



هيئة الطاقة الذرية السورية

قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية



جامعة دمشق - كلية العلوم

قسم علم الحياة الحيوانية

التأثير الحيوي لبعض المستخلصات الطحلبية على الخط الخلوي

MDA-MB-231

**Biological effect of some marine-algal extracts on the
cell line MDA-MB-231**

دراسة أعدت لنيل درجة الماجستير في البيولوجيا الخلوية والجزيئية- قسم
علم الحياة الحيوانية

إعداد الطالبة

ماري جوزيف جزارة

الدكتور حسام مراد

هيئة الطاقة الذرية السورية

مشرف مشارك

الدكتور شادي سكرية

جامعة دمشق - كلية العلوم

مشرف رئيسي

شكر وتقدير

بداية، يطيب لي أن أشكر جزيل الشكر السيد الدكتور إبراهيم عثمان المدير العام لهيئة الطاقة الذرية السورية لمنحي فرصة ذهبية بإتمام بحثي في مخابر الهيئة والاستفادة من خبراتها العلمية.

كما أوجه شكري إلى السيد الدكتور نزار مير علي رئيس قسم التقانة الحيوية والبيولوجيا الجزيئية، على رحابة صدره واستضافته لي في مخابر القسم.

أتقدم بالشكر العميق للدكتور حسام مراد الباحث الرئيسي في دائرة الوراثة البشرية، قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، لتفضله بالإشراف على رسالة الماجستير، وعلى كل ما بذله من وقتٍ وجهدٍ في الإرشاد والتوجيه والمتابعة لسير البحث، والدكتور أحمد غنام لكل الدعم والتوجيه والتعاون العلمي إذ لم يبخل عليّ بخبرته ومعرفته.

والدكتور شادي سكرية، المدرس في جامعة دمشق، بكلية العلوم لتفضله بالإشراف على رسالة الماجستير وتقديمه كل الدعم والإرشاد لإتمام العمل.

أتوجه بالشكر للدكتور محمود قويدر والدكتور مجد الجمالي لتفضلهم بتحكيم الرسالة وإثرائها بملاحظاتهم القيمة.

كما يشرفني أن أشكر أعضاء الهيئة الفنية والمخبرية لكل مساعدة قدموها لي في العمل المخبري وأخص بالذكر حسين درويش، علا سبيناتي، عبد المنعم جباوي، فاتن معسوس وعامر ميا.

أشكر جميع الأساتذة في كلية العلوم، وأخص بالذكر:

الأستاذ الدكتور عدنان ديب، عميد كلية العلوم، بجامعة دمشق.

الأستاذ الدكتور محمد مناف الحمد، وكيل الشؤون العلمية، بكلية العلوم، في جامعة دمشق.

الأستاذة الدكتورة سحر الخطيب، رئيسة قسم علم الحياة الحيوانية، في كلية العلوم، بجامعة دمشق.

أوجه شكري وإهدائي لعائلتي الغالية، أمي وأبي وأخواتي على وقوفهم بجانبني ودعمهم المستمر لي.

لجميع أصدقائي وصديقاتي وزملائي.

أشكر بلدي الغالي الذي كان ولا يزال بعد سنوات الحرب يقدم للجميع ولا يبخل.

بدايةً ونهايةً أشكر الله عزّ وجل على حسن توفيقه وكريم عونه.

فهرس المحتويات:

5	الفصل الأول: المقدمة
6	1-1 السرطان.
6	1-1-1 نشوءه.
8	2-1-1 التغذية الدموية والنقائل الخلوية.
9	3-1-1 الأنواع الخلوية للأورام.
9	4-1-1 الأنماط النسيجية للخلايا السرطانية.
10	5-1-1 طرق العلاج المتبعة حالياً.
10	6-1-1 سرطان الخلايا الدبقية.
11	7-1-1 سرطان الثدي.
13	2-1 الموت الخلوي.
13	1-2-1 الموت الخلوي النيكروزي.
13	2-2-1 البلعمة الذاتية.
14	3-2-1 الموت الخلوي المبرمج.
15	1-3-2-1 كيفية تحريض الموت الخلوي المبرمج.
15	2-3-2-1 الموت الخلوي المبرمج والسرطان.
16	3-3-2-1 آليات الموت الخلوي المبرمج.
16	1-3-3-2-1 مسار خارج خلوي.
17	2-3-3-2-1 مسار داخل خلوي.
18	4-2-1 المعالجة الكيميائية.
18	5-2-1 المعالجة بالبدائل الحيوية.
19	3-1 الطحالب البحرية.
20	1-3-1 أهمية الطحالب البحرية الكبيرة.
20	2-3-1 الفعالية الحيوية المضادة للسرطان لطحالب البحرية.
21	1-2-3-1 مركبات الاستقلاب الثانوية.
21	2-2-3-1 المتعددات السكرية المكبرثة.
23	3-3-1 الطحالب الحمراء.
23	1-3-3-1 لورنسيا بابيلوزا <i>Laurencia papillosa</i> .
25	4-3-1 الكاراجينان.
25	1-4-3-1 تعريفه وتوصيفه.
25	2-4-3-1 أنماطه.
26	3-4-3-1 دور نسبة الكبرثة في الفعاليات الحيوية.
26	4-4-3-1 استخداماته الصناعية والغذائية.
26	5-4-3-1 الفعاليات الحيوية.
28	4-1 أهمية البحث.
28	5-1 هدف البحث.

29	الفصل الثاني: مواد وطرائق العمل
30	1-2 الخطوط الخلوية المستخدمة في البحث
30	2-2 المركبات الطحلبية المستخدمة في معاملة الخلايا.
30	1-2-2 تحضير المستخلص.
31	2-2-2 فصل المستخلص إلى مكوناته الأساسية.
31	3-2 استنبات الخلايا السرطانية.
31	1-3-2 تحضير وسط الاستنبات RPMI1640.
31	2-3-2 تحضير الخلايا للاستنبات انطلاقاً من خلايا مخزنة.
32	3-3-2 الاستنبات الخلوي.
34	4-3-2 تجميد الخلايا.
34	5-3-2 عزل الخلايا للمفاوية.
36	4-2 دراسة العيوشية الخلوية باستعمال صباغ XTT.
36	1-4-2 إنشاء المنحنى المعياري.
37	2-4-2 الاستنبات الخلوي بغية المعاملة الخلوية.
38	3-4-2 دراسة العيوشية الخلوية بعد المعالجة.
38	5-2 دراسات خلوية باستخدام تقانة قياس التدفق الخلوي Flow cytometry.
38	1-5-2 دراسة توزيع أطوار الدارة الخلوية.
41	2-5-2 دراسة الموت الخلوي.
41	3-5-2 دراسة الموت الخلوي المبرمج.
43	4-5-2 دراسة البروتينات المرتبطة بالموت الخلوي المبرمج.
45	6-2 التصوير المجهرى للخلايا.
45	1-6-2 التصوير بالمجهر الضوئي.
45	2-6-2 التصوير بمجهر الفلورة بعد الصبغ بالصبغين DAPI و PI .
46	7-2 دراسة تغير التعبير المورثي عن المورثات المنظمة للموت الخلوي المبرمج باستخدام تقانة التصخيم بالزمن الحقيقي Real-time PCR.
46	1-7-2 عزل الـRNA.
47	2-7-2 حساب تركيز الحمض النووي المعزول والتأكد من جودة العزل.
49	3-7-2 تحويل mRNA إلى cDNA.
49	4-7-2 تفاعل Qpcr.
53	الفصل الثالث: النتائج
54	1-3 الجزء الأول: نتائج تأثير المستخلص ESC على عيوشية الخلايا السرطانية الدبقية البشرية T98G.
54	1-1-3 دراسة العيوشية الخلوية
55	2-1-3 دراسة توزيع أطوار الدارة الخلوية
56	3-1-3 تفعيل الموت الخلوي المبرمج بتأثير المعالجة بالمستخلص ESC
56	1-3-1-3 الكشف عن الموت الخلوي
57	2-3-1-3 تحديد طبيعة الموت الخلوي
58	4-1-3 تغير مستوى البروتين النشط 3-ACTIVE CASPASE

59	3-1-5 التغيرات الشكلية الناجمة عن المعالجة بالمستخلص
60	3-1-6 تغير التعبير المورثي للمورثات النازمة للموت الخلوي المبرمج
61	3-2-2 الجزء الثاني: نتائج تأثير المركبات كابا، يوتا ولامدا كاراجينان على خلايا سرطان الثدي MDA-MB-231.
61	3-2-1 دراسة تأثير كل من المركبات كابا، يوتا ولامدا كاراجينان على العيوشية الخلوية.
62	3-2-2 دراسة تأثير المركب لامدا كاراجينان على عيوشية الخلايا الطبيعية Lymphocytes.
63	3-2-3 دراسة توزيع أطوار الدارة الخلوية.
64	3-2-4 تفعيل الموت الخلوي المبرمج بتأثير المعالجة بالمركبات يوتا ولامدا كاراجينان.
64	3-2-4-1 الكشف عن الموت الخلوي.
65	3-2-4-2 تحديد طبيعة الموت الخلوي.
67	3-2-5 تغير مستوى البروتين النشط 3-ACTIVE CASPASE
68	3-2-6 التغيرات الشكلية التي تطرأ على الخلايا بتأثير المعالجة.
71	3-2-7 تغيير التعبير المورثي للمورثات النازمة للموت الخلوي المبرمج.
73	الفصل الرابع: المناقشة.
80	الفصل الخامس: الاستنتاجات والمقترحات.
81	5-1 الاستنتاجات.
82	5-2 المقترحات.
83	5-3 الأوراق العلمية.
86	الفصل السادس: المراجع

فهرس الأشكال:

رقم الصفحة	عنوانه	رقم الشكل
7	ترسيم لكيفية تحول الخلايا الطبيعية إلى خلايا سرطانية.	الشكل رقم 1
14	ترسيم للآليات المختلفة للموت الخلوي المحرض في الخلايا.	الشكل رقم 2
17	مخطط ترسمي للآليات الجزيئية للموت الخلوي المبرمج.	الشكل رقم 3
19	صورة لنماذج عن كل من الطحالب الخضراء والبنية والحمراء.	الشكل رقم 4
24	الطحلب البحري الأحمر <i>Laurencia papillosa</i> .	الشكل رقم 5
25	ترسيم للبنية الكيميائية لمركبات الكاراجينان.	الشكل رقم 6
33	شكل توضيحي يبين طريقة عد الخلايا الحية بواسطة صفيحة العد.	الشكل رقم 7
37	المنحنيات المعيارية للخطوط الخلوية السرطانية MDA-MB-231 و T98G، والخلايا اللمفاوية الطبيعية Lymphocytes.	الشكل رقم 8
42	ترسيم لمبدأ الوسم الثنائي للخلايا بـ Annexin-V و Propidium Iodide.	الشكل رقم 9
48	صورة لترحيل 1 ميكروغرام من total RNA لكل عينة على هلام الأغاروز.	الشكل رقم 10
50	تفاعل RT-PCR للمورثة المرجعية GAPDH يبين تحديد الـ Ct لكل عينة.	الشكل رقم 11
54	مخطط بياني لتأثير المستخلص الطحلي ESC على نشاط الخلايا السرطانية T98G.	الشكل رقم 12
55	تأثير المستخلص ESC في توزيع أطوار الدارة الخلوية نتيجة معالجة الخلايا T98G.	الشكل رقم 13
56	تأثير المستخلص ESC في تحريض الموت الخلوي في الخلايا المعالجة.	الشكل رقم 14
57	تأثير المستخلص ESC في تحريض الموت المبرمج في الخلايا المعالجة.	الشكل رقم 15
58	شكل بياني يبين تغير في نسبة البروتين النشط -ACTIVE CASPASE- عند المعالجة.	الشكل رقم 16
59	الصور المجهرية للخلايا T98G بعد المعالجة بالمستخلص ESC.	الشكل رقم 17
60	مخطط بياني يبين تغير التعبير المورثي للمورثات المرتبطة بالموت الخلوي المبرمج.	الشكل رقم 18
61	مخططات بيانية لنتائج تأثير المركبات كبا، يوتا ولامدا كاراجينان على عيشية الخلايا MDA-MB-231.	الشكل رقم 19

62	مخطط بياني لتأثير المركب لامدا كاراجينان على نشاط الخلايا اللمفاوية الطبيعية Lymphocytes .	الشكل رقم 20
63	تأثير مركبات الكاراجينان في توزيع أطوار الدارة الخلوية	الشكل رقم 21
64	تأثير المركبات يوتا ولامدا كاراجينان في تحريض الموت الخلوي في الخلايا MDA-MB-231	الشكل رقم 22
68	تأثير المركب يوتا كاراجينان في تحريض الموت المبرمج في الخلايا.	الشكل رقم 23
69	تأثير المركب لامدا كاراجينان في تحريض الموت الخلوي المبرمج.	الشكل رقم 24
70	شكل بياني يبين تغير في نسبة بروتين الكاسباز 3 الفعّال عند المعالجة.	الشكل رقم 25
71	صور مجهرية للخلايا MDA-MB-231 المعالجة بالمركبين يوتا ولامدا كاراجينان.	الشكل رقم 26
72	صور مجهرية باستعمال مجهر الفلورة للخلايا MDA-MB-231 المعالجة بالمركبين يوتا ولامدا كاراجينان والملونة بصباغ DAPI.	الشكل رقم 27
73	صور مجهرية باستعمال مجهر الفلورة للخلايا MDA-MB-231 المعالجة بالمركبين يوتا ولامدا كاراجينان والملونة بصباغ PI.	الشكل رقم 28
74	تأثير المركب يوتا كاراجينان في تغير التعبير المورثي للمورثات المرتبطة بالموت الخلوي.	الشكل رقم 29
75	تأثير المركب لامدا كاراجينان في تغير التعبير المورثي للمورثات المرتبطة بالموت الخلوي المبرمج.	الشكل رقم 30
82	مخطط ترسيمي للآلية المقترحة لتفعيل آليات الموت الخلوي المبرمج بتأثير المركبات يوتا ولامدا كاراجينان.	الشكل رقم 31

المخلص:

تحتوي الطحالب البحرية على العديد من المركبات الكيميائية ذات الفعالية الحيوية في القضاء على الخلايا السرطانية فقد أشارت العديد من الدراسات لارتباط انخفاض حالات السرطان باستهلاك الطحالب البحرية في البلدان التي تستهلك المنتجات الطحلبية بشكل تقليدي، ولعل من أهم هذه المركبات السكار المكبترية. تم في هذه الدراسة اختبار الأثر الحيوي للمستخلص الطحلي (Extracted Sulfated Carrageenan) ESC المحضر من الطحلب البحري الأحمر *Laurencia papillosa* والغني بمتعددات السكار المكبترية وللمركبات الفعالة المنقاة منه من يوتا ولامدا وكابا كاراجينان على الخطيين الخلويين T98G (خلايا سرطانية بشرية دبقية) وMDA-MB-231 (خلايا سرطانية بشرية ثديية). أظهرت النتائج قدرة كل من المستخلص ESC والمركبين يوتا ولامدا كاراجينان على تثبيط العيوشية الخلوية للخلايا المدروسة وعلى تحريض الموت الخلوي المبرمج الذي تمثل على المستوى الشكلي بتكثف DNA والتشدف النووي. كما بينت النتائج قدرة مركبي اليوتا واللامدا كاراجينان في تفعيل عدداً من المورثات المحرضة للموت الخلوي المبرمج وهي *Caspase-8*، *Caspase-9* و *Caspase-3* وفي زيادة مستويات البروتين الفعّال ACTIVE CASPASE-3، بالإضافة إلى تأثيرها على استقرار الميتوكوندريا من خلال إخلال التوازن في التعبير المورثي للمورثتين *Bax/Bcl-2* مؤدياً للفظ السيتوكروم (C) من الميتوكوندريا وبالتالي تحريض موت خلوي مبرمج وفق هذا السبيل الخلوي. تشير مجمل نتائج هذه الدراسة إلى أهمية مركبات الكاراجينان كمركبات حيوية واعدة يمكن أن تكون مرشحة للوقاية أو معالجة السرطان.

Abstract:

Marine algae contain several chemical compounds that are biologically active in eliminating cancer cells. Many studies have reported that marine algae consumption is linked to low cancer incidences in countries that traditionally consume marine products. In this study, we have evaluated the biological effects of the red alga *Laurencia papillosa* extracted sulfated carrageenan (ESC), and both the sulfated polysaccharides iota and lambda carrageenan on T98G (human glioblastoma cells) and MDA-MB-231 (human breast cancer cells). The current study has shown the ability of ESC, iota and lambda carrageenan in inhibiting the proliferation of these cells, and in inducing cell death (apoptosis) through DNA condensation and nuclear fragmentation. Our results have indicated the ability of the iota and lambda sulfated polysaccharides in up-regulating the pro-apoptotic genes caspase-8, caspase-9, caspase-3 and increasing the levels of ACTIVE CASPASE-3 protein. Furthermore, these compounds had the capacity to affect the mitochondrial stability by altering the bax/bcl-2 protein ratio leading to the release of cytochrome-c to the cytoplasm. Our results, presented in this thesis, indicate that carrageenan is a promising bioactive polymer which can be a potential candidate in preventing or treating cancer.

:Abbreviations الاختصارات

ACK: Ammonium-Chloride-Potassium (K).

AIF: Apoptosis Inducing Factor.

AT-III: AntiThrombin III.

BAX: BCL2-Associated X Protein.

Bcl-2: B-Cell lymphoma 2.

BID: BH3 Interacting-Domain death agonist.

BRCA1: BReast Cancer susceptibility gene 1.

Caspases: Cysteine-Aspartic Proteases.

cDNA: Complementary DNA.

Ct: Cycle Threshold.

DMSO: Dimethyl Sulfoxide.

DNA: DeoxyriboNucleic Acid.

DR: Death Receptor

EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid.

ESC: Extracted Sulfated Carrageenan.

FADD: Fas-Associated protein with Death Domain.

FBS: Fetal Bovine Serum.

FITC: Fluorescein Isothiocyante.

FT-IR: Fourier Transform InfraRed spectrometer.

GAPDH: Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase.

HBV: Hepatitis B Virus.

HCC: Hepatocellular Carcinoma.

HCV: Hepatitis C Virus.

HER2: Human Epidermal growth factor Receptor 2.

HPV: Human Papilloma Virus.

HSV-2: Herpes Simplex Virus type 2.

HTLV-1: Human T-cell Lymphotropic Virus.

mRNA: messenger RNA.

NF- κ B: Nuclear Factor Kappa B.

NK: Natural killer.

PBS: Phosphate Buffered Saline.

PI: Propidium Iodide.

RIP1: Receptor-Interacting Protein 1.

RNA: RiboNucleic Acid.

ROS: Reactive Oxygen Species.

RQ: Relative Quantitative.

tBID: Truncated Bid.

TNF- α : Tumor Necrosis Factor -alpha.

TNF-R1: Tumor Necrosis Factor Receptor1.

TO: Thiazole Orange.

TRAIL -R1: TNF-related apoptosis-inducing ligand Receptor 1.

TRAIL -R2: TNF-related apoptosis-inducing ligand Receptor 2.

الفصل الأول

المقدمة والدراسة المرجعية

1- المقدمة والدراسة المرجعية:

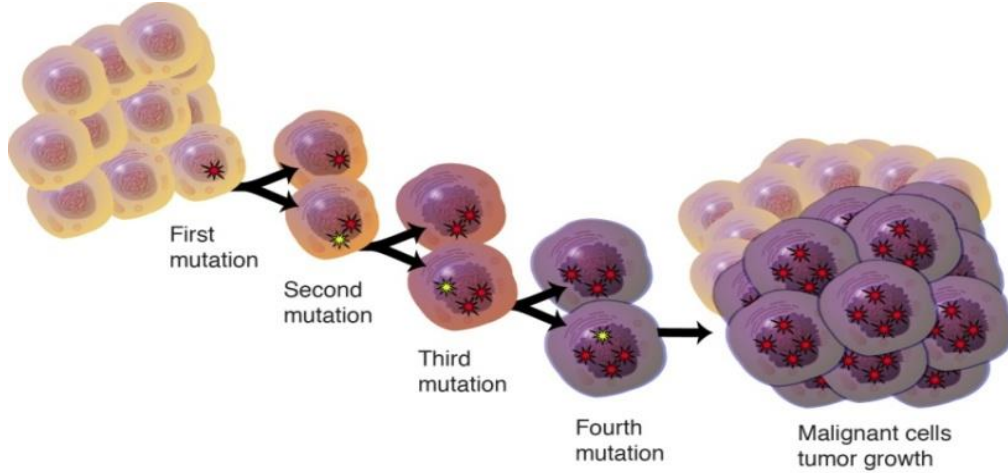
1-1 السرطان Cancer:

استخدمت كلمة سرطان لأول مرة من قبل العالم أبقراط لوصف الأورام ويعود أصلها إلى الكلمة اليونانية Karkinos، إلا أن تاريخ المرض وتوصيفه قديم جداً ويعود إلى العصور الفرعونية، بدأ التشخيص الفعلي لمرض السرطان في القرن الثامن عشر وأدى التطور العلمي خلال السنوات الخمسين الماضية إلى لفهم أعمق لطبيعة المرض وكيفية تطوره [1].

1-1-1 نشوء السرطان ومسبباته:

يعرّف السرطان بأنه مجموعة الأمراض الناجمة عن نمو وانقسام غير مضبوط للخلايا مما يجعلها تشكل ورماً في معظم الأحيان، وتستطيع خلايا الورم أن تترك موضعها الرئيس غازيةً نسيجاً وأعضاءً أخرى ومشكلةً أوراماً ثانوية. تشير إحصائيات منظمة الصحة العالمية (WHO, 2012) إلى 8.2 مليون حالة وفاة متعلقة بالسرطان و14 مليون حالة إصابة جديدة كل عام، ومن المتوقع ارتفاع حالات الإصابة بحوالي 70% في العقدين القادمين.

يعد السرطان من الأمراض المعقدة، الناتجة عن تراكم الطفرات Mutations التي تصيب نوعين من الجينات بشكل رئيس؛ الجينات الورمية البدئية والجينات الكابتة للورم وذلك في إحدى الخلايا الطبيعية، مما يجعلها تهرب من ضوابط الدارة الخلوية فتتو وتتنقسم بشكل مستمر مشكلة ورماً ومع تثبيط الموت الخلوي يزداد حجم الورم، ومن ثم تستطيع بعض خلاياه الانتقال وغزو نسيجاً أخرى. [2]، يخلق تنوع الطفرات التي تصيب في كل مرة جينات مختلفة تنوعاً كبيراً في أنواع الخلايا السرطانية [3]. (الشكل 1)



الشكل 1: ترسيم لكيفية تحول الخلايا الطبيعية إلى خلايا سرطانية كنتيجة لتراكم الطفرات التي تؤدي إلى الانقسام والتكاثر غير المضبوطين وتشكيل الأورام.

تعزى 5-10% من حالات السرطان إلى أسباب وراثية في حين يعود 90-95% منها لأسباب أخرى تعود إلى عوامل محيطية متمثلة إما بالغذاء أو التدخين أو الفيروسات أو الأشعة أو المواد الكيميائية [4].

- **الغذاء**، خصوصاً الأغذية الحاوية على مضافات غذائية لتعديل النكهة أو الأغذية الحاوية على مواد حافظة والحوية على مركبات سامة، منها السكرين Saccharin التي تؤدي لتشكيل الأورام مثل سرطان المثانة، النتريت والنترات Nitrites and Nitrates والتي تؤدي لتشكيل أورام الدماغ والدم والبلعوم عند التعرض لها بشكل كبير، و Acesulfame K وهي مادة سامة تؤدي للعديد من الأعراض السلبية وأخطرها السرطان [5].

- **التدخين**، يزيد خطر الإصابة بالسرطان بمقدار 20 ضعفاً كما أثبتت التقارير أنه يسبب حوالي 90% من حالات سرطان الرئة [6].

- **الفيروسات** ، تساهم العدوى الفيروسية بحوالي 15-20% من حالات السرطان، حيث ترمز لبروتينات تسيطر من خلالها على انقسام الخلايا وتمايزها، كما تسبب ضرر على مستوى الـDNA وتتحكم بالنظام المناعي. تصنف مجموعة من الفيروسات على أنها فيروسات مسرطنة للإنسان ومنها:

HTLV-1 (human T-cell lymphotropic virus) المسبب لمرض اللوكيميا.

HPV (Human papillomavirus) المسبب لسرطان الجلد وعنق الرحم والرأس والرقبة.

HBV (Hepatitis B virus) و HCV (Hepatitis C virus) المسببة لسرطان الكبد [7].

- الإشعاع، يرتبط التعرض للإشعاع بازدياد حالات السرطان حيث يؤدي الإشعاع إلى حدوث عدم استقرار مورثي يتجلى في الضرر على مستوى الصبغيات (كالإزفاء بين صبغيين) Chromosomal traslocation أو إحداث طفرات، حيث لوحظ ازدياد نسبة الإصابة بالسرطان وخصوصاً اللوكيميا عند اليابانيين الناجين من القنبلة الذرية، كما بينت الدراسات التجريبية ازدياد إمكانية الخلايا على الطفرات والانقسام بالتعرض لجرعات متزايدة من الأشعة [8].
- المواد الكيميائية، تشير الدراسات إلى ازدياد نسبة خطر الإصابة بالسرطان نتيجة التعرض لمواد كيميائية معينة خصوصاً المستعملة مهنيًا مثل البارافين، الأمينات العطرية، أصبغة الأنيلين، الراديوم وكلوريد الفينيل وغيرها من المواد المسببة لتخريب DNA وتحريض تشكل الطفرات [9].

2-1-1 التغذية الدموية والنقائل الخلوية:

تحتاج الخلايا الورمية للتغذية خلال فترة نموها وانقسامها، والتي يتم تأمينها من خلال الأوعية الدموية القريبة من الورم المتشكل، حيث تفرز الخلايا عوامل نمو تحرض خلايا البطانة الوعائية والخلايا الليفية على النمو والانقسام وبالتالي تشكيل أوعية دموية جديدة متجهة نحو الكتلة الخلوية لتغذيتها، الأورام التي تفشل في تحريض تشكل أوعية دموية مغذية للورم تبقى بشكل أورام كامنة لا يمكن أن يزيد حجمها عن 3 ملم³ [10].

تعد النقائل الخلوية السبب الأساسي لانتشار الأورام على نطاق واسع في الجسم بشكل يصعب السيطرة عليه وعلاجه وتكون السبب الأساسي للوفاة، ويعود السبب الرئيس لتشكلها إلى تفعيل عدد من الأنزيمات مثل أنزيمات السيرين بروتياز والكولاجيناز، التي تؤدي لتحليل بروتينات المطرق خارج الخلوي وتحرير الخلايا مما يسمح لها بالانسلال إلى الشعيرات الدموية والدخول للدوران العام وبالتالي الانتقال إلى أعضاء أخرى بعيدة أهمها الرئة كونها تعد المصب الأساسي للدم [10].

3-1-1 الأنواع الخلوية للأورام:

تقسم الأورام إلى [10]:

- أورام حميدة Benign tumors تتميز عموماً بانقسام خلوي بطيئ لا تشكل نقائل خلوية في أعضاء أخرى قريبة أو بعيدة، تتمثل خطورتها فقط في الضَّغَط على الأعضاء خصوصاً في حال وجدت في مكان ضيق كالجمجمة.
- أورام خبيثة Malignant tumors تتميز بانقسام خلوي سريع غير مضبوط، وبإمكانية خلاياها على الانفصال عن الكتلة الورمية وتشكيل نقائل خلوية في أعضاءٍ أخرى عن طريق الدورة الدموية أو اللمفية والتي تعد نوىً لكتل ورمية جديدة.

4-1-1 الأنماط النسيجية للأورام السرطانية:

صُنِّفت الأورام السرطانية حسب الأنماط النسيجية الناشئة عنها من قبل جمعية أبحاث السرطان cancer research society إلى:

- **Carcinoma**: هي الأورام المتشكلة في النسيج الظهارية، إما المغطية لسطح الجلد أو الأعضاء الداخلية، تشمل العديد من الأنواع منها الغدية adenocarcinoma، والناشئة عن الخلايا القاعدية basal cell carcinoma، والناشئة عن الخلايا الحرشفية squamous cell carcinoma، والناشئة عن الخلايا الانتقالية transitional cell carcinoma، وتشكل 90% من حالات السرطان.
- **Sarcoma**: الخلايا السرطانية المتشكلة في أنسجة ضامة صلبة مثل العظام، أو رخوة مثل الخلايا الدهنية، والعضلات و النسيج الضام.
- **Leukemia**: تتشكل من كريات الدم البيضاء الخبيثة.
- **Lymphoma**: الخلايا السرطانية المتشكلة في خلايا الجهاز اللمفاوي مؤديةً لإنتاج خلايا لمفاوية غير طبيعية أقل قدرة في مكافحة العدوى.
- **Myeloma**: الخلايا السرطانية الناتجة عن ورم نقي العظم وخصوصاً الخلايا اللمفاوية البائية.
- **Mesothelioma**: تعد من الأورام النادرة الناتجة عن البطانة المغطية لبعض الأعضاء الداخلية (mesothelium) كالرئتين والقلب. cancer research society

5-1-1 طرق العلاج المتبعة حالياً:

- اعتمدت مجموعة من الطرق العلاجية لمحاربة الخلايا السرطانية [11] ومنها
- العلاج الجراحي: تُعتمد الجراحة كعلاج للعديد من الأورام السرطانية مثل أورام الكولون والمري، كما تتجه الدراسات الحالية للقضاء على إمكانية انتقال الخلايا السرطانية من خلال التجميد بالنتروجين السائل، أو التعريض للأشعة.
- العلاج الكيميائي: الذي بدأ استعماله في العقدين الماضيين، وقد تم تحديد العديد من المركبات الفعالة في القتل السريع لخلايا عدد من أنواع السرطانات، وتتجه الأبحاث حالياً لتطوير هذه المركبات للتخفيف من آثارها الجانبية وتوجيهها للخلايا السرطانية فقط.
- العلاج الهرموني: يعتمد على استعمال مثبطات الهرمونات للحد من نمو وانتقال الخلايا الورمية.
- العلاج بالأشعة: يستعمل إما لتحريض قتل الخلايا السرطانية، أو للعلاج الوقائي للنسج المجاورة لمنطقة إزالة جراحية لورم خبيث.
- العلاج المساعد: وهو استخدام العلاج الكيميائي بعد الجراحة للتأكد من قتل الخلايا السرطانية المتبقية، وقد استخدم في حالات سرطان الكولون والخصية.
- العلاج المناعي: يعتمد على المركبات المناعية التي يستخدمها الجسم لمحاربة الخلايا السرطانية والتي تتمثل بال: أنترفيروونات، وأنترلوكينات، وسيتوكينات، والمثبطات الذاتية لتشكل الأوعية الدموية، كما تجري حالياً الدراسات على تطوير لقاح لتعزيز استجابة الجسم المناعية ضد الخلايا السرطانية. [11]

6-1-1 سرطان الخلايا الدبقية Glioma:

تعد الأورام الدبقية من أكثر أورام الجهاز العصبي المركزي شيوعاً، وتشكل 5% من مجمل حالات السرطان و 50% من حالات السرطان داخل الجمجمة مسببةً موت 80% من المرضى خلال السنة الأولى بعد التشخيص، كما تشكل هذه الأورام اضطرابات عصبية مؤدية إلى إعاقات تختلف باختلاف المنطقة المصابة، حيث يحدث ضعف في الكلام أو فقدان البصر عند تشكل الأورام في مناطق دماغية مسؤولة عن الحركات البلاغية في حين أن تشكلها في مناطق صامتة يسمح بنمو وتقدم الورم قبل ظهور الأعراض وتنتهي بالموت حيث تحتل المرتبة الثالثة كأدنى معدل بقاء (إذ يحتل سرطان البنكرياس والرئة المرتبتين الأولى والثانية على الترتيب) [12] [13].

