أمارا باك: مجلة علمية محكمة تصدر عن الأكاديمية الأمريكية العربية للعلوم والتكنولوجيا www. amarabac. com
المجلد الخامس، العدد الرابع عشر (٢٠١٤). ص ص ٣٩-٤٨

تقييم التأثير السمي لمستخلصات بعض الطحالب في خط خلايا سرطان الحنجرة البشري Hep-2

غيداء حسين الربيعي(*)

الملخص: تناولت الدراسة عزل وتشخيص ثلاثة أنواع من الطحالب *Anabaena cylindrical* و*Lyngbya* sp. التابع لشعبة الطحالب ألخضر المزرقة و*Scenedesmus obliguus*، التابع لشعبة الطحالب الخضر من قناة الحولية تابعة جامعة بغداد. استخدم الوسط الزرعي Chu 10 لتنمية الطحلب في مزرعة مستقرة في ظروف مختبرية ثابتة (25 °م وشدة إضاءة 200 مايكروانشتاين /م٢ /ثا ولمدة 6:18 ساعة اضاءة :ظلام). حصدت المزرعة بعد أربعة عشر يوما من عمر المزرعة. أستخدم الميثانول ٩٥%لأستخلاص المواد ألفعالة الخام من الكتلة الحية الجافة. اختبرت كفاءة فعالية المستخلص تجاه الخط الخلوي2-Hep في مركز التقنيات الإحيائية في جامعة النهرين وبتراكيز مختلفة (125و 250و500 و1000 و2000 و٤٠٠٠) ميكروغرام /مليلتر، أظهرت الدراسة أن مستخلص الطحلب الأخضر *Scenedesmus obliguus* أفضل فعالية من مستخلص الطحلبين الأخضر المزرق*Anabaena cylindrical* و*Lyngbya* sp. تجاه الخط االخلوي 2- Hep فقد وجد أن المستخلص له تأثير سمي بجميع التراكيز وكان أعلى تأثير سمي لمستخلص *Senedesmusa obliguus* عند التركيز ١٠٠٠مايكروغرام /مليلتر بمقدار ٧١.٤٥ %،في حين كان أعلى تأثير سمي عند التركيز ٤٠٠٠ مايكروغرام /مليلتر بمقدار ٧٠.٩% و٧١.٨% لمستخلص الطحلبين الأخضر المزرق *Anabaena cylindrical*. و*Lyngbya* sp. على التوالي. ولم يظهر تأثير مثبط عند التراكيز القليلة قيد الدراسة. وتمت تنقية المستخلص *S.obliguus* جزئياً إذ أظهر المستخلص المنقى جزئياً فعالية أعلى من المستخلص الخام تجاه الخط الخلوي Hep-2 حيث بلغ ٢٠%عند التركيز ٢٠٠ مايكروغرام /مليلتر.

الكلمات المفتاحية: الطحالب الدقيقة، مستخلصات، الخطوط السرطانية، مركبات مثبطة.

Evaluation Cytotoxic Effect of Some Algae Extracts on Cell Line Hep-2 In Vitro

Ghaidaa H. Al-Rubaiei

Abstract: In this Study, isolate and identification Three types of algae *Scenedesmus obliguus* of the belong to Division of green –algae and *Anabaena cylindrical* and *Lyngbya* sp. Of the belong to Division of cyanobacteria from channel at the University of Baghdad. Use culture medium Chu- 10 for growth of algae on batch culture in the laboratory conditions (25 ˚ c ±2 and light intensity 200 µE/m²/sec the light: dark regime was used 16:8 hrs). Harvested culture after fourteen days of age farm. Use methanol 95% to extract active compound from raw dry biomass, Tested the effectiveness of the efficiency of the cell extract toward the cell line (human larynx cancer) Hep-2 from biotechnology center at the University of Alnahrain university and different concentrations (125, 250, 500, 1000, 2000 and 4000 µg / mL) The study showed that the extract of green algae *Scenedesmus obliguus* better the effectiveness of the extract blue green alga *Anabaena cylindrical* and *Lyngbya* sp. toward the cell line Hep -2 found that the extract has a toxic effect of all concentrations had a higher effect Higher toxic effect of the extract at concentration *Senedesmus obliguus* 1000 µg / mL by 71.45%.while the toxic effect was higher when the concentration 4000 µg / mL by 70.9% and 71.8%% to blue-green alga extract *Anabaena cylindrical* and *Lyngbya* sp. respectively Did not show inhibitory effect at low concentrations in this study. These anti Hep-2 agents were partially purified and the pure active compounds proved to have higher activity comparing with the cruds extract about 20% at 200 µg / mLconsentration.

Keywords: microalgae, extracts, cell line, active compound

(*) كلية العلوم- الجامعة المستنصرية، العراق، ghaidaa_5@yahoo.com

المقدمة

تعد الطحالب الدقيقة من النباتات الواطئة ذاتية التغذية Autotrophic، إما بدائية النواة أو حقيقية النواة وتحول الطاقة الشمسية إلى طاقة كيميائية بعملية البناء الضوئي Photosynthesis وتكون بسيطة التركيب تفتقر إلى ساق وأوراق وجذور حقيقية ولها تراكيب تكاثرية بسيطة، ولا تحاط بالغلاف العقيم وتحتوي على الكلوروفيل a .[1]

