مجلة البصرة للعلوم الزراعية، المجلد 29 (2)، 1- 10 ،2016

تقيم أولي لتأثير الببتيد الكلايكوسيدي المعزول من الحبار .*Loligo* sp (نواعم: رأسية القدم) على خط الخلايا السرطانية Hela cell line والطبيعية REF

هيفاء عدنان الموسوي و بلسم أنيس مارينا و ضمياء قاسم سكر الفندي

قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة البصرة، البصرة، العراق

المستخلص: خلال الدراسة تم التعرف على قابلية مستخلص الحبار النقي .*Loligo* sp (كائن رخوي يعود إلى شعبة النواعم) في التأثير على نوعين من الخطوط الخلوية هما: خط خلايا سرطان عنق الرحم Hela cell lineو خط خلايا الجرذ الجنينية المولدة للألياف Rat embryo fibroblast (REF) . أوضحت القيم الناتجة ان التأثير التثبيطي لحيوية الخلايا بشكل عام كان يعتمد على تركيز المستخلص وأظهر المستخلص تثبيطاً عالياً لخط الخلايا السرطانية وبكافة التراكيز إذ كانت أعلى نسبة مئوية للتثبيط بعد 48 ساعة من تعريض الخلايا بالتركيز 1000 مايكرو غرام / مليلتر، إذ بلغت 42.79 % وكانت نسب التثبيط على خلايا Hela cell أعلى مما هو عليه في خلايا REF إذ أحدث المستخلص تثبيط على الخلايا الطبيعية ولكن بنسب أقل 20.4 % لنفس وقت التعريض والتركيز.

الكلمات المفتاحية: الحبار، المنتجات الطبيعية البحرية، خلايا Hela.

المقدمة

انتشرت بحوث المركبات البحرية الطبيعية في العالم نتيجة اعتماد الطرائق العلمية للاستفادة الكاملة من هذه المركبات الطبيعية في صناعة الأدوية الحديثة ولوفرة هذه المركبات وقلة اثارها الجانبية وإن العلاجات التقليدية لمرض السرطان مبنية وبشكل عام على أساس العلاج الجراحي والعلاج الاشعاعي والعلاج الكيمياوي أو الجميع معاً، وبشكل عام فان العلاج الجراحي والإشعاعي يستعملان في حالات الأورام الموضعية أما العلاج الكيمياوي فيستعمل في حالات انتشار المرض السرطاني في الجسم [8] ، على الرغم من فوائد هذه العلاجات في إيقاف أنتشار المرض إلا أن هذه العلاجات تمتلك تأثيرات جانبية تعود سلباً على صحة جسم الأنسان لاسيما المركبات الكيميائية والاشعاعية التي تحوي الكثير من الاثار الجانبية منها أنخفاض مستوى الحديد والمعادن في جسم المريض أو أحداث طفرات وراثية لخلايا الجسم أو أضعاف الجهاز المناعي [6]. يعد الحبر المفروز من الحبارات من المنتجات الطبيعية البحرية الفعالة حيوياً له القدرة على تحفيز وانتاج Thromboxane (مادة محفزة للتخثر) وقتل الخلايا السرطانية ورفع عدد كريات الدم البيضاء Leukocytes [14]، فضلاً عن كونه يعد مادةً مضادة للأكسدة Antioxidant ومضادة للبكتريا Antibacterial [12;16]. ينتمي حيوان الحبار الى شعبة الرخويات Mollusca وهي أحياء جانبية التناظر وذات

أجسام رخوة تتكون من رأس وكتلة أحشائية محاطة بغشاء الجبة Mantalcavityو الذي يقوم بإفراز الصدفة Shell وتركيب عضلي يشبه القدم [13]. وتقسم شعبة الرخويات الى ستة أصناف يعود الحبار إلى صنف راسية القدم Cephalopoda الذي يضم أكبر حجوم اللافقاريات التي تتراوح ما بين عدة أنجات إلى عدة أقدام مثل الاخطبوط والحبار والصدفة فيها خارجيةوا داخلية أو مفقودة والمنطقة الر أسية جيدة التكوين وكبيرة وتحمل المجسات والاذرع والعيون والمفتات [4]. وتركزت البحوث على عزل المنتجات الطبيعية البحرية الفعالة حيوياً بالخصوص الأيوض الثانوية هي المرجح الاكثر لإعطاء علاجات مضادة للأورام السرطانية Anti-cancer أكثر من النباتات الأرضية [5].

