

الفعالية البايولوجية لمستخلصات جذور نبات القسط الهندي ضد نوعين من الخطوط الخلوية
السرطانية (SR , L20B).

**Biological Activities of *Costus Speciosus* Roots extracts Plant against two
types of cancer cell lines (L20B , SR) .**

Nasr A. Turkey Alobaidy¹ Hameed H. Ali² Zaid A. Thabit³

¹ Medical Laboratory Techniques Department / AL-Maaref University College /AL-Anbar- Iraq

² College of Science / AL-Anbar University/ /AL-Anbar- Iraq

³ Biotechnology Research Center / AL-Nahrain University/ Baghdad – Iraq

نصر عافت تركي العبيدي^١ حميد حسين علي^٢ زيد اكرم ثابت^٣

^١ قسم تقنيات التحليلات المرضية/ كلية المعارف الجامعة/ الانبار – العراق

^٢ كلية العلوم/ جامعة الانبار/ الانبار – العراق

^٣ مركز بحوث التقنيات الاحيائية/ جامعة النهرين / بغداد – العراق

E-mail: Nasr91er@gmail.com

الملخص

القسط الهندي من النباتات الطبية المهمة الذي يحتوي على مجموعة من المركبات ذات الفعالية الحيوية، حيث اجريت عملية استخلاص بعض من هذه المركبات الفعالة باستخدام اربعة مذيبات منفصلة وهي: الميثانول 70%، الايثانول 70%، الهكسان 70% والماء بالاستخلاص المستمر باستخدام جهاز السكسلت Soxhlet. وتم الكشف عن المركبات الفعالة في المستخلص باستخدام كشوفات نوعية. تم دراسة تاثير المركبات الفعالة للمستخلصات الخام على نمو الخطوط الخلوية السرطانية L20B ، SR خارج الجسم الحي in vitro وبتراكيزين (12.5 ، 25) مايكروغرام/مل ضمن مدة تعريض 72 ساعة. اظهرت النتائج وجود فروق معنوية وبمستوى احتمالية $P \leq 0.05$ لبعض المستخلصات الخام، حيث كانت اعلى نسبة للتثبيط على الخط الخلوي السرطاني SR عند التركيز 25 مايكروغرام/مل لمستخلص الهكسان وهي 38%، اما بالنسبة للخط الخلوي السرطاني L20B فقد كانت اعلى نسبة للتثبيط لمستخلص الميثانول عند التركيز 12.5 وهي 14.5%.

الكلمات المفتاحية: القسط الهندي، السرطان، L20B ، SR، المستخلصات.

Abstract

The *Costus Speciosus* of the medicinal plants is important, which contains a group of compounds with biological activities, the process of extracting some of these active compounds using four separate solvents are: 70% methanol,

70% ethanol, 70% hexane and water by continuous extraction using the device Soxhlet. Active compounds were detected in the extract using qualitative detections . The effect of active compounds on crude extracts was studied on the growth of L20B and SR in vitro and in concentrations of (12.5, 25) $\mu\text{g} / \text{mL}$ within a 72 hour exposure period. The results showed significant differences and a level of probability $P \leq 0.05$ for some crude extracts, with the highest percentage of inhibition on the cancer cell Line SR at 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for the hexane extract 38%. For the L20B cell line, the highest inhibitory rate of the methanol extract was 14.5% at 12.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ concentration.

Key word : Costus Speciosus, Cancer , SR , L20B, extraction.

المقدمة

تعد النباتات مصدراً مهماً لصناعة العقاقير الطبية لاحتوائها على بعض المواد الكيميائية ذات الفعالية البايولوجية لذا اعتمدت في تحضير الكثير من الادوية والعقاقير الطبية، اثارت النباتات الطبية انتباه العلماء منذ فترة طويلة بعد انتشار استعمالها كوسيلة علاجية لكثير من الحالات الطبية خاصة في السنوات الاخيرة عندما اتضح تأثيرها في تحضير الكثير من الادوية والعقاقير الطبية لفعاليتها البايولوجية الدوائية وسرعة تأثيرها العلاجي ولقلة تأثيراتها الجانبية السلبية التي مقارنة بالادوية المصنعة كيميائياً، لذا أصبحت أفضل الوسائل العلاجية لكثير من الامراض التي تسقم الجنس البشري [1].

لوحظ للعديد من المستخلصات النباتية تأثيراً مضاداً لبعض السرطانات لاحتوائها على مركبات تؤثر في آليات الانقسام الخلوي من خلال تأثيرها في تضاعف الحامض النووي ال (DNA) او أحد الانزيمات المهمة في التضاعف والتي تمنع تكوين النيبات الدقيقة لخيوط مغزل انقسام الخلية كمادة الكولجيسين Colchicine المستخلصة من نبات Colchicum cwtumnale اذ تمنع بلمرة بروتين tubulin مما تؤدي الى توقف الكروموسومات في طور الاستوائي وبالتالي تمنع أتمام عملية الانقسام الخلوي [2].

كذلك الحال مع مادة Phenanthridin Benzo وهي من القلويدات التي تعمل على تثبيط الانقسامات المتعددة لبعض انواع خلايا الخطوط السرطانية للإنسان والمقاومة للعقاقير الطبية ودفعها الى الموت المبرمج Apoptosis [3] لذا عدت بعض المستخلصات النباتية الطبية كمضادات للسرطان

Anti- cancer [4] وتزايدت اهمية النباتات الطبية عندما اتضح دورها في حماية المادة الوراثية من تأثير المطفرات البيئية وقابلية مكوناتها على تصحيح الأخطاء الوراثية التي تحدثها هذه المطفرات [5].

