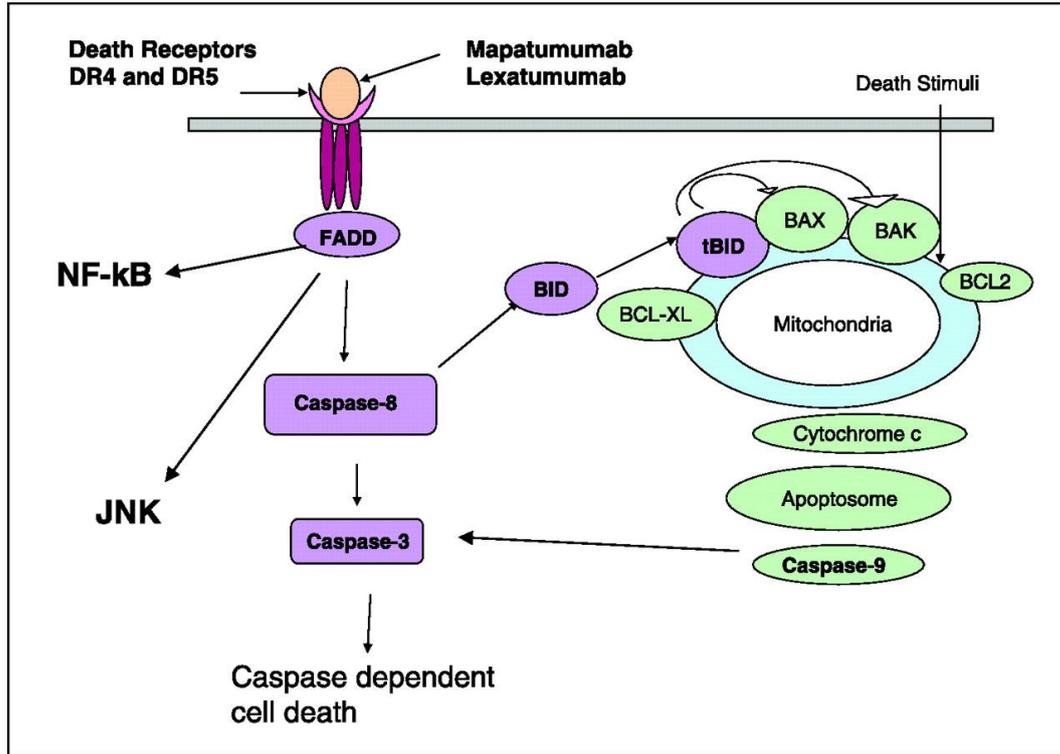
4.2 الموت المبرمج للخلايا Apoptosis

إن مصطلح الـ Apoptosis هو كلمة اغريقية متكونة من مقطعين هما Apo بمعنى بعيداً عن from والمقطع الآخر ptosis بمعنى سقوط أو يسقط اي (Fall away from)، ويطلق عليه موت الخلايا المبرمج أيضاً (Programmed Cell Death (PCD) وتحدث ظاهرة الموت المبرمج بصورة طبيعية في الخلايا المتجددة مثل بشرة الجلد ونقي العظم، إن ظاهرة الموت المبرمج للخلايا هي نظام انتحار دقيق تلجأ إليه الخلية عندما يكون هناك خلل تكون تبعاته مؤذية لها وللجسم عموماً (Pourahmad *et al* .,2012) . وتزيد الاخطاء

الحاصلة في الشفرة الوراثية نتيجة تقدم العمر من احتمالية حدوث السرطان (Serrano and Blasco, 2007). وحينها يبدأ الموت المبرمج بتكوين اجسام الموت المبرمج (apoptotic bodies) ، وهذه الأجسام قابلة للابتلاع والازالة بسرعة من قبل الخلايا البلعمية قبل خروج محتويات الخلية الى الخلايا المحيطة ، وبهذه الطريقة فان الموت الخلوي لا يستدعي اي تفاعل التهابي في الجسم و يُعدّ ذلك اختلافا جوهريا عن النخر (Necrosis) الذي يحدث فجأة نتيجة الاصابة الخلوية الحادة (Alberts et al., 2008). إن الهدف من الموت الخلوي المبرمج هو ازالة بعض الخلايا كجزء من التحول الشكلي فضلا عن الخلايا التي تعرضت الى تلف او خلل وراثي في الكائنات الناضجة ، كما انه يضمن التوازن السليم للأنسجة اذ يسمح بانقسام الخلايا الطبيعية وايقاف انقسام الخلايا الحاوية على ضرر جيني وبكلا الحالتين يتم الحفاظ على التوازن السليم (Adams, 2003). ويحدث الموت الخلوي المبرمج اذا كان الضرر الحادث كبيرا جدا و لا يمكن اصلاحه ، يظهر ذلك بوضوح في الامراض الحادة والمزمنة ونقص المناعة (الايدز) والعقم لكنه لا يحدث في الخلايا السرطانية (Danial and Korsmeyer, 2004).

هناك مسارين رئيسيين للموت الخلوي المبرمج و هما : المسار المعتمد على المستقبلات (الخارجي Extrinsic) والمسار المعتمد على الماييتوكوندريا (الداخلي Intrinsic). ويبدأ المسار الخارجي بالتنسيق مع مستقبلات الموت الخلوي على سطح الخلية، ومن اهم هذه المستقبلات هي مستقبلات عوامل النخر الورمي نوع (1) (TNFR-1) والبروتينات المتعلقة (Fas). اما في المسار الثاني فتقوم الماييتوكوندريا بإنتاج العوامل المضادة للموت الخلوي (Bcl-2 , Bcl-XL) والعوامل المحفزة للموت الخلوي (Bax , cytochrome C , Apaf-1) وهناك بعض الجزيئات التي تؤدي دوراً رئيساً في كلا المسارين وتضم caspases و Bcl-2 homology domain 3 (BH3)، و مستقبلات الموت الخلوي و (Wong, 2011) وتتفاعل جزيئة الـ BH3 مع مضادات الموت الخلوي (Bcl-2) الموجودة على سطح غشاء الماييتوكوندريا مما يؤدي الى ولوج الجزيئات Bax و Bak الى داخل غشاء الماييتوكوندريا ومن ثم تحرر cytochrome C (العوامل المسرعة للموت الخلوي) و يرتبط cytochrome C في السيتوبلازم مع جزيئتين اخريين (procaspase 9 , Apaf-1) مكوناً اجسام الموت المبرمج apoptosomes ومن ثم تبدأ مرحلة الموت الخلوي المبرمج

(Cory and Adams,2002). بالمقابل تمتلك الخلايا عدداً كبيراً من الميكانيكيات التي تحمي الدنا من التحطم والشذوذ الوراثي ، وهناك بروتينات مثل ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) و ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3 related) التي تتحسس لمثل هذا النوع من التحطم فتقوم بتفعيل نقاط التفتيش checkpoints مؤدية الى سكون الدورة الخلوية او تفعيل بروتينات الاصلاح (Bartek and Lukas, 2007).



شكل (2-2) عملية الموت الخلوي المبرمج (Pourahmad *et al.*, 2012)

5.2 علاج السرطان

مازال العلماء والباحثون يسعون إلى إيجاد طريقة مناسبة لعلاج السرطان ولكن على الرغم من ذلك فإنه لا يوجد علاج شافٍ تماماً من هذا الداء الخبيث ، فهناك العديد من الطرائق العلاجية التقليدية وغير التقليدية ، بالرغم من ان هذه الطرائق لا تستطيع القضاء على المرض بشكل نهائي الا أنها قد تطيل من عمر المريض (Kumara *et al.*,2005). فضلا عن ذلك فإن التطور الحاصل في مجال علاجات السرطان لاسيما غير التقليدية منها قد يفتح آفاقاً

كبيرة للشفاء الكامل من ذلك المرض الخبيث ومن بينها العلاج الجيني والعلاج بمركبات الايض الثانوي النباتية (Stanton *et al.*, 2015)، وتقسم الطرائق العلاجية الى:

1.5.2 العلاج الجراحي Surgical treatment

تعد الجراحة هي العلاج الامثل والاكثر فعالية من العلاج الكيميائي والاشعاعي لإزالة الاورام من مواقعها لاسيما الاورام الصغيرة التي من السهل التخلص منها ومنع اعادة نموها مرة اخرى، و يشترط فيه إزالة كل الخلايا السرطانية ، إذ أنّ بقاء بعض الخلايا القليلة يؤدي الى ظهور الورم مرة اخرى وانتشاره الى مواقع اخرى في النسيج نفسه وينتشر الى انسجة اخرى في الجسم (Bailey and Loves , 2010) لذلك تتبع الازالة الجراحية للكتلة الورمية الاولية استعمال العلاج الكيماوي لقتل الخلايا السرطانية المحتمل بقاؤها. في بعض الحالات لا يشمل استئصال الورم كله اما لصعوبة المكان واما لان ازالة الورم بشكل كامل تؤدي الى فقدان وظيفة معينة في الجسم لذلك تعد هذه الطريقة غير مضمونة في نتائجها (Bower , 2014).

2.5.2 العلاج الاشعاعي Radiotherapy

يعد العلاج الاشعاعي مؤثرا كعلاج تخفيض لمرض السرطان (Murray and McEwan, 2007) ، مبدأ المعالجة يتضمن توجيه أشعة عالية الطاقة من الأشعة السينية -X Ray وبطريقة حذرة ومسيطر عليها إلى النسيج الهدف الذي يحتوي على الورم ، إذ يتسبب الإشعاع بإحداثِ أضرارٍ في الـ DNA للخلايا السرطانية والطبيعية، وللاختلافات الجوهرية بين الخلايا السرطانية والطبيعية فمن الممكن أن يقلل التأثير على الخلايا الطبيعية عن طريق عملية التقطير ، التي تعني إعطاء الجرعة الكلية على شكل جلسات ومدة تعريض قليلة غالباً ما تكون مرة يومياً او مرتين الى ثلاث مرات بحسب الحالة. وعندما تتأثر أعداد كافية من الخلايا السرطانية سوف ينكمش الورم ويصبح من الممكن استئصاله. على الرغم من ايجابيات العلاج الاشعاعي الا أنّ هناك خطورة في استعماله وتكمن في قتله للخلايا الطبيعية ايضا فضلا عن تسببه في احداث طفرات وراثية للمادة النووية في حالة عدم تدميرها ، مما يؤدي الى نشوء خلايا سرطانية جديدة ناتجة عن التغيرات الكروموسومية (Burger *et al.*, 2015).

3.5.2 العلاج الكيميائي Chemotherapy

العلاج الكيميائي هو استخدام عقاقير ومركبات كيميائية تهاجم الخلايا الورمية وتترك تأثيرها على المادة الوراثية DNA او ينصب تأثيرها على الكروموسومات او الدورة الخلوية

خلال طور M phase . إنّ هذه المواد تؤثر على الخلايا السرطانية في الوقت نفسه الذي تؤثر فيه على الخلايا الطبيعية (Hershman *et al* .,2014). إنّ أغلب مضادات العلاج الكيميائي تقوم بقتل الخلايا السرطانية بواسطة تأثيرها على تصنيع DNA (DNA Synthesis) او وظيفته، ويحدث ذلك غالباً خلال الدورة الخلوية اذ تؤثر هذه المضادات على طور واحد في الدورة الخلوية فيطلق عليها Cell-Cycle specific او انها تؤثر على أطوار الدورة الخلوية جميعها فيطلق عليها Cell-Cycle nonspecific (Beer *et al* .,2014).

4.5.2 العلاج الاحيائي Biotherapy

يعمل العلاج الاحيائي على تغيير العلاقة ما بين الورم و المضيف بشكل يؤثر سلباً على الورم عن طريق تحفيز وتحويل الاستجابة الحيوية (Biological response) (Mak *et al* .,2014). ويتضمن العلاج الاحيائي انواعاً عدة وهي:

1.4.5.2 العلاج المناعي Immunotherapy

الجهاز المناعي من الاجهزة ذات الدقة العالية في التحري ومتابعة الاجسام الغريبة ، التي يعد السرطان واحد منها ، وبما أن المضيف الحامل للخلايا السرطانية قد فشل جهازه المناعي في التصدي لهذه الخلايا غير الطبيعية لذا فإنّ محور العلاج المناعي هو تقوية ذلك الجهاز بشكل يستطيع فيه الدفاع عن نفسه ضد تلك الخلايا الغريبة (Stanton *et al* .,2015) ، اما في المناعة الفعالة (Active Immunity) مثل استعمال لقاحات ضد الأورام تتكون هذه اللقاحات من خلايا ورمية مقتولة أو مستضدات الأورام ، وفي بعض اللقاحات تتم إضافة مساعدات (Adjuvants) الى الخلايا الورمية المقتولة ، وهذه تمثل استجابة مناعية للورم بشكل غير متخصص Non specific مثل حقن لقاح Bacillus Calmette – Guerin (BCG) للمرضى المصابين بالسرطان (Chapman, 2002) .أو إعطاء أجسام مضادة خاصة بالورم (Tumor – specific Antibiotic) بوضعها جزءاً من المناعة المتفعلة السلبية Passive Immunity (Abbas and Lichtman , 2003) .

2.4.5.2 العلاج الجيني Genetherapy

ان آلية هذا العلاج تهدف إلى إصلاح الخلل الحاصل في المادة الوراثية للخلايا السرطانية.، ويتم عن طريق التحويل الجيني في الخلايا الورمية ، إذ تضاف نسخ من الجينات الكابحة للأورام أو يتم كبح الجينات المسؤولة عن حدوث السرطان (Oncogenes)،

وتعزيز الاستجابة المناعية ضدها ومحاولة تمكين الخلية من الموت (Takahashi *et al.*, 2006). العلاج الجيني يهدف الى إنتاج مضادات من الجين المضاف ليكافح البروتينات الشاذة التي تشفرها الجينات الطافرة. ومن الطرائق الاخرى ايضاً، غرز جينات طبيعية بدل الجينات الطافرة مثل جينات إصلاح الـ DNA، وجينات تشفر الى مركبات مضادة لإنزيم الـ Telomerase، وبذلك تسهم في شيخوخة الخلية السرطانية وقتلها، أو ان تعمل نواتجها بوصفها مضادات لتكوين الأوعية الدموية فلا يصل الدم إلى الورم. كذلك منع انتشار الورم إلى مناطق أخرى عن طريق إنتاج مثبطات للإنزيمين الـ protease و Collagenase. (Stone, 2002).

6.2 المواد المضادة للنيبيات الدقيقة Anti-microtubules agents

نظراً لأهمية الدور الذي تؤديه النيبيات الدقيقة في انقسام الخلية مما جعلها الهدف المناسب في تطور أدوية العلاج الكيميائي (chemotherapeutic drugs) ضد الانقسام السريع للخلايا السرطانية (Zhou and Giannakakou, 2005)، فإن أغلب المواد المضادة للانقسام (Anti-mitotic drugs) والشائعة الإستخدام تؤثر في ديناميكية نيبيات المغزل (Jordan and Wilson, 2004).

تُقسم العقاقير المضادة للانقسام والهادفة للنيبيات الدقيقة على مجموعتين رئيسيتين هما:

1- المجموعة الأولى: تعرف بـ (Microtubule-destabilizing agents) وتثبط بلمرة النيبيات الدقيقة عند التراكيز العالية وتتضمن هذه المجموعة الكولجسين Colchicine وعدداً من Vinca alkaloids (Vincristine و Vinblastin و Vindesine و Vinorelbine و Estramustine و Halichondrins و Cryptophycins و Vinflunine و Combretastatins). (Jordan, 2002).

2- المجموعة الثانية: تعرف بـ Microtubule-stabilizing agents وتمنع هذه المواد إزالة البلمرة وتتضمن paclitaxal (وهي المادة الأولى التي شخصت في هذه المجموعة) و Docetaxol (Taxotere) و Etoposide و Discodermolide و Eleutherobins و Sarcodictyins و Rhazinalam و Lauimalide و Polyisoprenyl و beuzophenones (Jimenez-Barbero *et al.*, 2002).

يمكن تقسيم هذه المواد على مجموعات عدّة اعتماداً على موقع ارتباطها وطريقة تفاعلها إذ تم تعريف ثلاثة أنواع لمواقع ارتباط العقاقير على التيوبولين هي: موقع ارتباط الكولجسين (Colchicine binding site) وموقع ارتباط التاكسول (Taxol-binding site) وموقع ارتباط الفينكا (Vinca binding site)، أما المواد الأخرى فقد تتنافس على هذه المواقع عند ارتباطها (Jordan,2002).

تعد مادة الكولجسين من المواد الشائعة الاستخدام في إيقاف الانقسام الخلوي وهي من انواع الامينات Alkaloidal amine المعزولة من جذور نبات *Colchicum autumnale* (Sharma and Sharma,1980)، إذ ترتبط هذه المواد بالسطح الداخلي للثنائيات المختلفة بين الألفا والبيتا تيوبولين (Hastie, 1991)، فتكون معقد تيوبولين كولجسين (tubulin) (TC complex) الذي يثبط بلمرة التيوبولين وتكوين النيببات الدقيقة نتيجة حثه للتغيرات في هيئة التيوبولين مما يغير التماسك او الالتصاق ضمن النيببات الدقيقة وتشويه النمو الطبيعي لها (Corriea and Lobert,2001) ، وهناك مواد ترتبط بموقع ارتباط الكولجيسين منها podophyllotoxin فهو يتنافس مع موقع ارتباط الكولجيسين لكنه لا يحث نشاط GTPase أو يحث تغيرات شكلية (Himes,1991). وقد عُزل من نبات الصفصاف *Combretum caffrum* في جنوب افريقيا، مادة combretastine التي أظهرت نشاطاً فعالاً مضاداً للسرطان بوساطة تثبيط تقدم دورة الخلية في الانقسام مما يساعد على موت الخلية المبرمج (apoptosis) ومادة 2-methoxyestradiol من الهرمونات الاسترودية التي تثبط نمو الأورام من خلال ارتباطها بالتيوبولين بموقع ارتباط الكولجيسين (Zhou and Giannakakou, 2005) . إنّ مركبات Vinca alkaloids مثل Vinblastin و Vincristine المعزولان من أوراق نبات عين البزون *Cathranthus Roseus* (F. Apocinaceae) (Rosea L) يستعملان في علاج الأورام و ابيضاض الدم، مما يسبب منع بلمرة بروتين التيوبولين إلى نيببات دقيقة بارتباطها بوحدة بيتا للجزيئات الثنائية للتيوبولين عند منطقة Vinca binding site ، يعتمد عملها على التركيز، في التراكيز العالية إذ أنّها تحت جمع التيوبولين الى بلورات paracrystalline (Jordan et al.,1986) وجدّ Jordan (2002) ان التراكيز الواطنة لا Vinca alkaloid تكبح ديناميكية النيببات من دون إزالة بلمرة نيببات المغزل لكنها تبقى قدرتها على إيقاف الانقسام وحث عملية موت الخلية

المبرمج. ووجدَ أيضاً أنّ Vinca alkaloid تحت التيوبولين لتكوين بوليمرات حلزونية متبادلة تقسد ديناميكية النبيبات إذ وجدت علاقة في قابلية Vinca alkaloid لتكوين الشكل الحلزوني والسمية الخلوية لها.

شُخصت مركبات عديدة ترتبط بموقع ارتباط Vinca alkaloid على البيئاتيوبولين منها Halichondrins التي عزلت من *Halichondria okadai* و *Axinella sp.* و *Phakellia carteri* و *Lissodendoryx sp.* ، ومادة hemiasterlin المعزولة من الإسفنج البحري *Spongistatin* المعزولة من *Spirastrella spinispirulifera* ، ومادة Cryptophysin المعزولة من الطحالب الخضراء المزرقة *Nostoc sp.* فجميع هذه المواد توقف تقدم الانقسام وتحت عملية الموت المبرمج للخلايا السرطانية (Hamel, 1992; Duflos et al.,2002).

وعلى العكس من Vinblastin فهناك مادة Taxol، ويطلق عليها أيضاً Paclitaxel وهي نوع من التربينات الثنائية Diterpen المستخلصة من نبات الطقوس *Taxus brevifolia* التابع للعائلة Taxaceae أستخدمت على نحوٍ فعّالٍ في معالجة أنواع مختلفة من السرطانات منها سرطان الثدي، الرئة، المبيض، المثانة والحوض (Skeel,1999)، وتتخلص آلية عمل هذا المركب بتثبيت واستقرار النبيبات الدقيقة، من خلال منع عملية إزالة بلمرة النبيبات الدقيقة إلى التيوبولين الذائب نتيجة ارتباطه بالتيوبولين الموجود على طول هذه النبيبات وبألفة عالية جداً وحث التغيرات في هيئة التيوبولين مما يزيد من ألفته بالجزئيات المجاورة، وإنّ موقع ارتباطه يقع على وحدة بيتا في السطح الداخلي للنبيب الدقيق ويعرف بـ Precision، إذ يوجد موقع ارتباط واحد لجزئته paclitaxel على كل جزئية تيوبولين في النبيب، وهذا يعني إن النبيب الدقيق الذي يتألف من 10000 وحدة تيوبولين يتطلب ارتباط 5000 جزئية Paclitaxel لكل نبيب لكي يؤدي إلى تثبيته بلمرته (Nogales et al.,1995; Jordan and Wilson,2004).

7.2 الفعل الوقائي للنباتات الطبية من السرطان

يعود استخدام الادوية ذات الأصل النباتي الى عصور قديمة (Mike et al.,2010). من الناحية التاريخية هناك الآلاف من الأنواع النباتية المختلفة التي يمكن ان تستخدم كعلاج

مضاد للسرطان (Cragg *et al.*, 2005). إنّ المملكة النباتية تلعب دوراً مهماً في الوقاية من السرطان و علاجه و تعد النباتات الطبية مصدراً مهماً للمركبات المضادة للسرطان وتكون هذه المركبات ذات تركيب جزيئي معقد جدا ومن الصعب تخليقها او تصنيعها في المختبر، إنّ المركبات التي لها فعالية مضادة للسرطان المشتقة من النباتات الطبية تكمن فعاليتها من خلال عدة اليات التي تتضمن التأثير على بروتينات هيكل الخلية، و تلعب دوراً مهماً في انقسام الخلية وتثبيط انزيمات متناظرات الدنا DNA Topoisomerase والفعالية المضادة للأكسدة وتحفيز الجهاز المناعي (Mantle and Wilkins, 2005)، كذلك يمكن للنباتات أن تؤدي الى تأخير او منع ظهور السرطان، ويمكن للنباتات أن تقوي الجهاز المناعي وبالتالي زيادة فعاليته ضد الامراض وعلاجها (Wagner, 2005).