تصنف الأورام الدبقية حسب قدرتها على تشكيل نقائل خلوية إلى الأنسجة المجاورة والتطور لخلايا خبيثة في صفيين [14]:

- الصف الأول تتميز خلاياه بقدرة عالية على الانتقال والإمراضية وتتمثل ب: الخلايا النجمية astrocytoma، والخلايا النجمية السرطانية anaplastic astrocytoma، والخلايا الدبقية السرطانية متعددة الأشكال glioblastoma multiforme.
- الصف الثاني تتميز خلاياه بقدرة ضعيفة في الانتقال والتحول لخلايا خبيثة وتتمثل ب: الخلايا النجمية الشعرية pilocytic astrocytoma، والخلايا النجمية العملاقة تحت البطانة العصبية subependymal giant cell astrocytoma.
- بالإضافة لخلايا ذات قدرة ضئيلة جداً في الانتقال والإمراضية وتتمثل ب: fibrillary، gemistocytic و protoplasmic.

الخلايا T98G:

تنتمي هذه الخلايا إلى صف الخلايا الدبقية ذات القدرة العالية على الانتقال والإمراضية Gliomlastoma multiforme، تنمو في وسط الزراعة بشكل مجموعات، عالية النشاط الانقسامي ومقاومة للعلاج [15].

7-1-1 سرطان الثدي:

يعد سرطان الثدي السرطان الأكثر تواتراً بين النساء والسبب في 23% من مجمل وفيات السرطان، غالباً ما ينشأ من خلايا ظهارية غدية Adenocarcinoma تنمو مؤدية لتشكيل كتلة ورمية في الثدي وتكمن خطورته في قدرته على تشكيل نقائل خلوية إلى الغدد اللمفاوية وأعضاء أخرى وتشكل هذه النقائل السبب الرئيس للوفاة [16, 17]، يعود 5-10% من حالات سرطان الثدي لأسباب وراثية ناتجة عن حدوث طفرة في أحد الجينات الكابتة للورم، إذ تعد الطفرات في الجين BRCA1 المسؤولة عن 50% من حالات سرطان الثدي العائلي [18].

صنفت الجمعية الأمريكية للسرطان American Cancer Society خلايا سرطان الثدي وفقاً لوجود مستقبلات هرمونات HR (Hormone Receptor) (الإستروجين والبروجستيرون) ومستقبل عامل نمو الخلايا الظهارية (HER2) إلى:

خلايا إيجابية لمستقبلات الهرمونات (HR⁺): وهي الخلايا التي تملك مستقبلات للإستروجين أو للبروجستيرون، وتميل إلى النمو والانقسام بشكل بطيء، يمكن علاجها بأدوية معالجة هرمونية تؤدي لتخفيض مستويات الإستروجين أو البروجسترون أو تثبيط هذه المستقبلات، كما أن نسبة التحسن تكون أسرع.

خلايا سلبية لمستقبلات الهرمونات (HR⁻): وهي خلايا لا تملك مستقبلات الإستروجين أو البروجستيرون، وتميل الخلايا إلى النمو والانقسام بشكل سريع، علاجها بالأدوية الهرمونية غير مفيد.

خلايا (HER2⁺): تعبر هذه الخلايا السرطانية عن البروتين HER2 بنسب مرتفعة، يمكن علاجها بأدوية موجهة لاستهداف هذه المستقبلات.

خلايا (HER2⁻): يكون التعبير عن البروتين HER2 منخفض جداً، لاتستجيب للأدوية المستهدفة لهذه المستقبلات.

خلايا ثلاثية الإيجابية: تكون هذه الخلايا إيجابية لمستقبلات الإستروجين والبروجستيرون ولديها تعبير مرتفع عن بروتينات HER2، علاجها أكثر سهولة من الخلايا سلبية المستقبلات..

خلايا ثلاثية السلبية: تكون هذه الخلايا سلبية لمستقبلات الإستروجين والبروجسترون ولديها تعبير منخفض جداً عن بروتينات HER2.

الخلايا MDA-MB-231:

تصنف الخلايا MDA-MB-231 ضمن مجموعة الخلايا ثلاثية السلبية وهي خلايا منتقلة، تميل بشكل تفضيلي للانتقال إلى النسيج العظمية أو الدماغ أو الرئتين، وتعد من الخلايا ضعيفة الاستجابة للمعالجة [19].

إن الهدف الأساسي للأبحاث المهمة بدراسة الأورام السرطانية وكيفية القضاء عليها هو إيجاد استراتيجيات علاجية فعّالة في مجال دفع الخلايا للموت الخلوي.

2-1 الموت الخلوي Cell death:

يعد الموت الخلوي أحد الوظائف الحيوية الهامة في حياة الكائن الحي، له العديد من الأشكال ويتم تحريضه كاستجابة لعوامل مختلفة.

1-2-1 الموت الخلوي النيكروزي (التنخر) Necrosis:

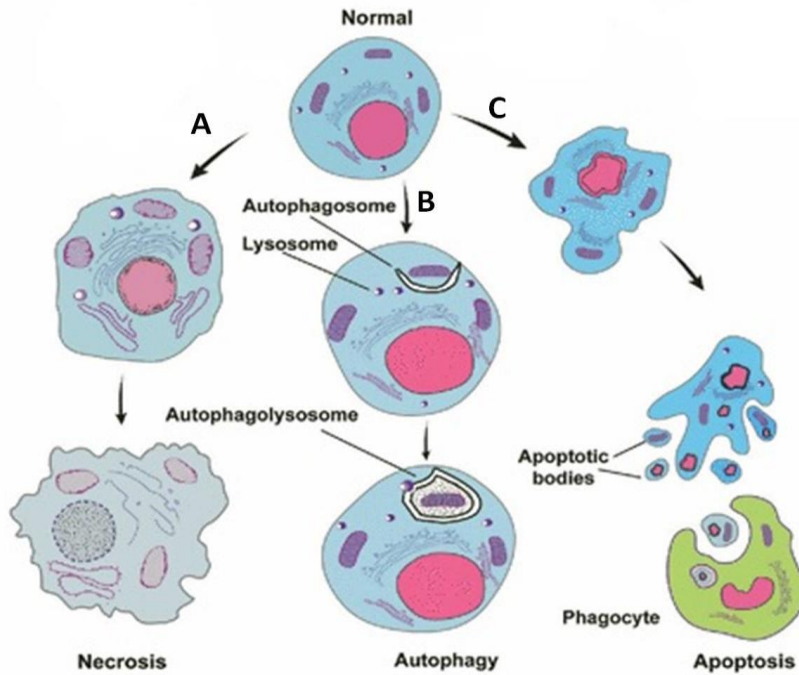
يتعرض الموت الخلوي النيكروزي كنتيجة للإجهاد الخلوي بتأثير عوامل فيزيائية أو كيميائية، يتصف بالعديد من الصفات كزيادة حجم الخلية، تضخم السيتوبلازما والعضيات الخلوية ويُتبع بفقدان هذه العضيات لوظائفها الحيوية. يمكن أن يبدأ المسار الخلوي للموت النيكروزي بتفعيل البروتين (RIP1 (receptor-interacting protein 1 والذي يفعل عدداً من المسارات الجزيئية المؤدية لارتفاع نسبة كل من شوارد الكالسيوم و ROS (reactive oxygen species) في السيتوبلازما مما يؤدي بشكل مباشر أو غير مباشر إلى تخريب البروتينات والدهون والحمض النووي، وينتهي بموت وتحلل الخلية وتحفيز إفراز العديد من السيتوكينات الالتهابية المؤدية لحدوث الالتهاب، يمكن اللجوء إليه كهدف في قتل الخلايا السرطانية المقاومة لتفعيل مسارات الموت الخلوي المبرمج Apoptosis [20].

2-2-1 البلعمة الذاتية Autophagy:

تبدأ عملية البلعمة الذاتية بعزل جزء كبير من السيتوبلازما بما تحويه من عضيات خلوية كالميتوكوندريا Mitochondrion والشبكة السيتوبلازمية الداخلية Endoplasmic Reticulum وجهاز كولجي ضمن حويصلات ضخمة في السيتوبلازما تسمى حويصلات أو جسيمات البلعمة الذاتية autophagosomes مضاعفة أو متعددة الأغشية، يتم دمجها لاحقاً مع الجسيمات الحالة Lysosomes، ترتبط البلعمة الذاتية بالعديد من العمليات الفيزيولوجية كالموت الخلوي، والاستقلاب الخلوي Cell Metabolism، والمناعة والشيخوخة، والعمليات المرضية كالسرطان، والأمراض العصبية والاضطرابات الاستقلابية، ويتم بألية جزيئية مستقلة عن تفعيل بروتينات الكاسباز Caspases والتكثف النووي [21].

3-2-1 الموت الخلوي المبرمج Programmed cell death:

يشكل الموت الخلوي المبرمج الآلية الخلوية الأساسية للموت الخلوي ويعرف أيضاً بالاستموات Apoptosis، الذي يؤدي دوراً محورياً في السيطرة على حجم الأنسجة من خلال إحداث التوازن بين عدد الخلايا الميتة وعدد الخلايا المنقسمة ويعد تحريضه الهدف الأساسي للعديد من الاستراتيجيات العلاجية المضادة للأورام، تتصف الخلايا الخاضعة للموت الخلوي المبرمج بصفات شكلية تتضمن الانكماش الخلوي، وتكثف المادة النووية بشكل هلال حول الغشاء النووي الداخلي متبوعاً بتشدها وتشكيل عدة نوى، وبشكل لاحق يحدث انعدام تكامل الغشاء السيتوبلازمي. أما على المستوى الجزيئي فيتم تفعيل شلال منتظم من البروتينات أهمها بروتينات الكاسباز وانتقال جزيئات فوسفاتيديل سيرين إلى الطبقة الخارجية من الغشاء السيتوبلازمي المضاعف والتي تكون بمثابة مفعّل مناعي لخلايا البالعات الكبيرة التي تتعرف هذه الخلايا على أنها خلايا ميتة. ينتهي الاستموات بتجزؤ الخلية إلى جسيمات تعرف بجسيمات الاستموات Apoptotic bodies والتي تتم بلعمتها دون تحريض آليات النهائية مناعية [22].



الشكل 2: ترسيم للآليات المختلفة للموت الخلوي المحرض في الخلايا، A الموت الخلوي النيكروز (التنخر)، B البلعمة الذاتية، C الموت الخلوي المبرمج (الاستموات).

1-3-2-1 كيفية تحريض الموت الخلوي المبرمج:

يتم تحريض الموت الخلوي المبرمج في العديد من الظروف منها فيزيولوجية ومنها مرضية:

الظروف الفيزيولوجية:

- في مراحل التطور الجنيني، يُعرض الموت الخلوي المبرمج لتكوين الأعضاء والأطراف بشكلها الطبيعي ويعرف عندها بالموت المكون للشكل.
- في حالات التجديد الخلوي، موت الخلايا الهرمة واستبدالها بخلايا جديدة ناتجة عن انقسام خلوي مثل خلايا ظهارة المعدة.
- ضمور الرحم والتدي بعد الحمل والإرضاع.
- ضمور الغدة الصعترية (التوتة) Thymus في سن مبكرة.

الظروف المرضية:

- في حالات الأورام، كاستجابة الخلايا السرطانية للعلاج.
- في حالة مرض عوز المناعة المكتسب (AIDS)، الذي يحرض موت واستنزاف الخلايا التائية CD4⁺.
- في حالات الأمراض التنكسية كالزهايمر وداء باركينسون.
- بتأثير العوامل الضارة كالأشعة، ونقص الأكسجة والصدمات الحرارية [23].

1-3-2-2 الموت الخلوي المبرمج والسرطان:

ربطت العديد من الدراسات استجابة الخلايا السرطانية للإستراتيجيات العلاجية المختلفة (العلاج الكيميائي أو العلاج المناعي أو العلاج بالأشعة) بقدرتها على تفعيل مسارات خلوية منتظمة (شلالات) cascades تؤدي إلى الموت الخلوي المبرمج (الاستموات)، كما أن عدم قدرة الخلايا على تفعيل هذه المسارات هو السبب الأساسي في المقاومة الخلوية للعلاج، لذلك يعتمد تطوير أدوية علاجية تستهدف تفعيل آليات الموت الخلوي المبرمج في الخلايا على الفهم الواضح للأساس الجزيئي للسبيل الإشاري المفضي لهذه العملية وتحديد المعوقات المسببة للمقاومة العلاجية [10]

1-2-3-3 آليات الموت الخلوي المبرمج:

أشارت الدراسات إلى أن تحريض الموت الخلوي المبرمج غالباً ما يكون مرتبطاً بتفعيل جملة من بروتينات (أنزيمات) الكاسباز Caspases، وهي بروتينات تتواجد في الخلايا كطليعة بروتين يتم تفعيلها بعملية شطر cleavage، وتُفَعّل بدورها بروتينات أخرى من نفس العائلة بطريقة متتابعة ومنظمة، تسهم في تفعيل أنزيمات DNase مؤدية لتشدد DNA بالإضافة لأنزيمات محللة لبروتينات الخلية كبروتينات الأكتين والفودرين واللامين التي تفقد الخلية شكلها وتبدأ بالتقلص.

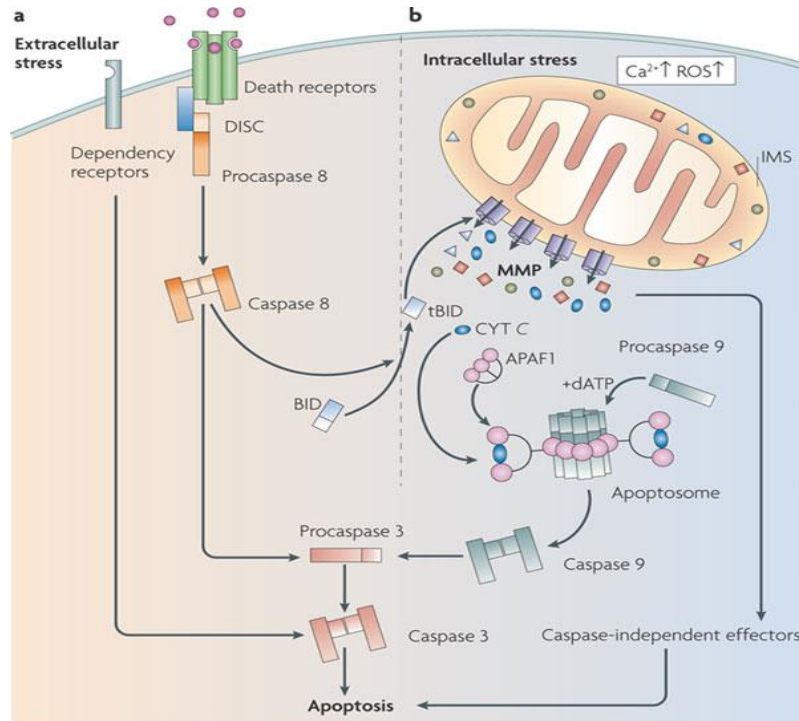
يمكن تفعيل بروتينات الكاسباز بأكثر من آلية، حيث تختلف نقطة التفعيل باختلاف طبيعة العلاج. فإما أن يكون التفعيل عبر سبيل pathway خارج خلوي عن طريق أحد مستقبلات الموت الموجودة على الغشاء السيتوبلازمي أو تفعيل عبر سبيل داخل خلوي [24].

1-3-3-2-1 السبيل خارج الخلوي Extrinsic pathway:

يبدأ هذا السبيل بتفعيل أحد مستقبلات الموت الموجودة على الغشاء السيتوبلازمي والتي غالباً ما تكون من عائلة مستقبلات بروتينات TNF المؤلفة من أكثر من 20 بروتيناً. تتميز مستقبلات الموت بمجالات داخل خلوية مؤلفة من حوالي 80 حمضاً أمينياً تؤدي الدور الأساسي في عملية نقل الإشارة، من هذه المستقبلات Fas الذي يتفعل بوجود الربيطه FasL مؤدياً لتفعيل أولى بروتينات الكاسباز المشتركة في السبيل الخلوي وهو Caspase-8 [24]، يمكن بعدها تفعيل مسارين مختلفين باختلاف النمط الخلوي ففي النمط الأول يجتمع عدد كبير من بروتينات Caspase-8 المفعلة مشكلة معقداً يسمى المعقد الإشاري المحرض للموت والذي يؤدي لتفعيل مباشر لـ Caspase-3 بشكل غير معتمد على الميتوكوندريا، أما في النمط الثاني فتكون نسبة Caspase-8 ضئيلة وغير كافية للتفعيل المباشر لـ Caspase-3 فيُتَبَع عندها هذا السبيل بتنشيط السبيل الداخلي خلوي من خلال البروتين Bid وتحويله للشكل الفعال tBid (الشكل 3a) الذي يفعل بدوره مسار موت خلوي من خلال التأثير على بروتينات الميتوكوندريا إلا أن هذا المسار يعد مساراً جزئياً حيث تبين عدم تغير مستويات FADD و Caspase-8 بعد العلاج الكيميائي المحرض للموت الخلوي المبرمج في الخلايا الليفية الجنينية، كما أنه يمكن أن يحرض بمستقبلات أخرى مثل TNF-R1، TRAIL-، TRAIL-R2، R1 [25].

2-3-3-2-1: Intrinsic pathway داخل الخلوي

يتم تفعيل السبيل داخل الخلوي للموت المبرمج عن طريق الميتوكوندريا، حيث تستهدف الأدوية العلاجية التأثير على بروتينات عائلة الـ Bcl-2 (وهي عائلة مكونة من 30 بروتيناً منها المضادة للموت المبرمج ومنها المفعلة له) المسيطرة على سلامة الأغشية الميتوكوندرية، يبدأ المسار بتنشيط التعبير عن بروتين الـ Bcl-2 وتفعيل البروتين Bax مما يخلق تغييراً في الأغشية الميتوكوندرية محرضاً إياها على لفظ بعض الجزيئات المحرصة للموت إلى الستوبلازما مثل عامل تحرض الموت المبرمج (Apoptosis Inducing Factor)، وأنزيمات النوكلياز الداخلية (Endo-G) التي تؤدي لتغيرات نووية، وجزيئات أخرى مثل السييتوكروم (C) Cytochrome-C، و Smac/DIABLO، و HtrA2/ OmiK، حيث يرتبط السييتوكروم (C) إلى جزيئات Apaf-1 بوجود جزيئات الطاقة ATP أو dATP مشكلاً بوجود المركب Pro-Caspase-9 ما يسمى جسيم الموت المبرمج "Apoptosome" مؤدياً لتفعيل Caspase-9 (الشكل 3b) والذي يفعل بدوره كلاً من Caspase-3 و Caspase-7. أما Smac/DIABLO و HtrA2/ OmiK فتؤدي دوراً منظماً لتحديد عمل مثبطات تفعيل الكاسبيز (IAPs) [25].



الشكل 3: مخطط ترسمي للآليات الجزيئية للموت الخلوي المبرمج، a المسار الخارج خلوي المعتمد على تفعيل أحد مستقبلات الموت، b المسار الداخل خلوي المعتمد على الميتوكوندريا.

اتجهت الدراسات الحالية الهادفة لإيجاد أدوية مضادة للسرطان إلى البحث عن مركبات تتمتع بالقدرة على تفعيل أحد هذه المسارات الخلوية وبالتالي تحريضها على الموت الخلوي المبرمج.

4-2-1 المعالجة الكيميائية: Chemotherapy:

تعد المعالجة الكيميائية الشكل التقليدي لعلاج الأورام السرطانية لكنها تفشل غالباً في القضاء على المرض وذلك لأسباب متعددة منها عدم كفاءة العلاج في التخلص من جميع أنواع الخلايا السرطانية، المتكاثرة والكامنة والجذعية، وغياب الطريقة المثلى لإيصاله إلى الخلايا المستهدفة ومقاومة الخلايا للعلاج. إضافة لإحداث العلاج لآثار جانبية سلبية على الخلايا الطبيعية مثل تثبيط خلايا نقي العظم، والغثيان، والإقياء، والسمية العصبية وغيرها من الأعراض. فمثلاً العلاج بمادة الباكليتاكسيل paclitaxel يستهدف الخلايا السرطانية المتكاثرة دوناً عن الخلايا السرطانية الكامنة والتي تسبب نواة جديدة لعودة تكاثر الخلايا السرطانية، كما أن العلاج بمادة سيكلوفوسفاميد cyclophosphamide يؤمن قتل الخلايا السرطانية الكامنة والمتكاثرة، إلا أن قدرة الخلايا على مقاومة هذه المادة تسمح لها بالهروب من العلاج، بالإضافة لعدم التمكن من القضاء على الخلايا الجذعية السرطانية التي تشكل السبب الأساسي لانتكاس المرض وانتقاله لأعضاء أخرى [26]، لذلك لابد من تصميم نظام علاجي جديد والحد من الآثار الجانبية الناجمة عن العلاج الكيميائي وتطوير نظم توصيل دوائية تستهدف فقط الخلايا السرطانية خصوصاً الجذعية منها [26].

لذلك اتبعت العديد من الأبحاث نهجاً جديداً معتمداً على إيجاد بدائل علاجية للتغلب على عيوب العلاج الكيميائي التقليدي وتحسين أدوية علاج السرطان وذلك من خلال المنتجات الحيوية الطبيعية [27].

5-2-1 المعالجة بالبدائل الطبيعية:

انتشرت في الطب القديم أهمية المنتجات الطبيعية المستمدة من النباتات، الحيوانات والكائنات الدقيقة في علاج العديد من الأمراض، مما يوحى بأهمية دراسة التأثير الحيوي لهذه المنتجات الحيوية على العديد من الأمراض وهذا ما لجأت إليه العديد من الأبحاث الحالية. فقد بينت دراسات حديثة أن الشاي الأخضر المستخدم بكثرة في الطب الياباني يحوي مركبات مضادة للأكسدة ويبطئ نمو سرطان الثدي بشكل كبير عند إنبات الفئران، كما لوحظ من خلال التجارب في الزجاج وفي الكائن الحي آثار مضادة للسرطان في نبات الزعفران [1]، و آثار واعدة لمركبات نباتية مثل الـ Curcumin و Genistein الأول مستخلص من نبات الكركم Curcuma longa والثاني من نبات فول الصويا Soybeans في تثبيط عيوشية وانقسام وهجرة

خلايا سرطان الثدي MDA-MB-231 وتفعيل آليات الموت الخلوي المبرمج فيها [28, 29]. كما أن لبعض النباتات آثاراً مزدوجة تجاه الخلايا مثل إمكانية المستخلص المائي لنبات *Mikania micrantha* في تثبيط الدارة الخلوية لخلايا سرطان الدم K562 وخلايا سرطان عنق الرحم HeLa في الطور G2/M وتحريضها على الموت الخلوي المبرمج [30]. بالإضافة لآثار مضادة للسرطان وجدت في المملكة الحيوانية كأثر المستخلص المائي والكحولي للإسفننج البحري *Polymastia janeirensis* في تحريض الموت الخلوي المبرمج في الخلايا الدبقية السرطانية U138MG [31]. وقد بينت العديد من الدراسات الفعالية الهامة لمستخلصات الطحالب البحرية وذلك لغناها بمركبات حيوية متنوعة غير موجودة في النباتات الأرضية [32].

1-3 الطحالب البحرية **Marine alga**:

تعد البيئة البحرية من أغنى البيئات بالكائنات الحية وأكثرها تنوعاً حيث تحوي 80% من أنواع الكائنات المتواجدة على سطح الأرض، وهذا التنوع الحيوي يعكس تنوعاً في المركبات النشطة حيوياً والتي تسهم في تطوير مركبات دوائية جديدة أكثر فعالية [33]. ومن أهم هذه الكائنات الطحالب، التي تعيش في البيئة البحرية وتصنف حسب حجمها في صنفين رئيسيين [34]:

- الطحالب الدقيقة *Microalgae* التي تتواجد في جميع البيئات البحرية وتتمثل بمجموعة العوالق النباتية وتلعب دوراً هاماً في السلسلة الغذائية.
- الطحالب الكبيرة *Macroalgae* المعروفة باسم الأعشاب البحرية (*seaweed*) التي تتواجد في المنطقة الشاطئية وتتمثل بالطحالب الخضراء والحمراء والبنية الشكل 4.



الشكل 4: صورة لنماذج عن كل من الطحالب الخضراء والبنية والحمراء.

1-3-1 أهمية الطحالب البحرية الكبيرة:

تمتلك الطحالب البحرية الكبيرة أهمية واسعة خصوصاً في الدول الآسيوية مثل الصين واليابان وكوريا، وذلك لكونها مصدراً غذائياً غنياً بالفيتامينات، المعادن، السكريات، البروتينات، الستيروئيدات والألياف. بالإضافة لأهميتها في مجال الطب التقليدي، حيث استخدمت في الطب الصيني والياباني في علاج الاضطرابات الغدية ومنها فرط نشاط الغدة الدرقية، توفير الوقاية من أمراض القلب والشرابيين ومواجهة العوامل الممرضة [35]. بالإضافة لأنشطة حيوية أخرى هامة إذ تعد مضادة للجراثيم antimicrobial، مضادة للفيروسات antiviral، مضادة للتخثر anticoagulant، مضادة أكسدة antioxidant، ومضادة أورام antitumor [35, 36] كما تعد مصدراً لاصطناع مجموعة متنوعة من المركبات النشطة بيولوجياً مثل الكاروتينات Carotenoids، التربينات Terpenoids، الكلوروفيل Chlorophyll، الأحماض الدسمة المشبعة وغير المشبعة Saturated and polyunsaturated fatty acids، الأحماض الأمينية Amino acids. بالإضافة للمركبات مضادات الأكسدة مثل البولي فينولات Polyphenols، الفلويديات Alkaloids، الكاراجينان Carrageenan وغيرها. وتدخل في مجال صناعة وتطوير الأدوية الموجهة لعلاج أمراض السرطان، الإيدز، الالتهابات، الروماتيزم والإصابات الفيروسية أو الجرثومية أو الفطرية [35].

1-3-2 الفعالية الحيوية المضادة للسرطان للطحالب البحرية:

تشير الدراسات إلى أهمية الخصائص الحيوية للطحالب البحرية الخضر والبنية والحمرة في العديد من المجالات الحيوية وهذا ما قد يتوافق مع الانخفاض الملحوظ لمعدلات الإصابة بسرطان الثدي عند الشعوب الآسيوية المعتمدة في غذائها على الأعشاب البحرية [37]، مما يدعو للتكهن بأهمية هذه الطحالب ومستخلصاتها في الوقاية والعلاج من أمراض السرطان، وهذا ما دفع العلماء لاحقاً لدراسة وتحديد الفعالية الحيوية الكامنة في الطحالب البحرية تجاه الخلايا السرطانية، مؤكداً الفرضية العلمية. فقد بينت الدراسات تأثير المستخلص الميثانولي للطحلب البني *Sargassum muticum* في انخفاض العيوشية الخلوية لخلايا الخطين الخلويين MDA-MB-231 و MCF-7 لسرطان الثدي وزيادة نسبة الموت الخلوي المبرمج فيهما [38]، كما دُرِس دور المستخلص المائي والميثانولي للطحلب البحري الأخضر *Ulva Fasciata* المضاد لسرطان الغدد اللمفاوية المتشكل عند الفئران البيضاء [39].

اتجهت الدراسات الحديثة لإيجاد مركبات حيوية جديدة أكثر فعالية ضد العديد من الأمراض ومنها السرطان، وذلك لامتلاك المركبات الحيوية خصائص هامة مثل التوافق الحيوي مع الخلايا الحية وإمكانية التحلل الحيوي والتخلص منها دون آثار جانبية، من هذه المركبات المتعددة السكريات السكرية المكبرنة ومركبات الاستقلاب الثانوية [32].

1-2-3-1 مركبات الاستقلاب الثانوية Secondary metabolites:

تتميز الطحالب البحرية الحمر والبنية بغناها بمركبات استقلاب ثانوية والتي تؤدي دوراً هاماً في العديد من الفعاليات الحيوية المختلفة التي تتمتع بها الطحالب. فمثلاً للعديد منها خواص مضادة للسرطان مثل مركبات التربينات متعددة الهالوجين polyhalogenated monoterpene المعزولة من الطحالب البحرية الحمر من جنس *Plaucamium*، ومركبات tetraprenylquinone و sargaquinoic acid المعزولة من الطحلب البني *Sargassum heterophyllum* المثبثة لعيوشية خلايا سرطان الثدي MDA-MB-231 [40]، كما أكدت دراسة أخرى على الدور المضاد للسرطان لمركب الـ Clerosterol المعزول من الطحلب الأخضر *Codium fragile* وذلك بتحريض موت خلوي مبرمج في خلايا سرطان الجلد A2058 [41].

1-2-3-2 المتعددة السكريات السكرية Sulfated Polysaccharides:

تتواجد المتعددة السكريات بوفرة في الجدر الخلوية للطحالب البحرية الكبيرة، وتشكل مجموعة من المركبات الكبيرة الهامة في المجالات الطبية والصيدلانية حيث تتمتع بخصائص هامة مضادة للأكسدة، مضادة للتخثر، مضادة للالتهاب ومضادة للأورام [42].

تتميز المتعددة السكريات المكبرنة بهياكل مختلفة ومتنوعة حسب الطحلب المستخلصة منه مما يقود إلى تنوع في الفاعلية الحيوية، وتصنف حسب نوع الطحلب إلى:

- **أولفان Ulvan**: المتعدد السكري المكبرن الرئيس في الطحالب الخضراء، وهو مركب منحل بالماء، يشكل حمض أولفانوبيوأورونيك ulvanobiouronic acid 3-sulfate، الذي يتكون من سكرين هما إما غلوكورونيك وإما إيدورونيك، الوحدة الأساسية في تركيبه. للأولفان العديد من الفعاليات الحيوية فمثلاً يتمتع الأولفان المستخلص من الطحلب *Ulva Lactuca* بفعالية مضادة لسرطان الكولون (CaCO-2) [43, 44].

- **الفوكويدان Fucoidan**: يتواجد في الطحالب السمراء، ويتكون من L-fucos المكبرت بالإضافة لنسبة ضئيلة من السكريات D-galactose, D-mannose, D-xylose, and uronic acid ويتمتع بالعديد من الفعاليات الحيوية منها الفعالية المضاد للسرطان، إذ بينت الدراسات قدرته على تثبيط نمو الخلايا الورمية لخلايا سرطان الكولون HCT116, HT-29 [45]، وقدرته على تحريض الموت الخلوي المبرمج والبلعمة الخلوية في خلايا سرطان الثدي MCF-7، وعلى تثبيط جزئي لنمو خلايا سرطان الكبد (Hepatocellular carcinoma) HCC من خلال منع انتشارها، إلا أنه لا يثبط نمو الأوعية الدموية [46].
- **الكاراجينان Carrageenan**: يتواجد بشكل رئيسي في الجدر الخلوية للطحالب الحمراء [47].

