

تأثير المستخلص الخام لنبات الراوند *Rheum ribes* في خط خلايا سرطان الحنجرة Hep-2 ووراثة الخلايا اللمفاوية البشرية النامية في الزجاج

رغد ضياء عبد الجليل (*)

المخلص: تُدرس التأثير السمي للمستخلص الخام لنبات الراوند على خلايا سرطان الحنجرة البشري Human Larynx carcinoma cell line (Hep-2) ، ولمدتي تعريض (3، 6) أيام. فوجد تباين في التأثير السمي معتمداً على التركيز ومدة التعريض. كانت جميع تركيزات المستخلص أكثر سمية عند حضنها لـ 6 أيام قياساً بالحضن مدة 3 أيام. كان التركيز السام للمستخلص القاتل لنصف عدد الخلايا السرطانية Inhibition Concentration 50 (IC₅₀) هو 0.063 µg/ml عند الحضن مدة 6 أيام. بينما لم يتم الحصول على تركيز قاتل لنصف عدد الخلايا عند المعاملة مدة 3 أيام. وقُدِّرت أفضل نسبة تثبيط عند التركيز 100 µg/ml الذي أدى إلى قتل 27.5 % من الخلايا. عمل المستخلص باتجاهين متعاكسين إذ حصلت زيادة في نمو الخلايا عند أعلى تركيز 100mg/ml ولكلتا المعاملتين بمعدل تحفيز نمو Proliferation Rate (PR) 46.154 % و 25.15 % عند المعاملة مدة 3 و 6 أيام. أدت جميع التركيزات الأدنى إلى نسب تثبيط متفاوتة. وأشارت نتائج تحليلات الوراثة الخلوية للخلايا اللمفاوية لدم الإنسان إلى أن المستخلص قد سبب انخفاضاً في دليلي الانقسام الخلوي Mitotic index (MI) والتحول الأرومي Blastogenic Index (BI)، وزيادة في التغيرات الكروموسومية وتبادل الكروموسومات الشقيقة Sister chromatid exchanges (SCE). وأدى التركيز الوسطي إلى تسريع دورة الخلية وتقدمها Cell cycle progression (CCP)، وازدادت قيم معامل التضاعف Replicative Index (RI). وحدث العكس من ذلك تماماً عند التركيزين العالي والواطي.

الكلمات الأساسية: نبات الراوند، خط خلايا سرطان الحنجرة، الخلايا اللمفاوية.

Effect of *Rheum ribes* Crude Extraction on Hep-2 Cancer Cell Line and Cytogenetic of Human Lymphocyte in Vitro

Raghad DH Abdul- Jalill

Abstract: Cytotoxic effect of *Rheum ribes* crude extraction was studied on Human epidermoid larynx carcinoma cell line (Hep-2) within two exposure time (3,6) days. Cytotoxic assay showed different results dependent manner. All concentrations of extract were more toxic in 6 days compared with 3 days. Inhibition concentration 50 (IC₅₀) of extraction was 0.063 µg/ml after 6 days exposure time. There was no Inhibition concentration 50 when the cells treated with extraction within 3 days. The best Inhibitory rate of it was 27.5% when it exposed with 100 µg/ml extraction. Opposite directions of extract action were observed. There were stimulation in the growth of cancer cells when it treated with high dose (100 mg/ml) while , in low dose, inhibition was observed. Proliferation Rate were 46.154 % , 25.15 % at 3 and 6 days respectively. All lower concentrations showed deferent inhibitory rate. There were reduction effect of Mitotic Index and Blast Index. All concentrations showed chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges (SCE). Cell cycle progression (CCP) was accelerated and replicative index (RI) was arising by medium concentrations. The opposite happened at high and lower concentration.

Keywords: *Rheum ribes*, Larynx carcinoma cell line, Human Lymphocyte.

(*) أستاذ مساعد بقسم علوم الحياة، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية، بغداد، العراق، raghadalshybany@yahoo.co.uk

المقدمة

نبات الراوند العراقي Rheum ribes أحد النباتات المعمرة التي تعود للعائلة البطباطية polyganaceae التي تنتشر في المناطق الصخرية الجافة في راوندوز وسليمانية ومنها أخذ تسميته المحلية ، ويتواجد في سوريا وجنوب وشرق تركيا وناдрأ في غرب إيران [1]. ويدعى محليا بالراوند العراقي، والراوند السوري ، وريواس، وريباس [2] ويدعى في تركيا ب asgun isgun [3] ، أما في إيران فيدعى rivas [4]. ويصل طول النبات إلى متر ونصف المتر وتظهر أزهاره الصفراء في حزيران وتموز في ما تنضج البذور في آب ، وينتشر النبات في التربة الثقيلة إلى المتوسطة الجافة ويتحمل انخفاض درجات الحرارة إلى ما دون - 20 درجة مئوية [5].

تحتوي جذور الراوند على مواد تانينية tanines بنسبة 8 % و 0.1- 0.025 % مشتقات ال anthracen [6]. كما يحوي على كلوكوزيدات انثراكينونية anthraquinones وأهم مركبات هذه المجموعة: Rhein, Aloe-emodin, Chrysophanol, Physcion, Physcion 8-O-glucoside, Aloe-emodin 8—glucoside, Sennoside A, Rhaponticin [3]. واكتشف مؤخراً احتواء جذور نبات الراوند العراقي على مركب Emodin أيضاً ، وهو المركب الفعال في نبات الراوند الطبي Rheum palmatum تعزى إليه كثير من الدراسات فعالية نبات الراوند في علاج السرطان ومنها سرطان الكبد والرئة والغدة اللبئية البشري وغيرها [7]. وتحتوي المستخلصات المثلية الخام للسيقان على مركبات فينولية وفلافونيات وهي: Pyrocatech و Quercetin equivalents وهي مركبات كلايكونية تعد الجزء الأساس من المركب الكلايكونسيدي Quercetin [8]. وتحتوي على أملاح البوتاسيوم بتركيز 32730.82 mg/kg وعلى الحديد بتركيز 56.11 - 147.01 mg/kg والألنيوم وأوكزالات الكالسيوم والمغنيسيوم والصوديوم والزنك وبكميات كبيرة [9].

تستخدم الأوراق والسيقان الغضة طعاماً للسكان المحليين في كل من تركيا وشمال العراق وغرب إيران وهي تؤكل إما بشكل نيئ أو بشكل مطبوخ [2]، وله عدة استخدامات في الطب الشعبي فهو يستخدم لعلاج البول السكري وله خواص مضادة لتكوين الشعيرات الدموية فيستخدم لعلاج البواسير في تركيا والعراق، ومضاداً لالتهابات الجهاز البولي [10]. كما يكافح الجذري ويحمي من اضطرابات المعدة وهو مضاد للقيء ويساعد في الهضم وقاتح للشهية ومسهل، ولقد أثبتت الدراسات الحديثة بعض هذه الخواص الطبية. فقد أوضح [11] أن لمستخلص أوراقه الكحولي خواصاً مضادة لقروح المعدة والجهاز الهضمي عند التركيز 200 mg/kg. كما أن له تأثيرات علاجية لبعض الأمراض النفسية [12]. وذكر [13] أن لمستخلص جذور النبات تأثيراً خافضاً للسكري عند تجريع الفئران المصابة بالسكري (الناتج عن أكسدة حامض اليوريك) فموياً. وله فاعلية مضادة لبعض الفيروسات (14). وان لمستخلصات جذوره وأوراقه وسيقانه المثلية الخام قابلية مضادة لعدد كبير من البكتريا السالبة لصبغة كرام [15] وأن هذه الفعالية تعود بشكل مباشر للمركبين الفعالين الأيمودين Emodin و Aloe-emodin [7]. واكتشف حديثاً أن للمستخلص المائي الخام لجذور وبراعم النبات قابلية مضادة لخط خلايا HL60 لسرطان سليفة الأرومة الثقوية promyeloblastic leukemia إذ كان التركيز القاتل لنصف عدد الخلايا السرطانية هو 145 µg/ml و 127 µg/ml لمستخلص البراعم والجذور على التوالي بعد الحضانة مدة 72 ساعة، إذ تعمل هذه المستخلصات على إيقاف تعبير جين Bax و Bcl₂ الأمر الذي يؤدي إلى تحفيز آلية الموت المبرمج للخلايا Apoptosis [16].