إنّ السرطان هو أحد أهم الأسباب المؤدية الى الوفاة في العالم (Om *et al.*, 2013)، يشكل مرض السرطان عبأ كبيراً على الصحة العامة في كل من البلدان المتقدمة والنامية (Elisha *et al.*, 2014). حالات الإصابة بالسرطان في تزايد تدريجي في العالم، هناك العديد من الادوية المتاحة لعلاج أنواع مختلفة من السرطان، والمشكلة الرئيسية في العلاج الكيميائي للسرطان هي سمية الادوية المصنعة، مع ذلك فإنّ النباتات الطبية والمواد المشتقة من النباتات التي اثبتت فعاليتها في العلاج هي أكثر اماناً. إنّ اغلب البحوث في الوقت الحاضر تعمل على إيجاد علاج للسرطان تتركز في عملها على النباتات والمنتجات الطبيعية المشتقة من النباتات، العديد من المنتجات الطبيعية ونظائرها تم تحديدها كعوامل فعالة ضد السرطان (Om *et al.*, 2013). واستخدمت النباتات لأغراض طبية منذ بدء التاريخ البشري هي أساس الطب الحديث، إنّ معظم ادوية العلاج الكيميائي المستخدمة لعلاج السرطان هي جزيئات تم تحديدها وعزلها من النباتات او المشتقات الصناعية الخاصة بها (Mohammad, 2006). وفي الوقت الحاضر يجري البحث عن عوامل مضادة للسرطان من مصادر نباتية والذي قد يؤدي بشكل واعد الى اكتشاف ادوية جديدة مضادة للسرطان (Ramasamy *at* *et.*, 2012).

8.2 الدور الواعد للنباتات الطبية في علاج السرطان

تعد النباتات مصدراً ضخماً للمركبات الفعالة بايولوجياً و أن نسبةً منها قد تم فحصها وتأصيلها لتكون مصدراً مهماً من المواد المضادة للسرطان (Dhanamani *et al.*,2011). تلعب النباتات الطبية دوراً مهماً في وقاية الانسان من الأمراض والعديد من النباتات الطبية التي تستخدم كعوامل مناعية، وتعمل هذه النباتات على تحسين مناعة الجسم ضد الإصابة بالعدوى والأمراض الأخرى (Sumit *et al.*,2014). وهناك العديد من المصادر المهمة للمركبات الفعالة بايولوجياً، وهي ذات تأثير مفيد ومهم على الصحة، اغلب هذه المصادر هي من المركبات الموجودة في المواد الغذائية والمركبات الفعالة بايولوجيا المستخلصة من النباتات لها فعالية ضد السرطان.

يستخدم حوالي 50-60 % من مرضى السرطان في الولايات المتحدة المواد المشتقة من الأجزاء المختلفة من النباتات في العلاج (Gutheil *et al.*,2011)، تُعدّ النباتات مصدراً طبيعياً مهماً للعلاجات المضادة للسرطان لسنوات عدّة، وقد عزل حوالي 30 نوعاً من المركبات المشتقة من النباتات حتى الان وهي حالياً قيد التجارب السريرية. قد وجد أنّ للمركبات المضادة للسرطان المشتقة من النباتات فعالية ضد أنواع مختلفة من الخلايا السرطانية (Joyce *et al.*,2011). و تُعدّ النباتات المصدر الرئيس لمركبات الايض الثانوية فضلاً عن قيمتها الغذائية وفعالية مركبات الايض الثانوي للنباتات في الوقاية من الامراض على شكل مركبات مضادة للأكسدة ومضادة للفيروسات ومضادة للبكتريا والمركبات المضادة للسرطان (Makkar *et al.*,2007). كما وجد ان القلويدات alkaloids المشتقة من نبات حلزون البحر (*Catharanthus roseus* (periwinkle plant) ذات قابلية على الارتباط ببروتينات النيببات الدقيقة (microtubular proteins) الموجودة في الجسم المركزي، مؤدية إلى بلورة النبيب الدقيق وحالة سكون في الانقسام الخيطي. وهذا ما جعلها من اكثر المركبات استعمالاً ضد نمو الخطوط الخلوية السرطانية (Nagle *et al.*,2006). لوحظ في السنوات الأخيرة توجه كبير الى استخدام مستخلصات النباتات الطبية كمواد مؤثرة على الخلايا السرطانية (الجبوري واخرون، 2014) و إن أكثر من 50 % من العقاقير المتعارفة في الوقت الحاضر هي من المنتجات الطبيعية التي لها قدرة السيطرة على الخلايا السرطانية وذلك من خلال

تأثيرها في آليات الانقسام الخلوي او في مرحلة ما قبل الانقسام مثل تضاعف الدنا (Mohd *et al.*, 2010) وفي العراق تم الكشف عن عدد من المستخلصات النباتية التي تمتلك فعالية مضادة للسرطان وتعتمد هذه الفعالية بشكل أساس على التراكيز المستعملة ومدة التعريض ونوع الخلايا إذ اشارت (عبد الرضا، 2012) الى أنّ مستخلصات قشور الليمون تمتلك تأثيراً مثبطاً لنمو الخطوط الخلوية السرطانية وقد يعود هذا التأثير الى احتوائها على الفلافونويدات والترينينات التي هي من المركبات الفعالة المضادة للأكسدة، وكذلك الدراسة التي اجراها (يوسف، 2012) على ثمار البمبر اثبتت انه يمتلك تأثيراً سميّاً على الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي *In vitro*. ايضاً فقد اشار (الجبوري واخرون، 2014) الى أنّ حليب التين المعزول من نبات التين له تأثير مثبط لنمو الخلايا السرطانية المزروعة في الزجاج *In vitro* وكذلك يمتلك تأثيراً مثبطاً لنمو الخلايا السرطانية المغروسة في الفئران *In vivo*. وقد اشارت الدراسة التي قام بها (النعمي واخرون، 2013) الى أنّ المستخلص المائي الخام لجمار النخيل صنف الزهدي *Phoenix dactylifera cultivar. Zahdi* يمتلك تأثيراً سميّاً على نمو الخطوط الخلوية السرطانية خارج الجسم *In vitro*، وأيضاً في دراسة (علي واخرون، 2014) أنّ المستخلص المائي الخام لنبات القيصوم يفيد في تثبيط الخلايا السرطانية، ويزيد من تحفيز عملية الموت الخلوي المبرمج فيها فضلاً عن انه غير سام وراثياً للخلايا للمفاوية الطبيعية.

9.2 نبات السبجح *Melia azedarach* :-

1.9.2 تصنيف النبات Taxonomy :-

يصنف النبات وفقاً لـ (Rupa *et al.*, 2014) :-

- Kingdom Plantae
- Division Magnoliophyta
- Class Magnoliopsida
- Order Sapindales
- Family Meliaceae
- Genus Melia
- Species *M. azedarach*
- Binomial name *Melia azedarach* L.

2.9.2 التسمية

يُعرف بالأرز الأبيض (*Melia azedarach*) الذي يسمى أيضاً بالليلك الفارسي Persian (lilach) أيضاً وكذلك بالشجرة المظلة (Umbrella tree) (Sharma and Paul , 2013). اما في العراق فيسمى بالسبج لان ثماره تشبه حبات المسبحة او يسمى بالزهر لمذاقه المر جدا واستعماله في صنع طعوم تصطاد به الأسماك (الكاتب، 2000).



شكل (2-3) نبات السبج (*Melia azedarach*) (Kikuchi *et al.*, 2013)

3.9.2 الانتشار

ينتشر نبات السبج في المناطق الاستوائية و شبه الاستوائية و يوجد كذلك في جنوب شرق اسيا و في استراليا (Sultana *et al.*, 2015) وفي القارة الأمريكية تزرع بوصفها شجرة ظل او غالباً تشجير الغابات كما ينتشر في بعض الدول العربية مثل سوريا ،السعودية ،السودان وتزرع اشجار السبج بكثرة في العراق بدءاً من محافظة نينوى شمالاً الى اقصى الجنوب إذ تزرع اشجاره بصورة رئيسة في الحدائق العامة والمنتزهات بوصفها اشجار ظل او على امتداد الطرق والشوارع (Tonsed and Guest , 1991).

4.9.2 الوصف

شجرة متوسطة الحجم من عائلة الميلية (Meliaceae) يتراوح ارتفاعها من 20-40 قدم نفضيه سريعة النمو . أوراق هذه الشجرة مركبة مضاعفة يتراوح طولها 10-22 انج الوريقات بيضوية مسننة او محززة الحواف اما الإزهار الكاملة فهي عبارة عن خمسة أجزاء الكؤوس خضراء اللون بينما التويجات ارجوانية اللون وهي عطرية Fragrant ، تنمو الازهار

من عناقيد موجودة في ابط النبات الثمرة ذات لون بني مصفر كروية الى بيضوية الشكل وذات سويق معلقة في مجاميع قطرها 1.5 سم كل ثمرة تحوي 3-5 بذور سوداء اللون (Sultana et al., 2015) و يزهر النبات في آذار وآب (Batcher , 2008).

5.9.2 المركبات الفعالة في نبات السبج :

يحتوي نبات السبج على العديد من المواد الكيميائية الفعالة طبيياً ، و تعد هذه المواد نواتج ثانوية لعمليات الايض ، و من هذه المواد القلويدات، التانينات، الصابونيات، الفينولات و الفلافونيدات (Ahmed et al., 2012) . و اكد الباحث Akihisa و اخرون (2013) عند دراسته للمركبات النشطة بيولوجيا احتواء ثمار نبات السبج على مركب (Limonoid) و هو احد انواع التربينات . كذلك عندما تم اجراء الفحص الكيميائي للمستخلص الميثانولي الذي تم الحصول عليه من ثمار نبات السبج لوحظ وجود مجموعة من المركبات $3-\alpha-$ Methyl tigloylmelianol ، Melianone ، $21-\beta$ -acetoxy-melianone و Oleic acid (Natalli et al., 2010) . كذلك يحتوي السبج على Azedarachin-A ، Azedarachin-B و Salannin و كذلك Palmitic acid ، Linoleic acid و Oleic acid (Sharma and Paul , 2013) . إن جميع هذه المركبات و المواد تكون مضادة للالتهابات و مضادة للأورام السرطانية و ايضا تعمل كمبيدات للحشرات (Rupa et al ., 2014) .

6.9.2 الاهمية الطبية لنبات السبج :

عُرف السبج أنه احد النباتات المهمة من الناحية الطبية إذ يمتلك فعالية بيولوجية و جميع اجزاء النبات كالثمار، البذور، لب البذور، الاغصان و لحاء الجذور تستخدم للأغراض الطبية، اذ تحتوي على اكثر من 100 مادة فعالة (Sultana et al., 2015). وقد ثبتت فعالية جذور النبات بكونها طاردة للديدان و لطفيليات الملاريا ، الامسك، تخفيف الحمى، مدررة للبول و مطهرة (Sen et al., 2010) اما الاوراق فتستخدم في علاج فقر الدم و لدغة الثعبان و كذلك في السيطرة على العديد من الحشرات (الأفات و النيماتودا) (Sharma and Paul , 2013) ، كما اظهرت الدراسة التي قام بها Sen و اخرون (2010) على ثمار نبات السبج انه يستخدم كمادة منشطة و مسهلة و يمكن استخدامها في علاج حالات التسمم، و

ايضا وجد ان استخدام قشرة ثمار النبات فعالة جدا في علاج مرض السكري (Ahmed *et al* (2011),, كذلك فعال ضد البكتريا (Khan *et al* .,2011) ، مضاد للفطريات ايضا (Javaid and Rehman,2011) . كذلك للسبجج فعالية واضحة في تقييم النشاط السمي ضد خطوط الخلايا السرطانية للإنسان (خلايا سرطان الدم في الانسان HL60 وخلايا سرطان الرئة A549 وخلايا سرطان المعدة AZ521) و إنّ هذه الفعالية السمية ظهرت بشكل اساسي من خلال حث الموت الخلوي المبرمج على المايتوكونديريا و مسارات المستقبلات المتوسطة، وهذه الفعالية تعود الى وجود مركبات Triterpenoides والتي تسمى Liminoids (Akihisa *et al* .,2013) . كما اشار Kikuchi و اخرون (2013) الى أنّ مركب -12 O-Acetylarachin B المعزول من ثمار نبات السبجج له فعالية تثبيطية ضد خطوط الخلايا السرطانية لدم الانسان (HL-60) والمعدة (AZ521) من خلال حث الموت الخلوي المبرمج للمايتوكونديريا ومسارات مستقبلات الخلية.

المواد وطرائق العمل Materials and Methodology

3 . 1 المواد Materials

3 . 1 . 1 الأجهزة والأدوات Equipment's and Apparatuses

جدول (1-3) الأجهزة والأدوات

المنشأ	الشركة المصنعة	الأجهزة والأدوات
U.K	Flow Lab., Irvine	أطباق الزرع النسيجي متعدد الحفر ذو 96 حفرة مسطحة 96 – wall Microtiter Plate
Japan	Shimadzu	المطياف الضوئي Spectrophotometer
Turkey	Indesit	ثلاجة Refrigerator
U.K	Hellabio	جهاز الاستخلاص لمستمر Contineous extraction apparatus soxhlet
Germany	Hemle Labortec hnink Gmbh	جهاز الطرد المركزي المبرد Cooling Centrifuge
Germany	Quik Fit	جهاز الأليزا ELISA
Germany	Memert	حاضنة Incubator
England	Gallenkamp	حاضنة مع ثاني أكسيد الكربون CO2 Incubator
Spain	Selecta	حاضنة هزازة Shaker Incubator
England	Gallenkamp	حمام مائي Water Bath

Germany	Memaret	Oven	فرن كهربائي
U.S.A	Falcon	قناني بلاستيكية للزرع النسيجي حجم 25 سم ² Plastic Flasic For Tissue Culture 25 Cm ²	
Korea	K & K	Laminar Air Flow	كابينة النمو
England	Griffin	Vortex	مازج
England	Volac	Micropipette	ماصة دقيقة
USA	The Electron Cotporation	Deep Freezer	مجدة
Japan	MEJEI	Inverted	مجهر ضوئي مقلوب Microscope
Korea	K & K	Magnetic Stirrer	محرك دوار
Denmark	Radiometer	Ph-Meter	مقياس الرقم الهيدروجيني
Spain	Selecta	Autoclave	مؤسسة
Germany	Sartorius	Sensitive Balance	ميزان حساس
(Spain)	Millipore	Filter unit 0.22 μm	وحدة ترشيح
USA	Thermos Scientific	High Content Screening Assay Scan	

3. 1. 2. Biological and Chemical Materials المواد الكيميائية والبيولوجية

جدول (2-3) المواد الكيميائية والبيولوجية Biological and Chemical Materials

المنشأ	المادة
BDH (England)	Chloroform
Sigma-(USA)	DMEM Media
Sigma (USA)	DMSO
Sigma (USA)	Ethanol
Sigma (USA)	Fetal bovine Serum
BDH (England)	Methanol
Sigma (USA)	MTT
Sigma (USA)	Phosphate Buffer Saline
Sigma (USA)	RPMI 1640 media
Sigma (USA)	Trypsin

3. 1. 3. العدة التشخيصية الجاهزة Kit

جدول (3-3) العدة التشخيصية الجاهزة Kit

Manufacturer Company (Supplier)	Kit
Thermo scientific / USA	Multiparameter Cytotoxicity 3 Kit

3. 2. جمع عينات النبات

تم جمع ثمار نبات السبج *Melia azedarach* من بساتين بعقوبة (منطقة شفتة) محافظة ديالى في نهاية شهر ايلول وبداية شهر تشرين الاول عام 2015 م، تم تصنيف

النبات بالاعتماد على الصفات المظهرية له من قبل الدكتور خزعل ضبع وادي في قسم علوم الحياة / كلية العلوم/ جامعة ديالى.

3.3 تحضير المستخلصات

تم فصل الأجزاء النباتية المستخدمة في الدراسة وغسلت جيداً بماء الحنفية Tap water لإزالة التربة والأوساخ منها مع مراعاة أن تكون هذه الأجزاء خالية من الأضرار الظاهرية وبعدها جففت بدرجة حرارة الغرفة ثم أجريت عمليات الاستخلاص كما يأتي:

1.3.3 تحضير المستخلص الكحولي الخام لثمار نبات السبج

اتبعت طريقة Harborne (1984) لتحضير المستخلص إذ أخذ (20)غم من العينة الجافة لثمار نبات السبج وضيف إليها الكحول الايثيلي بتركيز (98%) حتى اصبح الحجم النهائي (200) مل و تركت لمدة نصف ساعة بجهاز الهزاز الافقي (Horizontal shaker) و على سرعة متوسطة تم تركت العينة لتستقر لمدة ساعة ثم رشحت بثلاث طبقات من قماش الشاش لفصل العوالق الصلبة ومن ثم استخدمت فلتر Nalgen 0.45 لغرض الترشيح و بعدها اخذ الراشح .

2.3.3 تحضير المستخلص القلوي الخام لثمار نبات السبج

أخذت كمية 20 غم من مسحوق الثمار الجافة ووضعت في وعاء اسطواني الشكل مصنوع من مادة ورقية ذات مسامات يسمى Thimble، ثم وضع Thimble في المكان المخصص في جهاز السوكسليت Soxhlet وأضيف إليه الهكسان لغرض إزالة الدهون والكلوروفيل وأجري الاستخلاص لمدة 7 ساعة في درجة حرارة (55) م ° وهي درجة حرارة تبخر المذيب المستخدم، بعدها تم نقل مسحوق الثمار المزال منها الدهون والكلوروفيل إلى كحول الميثانول 70% في جهاز reflex ولمدة ثلاث ساعات، ثم رشح المستخلص بقطعة شاش ثم بورقة ترشيح، بعدها تم تركيز المستخلص الميثانولي بالحاضنة ولمدة يوم إلى يومين، ثم تمت معاملة المستخلص الميثانولي ب حامض الهيدروكلوريك 1% HCl في جهاز reflex ولمدة نصف ساعة ثم رشح مرة أخرى بورقة ترشيح نوع Whattman 1 ، وبإضافة diethyl ether إلى الراشح في قمع الفصل وتركه لمدة يوم كامل ظهرت طبقتان، الطبقة العليا هي طبقة diethyl ether التي أهملت والطبقة السفلى هي الطبقة المائية التي أخذت

ثم بعد ذلك رفع الأس الهيدروجيني بإضافة قاعدة ضعيفة هي الامونيا لغرض الحصول على pH 8، ثم 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 الأولية والثانوية والثالثية وكررت العملية ثلاث مرات، بعد ذلك تم التخلص من الكلوروفورم بتركه في الحاضنة ليتبخر وعُزلت مجموعة القلويدات بوصفها ناتجاً نهائياً وكما ورد ذكرها في (Cannel,1998).

3-4 المحاليل والكواشف Reagents and Solutions

3. 4. 1 الكشف الكيميائي التمهيدي لبعض المكونات الكيميائية في ثمار نبات السبج .

أولاً: الكواشف المستخدمة

الكشف عن القلويدات

كاشف ماير Mayer's Reagent

حُضِرَ بحسب ما ذُكِرَ في (Atherder (1969 وكالاتي:

1. المحلول (أ): حُضِرَ بإذابة 1.358 غرام من كلوريد الزئبقيك ($HgCl_2$) في 60 مليلتر من الماء المقطر.

2. المحلول (ب): حُضِرَ بإذابة 5 غرام من يوديد البوتاسيوم (KI) في 10 مليلتر من الماء المقطر.

مُزَجَ 10 مليلتر من المحلول (أ) مع 10 مليلتر من المحلول (ب) وأكْمَلَ الحجم إلى 100 مليلتر من الماء المقطر وحفظ الكاشف الى حين الاستخدام.

ثانياً: طريقة العمل

الكشف عن القلويدات Alkaloids

تم الكشف عن القلويدات باستخدام المحاليل الوارد ذكرها في الفقرة (أ-1 وأ-2)

اذ يدل ظهور الراسب الأبيض على وجود القلويدات في حالة استخدام كاشف ماير.

الكشف عن التانينات Tanins

أُتبعَت الطريقة التي ذكرت من الشامي (1982) وذلك بغلي 10 غم من المسحوق النباتي في 50 مل ماء مقطر ثم رشح المزيج وترك ليبرد، قسم بعدها الراشح على قسمين، أضيف إلى القسم الأول منه خلات الرصاص (1%) حضر باذابة 1 غم من خلات الرصاص في 100 مل من الماء المقطر، إذ يدل وجود راسب ابيض هلامي القوام على وجود التانينات، أما القسم الثاني فأضيف اليه محلول كلوريد الحديدك (1%) إذ حضر باذابة 1 غم من كلوريد الحديدك في 100 مل من الماء المقطر، ويدل ظهور اللون الاخضر المزرق على ايجابية الفحص.

الكشف عن التربينات والسترويدات Terpens and Steroids

تم الكشف وفقاً لما ورد في (1999) Al-Maisary وذلك بمزج 0.1 غم من المستخلص النباتي مع 2 مل من الكلوروفورم وأضيف إليه قطرة من حامض الخليك اللامائي وقطرة من حامض الكبريتيك المركز. إن تَوَظَّرَ اللون البني الفاتح يدل على ايجابية الفحص للتربين أما ظهور اللون الأزرق الداكن بعد ترك المزيج لمدة طويلة (يوم كامل) فانه يدل على وجود السترويد.

الكشف عن الفلافونات Flavonoids

تم الكشف وفقاً لما ورد في (Jaffer *et al.*, 1983) إذ حضر المحلول (أ) وهو المستخلص النباتي الخام بحجم 5 مل، وحضر المحلول (ب) باضافة 10 مل من الكحول الايثيلي بتركيز 50% إلى 10 مل من هيدروكسيد البوتاسيوم بتركيز 50%، مزجت كميات متساوية من كل من محلولي (أ) و (ب) إذ يدل ظهور اللون الأصفر على وجود الفلافونات.

5.3 المحاليل الخاصة باختبار السمية الخلوية على الخلايا اللمفاوية

حضرت المحاليل وفقاً لـ ياسين (Yaseen, 1999) وكما هو موضح في الفقرات الآتية:

1.5.3 الوسط الزرعي الكامل Complete Growth Medium :

استخدم الوسط الزرعي RPMI -1640 ولكن مع إضافة المصل البقري . عدل الأس الهيدروجيني الى (pH 7.2) ثم عقم الوسط باستخدام مرشحات غشائية (Nalgen 0.22 μ m)

، حُضِن الوسط بدرجة حرارة 37 م° لمدة ثلاثة ايام للتأكد من خلوه من الملوثات أعقب ذلك صُب في أنابيب معقمة بمقدار (5) مل للانبوب الواحد، حُفظت بدرجة حرارة (-20).

2.5.3 Fetal Calf Serum المصل العجل الجنيني

3.5.3 Phytohaemagglutinin (PHA) الملزن النباتي

حُضِر الملزن النباتي أنياً بإذابة (2.5) ملغم من مادة (PHA) في (4) مل من الماء المعقم، وأخذ منه (0.1) مل وأضيف إلى (0.6) مل من الماء المقطر المعقم ثم أخذ (0.1) مل منه ليضاف الى كل أنبوبة زرع حاوية على (5) مل من الوسط الزرعى ليصبح التركيز النهائي 15 مايكروغرام/مل، وحفظ بدرجة حرارة (20 - م°).

4.5.3 Colchicin الكولجسين

أذيب (0.5) ملغم من مسحوق الكولجسين في (10) مل من الماء المقطر مع مراعاة تحضيره أنياً عند الاستعمال وبعيداً عن الضوء.

5.5.3 Hypotonic solution واطئ التوتر

حضر محلول واطئ التوتر بإذابة 1.1175 غرام من KCl في (200) مل من الماء المقطر ليصبح المحلول بتركيز 0.075 مولاري، وحفظ بدرجة حرارة (4) م° الى لحين الاستعمال. وهو يستعمل دافئاً بدرجة حرارة 37 م°.