3-3-1 الطحالب الحمر Rhodophyta:

تتميز الطحالب الحمر باحتوائها على أصبغة الفيكورثيرين Phycoerythrin والفيكوسيانين Phycocyanin وتصنف الطحالب الحمر إلى شعبيتين وهما حسب [48]:

- Cyanidiophytina المؤلف من صف واحد وهو Cyanidiophyceae
- Rhodophytina المؤلف من ستة صفوف وهي:
 - Bangiophyceae
 - Compsopogonophyceae
 - Florideophyceae
 - Porphyridiophyceae
 - Rhodellophyceae
 - Stylonematophyceae

1-3-3-1 النوع لورنسيا بابيلوزا *Laurencia papillosa*:

وهو أحد أنواع الطحالب الحمر وتصنف حسب الـ Algae Base كما يلي:

Plantae	مملكة Kingdom
Rhodophyta	شعبة Phylum
Florideophyceae	صف class
Rhodymeniophycidae	صنيف Subclass
Rhodomelaceae	عائلة Family
Laurencia	جنس Genus
Laurencia papillosa	نوع species

يتراوح طول النبات بين 5-16 سم وينمو بشكل فروع قصيرة وكثيفة بالقرب من الشواطئ البحرية. تبين الدراسات أن مختلف أنواع الطحالب الأحمر *Laurencia* منتجة للعديد من المركبات الحيوية الهامة ومخزن لها، منها مركبات الاستقلاب الثانوية مثل Sesquiterpen و Triterpenes و Diterpenes [49]، والتي ثبتت أدوارها الهامة المضادة للطفيليات كالليشمانيا والتريبانوزوما والملاريا، المضادة للالتهاب والمضادة للسرطان [50]، بينت العديد من الدراسات الأهمية الحيوية لمركبات مستخلصة من الطحلب *L. papillosa*، إذ أن لمستخلصه الميثانولي دور هام كمضاد فطري وذلك لغناه بمركبات

الاستقلاب الثانوية كالكوليستون *Cholestane* والألدهيدات [51] ومضاد بكتيري موجه ضد أنواع مختلفة من البكتريا موجبة وسالبة الغرام [52]. واهتمت دراسات أخرى بدور مركبات الـ *Dactylone* التي ترتبط ارتباطاً كيميائياً وثيقاً إلى التربينات المستخلصة من طحلب *Laurencia* في تثبيط عيوشية خلايا سرطان الكولون HCT116 من خلال تثبيط التعبير عن السيكلين D وبالتالي إيقاف الدارة الخلوية في الطور G1، بالإضافة لتفعيل آليات الموت الخلوي المبرمج فيها [38]. كما وصفت إحدى الدراسات أهم المركبات المعزولة من الطحلب *Laurencia papillosa* وهي المتعددات السكرية المكبرثة ومنها الأغار والكاراجينان والذي يتميز بالعديد من الوظائف والفعاليات الحيوية الهامة.



الشكل 5: الطحلب البحري الأحمر *Laurencia papillosa*

4-3-1 الكاراجينان Carrageenan:

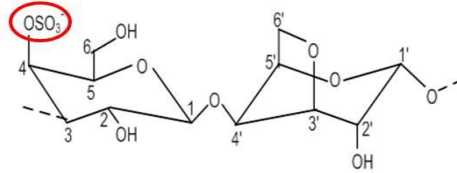
1-4-3-1 تعريفه وتوصيفه:

هو متعدد سكري مكبرت يتواجد بشكل رئيسي في الجدر الخلوية للطحالب الحمر، يتكون من سلاسل سكرية طويلة تتكون الوحدة الأساسية فيها من تكرار لسكري غالاکتوز Galactose (مرتبطين بروابط غليكوزيدية هما $\alpha(1-3)$ و $\beta(1-4)$) غالاکتوز ومرتبطة بجذور الكبريت [53]، وتصل كتلته الجزيئية إلى 100 كيلو دالتون.

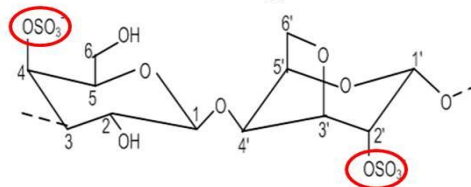
1-2-4-3-1 أنماطه:

تختلف أنماط الكاراجينان باختلاف توضع وعدد الزمر الكبريتية على الوحدات السكرية وبذلك يقسم الكاراجينان إلى ثلاث مجموعات: كابا (κ) نسبة الكبريتة 15-20%، يوتا (i) نسبة الكبريتة 28-30% ولامدا (λ) نسبة الكبريتة 32-39% (الشكل 6) [54].

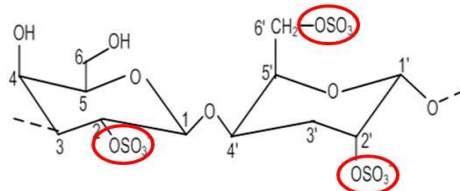
κ -Carrageenan



i-Carrageenan



λ -Carrageenan



الشكل 6: ترسيم للبنية الكيميائية لمركبات الكاراجينان، إذ تشير الدوائر الحمر إلى الجذور الكبريتية لكل مجموعة من مجموعات الكاراجينان.

1-3-4-3 دور نسبة الكبريتة في الفعاليات الحيوية:

يؤدي الاختلاف في نسبة الكبريتة إلى اختلافات في الخصائص الفيزيائية والكيميائية للمركب إذ تنخفض درجة حرارة الذوبان وتقل اللزوجة بازدياد نسبة الكبريتة [55]، وهذا ما قد يؤدي إلى اختلافات في الفعالية الحيوية للمركب. فقد أشارت إحدى الدراسات إلى أن تعديل نسبة الجذور الكبريتية في المتعددات السكرية بإدخال مجموعات كبريت جديدة للمركب يؤدي لتغيير البنية الجزيئية والنشاط الحيوي، حيث اختلفت الفعالية الحيوية للمتعدد السكري المكبرت المستخلص من الفطر *Hypsizigus marmoreus* في تثبيط نمو خلايا سرطان المعدة AGS عند استبدال جزيئات من المركب بمجموعات الكبريت، فازدادت الفعالية الحيوية بزيادة نسبة الجذور الكبريتية [56].

1-3-4-4 استخداماته الصناعية والغذائية:

تتمتع مركبات الكاراجينان بالعديد من الصفات الفيزيائية والكيميائية الهامة والتي تتيح المجال لاستخدامها في العديد من المجالات الصناعية والغذائية والصيدلانية، إذ تدخل في الصناعات الغذائية كالإنتاج الصناعي البيوكيميائي للخل، كما تُضاف كمحسنات أو مضافات للأغذية دون أن تؤدي لآثار سلبية على الجهاز الهضمي للجسم [57]، ومن الناحية الصيدلانية تؤدي مركبات الكاراجينان دوراً في تحسين إنتاج المضادات الحيوية كالتتراسيكلين والكلوروتتراسيكلين [58]، كما تشير دراسات حديثة إلى إمكانية استخدامها كمادة بيولوجية Biomaterial في العديد من الحالات العلاجية لدورها في تحسين تشكيل الأدوية، وتشكيلها لنظام توصيل دوائي Drug delivery حساس لتغيرات الحرارة أو درجة الحموضة، وبالتالي التحكم بكيفية العلاج [47].

1-3-4-5 الفعاليات الحيوية:

تشير الدراسات إلى قدرة مركب الكاراجينان على تفعيل مسارات التهابية في الخلايا البشرية وذلك من خلال تفعيل المسارات المرتبطة بـ NF-KB و Bcl-10 [59]، كما تتمتع هذه المركبات بالعديد من الخصائص الحيوية الهامة منها:

• **الخصائص المضادة للفيروسات Antiviral:** أثبتت العديد من الدراسات فاعلية مركبات الكاراجينان ضد أنواع مختلفة من الفيروسات إذ أظهر لامدا كاراجينان تأثيراً قوياً ضد فيروس HSV-2 (Herpes simplex virus type 2) [60].

• **الخصائص المضادة للتخثر Anticoagulant:** يؤدي الكاراجينان دوراً هاماً مضاداً لتخثر الدم يفوق قدرة الهيبارين بـ 15 ضعفاً من خلال تفعيل العامل الثالث المضاد للثرومبين AT-III (Antithrombin III)، ويرتبط هذا الدور بنسبة الكبريتة، إذ أن قدرة لامدا كاراجينان (عالي الكبريتة) في تنشيط عملية التخثر أكبر من قدرة كابا كاراجينان (منخفض الكبريتة) [61].

• **الخصائص المضاد للأكسدة antioxidant:** تملك المركبات كابا، ويوتا ولامدا كاراجينان قدرة واضحة مضادة للأكسدة وذلك من خلال تنشيط تشكل جذور الهيدروكسيل OH [62].

• **الخصائص المضاد للسرطان Anticancer:** تشير العديد من الدراسات إلى الأهمية الحيوية المضادة للسرطان للمتعددات السكرية المكبريتة وخصوصاً مركبات الكاراجينان، وذلك من خلال خواصها المثبطة لانقسام الخلايا، المسببة للموت الخلوي، المشدفة لـDNA، المضادة لتروية الأورام، المثبطة للنمو، المعطلة للدورة الخلوية و المثبطة للنواقلية الورمية [63, 64].

كما يؤدي كابا كاراجينان دوراً هاماً مضاداً للأورام من خلال خصائص التعديل المناعي وتفعيل خلايا القتلة الطبيعيون NK (Natural killer) وتحريض إفراز عامل النخر الورمي ألفا- (Tumor necrosis factor- TNF- α alpha) وإنتاج أضداد نوعية وتحريض آليات البلعمة الذاتية للخلايا الورمية [65]، كما يثبط لامدا كاراجينان نمو الخلايا الورمية بقطع التغذية الدموية عنها من خلال تحريض الموت الخلوي المبرمج في الخلايا البطانية الوعائية للأوعية الدموية المغذية لها [66].

4-1 أهمية البحث:

بالرغم من الغنى الحيوي للشاطئ السوري وامتلاكه ثروة كبيرة من الطحالب البحرية التي تنتشر بكثرة وتتنوع بشدة، إلا أن الدراسات التي تهتم بدراسة الآثار الحيوية والصيدلانية والعلاجية لمستخلصاتها المختلفة أو تلك التي تبحث في مكوناتها الفعالة ماتزال نادرة جداً، لذا يعد هذا البحث يعد من الأبحاث الأولى التي توجهت لدراسة التأثير الحيوي المضاد للسرطان الكامن في المستخلصات الطحلبية للطحالب البحرية السورية، بالإضافة لتحديد هوية المركبات الفعالة وتوصيف طبيعة تأثيرها.

5-1 هدف البحث:

هدف هذا البحث إلى دراسة التأثير الحيوي لمستخلص الطحلب *Laurencia papillosa* على حيوية الخلايا الدبقية السرطانية البشرية T98G والخلايا السرطانية البشرية الثديية MDA-MB-231 وتحديد المركبات الفعالة فيه ودراسة آليات المسار الجزيئي المفعّل بتأثير المركبات الطحلبية.

الفصل الثاني
مواد وطرائق البحث

2- مواد وطرائق البحث:

1-2 الخطوط الخلوية المستخدمة في البحث:

استعمل في الدراسة خطان خلويّان من الخلايا البشرية السرطانية وهما: الخلايا T98G التي تمثل خلايا دبقيّة بشرية سرطانية تتميز بشكلها النجمي، والخلايا MDA-MB-231 التي تمثل خلايا سرطانية ثديية مشتقة من الخلايا الغدية وتتميز بشكلها المغزلي. إضافة لذلك استُخدم في بعض التجارب خلايا لمفاوية طبيعية حيث تمت مقارنتها مع الخلايا السرطانية المستخدمة في البحث. تم الحصول على الخطوط الخلوية السرطانية من مخبر الأبحاث السرطانية في مدينة نانسي - فرنسا، في حين تم عزل الخلايا للمفاوية من عينات دم بشرية في مخبر الدراسات العليا بكلية العلوم - جامعة دمشق.

2-2 المركبات الطحلبية المستخدمة في معاملة الخلايا:

جرى في المرحلة الأولى من البحث العمل على المستخلص الطحلي ESC من الطحلب البحري الأحمر *Laurencia papillosa*. وهذا المستخلص، وبحسب الدراسات التي أجريت سابقاً في المخبر، عبارة عن خلاصة للجدر الخلوية للطحلب المذكور والتي تحتوي على مركبات سكرية مكبرته في غالبيتها من نوع كاراجينان. أما في المرحلة الثانية فقد تمت دراسة أثر المكونات الأساسية للمستخلص ESC، وهي كبا (Kappa (κ ، يوتا (i) ولامدا (Lambda (λ) كاراجينان.

1-2-2 تحضير المستخلص ESC:

جُمع الطحلب الأحمر *L. papillosa* من مياه الشواطئ السورية من قبل مخبر الطحالب البحرية، جامعة تشرين. غُسل بعدها بالماء لإزالة الأملاح والشوائب الخارجية. أُخذت أوزان ثابتة من الكتلة الحية للطحلب بهدف الاستخلاص، حيث جُففت العينات بالهواء الجاف بدرجة حرارة 60° درجة مئوية، ثم غُمّرت بالماء الساخن (1.5% وزن/حجم) بدرجة حرارة 50 درجة مئوية لمدة 12 ساعة مع المزج الميكانيكي. حُلّت المتعددات السكرية المستخلصة بالماء النقي وفُلترت ومن ثم رُسبت مع 3 أحجام من الايثانول 95%، ثم جُففت بالفرن بدرجة حرارة 50-60 درجة مئوية. بعد ذلك تمت دراسة طيف الأشعة تحت الحمراء (FT-IR: Fourier transform infrared spectrometer) من شركة Thermo (Nicolet 6700) لتحديد هوية المستخلص.

2-2-2 فصل المستخلص إلى مكوناته الأساسية:

أجريت الاختبارات الكيميائية من فصل المستخلص إلى مركباته الأساسية وتحديد هوية كل منها في قسم الكيمياء في هيئة الطاقة الذرية، حيث بينت عملية الفصل باستخدام تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) semi preparative high performance liquid chromatography أن المستخلص يتكون من ثلاث مركبات أساسية تم عزلها وجمع كل مركب على حدى، جرى بعدها تحديد هوية هذه المركبات بواسطة مطيافية الأشعة تحت الحمراء (FT-IR) وذلك بمقارنة طيف كل مركب من المركبات الثلاثة مع أطياف معيارية، تبين من خلالها أن المركبات الأساسية المفصولة عن المستخلص ESC هي عبارة عن كابا، يوتا ولامدا كاراجينان.

2-3 استنبات الخلايا السرطانية البشرية:

جرى استنبات الخطوط الخلوية السرطانية البشرية T98G و MDA-MB-231 في دوارق (Flasks) شفافة خاصة بالاستنبات الخلوي تسمح بتنفس الخلايا خلال نموها، حيث تلتصق هذه الخلايا على السطح السفلي للدورق وتأخذ الشكل المميز لها وتبدأ بالانقسام.

2-3-1 تحضير وسط الاستنبات RPMI 1640 الكامل:

يُستعمل وسط الاستنبات السائل RPMI 1640 (EuroClone) في عديد من المخبر التي تعمل على الخلايا السرطانية. تُنمى الخلايا في هذا الوسط المدعم بـ 10% من المصل البقري الجنيني FBS (Fetal bovine serum) منزوع المتممة بمعالجته بالحرارة 56 درجة مئوية مدة 30 دقيقة وبإضافة 2 ميلي مول من الغلوتامين (L-glutamine) و 50 وحدة/المول من المضادات الحيوية بنسلين Penicillin، جنتاميسين Gentamicin وستربتومايسين Streptomycin.

2-3-2 تحضير الخلايا للاستنبات انطلاقاً من خلايا محفوظة (في الأزوت السائل):

تكون الخطوط الخلوية محفوظة في الأزوت السائل على درجة حرارة (-196) درجة مئوية. بدايةً، يتم سحب العينات من الأزوت السائل ووضعها في حمام مائي درجة حرارته 37 درجة مئوية مدة 5 دقائق ثم سحب الخلايا مباشرة إلى 10مل من الوسط RPMI 1640 الكامل للتخلص من تأثير DMSO (Dimethyl sulfoxide) المستخدم عند حفظ الخلايا. من ثم، يتم تثفيل الخلايا مدة 5 دقائق بسرعة

100 × ج، والتخلص من الطافي وتعليق الخلايا في 10 مل من الوسط من جديد ونقلها لدوارق استنبتات سعة 75 سم² ومن ثم توضع الدوارق في حاضنة CO₂ عند درجة الحرارة 37 درجة مئوية بحيث تبدأ بالاستقرار وتأخذ الشكل المميز لها ومن ثم تبدأ بالانقسام. ويتم بشكل دوري مراقبة نمو وانقسام الخلايا تحت المجهر المقلوب، كما يتم تغيير وسط الاستنبتات كل 48 ساعة.

2-3-3 الاستنبتات الخلوي:

عندما يصل مستوى الخلايا إلى 70-80% من سطح الاستنبتات تجري عملية جمعها بعد فك التصاقها بسطح الاستنبتات ومن ثم عدها وتوزيعها إلى دوارق استنبتات جديدة وبعدها خلايا أقل بحيث يستنبت في كل دورق تركيز خلوي 1 × 10⁴ خلية/ 1 مل.

المواد المستخدمة في الاستنبتات الخلوي:

- RPMI 1640 الكامل.
- FBS 10%
- (Phosphate buffered saline) PBS1X.
- أنزيم ترپسين 1X + EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid).
- أزرق التريبيان 0.5% Trypan blue.

طريقة العمل:

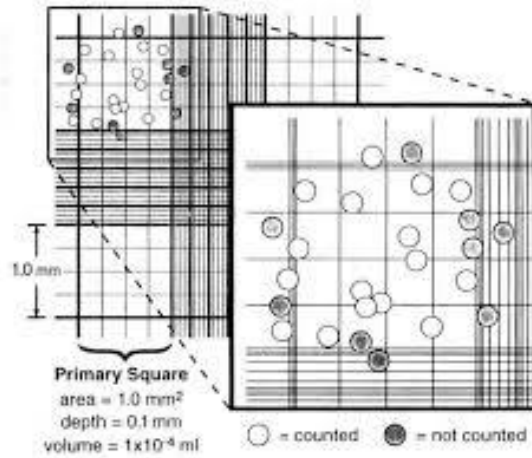
- التخلص من الوسط مع ما يحوي من خلايا ميتة.
- غسل سطح الاستنبتات ثلاث مرات بدارئة PBS للتخلص من الوسط مع ما يحوي من FBS.
- إضافة 5 مل ترپسين+ EDTA والحضن عند الدرجة 37 درجة مئوية حتى انفصال الخلايا عن السطح والتأكد من ذلك بواسطة المجهر المقلوب.
- إضافة 15 مل من الوسط RPMI 1640 الحاوي على FBS لإيقاف عمل أنزيم التريپسين Trypsin ومنعه من تخريب الخلايا.
- سحب الخلايا إلى أنبوب 15 مل والتثفيل بالسرعة 100 × ج مدة 5 دقائق.
- التخلص من الطافي والحفاظ على الرسابة الخلوية.

- تعليق الرسابة في 3 مل من وسط الاستنبات.

- عدّ الخلايا والذي يتم كما يلي:

- التمديد حجم بحجم بملون أزرق التريبان مدة 5 دقائق لتحديد عيوشية الخلايا وقابليتها لمتابعة التجربة حيث يميز أزرق التريبان بين الخلايا الحية والخلايا الميتة (يدخل الملون لداخل الخلايا الميتة فقط عبر الثقوب في الأغشية الخلوية ويصبغها باللون الأزرق).
- مزج الخلايا ثم عدّها بواسطة صفيحة العد (Neubaure slide) كما يلي:
عد الخلايا غير الملونة فقط في المربعات الأربعة الطرفية لشبكة العد كما في الشكل 7
- تقسيم العدد الخلوي على 4.
- تطبيق المعادلة التالية لتحديد عدد الخلايا:

عدد الخلايا $\times 2$ (نسبة التمديد بأزرق التريبان) $\times 10^4$ (معامل الصفيحة) = عدد الخلايا / مل



الشكل 7 شكل توضيحي يبين طريقة عد الخلايا الحية بواسطة صفيحة العد.

- استنبات $10^6 \times 1$ خلية في كل دورق سعة 75 سم².

- حضن الدوارق في حاضنة CO₂ على حرارة 37 درجة مئوية.

تُعاد عملية فصل الخلايا الى دوارق جديدة عندما تملأ الخلايا 70-80% من مساحة سطح الدورق.

2-3-4 تجميد الخلايا:

تُجمع الخلايا وتُعد وفقاً للطريقة المذكورة في الفقرة 2-3-3 ثم يتم تثفيها بسرعة 200× ج مدة 5 دقائق. بعد ذلك يتم التخلص من الطافي وتعليق الرسابة الخلوية في وسط التجميد (80% وسط (DULBECCO'S MODIFIED EAGLE'S) DME + 10% FBS منزوع المتممة + 10% (DMSO) بحيث يكون التركيز الخلوي 2×10⁶ خلية في كل 1 مل من وسط التجميد. تُوزع بعدها الخلايا على أنابيب 1.5 مل خاصة بالتجميد، توضع في عبوة للتجميد (MR.Frosty) حاوية على الإيزوبروبانول Isopropanol في درجة الحرارة (-80) مئوية (بهذه الطريقة تنخفض درجة حرارة الخلايا درجة مئوية واحدة كل دقيقة) مدة 24 ساعة تنقل بعدها إلى الأزوت السائل بالدرجة (-196) للتخزين.

2-3-5 عزل الخلايا اللمفاوية Lymphocytes :-

تم الحصول على عينة دم من بنك الدم في دمشق لعزل الخلايا اللمفاوية.

المواد المستخدمة:

- الدارئة 1X PBS.
- محلول (PBS+EDTA) لمنع تكثف الكريات بعضها مع بعض.
- محلول (Ammonium-Chloride-Potassium) ACK (لحل ما يتبقى من الكريات الحمر).
- الفيكول (Sigma) Ficoll.

طريقة العمل:

- تمديد 10 مل من عينة الدم بـ 30 مل من الدارئة 1X PBS.
- وضع 15 مل من الفيكول في أنبوب 50 مل ثم إضافة الدم الممدد بحذر على جدار الأنبوب بشكل مائل.
- تبدأ بعدها سلسلة من التثيفات للتخلص من الكريات الحمر والبلازما والفيكول.

التثفيل الأول:

يتم ضبط تسارع وتخامد المثقلة على الدرجة 0 ثم تثفيل الأنبوب على السرعة 200× ج مدة 30 دقيقة وحرارة 20 درجة مئوية حيث تتكدس الكريات الحمر في قعر الأنبوب وفوقها طبقة الفيكول بينما تتوضع الوحيدات واللمفاويات بشكل حلقة تفصل بين الفيكول والبلازما في أعلى الأنبوب.

التثفيل الثاني:

تأخذ الحلقة البيضاء بحذر وتوضع في أنبوب سعة 50 مل ويُضاف لها 25 مل من مزيج (PBS+EDTA) وتثفل على السرعة 400× ج مدة 25 دقيقة عند الحرارة 20 درجة مئوية. يتم التخلص من الطافي وحل الرسابة في 1 مل من محلول الـ ACK ومن ثم يوضع الأنبوب على الثلج مدة 3 دقائق.

التثفيل الثالث:

يُضاف 25 مل من مزيج (PBS+EDTA) ومن ثم تُثفل العينة بنفس الشروط السابقة.

التثفيل الرابع:

يُستبعد الطافي وتُعلق الرسابة في 25 مل من مزيج (PBS+EDTA) للتخلص من أثر ACK والفيكول ثم تُثفل العينة على السرعة 200× ج مدة 15 دقيقة عند درجة حرارة 20 درجة مئوية، وبعدها:

- التخلص من الطافي وتعليق الخلايا في 10 مل من الوسط IMDM بوجود 2% من المصل FBS ومضادات حيوية بنسلين، جنتاميسين وستربتومايسين.

- استنبات الخلايا في دورق 75 سم² والحضن مدة ساعتين في الحاضنة عند الدرجة 37 مئوية حيث تلتصق الوحيدات إلى سطح الاستنبات وتأخذ الشكل المغزلي بينما تبقى اللمفاويات معلقة في الوسط.

- جمع الوسط والتثفيل على السرعة 100× ج مدة 5 دقائق.

- التخلص من الطافي وحل الخلايا في 1 مل من الوسط ونقوم بعد الخلايا بنفس الطريقة المذكورة في

الفقرة 2-3-3.

- استنبات الخلايا لدراسة العيوشية الخلوية.

4-2 دراسة العيوشية الخلوية باستعمال طريقة الصبغ بال-XTT:

تُستخدم طريقة الصبغ بال-XTT (صبغ التترازوليوم) في الكشف عن العيوشية الخلوية حيث يُمكن للخلايا الحية فقط استقلاب صبغ ال-XTT أصفر اللون وتحويله إلى مادة الفورمازان ذات اللون البرتقالي الذي يقرأ عند طول موجة 450 نانومتر بواسطة جهاز قارئ الصفائح (Thermo Labsystems).

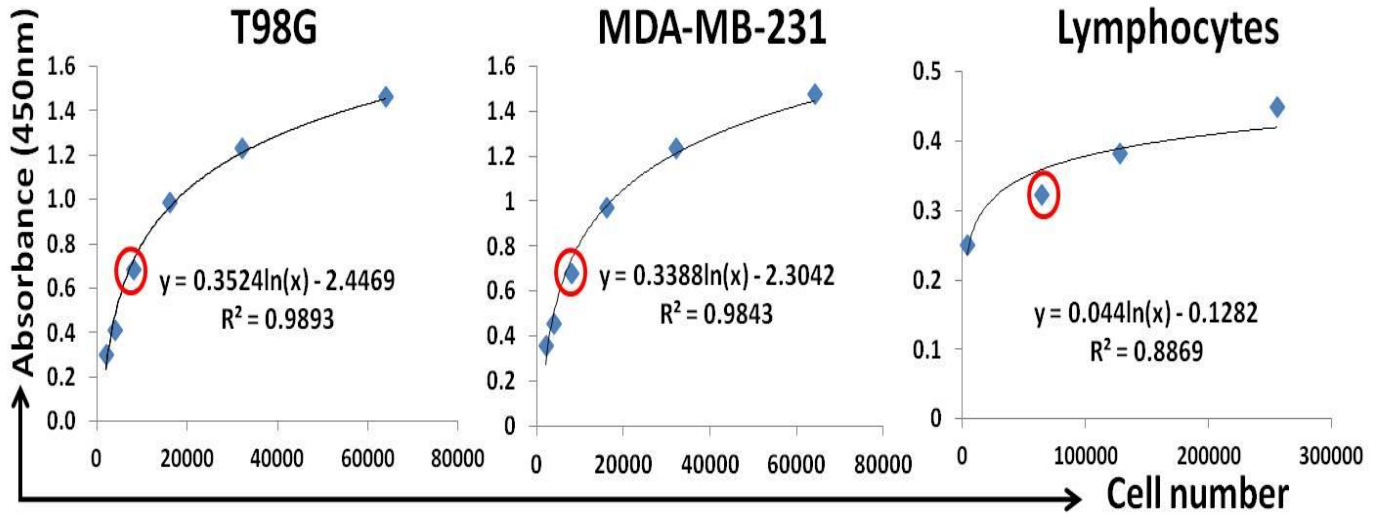
1-4-2 إنشاء المنحني المعياري:

بداية يتم استنبات كل من الخلايا السرطانية لكل خط خلوي أو الخلايا اللمفاوية الطبيعية بتراكيز خلوية متزايدة في صفيحة تحوي 96 بئر. تُحضن الصفيحة مدة 24 ساعة حتى تلتصق على السطح وتأخذ الشكل المميز لها (المغزلي للخلايا MDA-MB-231، والنجمي للخلايا T98G). كما يتم استنبات الخلايا اللمفاوية الطبيعية التي تبقى معلقة في الوسط. من ثم يُضاف محلول الصبغ XTT وتُقرأ الامتصاصية المتعلقة بكل تركيز خلوي ومن ثم يتم إنشاء منحني معياري يربط بين قيمة الامتصاصية وعدد الخلايا الحية (الشكل 8).

طريقة العمل:

- جمع الخلايا وعدها بالطريقة المذكورة في الفقرة 2-3-3.
- تحضير التراكيز الخلوية (0، 0.5، 1، 2، 4، 8، 16، 32، 64، 125) × 10³ خلية/100 ميكرو لتر (أربع مكررات لكل تركيز) من الخلايا السرطانية MDA-MB-231 و T98G أما الخلايا اللمفاوية فيحضر بالإضافة لهذه التراكيز التركيز 250 × 10³.
- توزيع 100 ميكرو لتر من كل تركيز خلوي في كل بئر.
- حضن الصفيحة في الحاضنة بالدرجة 37 مئوية مدة 24 ساعة.
- إضافة 50 ميكرو لتر من محلول الصبغ XTT من الطاقم (Roche, Mannheim, Germany) لكل بئر والحضن 4 ساعات.
- قراءة الامتصاصية عند طول الموجة 450 نانومتر وعند طول الموجة 690 نانومتر (والذي يعطي امتصاصية معدومة لصبغ XTT).
- طرح قيم الامتصاصية عند طول الموجة 690 نانومتر من قيم الامتصاصية عند طول الموجة 450 نانومتر لاستبعاد أي أثر لامتصاصية الصفيحة ووسط الاستنبات.
- حساب متوسط قيم الامتصاصية لكل تركيز خلوي.

- الربط بين كل من قيمة الامتصاصية وعدد الخلايا التابع لها بمنحنى معياري.
- تحديد معادلة المنحنى المعياري.



الشكل 8: المنحنيات المعيارية للخطوط الخلوية السرطانية T98G, MDA-MB-231 والخلايا اللمفاوية الطبيعية Lymphocytes.

2-4-2 الاستنبات الخلوي بغية المعالجة الخلوية:

تُحضّر سلسلة من تراكيز مختلفة من المستخلص ESC وذلك بتمديد التركيز الأم للمستخلص في وسط الاستنبات للوصول للتركيز المطلوبة بحجم كافي للمعالجة مجموعة التراكيز (0، 5، 10، 20، 40، 80) ميكرومول، كما تُحضّر سلسلة تراكيز لكل من المركبات كابا، يوتا ولامدا كاراجينان المفصولة من المستخلص ESC بواسطة HPLC وهي (0، 6.25، 12.5، 25، 50، 100، 200) ميكرومول.