أجريت في العقود الأخيرة عدد من الدراسات عن الكثير من المركبات التي يمكن أن تستخدم في تجارب على المركبات التي لها تأثير سمي في الخلايا السرطانية، ومن جانب آخر كان لبعض منها تأثيرات سمية جانبية كبيرة على الخلايا السليمة، ولذلك كان لابد من اختيار المركبات الأقل سمية في العلاج وتعد الأحياء المجهرية مصدراً فريداً للمركبات الأيضية الفعالة حيويا والمهمة طبيا، لذا فقد تم اختبار مجاميع من الأحياء المجهرية ومنها الطحالب الدقيقة لهذا الغرض[2,3] . إذ تنتشر الطحالب الدقيقة في بيئات مختلفة لتحملها الواسع للظروف البيئية المتغيرة من درجة الحرارة والملوحة والمغذيات والجفاف والأشعة فوق البنفسجية، لذا يجب أن تكيف بمثل هذه الظروف مما يجعلها تمتلك خصائص فسيولوجية فريدة من نوعها لذا تعد من المصادر الطبيعية لإنتاج المركبات الفعالة Natural products التي يمكن الاستفادة منها لعلاج كثير من الأمراض[4].

تنتج الطحالب الدقيقة مثل .Anabeana sp و.Nostoc sp و.Oscillatoria sp و Chlorella sp. و.Scenedesmus sp مركبات فعالة ناتجة من الأيض الثانوي Secondary metabolism ذات وظيفة سمية للخلايا [1,5] ومن أهم هذه المركبات هي الأحماض الدهنية غير المشبعة، الكاروتينات B-carotein، فيكوسيانين، وفيكوارثين وتراكيز عالية من الفيتامينات B_6 ,B_1,B_2 B_{12}, فضلا عن فيتامينD,k والأنزيمات. وأن كل هذه المركبات الفعالة تعد مضادات الأكسدة الطبيعية ومضادة للالتهابات وسامة للخلايا [٤].ويكون مسار تصنيع المركبات الحيوية في خارج وداخل الجسم الحي بنظام غاية الدقة، فقد لوحظ أن مستوى إنتاج المركبات الحيوية تتأثر بمسار الأنزيمات الذي يسيطر عليها بمستوى التعبير الجيني[6]. Level gene expression عزلت كثير من المركبات المستخلصة من الطحالب ومن أهمها Cylinrospermopsin وNostocine cyanopeptides, cyanopeptolins, micropeptins, microginins, or aeruginosins التي عزلت من Microcystis, Anabaena, Planktothrix التي تتميز بفعاليتها ضد الأورام السرطانية أذ أثبتت هذه المستخلصات الخام والمنقاة جزئياً أنها تسبب الموت المبرمج apoptosis للخلايا الكبدية واللمفاوية والطلائية فضلا عن سرطان الجلد fibroplast وخلايا الأمعاء والخلايا النخامية وخلايا سرطان الحنجرة البشري [7,4,1]، إذ أظهرت هذه المستخلصات تأثيراً تثبيطياً للأورام السرطانية داخل الجسم in vivo وخارج الجسم in vitro وكان بعض هذه الأورام مقاومة للمعالجة الكيميائية [8].ركزت هذه الدراسة على الطحالب الدقيقة لقلة الدراسات عن فعالية مستخلصاتها ضد الأمراض السرطانية، ولتوافر هذه الطحالب في البيئة المحلية فقد هدفت الدراسة إلى: عزل وتشخيص أنوع من الطحالب المحلية وتشخيصها ثم دراسة التأثير التثبيطي لمستخلص الطحلبScenedesmus obliguus وAnabaena cylindrical وLyngbya sp في الخط الخلوي (سرطان الحنجرة البشري.)Hep-2

المواد وطرائق العمل

١-تحضيرمجفف الخلايا

تم عزل الطحلب *Scenedesmus obliguus*باتباع طريقة Serial dilution methods [9]و الطحلب.*Anabaena cylindrical* و.*Lyngbya* sp بأتباع طريقة Streak Plating[10]من قناة الحولية تابعة جامعة بغداد. تم تشخيص الطحلبobliguus *Scenedesmus* التابع لشعبة

الطحالب الخضر Chlorophyta والطحلب *Anabaena cylindrical* التابع لشعبة الطحالب الخضر المزرقة Cyanophyta باستخدام المجهر الضوئي المركب Olympus وباعتماد مصدر التشخيص[12,11] على الترتيب، إذ استزرع الطحلب في الوسط الزرعي [10] Ch-10 وباستعمال المزارع المستقرة وفي ظروف مختبرية ثابتة (درجة حرارة 25مْ وشدة إضاءة 200 مايكرو أنشتاين /م^2/ثا ومدة ٦:١٨ ساعة إضاءة :ظلام) تم ترسيب المزارع بعد اربعة عشر يوما وذلك بالنبذ المركزي عند سرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة. جمع بعدها الراسب وجفف عند درجة حرارة ٤٠مْ ولمدة ٤٨ ساعة [٨].

٢- استخلاص المواد الفعالة

تم استخلاص المركبات المنتجة الخام باستعمال جهاز الاستخلاص Soxhelat، إذ تم وزن غرام ١ من الطحلب المجفف وأضيف له ٢٥٠ مليمترا من الميثانول بتركيز ٩٥% وتركت العينة ٢ ساعة لكي يتشبع المسحوق بالمذيب ثم أجري الاستخلاص ولمدة ٤ ساعات وجفف الراشح باستعمال جهاز المبخر الدوار عند درجة حرارة ٤٠ مْ، وزن الناتج من عملية الاستخلاص [8].