6.5.3 Fixative solution المحلول المثبت

حُضِر المحلول المثبت بالمزج الآتي للكحول المثيلي المطلق مع حامض الخليك الثلجي بنسبة 1:3 (حجم/حجم) ويستخدم بارداً.

7.5.3 Sorenson's buffer solution محلول دارى سورنسن

تم تحضير محلول دارى سورنسن بإذابة (7.08) غرام من Na_2HPO_4 مع (6.74) غم من ملح KH_2PO_4 في (1000) مل من الماء المقطر، وحفظ بدرجة حرارة 4 م° الى حين الاستعمال.

8.5.3 Giemsa stain كمزأ ملون

أذيب (2) غم من مسحوق صبغة كمزأ في (100) مل من الكحول المثلبي المطلق باستعمال جهاز المحرك المغناطيسي ولمدة (72) ساعة، ثم رُشحت الصبغة باستخدام ورق ترشيح نوع (1) (Whatman No. 1) وحفظت بقنينة معتمة محكمة الغلق وعدّ هذا المحلول خزينا، وعند الاستعمال تخفف أنياً بمزج (1) مل من الصبغة مع (4) مل من دارئ سورنسن .

9.5.3 Blood collection جمع عينات الدم

سُحب الدم الوريدي البشري من مستشفى بعقوبة العام من اشخاص اصحاء ظاهرياً تراوحت اعمارهم (25-40) من كافة اصناف الدم بوساطة محقنة نبيذة (5) مل مغسولة مسبقاً بمادة الهيبارين لمنع تخثر الدم . ويستخدم الدم المجموع أنياً.

10.5.3 تحضير الشرائح الزجاجية:

نظفت الشرائح الزجاجية وذلك بغمرها بحامض الكروميك Chromic acid لمدة (72) ساعة وغسلت بالماء الحار ثم البارد المقطر وحفظت في الثلجة الى حين الاستعمال.

6.3 دراسة تأثير تراكيز مختلفة من المستخلصين الكحولي والقلوي في معامل الانقسام الخلوي Mitotic Index في الخلايا اللمفاوية لدم الانسان.

تمت دراسة تأثير التراكيز في الخلايا اللمفاوية المحفزة على الانقسام، اعتماداً على طريقة (Verma and Babu,1989) باستخدام تقنية زرع الدم لمدة قصيرة (Short-term culture).

اولاً - زرع الدم مع المستخلصين

1 . تمت اضافة كل من المستخلصين الكحولي والقلوي بتراكيز مقدارها (12.5 ، 25 ، 50 ، 100 ، 200 ، 400) مكغم/مل في أنابيب الزرع المحضرة الحاوية على الوسط الزرعي الكامل RPMI-1640 مع مراعاة الحجم النهائي للمزيج (5) مل وبواقع ثلاثة مكررات لكل تركيز .

2 . أضيف (0.5) مل من الدم الى كل انبوبة باستخدام محقنة ذات حجم (5) مل.

3 . أضيف (0.1) مل من العامل المشطر للخلايا اللمفاوية. ثم مزجت مع الوسط بلطف وحضنت بدرجة حرارة (37) م° بصورة ماثلة لمدة (72) ساعة، مع مراعاة مزج محتوى الأنابيب كل (12) ساعة.

4 - تركت مجموعة من الأنابيب دون اضافة أي مستخلص وعدت هذه المعاملة سيطرة.

ثانياً - حصاد الخلايا

1 - تمت اضافة (0.1) مل من الكولجسين بتركيز مقداره (10) مكغم/مل لكل انبوب سيطرة ذلك قبل (150) دقيقة من انتهاء وقت الزرع الاصلي اما الانابيب المعاملة لا يضاف لها الكولجسين ، ثم أعيدت الأنابيب الى الحاضنة.

2 - وضعت الانابيب الحاوية على العينات في جهاز الطرد المركزي لمدة (10) دقائق وبسرعة (1500) دورة/دقيقة، تم التخلص من الراشح ورج الراسب جيداً مع بقايا الوسط الزراعي.

3 - أضيف (5-10) مل من محلول واطئ التوتّر (0.075 M) والداقي (37) م° بمقدار لكل انبوب تدريجياً ويهدوء مع الرج .

4 - حضنت الانابيب في حمام مائي بدرجة (37) م° لمدة (30) دقيقة.

5 - نبذت الأنابيب مركزياً بسرعة (1500) دورة/دقيقة لمدة (10) دقائق ، تم التخلص من الراشح.

ثالثاً - التثبيت Fixation

1 - رُجَّ الراسب جيداً وأضيفت اليه بضع قطرات من المثبت Fixative البارد على جدار الانبوبة مع الرج المستمر وأكمل الحجم الى (5) مل.

2 - خلطت العينات بوساطة الرجّاج Vortex ثم وضعت الأنابيب بحرارة (4) م° لمدة (30) دقيقة.

رابعاً - الغسل Washing

1 - وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي لمدة (10) بسرعة (1500) دورة/دقيقة دقائق، تم التخلص من الراشح وتركت الخلايا المترسبة.

2 - أعيدت عملية التثبيت عدة مرات الى حين ظهور اللون الرائق للعالق، وعلق الراسب بمقدار (1) مل من المثبت وحفظ بحرارة (-20) م°.

خامساً - التقطير Dropping

حضرت شرائح زجاجية نظيفة خالية من الدهون رطبة وباردة، مزجت الخلايا بشكل جيد وقطرت الخلايا على الشرائح الباردة باستخدام ماصة باستور من مسافة (0.5-1) متر وتركت لتجف .

سادساً - التصبيغ والفحص المجهرى

صبغت الشرائح بصبغة كمزا المحضرة والمخففة بمحلول دارى سورنسن الدافئ المحضر و بنسبة 1 : 4 لمدة (2-3) دقيقة، ثم غسلت بدارى سورنسن وتركت لتجف ثم فحصت بوساطة المجهر الضوئي لحساب :

1 . معامل الانقسام الخيطي Mitotic Index (MI)

تم حساب معامل الانقسام الخلوي بحسب طريقة (King *et al.*,1982) إذ قسمت الخلايا في طور الانقسام الاستوائى Metaphase على العدد الكلي للخلايا المفحوصة (1000) كما في المعادلة الآتية:

$$\text{معامل الانقسام الخيطي (MI)} = \frac{\text{عدد الخلايا المنقسمة}}{\text{العدد الكلي للخلايا}} \times 100$$

7.3 محاليل وكواشف الزراعة الخلوية

تم تحضير هذه المحاليل وفقا لطريقة (Taylor, 2007).

1.7.3 بيكربونات الصوديوم Sodium Bicarbonate

حضر المحلول بإذابة 4.4 غرام من بيكربونات الصوديوم أحادية الهيدروجين في 100 ملتر ماء مقطر ثم عقم المحلول بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 م° لمدة 15 دقيقة ثم حفظ بدرجة 4م° لحين الاستعمال (Taylor,2007).

3. 7. 2 الوسط الزراعي (Rosswell Park Memorial Institute) RPMI-1640

جدول (3-4) الوسط الزراعي

الكميات	مكونات الوسط
10.4 غم	RPMI-1640
0.5 ملغم/لتر	Penicillin
0.5 ملغم/لتر	Streptomycin
100 مللتر	Fetal calf serum 10(%)

خلطت مكونات الوسط وأضيف لها 4.4% من محلول بيكربونات الصوديوم المحضر في الفقرة 1.7.3 وأكمل الحجم إلى 900 مللتر من الماء المقطر ثم ضبط الرقم الهيدروجيني إلى 7.2، وأكمل الحجم إلى لتر من الماء المقطر. عقم الوسط بمرشح ذي ثقب بقطر 0.22 مايكروميتر، وحضن بدرجة 37م لمدة 72 ساعة للتأكد من خلوه من الملوثات.

3. 7. 3 المحلول الملحي الفسيولوجي (PBS) Phosphate Buffer Salin

حضر بإذابة 0.85 غم من ملح كلوريد الصوديوم في 100 مل من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة وحفظ بالثلاجة لحين الاستعمال (Cruickshank *et al.*,1996).

3. 7. 4 محلول التريسين-فيرسين Trypsin -Versin solution

حضر هذا المحلول بإذابة 1غم من المسحوق تريسين/ فرسين في 100 مل من الماء المقطر، ويضاف له هيدروكسيد الصوديوم لتعديل الأس الهيدروجيني إلى 7 ثم يعقم بالتريشيع باستعمال فلتر ذي ثقب 0.22 مايكروميتر وحفظ في قناني محكمة بدرجة 4م إلى حين الاستعمال (Taylor,2007).

8.3 خطوط الخلايا السرطانية المستخدمة

1.8.3 الخط الخلوي لسرطان الكبد في الانسان (HepG-2)

HepG-2 هو خط خلية مستمر لخلايا سرطان كبد الانسان ، والمشتقة من انسجة كبد ذكر قوقازي عمره 15 عام كان سرطان الكبد متبايناً و على نحوٍ جيد. يمكن زراعة خلايا HepG-2 بنجاح و على نطاق واسع (Ihrk *et al.*,1993) .

2.8.3 الخط الخلوي لسرطان المرئ (SK-GT2)

تم اشتقاق خلايا هذا الخط SK-GT2 من خلايا غدية معدية .تم انشاء خط خلية من السرطانات التي تنشأ في غشاء باريت المخاطي (Schrupp *et al.*,1998) .

3.8.3 الخط الخلوي الطبيعي لكبد الانسان (WRL68)

خط خلايا الكبد البشري والذي يكون مشابه في الشكل للخلايا الكبدية البدائية . (Souza *et al.*,1997).

4.8.3 تنمية خلايا الخطوط الخلوية السرطانية (HepG-2 , SK-GT2 and WRL68)

اتبعت طريقة Freshney (2012) لتنمية خلايا الخطوط السرطانية وكالاتي:

1. وضعت خلايا كل خط من الخطوط في وعاء زرع للخلايا الحيوانية بقطر 25 سم² يحتوي على الوسط الزرع RBMI-1640 وعلى 10 % مصل عجل البقر.
2. حضنت الاوعية المحتوية على المعلق الخلوي والوسط الزرع في حاضنة 5% CO₂ بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة.
3. بعد مدة يوم من الحضن وعند التأكد من وجود نمو في المزرعة الخلوية وخلوها من التلوث تم اجراء مزارع ثانوية لها.
4. فحصت الخلايا باستخدام المجهر المقلوب Inverted microscope للتأكد من حيويتها وخلوها من التلوث ونموها الى العدد المطلوب (500 - 800 الف خلية \ مل تقريباً).
5. نقلت الخلايا الى كابينة النمو وتم التخلص من الوسط الزرع المستخدم.

6. غسلت الخلايا باستخدام محلول PBS وتم التخلص منه وكررت العملية مرتين ولمدة 10 دقائق لكل مرة.
7. اضيفت كمية كافية من انزيم الترسيب الى الخلايا وحضنت لمدة 30 - 60 ثانية بدرجة حرارة 37م° وتم مراقبتها الى أن تحولت من طبقة أحادية الخلايا الى خلايا مفردة عندئذ يتم إيقاف عمل الانزيم بإضافة وسط تنمية جديد محتوي على المصل.
8. جمعت الخلايا في انابيب الطرد المركزي ووضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 2000 دورة \ دقيقة ولمدة 10 دقائق بدرجة حرارة الغرفة، لترسيب الخلايا والتخلص من الترسيب والوسط الزرعي المستخدم.
9. تم التخلص من الراشح و تعليق الخلايا في وسط زرعي جديد يحتوي على 10% مصل.
10. تم اجراء فحص عدد الخلايا بأخذ حجم معين من المعلق الخلوي مضافاً اليه الحجم نفسه من صبغة التريبان الأزرق (Trypan Blue) لمعرفة عدد الخلايا ونسبة حيويتها باستخدام شريحة Hemacytometer وحسب المعادلة:

$$C = N \times 10^4 \times F / ml$$

حيث أن: -

C = عدد الخلايا في مل واحد من المحلول

N = عدد الخلايا في الشريحة

F = عامل التخفيف

10^4 = ابعاد الشريحة

11. كما تم حساب نسبة حيوية الخلايا في العينة باستخدام شريحة Hemacytometer

أيضا حسب المعادلة: -

$$\text{نسبة حيوية الخلايا الحية} = \frac{\text{الخلايا الحية}}{\text{الخلايا الميتة}} \times 100$$

12. وزع المعلق الخلوي في اوعية جديدة ثم حضن في حاضنة 5% CO₂ بدرجة حرارة

37م° ولمدة 24 ساعة.

9.3 اختبار MTT لفحص حيوية الخلايا (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-3
 diphenyl tetrazolium bromide (MTT dya) و لمدة
 24 ساعة حضن.

مبدأ الاختبار

تم في هذا الاختبار تحديد تأثير السمية الخلوية للمستخلصين القلويدي و الكحولي للنبات على نوعين من الخلايا السرطانية بهدف اختيار المستخلص الأمثل والخط السرطاني الامثل من اجل استخدامه في فحوصات (High Content Screening (HCS).

3.9.1 طريقة العمل

1. جهزت الخلايا السرطانية باتباع الخطوات الموضحة نفسها في الفقرة (4.8.3) ثم تم وضع المعلق الخلوي في صفيحة ذات 96 حفرة مسطحة القاعدة وحضنت في حاضنة 5% CO2 بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة.
2. اضافة 100 مايكرو لتر من المعلق الخلوي في كل حفرة.
3. أضيفت التراكيز المحضرة من مستخلصي ثمارنبات السبجج القلويدي والكحولي (12.5, 25, 50, 100, 200, 400) مكغم/مل الى الحفر وواقع (3) حفرة لكل تركيز.
4. حضنت الصفيحة لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 م.
5. تم إضافة 10 مايكروليتر من محلول MTT لكل حفرة بتركيز 0.45 ملي غرام ١ مل.
6. حضنت الصفيحة لمدة 4 ساعات بدرجة حرارة 37 م.
7. أضيف 100 مايكرو لتر من محلول الاذابة Solubilization (DMSO) لكل حفرة لتذويب Formazan Crystals.
8. قرأت الامتصاصية للعينة على الطول الموجي 570 نانومتر باستخدام تقنية الامتزاز المناعي المرتبط بالانزيم (جهاز الاليزا ELISA).

10.3 اختبار High Content Screening (HCS) لتقييم السمية الخلوية

اقتصر هذا الاختبار على دراسة تأثير المستخلص القلويدي وبتراكيزه المختلفة لثمار نبات السبجج على خلايا الخط السرطاني HepG2 فقط وفق النتائج المتحصل عليها من

اختبار MTT. شمل هذا الاختبار قياس ومراقبة التغيرات التي تحدث في انوية الخلايا ونفاذية الاغشية الخلوية وتحرر الساييتوكروم من المايتوكوندريا. تم اجراء هذا الاختبار في جامعة ملابيا ١ قسم الصيدلة ١ مركز التحري عن الادوية الجديدة في ماليزيا. واستخدمت في هذا الاختبار عدة تشخيصية من شركة Thermo scientific صنع في الولايات المتحدة الامريكية ومحتوياتها هي:

جدول (3-5) مكونات العدة التشخيصية لاختبار (HCS)

75 µl	Cytochrome C Primary Antibody
72 µl	DyLight 649 Conjugated Goat-Mouse Antibody
1 µl	Mitochondrial Membrane Potential Dye
25 µl	Permeability Dye
30 µl	Hoechst Dye
100 ml	Wash Buffer
100 ml	Permeabilization Buffer
85 ml	Blocking Buffer
7/ pack	Thin Plate Seal Assembly

10.3.1. تحضير المحاليل المستخدمة

جدول (3-5) تحضير المحاليل المستخدمة لاختبار (HCS)

المحلول	تحضير المحلول
دارئ الغسل wash buffer	اخذ 20 مل من محلل الخزين لدارئ البفر واضيف الى 180 مل من الماء المقطر النقي ليصبح الحجم النهائي 200 مل. حفظ المحلول الدارئ في درجة حرارة 4 م في الثلاجة لمدة 7 أيام.
محلول التثبيت fixation solution	يحتوي هذا المحلول على 16% فورمالديهايد ويستخدم ساخناً بدرجة حرارة 37م.
permilization buffer	أخذ 10 مل من محلول الخزين واضيف الى 90 مل من الماء المقطر النقي ليصبح الحجم النهائي 100 مل، حفظ المحلول في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م لمدة 7 أيام.
Blocking buffer	أخذ 5 مل من محلول التحطيم الخزين واضيف الى 44 مل من الماء المقطر، حفظ المحلول في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م لمدة 7 أيام.
محلول الاجسام المضادة الأولية primary antibody	اضيف 60 مايكرو لتر من $MgCl_2$ ، و 100 مايكرو لتر من الاجسام المضادة الأولية، و 12 مايكرو لتر من فوسفات هستون H_3 للأجسام المضادة الأولية الى 5.9 مل من محلول التحطيم blocking buffer. يحضر انياً
محلول الاجسام المضادة الثانوية secondary antibody	اضيف 3 مايكرو لتر من DAPI، 12 مايكرو لتر من dylight 488 goat anti-muse و 12 مايكرو لتر من dylight 549 goat anti-rabbit الى 6 مل من محلول التحطيم.

<p>أضيف 117 مايكرو لتر من DMSO الى Mitochondrial Membrane Potential Dye لتحضير المحلول الخزين. يحضر قبل الاستخدام، أضيف 2.1 مايكرو لتر من Permeability Dye و 21 مايكرو لتر من Mitochondrial Membrane Potential Dye الى 6 مل من الوسط الكامل بدرجة حرارة 37 م°.</p>	<p>صبغة الخلايا الحية</p>
--	---------------------------

2.10.3 طريقة العمل:

- اتبعت طريقة (Looi 2013) لدراسة المؤشرات الخلوية التي يتم بها التثبيط كالتالي :
1. جهزت خلايا الخط الخلوي HepG2 وكما موضح في الفقرة (4.8.3) ووضعت في صفيحة (96حفرة) وحضنت في حاضنة 5% CO2 بدرجة حرارة 37م° لمدة 24 ساعة.
 2. اضيف 50 مايكرو لتر من تراكيز مستخلص ثمار النبات القلويدي (100 , 200 , 400) مايكرو غرام (1 مل) لكل حفرة وبقاوع (3) حفرة لكل تركيز في حين تم اضافة 50 مايكرو لتر من الوسط الزراعي الى حفرة السيطرة من دون إضافة المستخلص النباتي.
 3. أضيف 50 مايكرو لتر من صبغة الخلايا الحية الى كل حفرة وحضنت لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 37 م°.
 4. تم التخلص من الوسط الزراعي مع محلول التصبيغ ثم أضيف 150 مايكرو لتر من محلول التثبيط وحضنت لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة. تم التخلص من محلول التثبيط وغسل بالماء ومن ثم أضيف 100 مايكرو لتر لكل حفرة من محلول الاذابة solubilization وحضنت لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة الغرفة بعيداً عن الضوء.
 5. بعد التخلص من محلول الاذابة غسلت الصفيحة مرتين بـ 100 مايكرو لتر من محلول الغسل لمدة 10 دقائق ومن ثم تم اضافة 100 مايكرو لتر من محلول التحطيم blocking buffer لكل حفرة وحضنت لمدة 15 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة.
 6. بعد إزالة محلول التحطيم أضيف 50 مايكرو لتر لكل حفرة من محلول الاضداد الأولية وحضنت لمدة ساعة واحدة بدرجة حرارة الغرفة 25م° في الظلام، وتم التخلص من محلول الاضداد الأولية بعد الحضانة ثم غسلت بالماء.

7. أضيف 50 مايكرو لتر من محلول التصبيغ (الاضداد الثانوية) وحضنت لمدة ساعة واحدة بدرجة حرارة الغرفة بعيداً عن الضوء ثم تم التخلص من محلول التصبيغ بعد الحضانة وغسلت بالماء.

8. تم إضافة 100 مايكرو لتر ١ حفرة من محلول دارى الغسل ثم أخذت الصفيحة لقراءتها باستخدام Array Scan HCS Reader . و كانت تقريباً اعلى امتصاصية / انبعاث لاصباغ الفلورسنت هي كالاتي :

DyLight 649 Conjugated =646/674 nm

Mitochondrial Membrane Potential Dye=552/576 nm

Permeability Dye=491/509 nm

Hoechst Dye=350/461 nm

11.3 التحليل الاحصائي Statistical analysis

حللت النتائج احصائيا باستخدام نظام التحليل الاحصائي Graphpad Prism Version 6 وفق اختبار تحليل التباين Anova و قورنت المتوسطات الحسابية باختبار Duncan متعدد الحدود (المتوسط الحسابي \pm الانحراف المعياري $M \pm SD$) بفرق معنوي عند مستوى احتمالية $P < 0.05$ (Sisi *et al.*,2010).

4. النتائج والمناقشة Results and Discussion

1.4 تحضير المستخلصات الخام لثمار نبات السبج

استعملت في هذه الدراسة المستخلصات الخام، الهدف منها التحقق من امتلاك ثمار السبج فعالية مضادة للسرطان ، اذ تحتوي النباتات باجزائها المختلفة على الكثير من المركبات والجزئيات الصغيرة (Small molecules) التي قد تعطي نتائج ، إذ لايزال البعض من هذه المركبات والجزئيات غير مكتشف حتى الان او انه لم يدرس بالتفصيل من قبل المختصين بالكيمياء الطبية (Chanda and Nagani,2013). كما أنّ هناك تأثيرات تازرية او تعاضدية (Synergistic effect) للمركبات الكيميائية الموجودة في الاجزاء النباتية (Phytochemical) تلك التأثيرات هي المسؤولة عن فعاليتها العالية المضادة للاكسدة والمضادة للسرطان (Jafari *et al.*,2013).

وقد أُستخدم نوعان من المستخلصات (الكحولي و القلويدي) المستخلص الكحولي يحتوي على مجموعة من المركبات الفعالة و التي منها القلويدات بينما المستخلص القلويدي يحتوي على القلويدات فقط و ذلك لبيان الفرق بين المستخلصات الكحولية و القلويدية في فعاليتها ضد السرطان (Thoppil *et al.*, 2013) . واعطى المستخلص الكحولي وزن 0.3185 غرام من (20غم) من المسحوق الجاف لثمار نبات السبج في حين تم الحصول من المستخلص القلويدي على وزن 0.1338 غرام من (20غم) من المسحوق الجاف لثمار النبات.

2.4 الكشف الكيميائي التمهيدي لبعض مركبات الأيض الثانوي في مستخلصات نبات السبج.

اظهرت النتائج الموضحة في الجدول (1-4) وجود مركبات فعالة في المستخلصات الكحولية الخام لثمار نبات السبج كالفلافينويدات والقلويدات والتانينات والترينينات والستيرويدات. وهذه المركبات تمتلك فعالية سمية مضادة للاورام في نباتات اخرى مثل نبات الدفلة (Rupa *et al.*,2014).

الجدول (4-1): الكشوفات الكيميائية لبعض المركبات الكيميائية في مستخلص ثمار نبات السبج.

النتيجة	دليل الكشف	الكاشف المستخدم	المركب الكيميائي
+	راسب أبيض	كاشف ماير	1. القلويدات
+	راسب أبيض هلامي أخضر مزرق	خلات الرصاص 1% كلوريد الحديدك	2. التانينات
+	لون بني فاتح (التربينات) لون أزرق داكن بعد يوم (سترويدات)	كلورفورم + حامض الخليك اللامائي +قطرة الكبريتيك	3. التربينات والسترويدات
+	راسب اصفر	KOH مع كحول الايثيلي	4. الفلافونات

العلامة (+) تدل على ايجابية الفحص.