المواد وطرائق العمل

تم الحصول على الحبار *Loligo* sp. من مناطق مياه الخليج العربي في كانون الثاني 2015 وحفظت العينات في درجة حرارة 4°م لحين استخدامها في الدراسة.

الاستخلاص المائي

تم تحضير المستخلص المائي حسب الطريقة الموصوفة من قبل الحسن [2]، إذ تم وزن 250 غرام من النموذج ووضع في الخلاط الكهربائي مع ما يعادله من الماء المقطر لمدة خمس دقائق لغرض تقطيع الحيوان وطحنه بعدها ترك الخليط على المازج المغناطيسي بدرجة 4 °م، بعدها نبذ باستخدام جهاز الطرد المركزي 3000 دورة/ دقيقيه لمدة خمس دقائق ، أهمل الراسب وجفد الراشح بجهاز التجفيد Freeze dryer .

الاستخلاص باستخدام كبريتات الامونيوم 30%

تمت عملية استخلاص المستخلص المائي باستخدام االترسيب بكبريتات الامونيوم 30 % ترك الخليط على المازج المغناطيسي بدرجة 4 °م بعدها نبذ بإستخدام جهاز الطرد المركزي 3000 دورة/ دقيقيه لمدة خمس دقائق. اهمل الراسب وتم إجراء عملية الديلزة على الراشح للتخلص من الآثار الملحية لكبريتات الامونيوم وجفد بوساطة Freeze dryer وتمت بعدها عملية تنقية المستخلص الناتج بكروماتوكرافيا الترشيح الهلامي باستخدام حبيبات السيفادكس G-25.

تهيئة خطوط الخلايا السرطانية والطبيعية

تم تجهيزنا بخط خلايا سرطان عنق الرحم و خط خلايا الجرذ الجنينية المولدة للأليياف من المركز العر اقي للتقانات الاحيائية والخلوية، بغداد وتحت ظروف معقمة ثم أجريت خطوات الزرع النسيجي وحسب ما ذكر الثويني ونصيف [1].

تم تفريق محتويات وعاء الزرع النسيجي الحاوي على الخلايا السرطانية من الوسط الزرعي القديم RPMI-1640 ، ثم غسلت الخلايا بواسطة محلول دارئ الفوسفات الملحي Phosphatate Buffer Solution لأزالة الخلايا الميتة وذلك عن طريق غسلها ثلاث مرات، ثم أضيف كمية

قليلة من التربسين – فيرسين (3-2) مليلتر ثم أغلق جيداً ووضع في الحاضنة بدرجة 37م ْ ولمدة 2-3 دقيقة لأجل إعطاء فرصة لعمل التربسين – فيرسين على تحليل طبقة Monolayer الى خلايا مفردة وبعدها اخرج الوعاء وأفرغت محتوياته في أنبوبة أختبار ووضعت في جهاز الطرد المركزي 5000 دورة/ دقيقة لمدة ثلاث دقائق حيث تجمعت الخلايا بشكل كتلة في قعر الانبوب بعد أكتمال عملية الفصل، اهمل بعدها الوسط الزرعي القديم ، أضيف الوسط الزرعي الحاوي على نسبة 10 % من مصل العجل البقري وبمقدار 20 مليلتر مع احداث حركة دورانية بسيطة لآجل أزلة اكبر كمية من الخلايا الموجودة بالوعاء ، بعدها وضعت محتويات الوعاء في بيكر معقم وجهزت أطباق الزرع الخاصة المعقمة Microtitterplat الحاوية 96 حفرة كل حفرة تستوعب 300 مايكروليتر، قبل البدء بعملية الزرع في كل حفرة تمت عملية مجانسة توزيع الخلايا في الوسط الزرعي وذلك بإجراء عملية Pipetting وهي سحب ودفع الوسط الزرعي الحاوي على الخلايا بوساطة ماصة دقيقة Micropipette ولأكثر من مرة. أعيدت هذه العملية عند زراعة كل حفرة من حفر الطبق الخاص بالزرع النسيجي ، ثم وضع 0.2 مليليتر من عالق الخلايا في كل حفرة من حفر طبق الزرع (عدد الخلايا في كل حفرة مايقارب 3 × 10^4 خلية / حفرة) . وبعد الانتهاء غطي طبق الزرع بورق لاصق Parafilm وبصورة محكمة لضمان عدم حصول تلوث ووضعت الاطباق في حاضنة مجهزة ب5 % غاز ثاني أوكسيد الكاربون بدرجة حرارة 37°م لمدة 12-18 ساعة حتى التصقت الخلايا في قاع حفر الطبق.