٣-دراسة التأثير السمي لمستخلص الطحالب:-

أ- الخط الخلوي (سرطان الحنجرة البشري Hep-2): اختير خط الخلايا (سرطان الحنجرة البشري) واستعمل هذا الخط عند التمريرة 20.تم الحصول على الخط الخلوي السرطاني من مركز بحوث التقانة الإحيائية / جامعة النهرين. تمت تنمية الخط السرطاني في الزجاج في أطباق الزراعة النسيجية (Falcon 25cm^3) وبدرجة حرارة ٣٧ °م وبشكل أفقي باستعمال الوسط الزرعي Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) المجهز بـ ١٠% من مصل جنين البقرFetal calf Serum،وعند الحصول على طبقة أحادية كاملة Confluent monolayer عوملت الخلايا بمحلول التربسين –فرسين لتقسمها إلى مزرعة ثانوية أخرى [13] Subculture.

ب-تهيئة الخط الخلوي Hep-2: تم تفريغ وعاء الزرع النسيجي الذي يحتوي على الخلايا السرطانية من الوسط الزرعي القديم، ثم أضيفت له كمية قليلة من محلول التربسين –فرسين ٢-٣ مليلتر ووضع في الحاضنة بدرجة حرارة ٣٧ م^o ولمدة ٢-٥ دقيقة. وبعد ذلك أضيف الوسط الزرعي الذي يحتوي على نسبة ١٠% من مصل الجنين البقري إلى الوعاء وبمقدار ٢٠ مليلتر مع إحداث حركة دورا نية بسيطة لأجل إزالة أكبر كمية من الخلايا الموجودة في الوعاء وسكبت بعدها محتوياته في وعاء معقم.

ج-التأثير السمي: تم إجراء اختبار السمية مستخلصات الطحالب في قيد الدراسة بعدة تراكيز في نمو الخط الخلوي Hep- 2 بحسب طريقة [13] وهي كالآتي :

- **زرع الخلايا Cell Seeding** : استعملت أطباق الزرع النسيجي متعددة الحفر 96 Micro liter Plates ذات القعر المسطح Flat bottom لزرع الخلايا السرطانية المستحصل عليها بعد تكون الطبقة الأحادية الكاملة وإزالتها من سطوح الأوعية وتفكيكها بمحلول التربسين /الفرسين.
- **الحضن Incubation** : وضع الطبق في الحاضنة بدرجة ٣٧ م^o مزودة بـ ٥% من غاز ثنائي أوكسيد الكاربون إلى اليوم الثاني للسماح بالتصاق الخلايا Cell attachment .

- **المعاملة Treatment** : فحصت الأطباق التي تحتوي على الخلايا السرطانية2- Hep تحت المجهر المقلوب inverted microscope للتأكد من نمو الخلايا بشكل جيد في الحفر أعقبها إجراء الخطوات الآتية:-

١- حُضر[14] كل من المستخلص الميثانولي للطحالب المدروسة بوساطة إذابة ٠.٠١ غرام من المستخلص الخام المركز في ١مليلتر من المذيب الوسط Dimethyl Sulf Oxide (DMSO) ثم عُقّم باستعمال مرشح ذي ثقوب بقطر ٠.٢٢ مايكروميتروحُضّرت منه ستة تراكيز مخففة وهي (١٢٥و٢٥٠و٥٠٠و١٠٠٠و٢٠٠٠و٤٠٠٠) مايكروغرام/مليلتر وفي ظروف معقمة. إستخدمت جميع التراكيز المحضرة مباشرة بعد اكمال عملية التحضير.

٢- سكب الوسط الزرعي من الحفر في أطباق الزرع النسيجي بعد رفع اللاصق، ثم أضيف ٠.٢ مليلتر /حفرة من كل تركيز سابق وبواقع ٣حفرات لكل تركيز مع زراعة حفر أخرى محتوية على الوسط الزرعي الخالي من مصل الجنين البقري فقط التي تعد السيطرة السالبة وحفر أخرى تحوي DMSO بتركيز ٠.١% مع الوسط الزرعي الخالي من المصل بوصفه سيطرة موجبة.

بعد مرور مدة التعريض Exposure time وهي ٤٨ ساعة، أخرج الطبق من الحاضنة وأضيف إليه ٥٠ مايكروليتر من محلول صبغة الأحمر المتعادل وأُعيد الطبق مرة ثانية إلى الحاضنة مدة ساعتين. أُخرج بعدها الطبق وأزيلت محتوياته وغسلت الخلايا بمحلول دارئ الفوسفات الملحي (PBS) إلى حين زوال الصبغة الزائدة، أضيف بعد ذلك لكل حفرة ٥٠ مايكرو لتراً من محلول دارئ الفوسفات الملحي المحمض بالايثانول المطلق ١:١ (محلول استخلاص الصبغة). وسجلت النتائج باستخدام جهاز الاليزا بطول موجي ٤٩٢ نانومتر. اعتمدت اختبار سمية الخلوية cytotoxicity assay لتقويم تأثير تراكيز المستخلص في نمو الخلايا بدلالة النسبة المئوية لمعدل التثبيط IR%، حسبت النسبة المئوية للتثبيط الخلايا (IR%) حسب المعادلة الآتية[15]:

$IR\% = \frac{A - B}{A} \times 100$ حيث A تعني السيطرة، B تعني معدل القراءات $Test$

٤-التنقية الجزئية لمستخلص الطحلب

أتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Naviner *et al.*(١٩٩٩) للحصول على مركبات نقية جزئياً من الطحلب *Scenedesmus obliguus* وكما يأتي:

ا- عُلق 250ملغم من مجفف الطحلب في 10 مليلتر من الميثانول(٩٥%)،ثم رُج المعلق لمدة ٣٠-٦٠ دقيقة باستعمال حاضنة هزازة بدرجة حرارة ٢٥م°، وبسرعة ٧٠ دورة /دقيقة.