أشار Ahmed و اخرون (2012) عندما أُجري الفحص الكيميائي لمستخلص اوراق نبات السبج احتواءه على بعض المركبات الفعالة مثل القلويدات ، التانينات ، الصابونيات ، الفينولات والتربينات، وإنّ نبات السبج يحتوي على الكثير من المركبات الفعالة وعند اجراء تجربة على مستخلصات النبات لوحظ من خلال النتائج احتوائه على القلويدات ، التربينات ، التانينات ، الفلافونات ، السترويدات، الصابونيات، الفينولات والكلايكوسيدات وهذا اكده (Sharma and Paul,2013) ، واكد الباحث Akihisa و اخرون (2013) عند دراسته للمركبات النشطة بيولوجيا احتواء ثمار نبات السبج على مركب (Limonoid)، و هو احد انواع التربينات . كذلك عندما أُجري الفحص الكيميائي للمستخلص الميثانولي الذي حصلت عليه من ثمار نبات السبج لوحظ وجود مجموعة من المركبات $3-\alpha$ -tigloylmelianol ، Melianone ، $21-\beta$ -acetoxy-melianone و Methyl Kulonate (Ntalli *et al*) (2010). و نظرا لاحتواء نبات السبج على القلويدات فقد صار التوجه لاستخلاصها واختبارها لدراسة تأثيرها على الخلايا السرطانية .

3.4 دراسة تأثير المستخلص الكحولي الخام لثمار نبات السبج والمركب القلويدي بوصفهما مواد محفزة او مضادة لأنقسام الخلايا للمفاوية لدم الانسان.

عُملت الخلايا للمفاوية البشرية بستة تراكيز محضرة بشكل ثنائي لكل من المستخلصين المائي والقلويدى الخام وبمدة تعريض 24 ساعة حضان بدرجة حرارة 37 م. قسمت هذه التجربة على قسمين: القسم الأول: يتضمن معاملة المستخلصين الخام مع الخلايا للمفاوية بوجود العامل المشطر PHA، أما القسم الثاني فيتضمن المعاملة بالمستخلصين الخام مع الخلايا للمفاوية باضافاتها دون المادة المشطرة PHA.

1.3.4 تأثير المستخلصات النباتية بوصفها مواد محفزة لأنقسام الخلايا للمفاوية لدم الانسان
أُستخدم المستخلص الكحولي الخام لثمار نبات السبج والمستخلص القلويدي الخام بأضافته بدلا من المادة المشطرة PHA بأستخدام ستة تراكيز، نوعها عشرية تدرجت بين (12.5، 25، 50، 100، 200، 400) مكغم/مل . أظهرت النتائج عدم وجود أي تحفيز لأنقسام الخلايا للمفاوية ولجميع التراكيز المستخدمة ، ووجدت خلايا لمفاوية غير منقسمة فقط. وهذا دليل على عدم امتلاك المستخلصات القابلية على تحفيز الخلايا للمفاوية على الانقسام.

2.3.4 تأثير المستخلصات النباتية بوصفها مواد مضادة لأنقسام الخلايا للمفاوية لدم الانسان .

بينت النتائج أنّ المستخلص الكحولي الخام لثمار السبج أدى إلى إيقاف انقسام الخلايا للمفاوية لدم الانسان وينسب مختلفة كما في الجدول (4-2) وأزدادت النسبة مع زيادة التركيز كما في الشكل (4-1). كانت نسبة الخلايا المتوقفة في الطور الاستوائي 0.30% ، 1.10% ، 2.21% ، 2.53% ، 2.43% ، 2.90% في التراكيز (12.5، 25، 50، 100، 200، 400) مكغم/مل على التوالي.

أما النسبة في السيطرة المعاملة بالكولجسين فكانت 4.20%. وكان الفرقُ معنويًا بين نسب الخلايا المتوقفة في جميع التراكيز . ولم يكن معنويًا بين التركيزين (100، 200) مكغم/مل. عند المعاملة بالتركيز 12.5 مكغم/مل بلغت نسبة الخلايا المتوقفة 7.14% من السيطرة، وأزدادت هذه النسبة إلى 50% عند التركيز 100 مكغم/مل وازدادت إلى 69.04% عند التركيز 400 مكغم امل.

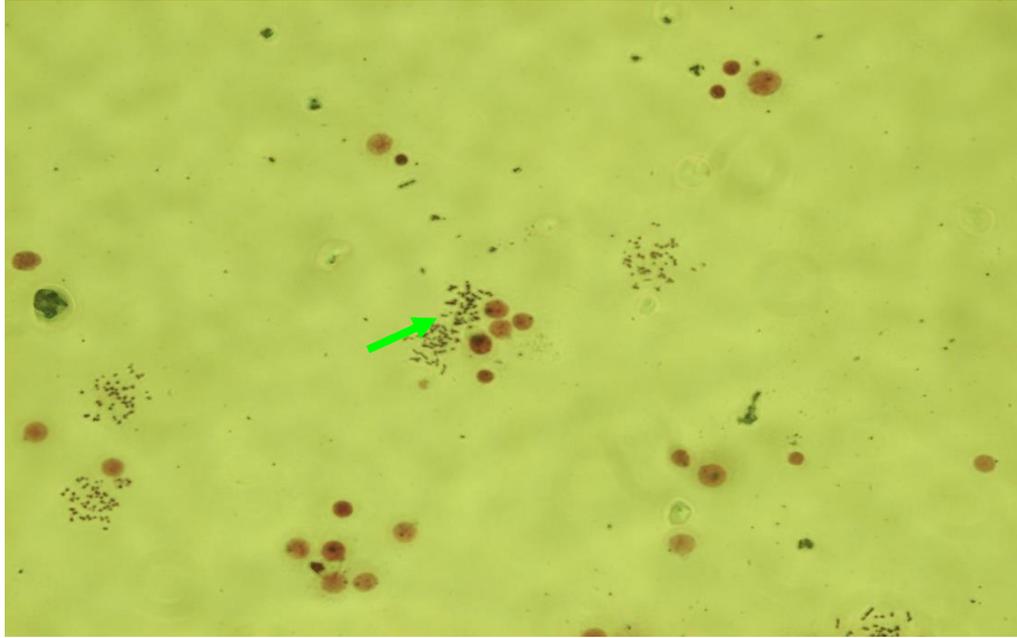
لإختبار فعالية المستخلص القلويدي الخام في إيقاف انقسام خلايا ادت المعاملة به الى حدوث زيادة في معدل الانقسام للخلايا اللمفاوية كلما زاد التركيز كما موضحة بالجدول (2-4). كانت نسبة الخلايا المتوقفة في الطور الاستوائي 0.56% و 1.60% ، 2.33% و 3.33% و 3.50% و 3.83% في التراكيز (12.5، 25، 50، 100، 200، 400) مكغم/مل على التوالي. أما نسبة الخلايا المتوقفة في السيطرة فكانت 4.20%، لم يكن الفرق معنوياً بين التراكيز (100، 200) مكغم /مل وكان الفرق معنوياً بين نسب الخلايا المتوقفة في جميع التراكيز والسيطرة. عند المعاملة بالتراكيز 12.5 مكغم/مل كانت نسبة الخلايا المتوقفة في الطور الاستوائي 13.33% وازدادت هذه النسبة لتصل 30.09% عند التركيز 25 مكغم/مل واستمرت الزيادة حتى وصلت النسبة 91.19% عند التركيز 400 مكغم /مل كما في الشكل (2-4).

الجدول (4-2): تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي والقلوي الخام لثمار نبات السبج في دليل الانقسام الخلايا للمفاوية لدم الانسان بدلالة الطور الإستوائي المتوقف

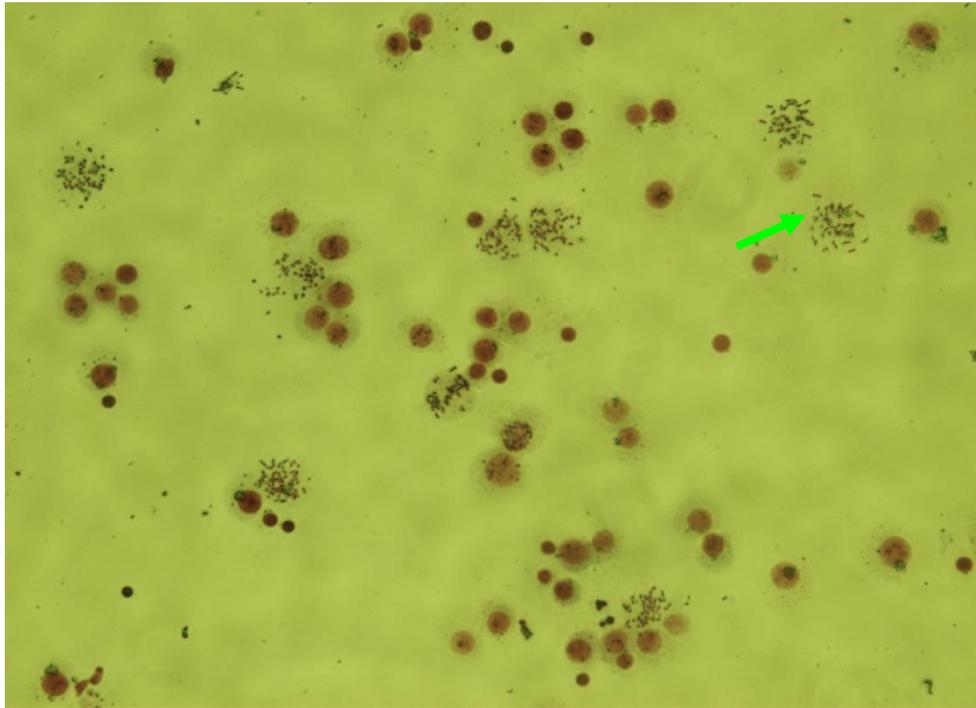
المستخلص القلوي الخام		المستخلص الكحولي الخام		التركيز µg/ml
النسبة المئوية من السيطرة	نسبة الخلايا في الطور الإستوائي SD±M	النسبة المئوية من السيطرة	نسبة الخلايا في الطور الإستوائي SD±M	
	0.01±4.20 a		0.00±4.20 a	السيطرة
13.33	0.56±0.56 f	7.14	0.11±0.30 f	*12.5
30.09	0.11±1.60 e	26.19	0.20±1.10 e	*25
55.47	0.08±2.33 d	36.42	0.17±2.21 d	*50
79.28	0.08±3.33 c	50.00	0.11±2.53 c	*100
83.33	0.40±3.50 c	57.82	0.17±2.43 c	*200
91.19	0.03±3.83 b	69.04	0.051±2.90 b	*400

الحروف المختلفة في العمود الواحد تعني وجود فروق معنوية عند مستوى (P<0.05) .

العلامة (*) يعني الاختلاف بين معدل دليل الانقسام لكلا المستخلصين معنويا عند مستوى (P>0.05)



الشكل (1-4) طور استوائي متوقف للخلايا اللمفاوية لدم الانسان عند استخدام التركيز 400 مكغم امل للمستخلص الكحولي الخام لثمار نبات السبجج (400X) .



الشكل (2-4) طور استوائي متوقف لخلايا اللمفاوية لدم الانسان عند استخدام التركيز 400 مكغم امل للمستخلص القلوي الخام لثمار نبات السبجج (400X) .

من خلال النتائج يمكن الاستدلال على أن المستخلص الكحولي الخام والقلويدي الخام لثمار نبات السبج له القابلية على إيقاف انقسام الخلايا للمفاوية في طور الاستوائي ، حيث بعد اجراء عدة دراسات عليه قد يكون هذا المستخلص او القلويد مشابها للقلويدات المستخدمة في صناعة العقاقير المضادة للسرطان، صنفت هذه القلويدات الى مجموعتين بحسب ما ذكره Mukherjee وآخرون (2001) في التأثير على النبيتات الدقيقة على مجموعتين رئيسيتين هما:

1- المواد المضادة للبلمرة Microtubule-destabilizing agents

تعمل هذه المواد على تثبيط بلمرة النبيتات الدقيقة عند التراكيز العالية ، وتتضمن هذه المجموعة الكولجسين Colchicine وعدداً من Vinca alkaloids (Vinblastin و Vincristine). تعد مادة الكولجسين من المواد الشائعة الاستخدام في إيقاف الانقسام الخلوي وهي من انواع الامينات Alkaloidal amine المعزولة من جذور نبات *Colchicum autumnale* (Sharma and Sharma,1980). ترتبط هذه المواد بالسطح الداخلي للثنائيات المختلفة بين الألفا والبيتا تيوبولين (Hastie, 1991)، فتكون معقد تيوبولين Tubulin (TCC) الذي يثبط بلمرة التيوبولين وتكوين النبيتات الدقيقة نتيجة حثه للتغيرات في هيئة التيوبولين مما يغير التماسك او الالتصاق ضمن النبيتات الدقيقة وتشويه النمو الطبيعي لها (Corriea and Lobert,2001; Jordan and Wilson,2004) وجد قلويدات Vincristine و Vinblastine التي تعمل على منع بلمرة النبيتات الدقيقة المكونة لخيوط المغزل عند استخدام التراكيز العالية بينما تجعل الخلايا تتوقف عن الانقسام وتموت بعملية الموت المبرمج من خلال عملها على كبح ديناميكية النبيتات بدلاً من ازالة بلمرتها (Becvarova et al.,2006).

2- المواد التي تمنع ازالة البلمرة Microtubule-stabilizing agents

تتضمن المواد التي تمنع ازالة البلمرة وتتضمن paclitaxal (وهي المادة الأولى التي شخصت في هذه المجموعة) و docetaxol (Taxotere) و Etoposides و Discodermolide و polyisoprenyl beuzophenones (Jordan,2002). وقد شاع استخدام القلويدات مثل مركبات paclitaxol المشتق من Taxol لايقاف الانقسام الخلوي في طور الاستوائي من خلال عملها على منع ازالة بلمرة النبيتات الدقيقة مسببة اعاقا الدورة

الخلوية وإيقافها في مرحلة الانتقال بين الطور الاستوائي والانفصالي الذي يصاحبه عدم انتظام اصطفاف الكروموسومات في خط استواء المغزل وتغيير في ترتيب المغزل (Madari *et al.*, 2003). يحفز ذلك التأثيرات المباشرة للعقار في المايوتوكونديريا اذ يرتبط بالجين Bcl-2 وهذا الارتباط يحفز فسفرة Bcl-2 مما يؤدي الى فتح مسام انتقال النفاذية في المايوتوكونديريا permeability transition pore (PTP) مما يسبب تحرير الساييتوكورم C ويؤثر ايضاً في تحرير ايونات الكالسيوم من المخزون داخل الخلوي (Kidd *et al.*, 2000).

استخدمت الشيباني (2006) المستخلصات الخام (المائي، الميثانولي، اسيتونايترال) 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 أن عدد الخلايا المتوقفة في الطور الستوائي كانت اقل مما أثبت في هذه الدراسة. كما لم تقل كفاءة عمل مستخلص الأزهار والبدور لنبات عين البزور عن السيطرة التي تمت معاملتها بالكولسيمايد، فضلا عن مستخلص الأوراق الذي فاقت كفاءته الكولسيمايد وذلك برفع قيمة معامل الانقسام (زيادة عدد الخلايا في الطور الاستوائي) بصورة كبيرة مقارنة بالسيطرة، وقد تناسبت هذه الزيادة طردياً مع إرتفاع التركيز (الجبوري، 2006).

تتأثر سمية الجزء النباتي بالحالة الفسلجية للنبات ومخزونه من المركبات الفعالة الذي يعتمد أيضا على مرحلة نمو النبات وساعة الجمع من اليوم ومن فصول السنة (هيكل وعمر، 1993). وقد ثبت أن المحتوى القلويدي لنبات السكران *Hyoscyamos niger* مرتفع خلال المرحلة الأولى من النمو ويأخذ بالنقصان خلال النمو الخضري، ثم يبدأ بالارتفاع مرة أخرى في أثناء طور التزهير آخذاً بالانخفاض التدريجي عقب تكوين الثمار والبدور، كما أن المحتوى القلويدي يختلف باختلاف العضو كما يختلف باختلاف طور النمو والتطور لنباتات أنواع السكران لأن المستوى الأعلى من القلويدات الكلية يوجد في الأزهار يليها الأوراق والجدور ثم السوق (الشحات، 1986).

وجد أن لمادة Cryptolepine hydrochloride وهي من القلويدات indologuoline المعزولة من جذور نبات *Cryptolepis sanguinolenta* نشاطاً في تثبيط انزيم DNA

Topoisomerase II وكذلك في إيقاف خلايا Melanema B16 في مرحلة G2/M (Bonjean *et al.*, 1998).

وجد أن لقلويد Noscipine القدرة على الارتباط بالتبوبيولين مما يسبب كبح ديناميكية النيبات من خلال زيادة مدة قضاء النيبات في حالتها المتوقفة (Pause) بدلاً من تغيير تنظيمها الخلوي ، وهذا يفسر سبب توقف انقسام اغلب انواع خلايا اللبائن عند وجود هذا القلويد (Landen *et al.*, 2002). واعتماداً على هذه الآليات استخدمت هذه القلويدات في تثبيط تكاثر ونمو الخلايا السرطانية اذ وجد ان لقلويد Narciclasine نشاطاً في تحفيز الموت المبرمج لخلايا PC-3Prostat و MCF-7 breast carcinoma cells (Dumont *et al.*, 2007). ووجد أن قلويد Isostrychnopentamino الموجود في الشجرة الافريقية *Strychnos usambarensis* يحث على الموت المبرمج لخط خلوي لسرطان القولون HCT-116 بواسطة نقل مجموعة phosphatidyle serine من الطبقة الداخلية الى الطبقة الخارجية للغشاء البلازمي، أظهر قلويد lycorine المستخلص من ابصال العائلة النرجسية نشاطاً في إيقاف خلايا human leukemia HL-60 في مرحلة G2/M اعتمداً على الجرعة (Liu *et al.*, 2004). وبين Eba Adou (2005) ان لقلويد Eptoposide المشابه لـ teniposide و thiophene وهي من المشتقات شبه المصنعة من مركبات epipodophyllotoxin المعزولة من نباتات العائلة epipodophyllaceae نشاطاً في تثبيط انزيم DNA Topoisomerase II ولذلك يستخدم في معالجة سرطان الرئة small-cell lung cancer والعقد اللمفاوية. بينما أظهر قلويد Cryptolopine المعزول من شجيرة غرب افريقيا Suriname rainforest نشاطاً في إيقاف الانقسام الخلوي لخلايا Human lung Adeno carcinoma A549 في طور S وطور G2/M وان هذا التأثير يعتمد على اختلاف التركيز للقلويدات (Zhu *et al.*, 2006).

4.4 التأثير السمي للمستخلص الكحولي الخام و المستخلص القلويدي الخام للثمار الجافة لنبات السبجح في نمو خطين من الخطوط السرطانية وخط طبيعي .

لاختبار امكانية استخدام قدرة المستخلص الكحولي الخام والقلويدي الخام في تثبيط تكاثر الاورام السرطانية ، أُجري اختبار على خطين سرطانيين ، عُملت الخطوط الخلوية السرطانية

بسته تراكيز و بواقع ثلاثة مكررات لكل تركيز من المستخلص الكحولي والقلويدي الخام لثمار النبات لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 37 م باستخدام تراكيز مختلفة تراوحت بين (12.5، 25، 50، 100، 200، 400) مكغم/مل بالاعتماد على (IC50)، و اعتمد اختبار السمية الخلوية (MTT) لتقويم تأثير تراكيز المستخلص في نمو الخلايا بدلالة النسبة المئوية لمعدل تثبيط النمو (Inhibition rate) .

1.4.4 تأثير المستخلص الكحولي الخام لثمار نبات السبج على خلايا الخطوط الخلوية السرطانية (HepG2 و SK-GT2) و الطبيعية (WRL68).

اوضح الجدول (3-4) أن للمستخلص الكحولي تأثيراً مثبطاً في نمو الخلايا السرطانية للخط HepG2 بدأ بالتركيز 12.5 مكغم/مل وبفرق معنوي اذ بلغت 9.8% و تزداد هذه النسبة لتصل 14.4%، 16.7%، 32.7%، 41.1%، 59.2% للتركيز (25، 50، 100، 200، 400) مكغم/مل و على التوالي . و لم يلاحظ فرق معنوي بين التراكيز (12.5، 25، 50) مكغم/مل و كذلك بين التراكيز (100، 200) مكغم/مل على التوالي كما موضحة في الشكل (3-4).

اوضح الجدول (4-4) أن للمستخلص الكحولي تأثيراً مثبطاً على الخط السرطاني SK-GT2 بدأ بالتركيز 12.5 مكغم/مل اذ بلغت نسبة التثبيط 4.3% و ازدادت الى 3.5%، 11.5%، 14.2%، 22.5%، 36.3% للتركيز (25، 50، 100، 200، 400) مكغم/مل و على التوالي. و لم يلاحظ فرق معنوي بين التراكيز (12.5، 25) مكغم/مل ، و كذلك بين التراكيز (50، 100) مكغم/مل ، وبين التراكيز (200، 400) مكغم/مل كما موضحة في الشكل (4-4).

اوضح الجدول (4-5) أن للمستخلص الكحولي تأثيراً مثبطاً على الخط الطبيعي WRL68 بدأ بالتركيز 12.5 مكغم/مل اذ بلغت نسبة التثبيط 3.1% و ازدادت الى 3.2%، 4.2%، 13.3%، 18.2%، 28.1% للتركيز (25، 50، 100، 200، 400) مكغم/مل و على التوالي. لم يلاحظ ظهور أي فرق معنوي في جميع التراكيز كما موضحة في الشكل (4-5).

حسب النتائج الاحصائية تبين أنّ هناك فرق معنوي عند المقارنة بين الخطين HepG2 و SK-GT2 في المستخلص الكحولي لثمار نبات السبجج بعد استخدام IC50 و البالغة للخط HepG2 (193.1) و للخط SK-GT2 (667) اما للخط الطبيعي WRL68 (579.6). ففي التركيز 400 مكغم/مل حيث لوحظ أنّ تأثير المستخلص الكحولي على الخط HepG2 كان اكثر من الخط SKGT2 فلقد كانت نسبة التثبيط 59.2% للخط HepG2 ونسبة التثبيط 36.3% للخط SK-GT2 في حين كانت نسبة التثبيط للخط الطبيعي عند التركيز نفسها 28.1% .

جدول (3-4) نسب التثبيط في الخط الخلوي السرطاني HepG2 ، بتأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي الخام لثمار نبات السبجج لمدة تعريض 24 ساعة ودرجة حرارة 37م باستخدام اختبار MTT.

الخط الخلوي السرطاني HepG2	التركيز
نسبة التثبيط ± الانحراف المعياري	µg/ml
2.5 ± 9.8 c	12.5
3.8 ± 14.4 c	25
5.6 ± 16.7 c	50
5.8 ± 32.7 b	* 100
8.4 ± 41.1 b	* 200
3.1 ± 59.2 a	* 400

الاحرف المختلفة تدل على وجود فروق احصائية عند مستوى P<0.05

جدول (4-4) نسب التثبيط في الخط الخلوي السرطاني SK-GT2 بتأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي الخام لثمار نبات السبج لمدة تعريض 24 ساعة ودرجة حرارة 37م باستخدام اختبار MTT.