ونظرا الى ما تقدم اختير نبات القسط الذي يندرج تحت عائلة الزنجبيليات Zingiberaceae ، ويؤخذ من نبتة القسط التي يبلغ ارتفاعها 5.1 مترا ولها أوراق، ساق وجذور. ويوجد في الهند والجزء المستخدم في العلاج هو قشور جذوره التي تكون بيضاء أو سوداء والقسط الهندي نوعه غليظ أسود مر المذاق شديد الحرارة واستخدم في هذه الدراسة جذوره [6,7].

الهدف من هذه الدراسة هو اختبار سمية المستخلصات الخام لجذور نبات القسط على الخطوط الخلوية السرطانية SR , L20B.

المواد وطرائق العمل Materials and methods

A- جمع النبات واستخلاصه Plant Collection and Extraction

تم جمع عينات من جذور نبات القسط، من معشب النباتات الطبية في الباب المعظم - بغداد - العراق وتم تصنيفه في معشب كلية العلوم جامعة بغداد. جلبت عينات من جذور نبات القسط الى المختبر حيث تم تنظيفها من الأتربة العالقة بها بصورة جيدة، وبعد تجفيفها بدرجة حرارة الغرفة 25 °م طحنت بمطحنة كهربائية ثم عبئت في حاويات معقمة وذات سداد محكم وحفظت بعيدا عن الضوء المباشر في الثلاجة لحين الاستخدام. وزن 50 غم من مسحوق جذور النبات الجافة، وضعت في الكتشبان Thimpeل في جهاز السكسلت Soxhlet واستخدم 400 مل من المذيبات الاتية كل على انفراد (ميثانول 70%، ايثانول 70% ،هكسان وماء) ولمدة ثماني ساعات، وتم تنقيع 50 غم اخرى في 400 مل ماء مقطر لمدة 48 ساعة. ثم رشحت المستخلصات باستخدام الضغط المخلخل وورق ترشيح، بعدها تم تركيز المستخلصات باستخدام المبخر الدوار rotatory evaporator بدرجة حرارة 400°م لجميع المستخلصات عدا المائية حيث تم تجفيفها بفرن بدرجة 65°م. تم نقل المستخلصات المركزة، ووزنت وقدرت نسبتها المئوية من الصيغة التالية:

وزن المستخلص المركز

$$\text{حصيلة المستخلص} = \frac{\text{وزن مستحوق النبات الجاف}}{\text{وزن المستخلص المركز}} \times 100\%$$

وزن مسحوق النبات الجاف

ونقلت الى حاويات معقمة ملائمة وحفظت في الثلاجة بدرجة 4 °م لحين استخدامها [8].

B- الاختبارات الكيميائية Phytochemical tests

تم إجراء كشوفات نوعية للتعرف على المكونات الكيميائية للنبات قيد الدراسة :

1: الكشف عن التانينات Tannins test

تم الكشف بإضافة بضع قطرات من محلول كلوريد الحديدك 5% إلى 2 مل من المستخلص المائي للنبات وعند ظهور لون اخضر داكن او اسود مزرق دلالة على وجود التانينات[9].

2: الكشف عن الكلايكوسيدات Glycosides test

اجري الكشف بمزج 1 مل من المستخلص المائي للنبات مع 2 مل من كاشف بندكت ، ووضع المزيج في حمام مائي مغلي لمدة 5 دقائق و ترك المحلول ليبرد فعند تكون راسب أحمر دلالة على وجود الكلايكوسيدات [10].

3: الكشف عن القلويدات Alkloids test

تم الكشف بإضافة 1-2 مل من كاشف دراكندروف إلى 5 مل من المستخلص المائي وان ظهور لون برتقالي محمر دلالة على وجود القلويدات[11].

4: الكشف عن الصابونين Saponin test

اجري الكشف بإضافة 5 مل من المستخلص الى 5 مل وترك لمدة 5-10 دقائق تكون راسب ابيض دلالة على وجود الصابونين[12].

5: الكشف عن الفلافونيدات Flavonoids test(Shinoda test)

اجري الكشف بإضافة قليل من فتات شريط المغنيسيوم الى 2 مل من المستخلص المائي للنبات ثم إضافة 6 قطرات من حامض الهيدروكلوريك المركز وعند تكون لون زهري او احمر دلالة على وجود الفلافونيدات [13].

6: الكشف عن الفينولات Phenolic test

يتم الكشف بإضافة 2 مل من 1% كلوريد الحديدك إلى 3 مل من المستخلص المائي ثم اضافة 2 مل من 1% سيانيد البوتاسيوم الحديدكي الى المزيج يتكون لون اخضر مزرق قائم دلالة على وجود الفينولات [14] .

7: الكشف عن الراتنجات Resin test

يتم الكشف بإضافة 50 مل من الكحول الايثيلي إلى 5 غم من مسحوق النبات وتركه في حمام مائي مغلي لمدة دقيقتين و يرشح بعدها ويضاف للمحلول 20 مل من الماء المقطر المحمض ب (4%) حامض الهيدروكلوريك حيث يلاحظ تكون عكورة دلالة على وجود الراتنجات [12] .