ولقلة الدراسات حول فعالية نبات الراوند العراقي ضد مرض السرطان في العالم ، ولتوافر هذا النبات وتكيفه لظروف العراق البيئية ولعدم وجود مثل هذا البحث في العراق فقد هدفت الدراسة إلى ما يأتي نصه :

- دراسة تأثير المستخلص الخام النبات لراوند العراقي في خط خلايا سرطان الحنجرة البشري Hep-2 النامية في المختبر in vitro .

- دراسة تأثير المستخلص الخام لنبات الراوند العراقي في الوراثة الخلوية للخلايا للمفاوية البشرية.

المواد وطرائق العمل

أجريت التجارب في المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية/ الجامعة المستنصرية، بغداد/ العراق للمدة من 2011/1/15 حتى 2011 /6/1.

جمع النبات وتحضير المستخلص النباتي

تم الحصول على نبات الراوند كاملاً من العشب العراقي للنباتات والأعشاب الطبية / وزارة الصحة ، وصُنِف النبات من قبل الأستاذ الدكتور علي عيسى الموسوي أستاذ تصنيف النبات في معشب كلية العلوم / جامعة بغداد . طحنت الأوراق الجافة طحناً خشناً بواسطة جهاز الطحن، حفظت الأجزاء الطحونة في حاويات بلاستيكية نظيفة بعيداً عن الضوء والحرارة والرطوبة لحين الاستخدام . جرى تحضير المستخلص الخام باستخدام جهاز السكسوليت Soxhlet ، وبحسب طريقة [17] وباستخدام مذيب الميثانول (70% methanol). قُسم المستخلص إلى عدة أقسام وحفظ في قناني زجاجية معتمة ومحكمة السد تحت حرارة 4°C ، وأستخدم في مدة لا تزيد عن الثلاثة أشهر وعند الحاجة إليه تم تذويب 1 g من المستخلص الجاف في 10 ml من محلول دارى الفوسفات القاعدي (PBS) Phosphate Buffer ، وخفف باستخدام المحلول نفسه وعقم من خلال ترشيحه بورق ترشيح Whatman 1 ، ثم أعيد ترشيحه بورق ترشيح nalgen filter ذات ثقوب بسعة 0.45 µm ثم بورق ترشيح nalgen filter ذات ثقوب بسعة 0.22 µm.

تأثير المستخلصات الخام لأوراق الراوند في نمو خط خلايا سرطان الحنجرة البشري Hep-2 في المختبر

• تهيئة الخط الخلوي السرطاني

تم الحصول على الخط السرطاني Hep-2 لخلايا سرطان الحنجرة البشري الذي استلم من التمريرة 285 من المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية / الجامعة المستنصرية . وتم عمل المزارع الثانوية (Subculture or passage) لكل خط خلوي وتحت ظروف معقمة وبحسب طريقة [18]، تمت متابعة الخطوط الخلوية يوميا للتأكد من خلوها من أي تلوث ، وأن الخلايا بحالة جيدة وذلك بفحصها بواسطة المجهر القلوب Inverted microscope . تكون الخلايا جاهزة للاستخدام عندما تتكون عدة طبقات من الخلايا over growth . وعُدت الخلايا الحية باستخدام صبغة التريبان الزرقاء Trypan blue ، ثم حسبت الخلايا الحية باستخدام شريحة العد التفريقي Improved double Neubauer ruling [18].

• اختبار سُمِّيَّة المستخلص الخام لنبات الراوند في نمو خط خلايا سرطان الحنجرة Hep-2

حضرت أنياً سبعة تركيزات مخففة بشكل عشري من المستخلص الخام وكالاتي نصه: 0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml, 1 mg/ml, 10 mg/ml, 100 mg/ml استخدمت التركيزات المحضرة جميعها مباشرة بعد إكمال عملية التحضير. جُهز عالق الخلايا السرطانية من مزرعة ثانوية (بالتمريرة 290) عن طريق معاملة وعاء الزرع النسيجي حجم 50 cm³ بمحلول التريسين/فرسين المعقم (20 ml من محلول التريسين (1 g: 100 ml DW) : 10 ml من

محلول الفرسين (1 g Acetic Acid Ethylene Diamine: 100 ml DW : 370 ml PBS) ، ثم أضيف له 20 ml من الوسط الزراعي الجديد الخالي من المصل (SFM) المعقم (RPMI-1640 16.4 g : Sodium Bicarbonate 7.2 g gentamycin: 0.2 ml : أكمل إلى حجم 1 L بإضافة الماء المقطر ، تم مزج عالق الخلايا جيدا وتم نقل 0.2 ml إلى حفر طبق معايرة الزرع النسيجي ذي القعر المسطح باستخدام ماصة أوتوماتيكية دقيقة. ثم تمت تغطية سطح حفر الطبق بورق لاصق شفاف معقم خاص لهذا الغرض وحرك الطبق بلطف، تركت الأطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م° مدة تراوحت بين 12-18 ساعة للسماح بالتصاق الخلايا (Cell attachment) في الحفرة ، تم التخلص من الوسط الزراعي القديم في الحفر بعد رفع اللاصق ، وأضيف 0.2 ml من التركيزات المحضرة سابقاً من المستخلصات لكل حفرة وبواقع 4 مكررات لكل تركيز. تم ترك العمود الأول كسيطرة سالبة بدون إضافة المستخلص النباتي وأضيف 0.2 ml من الوسط الزراعي الخالي من المصل له حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م° في حاضنة بعد إعادة وضع طبقة جديدة من الورق اللاصق على سطح الطبق. ومراعاة أن تكون إضافة الوسط الزراعي والمستخلص بصورة سريعة [19].

استخدم اختبار (MTT assay) لكشف التأثير السمي الخلوي للمستخلص النباتي في الخلايا السرطانية حسب [20] بعد مرور مدة التعريض المحددة للحضن. إذ أخرجت الأطباق من الحاضنة وسكبت محتوياتها، وأضيف 28 µl من صبغة 2,5-(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazolium bromide (المحضرة بتركيز 2 µg/ml) إلى كل حفرة من حفر الطبق وأعيد حضنها بدرجة 37 م° مدة ساعتين. تم التخلص من الصبغة وأضيف محلول المادة المذيبة (DMSO) Dimethyl sulphoxide بحجم 130 µl لكل حفرة، وضعت الأطباق مدة 15 دقيقة بجهاز الهزاز (Microshaker)، ثم قُرأت الكثافة الضوئية عند طول موجي مقداره (492) نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي الخاص بأطباق المعايرة الدقيقة (ELISA microplate spectrophotometer). مع مراعاة أن يكون العمل بصبغة MTT بعيداً عن الضوء. تم تحديد التركيز السام للمستخلص الخام القاتل لنصف عدد الخلايا السرطانية (IC₅₀) وفقاً لما جاء في [21]. تم حساب معدل تثبيط نمو الخلايا السرطانية (I.R) Inhibitory Rate وفق المعادلة المشار إليها في [22] وكالاتي نصه:

$$IR \% = A - B / A \times 100$$

كما حُسب معدل تحفيز النمو (PR) Proliferation Rate وفقاً لـ [23]، وكالاتي:

$$PR \% = B / A \times 100$$

إذ أن:

IR = النسبة المئوية لمعدل التثبيط. PR = النسبة المئوية لمعدل التحفيز. A = الكثافة الضوئية للسيطرة السالبة. B = الكثافة الضوئية لمجموعة الاختبار.

تأثير المستخلص الخام لنبات الراوند في الوراثة الخلوية للخلايا اللمفاوية لدم الإنسان.