كما يتم استنبات الخلايا السرطانية البشرية لكل خط خلوي في صفيحة 96 بئر بتركيز خلوي ثابت ($10^3 \times 4$ خلية في كل بئر بالنسبة للخلايا T98G و $10^3 \times 8$ خلية في كل بئر بالنسبة للخلايا MDA-MB-231) أما الخلايا اللمفاوية فقد تم استنباتها بتركيز خلوي $10^4 \times 3$ في كل بئر، وبعد ذلك، يتم الحضانة 24 ساعة بحيث تملأ الخلايا 70-80 % من مساحة البئر. تُعامل بعدها الخلايا بـ 10 ميكرو لتر في البئر من كل من التراكيز المحضرة سابقاً. (بحيث نعالج 4 مكررات لكل تركيز وتُحضان في الحاضنة CO_2).

2-4-3 دراسة العيوشية الخلوية بعد المعالجة:

لدراسة تأثير المستخلص ESC أو المركبات كابا، يوتا ولامدا كارجينان على عيوشية وانقسام الخلايا السرطانية ومقارنته مع أثرها على الخلايا الطبيعية , يُجرى اختبار العيوشية الخلوية للخلايا المعالجة بتركيز مختلفة بوجود خلايا شاهدة، بحيث يُضاف 50 ميكرو لتر من مزيج XTT لكل بئر والحضن مدة 4 ساعات يُلاحظ بعدها انخفاض شدة اللون البرتقالي إلى الأصفر، تُقرأ بعدها الامتصاصية عند طول الموجة 450 نانومتر بواسطة جهاز قارئ الصفائح (Thermo Labsystems) ويتم الربط بين كل تركيز معالجة ومتوسط قيم قراءات الامتصاصية لمكررات كل تركيز. من خلال منحنى معياري، - تُطبق معادلة المنحنى المعياري لكل خط خلوي لتحديد العدد الخلوي التابع لكل تركيز وحساب النسبة المئوية للخلايا الحية بالمقارنة مع الخلايا الشاهدة التي تمثل 100% من العيوشية الخلوية وتحديد التركيز المثبط لنمو نصف المجتمع الخلوي المعالج (Inhibitory Concentration) IC₅₀.

2-5-5 دراسات خلوية باستخدام تقانة قياس التدفق الخلوي Flow cytometry:

يعتمد مبدأ جهاز قياس التدفق الخلوي على قياس الصفات الفيزيائية أو الكيميائية للخلايا من خلال ربط الخلايا بمسابر (مواد مفلورة أو أضداد مرتبطة بأنزيمات نشطة أو مواد مفلورة) ثم توجيه ليزر خاص لكل خلية مؤدياً لتحريض المسبر المرتبط بالخلية وإصدار ضوء عند أطوال موجية معينة دالاً على أحد الصفات الفيزيائية أو الكيميائية للخلية، وقد استخدم لعدد من الدراسات الخلوية وهي:

2-5-1 دراسة توزع أطوار الدارة الخلوية:

دُرس توزع أطوار الدارة الخلوية وتضاعف الخلايا المزروعة بتأثير المعالجة بالمستخلص ESC أو المركبات يوتا ولامدا كارجينان من خلال تحليل محتوى الخلايا من DNA (DNA content).

تم بدايةً:

- استنبات الخلايا السرطانية T98G في دوارق استنبات بتركيز خلوي 1×10^5 خلية/1مل ثم معالجتها بالتركيزين 20، و40 ميكرومول من المستخلص ESC خلال فترة زمنية 24 ساعة بوجود الخلايا الشاهدة.

- استنبت الخلايا السرطانية MDA-MB-231 في دوارق استنبتات بتركيز خلوي 1×10^5 خلية/1 مل ثم معالجتها بالتركيزين 25، 50 ميكرومول من المركب يوتا كاراجينان أو التركيزين 12.5، 25 ميكرومول من المركب لامدا كاراجينان خلال فترة زمنية 24 ساعة بوجود الخلايا الشاهدة. تم بعدها جمع الخلايا الحية والميتة ودراسة المحتوى النووي لها، تتضمن الطريقة حل لبيدات الغشاء الخلوي والتخلص من الهيكل الخلوي والبروتينات النووية بواسطة أنزيم التربسين Trypsin ثم هضم RNA الخلوي بواسطة انزيم RNase مع المحافظة على ثبات الكروماتين النووي nuclear Chromatin من خلال إضافة محلول الحضانة السبيرمين تتراهيدروكلوريد spermine tetrahydrochloride. تُلون النوى بعد ذلك بالبروبيديوم أيودايد (PI) Propidium Iodide الذي يرتبط إلى DNA كاشفاً المحتوى النووي للخلية، ويتم تحليل العينة باستخدام جهاز قياس التدفق الخلوي BD FACS Calibur.

طريقة العمل:

- جمع وسط الاستنبتات مع ما يحوي من خلايا ميتة (المنفصلة عن السطح) في أنبوب 15 مل.
- إضافة تربسين 1X لكل دورق والحضانة مدة 3-5 دقائق عند الدرجة 37 مئوية حتى انفصال الخلايا عن السطح.
- سحب التربسين مع ما يحوي من خلايا حية من كل دورق إلى الأنبوب الموافق الحاوي على الخلايا الميتة وإيقاف عمل الأنزيم بإضافة الوسط RPMI 1640 الحاوي FBS.
- تشغيل بالسرعة $100 \times$ ج مدة 5 دقائق.
- التخلص من الطافي وتعليق الخلايا في 1 مل من الوسط الفارغ (بدون FBS).
- تلوين الخلايا وتحليلها بجهاز قياس التدفق الخلوي.

تحضير المحاليل:

- محلول ستراتي: يضاف 1 غ من سترات الصوديوم و 1 مل من مادة منظفة لا شاردية (Nonidet)
- (P-40) و 522 ملغ من مادة السبيرمين (Spermine tetrahydrochloride) و 61 ملغ من Tris base إلى 800 مل من الماء المقطر، ثم يُتم الحجم بالماء المقطر إلى 1 لتر ويُرشح عبر فلتر ذو مسام بقطر 0.22 ميكرومتر.

- درائة PBS:

- 0.23 غ من الفوسفات أحادية الصوديوم ثنائية الهيدرجين NaH_2PO_4
- 1.15 غ من الفوسفات ثنائية الصوديوم أحادية الهيدرجين Na_2HPO_4 .
- 9 غ من كلوريد الصوديوم NaCl .

تضاف هذه المركبات إلى 900 مل من الماء منزوع الشوارد المعقم.

▪ ضبط pH عند القيمة 7.4.

▪ يكمل حجم المحلول الناتج إلى 1 لتر بالماء المقطر منزوع الشوارد.

▪ يرشح المحلول على فلتر له مسام بقطر 0.22 ميكرومتر.

- محلول تربسين ستراتي: يضاف 3 ملغ من التربسين إلى 100 مل من المحلول الستراتي المحضر ثم

تضبط pH عند القيمة 7.6.

- محلول البروبيديوم أيودايد Propidium iodide: يضاف 20 ملغ من الـ PI و 116 ملغ من

السيبرمين إلى 100 مل من المحلول الستراتي ثم يُضبط pH عند القيمة 7.6.

- محلول RNase: يضاف 2 ملغ من RNase A إلى 10 مل من محلول PBS.

تلوين الخلايا:

- نقل 200 ميكرو لتر من المعلق الخلوي إلى أنبوب 6 مل يحوي 1 مل من المحلول الستراتي.

- تنفيل بسرعة 200× ج مدة 5 دقائق ثم طرح الطافي.

- إضافة 250 ميكرو لتر من محلول التربسين والحضن بالدرجة 37 درجة مئوية مدة 10 دقائق.

- إضافة 250 ميكرو لتر من محلول RNase والمزج والحضن بدرجة حرارة الغرفة مدة 10 دقائق.

- إضافة 20 ميكرو لتر من محلول PI والمزج والحضن في مكان مظلم بدرجة حرارة الغرفة مدة 10

دقائق.

- تحليل الخلايا بجهاز قياس التدفق الخلوي.

2-5-2 دراسة الموت الخلوي:

تم استنبات الخلايا السرطانية ومعالجتها بنفس الطريقة السابقة (الفقرة 2-5-1). تم بعدها جمع الخلايا الحية والميتة ودراسة الموت الخلوي باستخدام الصباغين المتفلورين الثيازول البرتقالي Thiazole orange الذي يلون الخلايا الحية والميتة والبروبيديوم أيودايد Propidium iodide الذي يلون الخلايا الميتة فقط وتحليلها باستخدام جهاز قياس التدفق الخلوي BD FACS Calibur.

تحضير المحاليل:

- محلول Thiazole orange (TO): 2 مل من محلول TO بتركيز 42 ميكرومول (من شركة BD).
- محلول Propidium iodide (PI): 1 مل من محلول PI بتركيز 4.3 ميلي مول/لتر ماء (من شركة BD).
- دارة PBS يحضر بنفس الطريقة السابقة.

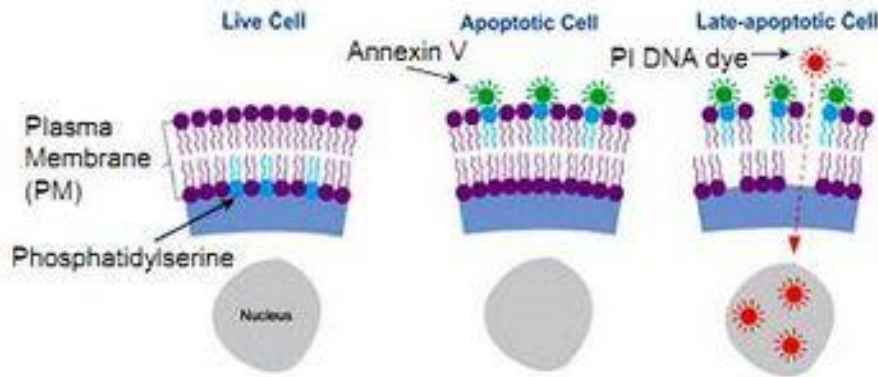
طريقة التلوين:

- تمديد المعلق الخلوي بنسبة (1:10) بمحلول PBS.
- إضافة 4 ميكرو لتر من محلول (TO) و 2 ميكرو لتر من محلول (PI).
- رج الأنبوب وتركه في مكان مظلم مدة 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة.
- تحليل العينة بواسطة جهاز قياس التدفق الخلوي.
- تحليل البيانات لتحديد نسب كل من الخلايا الحية والميتة من خلال تحليل $10^4 \times 1$ خلية.

2-5-3 دراسة الموت الخلوي المبرمج:

يتصف الموت الخلوي المبرمج بصفات ظاهرية بيولوجية وكيميائية حيوية مميزة تبدأ على مستوى الغشاء الخلوي بانتقال فوسفاتيديل السيرين من الطبقة الداخلية للغشاء الخلوي إلى الطبقة الخارجية، يمكن الكشف عن هذا الانتقال باستخدام بروتين Annexin-V المحضر من شركة (BD Pharmingen™)، Annexin-V (هو أحد بروتينات المشيمة ويتميز بألفة عالية لفوسفاتيديل السيرين) الموسوم بالمادة متفلورة من نوع (Fluorescein isothiocyanate-FITC) للكشف عن الخلايا الداخلة في الموت الخلوي المبرمج.

يتم استنبتات الخلايا ومعالجتها وجمعها وتعليقها في 1 مل من الوسط بنفس الطريقة المذكورة في الفقرة 2-5-1 ثم يتم تلوينها بشكل ثنائي بالـ Annexin-V-FITC و PI وتحليل النتائج كما هو موضح في الشكل 9. حيث تكون الخلايا الحية (السليمة) سلبية التلون لكل من Annexin-V و PI أي (Annexin⁻/PI⁻) الخلايا في المراحل المبكرة للموت المبرمج (Annexin⁺/PI⁻)، الخلايا في المراحل المتقدمة للموت المبرمج (Annexin⁺/PI⁺) أما الخلايا الميتة بآلية أخرى كالموت النيكروزي (Annexin⁻/PI⁺).



الشكل 9: ترسيم لمبدأ الوسم الثنائي للخلايا بـ Annexin-V و Propidium Iodide.

تحضير المحاليل:

- محلول Annexin-V FITC: 2 مل من محلول Tris-HCl بتركيز 0.05M و NaCl بتركيز 0.1M ويحوي على Annexin-V بتركيز 50 ميكروغرام/مل.
- محلول Propidium iodide (PI): 1 مل من محلول PBS يحوي 100 ميكروغرام من (PI).
- محلول ربط Annexin-V: يُحضر المحلول الأم 10X من:

HEPES بتركيز 0.1 مول.

NaCl بتركيز 1.4 مول

CaCl₂ بتركيز 25 ميلي مول

يؤخذ 1 مل من هذا المحلول ويضاف له 9 مل من الماء المقطر

- دائرة PBS.

طريقة التلوين:

- أخذ 100 ميكرو لتر من المعلق الخلوي إلى أنبوب يحوي 2 مل من محلول PBS.
- تنفيل على السرعة 200× ج مدة 5 دقائق وطرح الطافي
- تعليق الخلايا في 500 ميكرو لتر من محلول ربط Annexin-V 1X
- إضافة 5 ميكرو لتر من محلول Annexin-V FITC و 2 ميكرو لتر من محلول PI
- حضانة عند درجة حرارة الغرفة مدة 15 دقيقة في الظلام
- تحليل الخلايا بجهاز قياس التدفق الخلوي

2-5-4 دراسة البروتينات المرتبطة بالموت الخلوي المبرمج:

تم التوجه لتقصي المسار الخلوي المؤدي للموت الخلوي المبرمج المُعرض بتأثير المعالجة بكل من المستخلص ESC أو بالمركبات يوتا ولامدا كاراجينان وذلك باستعمال أعداد مفلورة وحيدة النسيلة موجهة للكشف عن أهم البروتينات المفتاحية المسؤولة عن تنامي أحداث الموت وهي: الشكل النشط للبروتين كاسبيز 3 (Active caspase-3) وهو بروتين بحجم 17 كيلو دالتون ينتج عن شطر البروتين الكامل Pro-caspase-3 ذو الكتلة الجزيئية النسبية 32 كيلو دالتون) والذي يفعل سلسلة من بروتينات السبيل الإشاري الخاص بالموت الخلوي المبرمج و البروتين Bcl-2 المثبط للموت الخلوي المبرمج.

يتم استنبات الخلايا ومعالجتها بنفس الطريقة المذكورة في الفقرة 2-5-1 وجمعها وتعليقها في 1 مل من PBS.

تحضير المحاليل:

- محلول الغسل PBS الحاوي على مصم العجل حديث الولادة 1% FCS وأزيد الصوديوم NaN_3 بتركيز 0.09% ويحضر بحل الأوزان التالية:

8 غ من NaCl

0.2 غ من KCl

1.44 غ من Na_2HPO_4

0.24 غ من KH_2PO_4

في 800 مل من الماء المقطر ثم ضبط pH على القيمة 7.3 ثم يضاف 10 غ من FCS منزوع المتممة وعند تمام الانحلال يضاف 0.9 غ من أزيد الصوديوم ويرشح المحلول عبر فلتر مساميته 0.22 ميكرومتر

- محلول التثبيت والإنفاذ: وهو محلول PBS الحاوي على شوارد الكالسيوم (CaCl_2) بتركيز 1 ميلي مول والمغنيزيوم (MgSO_4) بتركيز 1 ميلي مول وHEPES بتركيز 10 ميلي مول والبارافورم الدهيد بتركيز 4% والصابونين بتركيز 0.1%، يستعمل في تثبيت الخلايا وجعل أغشيتها نفوذة.
- محلول الغسل والإنفاذ: يحضر بنفس طريقة تحضير المحلول السابق باستثناء إضافة البارافورم الدهيد وفيه تركيز FCS يعادل 2% وأزيد الصوديوم 0.1%، يستعمل لغسل الخلايا مع المحافظة على أغشيتها نفوذة.

طريقة العمل:

- تعليق الخلايا في 1 مل من محلول الغسل PBS
- تنقيل بسرعة $250 \times$ ج مدة 5 دقائق وطرح الطافي
- تعليق الخلايا في 1 مل من محلول الغسل
- نقل 100 ميكرو لتر من المعلق الخلوي لكل عينة إلى أنبوب سعته 6 مل بوجود أنبوبين لعينتين شاهديتين إيجابية وسلبية (لا يضاف لها أضداد)
- إضافة 100 ميكرو لتر من محلول التثبيت والإنفاذ لكل أنبوب والحضن مدة 20 دقيقة في مكان مظلم بدرجة حرارة 4 درجة مئوية
- إضافة 1 مل لكل أنبوب من محلول الغسل والإنفاذ
- تنقيل بالسرعة $250 \times$ ج مدة 5 دقائق وطرح الطافي وتعليق الخلايا في 100 ميكرو لتر من محلول الغسل والإنفاذ.
- إضافة 20 ميكرو لتر من خليط الأضداد المتفلورة الموجهة للكشف عن البروتين المطلوب لكل عينة خلوية (الشاهد والمعالج) بينما يضاف 20 ميكرو لتر من بروتينات المايلوما إلى عينة الشاهد الإيجابي.
- الحضن مدة 30 دقيقة في مكان مظلم بالدرجة 4 درجة مئوية.

- إضافة 1 مل من محلول الغسل والإنفاذ ومن ثم التثقيب بالسرعة 250× ج مدة 5 دقائق (تكرر هذه الخطوة مرة ثانية)

- إضافة 500 ميكرو لتر من محلول الغسل لكل أنبوب ووضعها على الثلج

- تحليل $10^4 \times 1$ خلية لكل عينة بجهاز قياس التدفق الخلوي

- تحليل العينات لحساب نسبة الخلايا التي عبرت عن البروتين المدروس

6-2 التصوير المجهرى للخلايا:

تم تصوير كل من الخلايا الشاهدة والمعالجة بالمجهر الضوئي لملاحظة التغيرات الشكلية التي تطرأ عليها إثر المعالجة بالمركبات المختلفة كما تمت دراسة التغيرات الطارئة على الحمض النووي تحت المجهر المفلور وذلك بتلوين الخلايا بكل من الصباغين المتفلورين الملونين لـ DNA، DAPI الذي يُظهر التكثف النووي وPI الذي يظهر تشدق النواة وبالتالي الموت الخلوي.

1-6-2 التصوير بالمجهر الضوئي:

تم استنبات الخلايا السرطانية في صفائح تحوي 6 آبار بتركيز خلوي 2×10^5 خلية في البئر وحصنها 24 ساعة ثم معالجتها بتركيز مختلفة من المستخلص أو أحد المركبات الثلاثة بكمية 200 ميكرو لتر من المركب في البئر بوجود آبار تحوي خلايا شاهدة مدة 24 ساعة ثم تصوير الخلايا باستخدام المجهر الضوئي المقلوب Olympus CK2 وباستعمال العدسة ذات التكبير (100X).

2-6-2 التصوير بمجهر الفلورة بعد الصبغ بالصباغين DAPI وPI:

تم استنبات الخلايا السرطانية ومعالجتها بنفس الطريقة المذكورة سابقا مع وضع ساترة في كل بئر قبل الاستنبات كي تلتصق عليها الخلايا، بعدها يتم سحب الوسط والغسل مرتين بالـ PBS وإضافة 500 ميكرو لتر من ملون DAPI (Sigma) بتركيز 1 ميكرو غرام/مل لكل بئر والحصن مدة 5 دقائق في الظلام بعدها يتم الغسل بالـ PBS للتخلص من بقايا الملون وبعدها تم سحب الساترة ووضعها على صفيحة مجهرية وفحصت الخلايا ومن ثم صورت باستخدام مجهر الفلورة Nikon ECLIPSE 80i .

يتم اتباع نفس الخطوات السابقة عند التلوين بـ 500 ميكرو لتر من الملون PI ذو التركيز 4.3 ميلي

مول/ل.

7-2 دراسة تغير التعبير المورثي عن المورثات المنظمة للموت الخلوي المبرمج باستخدام تقانة

التصميم بالزمن الحقيقي Real-time PCR:

يعتمد مبدأ تقانة التفاعل السلسلي للبوليميراز في الزمن الحقيقي على دراسة تغير التعبير المورثي للمورثة باختلاف الشروط التي تطرأ على الخلايا، أي تغير نسبة انتساخ المورثة إلى mRNA ويتم الكشف عنه من خلال دراسة التغير في نسبة الدنا المتمم cDNA (Complementary DNA) باستخدام مرئسات نوعية لإجراء تفاعل PCR بالزمن الحقيقي.

لدراسة تغير تعبير المورثات المنظمة للموت الخلوي المبرمج تم بدايةً

- استنبات الخلايا السرطانية T98G بتركيز خلوي $10^5 \times 1$ خلية /مل ومعاملتها بالتركيزين 20، و40 ميكرومول من المستخلص ESC مدة 24 ساعة.

- استنبات الخلايا السرطانية MDA-MB-231 بتركيز خلوي $10^5 \times 1$ خلية /مل ومعاملتها بالتركيز 50 ميكرومول من المركب يوتا كاراجينان والتركيز 25 ميكرومول من المركب لامدا كاراجينان خلال فترتين زمنيتين 12، 24 ساعة.

يتم بعدها جمع الخلايا وتعليقها (لغسل) في 1 مل PBS، ومن ثمّ عزل RNA الكلي (total RNA) وتحويله إلى cDNA ثم إجراء تفاعل RT-PCR.

1-7-2 عزل RNA:

بعد أن تم تعليق الخلايا في 1 مل من PBS وغسله يتم التنفيل بالسرعة $250 \times$ ج مدة 5 دقائق والتخلص من الطافي. تم اتباع التعليمات الواردة في الطاقم الخاص (RNeasy kit) من شركة Qiagen لعزل RNA.

طريقة العمل:

- إضافة 600 ميكرو لتر من دارئة الاستخلاص (RLT) ممزوج مع 6 ميكرو لتر من مركب البيتا مركابتوإيتانول لكل عينة وسحب المزيج ثلاث مرات بواسطة سيرنغ لتحطيم الأغشية والعضيات الخلوية.

- نقل المحلول إلى عمود فصل مكروي يحوي غشاء سللوزي للتخلص من الحطام الخلوي وDNA النووي. ويتم التنفيل بالسرعة $10^4 \times 1$ دورة/ الدقيقة مدة 30 ثانية.

- التخلص من العمود وإضافة 600 ميكرو لتر من الإيتانول 70% فوق السائل المار من العمود والمزج بقوة.

- تثفيل كل عينة على عمود فصل مكروي خاص يحوي غشاء سللوزي خاص لربط الحموض النووية.
- غسل بـ 350 ميكرو لتر من الدارئة RW1 للتخلص من المركبات المرتبطة بالغشاء ارتباط غير نوعي والتثفيل بالسرعة $10^4 \times 1$ دورة/ الدقيقة مدة 15 ثانية.
- إضافة 80 ميكرو لتر من محلول DNase (المكون من 70 ميكرو لتر دارئة و10 ميكرو لتر من أنزيم DNase) والحضن مدة 15 دقيقة بالدرجة 37 درجة مئوية للتخلص من بقايا DNA.
- غسل بـ 350 ميكرو لتر من الدارئة RW1 والتثفيل بالسرعة $10^4 \times 1$ دورة/ الدقيقة مدة 15 ثانية للتخلص من نواتج هضم DNA.
- غسل بـ 500 ميكرو لتر من محلول الغسل RPE والتثفيل بالسرعة $10^4 \times 1$ دورة/ الدقيقة مدة 15 ثانية للتخلص أي أثر للأملاح المتواجدة في الدارئات المستعملة سابقاً.
- غسل بـ 500 ميكرو لتر من محلول الغسل RPE والتثفيل بالسرعة $10^4 \times 1$ دورة/ الدقيقة مدة 2 دقيقة.
- التثفيل بنفس السرعة مدة دقيقة واحدة لتتمام التجفيف.
- إضافة 30 ميكرو لتر ماء مقطر والحضن 5 دقائق بدرجة حرارة المخبر.
- نقل الأعمدة إلى أنابيب جافة سعة 1.5 مل والتثفيل دقيقة واحدة لجمع RNA.

2-7-2 حساب تركيز الحمض النووي المعزول والتأكد من جودة العزل:

لحساب تركيز الحمض النووي المعزول يستخدم جهاز قراءة الامتصاصية NanoVue Plus من شركة (GE Healthcare) حيث تتم قراءة الامتصاصية عند طول الموجة 260 نانومتر لعينات *total RNA* المعزول بعد تصفير الجهاز عند طول الموجة نفسه بواسطة الماء المستعمل لحل RNA.

بعدها تم التأكد من جودة العزل وأن RNA غير مشوب بـ DNA وذلك من خلال الرحلان الكهربائي لـ 1 ميكروغرام من الحمض النووي لكل عينة على هلامة أغاروز 1 % حيث تهاجر الحموض النووية المعزولة باتجاه القطب الموجب عند تطبيق تيار كهربائي (وذلك بسبب الشحنة السالبة التي تحملها نتيجة امتلاكها مجموعات الفوسفات) وتتفصل حسب أطوالها إلى عصابات يتبين من خلالها جودة عزل RNA وأنه غير مشوب بـ gDNA (الدنا الجينومي)، إذ يظهر عصابتان تمثلان RNA الريبوزومي 28S, 18S كما يظهر تدرج للمجموع الرنوي المتضمن mRNA وباقي أنواع الرنا على الهلامة مفصولة بحسب الطول (smear) الشكل 5.

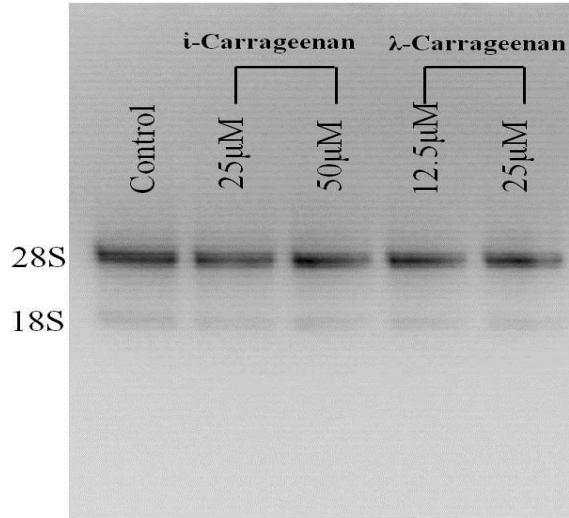
تحضير الهلامية:

- تحضير صفيحة الهلامية ووضع مشط الترحيل
- تحضير هلامية أغاروز 1% Agarose وزن لحجم في الدارئة TAE 1X (-Tris-acetate- EDTA) (وزن 0.5 غ من بودرة الأغاروز وحلها في 50 مل من الدارئة TAE 1X)
- التسخين مدة 1 دقيقة.
- إضافة 5 ميكرو لتر من الإيثيديوم برومايد Ethidium Bromide المُحضَّر مسبقاً بتركيز 1ملغ/مل
- صب الأغاروز في الصفيحة مع الانتباه لعدم تشكل فقاعات
- تترك حتى تجمد بدرجة حرارة الغرفة

طريقة الرحيل:

يتم تحضير عينات الترحيل بالطريقة التالية:

حساب الحجم اللازم من كل عينة والذي يحوي 1 ميكروغرام من *totalRNA* وإكمال الحجم بالماء إلى 10 ميكرو لتر ثم إضافة 2 ميكرو لتر من Loading Dye 6X من شركة (Fermentas). من ثم يتم ترحيل العينات بتطبيق فرق كمون 90 فولط مدة 40 دقيقة ثم تصوير الهلامية تحت أشعة UV بواسطة الجهاز (Bio Rad) Gel Doc (الشكل 10).



الشكل 10: صورة لترحيل 1 ميكروغرام من *totalRNA* لكل عينة على هلامية الأغاروز.

3-7-2 تحويل mRNA إلى cDNA:

تم اتباع الخطوات المذكورة في الطاقم (Reverse transcription kit) من شركة Invitrogen لتحويل 3 ميكروغرام من RNA إلى cDNA.

طريقة العمل:

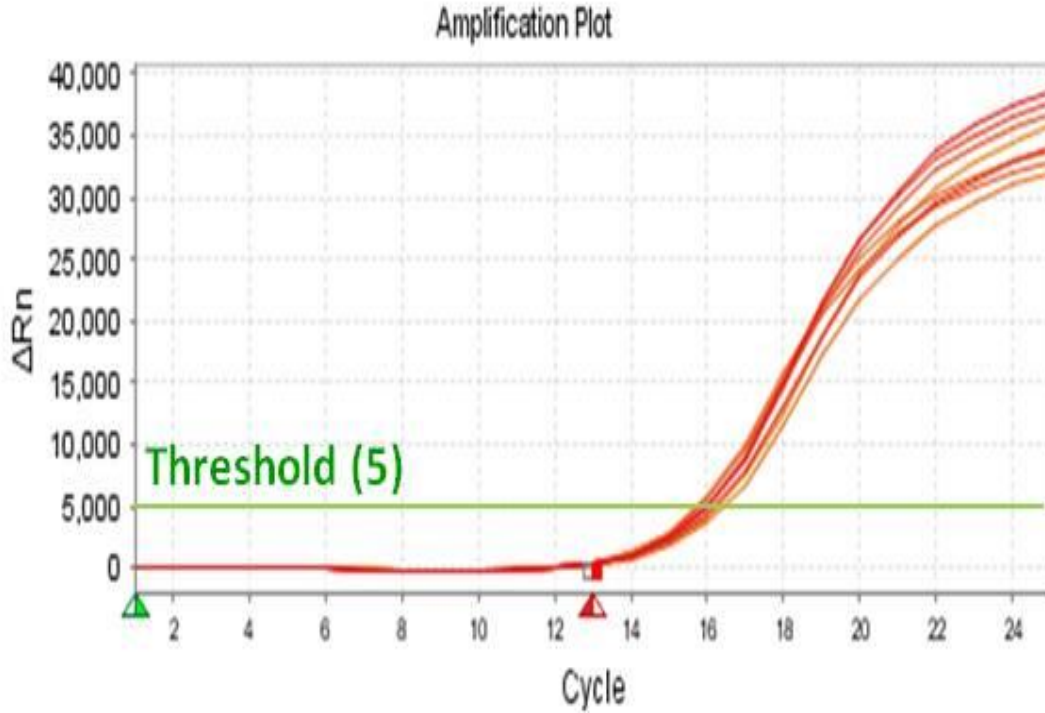
- أخذ كمية من كل عينة تحوي 3 ميكروغرام من RNA الكلي من كل عينة.
- إكمال الحجم بالماء إلى 10 ميكرو لتر.
- إضافة 1 ميكرو لتر من مزيج النكليوتيدات الأحادية dNTPs تركيزها 10 ميلي مول و 1 ميكرو لتر من المرئسات oligo dT تركيزها 0.5 ميكروغرام/ميكرو لتر.
- حضن الأنابيب عند الدرجة 65 مئوية مدة 5 دقائق لفك سلاسل RNA توضع بعدها على الثلج مباشرة مدة دقيقتين.
- إضافة 8 ميكرو لتر لكل أنبوب من المزيج المكون من: 4 ميكرو لتر من first strandbuffer و 5X و 2 ميكرو لتر دائرة DTT 0،1 مول و 1 ميكرو لتر من RNase out و 1 ميكرو لتر من أنزيم النسخ العكسي (M-MLV (40U/μl).
- حضن الأنابيب بالدرجة 37 مئوية مدة 1-2 ساعة.
- إيقاف التفاعل بوضع الأنابيب في درجة حرارة (-20) درجة مئوية.