8: الكشف عن التربينات Terpenoides test

أضيف 5 مل من المستخلص المائي إلى 2 مل من الكلوروفورم تبعها إضافة 3 مل من حامض الكبريتيك المركز بحذر على الجدار الداخلي لأنبوبة الاختبار حيث تكونت طبقة فاصلة ذات لون بني محمر دلالة على وجود التربينات [15].

9: الكشف عن الأحماض الامينية Amino acids test

أضيفت قطرتان من 0.2 % ننهايدرین إلى 1 مل من المستخلص النباتي ووضعت أنبوبة الاختبار في حمام مائي مغلي لمدة دقيقتين، تكون لون أرجواني أو أصفر دلالة على وجود الأحماض الامينية [10].

C- دراسة تأثير المستخلصات الخام لنبات القسط على الخطوط الخلوية السرطانية:

انجز في هذا البحث دراسة تأثير المستخلصات الخام لجذور نبات القسط على الخطوط الخلوية السرطانية وهي **L20B** هو عبارة عن خلايا الأمعاء لإناث الفئران نوع Albino mice و **SR** وهو عبارة خلايا لمفاوية المحيطة بالرئة في الانسان وجهزت من مركز بحوث التقنيات الاحيائية جامعة - النهرين.

a- المحاليل الخاصة بالزرع النسيجي الاساسي والزرع الثانوي :

تم تحضير المحاليل تبعا لطريقة Freshney الخاصة بالزرع النسيجي [16].

1- اوساط الزرع النسيجي

الوسط الزرعي Rosweel Park Memorial Institute (RPMI-1640)

ويتألف من:

10.4 غم L.glutamine , hepes buffer RPM 1640

15 غم Sodium bicarbonate (4.4%)

بيكاربونات الصوديوم لتعديل الأس الهيدروجيني الى 7.4 - 7.8.

0.5 مل Crystilline Penicilline

0.5 مل Streptomycin

0.25 مل Nystatin

5% من المصل البقري

أكمل الحجم الى لتر واحد بإضافة ماء مقطر وعقم بالترشيح ، بمرشح ذي قطر $0.22\mu\text{m}$ تحت ظروف معقمه.

2- أوساط الحفظ :

يحتوي على جميع مكونات الوسط الزراعي المذكور في الفقرة (1) ماعدا المصل البقري .

3: المحاليل المستعملة في الدراسة الوراثية - الخلوية

a : محلول داريء الفوسفات الفسيولوجي

حضر المحلول بإذابة 8غم من كلوريد الصوديوم NaCl و 0.2 غم من كلوريد البوتاسيوم KCl و 1.15 غم من فوسفات الصوديوم أحادي الهيدروجيني Na_2HPO_4 و 0.2 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4 في 1000 مل من الماء المقطر ويضبط تحت اس هيدروجيني 7.2 ثم عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 °م مدة 15 دقيقة ويحفظ في 4 °م لحين الاستعمال [17].

b- محلول بيكاربونات الصوديوم

تم تحضير هذا المحلول بإذابة 7.5 غم من بيكاربونات الصوديوم NaHCO_3 في 1000 مل من الماء المقطر للحصول على تركيز % 0.75 ، ثم عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 °م مدة 15 دقيقة ويحفظ هذا المحلول تحت 4 °م لحين الاستعمال [17].

c- تحضير صبغة MTT

يذاب 50 ملغم من صبغة MTT في 100 مل من PBS (Phosphate Buffer Saline) ثم يرشح بورقة ترشيح وبعدها يعقم باستخدام مرشح ذي ثقب بقطر 0.22 مايكرون [16].

d- تحضير التريسين Trypsin

حضر غرام واحد من مسحوق التريسين في 100 مل من داريء الفوسفات الفسيولوجي (PBS) المحضر في فقرة (a) ، وعقم بالترشيح باستعمال مرشح ذي ثقب بقطر (0.22 μ m) وحفظ بدرجة 20 $^{\circ}$ م.

e- تحضير الفرسين Versine

أضيف غرام واحد من مسحوق EDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid disodium) الى 100 مل من الماء المقطر وأذيب جيداً ثم عقم بالمؤصدة 121 مْ لمدة 10 دقائق، حفظ بدرجة 20 $^{\circ}$ م.

f- محلول التريسين-فرسين Trypsin-Versine solution

ويتكون من: 1- محلول التريسين Trypsin 20 مل .

2- محلول الفرسين Versine. 10مل.

3- محلول داريء الفوسفات الفسيولوجي PBS 370 مليلتر

مزجت المواد معاً وحفظت عند درجة حرارة 4 $^{\circ}$ م لحين الاستعمال.

g- محلول DMSO

حضر بخلط 0.2 مل من DMSO في 100 مل من الماء المقطر ، ثم عقم باستعمال مرشح ذي ثقب بقطر (0.22 μ L) وحفظ بدرجة حرارة 4 $^{\circ}$ م الى حين الاستعمال.

ج- محلول الأنستاتين Nystatin Solution

حضر بأخذ نصف حبة من الأنستاتين 500 ملغم وأضيفت الى لتر واحد من الوسط وأذبيت فيه.

k- محلول الستربتومايسين Streptomycin Solution

حضر بإذابة غرام واحد من الستربتومايسين في 5 مل من الماء المقطر ليكون التركيز النهائي 200 ملغم / مل أخذ منه 0.5 مل وأضيف الى لتر واحد من الوسط الزراعي .

1- محلول البنسلين Penicillin solution

حضر المحلول بإذابة غرام واحد من البنسيلين في 5 مل من الماء المقطر وأضيف 0.5 مل منه الى لتر واحد من الوسط الزراعي.

