دراسه تأثير مستخلص العفص Thuja occidentalis في خطوط الخلايا السرطانية RD خارج الجسم

م.م.همسة احمد جاسم

معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية للدراسات العليا

الخلاصة

اعطت هذه الدراسة فكره جيدة عن امكانية استخدام العفص ***Thuja occidentalis*** كنبات عراقي معروف بفاعليته العلاجية ضد السرطان, نظراً لاحتوائه على الفلافينيدات Flavonoides المتضمنة زيت العفص Thujone oil والكلايكوسايدات Glycosides (المحتوي على مادة الكلايكون Aglycon) اللتان لهما القدرة على قتل خلايا سرطان العضلات البشرية RD. بينت النتائج التي تم الحصول عليها من التحليلات الاحصائية ان لمستخلص العفص Thuja occidentalis تأثير فعال على الخلايا السرطانية بحالته المائية والكحولية والفروقات معنوية على مستوى($p<0.05$) في جميع التراكيز للمستخلصين المار ذكرهما. كما وجد فرق معنوي في نسب التأثير مابين المستخلص الكحولي و المستخلص المائي على مستوى ($p<0.05$)

حيث كان تاثير المستخلص المائي اكبر مما هو عليه عند معامله الخلايا السرطانية بالمستخلص الكحولي.

هدفت الدراسه لتسليط الضوء على قدرة التأثيرات السمية للمركبات الكيمائية التي يحويها مستخلص العفص المائي والكحولي على خطوط خلايا سرطان العضلات البشرية RD.

المقدمة

منذ العصور القديمة تم استعمال العفص***Thuja occidentalis*** كنبات طبي نظراً لفوائده العديدة, التي كان من اهمها ؛معالجه امراض مختلفة تخص الانسان مثل السعال cough والطفيليات المعوية Intestinal Parasites بالاضافه الى معالجة الامراض الجلدية وازالة التقرحات (1).حيث استخدم النبات في العديد من البحوث وخاصة في امريكا واوربا (2).يحتوي العفص على زيت العفص thuja oil الذي يستخلص من اوراق واغصان هذه الشجره ويحتوي هذا الزيت على العديد من المواد الفعالة التي لها دور في عالم الدواء والعلاج ومن اهم هذه المكونات a- thujone , b-thujone , a- pinene camphene d-sabinene , fenchone , terpinene-4-01 , بالاضافة الى ماده aglycon التي تعد اهم مكونات الكلايكوسايدات Glycosides التي يعزى اليها التأثير الطبي الفعال بالاضافةا الى استخدام مكونات العفص المختلفة في الطب والصناعات الغذائية وصناعة المواد التجميلية اضافة الى صناعة بعض انواع المشروبات(3).

اشار باحثون اخرون (4,5) الى ان العلاج بالمواد الكيميائية يؤدي الى ظهور سمية خلوية Cell Toxicity واستحث بعضها تأثيرات سمية في المادة الوراثية Genotoxic , اضافة الى ظهور تأثيرات مُشوِّهة Teratogenic للخلايا الطبيعية غيرالورمية (7,6).ان هذه التأثيرات الجانبية قد حدت من استخدام العقاقير الكيمائية على الرغم من كفائتها العالية في علاج الاورام الخبيثة, واصبح البحث عن علاجات بديلة ذات فعالية في علاج السرطان من جهة وغير سامة للخلايا الطبيعية من جهة اخرى امراً بالغ الاهمية. لذا ازدادت الجهود حول استخدام النباتات الطبية لهذا الغرض(9,8)كان الهدف من هذه الدراسة هو تسليط الضوء على تأثير المستخلصات المائية والكحولية لهذا النبات (***T.occidentalis***)على خطوط الخلايا السرطانية(RD)في الزجاج.

المواد وطرق العمل

1- جمع العينات النباتية وتحضير المستخلص الخام

تم الحصول على اوراق العفص من حدائق في محافظة بغداد, وشخص النبات من قبل الاستاذ الدكتور علي الموسوي جامعه بغداد ، و تم تجفيف النباتات في درجة حراره الغرفه ضمن محيط جاف جيد التهويه, وبعد جفاف النبات تم طحنه بواسطه مطحنة كهربائية ثم حفظت العينات لحين الاستعمال.

