تأثير المركب هايدروكسي يوريا (HYDROXY UREA) على الخلايا السرطانية

عبد علي ذاكر*، سلمان علي احمد** ورشيد محمد رشيد***
*كلية العلوم/ جامعة الأنبار
**كلية العلوم/ جامعة النهرين
***كلية التربية/ جامعة الأنبار

الخلاصة

درس تأثير المركب هايدروكسي يوريا (المصنع مختبريا) على تكاثر الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي وقد تضمنت الدراسة اختبار الفعالية السمية لهذه المادة في نوعين من الخطوط الخلوية السرطانية ، النوع الأول من خلايا سرطان الحنجرة والثاني من خلايا سرطان الغدد اللبنية في الفئران وبأربعة تراكيز هي 62.5 و125 و250 و500 مايكروغرام/ مليلتر ولمدتي تعريض 24 و48 ساعة. وقد اظهر تأثيرا سميا ابتداءا من المعاملة الأولى في مدتي التعريض بالنسبة للخط الخلوي السرطاني الثاني في حين كان تأثيره عند المعاملة الثانية خلال مدة التعريض الأولى بالنسبة للخط الخلوي السرطاني الأول. نستنتج من هذه الدراسة ان سمية المركب هايدروكسي يوريا تزداد مع ازدياد التركيز ومدة التعريض مما يشير إلى ا ذ التأثير اعتمد على الجرعة والزمن.

Effect of Hydroxy urea on cancer cells

A.A. Thaker*, S. A. Ahmed and R. M. Rasheed[1]*****
***College of Science\University of Al-Anbar**
****College of Science\University of Al-Nahryn**
*****College of Education\University of Al-Anbar**

Abstract

This research aims to explore the *in vitro* antitumor activity of the compound hydroxy urea (synthesized in the laboratory).Two cell lines were used, the first from epidermal larynx and the second from mammary glands of mice.

The cytotoxic effect of this compound started with Initial concentration (62.5 µg/ml) for the cell line of larynx but started at higher concentration (125 µg/ml) for the cell lines of mammary gland, and the activity Increases with concentration and time which means it is concentration and time dependant .It was cocluded from this study that the toxicity of hydroxy urea increased with increasing the concentration and time of exposure.

[1] البحث مستل من أطروحة الباحث الثالث.

المقدمة

صنع الهيدروكسي يوريا (Hydroxy Urea) لأول مرة في العام 1869 في ألمانيا من قبل الباحثين Dressler & Stein (1) مركب ينتمي في آلية عمله إلى مجموعة العوامل المضادة للاستقلاب Antimetabolites. استخدم هذا المركب في علاج العديد من الأمراض عند البشر مثل مرض ابيضاض الدم النخاعي المزمن ومتلازمة المتشعب النخاعي Myeloproliferative Syndromes وفقر الدم المنجلي.

أعطي هذا المركب لأول مرة لحيوان من قبل الباحث Rosenthal وجماعته عام 1928 وقد تسبب في حدوث حالات نقص كريات الدم البيضاء وضخامة الكريات الحمر وفقر دم ومن ثم الموت (1) كما وجد ا ن لهذا المركب القدرة على إحداث تجزؤ في شريط الدنا (DNA) في خلايا Hela Cellوان هذا التأثير كان يز داد مع ازدياد كمية الهيدروكسي يوريا المعطاة يرافقه انخفاض في كمية الدنا السليمة. كذلك وجد ان لهذا المركب تأثيراً واضحاً على مظهر ومعدل نمو خلايا اللبائن وعملية التعبير الجيني gene expression (2). كذلك استخدم هذا المركب في خفض حالات انسداد الأوعية ومتلازمة الصدر الحادة وان الآلية المسئولة عن التأثير المفيد لهذا المركب تعود إلى قدرته على زيادة مستوى الهيموغلوبين الجنيني Fetal hemoglobin (Hbf) (3).

الهدف من هذه الدراسة هو لمعرفة إمكانية استخدام هذا المركب كأحد العوامل المثبطة للخلايا السرطانية المأخوذة من الحنجرة والغدة اللبنية (خارج الجسم الحي).