ب- نبذ المستخلص مركزياً بسرعة ٦٠٠٠ دورة /دقيقة مدة ١٥ دقيقة

ج- أضيف بعدها 5 مليلتر من كلوريد جمع الجزء العضوي وتم تركيزه بدرجة حرارة الغرفة للحصول على المستخلص الخام.

د- وضع الجزء العضوي في قمع الفصل وأضيف له كلوريد المثيلين، مع الرج الجيد وترك مدة ٢-٥ دقائق

هـ - بإضافة ٥ مليلتر من كلوريد المثيلين ورج جيدا وترك إلى أن ينفصل إلى طبقتين، ثم أخذت طبقة كلوريد المثيلين. جمعت طبقة كلوريد المثيلين وركزت وحفظت في الظلام في ٤م° إلى حين الاستعمال.

تم الكشف عن الأحماض الدهنية بعملية التحليل في جهاز كروموتغرافي الغاز السائل GC في قسم المواد الخطرة /وزارة العلوم والتكنولوجيا، إذ تم استعمال جهاز كروموتغرافي الغاز السائل من نوع GC Pyeunicam 204 باستعمال درجة حرارة الكاشف FID ٣٠٠ أما درجة حرارة الحاقن فكانت ٢١٠ م°، إذ تم استعمال العمود الخاص بالأحماض الدهنية DEGS من نوع (Diethylen

glycol succinate) وبطول 1.5متر وقطر ٤ مليمتر ودرجة حرارة ١٥٠ م° وباستعمال الغاز الناقل النيتروجين N_2.

النتائج والمناقشة

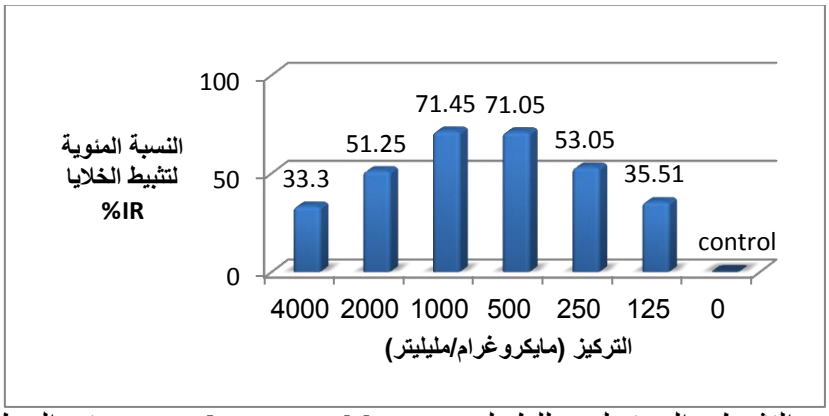
1- تأثير المستخلص *Scenedesmus obliguus* على الخط الخلوي Hep -2

يتضح من الدراسة أن التأثير سمي للطحلب *Scenedesmus obliguus* أكثر فعالية من الطحلبين الأخضر *المزرق Anabaena cylindrical* و *Lyngbya* sp.، إذ بينت النتائج أن التراكيز المختلفة لمستخلص الميثانولي للطحلب الأخضر*Scenedesmus obliguus* تأثيرا في نمو الخلايا Hep -2 (الجدول 1). وأظهرت نتائج التحليل الإحصائي لاوجود فرق معنوي (P<٠.٠٥) بين التراكيز المستعملة (1000و500) مايكروغرام/مليلتر. فقد تبين أن لمستخلص الميثانول الخام تأثيرا سمياً واضحاً في جميع التراكيز،إذ سجل أعلى تأثير مثبط 71.45% عند تركيز 1000مايكروغرام/مليلتر (الشكل 1).ويعود السبب في ذلك إلى نشاط الأحماض الدهنية التي تسبب عملية امتزاز على سطح الخلية وتغير في نفإذية أغشية الخلية [16]. تشير الدراسات أيضاً إلى أن الأحماض الدهنية المشبعة وغير المشبعة لها نشاط مضاد للأورام السرطانية، وجد أن نسبة الدهون في *Scenedesmus* sp. ١١-٥٥% من الوزن الجاف [17 ,18].وتعمل الأحماض الدهنية بوصفها عوامل غير مزدوجة Uncoupling Agents مما يجعل الأغشية نفإذة للبروتينات فيحدث تثبيط في بناء ATP،وأن الأحماض الدهنية غير المشبعة أقوى فعالية من الأحماض الدهنية المشبعة ويكون لموقع الآصرة المزدوجة ونوعها وطول السلسلة أثر في تحديد مدى فعالية هذه الأحماض [16]. وقد يرجع السبب الأخر لسمية الخلايا إلى الصبغات الكاروتينية التي لها دور في تثبيط نمو الخلايا السرطانية ويعتقد أن هذه الصبغات تقوم بكبح الجين المسؤول عن تحول الخلايا من الطورG0 إلى الطورG1 في دورة الخلايا [17] cell cycle.