4-7-2 تفاعل qPCR:

يعتمد مبدأ التفاعل على تضخيم شدة cDNA باستخدام مرئسات نوعية للجينات المراد الكشف عن تغيير تعبيرها المورثي بالزمن الحقيقي باستخدام الصباغ المفلور Sybr green الذي يرتبط ارتباطاً نوعياً إلى سلاسل DNA ثنائية السلسلة ويصدر بارتباطه إشارة فلورة بلون أخضر، وتتكرر العملية ويتم تسجيل إشارة الفلورة بشكل لحظي في كل دورة.

تم بداية التأكد من تحويل mRNA إلى cDNA وذلك بإجراء تفاعل RT-qPCR للمورثة المرجعية (هي مورثة لا يتغير تعبيرها المورثي بتغير الشروط التي تطرأ على الخلية) لكل من العينات الشاهدة والمعالجة.

استخدمت المورثة *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) في العمل كمورثة مرجعية بحيث يجب أن تكون قيمة *Ct* (Cycle Threshold) (وهي تمثل عدد الدورات التي يمكن عندها قراءة أول إشارة فلورة) للمورثة *GAPDH* في العينات الشاهدة والمعالجة متطابقة (الشكل 11).



الشكل 11: تفاعل RT-PCR للمورثة المرجعية *GAPDH* يبين تحديد الـ *Ct* لكل عينة.

بعد ذلك يتم دراسة تغير التعبير المورثي عن المورثات *Caspase-8*, *Caspase-9*, *Caspase-3*, *Bax*, *Bcl-2* وهي أهم المورثات المنظمة للموت الخلوي المبرمج وذلك بإجراء تفاعل RT-PCR (لكل من المورثة المرجعية والمورثات الهدف) يتم من خلاله تحديد قيمة *Ct* لكل مورثة مدروسة من كل عينة ثم حساب قيمة ΔCt و $\Delta\Delta Ct$ لكل عينة والذي يمكّننا من حساب التغير النسبي الكمي في التعبير عن هذه المورثات (RQ (Relative Quantitative) إثر المعالجة بالمركبات المطبّقة على الخلايا باستخدام الجهاز qPCR, StepOne Plus system من شركة Applied BioSystems.

حيث:

$$RQ \text{ (Relative quantitative)} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta Ct_{(1)} = (Ct_{\text{(الجين الهدف)}} - Ct_{\text{(الجين المرجعية)}}) \text{ العينة المعالجة}$$

$$\Delta Ct_{(2)} = (Ct_{\text{(الجين الهدف)}} - Ct_{\text{(الجين المرجعية)}}) \text{ العينة الشاهدة}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(1)} - \Delta Ct_{(2)}$$

تم استخدام المرئسات النوعية للمورثة المرجعية *GAPDH* والجينات:

Caspase-8, Caspase-9, Caspase-3, Bcl-2, Bax,

تركيزها 10 ميكرومول وتسلسلها النكليوتيدي موضح في الجدول رقم 1

اسم المرئسة	التسلسل النكليوتيدي	طول الشدفة المضخمة
<i>GAPDH-F</i>	5'- ATGACCCCTTCATTGACC -3'	131 bp
<i>GAPDH-R</i>	5'- GAAGATGGTGATGGGATTTC -3'	
<i>Cas-8-F</i>	5'-CATCCAGTCACTTTGCCAGA-3'	128 bp
<i>Cas-8-R</i>	5'-GCATCTGTTTCCCCATGTTT-3'	
<i>Cas-9-F</i>	5'-TTCCCAGGTTTTGTTTCCTG-3'	143 bp
<i>Cas-9-R</i>	5'-CCTTTCACCGAAACAGCATT-3'	
<i>Cas-3-F</i>	5'-ACATGGCGTGTCATAAAATACC-3'	120 bp
<i>Cas-3-R</i>	5'-CACAAAGCGACTGGATGAAC-3'	
<i>Bcl-2-F</i>	5'- CTTGACAGAGGATCATGCTGTAC -3'	129 bp
<i>Bcl-2-R</i>	5'- GGATCTTTATTTTCATGAGGC -3'	
<i>Bax-F</i>	5'- GGGCCCACCAGCTCTGA -3'	150 bp
<i>Bax-R</i>	5'- CCTGCTCGATCCTGGATGA -3'	

الجدول رقم 1: تسلسل النكليوتيدات لكل مرئسة نوعية لكل مورثة وطول الشدفة المضخمة

حيث تضخم كل منها شذفة من cDNA يتراوح طولها بين 100-150 bp (Base pair)، تم تصنيع المرئسات في المخبر الخدمي في دائرة الوراثة البشرية - قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية - هيئة الطاقة الذرية السورية.

طريقة العمل:

ضم أنبوب تفاعل RT-PCR المكونات التالية:

الحجم	المواد
10 ميكرو لتر	Master mix (الحاوي على نكليوتيدات حرة dNTPs وأنزيم البلمرة Taq Polymerase ودارنة ملحية و المادة المتفلورة SYBR greenI)
0.8 ميكرو لتر	مرئسات نوعية
2 ميكرو لتر	cDNA
7.2 ميكرو لتر	ماء
20 ميكرو لتر	الحجم النهائي للتفاعل

يتم بعدها وضع الأنابيب في الجهاز وضبط تشغيل 35 دورة على البرنامج التالي:

الزمن	درجة الحرارة	البرنامج
10 دقائق	95 درجة مئوية	البداية Start
15 ثانية	95 درجة مئوية	التمسخ Denaturation
1 دقيقة	60 درجة مئوية	التشافع Annealing

الفصل الثالث

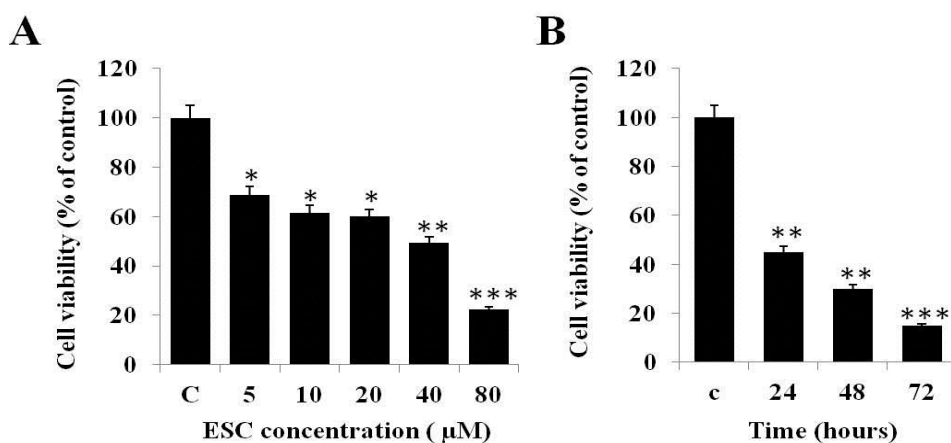
النتائج

3-النتائج

1-3 الجزء الأول: نتائج تأثير المستخلص ESC على عيوشية الخلايا السرطانية الدبقية البشرية T98G.

1-1-3 دراسة العيوشية الخلوية:

بعد أن تم استنبات الخلايا الدبقية البشرية السرطانية T98G في صفيحة الاستنبات ومعالجتها بتركيز وأزمنة مختلفة من المستخلص ESC، تم قياس العيوشية الخلوية باستخدام الصباغ XTT. تبين نتائج قراءة الامتصاصية انخفاض العيوشية الخلوية للخلايا المعالجة بزيادة تركيز المستخلص، فقد أبدت الخلايا المعالجة بالتركيز التالية (5، 10، 20، 40، 80) ميكرومول انخفاضاً تدريجياً في العيوشية إذ بلغت نسبة عيوشية الخلايا (69، 62، 60، 49، 22) % على التوالي خلال 24 ساعة من المعالجة. وبالتالي تحديد التركيز المثبط لنمو نصف المجتمع الخلوي (IC_{50}) عند التركيز 40 ميكرومول (الشكل 12A). كما تبين أن هذا الانخفاض في العيوشية الخلوية مرتبط أيضاً بزيادة زمن المعالجة فعند معالجة الخلايا بالتركيز 40 ميكرومول (تركيز IC_{50}) لثلاث فترات زمنية 24، 48 و 72 ساعة انخفضت نسبة العيوشية إلى (49، 30، 15) % على التوالي (الشكل 12B). تبين هذه المعطيات قدرة المستخلص ESC على تثبيط العيوشية الخلوية بشكل معتمد على التركيز والزمن، مما يشير إلى تأثير واضح في كبح نمو الخلايا السرطانية إما من خلال التأثير على تقدم الدورة الخلوية أو تعرض الموت الخلوي.

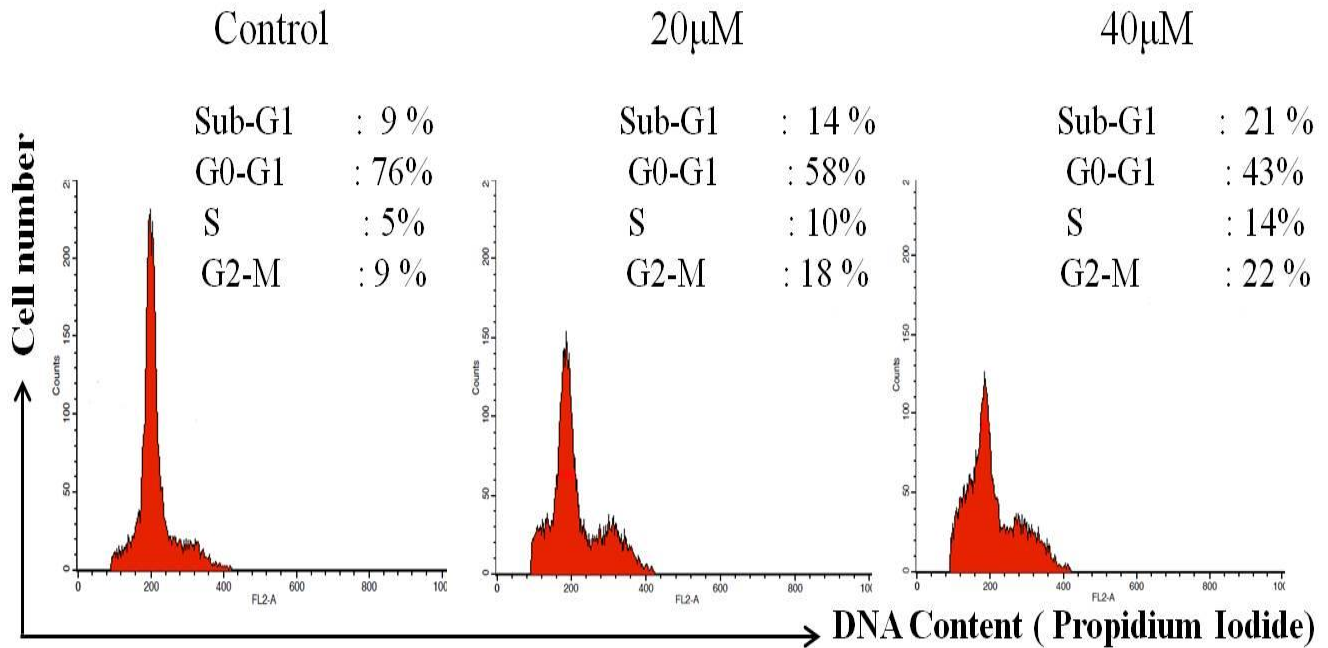


الشكل (12): مخطط بياني لتأثير المستخلص الطحلي ESC على نشاط الخلايا السرطانية T98G عند معالجتها بتركيز وأزمنة مختلفة. تمت معالجة الخلايا بخمسة تراكيز متدرجة (5، 10، 20، 40، 80) ميكرومول من الـ ESC لمدة 24 ساعة (A). عولجت الخلايا بتركيز 40 ميكرومول من ESC لمدة 24، 48 و 72 ساعة (B). قيس عيوشية الخلايا عن طريق اختبار العيوشية الخلوية XTT. عُبر عن عيوشية الخلايا بنسبة مئوية مقارنة مع الخلايا الشاهد الحية بحيث كانت النتائج المقدمة في الشكل هي متوسط (\pm) SEM لتكرار ثلاث تجارب منفصلة.

2-1-3 دراسة توزيع أطوار الدارة الخلوية:

لدراسة توزيع أطوار الدارة الخلوية قمنا بوسم الخلايا بالصبغ المتفلور (PI) Propidium Iodide الذي يرتبط بالمادة النووية للخلية ويعكس محتواها من DNA، ومن ثم قمنا بتحليلها بواسطة جهاز قياس التدفق الخلوي.

بينت النتائج أنه عند معالجة الخلايا بالمستخلص ESC بالتركيزين 20 و 40 ميكرومول، لوحظ ازدياد واضح في نسبة الخلايا في الطور SubG1 (الذي يمثل خلايا ذات محتوى من DNA أقل من 2n) والتي تشير إلى خلايا ميتة شاذة الصيغة الصبغية، حيث بلغت نسبتها 14 و 21% على التوالي عند المعالجة بالتركيزين السابقة مقارنة بالخلايا الشاهدة حيث بلغت 9% (الشكل 13).

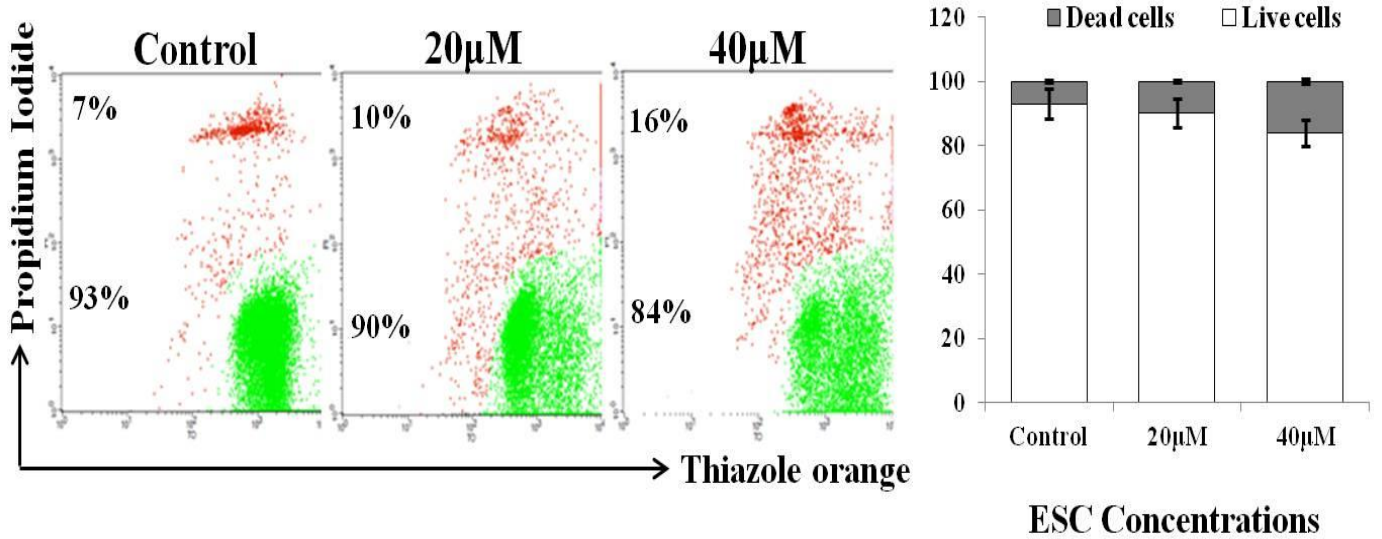


الشكل (13): تأثير المستخلص ESC في توزيع أطوار الدارة الخلوية نتيجة معالجة الخلايا T98G بالتركيزين (20 و 40) ميكرومول، حيث يبين الشكل تغيير النسبة المئوية للخلايا في طور اصطناع DNA (S) وظهور نسبة من الخلايا متشددة الـDNA (Sub G1) في الخلايا المعالجة بالمقارنة مع الخلايا الشاهدة.

3-1-3 تفعيل الموت الخلوي المبرمج بتأثير المعالجة بالمستخلص ESC:

1-3-1-3 الكشف عن الموت الخلوي:

عولجت الخلايا T98G بالتركيزين 20 و 40 ميكرومول مدة 24 ساعة، تم بعدها جمع الخلايا وتلوينها بالأصبغة المتفلورة TO وPI وتحليلها بواسطة جهاز قياس التدفق الخلوي. بينت النتائج ازدياد نسبة تلون الخلايا بالصبغ المتفلور PI والتي تمثل خلايا ميتة بازدياد تركيز المستخلص، إذ يبين التحليل ازدياد نسبة الخلايا ذات الغشاء السيتوبلازمي المتضرر والمتقرب مما يسمح بنفوذ صباغ PI لداخل الخلية وارتباطه على النواة، حيث يظهر الشكل 14 ازدياد نسبة الخلايا الميتة (الملونة باللون الأحمر) إلى 10% عند المعالجة بالتركيز 20 ميكرومول وارتفعت النسبة إلى 16% عند التركيز 40 ميكرومول بالمقارنة مع الخلايا الشاهدة والتي لم تزد فيها نسبة الموت الخلوي عن 5% (الشكل 14).

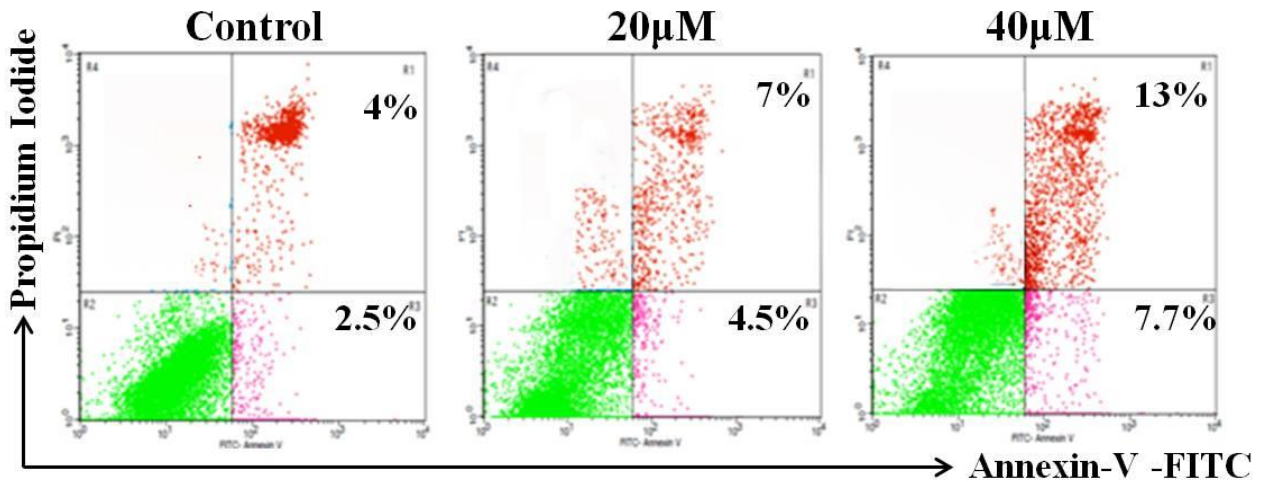


الشكل (14): تأثير المستخلص ESC في تحريض الموت الخلوي في الخلايا المعالجة. يبين الشكل تغير عدد الخلايا المصبوغة بالـ PI (اللون الأحمر) وعدد الخلايا المصبوغة بالـ TO (اللون الأخضر) بتغير تركيز المستخلص. تمت معالجة الخلايا بالتركيزين 20 و 40 ميكرومول من المستخلص ESC ومقارنتها مع خلايا المجموعة الشاهدة.

2-3-1-3 تحديد طبيعة الموت الخلوي:

بعد الكشف عن تحريض الموت الخلوي بتأثير المعالجة بالمستخلص، قمنا بوسم الخلايا وسماً ثنائياً بكل من Annexin-V-FITC وPI وتحليلها بواسطة جهاز قياس التدفق الخلوي، يبين تحليل الخلايا ازدياد نسبة ارتباط الـ Annexin-V إلى الخلايا بازدياد تركيز المستخلص مما يدل على ارتفاع نسبة الخلايا التي حدث فيها انقلاب لفوسفاتيديل السيرين إلى الطبقة الخارجية من الغشاء السيتوبلازمي مما يسمح بارتباطه إلى Annexin-V وبالتالي ازدياد نسبة الخلايا الداخلة في مسارات الموت الخلوي المبرمج (early apoptosis)، حيث بلغت نسبتها 4.5% عند المعالجة بالتركيز 20 ميكرومول و7.75% عند المعالجة بالتركيز 40 ميكرومول والتي تظهر باللون الوردي في الشكل (الشكل 15).

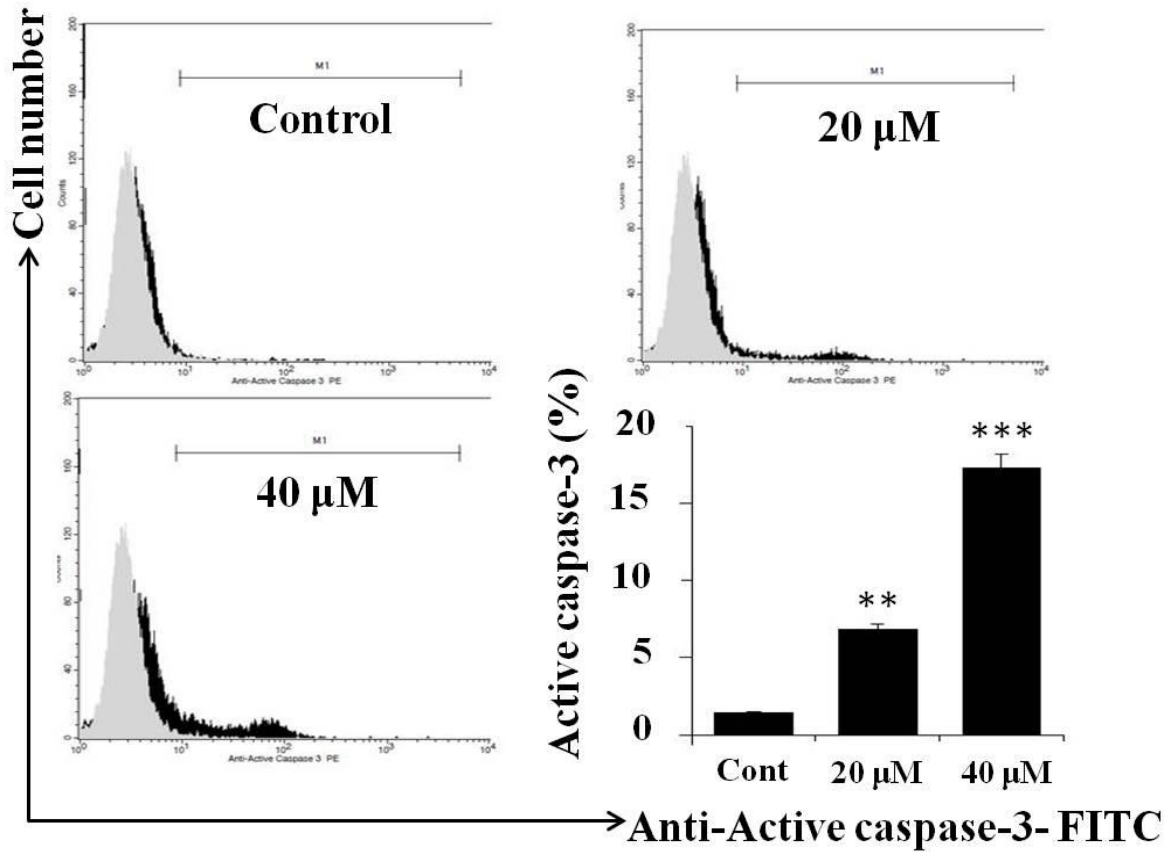
بالإضافة لذلك تبين ازدياد نسبة الخلايا الموسومة بشكل ثنائي بكل من Annexin-V وPI والتي تمثل خلايا في مراحل متقدمة من الموت الخلوي المبرمج (late apoptosis)، وقد بلغت النسب 7% عند المعالجة بالتركيز 20 ميكرومول و13% عند المعالجة بالتركيز 40 ميكرومول وتظهر باللون الأحمر في الشكل 15.



الشكل (15): تأثير المستخلص ESC في تحريض الموت المبرمج في الخلايا المعالجة. يبين الشكل نسبة الخلايا الداخلة في الموت الخلوي المبرمج المرتبطة بـ Annexin-V فقط (اللون الوردي) والخلايا الميتة موتاً مبمرجاً و المرتبطة بكل من Annexin-V وPI (اللون الأحمر) في المجموعتين المعالجتين بالتركيزين (20 و40) ميكرومول من المستخلص ESC مقارنةً بخلايا المجموعة الشاهدة.

3-1-4 تغيير مستوى البروتين النشط ACTIVE CASPASE-3:

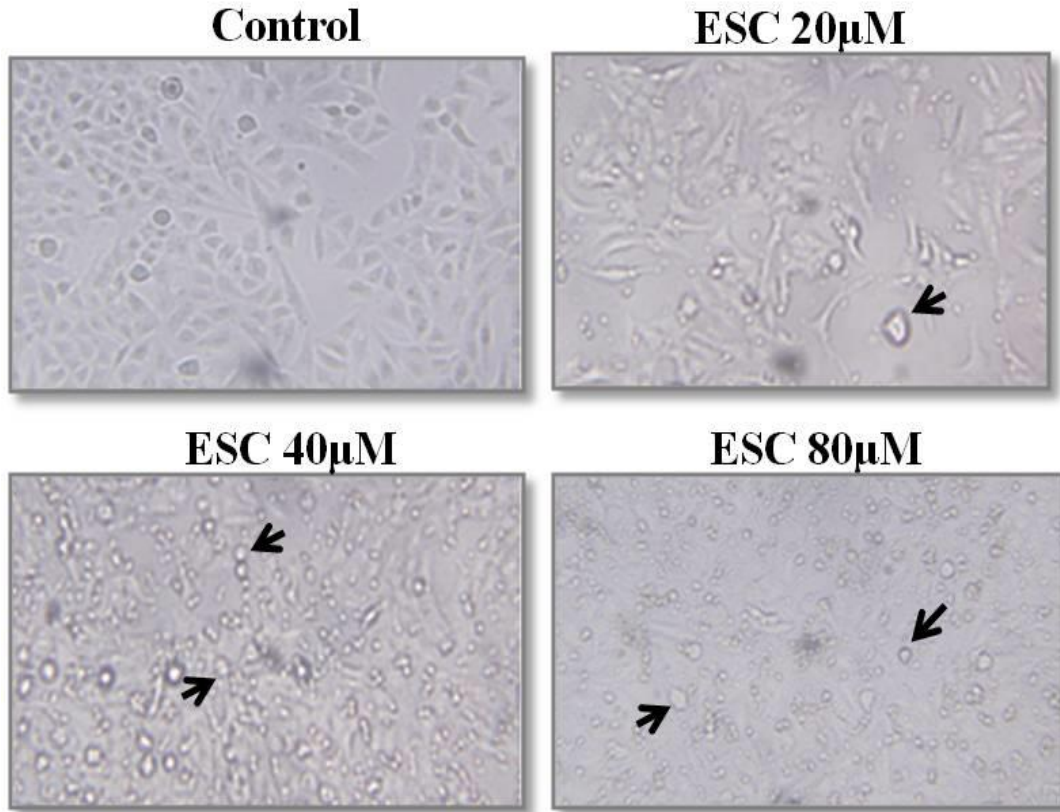
يؤكد الكشف عن تغيير مستوى البروتين النشط ACTIVE CASPASE-3 مقدار التحول الوظيفي للبروتين بما يخدم مسار الموت الخلوي المبرمج، لذلك توجهنا لدراسة مستوى تفعيل البروتين بتأثير المعالجة بالمستخلص، حيث تبين ازدياد نسبة الخلايا الحاوية على البروتين ACTIVE CASPASE-3 إلى النسبة 6% عند المعالجة بالتركيز 20 ميكرومول والنسبة 17.2% عند المعالجة بالتركيز 40 ميكرومول، بالمقارنة مع الخلايا الشاهدة التي لم تتجاوز فيها النسبة 1.5% (الشكل 16).



الشكل (16): شكل بياني يبين تغيير في نسبة البروتين النشط ACTIVE CASPASE-3 عند المعالجة بالتركيزين (20 و 40) ميكرومول من المستخلص ESC بالمقارنة مع خلايا المجموعة الشاهدة. يمثل المنحني الرمادي الرسم البياني للنمط الشاهد بينما يمثل المنحني الأسود الرسم البياني المعير عن كمية البروتين الفعّال. عُبر عن كمية التغير في التعبير البروتيني بنسبة مئوية من تعبير الخلايا الشاهدة وحسب المتوسط ونسبة الخطأ من مجموع ثلاثة تجارب مستقلة.

3-1-5 التغيرات الشكلية الناجمة عن المعالجة بالمستخلص:

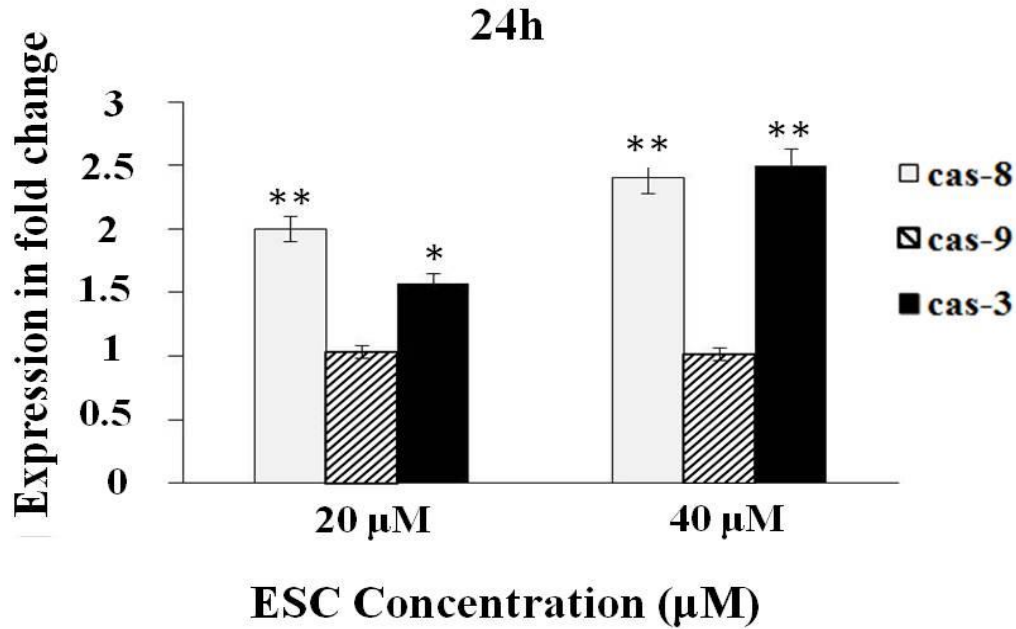
استخدم المجهر المقلوب لدراسة التغيرات التي طرأت على الخلايا نتيجة معالجتها بثلاث تراكيز مختلفة من المستخلص حيث تبين انخفاض واضح في عدد الخلايا ويزداد هذا الانخفاض بازدياد التركيز، بالإضافة لذلك لوحظ تغير واضح في شكل الخلايا مقارنة بالخلايا الشاهدة التي تتميز بالشكل النجمي (الشكل 17)، حيث بدأت الخلايا المعالجة بالتراكيز 20 و40 ميكرومول بفقدان تكامل غشائها السيتوبلازمي والانكماش والتكور كما بدأت تأخذ أشكالاً متفاوتة بين البيضوية والكروية (الشكل 17)، والذي تجلى بشكل أوضح في الخلايا المعالجة بالتركيز 80 ميكرومول حيث ازداد عدد الخلايا المكورة المنفصلة عن سطح الاستنبات والتي تظهر ساحة في الوسط والتي تشير لاختلال في الهيكل السيتوبلازمي الخلوي (الشكل 17)، مما يعطي دليلاً على توقف الفعاليات الحيوية ضمن الخلايا بتأثير المعالجة ودفع الخلايا نحو الموت.