4- تحضير الوسط الزراعي للخطوط الخلوية السرطانية واختبار سمية المستخلصات على تلك الخطوط

a- تحضير الوسط الزراعي للخطوط الخلوية السرطانية:

تمت تهيئه الوسط الزراعي في الفقرة (a) وفقاً لطريقة (Freshney) [16] ، بخلط مكوناته مع بعضها البعض لتحضير لتر واحد منه ، ومن ثم عقمت باستعمال مرشح ذي ثقب (0.22) مايكرون، ثم وزع الوسط الزراعي في قناني زجاجية ذات غطاء محكم سعة 200 مل وحفظت بدرجة حرارة -20°م الى حين الاستعمال.

حيث تم أجراء الخطوات الخاصة بالزرع النسيجي تحت ظروف معقمة كالاتي :

1- أضيف ٢ مل من محلول الترسين/ فرنسين المحضر الى قنينة الزرع النسيجي بحجم ٢٥سم^٣ الحاوية على الخلايا بعد تفريغها من الوسط الزراعي القديم ثم حركت القنينة برفق وحضنت في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م مدة 15 دقيقة لتفكيك الخلايا الملتصقة وكذلك منع التصاقها بجدار القنينة للحصول قدر الإمكان على خلايا أحادية مفردة.

2- أضيفت الى القنينة الحاوية على الخلايا المتفككة ما يقارب 15 مل من وسط نمو جديد (RPMI-1640) وتم تحريك القنينة جيداً وبعدها أفرغت محتويات القنينة الحاوية على الوسط الزراعي الجديد مع الخلايا الى قنينة أخرى جديدة بحيث يكون مستوى الوسط الزراعي مع الخلايا

متساو بين القنيتين أي كل قنينة وضع فيها نفس الحجم تقريبا من الوسط الزرعي مع الخلايا وتسمى هذه العملية بالمزرعة الثانوية Subculture .

3- حضنت القناني بدرجة حرارة 37°م لمدة يومين فيما يخص L20B و SR وتمت متابعة القناني يوميا للتأكد من خلوها من أي تلوث وأن الخلايا بحالة جيدة وذلك بفحصها بواسطة المجهر المقلوب Inverted microscope وعندما يصبح النمو داخل القنينة جيدا فأن الخلايا تكون جاهزة للاستعمال.

b- اختبار سمية المستخلصات الخام على تكاثر الخلايا السرطانية:

حضرت المستخلصات (ماء بارد، ماء حار، ميثانول، إيثانول، هكسان) لنبات القسط وفق الفقرة (A) ثم عقت المستخلصات باستعمال مرشح ذي ثقب 0.22 مايكروليتر وحضر منه تركيزان هما (25 و 12.5) ميكروغرام/مليلتر وتحت ظروف معقمة، استعملت جميع التراكيز المحضرة مباشرة بعد إكمال عملية التحضير وحسب الخطوات الآتية:-

1- جهز عالق الخلايا عن طريق معاملة الزرع النسيجي حجم ٢٥ مل بمحلول الترسين/فرسين بعد تفريغ الوسط الزرعي القديم وتحريك القنينة برفق، ثم حضنت في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م مدة 15 دقيقة، ثم أضيف له 20 مل من وسط النمو المحضر RPMI- 1640 ثم تم مزج عالق الخلايا جيدا وتم نقل 0.2 مل بعد كل مزجة جديدة الى حفر طبق معايرة الزرع النسيجي ذي القعر المسطح Microtiter plate for tissue culture باستعمال ماصة أوتوماتيكية دقيقة.

٢- ترك الطبق في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة الى حين التصاق الخلايا في الحفرة، بعدها تم التخلص من الوسط الزرعي القديم في الحفرة وتم إضافة ٠,٢ مل من التراكيز المحضرة سابقا في كل حفرة وبواقع ثلاثة مكررات لكل تركيز. تم عمل ثلاثة مكررات للسيطرة (خلايا فقط) مضاف لها وسط زرعي خالٍ من المصل Free media.

٣- بعد مرور 24 ساعة أخرج الطبق من الحاضنة وأضيف إليه محلول صبغة MTT

3-[4, 5 –dimethylthiazoyl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT dye)

لجميع الحفر الحاوية على الخلايا بمقدار 0.2 مل لكل حفرة .

٤- أعيد الطبق مرة ثانية الى الحاضنة ليحضن مدة ساعتين، وبعدها أخرج الطبق وأزيلت الخلايا

الميتة إذ إن الخلايا الحية تأخذ الصبغة أما الميتة فلا تأخذها ثم تعامل بمحلول DMSO.

٥- قُرئت النتائج باستعمال ELISA بطول موجي 630 نانومتر.

٦- تم حساب نسبة التثبيط لكل تركيز باستعمال المعادلة $\%IR = \frac{A - B}{A} \times 100$

A= Control

B= Test

5- التحليل الإحصائي

اجري التحليل الاحصائي بواسطة برنامج Graphpad prism v6 فقد استخدم اختبار تحليل التباين

ANOVA واختبار معامل الارتباط Correlation coefficient للمقارنة بين نتائج الدراسة .