أولاً: دراسة تأثير تركيزات مختلفة من المستخلص الخام في دليل الانقسام الخلوي (MI) ومعامل التحول الأرومي (BI) والتشوهات الكروموسومية (C.A) تمت الخطوات اللاحقة جميعها ابتداء من عملية الزرع والحضن والحصاد والتقطير بعيداً عن الضوء. وجُهزت المحاليل وأجريت طرائق العمل على وفق [24] وكالاتي نصه:

• سحب العينات والزرع

- تم سحب عينات الدم بشكل عشوائي من اشخاص أصحاء تراوحت أعمارهم بين 20-30 عام بواسطة محقنة طبية حاوية على محلول الهيبارين وبمقدار 5 ml من كل شخص واستخدمت في التجارب حالاً، (جمعت العينات من عشرة أفراد). وذلك بإضافة 0.1 ml من مادة (PHA)

Phytohemagglutinin (المجهزة من شركة Sigma U.S.A) والمحضرة بتركيز $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ إلى أنابيب حاوية على 5 ml من الوسط الزراعي (RPMI Roswell Park Memorial Institute) (المجهزة من شركة Sigma/ U.S.A) والمضاف إليه البلازما (المجهزة من عينات دم (AB+) من مصرف الدم بغداد).

- أضيف 0.5 ml من الدم إلى محتويات كل انبوبة، ثم أضيف 0.1 ml من مادة برومو ديوكسي يوردين 5-Brdu (المجهزة من شركة Serva/ Germany) والمحضرة بتركيز $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ إلى الأنابيب المزروعة.
- ثم أضيف إلى عدد من الأنابيب تركيزات مختلفة من المستخلص النباتي المحضر، تم حساب تركيزات المستخلص النباتي بعد إضافتها إلى الوسط الزراعي وكانت التركيزات المستخدمة كالاتي نصح: $1 \text{ mg}/\text{ml}$ ، $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ، $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ وحضنت جميع الأنابيب في درجة حرارة 37 درجة مئوية.
- تركت مجموعة من الأنابيب من دون إضافة أي مستخلص نباتي، وعدت هذه العاملية كسيطرة سالبة، أضيف إلى مجموعة أخرى من الأنابيب المطفر مائتومايسين C (المجهزة من شركة Kogyo) وحضر بتركيز نهائي مقداره $50 \text{ ng}/\text{ml}$ عدت هذه العاملية كسيطرة موجبة، ثبتت 3 مكررات لكل تركيز نباتي.

• حصاد الخلايا

تمت إضافة 0.1 ml من مادة الكولجسين Colchicin المحضر بتركيز $0.05 \text{ mg}/\text{ml}$ (شركة Sigma/ U.S.A) إلى جميع الأنابيب وذلك قبل 10 دقائق من انتهاء وقت الزرع الأصلي، ثم أعيدت الأنابيب إلى الحاضنة. وطردت العينات في جهاز الطرد المركزي مدة 10 دقائق وبسرعة 2000 دورة في الدقيقة ثم تخلصنا من الرائق لترك الخلايا المترسبة مع قليل من الوسط الزراعي في قعر الأنبوبة، ثم تم رج الراسب جيداً، وإضيف $5 - 10 \text{ ml}$ من كلوريد البوتاسيوم 0.075 M (الدايف) إليه تدريجياً وبهدوء مع الرج المستمر. حضنت العينات في حمام مائي هزاز مدة 25 دقيقة وبدرجة 37 مئوية. ونقلت العينات إلى جهاز الطرد المركزي مدة 10 دقائق وبسرعة 2000 دورة في الدقيقة وتم التخلص من الرائق.

• التثبيت fixation والغسل washing والتقطير dropping

رُج الراسب جيداً وأضيف إليه بضعة قطرات من المثبت fixitive المحضر آنيا من مزج ثلاثة حجوم من الميثانول المطلق مع حجم واحد من حامض الخليك الثلجي glacial acetic acid (شركة England/BDH) على جدار الأنبوبة مع الرج المستمر وأكمل إلى حجم 5 ml . خلطت العينات بواسطة الرج vortex ثم وضعت الأنابيب في الثلجة مدة 90 دقيقة. ثم طردت العينات في جهاز الطرد المركزي مدة 10 دقائق وبسرعة 2000 دورة في الدقيقة، تم التخلص من الرائق لترك الخلايا المترسبة. أعيدت عملية التثبيت عدة مرات لحين ظهور اللون الرائق للعالق، وكمرحلة أخيرة أضيف المثبت بمقدار 1 ml بعد آخر غسل. ثم حضرت شرائح جديدة ونظيفة وخالية من الدهون بوضعها في chromic acid مدة ثلاثة أيام أخرجت وغسلت بتيار من الماء الحار وبشكل جيد ثم بماء بارد وحفظت في الماء المقطر البارد غير المجمد. مزجت الخلايا جيداً قطرت الخلايا على الشرائح الباردة باستخدام ماصة Pasteur pipette من مسافة $0.5 - 1 \text{ ml}$ وتركت لتجف.

• التصبيغ والفحص المجهرى

صبغت قسم من الشرائح بطريقة التربسين Trypsin للحصول على الكروموسومات بشكل G-Banding من أجل احتساب التشوهات الكروموسومية (C.A) باستخدام التربسين وصبغة كمزا بحسب طريقة [24]. وترك القسم الآخر من الشرائح من دون تصبيغ.

ثانياً: اختبار تأثير المستخلص الخام في تبادل الكروماتيدات الشقيقة (SCE) ودالة معامل التضاعف (RI) وحساب دورة توالي الخلية (CCP)

اتبعت الطريقة الواردة في الفقرة أولاً مع الاختلافات الآتي نصها :

- في الفقرة أولاً وأثناء حصاد الخلايا، تمت إضافة 0.1 ml من مادة الكولجسين المحضر بتركيز 0.05 mg/ml (شركة Sigma U.S.A) إلى جميع الأنابيب قبل ساعتين من انتهاء وقت الزرع الأصلي، ثم أعيدت الأنابيب إلى الحاضنة وأكملت الخطوات كما هو موضح في الفقرات السابقة .

- صبغ القسم المتبقي من الشرائح باستخدام صبغة دابي Dapi stain المحضرة من إذابة 5 g من صبغة دابي Dapi stain في نصف لتر من داريء الفوسفات، وحفظ في 20- م⁵ لحين الاستخدام بعد تعقيمها في أوراق ترشيح ذات ثقوب بقطر 0.22 Mm وعند الاستخدام غُمرت الشريحة بالصبغة وتركت مدة 10 دقائق لتغسل بعدها بمحلول الفوسفات القاعدي Alkaline phosphate buffer المحضر بإذابة (28.2 g) من فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين و(31.2 g) من فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين و(76.05 g) من فوسفات الصوديوم في لتر من الماء وضبط الأس الهيدروجيني إلى 11 . وتم تغطيتها بأغطية الشريحة وفحصها تحت المجهر المتفلور (Fluorescence microscope) على طول موجي تراوح بين (360 – 390) نانوميتر.

تم احتساب التحليلات الوراثية الآتية:

• دليل انقسام الخلايا (MI)

تم حساب معامل الانقسام الخلوي بحسب طريقة [25] إذ قسمت الخلايا التي هي في طور الانقسام metaphase على العدد الكلي للخلايا المفحوصة لـ (1000) خلية كما في المعادلة الآتي نصها :

$$MI = \text{No. of mitotic cells} / 1000 \times 100$$

• معامل التحول الأرومي (BI)

هو النسبة بين الخلايا التي تم تحفيزها بالمشطر (PHA) وتلك غير المحفزة في (1000) خلية، [26].

$$BI = \text{No. Blast cells} / 1000 \text{ cells} \times 100$$

• حساب دورة توالي الخلية (CCP)

تم حساب 100 خلية وحُددت النسبة المئوية للخلايا المارة في الأطوار الانقسامية M₁, M₂, M₃ [27].