2 - تحضير المستخلص المائي وزن 50 غراماً من مسحوق اوراق العفص ووضع في دورق زجاجي سعة 1 لتر واضيف له 350 مليلتر ماء مقطر ، ترك لمدة 24 ساعة على المازج المغناطيسي ، رشح المزيج بوساطة الشاش ثم تم

ترشيحه تحت ضغط مخلخل باستخدام قمع بخنر وجمع الرائق وركز باستخدام جهاز المبخر الدوار تحت الضغط المخلخل في درجة حرارة 45 م حتى بلغ الحجم 10 مليلتر ووضع في أنبوبة اختبار لغرض الاستخدام (10).

3 - تحضير المستخلص الكحولي

وزن 20 غراماً من مسحوق نبات العفص ووضع في دورق زجاجي سعة 1 لتر واضيف 140 مليلتر كحول اثيلي بنسبة 1 : 7 (وزن : حجم) ، ترك لمدة24 ساعة على المازج المغناطيسي ، رشح المستخلص بورق ترشيح واتمان رقم 1 في قمع بخنر مع التفريغ ، رُكز الراشح باستعمال جهاز المبخر الدوار تحت الضغط المخلخل عند درجة حرارة 40-45 م للتخلص من المذيب الكحولي إذ تم الحصول على مستخلص خام ووضع في انبوبة اختبار معقمة في الثلاجة لحين ألاستعمال(11).

4-دراسة تأثير المستخلص في نمو الخلايا السرطانية

بعد أن تم تحضير الخلايا السرطانية المزروعة في اطباق الزرع النسجي الخاصة ذات 96 حفرة لأجل المعاملة تم تحضير تخافيف المستخلص بإذابة 0.1 غرام من المستخلص بـ 0.5مليلترا من محلول Dimethyl sulfoxide وقد عد هذا المحلول محلولا قياسيا لأجل تحضير التخافيف منه لاحقاً و تم أجراء التخافيف التالية (80,40,20,10,5,2.5,1.25,0.625,0,312,0.156,0.078,0.039) (مايكروغرام/مليلتر) عن طريق تخفيف خلاصة المستخلص بالوسط الزرعي الخالي من مصل العجل البقري . بعد ان تم تحضير التخافيف استخرج الطبق الزرعي الحاوي على الخلايا السرطانية المزروعة في الحفر وقيست حيوية الخلايا وعددها باستخدام المجهر الضوئي المقلوب للتأكد من أن هذه الخلايا جاهزة للمعاملة وفي ظروف معقمة أهمل 0.1 مليليتر من الوسط الزرعي القديم ثم أضيف في كل حفرة 0.1 مليلتر من كل من التراكيز المحضرة سابقا.

تمت إعادة الخطوات السابقة لتحضير التخافيف ولكل تركيز على المذيب فقط والحاوي على Dimethyl sulfoxide المخفف بالوسط الزرعي الخالي من مصل العجل البقري وبمعدل ثلاث مكررات لكل تركيز إذ يكون لكل تركيز(سيطرة موجبة) خاصة له ، مع زراعة حفر أخرى محتوية فقط على الوسط الزرعي الخالي من مصل العجل البقري والتي تعد السيطرة السالبة . وبعد الانتهاء من معاملة الطبق الزرعي بالمادة العلاجية والمذيب ، تم تغليف السطح الخارجي بلاصق شفاف ثم ادخل إلى الحاضنة. بعد انتهاء مدة الحضن اخرجت الأطباق من الحاضنة واضيف لكل حفرة 0.1 مليلتر من صبغة البنفسج البلوري وتركت مدة 20 ثانية .غسلت الحفر بالمحلول الفسيولوجي (Phosphate Buffer Saline) عدة مرات لحين زوال الصبغة الزائدة . جففت الاطباق تماماً و قرأت النتائج باستعمال جهاز الاليزا عند طول موجي 492 نانومتر لأجل معرفة التأثير التثبيطي للعلاج على الخلايا السرطانية وبحسب طريقه (12) .

تم استعمال برنامج العمليات الاحصائي(One- Way Analysis of Variance) لبيان مدى تأثير الوقت والتراكيز على خطوط الخلايا السرطانية RD خارج الجسم InVitro.