النتائج: Results

A- جمع النبات واستخلاصه Plant Collection and Extraction

يبين الجدول (1) الكميات التي تم الحصول عليها وحصيلة المستخلص من كل 50 غم من مسحوق جذور نبات القسط الجافة باستعمال المذيبات الخمسة:

جدول (1) كمية المستخلصات ونسبتها المئوية

ت	المذيب المستعمل في الاستخلاص	كمية المستخلص (غم)	حصيلة المستخلص (%)
1	ماء بارد	4.34	8.68
2	ماء حار	0.5	1
3	ميثانول	4.8	9.6
4	إيثانول	2.23	4.46
5	هكسان	0.76	1.52

B- الاختبارات الكيميائية Phytochemical tests

يبين الجدول (2) نتائج الكشف الكيميائي لبعض المركبات الفعالة الموجودة في جذور نبات القسط :

جدول رقم (2) نتائج الكشف عن المركبات الفعالة في مستخلص جذور نبات القسط

ت	المركبات الفعالة	نتيجة الكشف			
		مستخلص مائي		مستخلص كحولي	
		ماء بارد	ماء حار	ميثانول	إيثانول
1	الصابونينات	+	+	-	+
2	الكلايكوسيدات والكربوهيدرات	+	+	+	+
3	التانينات	-	-	-	-
4	القلويدات	+	+	-	-
5	الفلافونويدات	+	+	+	+
6	الراتنجات	+	+	+	+
7	التربينات	+	+	+	-
8	الاحماض الأمينية	-	+	-	-
9	الفينولات	+	+	+	+

العلامة (+) تدل على ايجابية الكشف العلامة (-) تدل على سلبية الكشف

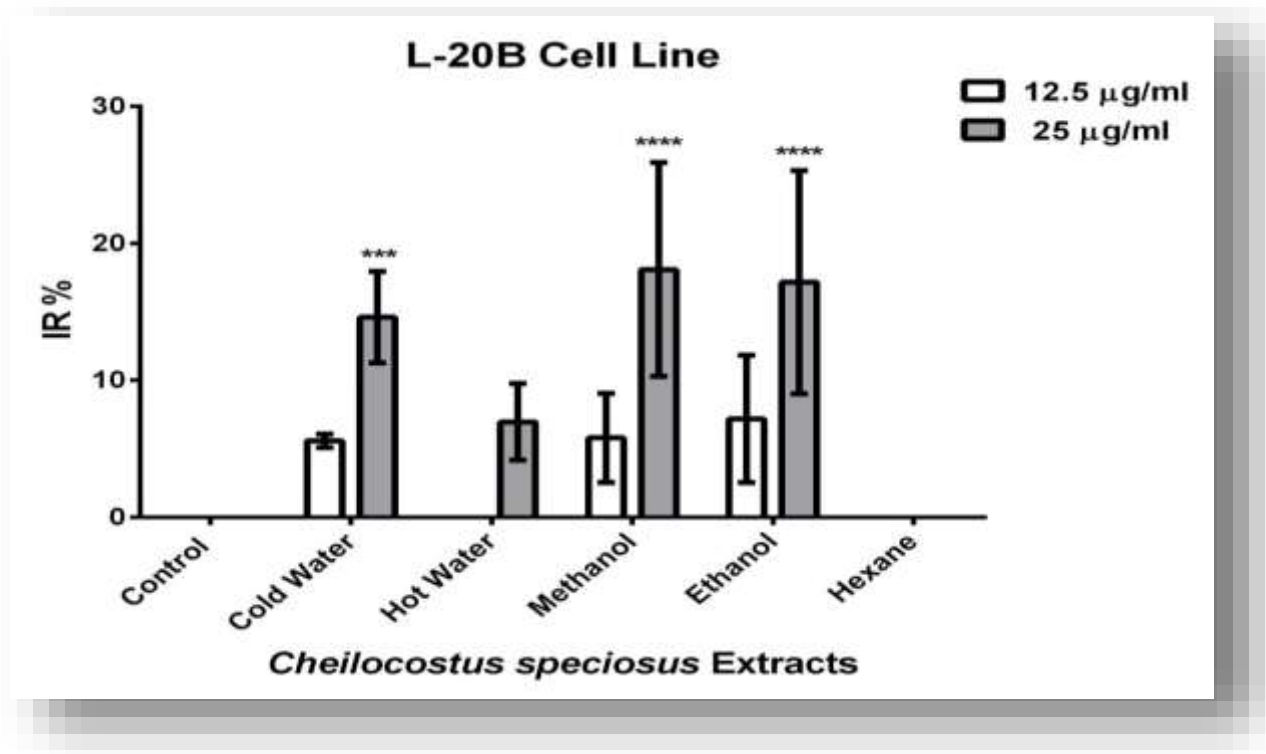
C- دراسة تأثير المستخلصات الخام على الخطوط الخلوية السرطانية (SR ، L20B)

1: تأثير مستخلصات نبات القسط على الخط الخلوي السرطاني (L₂₀B)

يبين الجدول رقم (3) والشكل (1) النسب المئوية لتثبيط الخلايا السرطانية L20-B باستعمال مذيبيات مختلفة وبتراكيزين مختلفين .