المواد وطرائق العمل

- **تحضير مركب الهيدروكسي يوريا:**

تم تحضير المركب وفق الخطوات الآتية الموصوفة من قبل Dechenghi (4):

1. يخلط 20.8 غرام (0.3 mole) من hydroxyamine hydrochloride ($NH_2OH.HCl$) و 20.6 غرام (0.5 mole) من هيدروكسيد الصوديوم 98% ثم أضيفت المادتين إلى 100 مل ماء مقطر.
2. يضاف 22.26 غرام (0.25 mole) من ethyl carbamate إلى المحلول المحضر في الخطوة الأولى.
3. يترك المحلول في درجة حرارة المختبر ولمدة ثلاثة أيام ثم يبرد المحلول باستخدام حمام ثلجي.
4. يتم معادلة المحلول وبحذر باستخدام حامض الهيدركلوريك.
5. يرشح المحلول باستخدام ورق الترشيح.
6. يتم استخلاص الناتج باستخدام الايثر في قمع الفصل وتعاد العملية لأكثر من مرة حيث يتم جمع الطور المائي.
7. تتم عملية تجفيف الطور المائي الذي تم استخلاصه باستخدام المبخر الدوار وبسرعة وفي درجة حرارة لا تزيد عن 50–60°م حيث يتكون راسب.
8. يغلى الراسب في 100 مل من الكحول الاثيلي المطلق ثم يرشح المحلول باستخدام القمع الساخن.
9. بعد التبريد نحصل على مادة بلورية بيضاء اللون تمثل الهيدروكسي يوريا.
10. تستخلص المادة المتبقية ثانية باستخدام 50 مل من الايثانول المطلق المغلي ثم يرشح مرة ثانية ويبرد حيث نحصل على مادة بلورية بيضاء تمثل الهيدروكسي يوريا.

- **الزرع النسيجي والوسط الزرعي:**

تم تحضيره وفقا لطريقة Freshney (5) الخاصة بالزرع النسيجي.

أما الوسط الزرعي (RPMI-1640) Rosswell Pork Momeral Institute فقد احتو ى المواد الآتية:

RPMI-1640 with hopes buffer, L-glutamin	10.4 غرام
Crystaline Penecillin	0.5 مليلتر = 100000 i.µ.
Streptomycin	0.5 مليلتر = 0.1 غرام
Bovine Calf Serum	%10
Sodium bicarbonate (%4.4)	دليل الاس الهيدروجيني (7.2)

أكمل الحجم إلى لتر بإضافة الماء المقطر مزدوج التقطير، ثم عقم بمرشح ذو ثقوب بقطر(0.22) مايكرون.

- **المضادات الحيوية.**

أذيبت مكونات عبوة Benzyl Pencillin بسعة 1000000 i.µ في 5 مليلتر من الماء المقطر، ثم اخذ منه 0.5 مليلتر (200000 i.µ.)، وأضيف إلى لتر واحد من الوسط الزرعي وحفظ في درجة حر ارة – 20°م.

أذيبت عبوة واحدة من الـ Streptomycin سعة 1 غم في 5 مليلتر من الماء المقطر، ثم اخذ منه 0.5مليلتر، وأضيف إلى لتر واحد من الوسط الزرعي وحفظ في درجة حرارة – 20°م.

- **الخطوط الخلوية Cell Lines.**

1– الخط الخلوي السرطاني (Human epidermoid Larynx Carcinoma (HeP-2.

وهو خلايا سرطان الحنجرة لرجل يبلغ من العمر 57 سنة، وهذا الخط تم تطعيه للنمو على وسط RPMI-1640 المجهز بـ 10% مصل العجل البقري في المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية في بغداد.

2 – الخط الخلوي السرطاني (Ahmed-Mohammed-Nahi-(AMN-3.

وهو سرطان الغدة اللبنية (Mammary adenocarcinoma) لإناث فئران نوع Balb/c المصابة بسرطان الغدة اللبنية التلقائي (*In vivo* Spontaneous mammary adenocarcinoma) تم الحصول عليها من المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية في بغداد.

- **اختبار سمية المواد الكيميائية والمستخلص النباتي على نمو الخطوط الخلوية السرطانية**

تم تحضير المحاليل وفقا لطريقة Abdul-Majeed (6) الخاصة باختبار التاثير السمي لنبات الحرمل.

حضر ت كل من المركبات المستعملة عن طريق إذابة 0.02 غرام من المركب أو المستخلص المركز في 10 مللتر من المذيب {الوسط Dimethyl sulf oxide (DMSO) + SFM} ثم عقم باستعمال مرشح ذو ثقوب بقطر 0.22 مايكرون وحضرت منه أربعة تراكيز مختلفة هي(500،250،125،62.5) مايكروغرام/مليلتر وتحت ظروف معقمة. استخدمت جميع التراكيز المحضرة مباشرة بعد اكمال عملية التحضير.