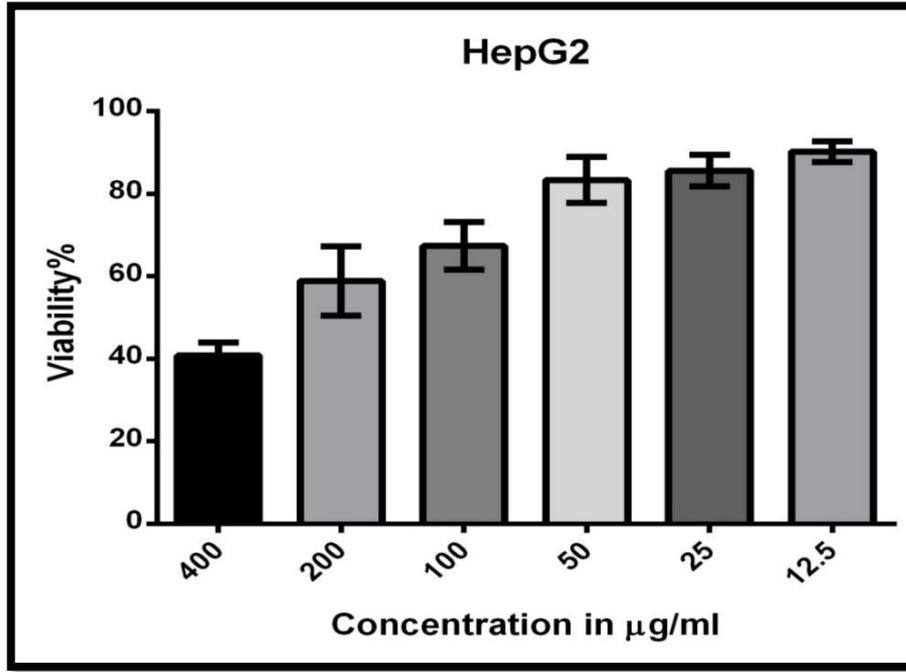
الخط الخلوي السرطاني SKGT2	التركيز
نسبة التثبيط ± الانحراف المعياري	µg/ml
2.8 ± 4.3 c	12.5
3.8 ± 3.5 c	25
7.3 ± 11.5 b	50
2.7 ± 14.2 b	* 100
6.4 ± 22.5 a	* 200
8.3 ± 36.3 a	* 400

الاحرف المختلفة تدل على وجود فروق احصائية عند مستوى $P < 0.05$

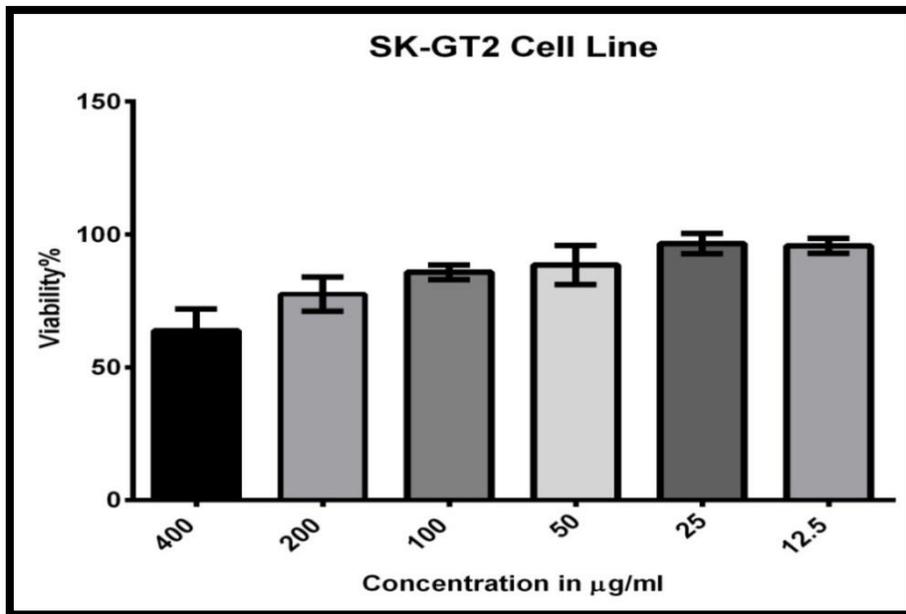
جدول (4-5) نسب التثبيط في الخط الطبيعي WRL68 بتأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي الخام لثمار نبات السبج لمدة تعريض 24 ساعة ودرجة حرارة 37م باستخدام اختبار MTT.

المستخلص الكحولي للخط الطبيعي WRL68	التركيز
نسبة التثبيط ± الانحراف المعياري	µg/ml
0.9 ± 3.1 a	12.5
1.9 ± 3.2 a	25
0.5 ± 4.1 a	50
7.2 ± 13.3 a	100
1.5 ± 18.2 a	200
3.5 ± 28.1 a	400

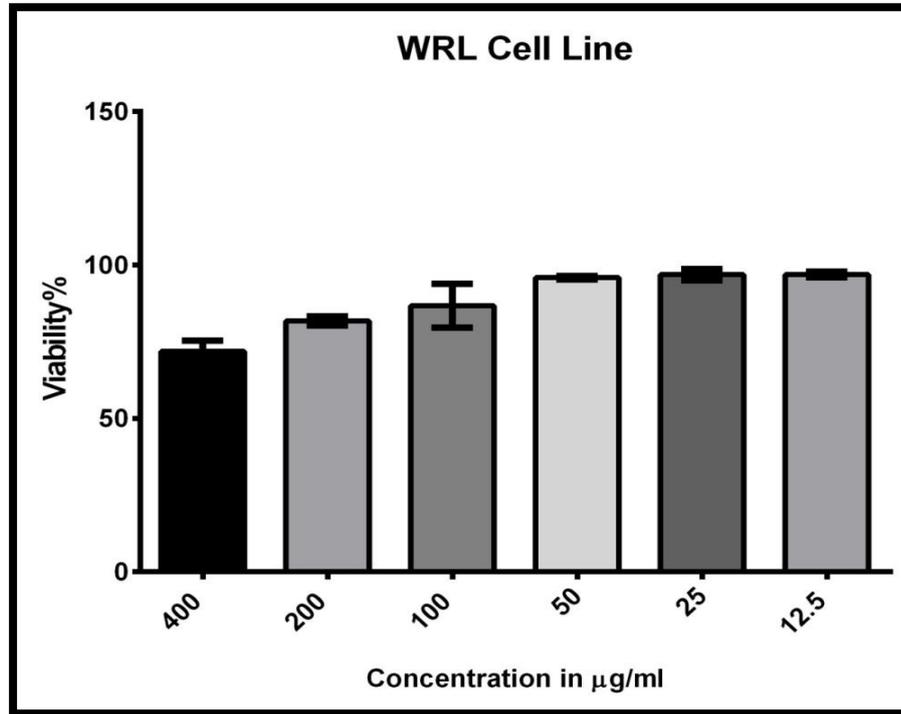
الاحرف المختلفة تدل على وجود فروق احصائية عند مستوى $P < 0.05$



شكل (3-4) تأثير المستخلص الكحولي الخام لثمار نبات السبجج على الخط الخلوي السرطاني HepG2 لفترة 24 ساعة و بدرجة حرارة 37 م باستخدام اختبار MTT.



شكل (4-4) تأثير المستخلص الكحولي الخام لثمار نبات السبجج على الخط الخلوي السرطاني SKGT2 لفترة 24 ساعة و بدرجة حرارة 37 م باستخدام اختبار MMT.



شكل (4-5) تأثير المستخلص الكحولي الخام لثمار نبات السبجج على الخط الطبيعي WRL68 لفترة 24 ساعة ودرجة حرارة 37 م باستخدام اختبار MTT.

2.4.4 تأثير المستخلص القلويدي الخام لثمار نبات السبجج على خلايا الخطوط الخلوية السرطانية (HepG2 و SK-GT2) و الطبيعية WRL68.

أوضح الجدول (4-6) أن للمستخلص القلويدي تأثيراً مثبطاً في نمو الخلايا السرطانية للخط HepG2 بدأ بالتركيز 12.5 مكغم/مل وبفرق معنوي إذ بلغت نسبة التنشيط 30.4% و تزداد هذه النسبة لتصل 31.5%، 35.3%، 36.2%، 47.5%، 65% للتركيز (25، 12.5) مكغم/مل و كذلك بين التركيزات (200، 100، 50) مكغم/مل على التوالي. و لم يلاحظ فرق معنوي بين التركيزات (25، 12.5) مكغم/مل و كذلك بين التركيزات (200، 100، 50) مكغم/مل على التوالي كما في الشكل (4-6).

أوضح الجدول (4-7) أن للمستخلص القلويدي على الخط السرطاني SK-GT2 تأثيراً مثبطاً بدأ بالتركيز 12.5 مكغم/مل إذ بلغت نسبة التنشيط 3.7% و ازدادت الى 5.1%، 6.1%، 13.3%، 25%، 30.8% للتركيز (25، 50، 100، 200، 400) مكغم/مل و على التوالي. و

لم يلاحظ فرق معنوي بين التراكيز (50، 25، 12.5) مكغم/مل ، و كذلك بين التركيزين (400، 200) مكغم/مل كما موضحة في الشكل (4-7).

اوضح الجدول (4-8) ان للمستخلص القلويدي على الخط الطبيعي WRL68 كان له تأثير قليل في التنشيط ففي التركيز 12.5 مكغم/مل بلغت نسبة التنشيط 0.86 % و ازدادت الى 1.5 %، 2.8 %، 5.7 %، 6.4 %، 14.8 % للتراكيز (25، 50، 100، 200، 400) مكغم/مل وعلى التوالي. لم يلاحظ فرق معنوي بين التراكيز (50، 25، 12.5) مكغم/مل، و كذلك بين التركيزين (200، 100) مكغم/مل كما موضحة في الشكل (4-8).

حسب النتائج الاحصائية تبين أن هناك فرق معنوي عند المقارنة بين الخطين HepG2 و SK-GT2 في المستخلص القلويدي لثمار نبات السبجح بعد استخدام IC50 و البالغة للخط HepG2 (165.6) و للخط SK-GT2 (282.8) اما للخط الطبيعي WRL68 (2607). ففي التركيز 400 مكغم/مل حيث لوحظ أن تأثير المستخلص القلويدي على الخط HepG2 كان اكثر من الخط SK-GT2 فقد كانت نسبة التنشيط 65% للخط HepG2 ونسبة التنشيط 30.8% للخط SK-GT2 في حين كانت نسبة التنشيط للخط الطبيعي عند التركيز نفسها 14.8% .

جدول (4-6) نسب التثبيط في الخط الخلوي السرطاني HepG2 ، بتأثير تراكيز مختلفة من المستخلص القلويدي الخام لثمار نبات السبج ولمدة تعريض 24 ساعة ودرجة حرارة 37م باستخدام اختبار MTT.

الخط الخلوي السرطاني HepG2	التركيز
نسبة التثبيط \pm الانحراف المعياري	$\mu\text{g/ml}$
8.9 \pm 30.4 c	* 12.5
2.5 \pm 31.5 c	* 25
5.9 \pm 35.3 b	* 50
5.4 \pm 36.2 b	* 100
4.7 \pm 47.5 b	* 200
6.2 \pm 65 a	* 400

الاحرف المختلفة تدل على وجود فروق احصائية عند مستوى $P < 0.05$

جدول (4-7) نسب التثبيط في الخط الخلوي السرطاني SKGT2 بتأثير تراكيز مختلفة من المستخلص القلويدي الخام لثمار نبات السبج ولمدة تعريض 24 ساعة ودرجة حرارة 37م باستخدام اختبار MTT.

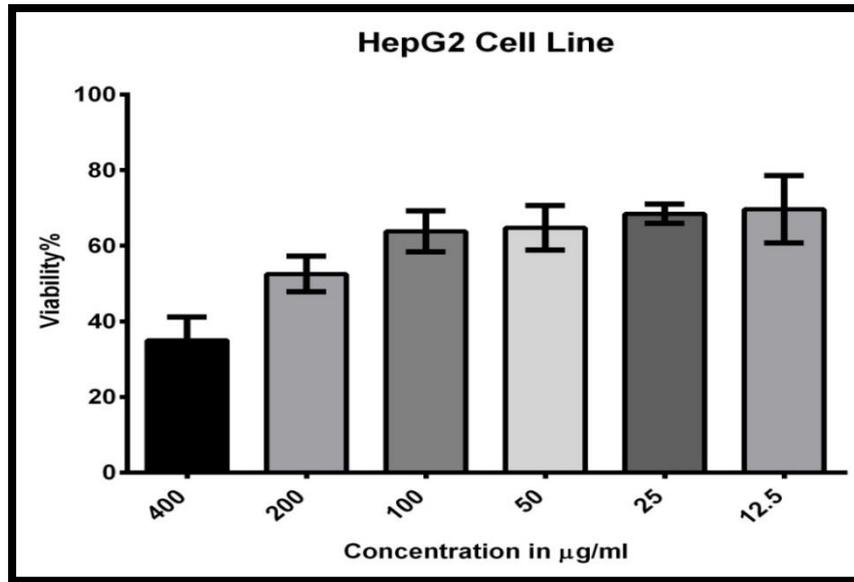
الخط الخلوي السرطاني SKGT2	التركيز
نسبة التثبيط \pm الانحراف المعياري	$\mu\text{g/ml}$
2.1 \pm 3.7 c	* 12.5
3.1 \pm 5.1 c	* 25
2.4 \pm 6.1 c	* 50
7.2 \pm 13.3 b	* 100
0.5 \pm 25 a	* 200
2.8 \pm 30.8 a	* 400

الاحرف المختلفة تدل على وجود فروق احصائية عند مستوى $P < 0.05$

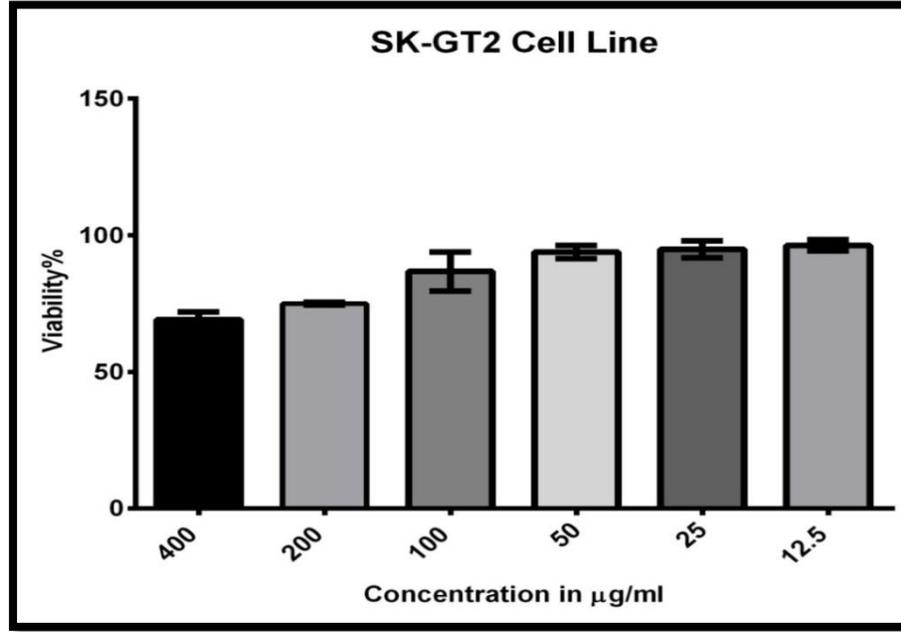
جدول (4-8) نسب التثبيط في الخط الطبيعي WRL68 بتأثير تراكيز مختلفة من المستخلص القلويدي الخام لثمار نبات السبج لمدة تعريض 24 ساعة ودرجة حرارة 37م باستخدام اختبار MTT.

المستخلص القلويدي للخط الطبيعي WRL68	التركيز µg/ml
نسبة التثبيط ± الانحراف المعياري	
0.10 ± 0.9 c	12.5
0.7 ± 1.5 c	25
1.7 ± 2.8 c	50
1.3 ± 5.7 b	100
1.4 ± 6.4 b	200
14.7 ± 14.8 a	400

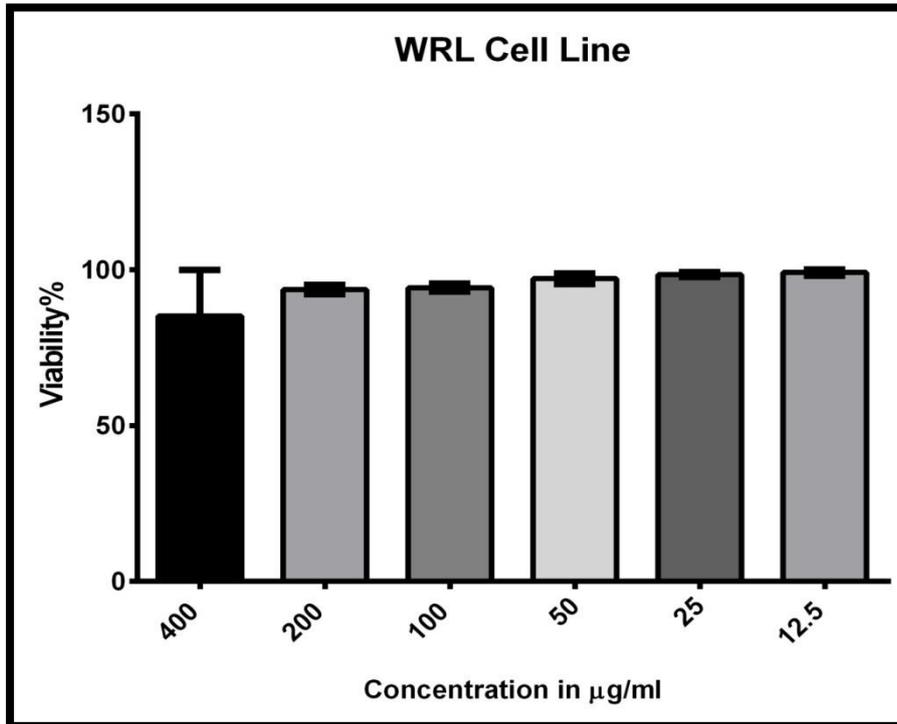
الاحرف المختلفة تدل على وجود فروق احصائية عند مستوى $P < 0.05$



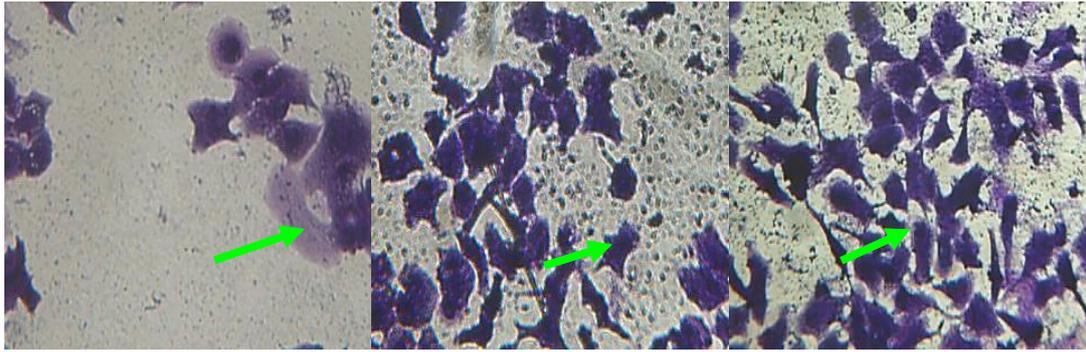
شكل (4-6) تأثير المستخلص القلويدي الخام لثمار نبات السبج على الخط الخلوي السرطاني HepG2 لفترة 24 ساعة و بدرجة حرارة 37 م باستخدام اختبار MTT.



شكل (4-7) تأثير المستخلص القلويدي الخام لثمار نبات السبجج على الخط الخلوي السرطاني SKGT2 لفترة 24 ساعة و بدرجة حرارة 37 م باستخدام اختبار MTT.



شكل (4-8) تأثير المستخلص القلويدي الخام لثمار نبات السبجج على الخط الطبيعي WRL68 لفترة 24 ساعة و بدرجة حرارة 37 م باستخدام اختبار MTT.



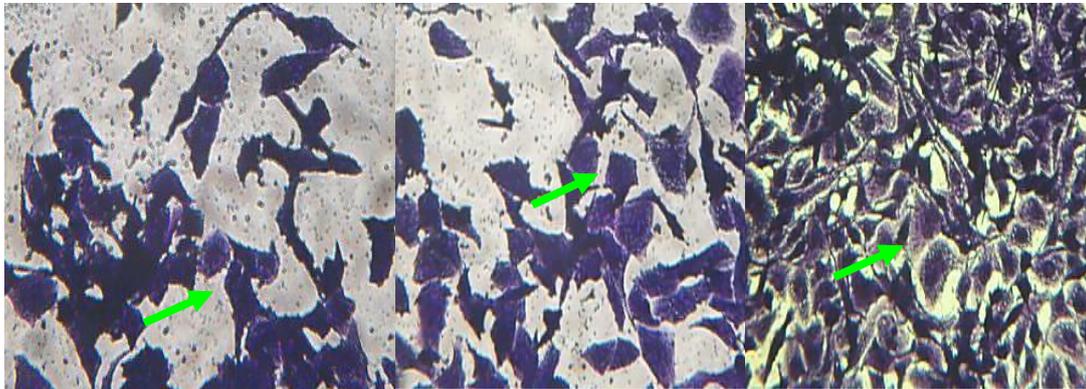
C

B

A

الشكل (4-9) مقارنة بين خلايا HepG2 عند تركيز 400 مكغم/مل بعد 24 ساعة للمستخلص الكحولي والقلويي لثمار نبات السبج (400X) باستخدام صبغة (Crystal Violate).

(A) الخط الخلوي السرطاني HepG2 الذي يمثل السيطرة (B) الخط الخلوي HepG2 المعامل بالمستخلص الكحولي عند تركيز 400 مكغم/مل ويوضح الفراغات بين الخلايا (C). الخط HepG2 المعامل بالمستخلص القلويي عند تركيز 400 مكغم/مل ويوضح الفراغات بين الخلايا.



C

B

A

الشكل (4-10) مقارنة بين خلايا SK-GT2 عند تركيز 400 مكغم/مل بعد 24 ساعة تعرض للمستخلص الكحولي والقلويي لثمار نبات السبج (400X) باستخدام صبغة (Crystal Violate).

(A) الخط الخلوي SK-GT2 الذي يمثل السيطرة ويوضح خلايا الخط الكثيفة. (B) الخط الخلوي SK-GT2 المعامل بالمستخلص الكحولي عند تركيز 400 مكغم/مل ويوضح الفراغات

بين الخلايا . (C) الخط الخلوي SK-GT2 المعامل بالمستخلص القلويدي عند تركيز 400مكغم/مل ويوضح الفراغات بين الخلايا .

عزّزت نتائج هذه الدراسة 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 (Rupa *et al.*, 2014).