معاملة الخلايا بالمستخلص المنقى

حضرت أربعة تراكيز مخففة بشكل مضاعف من المستخلص النقي وكانت التراكيز المخففة كالآتي: 125 و 250 و 500 و 1000 مايكروغرام/ مليليتر وتحت ظروف معقمة وحسب ما ذكر في [3] مع أجراء بعض التعديلات على التراكيز المستعملة ، استخدمت التراكيز المحضرة جميعاً مباشرة بعد أكمال عملية التحضير في تثبيط الخلايا السرطانية والطبيعية، بعدها اخرج الطبق الزرعي الحاوي الخلايا المزروعة في حفر الطبق وفحصت حيوية الخلايا وعدها باستخدام المجهر الضوئي المقلوب الطور للتأكد من حيوية الخلايا وأن هذه الخلايا جاهزة للمعاملة وفي ظروف معقمة تم رفع الشريط اللاصق من سطح الطبق وأهمل الوسط الزرعي القديم وأضيف 0.2 مليلتر من التراكيز المحضرة 125 و 250 و 500 و 1000 مايكروغرام/ مليلتر وبواقع خمس مكررات لكل تركيز وخمس مكررات سيطرة [خلايا مضاف اليها الوسط الزرعي الخالي من المصل البقري وبدون أضافة المستخلص]. بعد الانتهاء تم تغليف السطح الخارجي للطبق وحضنت في حاضنة مجهزة ب5 % غاز ثاني أوكسيد الكاربون بدرجة حرارة 37°م لمدة 48 ساعة. بعد انتهاء فترة الحضن أخرج الطبق من الحاضنة ونبذ الوسط الزرعي الموجود في الحفر وصبغت الخلايا بصبغة MTT -3(4,5-Dimethylthiazol-2]

[2,5diphenyltetra-zoliumbromide] وتركت لمدة ساعتين بعدها أزيلت الصبغة وتم اضافة 100 مايكرولتر من محلول (DMSO) Dimethylsulfoxide ووضعت الاطباق في حمام مائي هزاز بدرجة 37مْ لمدة 15 دقيقة. قرأت النتائج لكل طبق بإستخدام جهاز الأليزا (ELISA Reader) أستخدم هذا الجهاز لقراءة الأمتصاصية الطيفية على طول موجي 550 نانوميتر للخلايا الملتصقة في الطبق ومن ثم تحدد نسبة التثبيط للخلايا مقارنة مع السيطرة (العينة الضابطة) من خلال قراءة أمتصاصية الكثافة الضوئية في جهاز الأليزا وتحوليها الى نسب مئوية لأيجاد معدل التثبيط Inhibitoryrate وحسب المعادلة الآتية:

$$\text{معادلة التثبيط} = \frac{\text{متوسط العينة الضابطة} - \text{متوسط العينة المعالجة}}{\text{متوسط العينة الضابطة}} \times 100$$

النتائج والمناقشة

أستخدم نوعان من الخلايا هما Hela cell line أستعمل هذا الخط من المركز العراقي للتقانات الاحيائية والخلوية / بغداد المستعمل لدراسة السمية الخلوية Cytotoxicity، وهو خط سرطان عنق الرحم لأمراة تدعى HenrittaLacks سنة 1951 وهذا الوسط جرى تطبيعه للنمو على وسط RPMI-1640 . بينما أستعمل خط خلايا REF من المركز العراقي للتقانات الاحيائية والخلوية / بغداد المستعمل لدراسة السمية الخلوية Cytotoxicity، إذ أُستخدم أنزيم التربسين في عزل خلايا جنين الجرذ بعد اخراجها من رحم الأم الحامل وقطعها. يمتاز هذا الخط كونه يحتوي خلايا جرذ طبيعية غير متمايزة (Undifferentiated fibroblast) ، وهو متكون من خلايا كبيرة الحجم ، ونشطة جيدة النمو، وتحتاج لتكون طبقة أُحادية إلى عشرة أيام تقريباً . تمتاز خلاياه أيضاً بحساسيتها لتغير ظروف التنمية مثل الحموضة أو قلة المغذيات في الوسط. نمي هذا الخط بإستخدام الوسط الزرعي RPMI-1640 المُحضر من الشركة المجهزة له، للحصول على مزارع ثانوية جرت معاملة الخلايا السرطانية والطبيعية التي أصبحت على شكل طبقة أُحادية بمحلول التربسين _ فيرسين . لغرض تقيم التأثير السمي لمستخلص الحبار وأتضح من النتائج أنه ذو سمية خلوية عالية Cytotoxicity. ووجد ان المستخلص أعطى نتائج عالية للتثبيط مع الخلايا السرطانية وخاصة عند التراكيز العالية وان نسبة تثبيط الخلايا السرطانية اعتمدت بالدرجة الاساس على التركيز المستعمل dose depended، والعلاقة بين نسب تثبيط الخلايا السرطانية وتركيز مستخلص الحبار هي علاقة طردية إذ تزداد شدة التأثير السمي بازدياد التركيز.