• حساب دالة معامل التضاعف (RI)

تم حساب 100 خلية مارة في الأطوار الانقسامية M₁, M₂, M₃ وبحسب معامل التضاعف على وفق ما ذكره [28] كما في هذه المعادلة الآتية:

$$RI = \{1(M_1) + 2(M_2) + 3(M_3)\} / 100$$

• التشوهات الكروموسومية (C.A)

تم احتساب التشوهات الكروموسومية في 50 خلية منتشرة بشكل جيد على الشريحة الزجاجية وهي في طور الاستوائي metaphase [24].

• تبادل الكروماتيدات الشقيقة (SCE)

تم حسابه في 50 خلية منتشرة بشكل جيد على الشريحة الزجاجية وهي في طور الانقسام M₂ [29].

حُللت النتائج إحصائياً باستخدام برنامج الحقيبة الإحصائية للعلوم الاجتماعية (SPSS) Statistical Package for Social Sciences V.(11.5) بتطبيق تحليل التباين أحادي الاتجاه (ANOVA) باستخدام اختبار أقل فرق معنوي Least Significant Differences (L.S.D) بمستوى احتمالية (P ≤ 0.05) و (P ≤ 0.01) واستخدم اختبار "ت" (T test) .

النتائج

اختبار سُمية المستخلص الخام لنبات الراوند في نمو خط خلايا سرطان الحنجرة Hep-2 بعد اختبار الكشف عن التأثيرات السمية لمادة ما في الخلايا السرطانية في الزجاج أحد التقانات المهمة التي يتم اعتمادها مبدئياً في التحري عن امتلاك تلك المواد تأثيراً قاتلاً تجاه هذه الخلايا الخبيثة، التي قد تعقد عليها الآمال كعلاجٍ مستقبلي. تم في هذه الدراسة التحري عن مدى على خلايا سرطان الحنجرة Hep-2 ، وفي مدتين زمنيتين للتعريض (3، 6) أيام، وعوملت هذه الخلايا وهي بالتمريرة (290) إلى سلسلة تخافيف عشرية من المستخلص بتركيزات تدرجية تراوحت بين 0.1 µg/ml – 100 mg/ml. وفحصت تحت جهاز الأليزا وتم حساب التركيز السُمي القاتل لنصف عدد الخلايا السرطانية CC₅₀.

و جاء التأثير التثبيطي للمستخلص الخام لنبات الراوند طفيفاً عند حضان المستخلص مع الخلايا مدة 3 أيام ، إذ تمكنت نسبة كبيرة من الخلايا من مقاومة التأثير السمي للمستخلص والبقاء حية، حتى وصلت نسبة التثبيط (3.875 %) عند التركيز الواطيء 0.1 µg/m ، بينما كانت أفضل نسبة تثبيط تم الحصول عليها عند استخدام التركيز 100 µg/ml الذي أدى إلى قتل 27.5 % من الخلايا فقط، ثم بدأ التأثير التثبيطي يقل عند التركيز الأعلى منه. وبالعكس فقد ازدادت حيوية الخلايا السرطانية عند استخدام التركيز العالي وبمعدل تحفيز نمو قدر ب 46.15 % (الجدول 1).

جدول (1) التأثير السُمي للمستخلص الخام لنبات الراوند في خط خلايا سرطان الحنجرة البشري Hep-2 ومدة تعريض 72 ساعة حضان.

التركيز	% C.V
100mg/ml	146.154 ± 0.007 ^{E**}
10mg/ml	89.023 ± 0.028 ^M
1mg/ml	78.54 ± 0.012 ^{AL}
100µg/ml	72.5 ± 0.017 ^{AL*}
10µg/ml	91.24 ± 0.02 ^{BL}
1µg/ml	85.254 ± 0.003 ^{AM}
0.1µg/ml	96.125 ± 0.016 ^{AB}
0	100 ^{AM}

* معنوي عند مستوى احتمالية (P ≤ 0.01) قياساً بالسيطرة.

** معنوي عند مستوى احتمالية (P ≤ 0.001) قياساً بالسيطرة.

الأشارة C.V تعني النسبة المئوية لحيوية الخلايا.

الأرقام التي تأخذ الحرف نفسه عمودياً غير معنوية عند مستوى (P ≤ 0.05) والعكس صحيح.

كل قراءة تمثل الوسط الحسابي ± الانحراف المعياري لثلاثة مكررات.

أشارت النتائج الموضحة في الجدول (2) إلى وجود تأثير سمي عالٍ عند استخدام المستخلص بالتركيزات التي تراوحت بين 0.1 µg/ml - 10 mg/ml ، فقد وجدت فروق معنوية بمستوى احتمالية (P ≤ 0.01) بينها وبين السيطرة وذلك عند زيادة مدة حضان المستخلص مع الخلايا مدة 6 أيام، ولم يوجد تباين في التأثير السمي بين التركيزات المستخدمة الأدنى من 10 mg/ml إذ سجلت نسب تثبيط متقاربة جداً في ما بينها وبشكل غير معنوي (P ≤ 0.05). أما التركيز العالي 100 mg/ml فقد ازدادت حيوية الخلايا السرطانية وبمعدل تحفيز نمو قدر ب 25.15 % .

لحظ وجود تباين في التأثير السمي عند مقارنة تأثير أطالة مدة تعريض الخلايا السرطانية للمستخلص مدة (3، 6) أيام ولجميع التركيزات ، فكانت التركيزات جمعياً المستخدمة من المستخلص أكثر سمية عند حضانها مدة 6 أيام وبمعنوية عالية (P ≤ 0.01) بالمقارنة مع الحضان مدة 3 أيام. إذ

كان التركيز السام للمستخلص الخام القاتل لنصف عدد الخلايا السرطانية IC₅₀ هو 0.063 µg/ml عند حضان المستخلص مدة 6 أيام مع الخلايا. بينما لم يتم الحصول على تركيز قاتل لنصف عدد الخلايا عند معاملتها بتركيزات مختلفة من المستخلص مدة 3 أيام، وكانت أفضل نسبة قتل تم الحصول عليها عند استخدام التركيز 100 µg/ml الذي أدى إلى قتل 27.5 % من الخلايا فقط. .
ويلحظ من الشكل (1) أن المستخلص الخام قد عمل في اتجاهين متعاكسين ، وذلك بحصول زيادة في نمو الخلايا السرطانية عند استخدام أعلى تركيز 100 mg/ml ولكلتا المعاملتين وكانت نسبة الزيادة في النمو 46.154 % و 25.15 % عند معاملة الخلايا مدة 3 و 6 أيام على التوالي، في حين أدت جميع التركيزات الأدنى منه إلى نسب قتل متباينة. تسمى هذه الحالة بالتضادية في تأثير الجرعات (Hormesis) Hormetic effect.

جدول (2) التأثير السُمي للمستخلص الخام لنبات الراوند في خط خلايا سرطان الحنجرة البشري Hep-2 مدة تعريض 6 أيام

التركيز	% C.V
100 mg/ml	125.15 ± 0.006 ^A
10 mg/ml	30.962 ± 0.026 ^{B*}
1 mg/ml	23.431 ± 0.004 ^{B***}
100 µg/ml	22.176 ± 0.013 ^{B***}
10 µg/ml	21.757 ± 0.012 ^{B***}
1 µg/ml	22.176 ± 0.013 ^{B***}
0.1 µg/ml	20.921 ± 0.002 ^{B***}
0	100 ^A

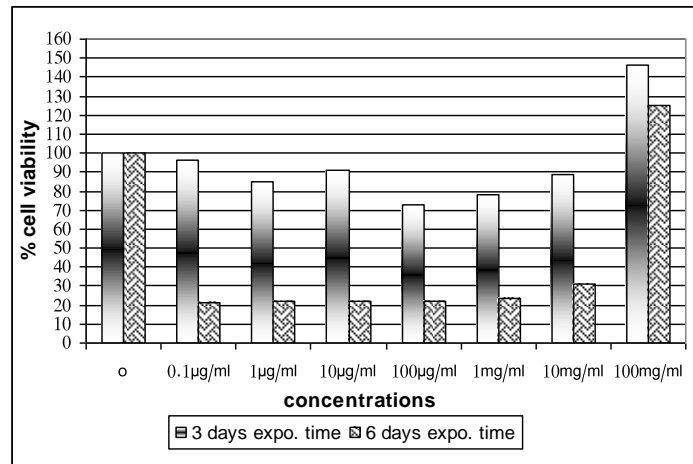
* معنوي عند مستوى احتمالية (P ≤ 0.05) قياساً بالسيطرة.