أد أوضحت النتائج ظهور تأثيرات سمية على نمو خلايا خطوط الخلية السرطانية HepG2 (SK-GT2 and) لجميع تراكيز مستخلصي الكحولي والقلويدي لثمار نبات السبج كما موضحة في الجداول (3-4)، (4-4)، (6-4) و (7-4). اوضحت النتائج وجود تأثير للمستخلص الكحولي بدأ بالتراكيز القليلة على الخط الطبيعي (WRL68) و لكن بنسب اقل مما في الخلايا السرطانية كما موضحة في الجدول (5-4) بينما لوحظ تأثير قليل على الخط الطبيعي (WRL68) عند استخدام المستخلص القلويدي لثمار نبات السبج كما موضحة في الجدول (8-4) مما يدل على عدم سمية المستخلص القلويدي ربما لوجود القلويدات في المستخلص او تأثيرات اخرى. ويعزى هذا التأثير التثبيطي للمستخلصين الى احتوائه على العديد من المركبات الكيميائية التي لها فعالية في تثبيط نمو الخلايا السرطانية او توقف نموها، ومن دراسة سابقة ل (Rupa و اخرون 2014) أظهرت نتائج الفحص الكيميائي لبعض المكونات الفعالة لنبات السبج تأثيرها على تثبيط الخلايا السرطانية المدروسة ، لاحتوائها على بعض المركبات الكيميائية مثل (القلويدات والتربينات). كما اشار (Kim and , 2012) Kang أنّ المستخلص الهكساني لنبات السبج *Melia azedarach* له فعالية تثبيطية لنمو خلايا الخط السرطاني A549 في المختبر. كذلك للسبج فعالية واضحة في تقييم النشاط السمي ضد خطوط الخلايا السرطانية للإنسان (خلايا سرطان الدم في الانسان HL60 ، خلايا سرطان الرئة A549 وخلايا سرطان المعدة AZ521) و إنّ هذه الفعالية السّمية ظهرت بشكل اساسي من خلال حث الموت الخلوي المبرمج على المايتوكونديريا و مسارات المستقبلات المتوسطة ، وهذه الفعالية تعود الى وجود مركبات Triterpenoides والتي تسمى Liminoids (Akihisa *et al.* , 2013). كما اشار Kikuchi و اخرون (2013) الى أنّ مركب 12-

O-Acetylarachin B المعزول من ثمار نبات السبج له فعالية تثبيطية ضد خطوط الخلايا السرطانية لدم الانسان (HL-60) والمعدة (AZ521) من خلال حث الموت الخلوي المبرمج للمايتوكوندريا ومسارات مستقبلات الخلية. واطهرت دراسة الربيعي (2009) ان المستخلص القلويدي لنبات المديد *Convolvulus arvensis* يمتلك فعالية تثبيطية لنمو خلايا الخط الخلوي السرطاني Hep-2 و AMN3 حيث تزداد الفعالية بزيادة التركيز، و اشار (Mukherjee and Patil, 2012) الى أنّ القلويدات المستخلصة من ثمار نبات *Citrullus colocynthis* تمتلك سمية عالية ضد الخلايا للخطوط الخلوية السرطانية (HepG-2 & MCF-7). تباينت سمية الخلايا السرطانية من خط خلوي الى اخر ويرجع ذلك الى اختلاف خلايا الخطوط الخلوية السرطانية في مستقبلاتها، فمن الممكن ايجاد أكثر من مركب في المستخلصات يمتلك القابلية التثبيطية ضد الخلايا السرطانية وذلك بالتأثير على مستقبلات معينة على أسطح هذه الخلايا ومن خلال تلك المستقبلات تكون الخلايا مستجيبة لفعل العديد من المواد المحفزة للموت الخلوي المبرمج (Apoptosis)، (Moteki et al., 2002).

كما بينت النتائج أنّ نوع المستخلص و تركيزه عاملان مهمان في تحديد نسبة تثبيط الخلايا. اذ وجد أنّ زيادة تركيز كلا المستخلصين الكحولي و القلويدي يزيد من نسبة تثبيط نمو الخلايا للخطوط السرطانية، هذا يتفق مع ما توصل اليه (Sreejay and Santhy, 2013) أنّ المستخلص الميثانولي لنبات *Acorus calamus* فعالية تثبيطية لنمو خلايا الخط الخلوي السرطاني MCF-7 حيث تزداد الفعالية بزيادة التركيز ايضاً، ويتفق مع (Looi et al., 2013) أنّ الفعالية التثبيطية لمستخلص الكلوروفورم لنبات *Centratherum anthelminticum* على خلايا الخط الخلوي السرطاني A375 تزداد بزيادة التركيز.. وقد وجد في بعض الدراسات حالة عكسية بخلاف ما توصلنا اليه في نتائج دراستنا هذه حيث وجد كلما زاد التركيز تقل نسبة تثبيط الخلايا السرطانية أي أنّ العلاقة عكسية بين التركيز ونسبة التثبيط وهذه الحالة تسمى بالتضادية في تأثير الجرعات Hormetic effect (Hormesis) وهي ظاهرة بايولوجية شائعة في علم السموم، تتميز بوجود تعاكس بعمل الجرعات الواطئة بالمقارنة مع الجرعات العالية حيث يتم الاستفادة من هذه الظاهرة في تأثير الجرعات من الجرعات الواطئة لبعض المركبات السامة او الملوثات في علاج بعض الامراض المستعصية كالسرطان والزهايمر اذ إنّ للجرعات الواطئة

من بعض المركبات القدرة على قتل الخلايا السرطانية دون التأثير في الخلايا الطبيعية (Calabrese and Baldwin, 2003). ربما يرجع ذلك الى تحرر مركبات معينة مثل القلويدات والفلافونيدات وغيرها وقد يكون لها تأثير تثبيطي عال في حين تكون المركبات او المواد الفعالة مركزة جداً عند التراكيز العالية فتعطي تثبيطاً اقل. لقد وجد (سلمان، 2013) عند دراسته للمستخلص المائي لنبات الريحان أنّ التراكيز الواطئة تمتلك نسبة تثبيط أعلى من التراكيز العالية على خلايا الخطين الخلويين AMN-3 و Hela. اشار (Dharani 2014) الى ان نسبة تثبيط الخلايا للخط الخلوي السرطاني MCF-7 تقل بزيادة تركيز المستخلص الميثانولي لأوراق نبات *Prosopis cineraria*. ويتفق هذا أيضا مع ما توصل اليه (Arshad et al., 2008) في دراستهم للمستخلصات النباتية فقد اعتمد التأثير التثبيطي على التراكيز الواطئة أكثر من التراكيز العالية وهذا يعتمد على عدة عوامل منها تركيز المادة والوزن الجزيئي اذ انه كلما كان تركيز المادة قليلاً كلما سهل ذلك اختراقها للغشاء الخارجي في جدار الخلية ولكن ليس للحد من التخفيف الذي يفقدها فاعليتها السمية.

كما بينت النتائج أنّ نوع المستخلص يلعب دوراً مهماً في نسبة تثبيط نمو خلايا الخطوط الخلوية السرطانية، حيث وجد ان المستخلص القلويدي يؤثر على نمو خلايا الخطوط السرطانية بنسبة اعلى من المستخلص الكحولي المستخدم ضد الخطوط الخلوية السرطانية نفسها وبالتراكيز نفسها ومدة التعرض (Landen et al., 2002).

مما تقدم يتضح أنّ للمستخلص القلويدي لثمار نبات السبجح سمية خلوية ضد الخلايا السرطانية أفضل من المستخلص الكحولي . وقد استعمل في هذه الدراسة المستخلصين الكحولي الخام و القلويدي الخام لثمار نبات السبجح كان الهدف منها التحقق من امتلاك نبات السبجح فعالية مضادة للسرطان، و قد أوضحت (Rupa وآخرون، 2014) أنّ نبات السبجح يحتوي على القلويدات والكلايكوسيدات والتانينات، وهذه المركبات الكيميائية لها فعالية تثبيطية ضد الخلايا السرطانية (Mukherjee and Patil, 2012).

فقد أُستخدم المستخلص القلويدي لأجراء اختبارات على المؤشرات الخلوية المتعددة في فحوصات (High Content Screening (HCS) على خلايا الخط الخلوي السرطاني HepG2 الذي يمتلك اعلى نسبة تثبيط لمستخلص القلويدي في اختبار MTT لغرض معرفة

الية تأثير المستخلص القلويدي على الخلايا السرطانية وألية حث الخلايا السرطانية على الموت الخلوي المبرمج (Apoptosis)

5.4 تأثير المستخلص القلويدي لثمار نبات السبجج على الخط السرطاني HepG2 باستخدام

فحص High Content Screening (HCS)

أُجري هذا الاختبار لتقويم السمية الخلوية للمستخلص القلويدي الخام لثمار نبات السبجج على خلايا الخط الخلوي السرطاني HepG2 بعد ان تم تفضيله على المستخلص الكحولي بالاعتماد على نتائج اختبار MTT لتأثير المستخلصين على نمو خلايا الخطوط الخلوية السرطانية (HepG2 and SK-GT2). كما تم اختيار الخط الخلوي السرطاني HepG2 بالاعتماد على تلك النتائج، اذ اظهر المستخلص القلويدي أفضل نسبة تثبيط لنمو خلايا الخط السرطاني HepG2 مقارنة بالخط السرطاني الاخر. تضمن هذا الاختبار تقويم تأثير المستخلص القلويدي لثمار النبات على مورفولوجيا خلايا الخط السرطاني HepG2، وذلك من خلال الكشف عن التغيرات التي تحدث للخلايا لقياس بعض المؤشرات الخلوية المتضمنة نفاذية الخلية وعدد الخلايا والمحتوى النووي للخلايا ونفاذية غشاء المايوتوكونديريا ومستوى تحرر سايتوكروم سي من الخلايا. أُجري هذا الاختبار باستخدام جهاز فحص المحتوى العالي (HCS) High Content Screening ويعتبر نظام ذو محتوى عالي الدقة يعمل بشكل الي في عد الخلايا وتصويرها بالمجهر المتألق من مزارعها الخلوية في صفيحة متعددة الحفر، فضلاً عن كونه يقيس وبشكل الي كثافة وموقع الإشارات داخل الخلية الواحدة والاشارات داخل العضيات الخلوية. حُللت الصور خلال وقت نمو الخلايا داخل المزارع الخلوية (العجيلي، 2012). وقد استخدم في هذا الاختبار عدة تشخيصية ذا صبغات عدة تعمل كل صبغة منها وفق هدف معين ومنها صبغة Hoechst dye التي لها القابلية للتداخل بين القواعد النيتروجينية أدنين-ثايمين للدنا. لقد بين (الاعظمي واخرون، 2012) أن لهذه الصبغة استعمالات مختلفة في التحضيرات المختبرية الخاصة بالمادة الوراثية، حيث تستعمل لتصبغ الدنا والكروموسومات. كما تحتوي العدة التشخيصية على صبغة النفاذية permeability dye وصبغة mitochondrial membrane potential dye ومستضدات للسايتوكروم سي والتي تستعمل للتحري عن مستوى السايتوكروم المتحرر داخل الخلية.

وتبين النتائج الموضحة في الجدول (4-9) أنّ للمستخلص القلويدي لثمار نبات السبج سمية خلوية عالية لخلايا الخط السرطاني HepG2 عند التركيز 400 مكغم/مل ، و لم يظهر التركيز 400 مكغم/مل أي فروق معنوية مقارنة بالعقار Doxorubicin ($20\mu\text{m}$) المستخدم كسيطرة حيث كانت نفاذية الخلايا للعقار 725.4 في حين كانت للتركيز 400 مكغم/مل 743.6 كذلك اظهر التركيز المستخدم فروق معنوية عن باقي التراكيز المستخدمة. اما بالنسبة لعدد الخلايا لوحظ زيادة في تألق الصبغة حيث لم يظهر أي فرق معنوي مقارنة بالعقار Doxorubicin ($20\mu\text{m}$) المستخدم كسيطرة ، حيث ان عدد الخلايا كان للتركيز 400 مكغم/مل 1558 مقارنة بالسيطرة Doxorubicin حيث كانت 1249 ، كذلك اظهرت التراكيز فروق معنوية فيما بينها . لوحظ نقصان في الكثافة النووية عند تقليل التركيز، ولم تظهر فروق معنوية بين التركيز المستخدم 400 مكغم/مل مقارنة بالعقار Doxorubicin ($20\mu\text{m}$) حيث كانت الكثافة النووية للتركيز 400 مكغم/مل 1000 مقارنة بالسيطرة للعقار 1163 و بدأت الكثافة النووية بالنقصان حيث وصلت الى 640.4 عند التركيز 100 مكغم/مل ، كذلك هناك فروق معنوية بين كافة التراكيز المستخدمة. لوحظ عدم وجود فروق معنوية بين التركيز 400 مكغم/مل مقارنة بالسيطرة للعقار Doxorubicin ($20\mu\text{m}$) حيث كانت نفاذية غشاء الماييتوكونديريا 137.6 مقارنة بالتركيز 400 مكغم/مل فقد كانت 180.8 ، كذلك اظهرت النتائج وجود فروق معنوية بين كافة التراكيز المستخدمة في التجربة. اما فيما يخص سايتوكروم سي فقد اظهرت النتائج عدم وجود فروق معنوية بين التركيز 400 مكغم/مل والتركيز 200 مكغم/مل مقارنة بالسيطرة للعقار Doxorubicin ($20\mu\text{m}$) لوحظ أنّ مستويات سايتوكروم سي كانت 225.7 للعقار Doxorubicin مقارنة بالتركيزين (200, 400) مكغم/مل كانت 233.6, 225.6 على التوالي. كذلك اظهرت النتائج عدم وجود فروق معنوية بين التركيزين (200, 400) مكغم/مل كما موضحة بالشكل (4-11).

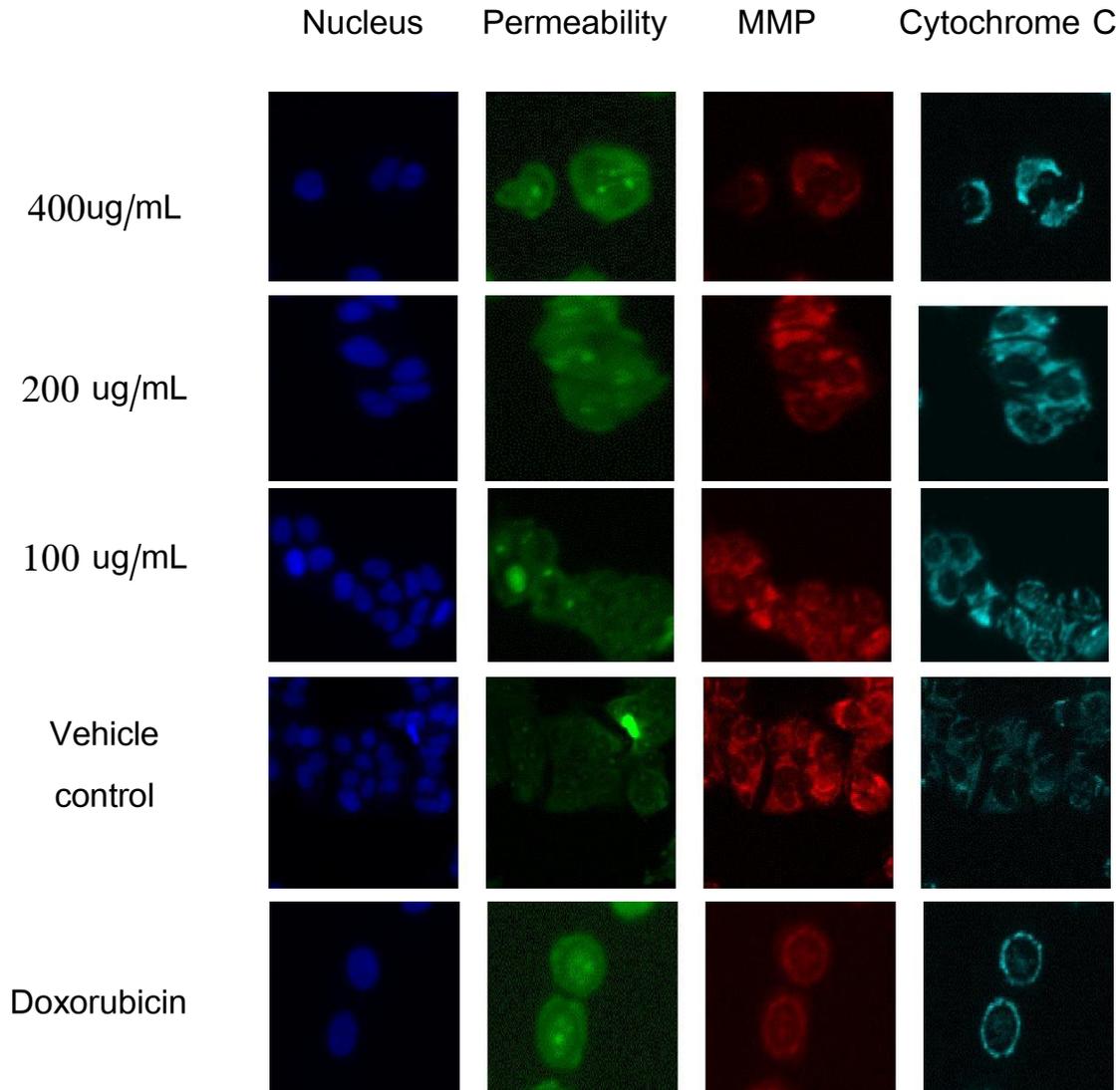
مما تقدم يلاحظ أنّ التراكيز العالية من المستخلص القلويدي تؤثر على جميع المؤشرات الخلوية لخلايا الخط الخلوي السرطاني HepG2 عند تعرضها للمستخلص لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 م والتي تؤدي الى حث الخلايا للدخول في عملية الموت الخلوي المبرمج (Apoptosis). فالسمات المميزة للمراحل المبكرة للموت الخلوي المبرمج تتضمن اضطراب

نشاط الماييتوكونديريا وتغيرات في نفاذية اغشيتها ونظام الاكسدة والاختزال داخلها، والتي بدورها تؤدي الى فتح مسامات الاغشية والسماح بمرور الايونات والجزيئات الصغيرة خلال الغشاء، وتؤدي عملية فتح المسامات في الغشاء الخلوي الى التوازن الايوني والذي بدوره يؤدي الى فصل السلسلة التنفسية وتحرر الساييتوكروم سي داخل الخلية (Elkholi *et al.*,2014).

جدول (4-9) قيم المعالم الخلوية المستخدمة للكشف عن فعالية المستخلص القلوي لثمار نبات السبج على خلايا الخط الخلوي HepG2 باستخدام جهاز HCS ولفترة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 م.

المؤشرات الخلوية					التراكيز µg \ ml
ساييتوكروم سي M±SD	نفاذية غشاء المايتوكونديري M±SD	الكثافة النووية M±SD	عدد الخلايا M±SD	نفاذية الخلايا M±SD	
225.7± 12.66 a	137.6± 29.99 a	1163± 85.24 a	1249± 77.99 a	725.4± 15.77 a	Doxorubicin
136.2± 15.98 C	326 ± 9.037 C	505.1± 76.66 d	4681± 427.8 C	336.3± 15.31 C	السيطرة
233.6± 10.88 a	180.8± 10.43 a	1000± 37.12 a	1558±192.9 a	743.6± 30.87 a	400µg\ml
225.6± 17.11 a	240.4± 9.617 b	807.6± 34.66 C	2508± 249.3 b	580.3± 75.58 b	200 µg\ml
188.8±13.51 b	277.8± 13.36 C	640.4± 60.95 d	4004± 400.3 C	434.9± 51.76 C	100 µg\ml

** (P < 0.05) وجود الاحرف المختلفة في نفس العمود تدل على وجود فروق معنوية



شكل (4-11) تأثير التراكيز المختلفة للمستخلص القلويدي لثمار نبات السبجج على المحتوى النووي ونفاذية الاغشية الخلوية ونفاذية غشاء المايٲوكونديريا ومستوى تحرر السايٲوكروم سي لخلايا الخط السرطاني HepG2 بعد الحضانة لمدة تعرض 24 ساعة وبدرجة حرارة 37م

إن استخدام اختبار السمية الخلوية (Cytotoxicity) للأدوية يُعد جزءاً أساسياً للكشف عن ادوية جديدة، وهي عملية معقدة تؤثر على مسارات ابيضية متعددة بعد تعرض الخلايا للمادة السامة وبالنتيجة تؤدي الى حث الخلايا على الموت اما كالموت الخوي المبرمج (Apoptosis) او التخر (Necrosis)، والذي يصاحبها عادة تغيرات في شكل النواة ونفاذية الخلية ووظائف

المائتوكونديريا والتي تؤدي الى فقدان وظيفة اغشية المائتوكونديريا وتحرر السائتوكروم C من المائتوكونديريا (Sang et al., 2002).

هنالك العديد من الدراسات التي تبين سمية المستخلصات النباتية على الخلايا السرطانية. فقد اظهر المستخلص المائي لجذور نبات *Vetineria zizanioides* سمية خلوية تجاه خلايا الخط الخلوي السرطاني MCF-7 عن طريق حث تجزئة المادة النووية وتكثيف الكروماتين (Chitra et al., 2014). كما وجد (Varalakshmi et al., 2014) ان المستخلص الميثانولي للحاء نبات *Cinnamomum zeylanicum* صفات الموت الخلوي المبرمج المورفولوجية مثل انكماش الخلايا وتكثيف المادة النووية وتجزئتها لخلايا الخط السرطاني HepG2. ويحث الموت الخلوي المبرمج عن طريق العديد من العمليات البايولوجية في الخلايا، وهو يختلف عن النوع الآخر من موت الخلايا المسمى بالتخر والذي يؤدي الى تضخم الانسجة وانتفاخ وتمزق الخلايا التي تعاني الموت (Wayne et al., 2009).

هناك مساران رئيسيان لموت الخلايا المبرمج هما المسار الداخلي والمسار الخارجي. يتمركز المسار الداخلي حول المائتوكونديريا باعتبارها نقطة بداية موت الخلايا المبرمج، اذ تتلقى عدة إشارات منها تلف الحمض النووي ونقص الأوكسجين والتوتر التأكسدي، والتي تؤدي بدورها إلى إفراز السائتوكروم-سي (Cytochrom C) من غشاء المائتوكونديريا، فضلاً على تفعيل بروتينات تساعد على الموت الخلوي المبرمج للخلايا الموجودة في السيتوبلازم. وعندما يتم إفراز هذه البروتينات في السيتوبلازم يقوم السائتوكروم-سي بالارتباط بعامل تحفيز موت الخلايا المبرمج (Apaf-1) وذلك يؤدي إلى تبلمر (Apaf-1) إلى مركب معقد سباعي الأجزاء، ثم يرتبط هذا المركب بكاسباز-9 وبهذا يتم تكوين بروتين متعدد يسمى أبوبتوسوم (Apoptosome) والآخر يؤدي الى كسر وتنشيط عدة انزيمات فاعلة في التحلل البروتيني. اما المسار الخارجي لموت الخلايا المبرمج فيعتمد على مستقبلات عامل التخر الورمي Tumor Necrosis Factor (TNF) لتحفيز موت الخلايا المبرمج. وعندما ترتبط هذه المستقبلات بنظيراتها داخل الخلايا تنشط كاسباز-9 و 10 وتكون مركب معقد لبداية الإشارة لحدوث الموت الخلوي وتنشيط الانزيمات الهدامة (Abbas et al., 2008).