ألنتائج و المناقشة

اظهرت دراسة تأثيرمستخلص العفص المائي على خط الخلايا السرطانية RD خلال مدة الحضن الاولى 24 ساعة تأثيرغيرمعنوي لجميع التراكيز في الوقت الذي اعطت نتائج اختبار السمية خلال فترة الحضن الثانية(48)ساعة نتيجه معنوية (0.813) عند التركيز الاول و بقي تأثير هذا المستخلص(المائي)محتفظا ً بقوة تأثيره على خط الخلايا RD لمدة 72 ساعة وبقوة عالية جدا ً (0.003)** على مستوى P<0.01 في الجدول رقم (1)

جدول(1) تأثير السمية الخلوية لمستخلص العفص المائي في خط الخلايا السرطانية بعد ثلاث مدد تعرض(24,48,72)

التراكيز المستخدمة (مايكروغرام\مللتر)	IR%		النسبة المئوية للتثبيط
	مدة تعرض4 2ساعة	مدة تعرض 48 ساعة	مدة تعرض 72 ساعة
80	± 0.023120.81367	**0.72833±0.01450	**0.57067± 0.04801
40	± 0.102270.81200	0.80033±0.04350	0.61600±0.03061
20	± 0.02542 0.75833	0.76500±0.03061	0.55800±0.05336
10	± 0.091890.72200	0.74333±0.01115	0.70733±0.06021
5	± 0.024270.79600	0.77333±0.01365	0.44400±0.11065
2.5	± 0.006660.78533	0.77733±0.05279	0.62967±0.7085
1.25	± 0.071860.81400	0.81200±0.05157	0.66733±0.04051
0.625	±0.036090.87567	0.84633±0.02228	0.66533±0.09504
0.312	± 0.059340.80633	0.71267±0.04974	0.56933±0.07978
0.156	±0.030050.85500	0.82400±0.03780	0.62067±0.06507
0.078	±0.034390.78100	0.77533±0.01498	0.77000±0.11247
0.039	±0.039960.80500	0.78033±0.05198	0.67200±0.08058

بينما كانت النتائج مهمة احصائيا ً (عالية جدا ًhighly significant)على مستوى (p<0.01) عند استخدام المستخلص الكحولي, مما دل على امتلاكه سمية خلوية عالية استطاعت ان تثبط انقسام ونمو الخلايا السرطانية RDخلال مدة الحضانة نفسها (24ساعة) حيث بلغت نسبة التثبيط(0.8) وهي قيمة معنوية جدا من الناحية الاحصائية بينما لو تظهر اي نتيجة معنوية خلال فترة الحضن الثانية 48 ساعة لوحظ ايضا ً وجود علاقة معنوية جدا ً (P<0.001)** بين المستخلص الكحولي وخط الخلايا السرطانية RD,ضمن مدة الحضانة البالغة(72)ساعة جدول رقم (2)

جدول (2) تأثير السمية الخلوية لمستخلص العفص الكحولي في خط الخلايا السرطانية بعد ثلاث مدد تعرض(24,48,72)

التراكيز المستخدمة (مايكروغرام\مللتر)	% IR		النسبة المئوية للتثبيط
	مدة تعرض 24 ساعة	مدة تعرض 48 ساعة	مدة تعرض 72 ساعة
80	**0.85067± 0.02031	0.72833 ± 0.01450	**0.56800 ± 0.03035
40	0.82800± 0.2364	0.80033± 0.04350	0.56033 ± 0.03963
20	0.8353 ± 0.01888	0.76500± 0.03061	0.35433 ± 0.08159
10	0.84400± 0.03292	0.74333 ± 0.01115	0.54200 ±0.06560
5	0.83233± 0.04188	0.77333 ±0.01365	0.60067 ± 0.01790
2.5	0.73800± 0.03851	0.77733 ± 0.05279	0.62067 ± 0.06747
1.25	0.78767± 0.01604	0.81200 ± 0.05157	0.67267 ± 0.03717
0.625	0.83167± 0.02589	0.84633 ± 0.02228	0.60267 ± 0.05698
0.312	0.83200± 0.02621	0.71267 ± 0.04974	0.58667 ± 0.04611
0.156	0.84233± 0.03275	0.82400 ± 0.03780	0.62733 ± 0.08406
0.078	0.82767± 0.03156	0.77533 ± 0.01498	0.6733 ± 0.07092
0.039	0.84767± 0.01102	0.78033 ± 0.05198	0.63167± 0.01258

إن أكثر التفسيرات قبولاً للتأثيرات السمية التي تُبديها المستخلصات النباتية تجاه الخلايا السرطانية هو قدرتها على التحفيز على الموت المبرمج للخلايا ، ومحاولتها إيقاف تكاثر تلك الخلايا إذ وجد إن كثيراً من العناصر الغذائية والأعشاب الطبية تمتلك تأثيرات سمّية في الخلايا السرطانية من خلال حثّها على الموت المبرمج (13) .