الشكل (17): الصور المجهرية للخلايا T98G بعد المعالجة بالمستخلص ESC بتركيز مختلفة 20، 40 و80 ميكرومول، ومقارنة الأثر مع الخلايا الشاهدة، تشير الأسهم في الشكل إلى الخلايا الداخلة في الموت الخلوي بعد المعالجة.

3-1-6 تغيير التعبير المورثي للمورثات الناظمة للموت الخلوي المبرمج:

عولجت الخلايا السرطانية بالتركيزين 20 و 40 ميكرومول مدة 24 ساعة ثم جمعت الخلايا وتم عزل *Total RNA* بالطريقة المذكورة في طرائق البحث، حوّل بعدها mRNA إلى cDNA وبعد التأكد من جودته، أجري تفاعل q-PCR للمورثة المرجعية *GAPDH* كما هو موضح في الفقرة 2-7-4. درس بعدها التغيير في النسبة الكمية لتعبير المورثات *Caspase-8*, *Caspase-9*, *Caspase-3* المنظمة لمسار الموت الخلوي المبرمج، وتبين ازدياد التعبير عن كل من المورثتين *Caspase-8*, *Caspase-3* بعد المعالجة في حين بقي التعبير عن *Caspase-9* شبه ثابت، حيث بلغت الزيادة في التعبير المورثي عند المعالجة بالتركيزين 20 و 40 ميكرومول بالنسبة للمورثة *Caspase-8* (2، 2.4) ضعف على التوالي، وبالنسبة للمورثة *Caspase-3* (1.5، 2.5) ضعف على التوالي في حين بلغ التعبير عن المورثة *Caspase-9* (1.03، 1.05) ضعف (الشكل 18)، مما يشير إلى قدرة المستخلص ESC في تفعيل أهم الجزيئات الخلوية الرئيسية التي تفضي إلى تحريض الموت الخلوي المبرمج.



الشكل 18: مخطط بياني يبين تغيير التعبير المورثي للمورثات المرتبطة بالموت الخلوي المبرمج (*caspase-8*, *caspase-9*, *caspase-3*) في الخلايا المعالجة بالتركيزين 20، 40 ميكرومول من المستخلص ESC لمدة 24 ساعة. عبر عن كمية التغيير في التعبير المورثي بمرات الزيادة (expression in fold change) حيث تمت مقارنة التغيير في التعبير المورثي بين كل من المورثات المدروسة مع المورثة المرجعية *GAPDH* في الخلايا المعالجة والخلايا الشاهدة وحسب المتوسط ونسبة الخطأ من مجموع ثلاثة تجارب مستقلة.

3-2 الجزء الثاني: نتائج تأثير المركبات كابا، يوتا ولامدا كاراجينان على خلايا سرطان الثدي

MDA-MB-231

3-2-1 دراسة تأثير كل من المركبات كابا، يوتا ولامدا كاراجينان على العيوشية الخلوية:

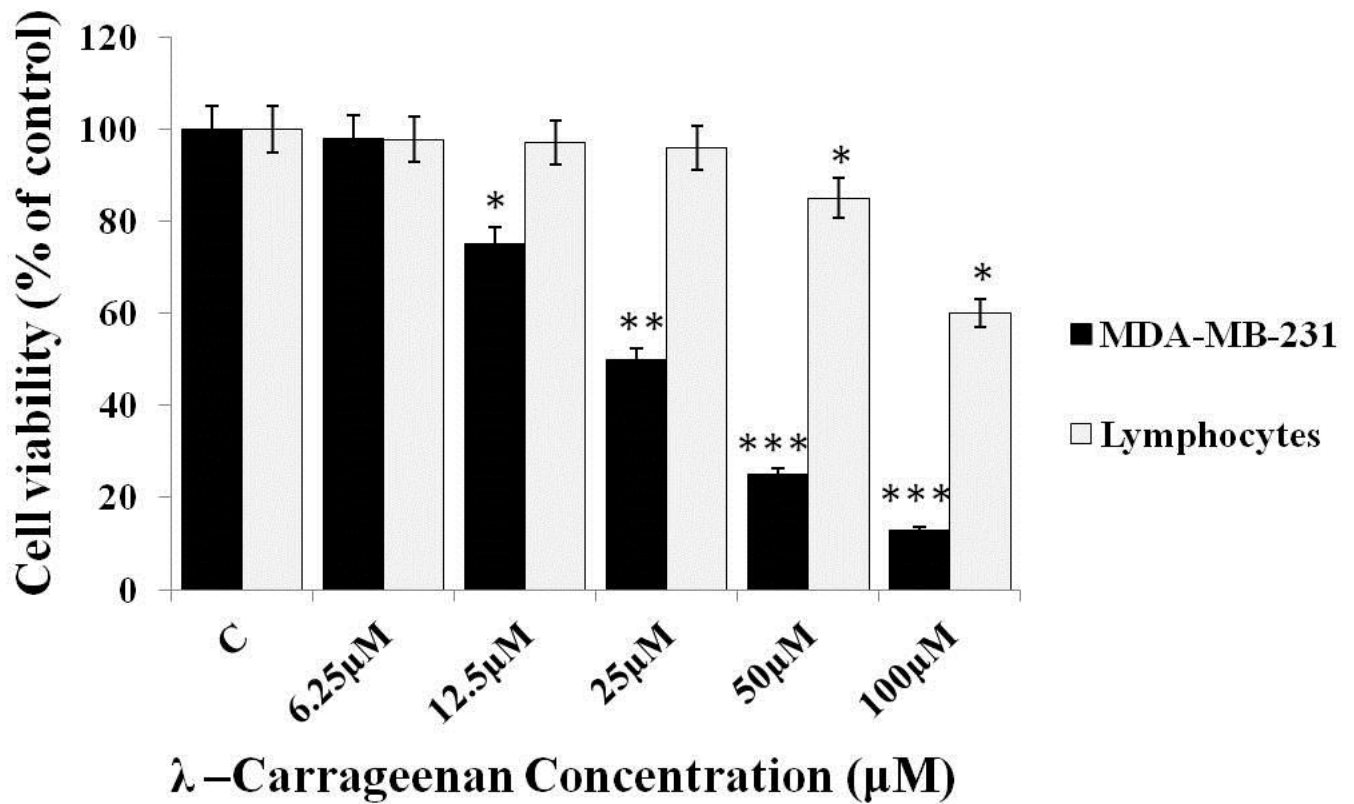
تم استنبات الخلايا السرطانية MDA-MB-231 في صفيحة الاستنبات 96 بئر ومعالجتها بتركيز وأزمنة مختلفة من المركبات كابا، يوتا ولامدا كاراجينان كل على حدى، وقياس العيوشية الخلوية باستخدام صباغ XTT، تبين النتائج أن المركب كابا كاراجينان له تأثير ضعيف في تثبيط العيوشية الخلوية إذ تجاوزت نسبة عيوشية الخلايا 70% حتى بعد المعالجة بالتركيز المرتفعة (200 ميكرومول) (الشكل 19) فتم إقصاءه في الاختبارات التالية ووتابعنا البحث بدراسة المركبين يوتا ولامدا كاراجينان، اللذان أبديا فعالية أكبر تجاه الخلايا السرطانية، حيث تبين بشكل واضح قدرتهما على تثبيط العيوشية الخلوية وبشكل يعتمد على التركيز والزمن. حيث انخفضت العيوشية بازدياد تركيز المركب، وبلغت بعد المعالجة بالتركيز (6.25، 12.5، 25، 50، 100) ميكرومول من المركب يوتا كاراجينان النسب التالية (85، 78، 70، 50، 34) % على التوالي، بينما بلغت بعد المعالجة بنفس التركيزات السابقة من المركب لامدا كاراجينان النسب (98، 75، 50، 25، 13) % على التوالي، حددت نسبة العيوشية الخلوية بعد المعالجة من خلال مقارنتها مع الخلايا الشاهدة غير المعالجة والتي تمثل النسبة 100% (الشكل 19). وبذلك تكون قيمة IC_{50} لكل مركب موافقة للقيم:

لامدا	يوتا	كابا	
25 ميكرومول	50 ميكرومول	-	IC_{50}

كما تبين أن هذا الانخفاض في العيوشية الخلوية مرتبط أيضاً بعامل الزمن، حيث لوحظ بعد المعالجة بالمركب يوتا كاراجينان بالتركيز IC_{50} مدة 24، 48 و72 ساعة أن العيوشية انخفضت إلى النسب (50، 40، 32) % على التوالي، كذلك عند المعالجة بالمركب لامدا كاراجينان بالتركيز IC_{50} بنفس الأزمنة السابقة، انخفضت العيوشية إلى النسب (50، 40، 28) % على التوالي (الشكل 19).

2-2-3 دراسة تأثير المركب لامدا كاراجينان على عيوشية الخلايا الطبيعية Lymphocytes:

بعد أن تم التأكد من فعالية المركبات في تثبيط العيوشية الخلوية للخلايا السرطانية قمنا باختبار تأثير أحدها وهو لامدا كاراجينان على عيوشية الخلايا الطبيعية للمفاوية والمقارنة بتأثيره الحيوي على الخلايا السرطانية الثديية. إذ تبين أن الخلايا للمفاوية بقيت محافظة على عيوشيتها الخلوية بعد المعالجة بالمركب لامدا كاراجينان بشكل أكبر من الخلايا السرطانية (الشكل 20) مما يبين بشكل واضح قدرة المركب على تثبيط انقسام الخلايا السرطانية بشكل فعال دوناً عن الخلايا للمفاوية الطبيعية.



الشكل (20): مخطط بياني لتأثير المركب لامدا كاراجينان على نشاط الخلايا للمفاوية الطبيعية Lymphocytes عند المعالجة بتركيز مختلفة والمقارنة مع تأثيره على الخلايا السرطانية MDA-MB-231. عولجت الخلايا الطبيعية والسرطانية بخمسة تراكيز متدرجة (6.25، 12.5، 25، 50، 100) ميكرومول من لامدا كاراجينان مدة 24 ساعة، قيس عيوشية الخلايا عن طريق اختبار XTT. عُبِّرَ عن العيوشية الخلوية بنسبة مئوية مقارنة مع الخلايا الشاهد الحية.

3-2-3 دراسة توزع أطوار الدارة الخلوية:

- عند معالجة الخلايا بالمركب يوتا كاراجينان بالتركيزين 25 و 50 ميكرومول، لوحظ انخفاض واضح في نسبة الخلايا الموجودة في الطور S (طور اصطناع DNA) إلى 19، و 17 % على التوالي مقارنة بالخلايا الشاهدة حيث بلغت النسبة 29 %، كما لوحظ ازدياد نسبة الخلايا الموجودة في الطور Sub-G1 (الطور الذي تتراكم فيه الخلايا ذات محتوى من DNA أقل من $2n$ أي الخلايا الميتة شاذة الصيغة الصبغية)، إذ بلغت نسبتها 12، و 22 % عند المعالجة بالتركيز السابق مقارنة بالخلايا الشاهدة التي بلغت فيها النسبة 5 % (الشكل 21B).
- عند المعالجة بالمركب لامدا كاراجينان كانت النتائج مشابهة من حيث انخفاض نسب الخلايا المعالجة الموجودة في الطور S وزيادة نسب تلك الموجودة في الطور Sub-G1 ولكن الأثر كان أكبر من أثر يوتا كاراجينان، إذ انخفضت نسبة الخلايا في الطور S عند المعالجة بالتركيزين (12.5، و 25) ميكرومول بشكل أكبر مما هو عليه عند المعالجة بالمركب يوتا كاراجينان وبلغت النسب (9، 11) % على التوالي مقارنة بالخلايا الشاهدة 29 %، بالإضافة لازدياد نسبة الخلايا في الطور Sub-G1 والتي بلغت (31، 39) % عند المعالجة بنفس التركيز السابق مقارنة بالخلايا الشاهدة 5 % (الشكل 21C).
- توضح هذه النسب قدرة مركب لامدا كاراجينان التي تفوق قدرة مركب يوتا كاراجينان في التأثير على تثبيط اصطناع DNA من جهة وتحريض تشدفه من جهة مما يعني دفع الخلايا للدخول في مسارات الموت الخلوي.

3-2-4 تفعيل الموت الخلوي المبرمج بتأثير المعالجة بالمركبات يوتا ولامدا كاراجينان:

3-2-4-1 الكشف عن الموت الخلوي:

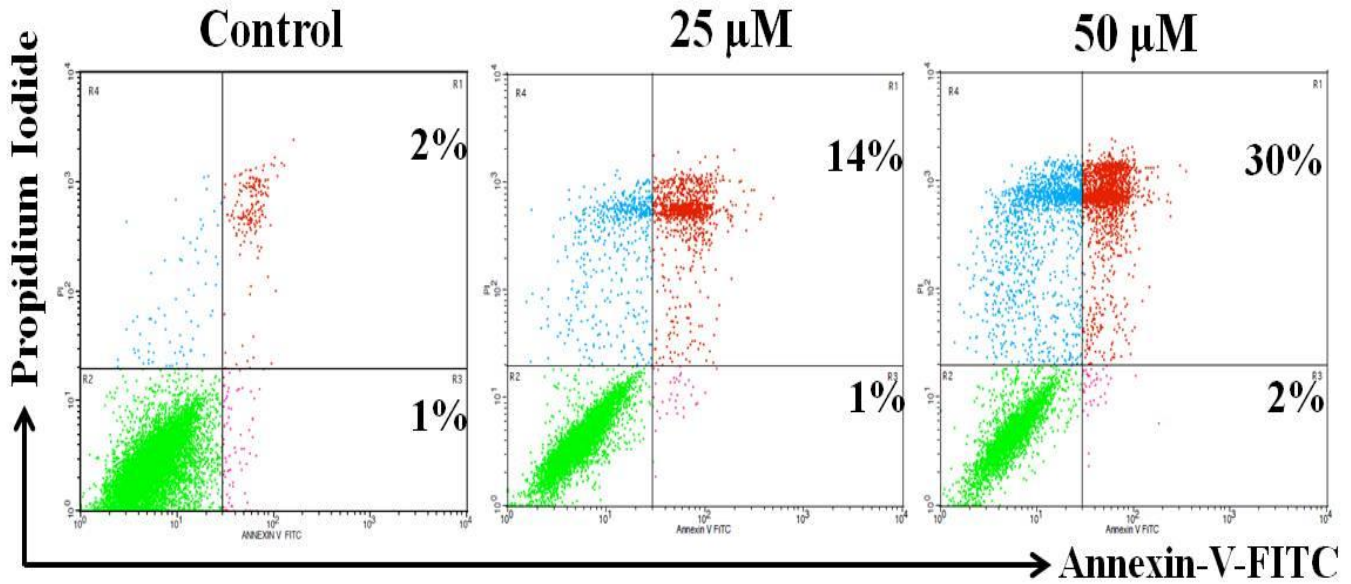
بعد المعالجة بالمركبين يوتا ولامدا كاراجينان مدة 24 ساعة، جمعت الخلايا ولونت بالأصبغة المتفلورة TO وPI وحللت، إذ بينت النتائج مايلي:

- زيادة واضحة في تلون الخلايا بالصبغ PI عند المعالجة بالمركب يوتا كاراجينان بالتالي زيادة نسبة الموت الخلوي، وهذه الزيادة مترافقة بازدياد التركيز، إذ بلغت هذه النسبة 20 %، و46 % عند المعالجة بالتركيزين 25، و50 ميكرومول على التوالي (الشكل 22B)، مقارنة بالخلايا الشاهدة التي بلغت فيها نسبة الموت الخلوي فيها 5 % (الشكل 22A).
- زيادة واضحة في نسبة الموت الخلوي عند المعالجة بالمركب لامدا كاراجينان ومترافقة بازدياد التركيز، إذ بلغت هذه النسبة 8، 45% عند المعالجة بالتركيزين 12.5، 25 ميكرومول على التوالي (الشكل 22C)، مقارنة بالخلايا الشاهدة التي بلغت فيها نسبة الموت الخلوي 5 %.

2-4-2-3 تحديد طبيعة الموت الخلوي:

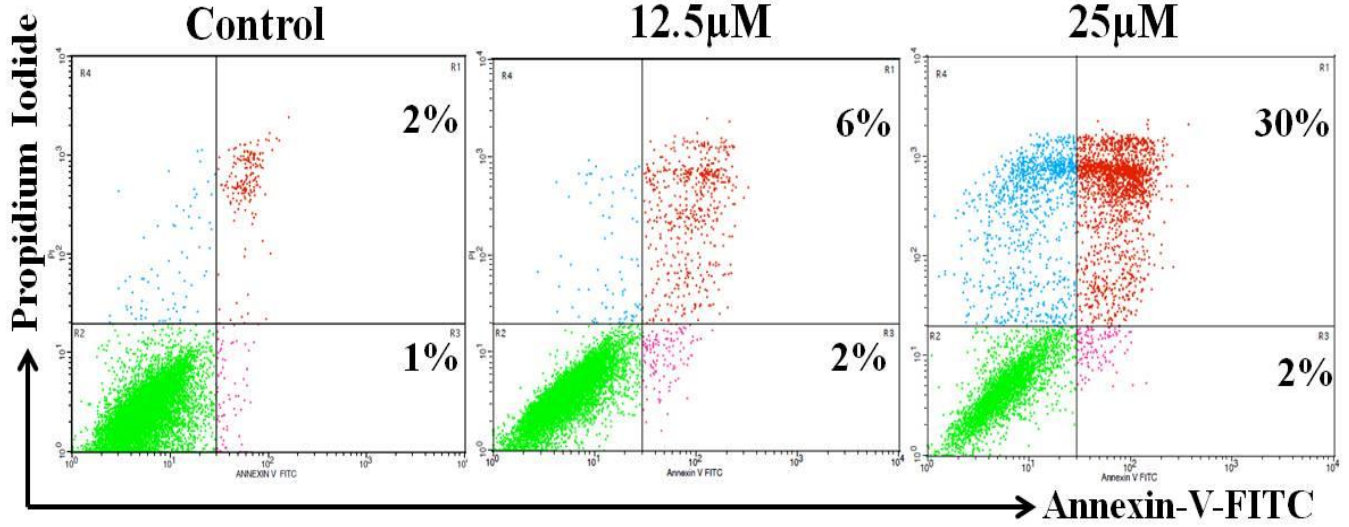
بعد الكشف عن تحريض الموت الخلوي بتأثير المعالجة بالمركبات يوتا ولامدا كاراجينان، قمنا بالتقصي عن طبيعة هذا الموت فيما إذا كان موتاً خلوياً مبرمجاً وذلك بوسم الخلايا وسمّاً ثنائياً بكل من Annexin-V-FITC وPI وتحليلها بواسطة جهاز قياس التدفق الخلوي، حيث بينت النتائج ما يلي:

- بعد المعالجة بالمركب يوتا كاراجينان مدة 24 ساعة، تبين ازدياد طفيف في نسبة الخلايا التي تبدأ حادثة الموت الخلوي المبرمج وهي الخلايا التي تربط الـ Annexin-V فقط (الخلايا الملونة باللون الوردي في الشكل 24)، بالإضافة لزيادة واضحة في الخلايا الميتة موتاً خلوياً مبرمجاً وهي الخلايا التي تربط كل من الـ Annexin-V و PI (الخلايا الملونة باللون الأحمر في الشكل 24)، إذ تبلغ نسبة مجموع هذين النمطين من الخلايا 15، و32% عند المعالجة بالتركيزين (25، 50) ميكرومول على الترتيب مقارنة بالخلايا الشاهدة إذ بلغت النسبة 3% (الشكل 23).



الشكل (23): تأثير المركب يوتا كاراجينان في تحريض الموت المبرمج في الخلايا. يبين الشكل تغيراً في نسبة الخلايا التي تبدأ حادثة الموت الخلوي المبرمج والمصبوغة بـ Annexin-V فقط (اللون الوردي) والخلايا الميتة موتاً مبرمجاً والمصبوغة بـ Annexin V وPI (اللون الأحمر) بتغير تركيز المركب، تمت معالجة الخلايا بالتركيزين (25- 50) ميكرومول من المركب يوتا كاراجينان ومقارنتها مع خلايا المجموعة الشاهدة.

- كانت النتائج مشابهة بعد المعالجة بالمركب لامدا كاراجينان، إذ تبين أيضاً ازدياد طفيف في نسبة الخلايا المتجهة للموت الخلوي المبرمج بالإضافة لزيادة واضحة في الخلايا الميتة موتاً خلوياً مبرمجاً، وبلغ مجموع هذين النمطين من الخلايا النسبتين 8، 32 % عند المعالجة بالتركيزين (12.5، 25) ميكرومول على التوالي مقارنة بنسبة الخلايا الشاهدة والتي تبلغ 3 % فقط (الشكل 24).



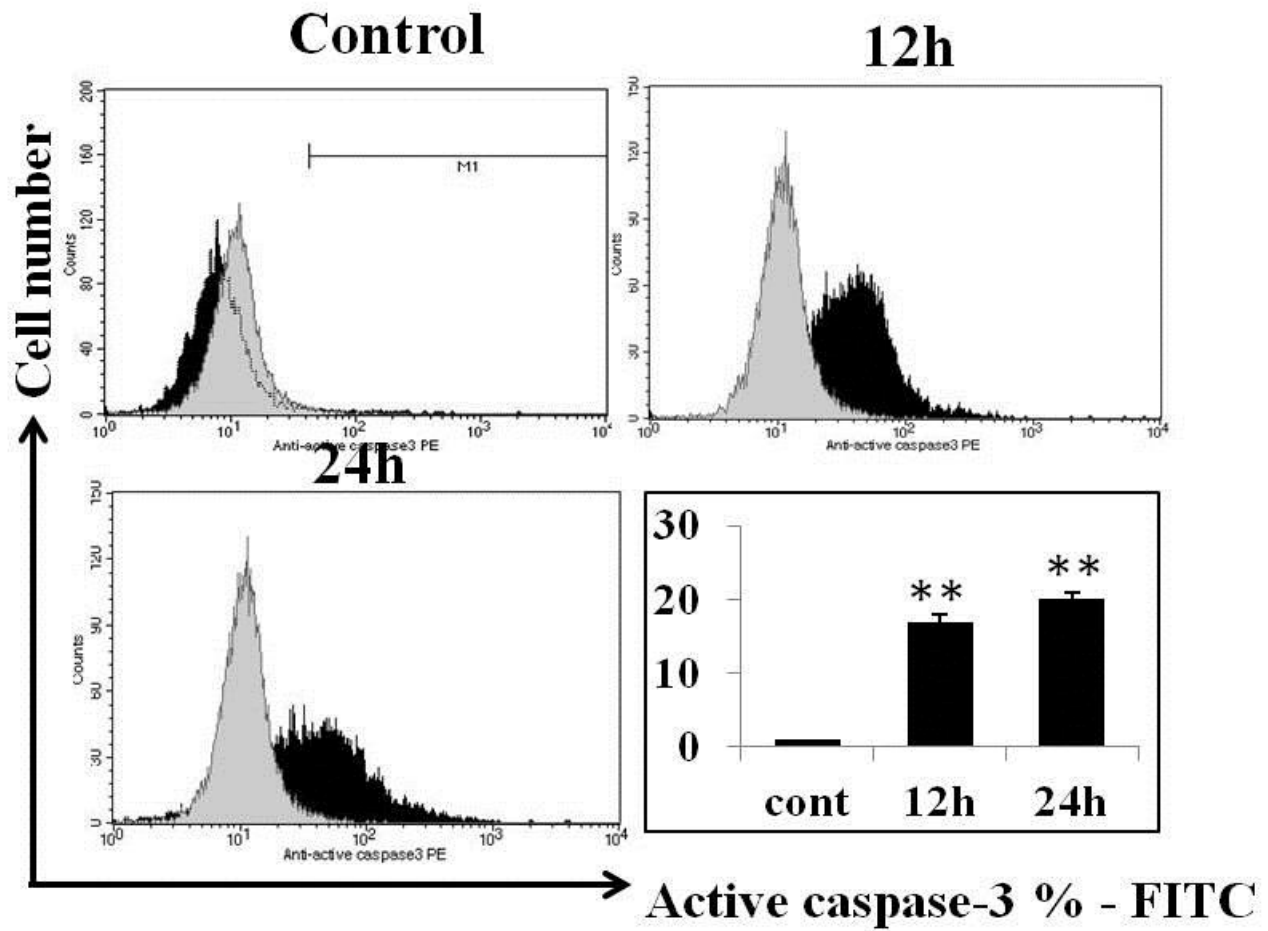
الشكل (24): تأثير المركب لامدا كاراجينان في تحريض الموت الخلوي المبرمج. يبين الشكل تغيراً في نسبة الخلايا الداخلة في الموت الخلوي المبرمج المصبوغة بـ Annexin-V فقط (اللون الوردي) والخلايا الميتة موتاً مبرمجاً والمصبوغة بـ Annexin-V و PI (اللون الأحمر) بتغير تركيز المركب. تمت معالجة الخلايا بالتركيزين (12.5، 25) ميكرومول من المركب لامدا كاراجينان ومقارنتها مع خلايا المجموعة الشاهدة.

في حين ظهر عند المعالجة بأي من المركبين نسبة ضئيلة من الخلايا الموسومة بشكل أحادي بـ PI والتي ربما تعبر عن موت خلوي نيكروزي تحرض في مجموعة من الخلايا وأدى لانفجارها (الخلايا الملونة باللون الأزرق في كلا الشكلين 23-24).

تؤكد مجمل هذه النتائج أن الموت الخلوي المحرض بتأثير المعالجة بالمركبات يوتا ولامدا كاراجينان هو موت خلوي مبرمج في جزء كبير من المجتمع الخلوي المعالج ويزداد بازدياد التركيز.

3-2-5 تغيير مستوى البروتين كاسبيز 3 الفعّال ACTIVE CASPASE-3:

يؤكد الكشف عن تغيير مستوى بروتين الكاسبيز 3 الفعّال التحول الوظيفي للبروتين بما يخدم مسار الموت الخلوي المبرمج لذلك وبعد التأكد من التفعيل على المستوى المورثي، قمنا باختبار مستوى بروتين الكاسبيز 3 الفعّال بعد المعالجة بالتركيز 25 ميكرومول من المركب لامدا كارجينان خلال فترتين زمنيتين 12، 24 ساعة، فتبين ازدياد مستويات بروتين الكاسبيز 3 الفعّال بتأثير المعالجة بالمركب لامدا كارجينان وهذه الزيادة مترافقة بازدياد زمن المعالجة، إذ بلغت النسبة 17% عند المعالجة لمدة 12 ساعة وازدادت إلى 20% عند المعالجة لمدة 24 ساعة، بالمقارنة مع الخلايا الشاهدة حيث بلغت النسبة 0.5% (الشكل 25).



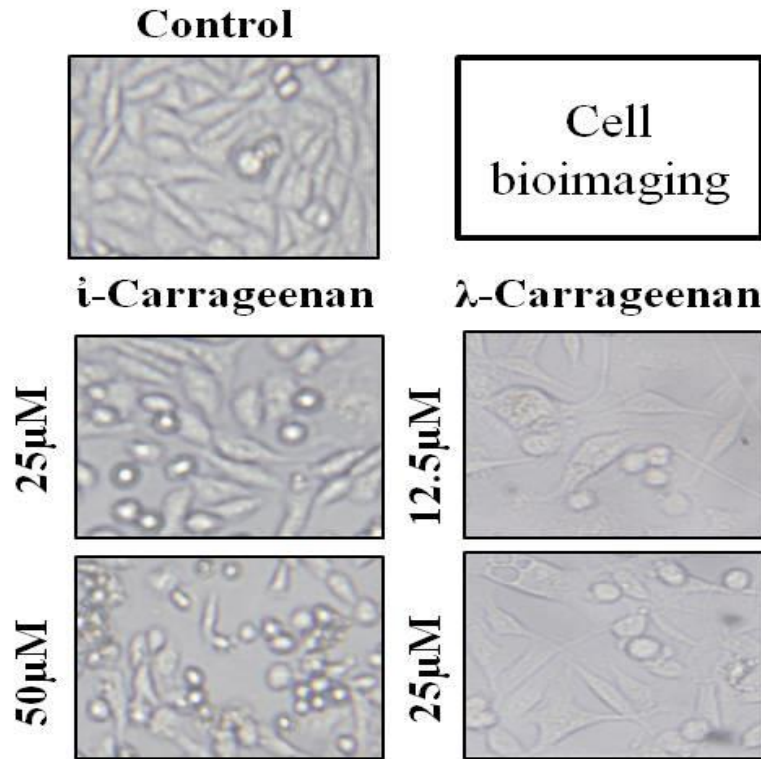
الشكل (25): شكل بياني يبين تغيير في نسبة بروتين الكاسبيز 3 الفعّال عند المعالجة بالتركيز 12.5 ميكرومول من المركب لامدا كارجينان خلال فترتين زمنيتين 12-24 ساعة بالمقارنة مع خلايا المجموعة الشاهدة. يمثل المنحني الرمادي الرسم البياني للنمط الشاهد بينما يمثل المنحني الأسود الرسم البياني المعبر عن كمية البروتين الفعّال. غير عن كمية التغيير في التعبير البروتيني بنسبة مئوية وذلك بالمقارنة بتعبير الخلايا الشاهدة وحسب المتوسط ونسبة الخطأ من مجموع ثلاثة تجارب مستقلة.

3-2-6 التغيرات الشكلية التي تطرأ على الخلايا بتأثير المعالجة:

تم تحديد التغيرات الشكلية والنوعية التي طرأت على الخلايا بعد المعالجة بالمركب يوتا كاراجينان بالتركيزين (25، 50) ميكرومول، أو بالمركب لامدا كاراجينان بالتركيزين (12.5، 25) ميكرومول، وذلك باستخدام المجهر المقلوب ومجهر الفلورة.