الجدول ١- معدل نسبة التثبيط (IR%)للمستخلص الميثانولي للطحلب *Scenedesmus obliguus* في الخط الخلوي السرطاني Hep -2

النسبة المئوية للتثبيط (IR%)	التركيز(مايكروغرام /مليلتر)
٣٣.٣±1.73 a	٤٠٠٠
٥١.٢٥±2.88 b	٢٠٠٠
٧١.٤٥±2.30 c	١٠٠٠
٧١.٠٥±2.30 c	٥٠٠
٥٣.٠٥±1.73 d	٢٥٠
٣٥.٥١±0.577 e	١٢٥
٠ ± ٠.٠٠	control

الحروف المختلفة في الأعمدة تعني وجود فرق معنوي عند مستوى (P<0.05)



الشكل١- التأثير التثبيطي المستخلص للطحلب *Scenedesmus Obliguus* في الخط الخلوي2- Hep

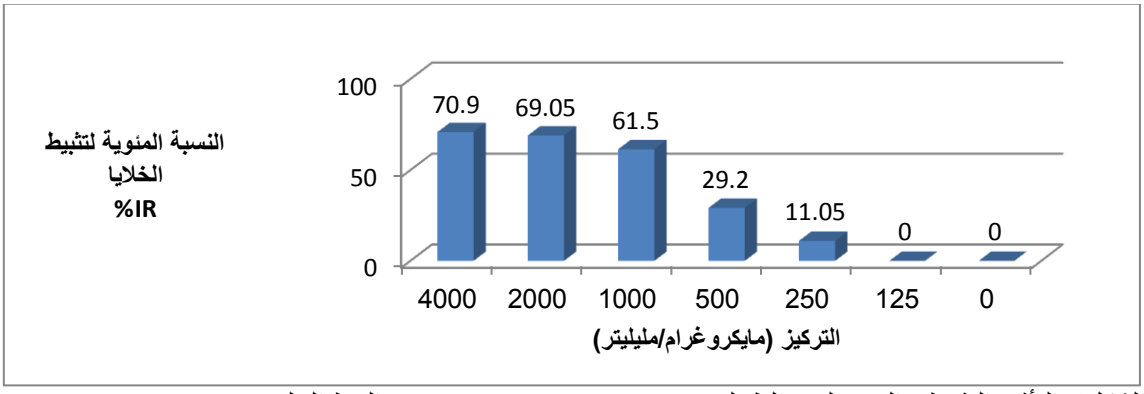
٢-تأثير المستخلص *Anabaena cylindrical* على الخط الخلوي 2- Hep

يتضح من النتائج أن للتراكيز المختلفة للمستخلص الميثانولي للطحلب *Anabaena cylindrical* تأثيرا في نمو الخلايا ٢- Hep (الجدول ٢). وأظهرت نتائج التحليل الإحصائي لا يوجد فرق معنوي (P<٠.٠٥) بين التراكيز (٤٠٠٠و٢٠٠٠و١٠٠٠) مايكروغرام/مليلتر. فقد تبين أنه لمستخلص الميثانول الخام تأثيراً سمياً واضحاً في التراكيز العالية حسب الدراسة عدا التركيز ١٢٥ مايكروغرام/مليلتر الذي لم يظهر أي تأثير مثبط لنمو الخلايا، فقد سجل أعلى تأثير مثبط ٧٠.٩% عند تركيز ٤٠٠٠ مايكروغرام/مليلتر. وأقل تأثير سمي على الخلايا عند التركيز ٢٥٠ مايكروغرام/مليلتر يبلغ ١١.٠٥% (الشكل ٢). إن أكثر التفسيرات قبولاً للتأثيرات المثبطة التي تُبديها مستخلصات الطحالب ضد الخلايا السرطانية هو قدرتها على التحفيز على الموت المبرمج للخلايا [20,19].وربما يعود في ذلك إلى سلوك الخلية [21]. أثبت أن بعض الطحالب الخضر المزرقة مثل *Oscillatoria* sp. و*Chroococcus* sp. و*Nostoc* sp. تنتج المركبات microsystinsو nodularinsوالتي تثبط الأنزيم protein-phosphatase لخلايا الخط الخلوي للبائن، ومن ثم يقود هذا إلى نخر الخلايا وموتها، وأن المركبmicrocystins، والأحماض الدهنية المشبعة وغير المشبعة تحث على بدأ الموت المبرمج، ومحاولتها إيقاف تكاثر تلك الخلايا، وتعد عملية الموت المبرمج من الآليات المهمة والدقيقة في خلايا اللبائن، وتحدث غالباً عندما تعاني أي خلل وظيفي، لذا فهي تؤدي دوراً مهماً في عملية التسرطن [23,22].

الجدول ٢- التثبيط (%IR)المستخلص الميثانولي للطحلب في *Anabaena cylindrical* الخط الخلوي Hep-2

النسبة المئوية للتثبيط (%IR)	التركيز(مايكروغرام /مليلتر)
٧٠.٩±1.73 a	٤٠٠٠
٦٩.٠٥ ±1.73 a	٢٠٠٠
٦١.٥±2.88 a	١٠٠٠
٢٩.٢±0.57 b	٥٠٠
11.05±1.73 c	٢٥٠
0.00	١٢٥
0.00	control

الحروف المختلفة في الأعمدة تعني وجود فرق معنوي عند مستوى (P<0.05)