جدول (3) النسب المئوية لتثبيط خلايا إلـ L20B

نوع المستخلص	التركيز $\mu\text{g/ml}$	نسبة التثبيط (%I.R)
ماء بارد	12.5	6.06
	25	11.51
ماء حار	12.5	0
	25	4.24
ميثانول	12.5	14.55
	25	3.03
ايثانول	12.5	10.3
	25	0
هكسان	12.5	0
	25	0



* = $P \leq 0.05$, ** = $P \leq 0.01$, *** = $P \leq 0.001$

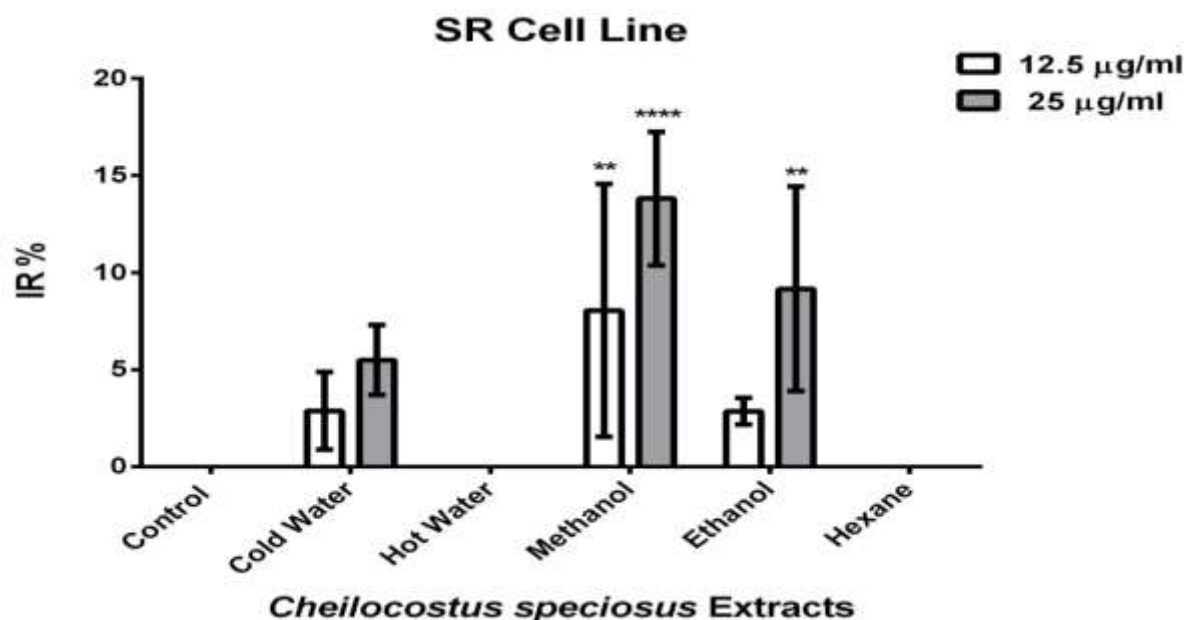
شكل (1) يوضح تأثير مستخلصات نبات القسط في الخط الخلوي السرطاني L₂₀B

2: تأثير مستخلصات نبات القسط على الخط الخلوي (SR)

يبين الجدول رقم (4) والشكل (2) النسب المئوية لتنشيط الخلايا السرطانية SR باستعمال مذيبيات مختلفة وبتراكيزين مختلفين .

جدول (4) النسب المئوية لتثبيط خلايا إل SR

نوع المستخلص	التركيز $\mu\text{g/ml}$	نسبة التثبيط (%I.R)
ماء بارد	12.5	0
	25	0
ماء حار	12.5	0
	25	0
ميثانول	12.5	8.6
	25	12.5
إيثانول	12.5	0
	25	0
هكسان	12.5	12.06
	25	38



* = $P \leq 0.05$, ** = $P \leq 0.01$, *** = $P \leq 0.001$

شكل (2) يوضح تأثير مستخلصات نبات القسط الهندي في الخط الخلوي السرطاني SR

المناقشة DISCUSSION

اظهرت نتائج التحاليل والكشوفات الكيميائية النوعية للمستخلصات المائية الخام لجذور نبات القسط أن المستخلص المائي البارد يحتوي على المواد الفعالة (الصابونينات، والكلايكوسيدات والكربوهيدرات، التانينات، القلويدات، الفلافونويدات، الراتنجات، التربينات، الفينولات)، والمستخلص المائي الحار يحتوي على المواد الفعالة (الصابونينات، والكلايكوسيدات والكربوهيدرات، التانينات، القلويدات، الفلافونويدات، الراتنجات، التربينات، الاحماض الأمينية، الفينولات).

اما المستخلصات الكحولية الخام فتحتوي على المواد الفعالة كما في الجدول (2) إذ يحتوي المستخلص المثلي على المواد الفعالة (الكلايكوسيدات والكربوهيدرات، التانينات، الفلافونويدات، الراتنجات، التربينات، والفينولات)، في حين يحتوي المستخلص الايثيلي على المواد الفعالة (الصابونينات، الكلايكوسيدات والكربوهيدرات، التانينات، الفلافونويدات، الراتنجات، والفينولات)، وإما مستخلص الهكسان فيحتوي على المواد الفعالة (الصابونينات، التانينات، الراتنجات، التربينات، والفينولات)، جاءت هذه النتائج مطابقة لدراسات سابقة [19,18].

إن وجود هذه المركبات الفعالة يفسر أهمية تلك البذور والجذور ويفسر سبب استخدامها في الطب القديم والحديث وكذلك يكشف عن القيمة الدوائية لهذه النباتات، وأن الكشف عن هذه المركبات وعزلها وتنقيتها له الأثر الفعال في توظيف نتائجها لغرض استخدامها في السيطرة على الأمراض التي تصيب الإنسان والمتسببة بفعل البكتريا والفطريات والسرطان وغيرها [22,21,20].