تأثير مستخلص الحبار على خط الخلايا السرطانية Hela cell line

أظهرت نتائج اختبار السمية الخلوية الموضحة في الشكل (1) إن مستخلص الحبار أعطى تثبيط للخلايا السرطانية في التركيز العالي 1000µg /ml بوقت تعريض 48 ساعة

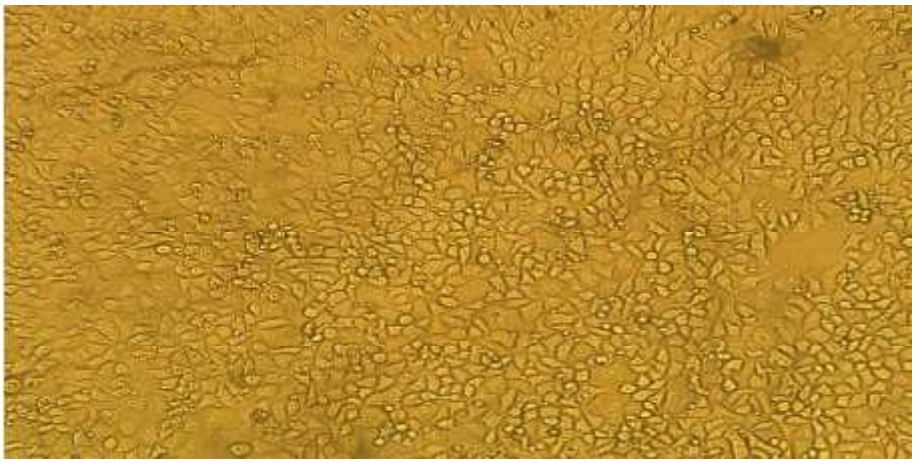
حيث بلغت النسبة المئوية 42.79 % في حين كانت النسبة المئوية للتثبيط لبقية التراكيز موضحة بالجدول (1). أوضحت النتائج في الجدول والشكل 1 ظهور تأثيرات سمية Cytotoxicity لمستخلص الحبار البروتيني ويعزى سبب ذلك الى شكل وطبيعة المستقبلات الموجودة على سطح الخلايا السرطانية وامكانية ارتباطها بالمركبات المختلفة [15]. وقد وجد أن المستخلص أعطى نتائج للتثبيط في التركيز العالي 1000µg/ml بوقت تعريض 48 ساعة ، وإن نِسبة تثبيط خلايا السرطانية أعتمدت بالدرجة الاساس على التركيز المستعمل. وقل التاثير التثبيطي تدريجياً مع أنخفاض التركيز المستعمل ، أي أن العلاقة بين النسب المئوية لتثبيط الخلايا السرطانية وتركيز مستخلص الحبار هي علاقة طردية، إذ تزداد شدة التاثير السمي بأزدياد التركيز وهذه النتيجة تدعم الدراسة التي اكدت أن التاثير السمي في خطوط الخلايا السرطانية يعتمد على تركيز الجرعة defendant dose [9]. وربما يمكن تفسير ذلك أن التراكيز العالية لمستخلص الحبار قامت بعميلة تحفيز الموت المبرمج Apoptosis في الخلايا السرطانية ولوحظ ان التراكيز العالية للمستخلص هي التي تسبب تحفيزاً أكبر للموت المبرمج وخاصة تركيز 1000µg/ml وقد اختلفت هذه القابلية باختلاف التركيز . وقد جاءت هذه النتيجة مطابقة لما توصل اليه الباحثون في دراسة السمية الخلوية لمستخلص صدفة الحبار على خط الخلايا السرطانية HepG2 cell line [7]. وقد يعزى العمل التثبيطي لمستخلص الحبار للخلايا السرطانية كون التكرار العالي للأحماض الامينية الكارهة للماء في جلد الحبار قادرة على التثبيط العالي لبيروكسيدات الدهون بسب قدرتها الطبيعية على التفاعل مع نظام الدهون وهذا يسمح للأحماض الأمينية الكارهة للماء أن تثبت وبسرعة في الجذور الحرة المتولدة من أكسدة الدهون وبالتالي تكمن الفائدة في الحد من الأورام السرطانية [10].