** معنوي عند مستوى احتمالية (P ≤ 0.01) قياساً بالسيطرة.

الإشارة C.V تعني النسبة المئوية لحيوية الخلايا.

الأرقام التي تأخذ الحرف نفسه عموديا غير معنوية عند مستوى (P ≤ 0.05) والعكس صحيح.

√ كل قراءة تمثل الوسط الحسابي ± الانحراف المعياري لثلاثة مكررات.



شكل (1) مقارنة لتأثير إطالة مدة تعريض خلايا سرطان الحنجرة البشري Hep-2 للمستخلص الخام لنبات الراوند

تأثير المستخلص الخام لنبات الراوند في الوراثة الخلوية للخلايا اللمفاوية لدم الإنسان. أولاً: دراسة تأثير تركيزات مختلفة من المستخلص الخام في دليل الانقسام الخلوي (MI) ومعامل

التحول الأرومي (BI) والتشوهات الكروموسومية (C.A)

أشارت النتائج الموضحة في الجدول (3)، إلى أن المستخلص الخام للنبات سبب انخفاضاً غير معنوي ($P > 0.01$) في قيمة دليل الانقسام الخلوي M.I. ومعامل التحول الأرومي B.I. عند استخدام التركيزين الواطي والمتوسط بينما كان هذا الانخفاض معنوياً عند التركيز العالي. دلت نتائج الجدول (4) إلى ظهور خللاً في التركيب الكروموسومي وللتكريرات المستخدمة في التجربة كلها وكانت التشوهات الكروموسومية تركيبية تمثلت بوجود حذف كروموسومي، وكسور كروموسومية وكروموسومات ثنائية السنترومي، ولكن هذه التغيرات كانت غير معنوية بمستوى احتمالية ($P \leq 0.01$) عند مقارنتها بالسيطرة السالبة، يلحظ (شكل 2). أدت معاملة الخلايا بعقار المايتومايسين C إلى ظهور خلل في التركيب الكروموسومي بظهور تكرار عالٍ في التغيرات الكروموسومية CA بشكل معنوي عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.01$) قياساً بالسيطرة السالبة، وتمثلت بوجود كسور كروماتيدية وكروموسومية فضلاً عن حدوث تكرار عالٍ من حالات الحذف الكروموسومي والإضافة، ووجدت حالات من الكروموسومات ثنائية السنترومي.

جدول (3) تأثير المستخلص الخام لنبات الراوند في دليل الانقسام الخلوي M.I. ومعامل التحول الأرومي B.I. للخلايا اللمفاوية البشرية ومدة تعريض 72 ساعة .

التركيز	M.I (mean \pm S.D)	B.I (mean \pm S.D)
1 mg/ml	0.28 ^D	2.151 \pm 1.825 ^D
100 μ g/ml	2.806 \pm 0.268 ^A	43.414 \pm 5.34 ^A
10 μ g/ml	2.632 \pm 0.174 ^A	33.863 \pm 6.05 ^A
C ⁻	3.169 \pm 0.243 ^A	40.577 \pm 8.094 ^A
C ⁺	0.46 \pm 0.0240*	02.49 \pm 0.1968*

الأرقام التي تأخذ الأحرف نفسها عمودياً غير معنوية عند مستوى ($P \leq 0.01$) والعكس صحيح.

√ كل قراءة تمثل الوسط الحسابي \pm الانحراف المعياري لثلاث مكررات.

الإشارة C⁺ هي السيطرة الموجبة مضافاً إليها مادة المايتومايسين C المطفرة. والإشارة C⁻ هي السيطرة السالبة.

جدول (4) تأثير تركيزات مختلفة من المستخلص الخام لنبات الراوند في التغيرات الكروموسومية C. A

C. A/ B	C. A/ A	C. A						B	A	التركيز
		Dic.	Del.	Add.	Br. Chrom.	Br. Chrt.	Num. Chrom.			
1.334	* 0.48	1	4	0	4	15	0	18	50	1 mg/ml
1.75	* 0.667	2.381	21.429	0	0	9.524	0	19.05	50	100 μ g/ml
1.22	0.22	0	3	0	0	8	0	9	50	10 μ g/ml
1	0.16	0	7	0	0	1	0	8	50	C ⁻
* 2.2	*0.44	2	11	1	4	4	0	10	50	C ⁺

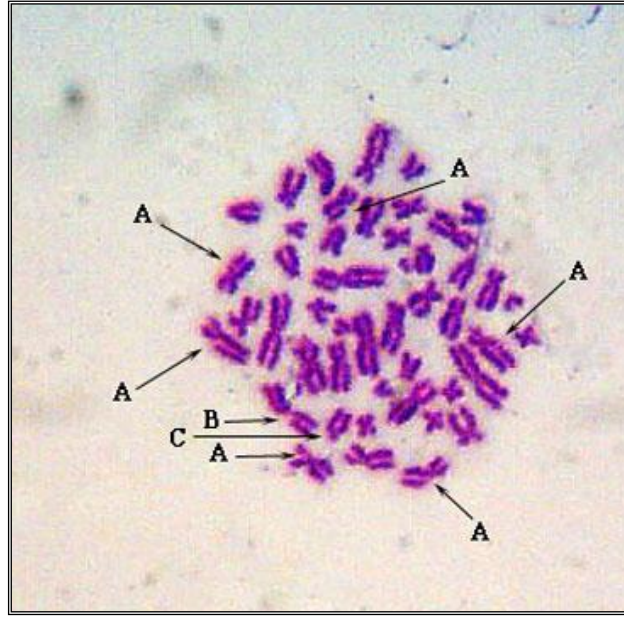
الإشارة A تعني عدد الخلايا الفحوصية. الإشارة B تعني عدد الخلايا المتضررة.

الإشارة C⁺ تعني السيطرة الموجبة المضاف إليها مادة المايتومايسين C المطفرة. والإشارة C⁻ تعني السيطرة السالبة.

Num. Chrom. تعني تغيرات عددية في الكروموسوم، Br. Chrt. تعني كسر كروماتيدي، Br. Chrom. تعني كسر

كروموسومي، Add. تعني إضافة، Del. تعني حذف، Dic. تعني ثنائي السنترومي.

* معنوي عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.01$) قياساً بالسيطرة السالبة.



شكل (2) تبين التغيرات الكروموسومية التركيبية A في الخلايا للمفاوية البشرية عند معاملتها بالتركيز العالي من المستخلص الخام لنبات الراوند ، الإشارة A تعني كسر كروماتيدي، و B تعني كسر كروموسومي ، و C تعني حذف (100 X).

ثانياً: اختبار تأثير المستخلص الخام في تبادل الكروماتيدات الشقيقة (SCE) ودالة معامل

التضاعف (RI) وحساب دورة توالي الخلية (CCP)

أدت معاملة الخلايا للمفاوية بالتركيز 100 µg/ml من المستخلص الخام إلى تسريع دورة الخلية وتقدمها ، إذ لحظ أن عدد الخلايا المتوقفة في مرحلة M₃ أكثر من خلايا السيطرة المتوقفة في المرحلة نفسها، وازدادت قيم معامل التضاعف RI بشكل غير معنوي قياساً بالسيطرة ، ولكن رافق ذلك حدوث زيادة معنوية (P ≤ 0.01) في معدلات تبادل الكروماتيدات الشقيقة . بينما لحظ بطء في دورة الخلية وانخفاض معامل التضاعف RI بشكل معنوي بمستوى احتمالية (P ≤ 0.01) عند معاملة الخلايا بالتركيزين العالي والواطيء مع حدوث خلل في التركيب الكروموسومي تمثل بزيادة تكرار معدلات تبادل الكروماتيدات الشقيقة وكانت هذه الزيادة معنوية عند التركيز العالي وغير معنوية عند استخدام التركيز الواطيء .