تحتوي المستخلصات الكحولية والمائية الخام لجذور القسط الهندي على الفلافونويدات Flavonoids التي اثبتت الدراسات فعاليتها البيولوجية والفسيلوجية العالية عند اعطائها عن طريق الفم والتي تعمل بوصفها مواداً مضادة للأكسدة Antioxidant التي تحمي خلايا اللبائن من الجذور الحرة للأوكسجين Free oxygen والتي تعمل على ازلتها [23].

عند معاملة الخط الخلوي السرطاني ($L_{20}B$) بتركيز مختلفة (12.5، 25) مايكروغرام/مل من مستخلصات نبات القسط الهندي وجد ان هناك تأثيراً تثبيطياً واضحاً لبعض المستخلصات ويختلف هذا التثبيط باختلاف نسب التراكيز المستخدمة.

يلاحظ من الشكل (1) الجدول (3) ان المستخلص المائي لنبات القسط الهندي له تأثير تثبيطي على نمو الخلايا السرطانية من نوع $L_{20}B$ ، إذ اعطى المستخلص المائي البارد نسبة تثبيط مقدارها 11.51% عند التركيز 25 و نسبة تثبيط مقدارها 6.06% عند التركيز 12.5 مايكروغرام/مل ، بينما المستخلص المائي الحار فكانت نسبة تثبيط له عند التركيز 25 مايكروغرام/مل تساوي 4.24% ولم يعط اي تثبيط عند التركيز 12.5 مايكروغرام/مل للخلايا السرطانية من النوع $L_{20}B$.

اما المستخلصات الكحولية لنبات القسط الهندي عند التركيز 12.5 مايكروغرام/مل فقد اعطى المستخلص الميثانولي نسبة تثبيط 14.55%، والمستخلص الايثانولي 10.3%، والمستخلص الهكساني لم يعط اي نسبة تثبيط ، اما عند التركيز 25 مايكروغرام/مل فقد اعطى المستخلص الميثانولي نسبة تثبيط 3.03%، ولم تعط مستخلصات (الايثانول والهكسان) اي نسبة تثبيط للخلايا. اظهرت نتائج التحليل الاحصائي ان هناك فرقاً معنوياً واضحاً بين تركيزي مستخلص الماء البارد لنبات القسط الهندي على الخلايا السرطانية ($L_{20}B$) عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) ، ولا يوجد فرق معنوي بين تركيزي مستخلص الماء الحار عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) ورغم الزيادة الحاصلة في نسبة التثبيط بين تركيزي المستخلص. ويوجد فرق معنوي بين تركيزي مستخلصات الميثانول والايثانول عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) شكل (1).

جاءت نتائج الدراسة هذه مطابقة لدراسات سابقة في ان سبب قدرة مستخلصات الميثانول والايثانول على تثبيط او تقليل نمو الخلايا السرطانية من نوع $L_{20}B$ هو قدرة هذه المذيبات على ترسيب العديد من المركبات الكيميائية ذات الفعالية العالية واهمها الفينولات والفلافونويدات والاحيرة تحتوي على العديد من المركبات الحامضية مثل حامض هيدروكسي سينامك والتي تعتبر نوعاً من الفلافونويدات والتي تضم عدداً من الحوامض منها حامض P-Coumaric acid إذ ان هذه

الحوامض تتميز ببنية تركيبية توصف بانها ذات نظام دفاعي ضد الخلايا السرطانية عن طريق تحليل هذه المركبات وتكوين جذور وبيروكسيدات تعمل على مهاجمة انسجة العدو وبالتالي القيام بتنشيطها [24].

يلاحظ من الشكل (2) والجدول (4) ان المستخلصات المائية لنبات القسط لم تعط اي نسبة تنشيط او قتل للخلايا السرطانية عند الخط الخلوي SR في كلا التركيزين المستخدمين.

اما المستخلصات الكحولية ، فان مستخلص الميثانول اعطى نسبة قتل للخلايا السرطانية 8.6% ، 12.5% عند كلا التركيزين (12.5، 25) مايكروغرام/مل على التوالي، ومستخلص الايثانول لم يعط اي نسبة قتل للخلايا السرطانية عند كلا التركيزين ، ونجد ان مستخلص الهكسان اعطى اعلى نسبة قتل للخلايا السرطانية 38% عند التركيز 25 مايكروغرام/مل و 12.06% عند التركيز 12.5 مايكروغرام/مل .

اظهرت نتائج التحليل الاحصائي ان هناك فرقا معنويا واضحا بين تركيزي مستخلص الهكسان عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) ، ورغم الزيادة الحاصلة في نسبة التنشيط بين تركيزي مستخلص الميثانول فأنها تعد غير معنوية عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) ولكن هذا لا ينفي وجود هذه الزيادة في نسبة التنشيط ولكنها بفروق قليلة غير معنوية. اما المستخلصات الاخرى التي لم تعط اي نسبة تنشيط فلاتوجد بينها فروق معنوية عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) شكل (2) . نستنتج من ذلك انه كلما زاد تركيز مستخلصات القسط (الهكسان ، والميثانول) كلما زادت نسبة التنشيط للخلايا السرطانية SR، وهذا مطابق لما ذكرته دراسات سابقة [25].