جدول (1): النسب المئوية لتثبيط خلايا الخط السرطاني Hela cell line.

التراكيز المستعملة مايكروغرام / مليلتر	النسبة المئوية للتثبيط %
1000 µg/ml	% 42.79
500 µg/ml	% 35.00
250 µg/ml	% 20.70
125 µg/ml	% 17.00

تأثير مستخلص الحبار على خط الخلايا الطبيعية REF

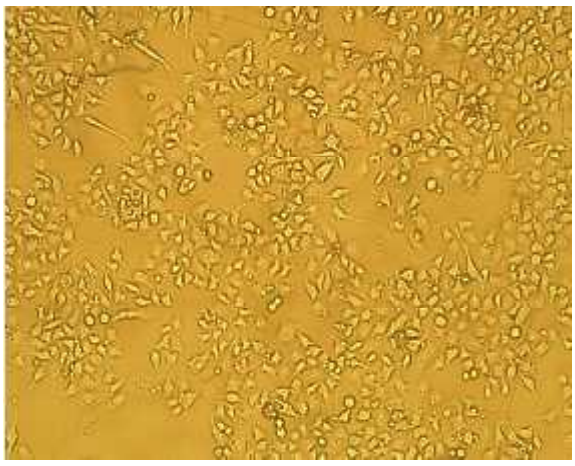
تمت دراسة السمية الخلوية لمستخلص الحبار على Rat embryo fibroblast لمعرفة تأثيره على الخلايا الطبيعية ومقارنتها مع خط الخلايا السرطانية Hela . أظهر المستخلص في هذه الدراسة نتائج متباينة على حيوية الخلايا الطبيعية بعد تعريضها لمدة 48 ساعة وكما موضح بالجدول (2) والشكل (2) فقد أعطى المستخلص أعلى نسبة تثبيط وصلت