كما أدى استخدام عقار المايتومايسين C إلى حدوث زيادة معنوية في معدل تبادل الكروماتيدات الشقيقة وبطء في دورة الخلية وانخفاض معامل التضاعف قياساً بالسيطرة، الجدول (5).

جدول (5) تأثير المستخلص الخام لنبات الراوند في تبادل الكروماتيدات الشقيقة SCE ودالة معامل التضاعف RI ودورة توالي الخلية (CCP) للخلايا للمفاوية في دم الإنسان.

R.I	CCP			SCE/cell	C. A/ cell	التركيز
	M ₃	M ₂	M ₁			
1.77 ± 0.54 *	23.1	30.8	46.1	4.75 ± 0.41 *	0.48 *	1 mg/ml
2.216 ± 0.287	50.050	21.450	28.5	4.667 ± 0.31 *	0.667 *	100 µg/ml
1.733 ± 0.65 *	19.98	33.3	46.72	4.6 ± 0.96	0.22	10 µg/ml
2.001 ± 0.993	26.68	46.69	26.63	4.429 ± 1.56	0.16	C ⁻
1.51 ± 0.057*	10.7	30.2	59.1	12.93 ± 0.6 *	0.44 *	C ⁺

* معنوي عند مستوى احتمالية (P ≤ 0.01) قياساً بالسيطرة السالبة.
√ كل قراءة تمثل الوسط الحسابي ± الانحراف المعياري لثلاثة مكررات.
C⁺ تعني السيطرة الموجبة المضاف إليها مادة المايتومايسين C المطفرة. والإشارة C⁻ تعني السيطرة السالبة.

المناقشة

بعد اختبار كشف التأثيرات السمية لمادة ما في الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي أحد التقانات المهمة التي يتم الاعتماد عليها مبدئياً في التحري عن امتلاك تلك المواد تأثيراً قاتلاً تجاه هذه الخلايا الخبيثة، التي قد تعقد عليها الآمال كعلاجٍ مستقبلي. تمّ في هذه الدراسة التحري عن تأثير المستخلص الخام لنبات الراوند على خلايا سرطان الحنجرة Hep-2 ، وفي مدتين زمنيتين للتعرض (3، 6) أيام.

لحظ وجود تباين في التأثير السمي عند مقارنة تأثير إطالة مدة تعريض الخلايا السرطانية للمستخلص مدة (3، 6) أيام وللتركيزات كلها ، فكانت التركيزات جميعها المستخدمة من المستخلص أكثر سمية عند حضنها مدة 6 أيام وبمعنوية عالية ($P \leq 0.01$) قياساً بالحضن مدة 3 أيام. إذ كان التركيز السام للمستخلص الخام القاتل لنصف عدد الخلايا السرطانية CC_{50} هو $0.063 \mu\text{g/ml}$ عند حضن المستخلص مدة 6 أيام مع الخلايا. بينما لم يتم الحصول على تركيز قاتل لنصف عدد الخلايا عند معاملتها بتركيزات متفاوتة من المستخلص مدة 3 أيام إذ جاء التأثير التثبيطي للمستخلص طفيفاً عند هذه المدة من الحضن ، وكانت أفضل نسبة قتل تم الحصول عليها عند استخدام التركيز $100 \mu\text{g/ml}$ الذي أدى إلى قتل 27.5 % من الخلايا فقط إذ تمكنت نسبة كبيرة من الخلايا من مقاومة التأثير السمي للمستخلص والبقاء حية.

لقد درس تأثير المستخلص الخام لجذور نبات الراوند من باحثين قليلين في تركيا وإيران وأثبتوا فعاليته كنبات مضاد لأنواع معينة من الخطوط الخلوية السرطانية التي اعتمد بالدرجة الأساس على عاملي التركيز والمدة الزمنية التي تتعرض فيها الخلايا للمستخلص. وفي هذا المجال ذكر [16] أن للمستخلص المائي الخام لبراعم نبات الراوند وجذورها تأثير تثبيطي لخط خلايا HL60 لسرطان سليفة الأرومة النقوية البشري وذلك عند حضنها مع المستخلصات الخام مدة 72 ساعة، وبلغ التركيز القاتل لنصف عدد الخلايا السرطانية $145.01 \mu\text{g/ml}$ ، $127.15 \mu\text{g/ml}$ لكل من مستخلصات البراعم والجذور على التوالي وأن هذه القابلية المضادة لسرطان تعود إلى تحفيزهما لآلية الموت المبرمج للخلايا من خلال التأثير في تعبير كل من جيني Bax و Bcl-2.

يحتوي نبات الراوند العراقي على عدة مركبات هيدروكربونية أكلايكونية من نوع Anthraquinen تعد الأساس في تكوين أنواع من الكلايكوسيدات ومنها: Emodin ، Aloe-emodin ، Rhein وهي مركبات فعالة في تثبيط نمو الخطوط الخلوية السرطانية ووقف انبثاقها إلى أماكن أخرى من الجسم فضلاً عن قابليتها على تحفيز آلية الموت المبرمج للخلايا [8]. فمثلاً يعزى لمركب الأيمودين Emodin وهو المركب الأساس في جنس الراوند [7] ، قابلية هذه النباتات كمضادات لسرطان الكبد والرئة والغدة اللبنية البشري وذلك في تجارب خارج الجسم الحي [30]. فعند استخدام هذا المركب بتركيز $50 \mu\text{M}$ يؤدي إلى تحرير cytochrom c وتحفيز كل من الكاسبيزات: caspase 9, 3, 2 الذي يؤدي إلى حث الموت الخلوي المبرمج لخط A549 لخلايا السرطانة الغدائية الرئوية البشري Adenocarcinoma ، وهذا يترافق مع انهيار غشاء المايتوكونديا وتثبيط Bcl-2 [31]. وله تأثير في قمع عاملي HUVECs و VEGF-A (والأخير عامل مهم في تكوين الشعيرات الدموية المجهرية لخلايا أدمة الإنسان) من خلال تثبيطه للمستقبل الخاص بهما، كما أنه يوقف دورة الخلية السرطانية عند الطور G0/G1 بتثبيط تعبير كل من E, Cyclin D1، وتثبيط فسفرة بروتين retinoplastoma ومايتوجين P38 [32]. من جانب آخر، وجد أن لهذا المركب المعزول من نوع آخر يدعى الراوند الطبي تأثيراً في عمل: PKC ، بروتين كينيز P13K وعامل NF-kappaB [33]. وذكر [34] أن المركب آنف الذكر قد ثبط من نمو خلايا SH-Sy5y لسرطان الخلايا العصبية البشري neroblastoma وأوقف هجرة وغزو هذه الخلايا إلى أماكن أخرى من الجسم ، من خلال تثبيطه للبروتينات التالية: GRB2, COX2, P-P38, P-C-jin, MMP2, MMP9, MMP7، ولكنه

يثير بروتينات أخرى : PKC, P13K, MEKK₃, NF-KBp₆₅ لها دور في تثبيط انتشار الخلايا السرطانية.

وقد تعزى فعالية النبات في تثبيط الخلايا السرطانية إلى وجود مركب Aloe-emodin (وهو المركب الرئيس الثاني في النبات [7]، فقد ذكر [35] أن هذا المركب يؤدي إلى زيادة تعبير جيني P₂₁ و P₅₃ مما أدى إلى إيقاف دورة الخلية عند الطور G₁ فضلاً عن زيادة واضحة في تعبير جين Bax الأمر الذي يفضي إلى موت خلايا HepG₂ و Hep3B لخلايا سرطان الكبد البشري. وأوضح [36] أن مركب Aloe-emodin يحفز موت الخلايا المبرمج لخلايا C 6 glioma في الجرذان بتثبيطه الكاسبيزات كما أنه يثبط كايينز ERK1/2 .