المصادر REFERENCES

- 1- قطب، فوزي طه، النباتات الطبية زراعتها ومكوناتها، الدار العربية للكتاب، ليبيا، (1979).
- 2-Usui,T.;Kondoh, M.; Cui, C-B., Mayami,T. and Osada,H. , "Tryprostatin A,aspecific and novel inhibiton of microtubule assembly", Biochem.J.,Vol.333, pp:543-548,(1998).

3-Lopus,M.and Panda, D. , "The enzophena thridine alkaloid sanguinarine perturbs micro-tubule assembly dynamic through tubulin binding.A possible mechanism for its antiproliferative activity" , J.FEBSIO,pp:2139-50, (2006).

4- Gurib-Fakim,A. , "Medicinal Plants.Tradition of yesterday and drugs tomorrow", Molecular Aspects of Medicine, (2005).

5-Manosroi,J., Dhumtanoma, P. and Manosoi, A.,"Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines cancer letters:,pp:1-7, (2005) .

6- RICHA, S.; BAMKIN C. N. and NAKULESHWAR D. J. , "QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ESTIMATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN MIMOSA HAMATA", International J. of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences ,Vol. 6, pp: 72-75, (2014).

7- Jeetendra N.; Manish B. and Minal N. , "In-vitro Evaluation of Antioxidant Activity and Phenolic Content of Costus speciosus (Koen) J.E. Sm." , Iranian J. of Pharmaceutical Research., Vol.9 (3),pp: 271-277, (2010).

8- البالاني ، ماجد رشيد مجيد. "تأثير المستخلصات النباتية الخام وقلويد الفازيسين لنبات حلق السبع الشجيري Adhatoda Vasica"، رسالة ماجستير، كلية العلوم ، جامعة بغداد ، 23 ، (2003) .

9- Cuilel I. , "Methodology for the analysis of vegetables and drugs", Chemical Industry Division , NNIDO Romania, pp: 24-67, (1994).

10- القطان ، منال. " تأثير القسط الهندي على فطر Aspergillus و A.Fumigatus وخميرة Candida albicans التي تصيب الجهاز التنفسي في الانسان"، المجلد الاول ، العدد الثاني . الناشر. جامعة ام القرى للعلوم التطبيقية، (2009) .

11-Bouaklin, A., Lacroix, C. Roux, N. Gangheux, J.P. and Deronin, F. "Fungal contamination of food in Dermatology units", J. Clin. Microbiology , Vol.38 , pp: 4272- 4273, (2000).

- 12- Melvinjoe, M. Jayachiyral, J. and Viyayaprixa, M. , "Candida and Candisis", 3th. J. of Medicinal and Plant Research Vol. 3(11) , pp:1134-1136,(2000).
- 13- Yadav RNS, Agarwala M. Phytochemical analysis of some medicinal plants, J Phytol, Vol.3,pp: 10-14,(2011).
- 14- Roberts, M., Wink, M., " Alkaloids Biochemistry Ecology and Medicinal application", Plenum Press NewYork- London , pp.435-459,(1998).
- 15- Khan F, Iqbal H, Shahid F, Majed A, Muhammad A, Inayat U., "Phytochemical Screening of Some Pakistanian Medicinal Plants", Middle-East J. of Scientific Research , Vol. 8,pp: 575-578,(2017).
- 16- Freshney, R.I., " Culture of animal cell", Sixth education, Wily- Liss, NewYork, (2012).
- 17- Allen, J.W., Schuler, C.F., Mends, R.W. and Latt, S.A., " A simplified technique for in vivo analysis of sister chromatid exchange using 5-bromodeoxy uridine tablet, cytogenetics", Vol.18,pp:231-237,(2005).
- 18- Suzan, K. and AL-Kattan, M. O., "Phytochemical screening and antimicrobial activities of Costus speciosus and Sea Qust", Biomedical Research , Vol. 28 (1),pp: 389-393,(2017).
- 19- Naik, A. , Krishnamurthy, R.and Pathak, J., "Antioxidant Activity and Phytochemical Screening of Costus pictus D. Don Leaf Extracts", International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research, vol. 9(6), pp:789-796, (2017).
- 20- Johri, G.K., Abdullah, S.S., Kumari, P.S., "Antidiabetic Effect of Costus speciosus Rhizome Extract in Alloxan Induced Albino Rats", Journal of chemistry and biochemistry , Vol.2(1) , (2014).

- 21- Kalita, C.J., Haque, A.," Effect Of Costus Speciosus Koen on Reproductive organs of Female Albino Mice ", International Research Journal of Pharmacy , Vol.3(4) , (2012).
- 22- Chibueze, F.U., Kingley,N.A., Okorie, K.N., Agwu, A., Success, N.N., "Phytochemical Composition Of Costus Afer Extract and its Alleviation of Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Oxidative Stress and Toxicity", International Journal of Modern Botany , vol.2(5) , pp.120-126 , (2012).
- 23- Nakayama .T., Hor, K. , Terazawa and Kawakish. S.," Comparision of the Cytotoxicity Of different hydroperoxides to V79cell , Free Radical Res", Commun , Vol.14 , pp. 173-178 , (2002).
- 24- Feeny, P., "Inhibitory effect of oak leaf tannins on the hydrolysis of protein by trypsin ", J. Phytochemistry , Vol.8 , PP:209 – 212,(2000).
- 25- Correa,P.A." Human gastric carcinogenesis : amultistep and multifactorial process. First Americal Cancer Society a word lecture on cancer epidemiology and prevention. Cancer Res., Vol.52, pp: 6735 – 6740, (1992).