كما أوضح (14) أن تكاثر خلايا سرطان الثدي البشري (MCF-7) قد إنخفض بشكل يعتمد على التركيز ومدة التعريض عندما عوملت هذه الخلايا بمستخلص نبات عرق السوس (*Glycyrrhiza glabra*) Licorice . ووجد (15) . أن الجزء Ethyl acetate fraction من مستخلص نبات جذورالافعى السوداء (*Actaeae racemosa*) Black cohosh قد حفّز على توقف خلايا سرطان الثدي البشري (MCF-7) عند طور G1 عندما إستعمل بتركيز 30 مايكروغرام/مليلتر ، وأوقفها عند طور G2/M عندما إستُعمل بتركيز 60 مايكروغرام/مليلتر ، وهذا ما جعلهم يقترحون أن هذا الجزء من المستخلص يحوي مركبات فعّالة في إيقاف الخلايا عند طور G1 ، وهذه المركبات أقل فعالية في إيقاف الخلايا عند طور G2/M ، أي بمعنى أن فعاليتها معتمدة على التركيز المستخدم .

وقد تعزى قابلية نبات العفص (family:Cupressaceae) thuja لتثبيط الخلايا السرطانية احتواء مستخلصه المائي والكحولي على مركبات الفلافونويداتFlavonoides بغزاره بالاضافة على احتواءه على نسبة عالية من زيت العفص Thuja oil ,التي لها دور فعال في تثبيط الخلايا السرطانية(17,16). كما تحتوي هذه المستخلصات على مركبات مهمة ولها دور ضروري ومهم في معالجة الخلايا السرطانية والمتمثلة بمركبات الكلايكوسايدات المحتوية على الاكلايكون Aglycon الفعالة الذي يشكل مع زيت العفص تأثير واضح على تثبيط انقسام ونمو الخلايا السرطانية(18).

ان فهم طبيعة هذه المركبات له دور مهم في امكانية استخدامها كعلاج عن طريق استخلاص المحلول المائي والكحولي من اوراق العفص وتحليلها بأستعمال طريقة كروماتوكرافيا اللوائح الرقيقة (TLC) لغرض دراسة تأثير السمية للمستخلص بحالتيه المائية والكحولية على خطوط الخلايا السرطانية RD (19).

اكدت دراسات اخرى (20)تم تطبيقها على مجاميع سكانية في كل من اوربا وامريكا تؤيد ما توصلنا اليه من تطبيقات وتجارب مستخلص العفص الكحولي على اورام السرطان المبين في الجدول رقم(2).كما اشار (20)ايضا الى وجود علاقة متينة بين المركبات الكيمائية في الاغذية المحتوية على مركبات الكلايكوسايدات مثل فول الصويا ونسب الاصابة المنخفضة بامراض السرطان لدى هذه المجاميع البشرية.

نستنتج من مقارنة بيانات الجدولين رقم (1)ورقم (2),وجود قدرة عالية للمستخلص المائي في التأثير والتثبيط على خط خلايا السرطان RD,ضمن مدة الحضن التي مقدارها 48 ساعة.بينما تكون النتائج المسجلة ضمن مدة الحضانة التي مقدارها 24 ساعةغير مهمة من الناحية الاحصائية.

يرجع سبب هذا الاختلاف في النتائج المأخوذة من الجدولين المشار اليهما اعلاه الى اختلاف مدة الحضانة بينهما,والتي لها دور مهم في زيادة استخلاص المركبات الكيمائية مثل الفلافونات و الكلايكونات ذات الفعالية المؤثرة على خط الخلايا RD خلال المدة 48 ساعة.

,هذه العلاقة ايدها وبقوة (17)عند معالجة السرطان A375 cells بزيت العفصthuja oil الذي يعد احد المركبات الحيوية المهمة ضد التسرطن(22,21).

References:

1-اليعقوبي,كفاح جبار شاكر.دراسة تاثير م ستخلص الكحول الاثيلي والهكساني لثمار نبات الهيل(Cardamom) *Elettria cardomomu* في خطوط الخلايا السرطانية والطبيعية للدم المحيطي للانسان خارج الجسم.رسالة

ماجستير.كلية العلوم_جامعة الكوفة

3-Ferow,C.W. andJ.R.Avila.2004.Professional Handbook of complementary and Alternative,Medicines.Philadelphia,PA:Lippincott Wiliams and Wilkins.

4- الذبحاوي,احمد حميد عبود.2005 تأثير المستخلص الخام لنبات الشيح *Artemisia herba alba* في تثبيط نمو الخلايا السرطانية في المختبر وفي علاج السرطان المغروس في الفئران.رسالة دكتوراه.كلية الطب البيطري جامعة بغداد.