• دراسات المجهر المقلوب:

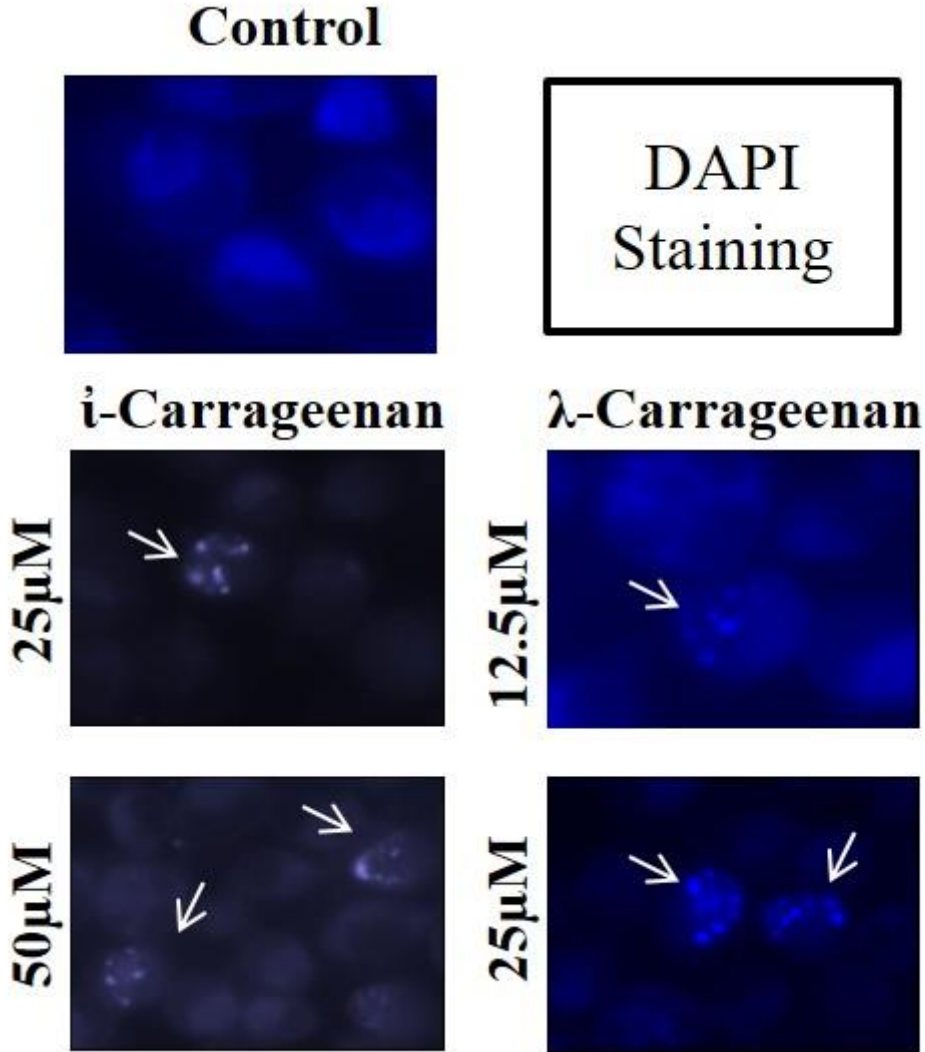
لوحظ انخفاض في عدد الخلايا وتغير شكلي واضح بعد المعالجة ويزداد هذا التغير بازدياد تركيز المركب، حيث يبين الشكل 26 أن المعالجة بالتركيز المنخفض لأي من المركبين تؤثر على بنية الهيكل الخلوي إذ بدأت الخلايا بفقدان الشكل المغزلي المميز لها متجهةً للانكماش والتكور بالإضافة لانعدام تكامل الغشاء السيتوبلازمي وهذا ما بدا بشكل واضح عند المعالجة بالتركيز الأعلى الموافق لتركيز IC_{50} . إضافةً لذلك لوحظ انفصال الخلايا عن سطح الاستنابت مما يعطي مؤشر لموت خلوي محرض في الخلايا بعد المعالجة بكلا المركبين.



الشكل (26): صور مجهرية للخلايا MDA-MB-231 المعالجة بالمركبين يوتا ولامدا كاراجينان. عولجت الخلايا بالتركيزين (25، 50) ميكرومول من المركب يوتا كاراجينان، أو بالتركيزين (12.5، 25) ميكرومول من المركب لامدا كاراجينان لمدة 24 ساعة ومن ثم تُثبت بالفورمالدهيد ودرست باستعمال المجهر الضوئي - تكبير 100X حيث يظهر تغير شكل الخلايا بعد المعالجة.

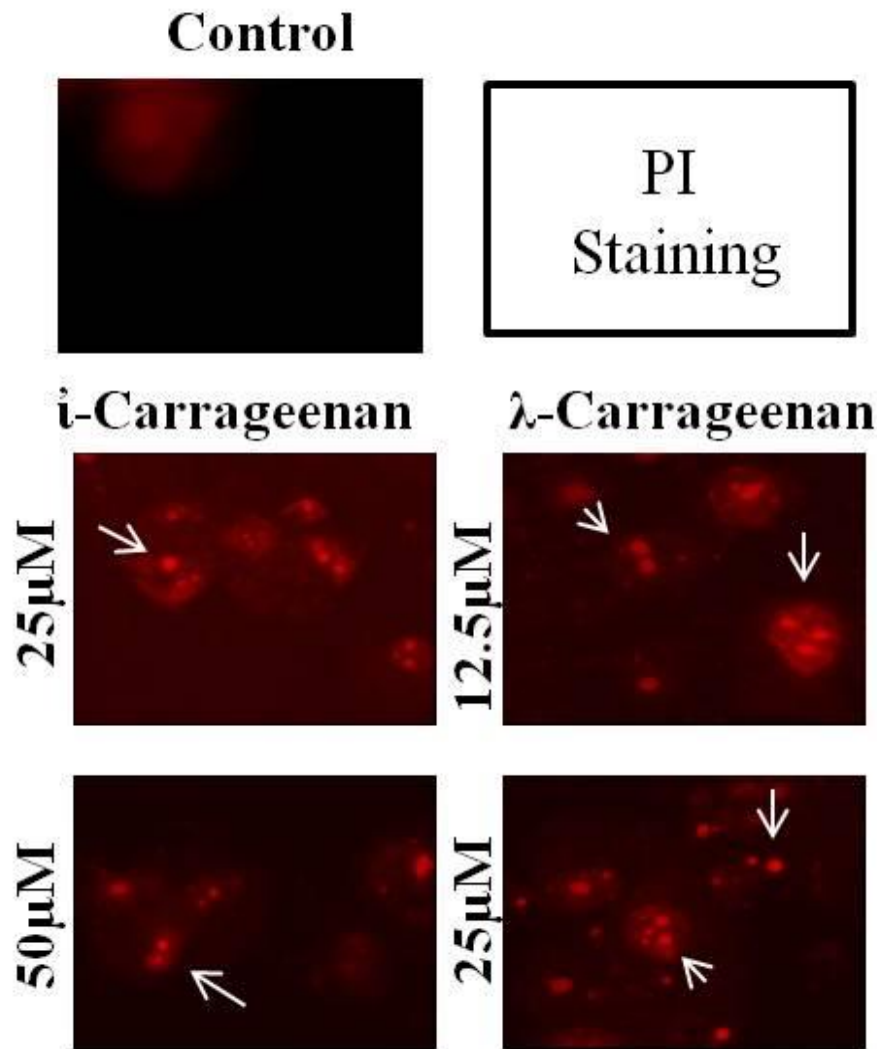
• دراسات مجهر الفلورة:

تمت دراسة التغيرات التي طرأت على نوى الخلايا بعد المعالجة وذلك من خلال وسم الخلايا بالصبغين المتفلورين DAPI أو PI وتصويرها بواسطة مجهر الفلورة، لوحظ باستعمال صباغ DAPI حدوث تكثف كبير على مستوى DNA والذي يؤدي لتكثف DNA بشكل حلقات صغيرة تتوضع حول محيط النواة (الشكل 27).



الشكل (27): صور مجهرية باستعمال مجهر الفلورة للخلايا MDA-MB-231 المعالجة بالمركبين يوتا ولامدا كاراجينان والملونة بصباغ DAPI، عولجت الخلايا بالمركبين يوتا ولامدا كاراجينان مدة 24 ساعة، فُيَمت التغيرات الشكلية للنواة وتكثف DNA عن طريق صبغ الخلايا بملون DAPI. تشير الأسهم إلى الخلايا الحاوية على gDNA متكتل في النواة وهو ما يشير إلى بدأ استموات الخلايا.

كما لوحظ باستخدام الصباغ PI تشدّف النوى الخلوية إلى نوى متعددة بتأثير المعالجة بكل من المركبين يوتا ولامدا كاراجينان والذي يظهر واضحاً في الشكل 28.

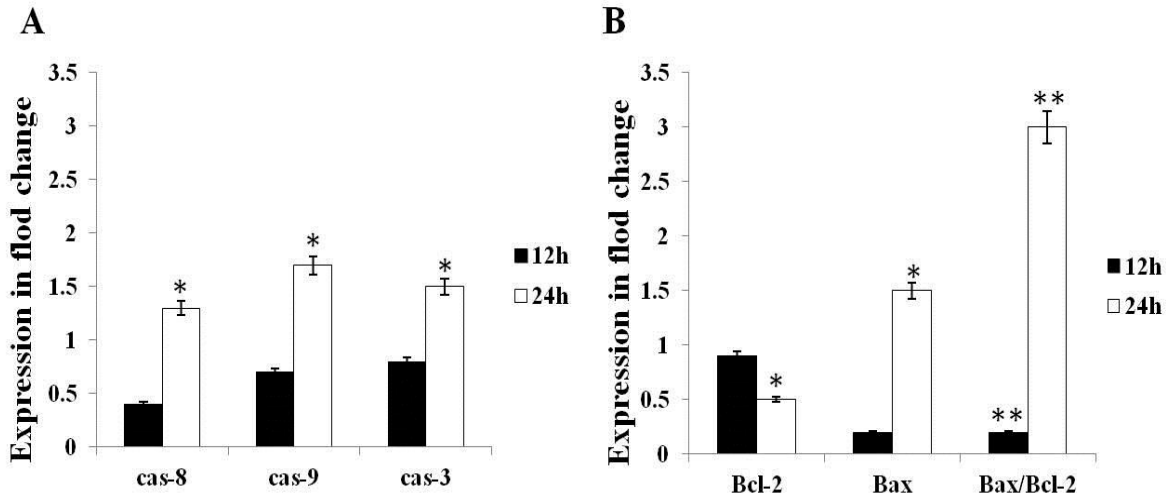


الشكل (28): صور مجهرية باستخدام مجهر الفلورة للخلايا MDA-MB-231 المعالجة بالمركبين يوتا ولامدا كاراجينان والملونة بصباغ PI. عولجت الخلايا بالمركبين يوتا ولامدا كاراجينان مدة 24 ساعة. تشير الأسهم إلى الخلايا الحاوية نوى متشدفة.

7-2-3 تغيير التعبير المورثي للمورثات النازمة للموت الخلوي المبرمج:

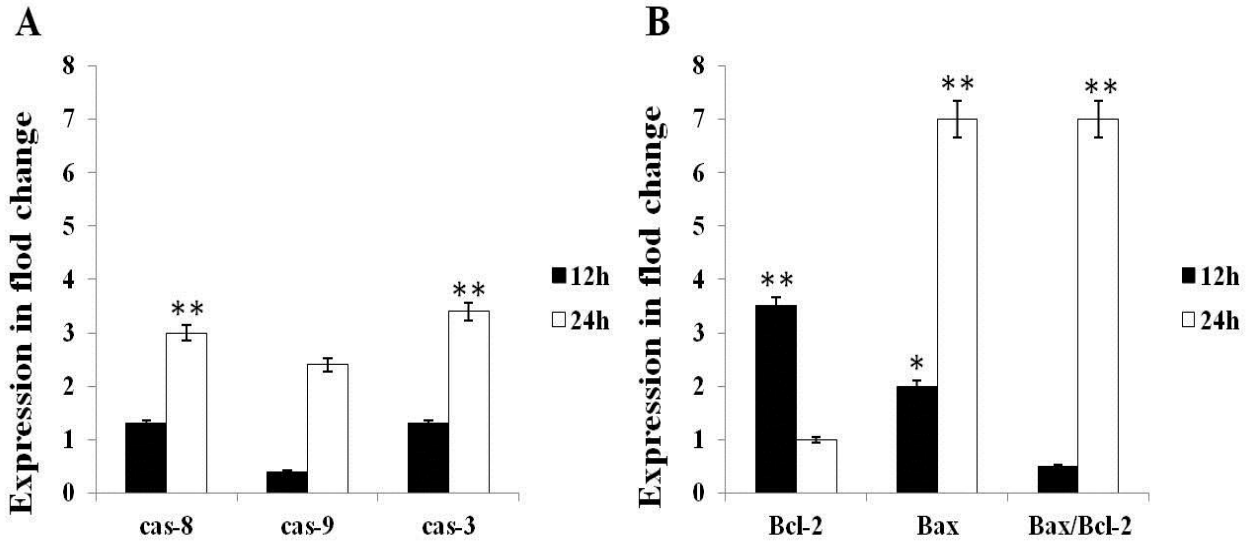
عولجت الخلايا بالمركبين يوتا ولامدا كاراجينان كل على حدى خلال فترتين زمنيتين 12 و 24 ساعة بالتراكيز الموافقة لقيمة IC_{50} لكل مركب، تم بعدها دراسة تغير كمية التعبير المورثي بين الخلايا المعالجة والخلايا الشاهدة وذلك لأهم المورثات النازمة لمسار الموت الخلوي المبرمج (*Caspase-8*, *Caspase-9*, *Caspase-3*, *Bax*, *Bcl-2*).

بينت النتائج تغير في التعبير المورثي بتأثير المعالجة بالمركب يوتا كاراجينان ويزداد هذا التغير بازدياد زمن المعالجة، إذ ازداد التعبير عن المورثات المفتاحية المميزة لبداية تفعيل مسار الموت الخلوي المبرمج وهي *Caspase-3*, *Caspase-9*, *Caspase-8* إلى القيم 1.3، 1.7، 1.5 ضعف على الترتيب بعد المعالجة مدة 24 ساعة بالمقارنة مع المعالجة مدة 12 ساعة حيث بلغت القيم 0.4، 0.7، 0.8 ضعف على الترتيب (الشكل 29A)، بالإضافة لاختلال التوازن في التعبير عن المورثتين *Bax/Bcl-2*، فقد انخفض التعبير عن المورثة *Bcl-2*، إذ بلغ 0.9 ضعف بعد المعالجة مدة 12 ساعة وانخفض إلى 0.5 ضعف بعد 24 ساعة في حين ازداد التعبير عن المورثة *Bax* بشكل واضح، وبلغ 0.2 ضعف بعد المعالجة مدة 12 ساعة وازداد إلى 3.5 ضعف بعد المعالجة 24 ساعة (الشكل 29B) مما يعطي دليلاً على مرور مسار الموت الخلوي المبرمج عبر الميتوكوندريا كما هو موضح في المقدمة.



الشكل (29): تأثير المركب يوتا كاراجينان في تغيير التعبير المورثي للمورثات المرتبطة بالموت الخلوي المبرمج بتغير زمن المعالجة. (A) تغيير التعبير عن المورثات المفتاحية لمسار الموت المبرمج (*Caspase-8*, *Caspase-9*, *Caspase-3*)، (B) اختلال التوازن في التعبير عن المورثات (*Bcl-2*, *Bax*). عولجت الخلايا بالتركيز 25 ميكرومول مدة 12-24 ساعة من المركب يوتا كاراجينان. تمت مقارنة التغير في التعبير المورثي مع المورثة المرجعية *GAPDH*. عُبر عن كمية التغير في التعبير المورثي بمرات الزيادة (expression in fold change) بالمقارنة مع الخلايا الشاهدة وحسب المتوسط ونسبة الخطأ من مجموع ثلاثة تجارب مستقلة.

أما بالنسبة للمركب لامدا كاراجينان فقد بدأ تأثيره أكثر وضوحاً في تغير التعبير المورثي للمورثات السابقة، فقد بلغ التعبير عن المورثات *Caspase-3*, *Caspase-9*, *Caspase-8* القيم 1.3، 0.4، 1.3 ضعف على الترتيب بعد المعالجة مدة 12 ساعة وازداد إلى 3، 2.4، 3.4 ضعف بعد المعالجة مدة 24 ساعة (الشكل 30A)، بالإضافة لاختلال التوازن في نسبة التعبير عن المورثتين *Bax/Bcl-2*، فقد انخفض التعبير عن المورثة *Bcl-2* من 3.5 ضعف عند المعالجة مدة 12 ساعة إلى 1 ضعف بعد المعالجة مدة 24 ساعة في حين ازداد التعبير عن المورثة *Bax* من 2 ضعف بعد المعالجة مدة 12 ساعة إلى 7 أضعاف بعد المعالجة مدة 24 ساعة (الشكل 30B).



الشكل (30): تأثير المركب لامدا كاراجينان في تغير التعبير المورثي للمورثات المرتبطة بالموت الخلوي المبرمج بتغير زمن المعالجة. (A) تغير التعبير عن المورثات المفتاحية لمسار الموت المبرمج (*Caspase-8*, *Caspase-9*, *Caspase-3*)، (B) اختلال التوازن في التعبير عن المورثات (*Bcl-2*, *Bax*). عولجت الخلايا بالتركيز 12.5 ميكرومول مدة 12-24 ساعة من المركب لامدا كاراجينان. تمت مقارنة التغير في التعبير المورثي مع المورثة المرجعية *GAPDH*. عُبر عن كمية التغير في التعبير المورثي بمرات الزيادة (expression in fold change) بالمقارنة مع الخلايا الشاهدة وحسب المتوسط ونسبة الخطأ من مجموع ثلاثة تجارب مستقلة.

الفصل الرابع

المناقشة

أنجز هذا العمل على مرحلتين: في المرحلة الأولى درس التأثير الحيوي للمستخلص ESC المحضر مسبقاً من الطحلب الأحمر *Laurencia papillosa* والذي بينت الدراسة الطيفية احتواءه بشكل رئيس على مركبات الكاراجينان على الخط خلوي T98G (الخلايا السرطانية الدبقية البشرية)، وفي المرحلة الثانية درس التأثير الحيوي للمكونات الرئيسية للمستخلص ESC بعد الحصول عليها بواسطة الكروماتوغرافيا التحضيرية وهي الكابا واليوتا واللامدا كاراجينان على الخط الخلوي MDA-MB-231 (الخلايا السرطانية الثديية البشرية).

بينت نتائجنا في كلا مرحلتي العمل انخفاض عيوشية الخلايا T98G بعد المعالجة بالمستخلص ESC، وعيوشية الخلايا MDA-MB-231 بعد المعالجة بالمكونات يوتا ولامدا كاراجينان وذلك بشكل يعتمد على التركيز ومدة المعالجة، كما ترافق انخفاض العيوشية مع ملاحظات مجهرية تمثلت في تغيرات في شكل الخلايا وانخفاض في تعدادها.

نجد توافقاً كبيراً بمقارنة هذه النتائج مع نتائج أبحاث أخرى من نفس المجال، إذ أكدت الكثير من الأبحاث على الدور الهام لمستخلصات الطحالب البحرية وللمركبات الحيوية المنقاة منها في خفض العيوشية الخلوية للخلايا السرطانية [67, 68]. فمثلاً، تبين انخفاض العيوشية الخلوية لخطين خلويين سرطانيين هما K562 (خلايا سرطان الدم) و Daudi (خلايا سرطانية لمفاوية)، بتأثير المعالجة بالمستخلص المائي للطحلب البني *Sargassum oligocystum* [67]، وبينت دراسة أخرى قدرة المركب *sargequinoic acid* المعزول من هذا الطحلب على تحريض موت خلوي مبرمج في الخلايا MDA-MB-231 [40]. واستطاع المركب *pheophorbide a* المستخلص من الطحلب البحري الأحمر *Grateloupia elliptica* خفض العيوشية الخلوية للخلايا الدبقية السرطانية U87MG وتحريض تغير شكل الخلايا المعالجة من الشكل المغزلي إلى الشكل الكروي [68].

تعد متعددات السكاكر المكبرته من أهم المركبات ذات الفعالية الحيوية المتوفرة في الخلاصات الطحلبية والتي أشارت لها العديد من الدراسات، وكما ذكرنا سابقاً استطاع فريق العمل عزل ثلاث أنماط منها وهي كابا ويوتا ولامدا كاراجينان من المستخلص ESC المحضر من الطحلب الأحمر *L.papillosa*، وبيئنا في هذا البحث الدور الحيوي لهذه الأنماط من السكاكر المكبرته، إذ كان للمدا ويوتا كاراجينان الفعالية

الحيوية الأكبر في خفض عيوشة الخلايا MDA-MB-231، بينما لم يكن لهما أي أثر على الخلايا للمفاوية الطبيعية.

توافقت هذه النتائج مع نتائج العديد من الدراسات التي اهتمت بالأثر الحيوي لهذه المركبات على الخطوط الخلوية المختلفة، فقد أشارت إحداها إلى انخفاض العيوشية الخلوية لخلايا سرطان الثدي للخط الخلوي MCF-7 بتأثير المركب يوتا كاراجينان التجاري [69]. وقد استطاع المتعدد السكري phycocyanin المستخلص من الطحلب البحري الأحمر *Porphyra yezoensis* خفض عيوشية الخلايا لأربع خطوط خلوية مختلفة وهي MCF-7، HO-8910، وK562، وSMMC-7721 [70]. كما كان للمتعدد السكري المكبرت Fucoidan المستخلص من النوع *Saccharina japonica* المنتمي إلى الطحالب البنية أثراً مماثلاً في خلايا سرطان الثدي T-47D [71] وخلايا سرطان الكولون للخطين الخليين HCT116 وHT-29 بينما لم يكن له أي أثر على الخلايا الظهارية الطبيعية من النمط FHC [45, 71].

بينت دراستنا عدم وجود أثر لمركب الكابا كاراجينان في العيوشية الخلوية لخلايا MDA-MB-231 ويمكن تفسير ذلك بارتباط الفعالية الحيوية لهذه المركبات بدرجة الكبرته وبمواقعها، إذ تزداد الفعالية مع زيادة درجة الكبرته وهذا ما أشارت إليه دراسات سابقة [53]، مع العلم أن مركب الكابا كاراجينان هو أقل مركبات الكاراجينان من حيث الكبرته بالمقارنة مع المركبين الآخرين.

تشير العديد من الأبحاث إلى أهمية دراسة استجابة الخلايا السرطانية تجاه المركبات المستخدمة في المعالجة ومنها السكاكر المكبرته، إذ تؤكد هذه الدراسات على أن أولى استجابات الخلايا السرطانية لأي ضرر ناجم عن المعالجة تكون من خلال تفعيل نقاط التفتيش في الدارة الخلوية (Checkpoints) بهدف تحريض توقف هذه الدارة [72]، فمثلاً أشارت إحدى الدراسات إلى توقف الدارة الخلوية وتراكم الخلايا في الطور G2-M عند معالجة الخلايا الظهارية المعوية البشرية بمركب لامدا كاراجينان [73]، في حين بيّنت دراسة أخرى توقف الدارة الخلوية في الطور G1 وتراكم الخلايا الوحيدات للخط الخلوي THP-1 في هذا الطور بنتيجة معالجتها بمركب اليوتا كاراجينان [74]، وكان هذا الأثر متوافق مع أثر لوحظ في دراسة سابقة لفريق العمل أُثبت فيها تراكم خلايا سرطان الثدي MDA-MB-231 بالمستخلص ESC في الطور G1 [75].

بينما بينت دراستنا الحالية تراكم خلايا الخطين الخلويين T98G وMDA-MB-231 في الطور Sub-G1 بنتيجة المعالجة، وينتج عادة تراكم الخلايا في هذا الطور بنتيجة حدوث ضرر في مادتها الجينية وتشدف DNA النووي، والذي يعد المؤشر الرئيس للموت الخلوي المبرمج [76]. دعمت هذه النتيجة في البداية بالفحص المجهرى للخلايا المعالجة إذ لاحظنا في دراستنا حدوث تغيرات عميقة طرأت على نوى الخلايا المعالجة، والتي تمثلت بتكثف DNA وتشدف نواة كل خلية إلى نوى متعددة، وهذا ما توافق مع دراسات سابقة أظهرت تغيرات مماثلة في نوى خلايا البطانة الوعائية للوريد السري HUVEC ناتجة عن تأثير مركب لامدا كاراجينان [66].

يعد الموت الخلوي المبرمج هدفاً أساسياً للعديد من الأبحاث في مجال علاج السرطان والقضاء على الخلايا الورمية [77]، وقد استطعنا في هذه الدراسة كشف هذا النمط من الموت الخلوي في الخلايا السرطانية المعالجة بمركبات الكاراجينان منذ مرحله الأولى عن طريق ارتباط بروتين Annexin-V الموسوم إلى جزيئات فوسفاتيديل السيرين التي تنقلب إلى السطح الخارجي للغشاء السيتوبلازمي في المراحل المبكرة للموت الخلوي المبرمج. تم في العديد من الدراسات السابقة إثبات ارتباط هذه العملية بتفعيل بروتينات الكاسباز، التي تقوم بدورها بتفعيل جزيئات Xkr8 المسؤولة عن حركة انقلاب فوسفاتيديل سيرين. لهذه العملية أهمية كبيرة في تسهيل تعرف الخلايا البالعة على الخلايا غير الطبيعية بالتالي تسهيل عملية البلعمة والتخلص منها دون إثارة استجابات مناعية التهابية مؤذية [78].

تبين مجمل نتائج الدراسة الحالية أن لمركبي لامدا ويوتا كاراجينان المستخلصة من الطحلب *L. papillosa* قدرة على قتل الخلايا السرطانية المعالجة من خلال تفعيل آليات الموت الخلوي المبرمج، وهذه النتيجة تتوافق كلياً مع نتائج دراسة تثبت دور المركب لامدا كاراجينان في تحريض الموت الخلوي المبرمج في خلايا البطانة الوعائية للوريد السري HUVEC [66, 79]، كما تتوافق مع نتائج سابقة لفريق العمل أظهرت قدرة المستخلص ESC على تفعيل الموت الخلوي المبرمج في خلايا سرطان الثدي MDA-MB-231، بالإضافة لقدرته على تفعيل مسارات توقف الدارة الخلوية [75, 80] والذي يمثل سبباً آخر لانخفاض العيوشية الخلوية الملاحظة في هذه الدراسة، هذا التأثير لم يلحظ في دراستنا عند استعمال المركبات المنقاة مما يعكس قدرة المركب النقي على تفعيل آلية خلوية محددة بعكس المستخلص الخام القادر على تفعيل آليات خلوية مختلفة والتي يمكن أن تعود لوجود المركبات المختلفة المكونة للمستخلص الطحلي واختلاف نسب المركبات الفعالة. بينما اختلفت هذه النتيجة مع نتائج دراسات سابقة تم ذكرها آنفاً [73] والتي

أظهرت توقف الدارة الخلوية في أطوار مختلفة بحسب النمط الخلوي، مما يعكس اختلاف آلية استقبال الأنماط الخلوية المختلفة لمركبات الكاراجينان.

بالرغم من إثبات طبيعة الموت في دراستنا الحالية إلا أنه كان من الضروري دراسة مسار نقل الإشارة ومقارنته مع السبل الإشارية المدروسة سابقاً للموت الخلوي المبرمج.

قدمت نتائج كل من تقانات قياس التدفق الخلوي و RT-qPCR تصوراً للسبيل الخلوي الذي يمكن تفعيله في الخلايا السرطانية T98G و MDA-MB-231 بعد المعالجة بالمستخلص ESC أو بالمكونين يوتا ولامدا كاراجينان، إذ تشير الدراسات الموصّفة لسبل الموت الخلوي المبرمج المختلفة إلى إمكانية بدء هذه السبل بتفعيل أحد مستقبلات الموت على سطح الخلية مما يؤدي لتفعيل مجموعة من بروتينات الكاسبيزات، أولها CASPASE-8 والذي يعد تفعيله بمثابة شرارة انطلاق لتفعيل شلال من البروتينات الهامة في نقل إشارة الموت الخلوي المبرمج حتى الوصول للبروتين المستقل effector وهو البروتين CASPASE-3 [81]، وقد توافقت نتائجنا مع هذا المخطط العام إذ تبين تفعيل كل من *Caspase-3* و *Caspase-8* و *Caspase-9*، كما توافقت هذه النتائج مع نتائج دراسة حديثة أظهرت قدرة مركب لامدا كاراجينان على تحريض الموت الخلوي المبرمج المعتمد على تفعيل البروتين CASPASE-3 في خلايا سرطاني الجلد B16-F10 والثدي 4T1 المعالجة والمغترسة تجريبياً في فأر مضعف مناعياً [82].

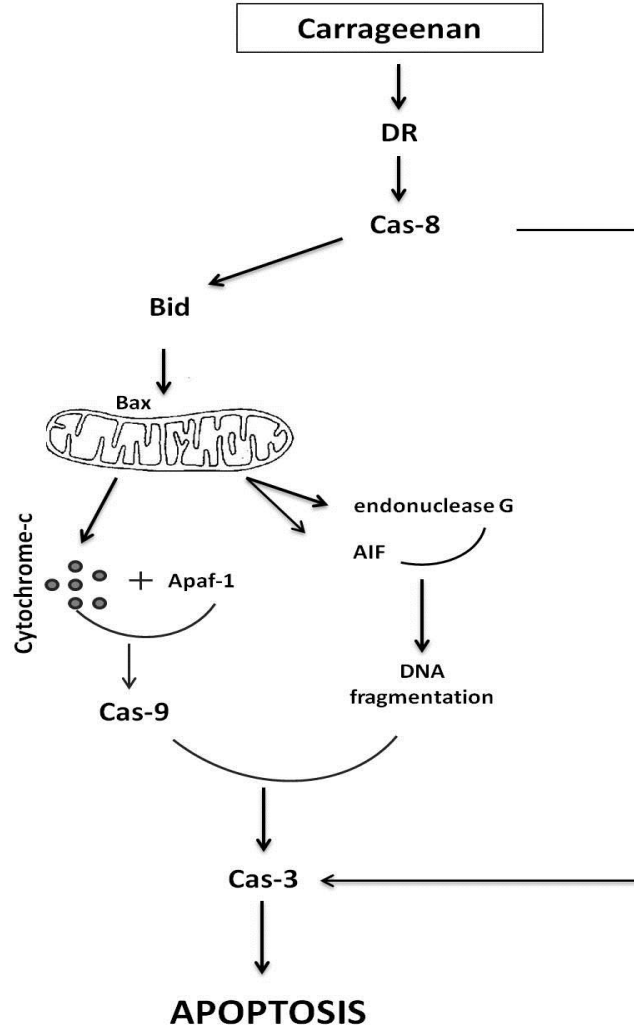
بينت نتائج دراسة حديثة قدرة المتعدد السكري المكبرت G19 المستخلص من الطحلب الأحمر *Grateloupia filiciina* والقريب في بنيته الكيميائية من الكاراجينان على تفعيل موت خلوي مبرمج في الخلايا الدبقية السرطانية U87MG وفق سبيل خلوي آخر معتمد على المورثة *p53* [83]، وهذا ما قد يكون مختلفاً مع السبيل الخلوي المفعّل في كلا الخططين الخلويين T98G و MDA-MB-231 المستعملين في هذه الدراسة إذ أن المورثة *p53* طافرة فيهما مما استدعى سبل بديلة غير معتمدة على وجودها [84, 85].