وربما تعود فعالية النبات التثبيطية إلى وجود مركب Rhein الفعال ضمن تركيب النبات [3] فذكر [31] أنه فعال في امتصاص الكلوكوز من الخلايا السرطانية مسبباً تغيرات في الغشاء الخلوي واختلال وظائفه مما يؤدي إلى موتها.

ولحظ أن المستخلص الخام قد عمل في اتجاهين متعاكسين إذ حصلت زيادة في نمو الخلايا السرطانية عند استخدام أعلى تركيز 100 mg/ml ولكلتا المعاملتين وكانت نسبة الزيادة في النمو 46.154 % و 25.15 % عند معاملة الخلايا مدة 3 و 6 أيام على التوالي، في حين أدت التركيزات الأدنى منه كلها إلى نسب قتل متفاوتة. تسمى هذه الحالة بالتضادية في تأثير الجرعات وهي ظاهرة بايولوجية شائعة في علم السموم ، تمتاز بوجود تعاكس لعمل الجرعات الواطئة قياساً بالجرعات العالية [37] . يتم الافادة من ظاهرة التضادية في تأثير الجرعات من الجرعات الواطئة لبعض المركبات السامة أو الملوثة في علاج بعض الأمراض المستعصية كالسرطان والزهايمر ومرض باركنسون إذ إن للجرعات الواطئة من بعض المركبات القدرة على قتل الخلايا السرطانية دون التأثير في الخلايا الطبيعية ، وقد تُعزز في أحيان أخرى عمل المركبات المضادة للسرطان ويمنع قسم منها بعض أنواع السرطانات السامة جينياً من أحداث السرطان ، بينما تكون الجرعات العالية محفزة للنمو [38] .

أشارت النتائج إلى أن المستخلص الخام قد سبب انخفاضاً غير معنوي في قيمة دليل الانقسام الخلوي ومعامل التحول الأرومي عند استخدام التركيزين الواطئ والمتوسط بينما كان هذا الانخفاض معنوياً عند التركيز العالي . وظهر خلل في التركيب الكروموسومي للتركيزات المستخدمة في التجربة تمثل بزيادة غير معنوية للتشوهات الكروموسومية التركيبية، وزيادة في تكرار معدلات تبادل الكروماتيدات الشقيقة. أدت معاملة الخلايا للمفاوية بالتركيز الوسطي من المستخلص الخام إلى تسريع دورة الخلية وتقدمها ، إذ لحظ أن عدد الخلايا المتوقفة في مرحلة M₃ أكثر من خلايا السيطرة المتوقفة في المرحلة نفسها، وازدادت قيم معامل التضاعف بشكل غير معنوي قياساً بالسيطرة. وحدث العكس من ذلك تماماً عند التركيزين العالي والواطئ.

جاءت نتائج هذا الجانب من الدراسة متوافقة مع ما توصلت إليه إحدى الدراسات العراقية حول التأثيرات السمية للمستخلص الخام لنبات الراوند على الوراثة الخلوية داخل الجسم الحي، فذكر [39] عدم وجود تأثيرات تطهيرية لكروموسومات نقي عظم الفئران المختبرية وذلك عند تجريعها بـ 150 mg/kg, 100 mg/kg من المستخلص المائي الخام لجذور النبات ، بل بالعكس كانت لهما قدرة تثبيطية عالية مضادة لفعل المطفر gemcitabine وذلك عند استخدامهما معاً. أن الزيادة الملحوظة في تكرار معدلات تبادل الكروماتيدات الشقيقة قد تعود إلى احتواء النبات على مركب الـ Aloe-emodin (وهو المركب الرئيس الثاني في النبات) والتي ذكرت عدة أبحاث أنه مركب سام خلوي في تجارب خارج الجسم الحي مسبباً ضرراً للمادة الوراثية ولكنه غير سام عند استخدامه في تجارب أجريت داخل الجسم على نقي عظم الهامستر الصيني [40]. أو قد تعود إلى احتواء النبات على الإيمودين إذ ذكر [41] أن هذا المركب يؤدي إلى حدوث أضرار في المادة الوراثية لخلايا HepG₂ عند استخدامه

بتركيز $100 \mu\text{m}$. كما أنه يوقف الدورة الخلوية عند الطور S لخط LO_2 لخلايا الكبد الطبيعية مسببة أضراراً فيها [42].

ويمكن أن نستنتج من نتائج البحث الحالي أن أغلب تركيزات المستخلص الخام سامة لخط خلايا Hep-2 عند الحضانة لمدة 6 أيام في حين كان التأثير التثبيطي لهذه التركيزات طفيفاً عند حضانة الخلايا مع المستخلص لمدة 3 أيام، واستطاعت نسبة كبيرة من الخلايا البقاء حية. وأشارت نتائج تحليلات الوراثة الخلوية للخلايا للمقاوية لدم الإنسان إلى سمية واضحة للمستخلص عند التركيزات العالية بينما لم يظهر التركيز الواطئ خلالاً في التركيب الكروموسومي.

وعلى وفق ما جاء في البحث الحالي، يُوصى بعزل وتنقية المركبات الفعالة الموجودة في نبات الراوند ودراسة تأثيرها في حيوية الخلايا السرطانية. ودراسة ميكانيكية التأثير التثبيطي فيها فضلاً عن دراسة التأثيرات السمية داخل جسم الكائن الحي للتأكد من سلامة استخدام هذا العشب في الطب الشعبي.

خالص شكري وتقديري للأستاذ الدكتور ناهي يوسف ياسين/ المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية / الجامعة المستنصرية / بغداد / العراق الذي وفر سبل إنجاح هذا العمل.

المراجع

1. Akyuz, C. and Tosun, F. 1997. Flavonoids of Rheum ribes L. plants. Chem. Cong. Van Turkey. 11: 658-660.
2. مجيد، سامي هاشم ومهند جميل محمود. 1988. النباتات والأعشاب العراقية بين الطب الشعبي والبحث العلمي. قسم العقاقير وتقييم الأدوية/ مركز بحوث علوم الحياة/ مجلس البحث العلمي. 274 صفحة.
3. Tuzlac, E.; A.; Meriçli, H. 1991. Some studies on Isgın (Rheum ribes) and its distribution in Turkey. Proceeding of the 9th Symposium on Plant Drugs. Eskisehir, Turkey. 336-341.
4. Zargari A. 1991. Medicinal Plants. Tehran University Press. 14, (5th Ed.). 233-241.
5. Vural, H.; Esiyol, D.; Duman, K. 2000. Cultivated vegetable (vegetable protection). Ege. University Press, Bornova, Izmir. 74-78.
6. Baytop, T. 1999. Therapy with Medicinal Plants in Turkey. Nobel Tıp Kitabevleri: Istanbul. (2nd Ed.). 319-320.
7. Alaadin, M.; Al-Khateeb, E. H.; Jäger, A. K. 2007. Antibacterial Activity of the Iraqi Rheum ribes Root. Pharmac. Bio. 45: 688 – 690.
8. Öztürka, M.; Aydoğmuş-Öztürkb, F.; Duruc, M. E.; Topçud, G. 2007. Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (Rheum ribes): An edible medicinal plant Food Chemistry. 103: 623-630.
9. Ozcan, M. M.; Dursun, N.; Arslan, D. 2007. Some nutritional properties of Prangos ferulacea (L.) Lindl and Rheum ribes L. stems growing wild in Turkey. Int. J. Food Sci. Nutr. 58: 162-7.
10. Ozgen, U.; Kaya, Y.; Houghton, P. 2012. Folk medicines in the villages of Ilca District (Erzurum, Turkey). Turk. J. Biol. 36 : 93-106.