السيطرة

تركيز 250 مايكروغرام/مليلتر

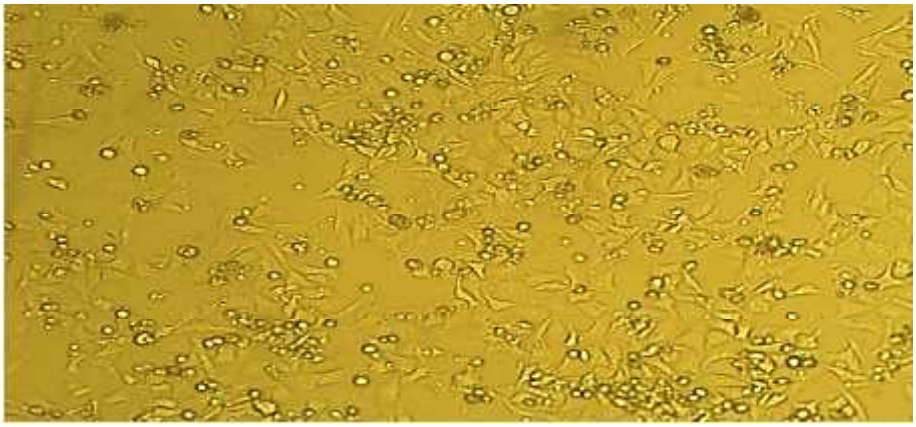
تركيز 125 مايكروغرام/مليلتر



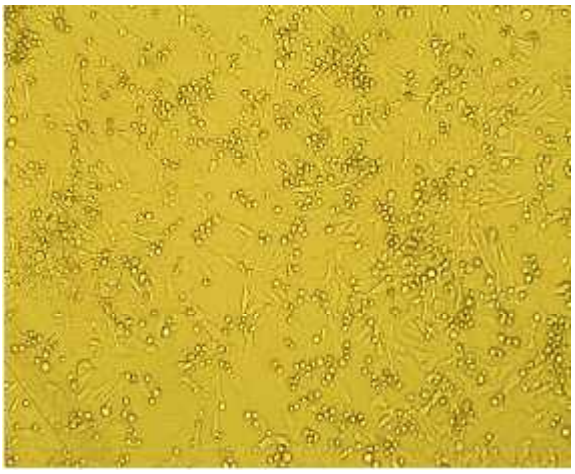
تركيز 1000 مايكروغرام/مليلتر

تركيز 500 مايكروغرام/مليلتر

شكل (1): الفعالية السمية الخلوية للمستخلص النقي بتراكيز مختلفة (125 و250 و500 و1000) ملغم/مليلتر أتجاه خط الخلايا السرطانية Hela cell line ولمدة زمنية 48 ساعة بدرجة حرارة 37مْ .



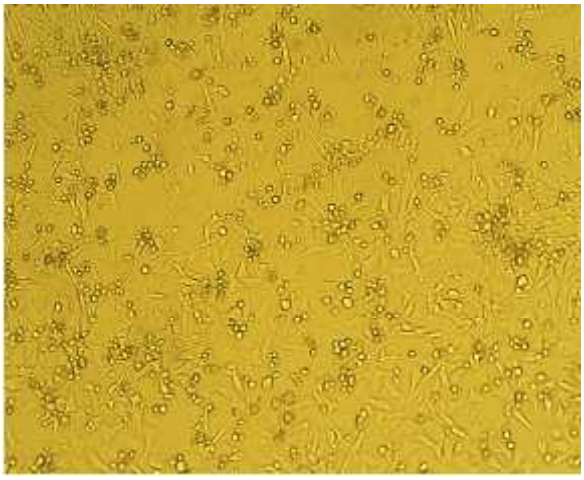
السيطرة



تركيز 250 مايكروغرام/مليلتر

تركيز 125 مايكروغرام/مليلتر

تركيز 1000 مايكروغرام/مليلتر



تركيز 500 مايكروغرام/مليلتر

شكل(2): الفعالية السمية الخلوية للمستخلص النقي بتراكيز مختلفة (125و250 و500 و1000) ملغم/مليلتر أتجاه خط الخلايا الطبيعية REFcell line ولمدة زمنية 48 ساعة بدرجة حرارة 37 °م.

جدول (2): النسب المئوية لتثبيط خلايا الخط الطبيعي REF cell line.

التراكيز المستعملة مايكروغرام / مليلتر	النسبة المئوية للتثبيط %
1000 µg/ml	% 20.4
500 µg/ml	% 16.3
250 µg/ml	% 9.0
125 µg/ml	% 1

إلى 20.4 % عند التركيز 1000µg/ml في حين كانت النسبة المئوية للتثبيط لبقية التراكيز موضحة في جدول (2). نجد إن من خلال مقارنة تأثير الخط الخلايا السرطانية مع تأثير الخط الطبيعي REF فإن الاول كان اكثر تأثراً وحساسية من خط الخلايا الطبيعية لجنين الجرذ لمولدة للاليلاف أتجاه مستخلص الحبار، ذلك بسب عدد من الخواص الايضية التي تمتلكها الخلايا السرطانية مثل الطبيعة الآيضية لتكوين الاوعية الدموية الجديدة وكذلك الى شكل وطبيعة المستقبلات الموجودة في سطح الخلية السرطانية وأمكانية أرتباطها بالمركبات المختلفة والتأثير في الخلية الأواصر بين القواعد النتروجينية قوية مقارنة في الخلية السرطانية [11]. ويشير الجدول والشكل (2) الى ظهور تأثيرات بنسب أقل في الخط الطبيعي مقارنة مع الخلايا السرطانية Hela وبمختلف التراكيز المستخدمة للمستخلص.

المصادر

1–الثويني، امنة نعمة و نصيف، سنار سلمان (2010). تقييم مستخلص نبات القرنفل على خط الخلايا السرطانية الAMN3 والطبيعية REF. المجلة العراقية للعلوم، 51(3): 460–464.