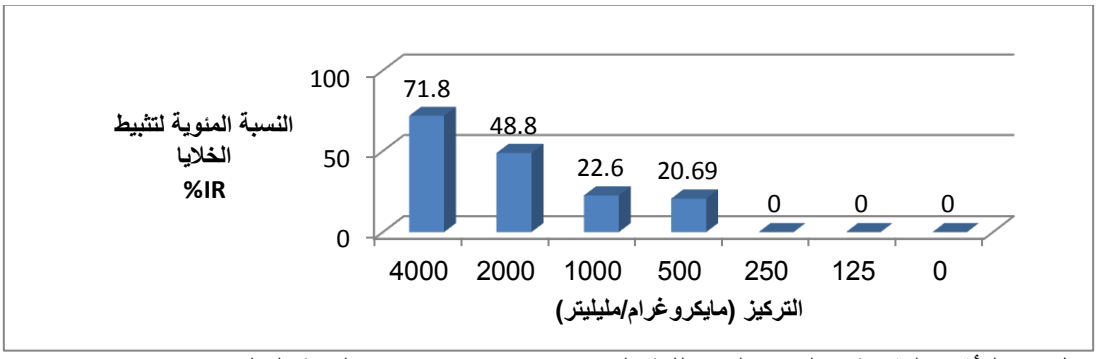
الشكل٢-التأثير التثبيطي المستخلص الطحلب Anabaena cylindrical في الخط الخلوي Hep-2

٣- تأثير المستخلص *Lyngbya* Sp. على الخط الخلوي Hep -2

يتضح من النتائج أن للتراكيز المختلفة للمستخلص الميثانولي للطحلب *Lyngbya* Sp. أقل تأثيرا في نمو الخلايا Hep ٢– مقارنة بالطحالب الأخرى قيد الدراسة (الجدول ٢). وأظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فرق معنوي (P<٠.٠٥) بين التراكيز المستعملة. فقد تبين أن لمستخلص الميثانول الخام تأثيراً سمياً واضحاً في التراكيز العالية حسب الدراسة عدا التركيز١٢٥ و٢٥٠ مايكروغرام/ملليتر الذي لم يظهر أي تأثير مثبط لنمو الخلايا، فقد سجل أعلى تأثير مثبط ٧١.٨% عند تركيز ٤٠٠٠ مايكروغرام/ملليتر. عدم وجود فروق معنوية بين التركيز ١٠٠٠و ٥٠٠ مايكروغرام/ملليتر بلغ وأقل تأثير سمي على الخلايا يبلغ ٢٢.٦% و٢٠.٦% على التوالي (الشكل ٢). إن أكثر التفسيرات قبولاً للتأثيرات المثبطة التي تُبديها مستخلصات الطحالب ضد الخلايا السرطانية هو قدرتها على التحفيز على الموت المبرمج للخلايا [20,19].وربما يعود في ذلك إلى سلوك الخلية [21]. أثبت أن بعض الطحالب الخضر المزرقة مثل *Oscillatoria* sp. و*Chroococcus* sp. و*Nostoc* sp. تنتج المركباتmicrosystinsو nodularinsوالتي تثبط الأنزيم protein-phosphatase لخلايا الخط الخلوي للبائن، ومن ثم يقود هذا إلى نخر الخلايا وموتها، وأن المركب microcystins يعمل أو يحث على بدأ الموت المبرمج، ومحاولتها إيقاف تكاثر تلك الخلايا. وتعد عملية الموت المبرمج من الأليات المهمة والدقيقة في خلايا اللبائن وتحدث غالباً عندما تعاني أي خلل وظيفي، لذا فهي تؤدي دوراً مهماً في عملية التسرطن[22].

الجدول ٣-التأثير التثبيطي المستخلص الطحلب Lyngbya Sp. في الخط الخلويHep-2

النسبة المئوية للتثبيط (%IR)	التركيز(مايكروغرام /ملليتر)
٧١.٨±1.73 a	٤٠٠٠
٤٨.٨±1.15 b	٢٠٠٠
٢٢.٦ ±0.57 c	١٠٠٠
٢٠.٦٩±0.57 c	٥٠٠
٠.٠٠	٢٥٠
0.00	١٢٥
0.00	control



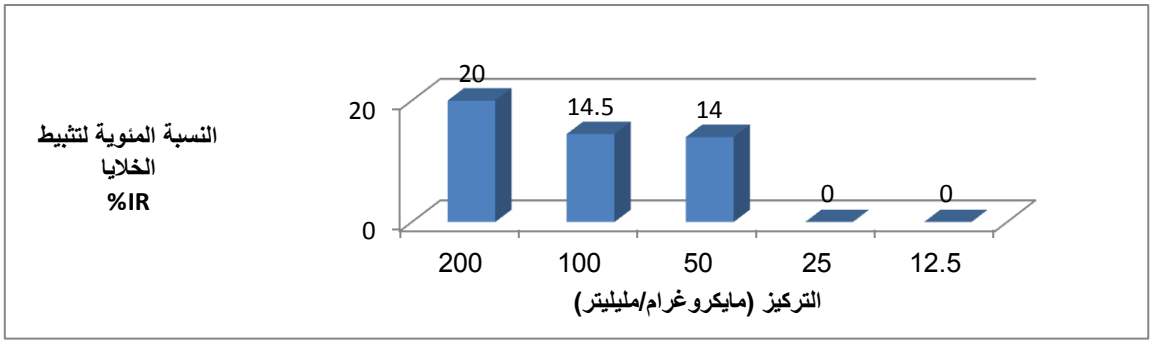
الشكل٣- التأثير التثبيطي المستخلص للطحلب *Lyngbya* Sp في الخط الخلويHep -2