11. Sindhu, R. K.; Kumar, P.; Kumar, J.; Kumar, A.; Arora, S. 2010. Investigation into the antiulcer activity of *Rheum ribes* L. leaves extracts. *Int. J. Pharm. Sci.* 2 (4): 90-93.
12. Sayyah, M.; Boostani, H.; Malayeri, A.; Siahpoosh, A. 2011. Efficacy of hydroalcoholic extract of *Rheum ribes* L. in treatment of Obsessive compulsive disorder: A double blind clinical trial. *J. Pharm. Biomed. Sci.* 1(3): 57- 61.
13. Özbek, H.; Ceylan1, E.; Kara, M.; Özgökçe, F.; Koyuncu, M. 2004. Hypoglycemic effect of *Rheum ribes* roots in alloxan induceddiabetic and normal mice. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* 31:113-115.
14. Hudson, J. B.; Lee, M. K.; Sener, B.; Erdemglu, N. 2000. Antiviral activity in extracts Turkish medicinal plants. *Pharmac. Biol.* 38: 171-175.
15. Bazzaz, b. S. F.; Khajehkarmamadin, M.; Shokooheizadeh, H. R. 2005. Invetro antibacterial activity of *Rheum rhibes* extracts obtained from various plant parts against clinical isolates of Gram N agents. *Iranian J. Pharma. Res.* 2: 87-91.
16. Vyar, P.; Ozgokce, F.; Coruh, N.; Isca, M. 2008. Antiproliferation and induction of apoptosis by *Rheum ribes* on HL-60 human acute poromyelblastic leukemia cell line. *Mutidipliner Kanser Arastuma Sewpozyumn.* 2: 24-27.
17. Simandi, B.; Kery, A.; Kristo, S. T.; Andras, C.; Prechi, A.; Fekete, J. 2001. Supercritical fluid extraction of non-volatile terpenoids from medicinal plants. *Acta. Pharm. Hung.,* 71: 318-324.
18. Freshney, R. I. 2000. Culture of animal cells: A manual for basic technique (4th Ed.). Wiley-liss, A. John wiley & sons, Inc. Publication, New York. pp. 566.
19. Freshney, R.L. 2001. Application of cell culture to toxicology. *Cell Biology and Toxicology,* 17: 213 -230.
20. Betancur-Galvis, L.; Morales, G.E.; Forero, J. E.; Roldan, J. 2002. Cytotoxic and Antiviral Activities of Colombian medicinal Plant Extracts of the *Euphorbia* Genus. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz., Rio de Janeiro.* 97: 541-6.
21. Masters, J. R. W. 2000. Animal cell culture. Oxford University Press. pp. 310.
22. Gao, S.; Yu, B.; Li, Y.; Dong, W.; Luo, H. 2003. Antiproliferative effect of Octreotide on gastric cells mediated by Inhibition of Akt/PKB and telomerase. *World J. Gastroenterol.* 9: 2362-5.
23. Chumchalova, J. and Smarda, J. 2001. Colicins and their effect on malignant cells. *Scripta Medica.* 74: 273-300.
24. Verma, R. S.; Babu, A. 1989. Human chromosomes manual of basic techniques. Pergamon. Press. pp. 240.
25. King, M.; Wild, D.; Gocke, E.; Eckhardt, K. 1982. 5- Bromo deoxyuridine tablets with improved depot effect for analysis in vivo of SCE in bone marrow and spermatogonal cells. *Mut. Res.* 97: 117-129.
26. Stites, D. 1979. Laboratory methods of detection cellular immune function. In: Basic and clinical immunology, Fundberg, H. H.; Stiter, D.; Coldwell, J. (Ed), LAGE, Medical publication, California.

27. Schnieder, E. and Lewiss, J. Comparison of in vivo and in vitro sister chromatid exchange induction. *Mutat. Res.*, 114: 183-187. (1982).
28. Yadav, J. S.; Seth, N. Effect of NOx on the Somatic Chromosomes of Goldsmiths. *Environ. Health Perspec.* 10: 33-39. (1998).
29. Militao, G. C.; Albuquerque, M. R.; Pessoa, O. D.; Pessoa, C.; Moraes, M. E.; Moraes, M. O.; Costa-Lotuf, L. V. 2004. Cytotoxic activity of nepetin, a flavonoid from *Eupatorium ballotaefolium* HBK. *Pharmazie.* 59: 965-6.
30. Yan, Y. Su, X.; Liang, Y.; Zhang, J.; Shi, C; Lu, Y.; Gu, L.; Fu, L. 2008. Emodin azide methyl anthraquinone derivative triggers mitochondrial-dependent cell apoptosis involving in caspase-8-mediated Bid cleavage. *Mol. Cancer Ther.* 7:1688-97.
31. Su, Y. T.; Chang, H. L.; Shyue, S. K.; Hsu, S. L. 2005. Emodin induces apoptosis in human lung Aden carcinoma cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway. *Biochem Pharmacol.* 70:229-41.
32. Kwak, H. J.; Park, M. J.; Park, C. M.; Moon, S. I.; Yoo, D. H.; Lee, H. C.; Lee, S. H.; Kim, M. S.; Lee, H. W.; Shin, W. S.; Park, I. C.; Rhee, C. H.; Hong, S. I. 2006. Emodin inhibits vascular endothelial growth factor-A-induced angiogenesis by blocking receptor-2 (KDR/Flk-1) phosphorylation. *Int. J. Cancer.* 118: 2711-20.
33. Huang, Q.; Lu, G.; Shen, H. M.; Chung, M. C.; Ong, C. N. 2007. Anti-cancer properties of anthraquinones from rhubarb. *Med. Res. Rev.* 27: 609-30.
34. Hsu-Feng Lu Æ Kuang-Chi Lai Æ Shu-Chun Hsu Æ Hui-Ju Lin Æ Chao-Lin Kuo Æ Ching-Lung Liao Æ Jai-Sing Yang Æ Jing-Gung Chung. 2009. Involvement of Matrix Metalloproteinases on the Inhibition of Cells Invasion and Migration by Emodin in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Neurochem. Res.* 34:1575–1583.
35. Kuo, P. L.; Lin, T. C.; Lin, C. C. 2002. The antiproliferative activity of aloe-emodin is through p53-dependent and p21-dependent apoptotic pathway in human hepatoma cell lines. *Life Sci.* 71 (16): 1879-92.
36. Mijatovica, S.; Maksimovic-Ivanica, D.; Radovica, J.; Miljkovica, Dj.; Harhajia, Lj.; Vuckovich, O.; Stosic-Grujicica, S.; Mostarica, M.; Stojkovic, B and Trajkovich, V. 2005. Anti-glioma action of aloe emodin: the role of ERK inhibition. *CMLS. Cell. Mol. Life Sci.* 62: 589–598.
37. Calabrese, E. J.; Baldwin, L. A. 2002. Defining hormesis. *Hum. Exp. Toxicol.* 21:91-97.
38. Calabrese, E. J.; Baldwin, L. A. 2003. Hormesis: the dose-response revolution. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 143: 175-197.
39. كريم، كريم جلال . 2007. دور المستخلص المائي للراوند *Rheum ribes* والزعتر *Thymussyriacus* في تثبيط التأثير التطفري لعقار Gemcitabine والتأثير المسرطن لمادة 7,12-DMBA في ذكور الفئران البيض. أطروحة دكتوراه/ كلية التربية (ابن الهيثم)/ جامعة بغداد.
40. Heidemann, A.; Völkner, W.; Mengs, U. 1996. Genotoxicity of aloe-emodin in vitro and in vivo. *Mutat. Res.* 367:123-33.
41. Chi-Hao, W.; Chiu-Lan, H.; Tuzz-Ying, S. and Gow-Chin, Y. 2001. Inhibitory Effects of *Cassia tora* L. on Benzo[a]pyrene-Mediated DNA Damage toward HepG2 Cells . *J. Agric. Food Chem.* 49 (5): 2579–2586.

42. Zhang, R. 2010. Effects of extract of Polygonum multiflorum on cell cycle arrest and apoptosis of human liver cell line L02. J. Chin. Integrat. Med. Pres. 8 (6): 554-561.