ويمكن أن تخضع جميع الخلايا حقيقية النواة لاستجابة الموت الخلوي المبرمج، والتي يمكن تحفيزها من خلال محفزات داخل الخلية أو من خارجها. ولا بد من وجود اتزان بين التضاعف الخلوي وتمايز الخلايا من جهة وموتها من جهة أخرى، وإن أي اختلال في هذا الاتزان سوف يؤدي إلى حدوث الأمراض مثل السرطان (Wong, 2011).

وهناك العديد من الأبحاث التي تبين أن المستخلصات النباتية تعمل على حث الخلايا السرطانية على الموت الخلوي المبرمج. فقد أوضح (Stankovic *et al.*, 2011) إلى أن نسبة الموت الخلوي المبرمج لخلايا الخط الخلوي HCT-116 تزداد عند معاملة مع المستخلص الميثانولي لجنس *Teucrium*. كما أشارت دراسة (Machana *et al.*, 2011) بأن معاملة خلايا الخط الخلوي HepG2 بمستخلصات نباتات *C. orientalis* و *C. speciosum* و *P. kesiya* و *A. tatarinowii* يؤدي إلى تكثيف الكروماتين وتكون اجسام الموت الخلوي المبرمج، مما يدل على المراحل المختلفة للموت الخلوي المبرمج. كما أشار (Kabeer *et al.*, 2012) أن خلايا الخط الخلوي السرطاني T47D عند معاملة مع مستخلص نبات *Elephantopus scaber* أظهرت تكثيف الكروماتين وتجزئة المادة النووية فيها. وعند معاملة خلايا الخط الخلوي السرطاني MCF-7 بالمستخلص الميثانولي للأوراق الخضراء لنبات *Leucobryum bowringi* فإنه يؤدي إلى تكثيف الكروماتين بشكل كبير وتحطم تركيب المحتوى النووي (Manoj *et al.*, 2012). و أيضا أوضح (yang *et al.*, 2013) بان حامض البتولونيك Betulonic acid المعزول من جذور نبات *Toona sinensis* يظهر فعالية حث الموت الخلوي المبرمج في خلايا الخط الخلوي السرطاني MGC-803 و PC3. وبينت دراسة (Kardong *et al.*, 2013) بأن المستخلص الايثانولي لأوراق نبات *Sarchoclamys pulcherrima* يزيد من عدد الخلايا المتضررة مع زيادة جرعة المستخلص لخلايا الخط الخلوي DLA. وأظهرت خلايا الخطين السرطانيين MCF-7 و SKOV-3 تكثيف عالي للكروماتين فيهما عند معاملة مع مستخلصي الهكسان والكلوروفورم لأوراق نبات *Alpiniascabra* (Reddy *et al.*, 2013). كما ذكر (Shen *et al.*, 2014) بأن معاملة خلايا الخط السرطاني PC3 بمستخلص الميثانول لنبات *Garcinia bracteata* فإنه يحفز الموت الخلوي المبرمج للخلايا السرطانية.

إنّ جميع هذه الدراسات تؤكد تأثير المستخلصات النباتية على حث عملية الموت الخلوي المبرمج للخلايا السرطانية من خلال تأثيرها على العديد من المؤشرات الخلوية والتي تم الكشف عن البعض منها في الدراسة الحالية، وتتفق نتائج هذه الدراسات مع ما وصلت اليه الدراسة الحالية بأنّ للمستخلص القلويدي لثمار نبات السبج تأثيراً واضحاً على حث الخلايا السرطانية للخط السرطاني HepG2 للدخول في عملية الموت الخلوي المبرمج.

الاستنتاجات

- 1- قدرة المستخلص الكحولي والقلوي لثمار نبات السبجج على إيقاف الانقسام في الخلايا للمفاوية لدم الانسان ، و عدم قدرته على استخدامه كعامل مشطر للخلايا .
- 2- يمتلك المستخلص الكحولي والقلوي لثمار نبات السبجج تأثيراً مثبطاً للخطوط السرطانية المستعملة في الدراسة (HepG2 و SKGT2) وكان التأثير اكبر على الخط (HepG2) فيما يخص الخط الخلوي الطبيعي فكانت تأثير المستخلصات على الخط (WRL68) قليلة و لكافة التراكيز المستخدمة باستخدام اختبار MTT.
- 3- وجد ان المستخلص القلوي لثمار نبات السبجج يمتلك تأثيراً واضحاً على المؤشرات الخلوية المتعددة لخلايا الخط السرطاني HepG2 من خلال زيادة في نفاذية الاغشية للمايتوكوندريا و كذلك زيادة في مستوى تحرر السايتركروم وزيادة في الكثافة النووية.

التوصيات

1. عزل و تنقية القلويدات الموجودة في النبات باستخدام تقنية HPLC او GC-Mas.
2. معرفة تأثير كل مادة فعالة في نبات السبجح في نمو خطوط الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي لتحديد الكفاءة التثبيطية لهذه المركبات ، كذلك اجراء دراسة لمعرفة تأثير مكونات مستخلصات السبجح في الحيوانات المختبرية *In vivo* و دورها في علاج السرطان .
3. دراسة تأثير هذه المستخلصات على الخلايا لبيان تأثيرها في الطرز الكروموسومية.
4. اجراء دراسة على المستوى الجزيئي لتحديد الآلية التي تعمل بها المستخلصات في تثبيط الخلايا السرطانية .
5. استخدام اختبارات سمية خلوية اخرى كالموت الخلوي و معرفة مدى تأثيرها في الخلايا السرطانية.
6. العلاج بالمستخلصات للنبات على فئران حاملة لانواع من الاورام.
7. دراسة تأثير هذه المستخلصات على الجهاز المناعي والتي تساهم في تحسين وتطوير الاستجابة المناعية والتي تزيد من مقاومة الجسم للسرطان.

المصادر

المصادر العربية

- ❖ الأَعْظَمِي، مُحَمَّدُ عَبْدِ الْوَهَّابِ وَالْعَوَادِي، بَرَاءُ قَاسِمٍ وَعَبْدُ الْعَبَّاسِ، عَلِيُّ عَبْدِ الْكَاسِمِ (2012). دَرَاةُ التَّأَثْرِ السَّمِيِّ الْوَرَاثِيِّ لَصِبْغَةِ Hoechst 33258 فِي الْخَلَايَا اللَّمْفَاوِيَّةِ لِلْإِنْسَانِ (خَارِجُ الْجِسْمِ الْحَيِّ)، الْمَجَلَّةُ الْعِرَاقِيَّةُ لِلتَّقَانَاتِ الْحَيَاتِيَّةِ، 11(2): 209-218
- ❖ الْجَبُورِي، لِقَاءُ حَسُونِ صَكْبَانَ (2006). دَرَاةُ تَأَثْرِ الْمَسْتَخْلَصَاتِ الْخَامِ لِنَبَاتِ عَيْنِ الْبَزُونِ *Vinca rosea* فِي نَمُو بَعْضِ خُطُوطِ الْخَلَايَا السَّرْطَانِيَّةِ وَالطَّبِيعِيَّةِ لِبَعْضِ اللَّبَائِنِ خَارِجِ الْجِسْمِ. رِسَالَةٌ مَاجِسْتِير، كَلِيَّةُ التَّرْبِيَّةِ - جَامِعَةُ كَرْبَلَاءِ.
- ❖ الْجَبُورِي، خَلِيلُ حَسَنٍ وَالغَزِي، بِاسْمِ جَارِ اللَّهِ وَيَاسِينَ، نَاهِي يُوْسُفَ (2014). تَأَثِيرُ حَلِيبِ التِّينِ عَلَى خُطُوطِ الْخَلَايَا السَّرْطَانِيَّةِ فِي الْمَخْتَبَرِ وَفِي الْجِسْمِ الْحَيِّ بِالْفَتْرَانِ، الْمَجَلَّةُ الْعِرَاقِيَّةُ لِلسَّرْطَانِ وَالْوَرَاثَةِ الطَّبِيعِيَّةِ، مَجَلد 7. عَدَد 2. الصَّفَحَات: 181 - 187.
- ❖ الرَّبِيعِي، إِبْرَاهِيمَ هَادِي. (2009). دَرَاةُ تَأَثْرِ الْمَسْتَخْلَصِينَ الْمَائِي وَالْقَلْوَيْدِي الْخَامِ لِنَبَاتِ الْمَدِيدِ *Convolvulus arvensis* فِي تَنْبِيْطِ نَمُو بَعْضِ الْخُطُوطِ السَّرْطَانِيَّةِ فِي الزَّجَاجِ وَالْحَيِّ. كَلِيَّةُ الْعُلُومِ لِلنَّبَاتِ - جَامِعَةُ بَغْدَادِ.
- ❖ السَّعْدِي، نَمَارِقُ هَادِي مَنصُورَ (2008). تَأَثِيرُ الْمَسْتَخْلَصِ الْقَلْوَيْدِي الْخَامِ لِأَوْرَاقِ نَبَاتِ الْمَدِيدِ *Convolvulus arvensis* فِي الْإِنْقِسَامِ الْخَلْوِيِّ. رِسَالَةٌ مَاجِسْتِير، كَلِيَّةُ الْعُلُومِ لِلنَّبَاتِ - جَامِعَةُ بَغْدَادِ.
- ❖ الشَّامِي، سَامِي أَعَا. (1982). دَرَاةُ بَعْضِ الصَّفَاتِ الْوَرَاثِيَّةِ وَالسَّمِيَّةِ لِأَزْهَارِ الْقَيْصُومِ. رِسَالَةٌ مَاجِسْتِير، كَلِيَّةُ الطَّبِّ الْبَيْطَرِيِّ - جَامِعَةُ بَغْدَادِ.
- ❖ الشَّحَات، نَصْرُ أَبُو زَيْدِ [1986]. النَّبَاتَاتُ الطَّبِيعِيَّةُ وَالْأَعْشَابُ الطَّبِيعِيَّةُ، دَارُ الْبَحَارِ، بَيْرُوتِ.
- ❖ أَلْشَّمَاعِ، عَلِيُّ عَبْدِ الْحَسَنِ. (1989). الْعَقَاقِيرُ وَكِيمِيَاءُ النَّبَاتَاتِ الطَّبِيعِيَّةِ، دَارُ الْكُتُبِ لِلطَّبَاعَةِ وَالنَّشْرِ، الْمَوْصِلِ، جُمْهُورِيَّةُ الْعِرَاقِ. ص: 33-74.

- ❖ الشيباني، رغد ضياء عبد الجليل (2006). تأثير مستخلصات نبات الدفلة *Nerium oleander* الخام والنقية في الخلايا الطبيعية وخطوط الخلايا السرطانية النامية في المختبر وفي الحيوانات المختبرية. اطروحة دكتوراه ، كلية العلوم - الجامعة المستنصرية.
- ❖ العجيلي، هدى سلمان نصيف (2012). تقييم بعض الاستجابة المناعية والتأثير المضاد للأورام باستخدام بكتريا العصيات اللبنية الحامضية كمعزز حيوي، رسالة ماجستير، جامعة بغداد، معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الإحيائية للدراسات العليا.
- ❖ الكاتب ، يوسف منصور (2000). تصنيف النباتات البذرية . الطبعة الثانية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل. ص590.
- ❖ النعيمي، آمنة موفق وياسين، ناهي يوسف والعزاوي، بدر محمد (2013). تأثير المستخلصات الخام لجمار النخيل صنف زهدي *Phoenix datylifera Cultivar*. Zahdi على نمو الخطوط الخلوية السرطانية، المجلة العراقية للسرطان والوراثة الطبية، مجلد 6. عدد 2. الصفحات: 159 - 164.
- ❖ سلمان، اسراء صكر وحسن، انتصار عبد الله وجاسم، نور نعيم (2014). تأثير المستخلص المائي للأجزاء الخضرية لنبات البربين *Portulaca oleracea* في بعض الخطوط الخلوية السرطانية والطبيعية، مجلة جامعة النهريين، كلية العلوم، المجلد 17 العدد(3)، ص 34-40.
- ❖ عبد الرضا، ولاء (2012). التأثيرات السمية الخلوية للزيت المستخلص على بعض الخطوط الخلوية السرطانية و *Citrus limon* من قشور ثمرة. الطبيعية (في الزجاج). رسالة ماجستير. كلية العلوم للنبات. جامعة بغداد.
- ❖ علي، أمال محمد واحمد، أسماء عامر وحسن، أيمن علي وجعفر، نور ثائر وعلي، زيد عبد المنعم (2014). التأثير السمي للمستخلص المائي الخام لنبات القيصوم في بعض الخلايا السرطانية. المجلة العراقية للسرطان والوراثة الطبية، مجلد 7. عدد 1. الصفحات: 86 - 91.

- ❖ هيكل، محمد السيد و عمر، عبد الله عبد الرزاق (1993). النباتات الطبية والعطرية، الطبعة الثانية، منشأة المعارف بالإسكندرية.
- ❖ يوسف، رباب عبد الرضا (2012). تأثير مستخلصات الخام لثمار البمير *Cordia myxa* L. على نمو الخطوط الخلوية السرطانية والطبيعية. رسالة ماجستير. كلية العلوم للبنات-جامعة بغداد.

المصادر الاجنبية

- ❖ Abbas,A.K. and Lichtman,A.H.(2003).Cellular and Molecular Immunology DNA Illustrations. Inc.,SanfranciscoCalifornia(5th ed.).
- ❖ Abbas,K.A. Lichtman, A.H. and Pilliai, S.(2008).Cellular and Molecular Immunology. Sixth Edition. Elsevier, India.
- ❖ Adams, J.M. (2003). Ways of dying: Multiple pathways to apoptosis. *Genes & Dev*, 17: 2481–2495.
- ❖ Aggarwal, B. and Shishodia, S. (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem. Pharmacol.*, 71:1397–1421 .
- ❖ Ahmad, M. Khan, M. Arshad, M. and Zafar, M.(2011). Ethnophytotherapical approaches for the treatment of Diabetes by the local inhabitants of District Attock. *Pak. J. Bot.*, 43: 141–150.
- ❖ Ahmed, M. A. Srinivasa, R. and Ibrahim, M.(2012).Phytochemical study and antioxidant activity of *Melia azedarach* linnleaves by DPPH scvening assy. *International Journal of Pharmaceutical Applications*, 3(1): 271–276.

- ❖ Akihisa, T. Xin, P. Yasuhiro, N. and Takashi, K. (2013). Limonoids from the fruits of *Melia azedarach* and their cytotoxic activities. *Phytochemistry*, 89: 59–70
- ❖ Alberts, B. Johnson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts and Walter, P. (2008). "Chapter 18 Apoptosis: Programmed Cell Death Eliminates Unwanted Cells". [*Molecular Biology of the Cell \(textbook\)*](#) (5th ed.). [*Garland Sci.*](#)
- ❖ Al-Maisry, M. (1999). Effect of oil and alcoholic extract of *Azdirachta indica* on some pathogenic fungi of plant, M.SC. Thesis, Science College, Al-Mustansria University.
- ❖ Andersen, B. DeRubeis, R. Berman, B. (2014). Screening, assessment, and care of anxiety and depressive symptoms in adults with cancer: an American Society of Clinical Oncology guideline adaptation. *J Clin Oncol.*, 32: 1605–1611.
- ❖ Anderson, A. (2011). Angiogenesis and cancer. special project angiogenesis. [html://www.rndsyste.ms.com](http://www.rndsyste.ms.com)
- ❖ Arshad, N. Neubauer, C. Hasnain, S. and Hess, M. (2008). *Peganum harmala* can minimize *Escherichia coli* infection in poultry, but long-term feeding may induce side effects. *Poultry Science*, 87:240–249.
- ❖ Atherder, L.M. (1969). *Bentler and drivers textbook of pharmaceutical chemistry*, Oxford. Univ., Press, London.
- ❖ Azaizeh, H.; Saad, B.; Khalil, K. and Said, O. (2006). The state of the art of traditional arab herbal medicine in the eastern region of the mediterranean: A review. *eCAM*, 3:229–235.

- ❖ Bailey and Loves. (2010). Short practice of surgery, ed. Russel, R.C.G.; Normans S. Williams and Christopher, J.K. 24 rd Edition. New York.
- ❖ Bartek, J. and Lukas, J. (2007). DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol.*, 19, 238–245.
- ❖ Batcher, M.S.(2008). Element of steward ship abstract for Melia azedarach, The nature conservancy . Viewed 22 February, 2008. <http://tncweeds.ucdavis.edu/esadocs/documnts/meliaze.pdf>
- ❖ Becvarova,D. Skorpirova,J. Janisth,R. and Novy,J. (2006). Avenca alkaloid effect on microtubulues of Hela cell. *scripta medica (Brno)*79(1):19–34.
- ❖ Beer, T.M.; Armstrong, A.J.; Rathkopf, D.E.and et al.(2014).Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. *N Engl J Med.*;371: 424–433.
- ❖ Boissel, N.and Sender, L.(2015).Best practices in adolescent and young adult patients with acute lymphoblastic leukemia: A focus on asparaginase. *J Adolesc Young Adult Oncol*,4: 118–128.
- ❖ Bonjean, K. Depanw Gillet, M.C. DeFresne, M.P. Colson, P. Houssier, C. Quetinledercq, J. Tits, M. and Angelot, L.(1998).The DNA intercalating alkaloid cryptolepine interferes with topoisomerase II and inhibit primarily DNA synthesis in B16 melanoma cells, *Biochem.*, 37: 5136–5146.
- ❖ Bower, J.E. (2014).Cancer-related fatigue – mechanisms, risk factors, and treatments. *Nat Rev Clin Oncol.*,11: 597–609.

- ❖ Burger, J.A.; Tedeschi, A.; Barr, P.M. and et al. (2015). Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.*, 373: 2425–2437.
- ❖ Calabrese, E.J. and Baldwin, L.A. (2003). Hormesis: The dose–response revolution. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 143:175–197
- ❖ Cannell, R.J. (1998). Natural product isolation, Humana Press, New Jersey, U.K.
- ❖ Chanda, S. and Nagani, K. (2013). In vitro and in vivo Methods for Anticancer Activity Evaluation and Some Indian Medicinal Plants Possessing Anticancer Properties: An Overview. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2 (2) : 140–152.
- ❖ Chapman, P. B. (2002). Vaccinating patients with autologous tumor. *Journal of Clinical Oncology*, 20 (20): 4139– 4140.
- ❖ Chitra, T. Jayashree, S. and Rathinamala, J. (2014). Evaluation of anticancer activity of *Vetiveria zizanioides* against human breast cancer cell line, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*, 6: 164 – 166.
- ❖ Correia, J. J. and Lobert, S. (2001). Physicochemical aspects of turbin–interacting antimitotic drugs, *Curr. Pharma. Design*, 7: 1213–1228.
- ❖ Cory, S. and Adams, J.M. (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life–or–death switch." *Nat. Rev. Cancer.*, 2: 647–656.
- ❖ Cruickshank, R. Duguid, T.P. Marmion, B.P. and Swain R.H. (1996). *Medical Microbiology*. 12th ed. (2) Churchill Livingstone Edinburgh London. New York.
- ❖ Danial, N.N. and Korsmeyer, S.J. (2004). Cell death: Critical control points. *Cell.*, 1(16): 205–219.

- ❖ Demark, W. Rogers, L. and Alfano, C. (2015). Practical clinical interventions for diet, physical activity, and weight control in cancer survivors. *CA Cancer J Clin.*, 65: 167–189.
- ❖ Dhanamani, M. Lakshmi, S. and kannan, A. (2011). Ethnomedicinal plants for cancer therapy .a review, *hygeia journal for drugs and medicines*, 3: 1–10.
- ❖ Dharani, B. (2014). In Vitro Apoptotic And Anticancer Effects Of Prosopis Cineraria Leaves In Breast Cancer. (D.M), India Avinashilingam University For Women.
- ❖ Duflos, A. Krucznski, A. and Barret, J.M. (2002). Novel aspects of natural and modified vinca alkaloid, *Curr. Med. Chem. Anticanc. Agents*, 2: 55–70.
- ❖ Dumont, P. Ingrassia, L. Rouzeau, S. Ribaucour, F. Thomas, S. Roland, I. Darro, F. Lefrancy, F. and Kissy, R. (2007). The Amaryllidaceae Isocarbostryril Narciclasine Induces Apoptosis By Activation of the Death Receptor in Cancer Cells But Not in Normal Fibroblasts 1. *Neoplasia*, 9(9): 766 – 776.
- ❖ Eba Adou. (2005). Isolation and characterization of Bioactive from suriname and madagascar flora .II. A synthetic Approach to lucilactaene. Doctor of philosophy in chemistry, Virginia university Evans, W.C. (1999). Trease and Evan's pharmacognosy, 14th ed., W.B. Saunders Company Ltd. U.K.
- ❖ Elisha, S. Michal, L. and Sarah, S. (2014). Evaluating Medicinal Plants for Anticancer Activity. *The Scientifi World Journal*, 5: 1–12.
- ❖ Elkholi, R. Thibaud, R. Madhavika, S. and Jerry, C. (2014). Putting the pieces together: How is the mitochondrial pathway of

- apoptosis regulated in cancer and chemotherapy. *Cancer & Metabolism.*, 2:16–26.
- ❖ Fisher, J. P. Mikos, A. G. and Bronzio, J. D. (2007). Tissue Engineering. New York. CRC press. pp:8–14.
 - ❖ Freshney, R. (2012). Culture of Animal Cell. Sixth Edition. Wiley-Liss, New York.
 - ❖ Gutheil, W.G. Reed, G. Ray, A. Dhar, A. and Crocetin, A. (2011). an Agent Derived from Saffron for Prevention and Therapy for Cancer. *Curr Pharm Biotechnol.*
 - ❖ Guy, G.P. Yabroff, K.R. Ekwueme, D.U. (2015). Healthcare Expenditure Burden Among Non-elderly Cancer Survivors. *Am J Prev Med*, 49: 489–497.
 - ❖ Hamel, E. (1992). Natural products which interact with tubulin in the vinca domain: maytansine, rhizoxin, phomopsin A, dolastatins 10 and 15 halichondrin B, *Pharmacol. Ther*, 55: 31–51.
 - ❖ Hanna, N.H. and Einhorn, L.H. (2014). Testicular cancer discoveries and updates. *N Engl J Med*, 5: 365–371.
 - ❖ Harborn, J. B. (1984). Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis 2ed ed. Chapman and Hall, New York.
 - ❖ Hastie, S.B. (1991). Interactions of Colchicine with tubulin, *pharmacol; Ther*, 512: 377–401.
 - ❖ Hershman, D.L. Lacchetti, C. and Dworkin, R.H. (2014). Prevention and management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in survivors of adult cancers: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol*, 32: 1941–1967.