٤ -تأثير المستخلص *Scenedesmus obliguus* المنقى جزئيا على الخط الخلوي Hep -2

يتضح من النتائج أن التراكيز المختلفة للمستخلص المنقى جزئياً للطحلب *Scenedesmus obliguus* كان له تأثير سمي في نمو الخلايا Hep-2 (الجدول٤). وأظهرت نتائج التحليل الإحصائي أن هناك فرقاً معنوياً (P<٠.٠٥) بين التراكيز المستعملة. فقد تبين أن لمستخلص المنقى جزئيا تأثيرا سمياً واضحاً في جميع التراكيز عدا التركيز ٢٥ و١٢.٥ مايكروغرام/مليلتر الذي لم يظهر أي تأثير مثبط لنمو الخلايا، فقد سجل أعلى تأثير مثبط 20% عند تركيز ٢٠٠ مايكروغرام/مليلتر. وأقل تأثير سمي على الخلايا عند التركيز ٥٠ مايكروغرام/مليلتر يبلغ ١٤% (الشكل ٢). ليس هناك وجود فرق معنوي في التراكيز ١٠٠و ٥٠ مايكروغرام/مليلتر وهذا يشير إلى أن فعالية المركبات على الخط الخلوي Hep-2لا تعتمد على التركيز، وهذا ربما يؤكد فعالية المستخلصات المنقاة جزئياً على الخط الخلوي لاحتوائها على الأحماض الدهنية التي تؤثر في عمل أنزيم او بروتين معين أو تسبب أضرارا في غشاء الخلية أو تغيراً في الفعالية الفسيولوجية أو تحليل الخلية[24]

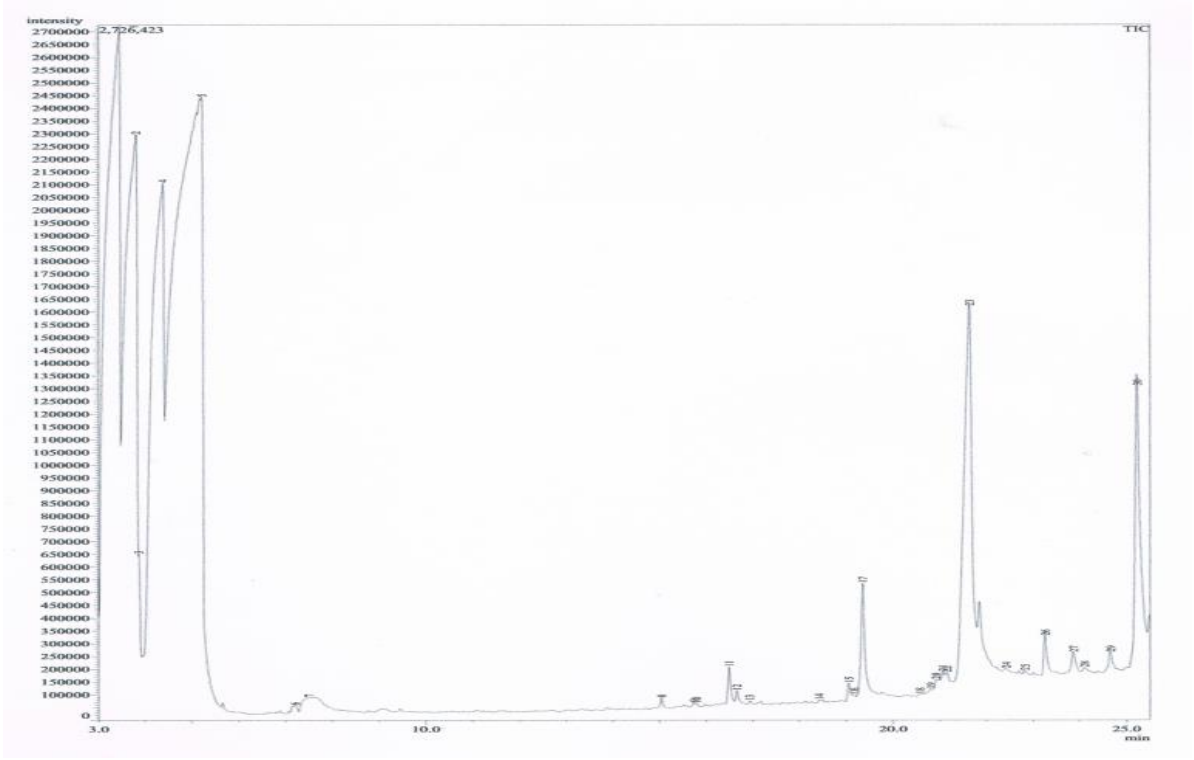
الجدول (4): معدل التثبيط IR% للمستخلص ألمنقى جزئياً للطحلب *Scenedesmus obliguus* في الخط الخلوي Hep-2 بعد تعريضه لمدة ٤٨ ساعة

التركيز (مايكروغرام/مليلتر)	النسبة المئوية للتثبيط(%IR)
٢٠٠	20 .00 ±1.15 a
١٠٠	1٤.50 ±1.73 b
٥٠	14.00 ±0.57 b
٢٥	0.00
١٢.٥	0.00



الشكل٤- التأثير التثبيطي المستخلص المنقى جزئيا للطحلب Scenedesmus Obliguus بالخط الخلويHep -2

أظهرت النتائج أن هناك أنواعاً مختلفة من الأحماض الدهنية للمستخلص والمنقى جزئياً للطحلب *S.obliguus* وجد أن هناك اختلافا في أوقات الفصل كان أفضل الحامض الدهني قد سجل أعلى تركيز(أكبر مساحة 37.61%) من بقية الأحماض الدهنية الأخرى، إذ بلغ وقت الفصل 5.21 دقيقة. بينما سجلت بقية الأحماض الدهنية أوقات فصل ٣.٤٥ و٣.٨٠ دقيقة (ومساحة ١٨.٣٨ و١٣.٥٥ %) كما في (الشكل ٥).



الشكل (٥): الأحماض الدهنية في المستخلص *Scenedesmus Obliguus* التي شخصت بجهاز الكروموتوغرافي الغاز-السائل GC.