2–الحسن، سفانه كاظم جاسم (2007). استخلاص مركبات بروتينية من القواقع *Tibia* sp. , *Tibia insulaechorabcurta , Pomacea bridgesii diffusa* (Mollusca: Gastropoda) ودراسة فاعليتها على بعض أنواع البكتريا. رسالة ماجستير .كلية العلوم. جامعة البصرة. 108ص.

3.Abdul-Majeed, R. (2000). Induction & characterization of SU-99 Plasmacytoma cell line and its effect on mice immune response. Ph. D. Thesis. Al-Nahrain University.

4.Barnes, R. D. (1968). Invertebrate Zoology . W.B. Saunders Company. 743pp

5.Bhatnagar, I. and Kim, S. K. (2010). Marine antitumor drugs: Status, shortfalls and strategies. Mar. Drugs., 8: 2702-2720.

6.DeVita, V. T. (1997). Principles of cancer management chemotherapy. In: De Vita, V. T.; Hellman., S.; Rosenberg, S. A. and Raven, L.H. (Eds.). Cancer principles and practice of oncology. 5th ed. Lippincott–Raven Publishers, Philadelphia, Pp: 333-348.

7.Diaz, J.; Thilaga, R.D. and Sivakumar, V. (2015). Invitrocytotoxic activity of squid and cuttle fish bone extract on HepG2 cell line. IJPSR, 6(2): 778-782.

8.Hellman, S. (1997). Principles of cancer management: Radiation therapy. In: De Vita, V.T.; Hellman, S. and Rosenberg, S.A. (Eds.). Cancer: principles and practice of oncology. 5th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. Pp:.307-332.

9.Lupi, M.; Matera, G. ; Bbbranduradi, D.; Dincalci, M. and Ubezio, P. (2004). Cytostatic and cytotoxic effects of topote4can decoded by a novel mathematical simulation approach. Cancer Research, 64: 2825-2832.

10.Mendis, E.; Rajapakse, N.; Byun, H. G. and Kim, S. K. (2005). Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. Life Sciences, 77: 2166-2178.

11.Moteki, H.; Hibasmai, H .; Yamada, Y.; Katsuzaki, H .; Imai, K. and Komiya, T. (2002 Specific of apoptosis 1,8-cineole in two human leukemia cell line, but not in a human stomach cancer cell lines. Oncology Reports, 9:757-760.

12.Nithya M., Ambikapathy, V.; and Panneerselvam, A. (2011). Effect of pharaoh's cuttlefish ink against bacterial pathogens. Asian J. Plant Sci. Res., 1(4): 49-55.

13.Ruppert, E.; Fox, E.R.S. & Barnes, R.D. (2003). Invertebrate Zoology, a functional evolutionary approach. 7th ed. Brooks, B. Colc-Thomson Learning. Pp: 414-422.

14.Sasaki, J.; Ishita, K.; Takaya, Y.; Uchiswa, H. & Matsue, H. (2012). Antitumor activity of squid ink. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 43(4): 455-461.

15.Shoieb, A. M.; Elgayyar, M.; Durdrick, P.; Bell, E. and Titnof, P. K. (2003). Inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thimoquiol. Int. Oncology, 22: 107-113.

16.Zhang, C.; Kim, S. K. (2009). Matrix metalloproteinase inhibitors (MMPs) from marine natural products: The current situation and future prospects. Mar. Drugs, 7: 71-84.

Basrah J. Agric. Sci., 29 (2): 1-10, 2016

A preliminary Evaluation of the Effect of Pure Protein Extract Obtained from *Loligo* sp. (Mollusca: Cephalopoda) on Cancer cell line (Hela) and on Normal Cell Line (REF)

Heifaa A. Al-Mosawi*, Balsam A. Marina and Dameia, Q. S. Al-Fandi

Department of Biology, Basrah University, College of Science, Basrah, Iraq
*e-mail: hifaa.adnan@gmail.com

Abstract: In this study the capacity of pure *Loligo* sp. extract was studied on two cell lines Hela cell line and normal line of rat embryo fibroblast (REF) *in vitro*. The extract of *Loligo* sp. showed a high inhibition activity on Hela cell line in all concentrations used and the highest effect was appeared after 48 hours of exposure with a concentration 1000µg/ml inhibition; result of this cell were 42.79% for extract and bio result of these cells explained inhibition for biology of cell depended on concentration of pure extract, while it was low effect on REF exposure time 48 hrs.

Key words: Squid, *Loligo* sp., anticarcinogenic, Hela cell.