- ❖ Himes, R.H. (1991). *Pharmacol. Ther.*, 51: 257–267 cyted in Zhou, J. and Giannakakou, P. (2005). Targeting microtubules for cancer chemotherapy, *Curr. Med. Chem. –Anticanc. Agents*, 5: 65–71.
- ❖ Ihrke, G. Neufeld, E. and Meads, T.(1993).WIF–B cells: an in vitro model for studies of hepatocyte polarity. *J. Cell Biol*, 123(6): 1761–1775.
- ❖ Jafari,S.Soodabeh, S.Homa, H.Mohammad, R. S. Mohammad, A. F. Abbas, H. and Mahnaz, K.(2013). Cytotoxic evaluation of *Melia azedarach* in comparison with,*Azadirachta indica* and its phytochemical investigation . *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(1): 21–37.
- ❖ Jaffer, H. J. Mohmod, M.J. Jawad, A.M. Naj, A. and Alnaib, A. (1983). Phytochemical and biological screening of some Iraqi plant, *Fitoterapia Lix* 299.
- ❖ Javid, A. and Rehman, H. (2011).Antifungal activity of leaf extracts of some medicinal trees against *Macrophomina phaseolina*. *J. Med. Plants Res*, 5(13): 2868–2872.
- ❖ Jimenez– Barbero, J. Amal–Guerra, F. and Snyder, J.P. (2002). The Solid state. Solution and tubulin–bound conformations of agents that promote microtubule stabilization, *Curr–Med. Chem. Anti–Canc. Agents*, 2: 91–122.
- ❖ Jordan, M.A. (2002). Mechanism of action of anti tumor drugs that interact with microtubules and tubulin, *Curr. Med. Chem. Anti–Canc. Agents*, 2: 1–17.
- ❖ Jordan, M.A. and Wilson, L. (2004). Microtubules as target for anticancer drugs, *Nature Reviews*, 4: 253–266.

- ❖ Jordon, M.A. Margolis, R.L. Himes, R.H. Wison, L. (1986). J. Mol-Biol., 187, 61–73 cited in Zhou, J. and Giannakakou, P. (2005). Targeting microtubules for cancer chemotherapy; *Curr. Med. Chem.–Anti Cancer agents*, 5: 65–71.
- ❖ Joyce, N. Samundeeswari, A. and Deepa, P.(2011). Natural plant resources in anti-cancer therapy.A review Research in Plant. *Biology.*, 1(3): 1–14.
- ❖ Juste, C. (2005) Dietary fatty acids, intestinal microbiota and cancer. *Bull. Cancer.*, 92:708.
- ❖ Kabeer A. Sreedevi B. Nair S. Rajalekshmi N. Gopalakrishnan P. and Prathapan R., (2012). Isoleoxyelephantopin, a sesquiterpene lactone, from *Elephantopus scaber* induces cell cycle arrest and apoptosis in tumor cells, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 9: 1 – 6.
- ❖ Kardong D. Verma A. Upadhyaya S. and Borah, D.(2013). Phytochemical and cytotoxic properties of wild *Sarchoclamys pulcherrima* Goud from Assam, North Eastern India, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*, 5: 394 – 397.
- ❖ Khan, A.V. Ahmed, Q.U. Mir, M.R. Shukla, I.and Ali, A.K. (2011). Antibacterial efficacy of the seed extracts of *Melia azedarach* against some hospital isolated human pathogenic bacterial strains. *Asian P.J. Trop. Bio*, 452–455.
- ❖ Kidd, P.M. (2000). "The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment" . *Altern Med. Rev.*, 5: 4–27.
- ❖ Kikuchi,T. Xin, P. Koichi, I. Yasuhiro, N. and Toshihiro, A. (2013). Cytotoxic and Apoptosis-Inducing Activities of 12-O-

Acetylated zedarachin B from the Fruits of *Melia azedarach* in Human Cancer Cell Lines. *Biol. Pharm. Bull*, 36(1) 135–139.

- ❖ Kim, H.W. and Kang, S.C. (2012). The Toxicity and Anti-cancer Activity of the Hexane Layer of *Melia azedarach* L. var. *japonica* Makinos Bark Extract. *Official journal of Korean Society of Toxicology*, 28(1) :57–65.
- ❖ King, M. Wild, D. Gocke, E. and Eckhardt, K. (1982). 5-Bromo deoxy uridine tablets with improved depot effect for analysis In vivo of SCE, in bone marrow and spermatogonial cells. *Mut. Res.*, 97: 7–9.
- ❖ Kruper, L. Kauffmann, R. Smith, D. and Nelson, R. (2014). Survival analysis of contralateral prophylactic mastectomy: a question of selection bias. *Ann Surg Oncol.*, 21: 3448–3456.
- ❖ Kumara, B. Abbas, A.K. and Fausto, N. (2005). Robbin's pathology basis of diseases. 7th. Ed., Elsevier Saunders, USA, P:26.
- ❖ Kummerow, K.L. Du, L. Penson, D.F. Shyr, Y. and Hooks, M.A. (2015). Nationwide trends in mastectomy for early-stage breast cancer. *JAMA Surg.*, 150: 9–16.
- ❖ Landen, J.W. Lang, R. McMahon, S.J. Rusan, N.M. Yvon, A.M. Adams, A.W. Sorcinelli, M.D. Campbell, R. Armstrong, C.A. and Joshi, H.C. (2002). Noscapine alter microtubule dynamic in living cell and inhibits the progression of melanoma. *Cancer Research*. 62: 4109–4114.
- ❖ Lester, N.H. Lee, J.M. Gogineni, K. Hwang, W.T. Schwartz, J.S. and Prosnitz, R.G. (2015). Benefits and risks of contralateral prophylactic mastectomy in women undergoing treatment for sporadic

- unilateral breast cancer: a decision analysis. *Breast Cancer Res Treat.*,152: 217–226.
- ❖ Liu, R.H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J. Nutr.*, 134:3479S–3485S .
 - ❖ Looi, C. Y. Bushra, M. Mohammad,j. P. Yi, L. W. Won, F. W. and Mohd, R. M. (2013). Induction of apoptosis in melanoma A375 cells by a chloroform fraction of *Centratherum anthelminticum* (L.) seeds involves NF–kappaB, p53 and Bcl–2–controlled mitochondrial signaling pathways. *BMC Complementary and Alternative Medicine.*, 13:166. (A375 and MTT assay)
 - ❖ Machana, S. Weerapreeyakul, N. Baruusrux, S. Nonpunya, A. Sripanidkulchai, B. and Thitimetharoch, T. (2011). Cytotoxic and apoptotic effects of six herbal plants against the human hepatocarcinoma (HepG2) cell line, *Chin. Med.*, 6(10):6–39.
 - ❖ Madari, H. Panda, D. Wilson, L. and Jacobs, R.S.(2003). Dicoumarol : a unique microtubule stabilizing natural product that is synergistic with taxol, *Biochemistry and Biophysics.*, 63: 1214–1220
 - ❖ Mak, R.H. Hunt, D. Shipley, W.U. (2014). Long–term outcomes in patients with muscle–invasive bladder cancer after selective bladder–preserving combined–modality therapy: a pooled analysis of Radiation Therapy Oncology Group protocols. *J Clin Oncol*,32: 3801–3809.
 - ❖ Makkar, P. Siddhuraju, P. and Becker K. (2007). *Plant Secondary Metabolites*, Humana Press, Totowa, NJ, USA,.
 - ❖ Maldosievicova, B.(2011). *Pathophysiology of malignant disease*. Pp:647–650.

- ❖ Manoj, G. Kumar, S. Varghese, S. and Murugan, K. (2012) Effect of methanolic and water extract of *Leucobryum bowringii* Mitt. on growth, migration and invasion of MCF-7 human breast cancer cells in vitro, *Ind. J. Exp. Biol*, 50: 602 – 611.
- ❖ Mantle, D. and Wilkins, R.M. (2005). Medicinal Plants in the prevention and therapy of cancer. In: Handbook of medicinal Plants. Yaniv Z and Bachrach U. Eds., 281–318. The Haworth Press. N.Y.
- ❖ Mike, O. Soladoye, N. Amusa, O. Raji-Esan, C. and Ayanbamiji, T. (2010). Ethnobotanical Survey of Anti-Cancer Plants in Ogun State, Nigeria (PDF). *Annals of Biological Research*. 1 (4): 261–273.
- ❖ Mohammad, S. (2006). Anticancer agents from medicinal plants. *Bangladesh Pharmacological Society*, 1: 35 – 41.
- ❖ Mohd, F. Abu, B. Maryati, M. Asmah, R. Steven, A. and Jeffrey, R. (2010). Cytotoxicity and polyphenol diversity in selected parts of *Mangifera pajang* and *Artocarpus odoratissimus* fruits, *Mal., J. Food Sci*, 6634–6659.
- ❖ Moteki, H. Hibasmai, H. Yamada, K.H. Imai, K. and Komija, T. (2002). Specific of apoptosis 1,8-cineole in two human leukemia cell line but not in human stomach cancer cell lines. *Oncology. Reports*, 9:757–760.
- ❖ Mukherjee, A. Sourar, B. Nabainta, S. and Anil, C. (2001). Advance in cancer therapy with plant based natural product. *current medicinal chem*. 1467–1486.
- ❖ Mukherjee, A and Patil, S.D. (2012). Effects of Alkaloid Rich Extract of *Citrullus colocynthis* Fruits on *Artemia Salina* and Human Cancerous (MCF-7 and HEPG-2) Cells. *Journal of PharmaSciTech*, 1(2): 15–19.

- ❖ Murray, D. and McEwan, A. J. (2007). Radiobiology of systemic radiation therapy. Department of oncology, division of experimental oncology, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada, 22(1): 1–23.
- ❖ Nagle, A. Hur, W. and Gray, N. (2006). Antimitotic agents of natural origin. 7(22): N 3, pp:30–326.
- ❖ Nikoletta, G. Filippo, C. Carlos, A. Laura, E. (2010). Cytotoxic Tirucallane Triterpenoids from *Melia azedarach* Fruits. *Molecules.*, 15: 5866–5877.
- ❖ Nogales, E. Wolf, S.G. Khan, I.A. Luduena, R.F. and Dowing, K.A. (1995). Structure of tubulin at 6.5°A and location of the taxol-binding site, *Nature*, 375: 424–427.
- ❖ Ntalli, N. Filippo, C. Carlos, A. Laura, E. Marco, L. Simona, V. and Pierluigi, C. (2010). Cytotoxic Tirucallane Triterpenoids from *Melia azedarach* Fruits. *Molecules.*, 15: 5866–5877.
- ❖ Ogrady, T.J. Gates, M.A. and Boscoe, F.P. (2015). Thyroid cancer incidence attributable to overdiagnosis in the United States 1981–2011. *Int J Cancer.*, 137: 2664–2673.
- ❖ Om, P. Amit, K. and Ajeet, A. (2013). Anticancer Potential of Plants and Natural Products: A Review. *American Journal of Pharmacological Sciences*, 1 (6): 104–115.
- ❖ Pourahmad, H. Osseini, M. Eskandari, M. and Rahmani, F. (2012). Involvement of four different intracellular sites in Chloroacetaldehyde induced oxidative stress and Cytotoxicity. *Iranian J. Pharma. Res.*, 1:265–276.

- ❖ Rajandeeep, K. Karan, K. and Harpreet, K. (2011). Plants as a source of anticancer agents. *Scholars Research Library*, 1: 119 – 124.
- ❖ Ramasamy S. Abdul Wahab, N. Zainal Abidin, N. Manickam, S. and Zakaria, Z. (2012). Growth inhibition of human gynecologic and colon cancer cells by *Phyllanthus watsonii* through apoptosis induction. *Plos One.*, 7: 34793–34799.
- ❖ Reddy, S. Malek, A. and Sim, K. (2013). Cytotoxic effect of *Alpinia scabra* (Blume) Naves extracts on human breast and ovarian cancer cells, *BMC Complem. Altern. Med.*, 13:314 – 334.
- ❖ Rupa, B. Azam, N. Abdul Mannan, A, N. and Hasan, N. (2014). Phytochemistry and Pharmacological Appraisals of Persian Lilac (*Melia azedarach* Linn.). A Quick Comprehensive Review. *American Journal of Ethnomedicine*, 1(3): 152–163
- ❖ Sang, S. Cheng, X. Stark, R. Rosen, T. Yang, C. and Ho, T. (2002). Chemical studies on antioxidant mechanism of tea catechins: analysis of radical reaction products of catechin and epicatechin with 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Bioorg. Med. Chem.*, 10: 2233–2237.
- ❖ Schmid, D. Ricci, C. Behrens, G. and Leitzmann, M. (2015). Adiposity and risk of thyroid cancer: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev.*, 16: 1042–1054.
- ❖ Schrupp, D.S. Matthews, W. Chen, G.A. Mixon, A. and Altorki, N.K. (1998). Flavopiridol mediates cell cycle arrest and apoptosis in esophageal cancer cells. *Clinical Cancer Rese.*, 4: 2885–2890

- ❖ Sen, A. Batra, A. and Rao, D.V. (2010). Pivotal role of plant growth regulators in clonal propagation of *Melia azedarach* L. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*,5(2): 43–49.
- ❖ Serrano, M. and Blasco, M. A. (2007). Cancer and aging: convergent and divergent mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 8:715–722.
- ❖ Sharma, A.K. and Sharma, A. (1980). Chromosome techniques theory and practice; 3rd ed., Butter Worth's Company, London, Boston.
- ❖ Sharma, D. and Paul, Y.(2013).Preliminary and Pharmacological Profile of *Melia azedarach* L.: An Overview. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3 (12):133–138.
- ❖ Shen, T. Li ,W. Wang, Y. Zhong, Q. Wang, S. Wang, X. Ren, D. and Lou, H. (2014). Antiproliferative activities of *Garcinia bracteata* extract and its active ingredient, isobractatin, against human tumor cell lines, *Arch. Pharm. Res.*, 37:412 – 420.
- ❖ Sisi,W.Hongyong,Z.Liang,C.and Chong,X.(2010).Analysis of the Cytotoxic Activity of the Carboplatin and Gemcitabine Combination. *Anticancer Res.*, 30(11): 4573–4578.
- ❖ Skeel, R.T. (1999). Handbook of chemotherapy, 5th ed., Lippincott, Williams and Wilkins, Baltimore.
- ❖ Skolarus, T.A. Wolf, A.M. and Erb, N.L. (2014).American Cancer Society prostate cancer survivorship care guidelines. *CA Cancer J Clin*, 64: 225– 249.
- ❖ Souza, V. Bucio, L. and Gutiérrez–Ruiz, M.C. (1997). Cadmium uptake by a human hepatic cell line (WRL–68 cells). *Toxicol*,120(3): 215–220.

- ❖ Sreejaya, S.B. and Santhy, K.S.(2013). Cytotoxic Properties Of Acorus Calamus in MCF -7 Breast Cancer Cells. *International Journal Of Current Research And Academic Review*,1(1):106-111.
- ❖ Stankovic, M.S. Curcic, M.G. Zizic, J.B. Topuzovic, M.D. Solujic, S.R. and Markovic, S.D. (2011). Teucrium plant species as natural sources of novel anticancer compounds: antiproliferative, proapoptotic and antioxidant properties, *Int. J. Mol. Sci*, 12:4190 - 4205.
- ❖ Stanton, A.L. Rowland, J.H.and Ganz, P.A.(2015).Life after diagnosis and treatment of cancer in adulthood: contributions from psychosocial oncology research. *Am Psychol*,70: 159-174.
- ❖ Stone, R.M.(2002). The Difficult Problem of Acute Myeloid Leukemia in the older Adult. *Cancer J.clin*, 52:363-371.
- ❖ Sultana, S. Hafiz, m.and Saif, A. (2015).Comprehensive review on ethanobotanical uses Melia azedarach . *Asian J Pharmaceut Res Health Care*, 6 (1): 26-32.
- ❖ Sumit, D. Ripunjoy, B. and Nishant, N.(2014). A Review on Immune Modulatory Effect of Some Traditional Medicinal Herbs. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 2(1): 33- 42
- ❖ Takahashi, S. Ito, Y. Hatake, K. and Sygimoto, Y.(2006). Gene therapy for breast cancer. Review of clinical gene therapy trial for breast cancer and MDRI gene therapy trial in cancer Institute Hospital. *Breast Cancer*, 13: 8-15.
- ❖ Takashi, K. Xin, P. Koichi, I. Yasuhiro, N. Eri, O.and Kazuo, K.(2013). Cytotoxic and Apoptosis-Inducing Activities of 12-O-Acetylated azedarachinB from the Fruits of *Melia azedarach* in Human

Cancer Cell Lines. *Biol. Pharm. Bull.*,36(1): 135–139.

- ❖ Taylor, D. L. (2007). High content screening. A powerful approach to systems cell biology and drug discovery. *Method Mol. Biol.*, 356–360.
- ❖ Thoppil, R. Harlev, E. Mandal, A. Nevo, E. and Bishayee, A. (2013). Antitumor activities of extracts from selected desert plants against HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. *pharmaceutical Biology.*, 51(5) :668–674.
- ❖ Tonsed, C.C. and Guest, E. (1991). Flora of Iraq, (2). Ministry of Agric., Baghdad. pp.713.
- ❖ Van, F.A. Schaapveld, M. Janus, C.P. (2014). Risk of diabetes mellitus in long-term survivors of Hodgkin lymphoma. *J Clin Oncol*, 32: 3257–3263.
- ❖ Varalakshmi, B. Anand, A.V. Karpagam, T. Bai, J.S. and Manikandan, R. (2014). In vitro antimicrobial and anticancer activity of Cinnamomum zeylanicum linn bark extracts, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*, 6:12 – 18.
- ❖ Verma, R.S. and Babu, A. (1989). Human chromosomes : Manual of Basic Techniques. Pregramon Press, New York. pp.240.
- ❖ Visovsky, C. and Workman, M. L. (2000). Cancer biology: guide to cancer care. *Lippincott Philadelphia.*, 6: 31–37.
- ❖ Wagner, H. (2005). Trends and challenges in phytomedicine: Research in the New Millennium. In: Handbook of medicinal Plants. Yaniv Z and Bachrach U. Eds., 3–28. The Haworth Press. N.Y.

- ❖ Wang,X. Zhao, F. and Fisch, M. (2014).Prevalence and characteristics of moderate to severe fatigue: a multicenter study in cancer patients and survivors. *Cancer.*,120: 425–432.
- ❖ Wayne, M.B. Lewis, J.K. Jeff, H. and Gregory, P.B.(2009).The World of the Cell.Pearson Benjamin Cummings, seventh edition, New York.
- ❖ Wong, R.S.Y.(2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, (30): 14–24.
- ❖ Yang, S. Zhao, Q. Xiang, H. Liu, M. Zhang, Q. Xue, W. Song, B. and Yang, S. (2013). Antiproliferative activity and apoptosis–inducing mechanism of constituents from *Toona sinensis* on human cancer cells. *Cancer Cell Int.*, (13): 10 1475–2867.
- ❖ Yaseen, N.Y. (1999). Tumor origin: Polyclonal or monoclonal. *The Medical Journal of Tikrit University*, 5: 167–175.
- ❖ Zhou, J. and Giannakakou, P. (2005). Targeting microtubules for cancer chemotherapy, *Curr. Med. Chem.–Anti.–Cancer Agents*, 5: 65–71.
- ❖ Zhu, H. G. 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.

SUMMARY

This study aimed to investigate the effects of the crude alkaloids extracted from *Melia azedarach* on the proliferation of two cancer cell lines HepG2, SK-GT2 and a normal cell line WRL68. Chemical components of *M.azedarach* fruits extract were investigated, it was found that this plant contains most of the chemical compounds such as Alkaloids, Saponins, Flavonoids, Resins, Steroids and Terpenes extra .

In this study we showed effect of alcoholic and alkaloids crude extract of *M.azedarach* fruits on tumor cell lines HepG2 , SK-GT2 and normal cell line WRL68 by different assays. The first assay study effect of alcoholic and alkaloid extract on lymphoid cell division in human blood that found these alcoholic and alkaloid extracts for *M.azedarach* lead to capture cell division for lymphoid cell in human blood at mitosis stage in different level, this block increased with increase the concentrations, the percentage of blocked cells in mitosis stage for alcoholic extract ranged between 0.30-2.90% for concentrations 12.5-400 $\mu\text{g/ml}$, while for alkaloid extract ranged between 0.56-3.83% for concentrations 12.5-400 $\mu\text{g/ml}$. The second assay including effect both of alcoholic and alkaloida extracts on growth of tumor cell lines HepG2, SK-GT2 and normal cell line WRL68 by MTT assay. Both extract revealed cytotoxicity on different cell line, and this effect depend on concentration and type of cells and extract. The inhibition activity for tumor cell line increas with increase concentration of extract. While found that tumor cell line type inhibition variance in both extract depending on cells differences. The lowest inhibition rate for alcoholic extract was 9.8% in concentration 12.5 $\mu\text{g/ml}$, and higher inhibition rate was 59.2% in concentration 400 $\mu\text{g/ml}$ for HepG2, while for SK-GT2 the lowest inhibition rate was 4.3% for alcoholic extract in concentration

12.5 $\mu\text{g} \setminus \text{ml}$ and higher inhibition rate was 36.3% in 400 $\mu\text{g} \setminus \text{ml}$, and for WRL68 the lowest inhibition rate was 3.07% for alcoholic extract in 12.5 $\mu\text{g} \setminus \text{ml}$ and higher inhibition rate was 28.11% in 400 $\mu\text{g} \setminus \text{ml}$. For alkaloid extract the lowest inhibition rate was 30.4% in 12.5 $\mu\text{g} \setminus \text{ml}$ and higher inhibition rate was 65% in concentration 400 $\mu\text{g} \setminus \text{ml}$ for HepG2. SK-GT2 cell line the lowest inhibition rate for alkaloid extract was 3.7% in concentration 12.5 $\mu\text{g} \setminus \text{ml}$ and higher inhibition rate was 30.8% in concentration 400 $\mu\text{g} \setminus \text{ml}$, and normal cell line WRL68 the lowest inhibition rate was 0.86% in concentration 12.5 $\mu\text{g} \setminus \text{ml}$ and higher inhibition rate was 14.8% in 400 $\mu\text{g} \setminus \text{ml}$. From results of previous experiments the alkaloid extract chosen for further study on HepG2 cell line. High content screening assay had used to study the toxicity of alkaloid extract with HepG2 cell line, by measurement the changes that occur in some cellular parameters including cell permeability, cell count, nuclear intensity, mitochondrial membrane potential and cytochrome C releasing from the cells. Results of this assay showed that alkaloid extract have certain effect on potential of membrane permeability because the damages that occur in membrane and lead to increase permeability and biological pathways of mitochondria inside the cell, and by study the changes that happened on permeability of mitochondrial membrane and measure the level of cytochrome C that liberated, in addition to nuclear intensity for cell lines in high concentration of extract 400 $\mu\text{g} \setminus \text{ml}$, while there was less effect on cells with concentrations 100-200 $\mu\text{g} \setminus \text{ml}$.



Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
Diyala University
College of Science



Effect of Alcoholic and Alkaloids Extract of *Melia azedarach* in the division of lymphocytes and Cancer Cells

A Thesis

**Submitted to the College of Science, Diyala University, in Partial
Fulfillment of Requirements for the Degree of Master of Science
in Biology**

By

Maryam Hikmat Abdullatif

Supervised By

Assist professor

Ibrahim Hadi Mohammad

Assist professor

Amer Talib Tawfiq

2017 A. D.

1438 A. H.

الفصل الأول

المقدمة

الفصل الثاني

استعراض المراجع

الفصل الثالث

المواد وظرائق

العمل

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

الاستنتاجات

و

التوصيات

المصادر