تبين الدراسات المرجعية أن لـ CASPASE-8 إمكانية في تفعيل بروتين BID والذي يرتبط بشكل مباشر إلى البروتين BAX ويحوّله إلى الشكل الفعّال محدثاً اختلال في التوازن في التعبير الجيني بين كل من BAX و BCL-2، وهذا ما بدا واضحاً في نتائجنا. عادة ما يؤثر اختلال التوازن هذا على أغشية الميتوكوندريا مؤدياً للفظ السيوكروم (C) من الميتوكوندريا وكل من: العامل AIF (المساهم في تكثيف DNA) والنكلياز الداخلية G G endonuclease (المساهمة في تشديف DNA) [86, 87] مما يؤدي في

نهاية الأمر إلى تكثف ومن ثم تشدّف DNA وهذا ما توافق مع نتائج التشدّف النووي الملاحظ في هذه الدراسة والموضح في الأشكال (27 و 28). ومن جهة أخرى يرتبط السيٲوكروم (C) الذي لُفظ من الميتوكوندري إلى السيٲوبلازما بالعامل Apaf-1 مما يفعل البروتين CASPASE-9 والذي يقوم بدوره بتفعل معزز للبروتين CASPASE-3 [88] [89] وينتهي عادة هذا السبيل بتفعل N-Gelsolin الذي يقوم بتخريب الهيكل السيٲوبلازمي الخلوي من خلال تحريض قطع خيوط الأكتين وبالتالي تشدّف سيٲوبلازمي لاحق للتشدّف النووي مما يؤدي لتشكل جسيمات الموت الخلوي المبرمج [90].

تمكنا مقارنة مجمل النتائج التي تم التوصل إليها في دراستنا مع الدراسات المرجعية حول الموت الخلوي المبرمج من وضع تصور عن الآلية الجزيئية التي يمكن أن تستعملها مركبات الكاراجينان في تحريض استموات خلايا سرطان الثدي MDA-MB-231 (الشكل 31).

أخيراً اتجهت الدراسات الحديثة لمعالجة مركبات الكاراجينان كيميائياً لتشكيل سلاسل سكرية مكبرته قصيرة واختبار تأثيرها على الخلايا السرطانية، حيث تبين ازدياد الفعالية الخلوية المثبّطة لنمو الخلايا السرطانية والمحرضة للموت الخلوي المبرمج لكل من المركبات كبا ويوتا كاراجينان بانخفاض طول السلاسل السكرية [91] كما تبين أن السبيل الخلوي للموت المبرمج المحرض في خلايا سرطان عظمي نقوي بشري بتأثير يوتا كاراجينان قصير السلاسل، معتمد على تثبيط بروتينات Wnt/ β Catenin [92] مما يشير إلى تفعل هذه السلاسل القصيرة سبلاً إشارية محرضة للموت المبرمج مختلفة عن تلك الملاحظة في دراستنا.



الشكل 31: مخطط ترسيمي للآلية المقترحة لتفعيل آليات الموت الخلوي المبرمج بتأثير المركبات يوتا ولامدا كاراجينان.

بنتيجة هذا العمل تم إثبات الفعالية الحيوية للمستخلصات الطحلبية والمركبات يوتا ولامدا كاراجينان المنقاة منها على الخلايا السرطانية وذلك من خلال القدرة على خفض عيوشيتها وتحريض آليات الموت الخلوي المبرمج فيها وفق سبيل خلوي يبدأ بتفعيل *CASPASE-8* واختلال التوازن في التعبير الجيني بين المورثتين *BAX* و *BCL-2* مما ينتج عنه لفظ السيتوكروم (C) وجزيئات أخرى إلى السيتوبلازما موديةً إلى تشدق DNA ومن ثم تشكل أجسام الموت الخلوي المبرمج.

الفصل الخامس
الاستنتاجات والمقترحات

1-5 الاستنتاجات:

- بين البحث قدرة المستخلص ESC لطحلب *Laurencia papillosa* الغني بالمتعددات السكرية المكبرته على خفض العيوشية الخلوية للخلايا الدبقية البشرية السرطانية T98G، بالإضافة لقدرة كل من المركبات يوتا ولامدا كاراجينان المنقاة منه على خفض العيوشية الخلوية لخلايا سرطان الثدي MDA-MB-231.
- أثبتت النتائج أن سبب انخفاض العيوشية الخلوية في كلا الحالتين يعود إلى تفعيل آليات الموت الخلوي المبرمج في خلايا كلا الخطين الخلويين.
- حددت المورثات الرئيسية المشتركة في السبيل الجزيئي للموت الخلوي المبرمج المُفَعَّل بتأثير كلاً من المستخلص والمركبات يوتا ولامدا كاراجينان، حيث أُثبت أن هذا السبيل يُفَعَّل بواسطة الكاسبيزات وباشتراك الميتوكوندريا.

2-5 المقترحات:

تعد المتعددات السكرية المكبرثة من المركبات الواعدة في مجال تطوير أدوية لمعالجة الأورام السرطانية لذلك فمن المقترح استكمال الدراسات المستقبلية في العمل على:

- زيادة الأثر الحيوي لهذه المركبات من خلال تعديلها كيميائياً، أن كان من حيث الوزن الجزيئي أو من حيث نسبة الكبرثة.
- تحري عن آلية التأثير الخلوي من خلال الكشف عن هوية المستقبل الذي يمكن أن ترتبط به هذه المركبات إلى سطوح الخلايا الورمية لتتجز أثرها الحيوي.
- فهم أعمق للسبيل الخلوي المفعّل بواسطة هذه المركبات والمؤدي إلى الموت الخلوي المبرمج عن طريق استهداف المورثات المرشحة لتؤدي دوراً في هذه الآلية وذلك من خلال اسكاتها باستعمال تقانات التداخل مع RNA (RNA interference).
- اختبار الارتباط الإنتقائي لمتعددات السكاكر المكبرثة بالخلايا السرطانية ومن ثم العمل على ربطها بمركبات تفيد في العلاج مثل الجزيئات الممغنطة كجزيئات أكسيد الحديد Fe_2O_3 أو جزيئات الذهب.
- دراسة الأثر الحيوي المفعّل بتأثير المعالجة بهذه المركبات في الكائن الحي (*In vivo*) ضمن نماذج حيوانية كالفئران.



تأثير الكاراجينان المكثرت المستخلص من الطحلب *Laurencia papillosa*
على تثبيط نمو الخلايا البشرية الدقيقة السرطانية T98G
Anti-proliferative effect of sulfated carrageenan extracted from *Laurencia papillosa* on T98G glioblastoma cancer cells

ماري جزارة¹, أحمد غنام², سادي سكرية¹, حسام مراد²
¹ قسم علم الحياة الحيوانية – كلية العلوم، جامعة نمىق
² قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية السورية

المخلص:

تتميز البيئة البحرية بالتنوع الحيوي الكبير مما يشكل مصدراً للكثير من المركبات الحيوية الهامة في التطبيقات الصيدلانية والعلاجية. ربطت العديد من الدراسات انخفاض حالات الإصابة بالسرطان باستهلاك الأغذية البحرية خصوصاً الطحالب البحرية الغنية بالمتعددات السكرية المكثرة. في هذا البحث، درس الأثر الحيوي لمستخلص ESC (extracted sulfated carrageenan) المحضّر من الطحلب البحري الأحمر *Laurencia papillosa* على الخلايا السرطانية T98G من خلال تحري أثره في تثبيط النشاط الحيوي للخلايا. قدمت الدراسة مجموعة من المؤشرات على أن المستخلص يحرض على الموت الخلوي المبرمج (Apoptosis) من خلال تكثف النواة وتشدّد جزئيات DNA. بينت دراسة التغير في التعبير المورثي، باستخدام تقنية تفاعل البلمرة بالزمن الحقيقي (qPCR)، أن المستخلص يحرض المسار الخلوي الخارجى للمورثات الناظمة للموت الخلوي المبرمج (*Caspase-3, Caspase-8*). كما لوحظ، باستخدام تقنية التدفق الخلوي (Flow Cytometry)، زيادة في تعبير البروتين النشط (ACTIVE-CASPASE-3) بعد المعالجة. تشير هذه النتائج إلى أن المستخلص ESC، بما يحتويه من سكريات مكثرة، يعتبر مادة واعدة لاستهداف انقسام وانتشار الخلايا الدقيقة السرطانية

The high biodiversity of marine ecosystems makes it a good source of numerous bioactive molecules useful in pharmacological and therapeutic applications. Many studies have reported that marine algae consumption is linked to low cancer incidences in countries that traditionally consume marine products. Seaweeds are considered as a rich source of sulphated polysaccharides such as carrageenans. In this study, the biological activity of sulphated carrageenan (ESC) extracted from the red alga *Laurencia papillosa* on T98G cancer cell line was explored. We studied the bio-effect of ESC and apoptosis on T98G cells through nuclear condensation and DNA fragmentation. Gene expression study for caspase-3 and caspase-8 was measured using qPCR after ESC treatment. This result was supported by flow cytometry technique which revealed an increase in ACTIVE CASPASE-3 protein levels in treated cells. The presented data demonstrated that ESC is considered as a promising compound which could target the proliferation of glioblastoma cells.

الكلمات المفتاحية: Key Words: الخلايا البشرية الدقيقة السرطانية glioblastoma cells، الطحالب الحمراء red alga، السكريات المكثرة، *Laurencia papillosa*، السكريات المكثرة، sulphated polysaccharides، الانقسام الخلوي proliferation، الموت الخلوي المبرمج Apoptosis.

Antiproliferative activity of λ -carrageenan through the induction of apoptosis in human breast cancer cells

Marie Jazzara¹, Ahmed Ghannam², Chadi Soukkarieh¹ and Hossam Murad^{2*}

¹ Faculty of Sciences, Damascus University, Damascus, Syria

² Department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy Commission of Syria (AECS), P. O. Box 6091, Damascus, Syria

* Corresponding author: Department of Molecular Biology and Biotechnology

Abstract

Sulfated Polysaccharides (SPs) are known for their diverse origins, chemical structure and biological activities, which explain their pharmacological and therapeutic importance. Various studies have indicated the notable ability of SPs to affect the proliferation cancer cells. In this study, we evaluated the biological effects of λ -carrageenan, a highly SP, extracted from the red seaweed *Laurencia papillosa*, on MDA-MB-231 cancer cell line. This SP was previously characterized and its sulfation degree was determined. The current study has shown that λ -carrageenan inhibits the proliferation of MDA-MB-231 cells and induced cell death through DNA condensation and nuclear fragmentation. Moreover, our results indicated that the signaling pathway of λ -carrageenan inhibits the proliferation of MDA-MB-231 cells by upregulating the pro-apoptotic genes *caspase-8*, *caspase-9*, *caspase-3* and resulting in increasing the levels of active caspase-3 protein. Furthermore, This SP had the capacity to affect the mitochondrial stability by altering the *bax/bcl-2* ratio of expression which conducted to the apoptosis induction. The presented results signposted that λ -carrageenan is a promising bioactive polymer which could be a potential candidate in preventing or treating breast cancer.

Keywords Antiproliferation, λ -carrageenan, apoptosis, breast cancer, MDA-MB-231.



Anti-proliferative effect of λ -carrageenan extracted from *L. papillosa* on MDA-MB-231 human breast cancer cells

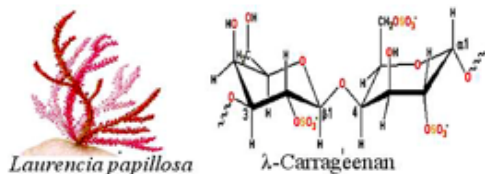
Marie Jazzara, Ahmed Ghannam, Chadi Soukkarieh and Hossam Murad*



Introduction: Marine algae are considered as a rich source of sulfated polysaccharides such as carrageenans, which may be responsible for the low incidence of cancer in countries which traditionally consume high levels of marine organisms.

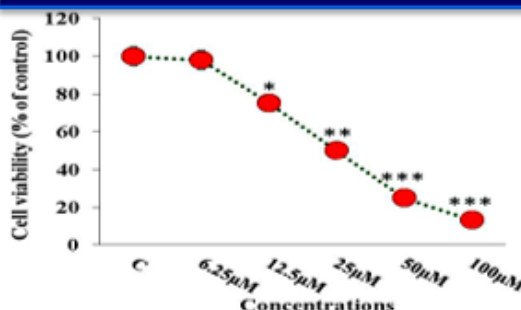
Cancer is a major cause of death worldwide. Therefore, we targeted the discovery of new molecules with anti-cancer activity to treat the disease.

Methods: Biological effects of the polysaccharides were evaluated in MDA-MB-231 cells using XTT assay and flow cytometry. Expression levels of key genes in the apoptotic signaling pathway were tracked using quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Optical and fluorescent microscopy.

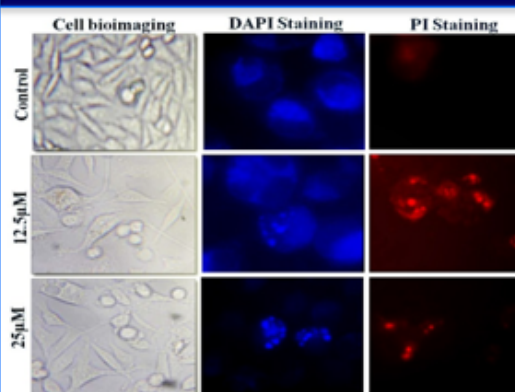


Results: λ -carrageenans & MDA-MB-231

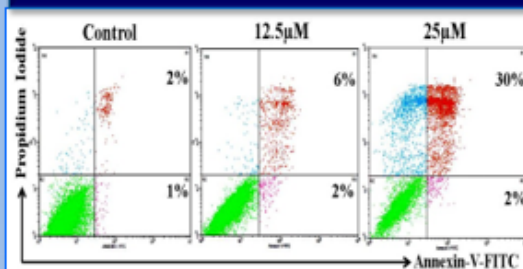
XTT assay: Anti-proliferative effect of λ -carrageenan



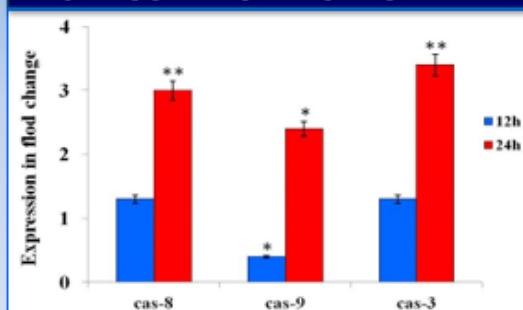
Morphological changes, DNA condensation and nuclear fragmentation



Flow cytometry: Apoptosis induced in MDA-MB-231 cells



RT-qPCR: Apoptosis is dependent upon caspases activation



Conclusion: λ -carrageenan has shown anti-proliferative activity in human MDA-MB-231 cells via the promotion of caspases-dependent apoptosis. This study exemplifies that λ -carrageenan possess both common and distinctive anti-carcinogenic mechanisms, which can further develop into an effective chemotherapeutic agents in the treatment of human breast cancer.

*(hmurad@aec.org.sy)

الفصل السادس

المراجع

1. Nobili, S., et al., *Natural compounds for cancer treatment and prevention*. Pharmacol Res, 2009. **59**(6): p. 365-78.
2. Blanpain, C., *Tracing the cellular origin of cancer*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(2): p. 126-34.
3. Polak, P., et al., *Cell-of-origin chromatin organization shapes the mutational landscape of cancer*. Nature, 2015. **518**(7539): p. 360-4.
4. Anand, P., et al., *Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes*. Pharm Res, 2008. **25**(9): p. 2097-116.
5. Inetianbor, J.E., J.M. Yakubu, and S.C. Ezeonu, *EFFECTS OF FOOD ADDITIVES AND PRESERVATIVES ON MAN- A REVIEW*. Asian Journal of Science and Technology, 2015. **6**.
6. Parsons, A., et al., *Influence of smoking cessation after diagnosis of early stage lung cancer on prognosis: systematic review of observational studies with meta-analysis*. BMJ, 2010. **340**: p. b5569.
7. McLaughlin-Drubin, M.E. and K. Munger, *Viruses associated with human cancer*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1782**(3): p. 127-50.
8. Sigurdson, A.J. and I.M. Jones, *Second cancers after radiotherapy: any evidence for radiation-induced genomic instability?* Oncogene, 2003. **22**(45): p. 7018-27.
9. Poirier, M.C., *Chemical-induced DNA damage and human cancer risk*. Discov Med, 2012. **14**(77): p. 283-8.
10. Malcolm, R.A., *Cancer*. 2001.
11. Sudhakar, A., *History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods*. J Cancer Sci Ther, 2009. **1**(2): p. 1-4.
12. Avgeropoulos, N.G. and T.T. Batchelor, *New treatment strategies for malignant gliomas*. Oncologist, 1999. **4**(3): p. 209-24.
13. Lemke, D.M., *Epidemiology, diagnosis, and treatment of patients with metastatic cancer and high-grade gliomas of the central nervous system*. J Infus Nurs, 2004. **27**(4): p. 263-9.
14. Ware, M.L., M.S. Berger, and D.K. Binder, *Molecular biology of glioma tumorigenesis*. Histol Histopathol, 2003. **18**(1): p. 207-16.
15. Korzhhevskii, D.E., V.A. Otellin, and L.F. Litvinchuk, *[Morphological and cytochemical properties of the human glioblastoma T98G cells during the monolayer culture]*. Morfologiya, 2003. **123**(2): p. 39-42.
16. Weigelt, B., J.L. Peterse, and L.J. van 't Veer, *Breast cancer metastasis: markers and models*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(8): p. 591-602.
17. Donepudi, M.S., et al., *Breast cancer statistics and markers*. J Cancer Res Ther, 2014. **10**(3): p. 506-11.

18. Lamber, E.P., A.A. Horwitz, and J.D. Parvin, *BRCA1 represses amphiregulin gene expression*. *Cancer Res*, 2010. **70**(3): p. 996-1005.
19. Chavez, K.J., S.V. Garimella, and S. Lipkowitz, *Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer*. *Breast Dis*, 2010. **32**(1-2): p. 35-48.
20. Festjens, N., T. Vanden Berghe, and P. Vandenabeele, *Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1757**(9-10): p. 1371-87.
21. Gozuacik, D. and A. Kimchi, *Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism*. *Oncogene*, 2004. **23**(16): p. 2891-906.
22. Chaabane, W., et al., *Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2013. **61**(1): p. 43-58.
23. Wong, R.S., *Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011. **30**: p. 87.
24. Fulda, S. and K.M. Debatin, *Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy*. *Oncogene*, 2006. **25**(34): p. 4798-811.
25. Pommier, Y., et al., *Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks*. *Oncogene*, 2004. **23**(16): p. 2934-49.
26. Liu, H., L. Lv, and K. Yang, *Chemotherapy targeting cancer stem cells*. *Am J Cancer Res*, 2015. **5**(3): p. 880-93.
27. Safarzadeh, E., S. Sandoghchian Shotorbani, and B. Baradaran, *Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment*. *Adv Pharm Bull*, 2014. **4**(Suppl 1): p. 421-7.
28. Chiu, T.L. and C.C. Su, *Curcumin inhibits proliferation and migration by increasing the Bax to Bcl-2 ratio and decreasing NF-kappaBp65 expression in breast cancer MDA-MB-231 cells*. *Int J Mol Med*, 2009. **23**(4): p. 469-75.
29. Li, Z., et al., *Genistein induces cell apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells via the mitogen-activated protein kinase pathway*. *Toxicol In Vitro*, 2008. **22**(7): p. 1749-53.
30. Dou, X., et al., *The anti-tumor activity of Mikania micrantha aqueous extract in vitro and in vivo*. *Cytotechnology*, 2014. **66**(1): p. 107-17.
31. da Frota, M.L., Jr., et al., *Brazilian marine sponge Polymastia janeirensis induces apoptotic cell death in human U138MG glioma cell line, but not in a normal cell culture*. *Invest New Drugs*, 2009. **27**(1): p. 13-20.
32. Silva, T.H., et al., *Marine algae sulfated polysaccharides for tissue engineering and drug delivery approaches*. *Biomatter*, 2012. **2**(4): p. 278-89.
33. Jha, R.K. and X. Zi-rong, *Biomedical Compounds from Marine organisms*. *Marine Drugs*, 2004.
34. El Gamal, A.A., *Biological importance of marine algae*. *Saudi Pharm J*, 2010. **18**(1): p. 1-25.

35. de Almeida, C.L., et al., *Bioactivities from marine algae of the genus Gracilaria*. Int J Mol Sci, 2011. **12**(7): p. 4550-73.
36. IBRAHIMA, A., et al., *Active biological materials inhibiting tumor initiation extracted from marine algae*. Egyptian Journal of Aquatic Research 2005. **31**.
37. Yuan, Y.V. and N.A. Walsh, *Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds*. Food Chem Toxicol, 2006. **44**(7): p. 1144-50.
38. Moussavou, G., et al., *Anticancer effects of different seaweeds on human colon and breast cancers*. Mar Drugs, 2014. **12**(9): p. 4898-911.
39. ABIRAMI, R.G. and S. KOWSALYA, *ANTICANCER ACTIVITY OF METHANOLIC AND AQUEOUS EXTRACT OF ULVA FASCIATA IN ALBINO MICE*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2012. **4**(2).
40. de la Mare, J.A., et al., *Quinones and halogenated monoterpenes of algal origin show anti-proliferative effects against breast cancer cells in vitro*. Invest New Drugs, 2012. **30**(6): p. 2187-200.
41. Kim, A.D., et al., *Cytotoxic effect of clerosterol isolated from Codium fragile on A2058 human melanoma cells*. Mar Drugs, 2013. **11**(2): p. 418-30.
42. Costa, L.S., et al., *Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds*. Biomed Pharmacother, 2010. **64**(1): p. 21-8.
43. Jiao, G., et al., *Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae*. Mar Drugs, 2011. **9**(2): p. 196-223.
44. Kaeffer, B., et al., *Biological properties of ulvan, a new source of green seaweed sulfated polysaccharides, on cultured normal and cancerous colonic epithelial cells*. Planta Med, 1999. **65**(6): p. 527-31.
45. Kim, E.J., et al., *Fucoidan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells*. BMC Gastroenterol, 2010. **10**: p. 96.
46. Zhu, C., et al., *Fucoidan inhibits the growth of hepatocellular carcinoma independent of angiogenesis*. Evid Based Complement Alternat Med, 2013. **2013**: p. 692549.
47. Liu, J., et al., *Review for carrageenan-based pharmaceutical biomaterials: favourable physical features versus adverse biological effects*. Carbohydr Polym, 2015. **121**: p. 27-36.
48. Yoon, H.S., et al., *DEFINING THE MAJOR LINEAGES OF RED ALGAE (RHODOPHYTA) I*. Journal of Phycology, 2006. **42**(2).
49. Davis, G.D. and A.H. Vasanthi, *Seaweed metabolite database (SWMD): A database of natural compounds from marine algae*. Bioinformation, 2011. **5**(8): p. 361-4.
50. de Oliveira, L.S., et al., *New Insights on the terpenome of the red seaweed Laurencia dendroidea (Florideophyceae, Rhodophyta)*. Mar Drugs, 2015. **13**(2): p. 879-902.
51. Alarif, W.M., et al., *New antifungal cholestane and aldehyde derivatives from the red alga Laurencia papillosa*. Nat Prod Commun, 2011. **6**(12): p. 1821-4.

52. Kavita, K., V.K. Singh, and B. Jha, *24-Branched Delta5 sterols from Laurencia papillosa red seaweed with antibacterial activity against human pathogenic bacteria*. Microbiol Res, 2014. **169**(4): p. 301-6.
53. Liang, W., et al., *Effects of sulfate group in red seaweed polysaccharides on anticoagulant activity and cytotoxicity*. Carbohydr Polym, 2014. **101**: p. 776-85.
54. Usov, A.I., *Polysaccharides of the red algae*. Adv Carbohydr Chem Biochem, 2011. **65**: p. 115-217.
55. Barbeyron, T., et al., *iota-Carrageenases constitute a novel family of glycoside hydrolases, unrelated to that of kappa-carrageenases*. J Biol Chem, 2000. **275**(45): p. 35499-505.
56. Bao, H., W.S. Choi, and S. You, *Effect of sulfated modification on the molecular characteristics and biological activities of polysaccharides from Hypsizigus marmoreus*. Biosci Biotechnol Biochem, 2010. **74**(7): p. 1408-14.
57. Weiner, M.L., *Food additive carrageenan: Part II: A critical review of carrageenan in vivo safety studies*. Crit Rev Toxicol, 2014. **44**(3): p. 244-69.
58. Asanza Teruel, M.L., et al., *Response surface analysis of chlortetracycline and tetracycline production with K-carrageenan immobilized Streptomyces aureofaciens*. Enzyme Microb Technol, 1997. **21**(5): p. 314-20.
59. Borthakur, A., et al., *Prolongation of carrageenan-induced inflammation in human colonic epithelial cells by activation of an NFkappaB-BCL10 loop*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1822**(8): p. 1300-7.
60. Carlucci, M.J., et al., *Protective effect of a natural carrageenan on genital herpes simplex virus infection in mice*. Antiviral Res, 2004. **64**(2): p. 137-41.
61. Shanmugam, M. and K.H. Mody, *Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents*. 2000. **79**: p. 1672–1683.
62. Rocha de Souza, M.C., et al., *Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds*. J Appl Phycol, 2007. **19**(2): p. 153-160.
63. Chen, L.L., et al., *Exploiting antitumor immunity to overcome relapse and improve remission duration*. Cancer Immunol Immunother, 2012. **61**(7): p. 1113-24.
64. Namvara, F., et al., *Polyphenol-rich seaweed (Eucheuma cottonii) extract suppresses breast tumour via hormone modulation and apoptosis induction*. Food Chemistry, 2012. **130**(2): p. 376–382.
65. Yuan, H., et al., *Immunomodulation and antitumor activity of kappa-carrageenan oligosaccharides*. Cancer Lett, 2006. **243**(2): p. 228-34.
66. Chen, H., et al., *Ī-Carrageenan oligosaccharides elicit reactive oxygen species production resulting in mitochondrial-dependent apoptosis in human umbilical vein endothelial cells*. 2009.
67. Zandi, K., et al., *Anticancer activity of Sargassum oligocystum water extract against human cancer cell lines*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2010. **14**(8): p. 669-73.

68. Cho, M., et al., *Glioblastoma-specific anticancer activity of pheophorbide a from the edible red seaweed Grateloupia elliptica*. J Microbiol Biotechnol, 2014. **24**(3): p. 346-53.
69. Hoffman, R., W.W. Burns, 3rd, and D.H. Paper, *Selective inhibition of cell proliferation and DNA synthesis by the polysulphated carbohydrate l-carrageenan*. Cancer Chemother Pharmacol, 1995. **36**(4): p. 325-34.
70. Z., L.-X., et al., *ANTI-CANCER EFFECTS OF POLYSACCHARIDE AND PHYCOCYANIN FROM PORPHYRA YEZOENSIS*. Journal of Marine Science and Technology, 2011. **19**.
71. Vishchuk, O.S., S.P. Ermakova, and T.N. Zvyagintseva, *Sulfated polysaccharides from brown seaweeds Saccharina japonica and Undaria pinnatifida: isolation, structural characteristics, and antitumor activity*. Carbohydr Res, 2011. **346**(17): p. 2769-76.
72. Chircop, M. and D. Speidel, *Cellular stress responses in cancer and cancer therapy*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 304.
73. Bhattacharyya, S., et al., *Carrageenan induces cell cycle arrest in human intestinal epithelial cells in vitro*. J Nutr, 2008. **138**(3): p. 469-75.
74. Benard, C., et al., *Degraded carrageenan causing colitis in rats induces TNF secretion and ICAM-1 upregulation in monocytes through NF-kappaB activation*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8666.
75. Murad, H., et al., *Induction of G1-phase cell cycle arrest and caspase-3-dependent apoptosis in human breast cancer cells by Laurencia papillosa extract*. under revision.
76. Kajstura, M., et al., *Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete "sub-G1" peaks on DNA content histograms*. Cytometry A, 2007. **71**(3): p. 125-31.
77. Westhoff, M.A., et al., *A critical evaluation of PI3K inhibition in Glioblastoma and Neuroblastoma therapy*. Mol Cell Ther, 2014. **2**: p. 32.
78. Marino, G. and G. Kroemer, *Mechanisms of apoptotic phosphatidylserine exposure*. Cell Res, 2013. **23**(11): p. 1247-8.
79. Mi, T.Y., et al., *[Proliferation inhibition of lambda-carrageenan oligosaccharides on HUVEC and expression of apoptotic relevant genes]*. Yao Xue Xue Bao, 2008. **43**(5): p. 474-9.
80. Murad, H., et al., *Algal sulfated carrageenan inhibits proliferation of MDA-MB-231 cells via apoptosis regulatory genes*. Mol Med Rep, 2015. **11**(3): p. 2153-8.
81. Ashkenazi, A., *Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 420-30.
82. Luo, M., et al., *Antitumor and Adjuvant Activity of lambda-carrageenan by Stimulating Immune Response in Cancer Immunotherapy*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 11062.
83. Liu, H., et al., *Oligosaccharide G19 inhibits U-87 MG human glioma cells growth in vitro and in vivo by targeting epidermal growth factor (EGF) and activating p53/p21 signaling*. Glycobiology, 2014. **24**(8): p. 748-65.

84. Wang, X., et al., *Mutant TP53 enhances the resistance of glioblastoma cells to temozolomide by up-regulating O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase*. *Neurol Sci*, 2013. **34**(8): p. 1421-8.
85. Hui, L., et al., *Mutant p53 in MDA-MB-231 breast cancer cells is stabilized by elevated phospholipase D activity and contributes to survival signals generated by phospholipase D*. *Oncogene*, 2006. **25**(55): p. 7305-10.
86. van Loo, G., et al., *The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet*. *Cell Death Differ*, 2002. **9**(10): p. 1031-42.
87. Slee, E.A., S.A. Keogh, and S.J. Martin, *Cleavage of BID during cytotoxic drug and UV radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of Bcl-2 action and is catalysed by caspase-3: a potential feedback loop for amplification of apoptosis-associated mitochondrial cytochrome c release*. *Cell Death Differ*, 2000. **7**(6): p. 556-65.
88. Fulda, S. and K.M. Debatin, *Signaling through death receptors in cancer therapy*. *Curr Opin Pharmacol*, 2004. **4**(4): p. 327-32.
89. Salakou, S., et al., *Increased Bax/Bcl-2 ratio up-regulates caspase-3 and increases apoptosis in the thymus of patients with myasthenia gravis*. *In Vivo*, 2007. **21**(1): p. 123-32.
90. Desouza, M., P.W. Gunning, and J.R. Stehn, *The actin cytoskeleton as a sensor and mediator of apoptosis*. *Bioarchitecture*, 2012. **2**(3): p. 75-87.
91. Ariffin, S.H., et al., *Cytotoxicity effect of degraded and undegraded kappa and iota carrageenan in human intestine and liver cell lines*. *BMC Complement Altern Med*, 2014. **14**: p. 508.
92. Jin, Z., Y.X. Han, and X.R. Han, *Degraded iota-carrageenan can induce apoptosis in human osteosarcoma cells via the Wnt/beta-catenin signaling pathway*. *Nutr Cancer*, 2013. **65**(1): p. 126-31.