المراجع

1- Robert Edward Lee. Phycology 4th ed., 1-534 Cambridge unv. press (2008).

2- Okuzumi, J,; Nishino, H.; Murakoshi, M.; Iwashima, A.; Tanaka, Y.; Yamane, T.; Fujita, Y. and Takahashi, T**.** Inhibitory effects of fucoxanthin ,a natural caroteniod, onN,myc expression and cell cycle progression in human malignant tumor cell. *Cancer Letters*.55;75-81:pp34-35(1990).

3- Siyamak E.; Fatimah M.; Noorijahan B. Mehdi R.; Yeap S**.** Cytotoxic Effect of Ethanol Extract of Microalgae ,Chaetoceroscalcitrans, and its Mechanisms in inducing Apoptosis in Human Breast Cancer cell Line. *BioMed Research International* ;Vol.2(9):8-15:67-68(2013).

4- Burja A.M., Banaigs E.B, Abou-Mansour, Burgess JG, Wright PC: Marine cyanobacteria-a prolific source of natural products. *Tetrahedron*; 57: 9347–9377.(2001).

5- Tan L. T. Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. *Phytochemistry*; 68(7):954–979.(2007).

6- Olav M.S. Microalgae as a source of bioactive molecules-experience from cyanophyta *research. of Applied Phycology*, 12:341-348.(2000).

7- Welker M, von Dohren H: Cyanobacterial peptides—Nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*; 30(4):530–563. (2006).

8- Zorica, S.; Dragana, C.; Jelica, S.; Maja, K.; Dejan, S. Antibacterial ,antifungal and cytotoxic activity of terrestrial cyanobacterial strains from Serbia. *Science in China Series* 51 (10):941-947.(2008).

9- Stein, J. *Handbook of phycologicalmethods. Culture methods and growth measurements*.Cambridge University Press.pp:448.(1973).

10- Rippka, R. J.; Deruelles , J.; Waterbury, Herdman, M. and anier, R. Generic assiments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria.*J. Gen.Microbiol*.111:1-61(1979).

11- Prescott, G. W. Algae of the western lakes area.Brown ,W.M.C.Com. *Publisher, Dubuqu*e.Iowa.16th printing.1-123(1982).

12- Desikachary, T. V. *Cyanophyta*.Indian Council of Agricultural Research. New Delhi.(1959).

13- Freshney, R.I. *Culture of animal cells: A manual for basic technique* (3th ed.). Wiley-liss, A John Wiley & Sons Inc. publication, New York.pp540(1994)

١٤- الحلي، زيد عبد المنعم علي، تأثير المستخلصات الخام لعشب السعد *Cyperusrotundus* L. في تثبيط نمو الخطوط الخلوية السرطانية. رسالة ماجستير /كلية العلوم /جامعة بغداد ٧٨-٩٨ (٢٠٠٤).

15-Freshney,R.I. *Culture of animal cell: Amanual for basic technique* (4thed). *John* wiley and Sons, Inc. Publication, New Yorkpp1-89.(2000).

16- Jiunn-Tzong, W.; Yin-Ru ,C.; Wen-Ya,H. and Wann-Neng, J.Cytotoxic effects of free fatty acids on phytoplankton algae and cyanobacteria.*Aquatic Toxicology* ,80 (4) :338-345.(2006).

١٧- يوسف، سامرة يونس وقاسم، ثائر أبراهيم والكبيسي، حارث كامل، التأثير المضاد للأورام السرطانية في المستخلص الخام لطحلب *Nitzschiapalea (*Kutez).W.sm العصوي. مجلة أبحاث التقانة*الحيوية* ٥(١):٣٤-٤١. (٢٠٠٣).

18-Tüney, I.; Cadirci, B. h.; Unal, D. and Sukatar, A. M. (2007). In antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (izmir, Turkey). *Fres.Environ,Bull*,16:428-434.

19- Pavel ,H.; Jiri,K. and Blahosla ,M. (2005). Cytotoxic effect of soil cyanobacterial extracts to mammal cell lines YAC-1 and WEHI.*Czech phycology* ,5,79-90.

20- Al-Hilli, Z. A. (2009). A study of cytotoxic ,antioxidant ,inhibition of angiogenic factors and induction of apoptosis of *Cyperusrotundus* L.extracts on several cancer cell lines. Ph.D. thesis. Genetic Engineering and Biotechnology, Univ. of Baghdad, Iraq.pp75-76

21- Mohammed, Z. Y. Al-Jumaily, E. F. (2008)، Study the effect of the polyphenolic compound extracted from Grape Skin Fruit *Vitisvinifera* on some Cell lines (*in vitro*).M.Sc. thesis Genetic Engineering and Biotechnology, Univ. of Baghdad, Iraq.pp43

22- Ludmila ,V.; Jiri , K.; Tatiana, S.; Alla, P.; Nina ,T. and Pavel, H.; Valentina, D. Toxins and other bioactive compound produced by cyanobacteria Lake Ladoga.Estonian J. *of Ecology*,57(2):100-110. (2008).

23- Naveen B., Md. I.2, , and Tasneem F. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Cyanobacteria. Inter. Jou. of Innovative Res. in Scie., Engineering and Technology. Vol. 2, Issue 9, pp 4328 - 4343 (2013)

24- Jiunn-Tzong, W.; Yin-Ru ,C.; Wen-Ya,H. and Wann-Neng, JCytotoxic effects of free fatty acids on phytoplankton algae and cyanobacteria.Aquatic Toxicology ,80 (4) :338-345.(2006).

****