جهز عالق الخلايا عن طريق معاملة قنينة الزرع النسيجي حجم 25 سم^2 بمحلول التربسين/ فرسين ثم أضيف له 20 مليلتر من الوسط الزرعي الجديد من المصل (SFM)ثم مز ج عالق الخلايا جيدا وتم نقل 0.2مليلتر بعد كل مزجة جيدة إلى حفر طبق معايرة الزرع النسيجي ذو القعر المسطح باستعمال ماصة أوتوماتيكية، بحيث احتوت كل حفرة على عدد معلوم من الخلايا الحية (1×10^5 خلية/حفرة). بعد ان تم عد الخلايا الحية من الميتة بواسطة صبغة (Trypan blue). ترك الطبق في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م لمدة تتراوح بين 12–18 ساعة إلى حين التصاق الخلايا في الحفرة وبعدها تم التخلص من الوسط الزرعي القديم في الحفر وتم إضافة 0.2 مليلتر من التراكيز

المحضرة سابقا وبواقع ثلاث مكررات لكل تركيز كما تم عمل ثلاث مكررات للسيطرة. وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م في حاضنة مزودة بـ 5% من غاز ثاني اوكسيد الكربون.

بعد مرور مدة التعريض المحددة للحضن. اخرج الطبق من الحاضنة وأضيف إليه 50مايكروليتر من محلول صبغة الأحمر المتعادل وأعيد الطبق مرة ثانية إلى الحاضنة ليحضن ساعتين بعدها اخرج الطبق وأزيلت محتوياته وغسلت الخلايا بمحلول (PBS) لحين زوال الصبغة الزائدة، إذ ان الخلايا الحية تأخذ الصبغة أما الميتة فلا تأخذها. بعد ذلك أضيف لكل حفرة 50 مايكروليتر من محلول دارئ الفوسفات الملحي المحمض بالايثانول المطلق بنسبة (1:1) (محلول استخلاص الصبغة)، إذ يقوم هذا المحلول باستخراج الصبغة من الخلايا الحية التي كانت قد أخذت الصبغة قرأ تالنتائج باستخدام جهاز الاليزا بطول موجي 492 نانومتر اعتمد برنامج Biostat 2007 في إجراء التحاليل الإحصائية، وقورنت المتوسطات فيما بينها بالاعتماد على قيمة اختبار اقل فرق معنوي عند مستوى احتمالية 5%.

النتائج

- **الخط الخلوي السرطاني** Hep – 2.

يوضح الجدول رقم (1) نتائج التحليل الإحصائي الخاصة بتأثير التراكيز المحضرة للمركب هايدروكسي يوريا على نمو خلايا الخط السرطاني Hep – 2 خلال مدتي التعريض. وتشير هذه النتائج إلى ا ن التأثير المعنوي بدأ خلال مدة التعريض 24 ساعة عند المعاملة 125 مايكروغرام/ مليلتر أما في مدة التعريض 48 ساعة فانه ابتدأ عند المعاملة 62.5 مايكروغرام/ مليلتر. ا ن أفضل تأثير معنوي حصل عند المعاملة 250 مايكروغرام/ مليلتر في مدة التعريض 48 ساعة، أما اقل تأثير معنوي فهو عند المعاملة 125 مايكروغرام/ مليلتر خلال مدة التعريض 24 ساعة وان التأثيرالمعنوي كان في تزايد ابتداء من المعاملة الثانية أما في فترة التعريض الثانية فان التأثير المعنوي ازداد تدريجياً مع ازديادالتركيز ابتداء من المعاملة 62.5 مايكروغرام/ مليلتر ولغاية المعاملة 250 مايكروغرام/ مليلتر.

جدول (1) قيم المتوسطات للخط الخلوي السرطاني Hep – 2 بعد المعاملة بتراكيز مختلفة من المركب Hydroxy Urea خلال مدتي التعريض 24 و 48 ساعة

تركيز Hydroxy urea مايكرو غرام / مليلتر	متوسطات الكثافة الخلوية		
	24	48	$\overline{X}_C$
0	0.644	0.624	0.634
62.5	0.634	0.528	0.581
125	0.616	0.425	0.520
250	0.590	0.336	0.463
500	0.565	0.379	0.472
$\overline{X}_t$	0.609	0.458	

وتشير نتائج التحليل الإحصائي إلى ان مدة التعريض الثانية (48 ساعة) كانت هي الأكثر تأثيرا بالمقارنة مع مدة التعريض الأولى (24 ساعة) كما وأظهر ت المعاملات المحضرة تأثيرامعنوياً متزايداً مع ازدياد التركيز لغاية المعاملة 250 مايكروغرام/ مليلتر.