5-Kinghorn,A.D.;Su,B.N.:Jang,D.S.;Chang,I.C.;Lee,D.Gu;Carcach-Blanco,E.J.;Jang,D.C.;Pezzuto,J.M.2004.Natural inhibition of carcinogenesis.Planta .Med.,70:691-705.

6-Philip, P.A.(2005). Experience with docetaxel in the treatment of gastric cancer. *Semin Oncol*., 32:S24-38.

7-Karim, K.J.(2007). Antimutagenic and anticarcinogenic effects of Rhubarb (*Rheum ribes*) and Thyme (*Thymus syriacus*) crude extract in male albino mice (*Mus musculus*). Ph.D. thesis, College of Ibin-Alhaitham, University of Baghdad, Baghdad, Iraq.

8-ابي ، شلال مراد حسين .(2001). تأثير المستخلص الكحولي الخام لأوراق نبات سم الفراخ (*Withania somnifera)* Duri.في نمو الخلايا السرطانية في الزجاج وفي بعض المعايير الفسلجية في الفئران . أطروحة دكتوراه . كلية الطب البيطري - جامعة بغداد .

9- Sa`eed, O.F. (2004). The effect of green and black tea extracts on different cell lines *in vitro*. M.Sc. Thesis, College of Pharmacy, University of Mosul, Mosul, Iraq .

10- Das, A. K., Mandal, S. C., Banerjee, S. K., Sinha, S., Saha, B. P. and Pal, M. (2001), Studies on the hypoglycaemic activity of *Punica granatum* seed in streptozotocin induced diabetic rats. Phytotherapy Research, 15: 628–629. doi: 10.1002/ptr.740.

11_Nadir, M. T.; Salih, F. M.; Dhahir, A. J.; Nori, M. and Hussain, A. M. (1986) Antimicrobial activity of *Salvia* species indigenous to Iraqi. *J. Bio. S. R.*, 17: 109-117.

12- Gruenwald J.PDR for herbal Medicines.3rd ed Montvale,N J:Thomoson PDR:2004.

13-Gadek,P.A.,Alpers,D.L.,Heslewood,M.M.,and quinn,C.J.2000.Relationships within Cupressaceae *sensu lato*:a combined morphological and molecular approach Amer.J.of Botany 87:1044-1057.

14 -Sunila,E.S. and G.Kuttan(2005).Protective effect of Thuja occidentalis against radiation-induced toxicity in mice. Integrative cancer therapies. Vol 4(no 4)pp.322-328.

15- Wang,Y.,Sun,L.,Xia,C.,Ye,L. and B.Wang(2008).P38MAPK regulates caspase-3 by binding to capase-3 in nucleus of human hepatoma Bel-7402 cells during anti-fas antibody and actinomyacin D-induced apoptosis, Biomedicine and Pharmacotherapy.pp.1-8.

16- Alagelly , A . S. , Using some plant extracts as an intra canal medicaments in endodontic treated teeth . Genetic engineering and Biotechnology Institute . Baghdad Univ. , 2007 .

17- Sunila , E.S. and Kuhan , G . Protective effect of ***Thuja occidentalis*** against radiation indused toxicity in mice . Integrative cancer Therapies , Vol . 4 , PP 328 . 2005 .

18- Liu,M.J.,Yue,P.Y-K.,Wang,Z.and R.N-S.Wong(2005).Methly protodioscin induces G2 awest and apoptosis mk 562 cells with the hyperpolarization of mitochondria.Cancer Letters-Vol 1224(No2)pp:229-241.

19- Ernst,E.,Pittler,M.H.,Stevenson,C. and A.R. White.2001.The Desktop Guide to complementary and alternative Medicine.Mosby Edinburagh.UK.

20- Ravidranth,M.H.,Muthugounder.S.,Presser,N. and Viswanthan,S.2004.Anticancer therapeutic potential of soy isoflavone genistein.Adv.Exp.Med.Biol.,546:65-121.

21- Dean,P.M.(2005)Conifer pollen sensitivity in western New York:Cedar pollens. Allergy Asthma Proc.26:352-355.

22- Offergeld,R.,Gumz,E.(1992).Mitogenic activity of high molecular polysaccharides fractions isolated from the cuprssaceae Thuja occidentalis (L.)enhanced cytokine-production by thyapoly saccharide,g- fraction(TPSg).Leukemia.3:189-191.