- **الخط الخلوي السرطاني** Amn3 .

يظهر الجدول رقم (2) نتائج التحليل الإحصائي لتأثيرات تراكيز المختلفة من المركب في تثبيط نمو خلايا هذا الخط الخلوي خلال مدتي التعريض 24 و48 ساعة. وتشير النتائج إلى ا ن التأثير السمي بدأ من المعاملة الأولى 62.5 مايكروغرام/ مليلتر خلال مدتي التعريض، وان أفضل تأثير معنوي تحقق عند المعاملة 500 مايكروغرام/ مليلتر خلال مدة التعريض الأولى والمعاملة 250 مايكروغرام/ مليلتر خلال مدة التعريض الثانية، فيما كان اقل تأثير معنوي عند المعاملة 62.5 مايكروغرام/ مليلتر في مدة التعريض الأولى 24 ساعة. ا ن تأثير المعاملات المعنوي خلال مدة التعريض الأولى كان في تزايد مع ازدياد التركيز لغاية المعاملة الثالثة، كذلك نجد ان التأثير المعنوي ازداد تدريجياً مع ازدياد التركيز إلى حد المعاملة 250 مايكروغرام/ مليلتر في مدة التعريض الثانية. وعند المقارنة ما بين مدتي التعريض أظهر ت النتائج ان الخلايا كانت أكثر تحسساً لهذا المركب خلال مدة التعريض الثانية وان الفرق بينهما كان معنوياً . كما أظهر ت التراكيز تأثيرامعنوياً متزايداً مع ازدياد التراكيز إلى حد المعاملة 250 مايكروغرام/ مليلتر.

جدول (2) قيم المتوسطات للخط الخلوي السرطاني Amn_3 بعد المعاملة بتراكيز مختلفة من المركب Hydroxy Urea خلال مدتي التعريض 24 و 48 ساعة

تركيز Hydroxy Urea مايكرو غرام / مليلتر	متوسطات الكثافة الخلوية		
	24	48	$\overline{X}_C$
0	0.237	0.223	0.230
62.5	0.209	0.192	0.200
125	0.176	0.158	0.167
250	0.116	0.113	0.114
500	0.113	0.119	0.116
$\overline{X}_t$	0.170	0.161	

المناقشة

أظهر ت النتائج وجود تأثير سمي للتراكيز المستخدمة من المركب في نمو خلايا الخطوط السرطانية Hep 2 – وAmn3 خلال مدتي التعريض 24 و48 ساعة. أشارت الكثير من البحوث إلى امتلاك المركب تأثيرا ساماً وان هذا التأثير يعود إلى قدرته في تثبيط فعالية الإنزيم ribonuclocotide reductase (RNR) المسؤول عن صناعة الحمض النووي DNA (7) وبالتالي فان ذلك يؤدي توقف دورة الخلية في نهاية الطور G وبداية الطور (S) (8).

وقد تعزى التأثيرات السامة لهذا المركب في تثبيط نمو الخلايا إلى قدرته في زيادة تعبير Over expression الجين P53 والذي هو بروتين يحث على إيقاف دورة حياة الخلية ومن ثم إدخالها مسار الموت المبرمج apoptosis كاستجابة للضغوطات التي تتعرض لها الخلية ومنها الأضرار التي تصيب الحمض النووي DNA (1).

اظهر هذا المركب القدرة علىإزالة ما يعرف بأزواج الكروموسومات الدقيقة (domins) – double-minute chromosome وهي الكروموسومات الحاوية على الجينات المضخمة لمقاومة الأدوية amplified drug resistance genes ومكونات الأورام On Cogenes في الخلايا السرطانية (9). إذ ا ن وجود الجينات المضخمة والـ P53 المطفر هو من عوامل تقدم السرطان (10) لذلك فان العلاجات التي يمكن ان تزيل أو تحذف domins أظهر ت القدرة على تثبيط نمو وتقدم الخلايا السرطانية. ولقد اظهر المركب القدرة على خفض أعداد domins ومكونات الأورام Tumorigenicity في العديد من أنظمة السرطانات البشرية داخل وخارج الجسم(11). ان امتلاك هذا المركب لهذه التأثيراتجعله واحداً من المركبات المستخدمة حالياً في علاج الأورام الخبيثة عند البشر ولقد أظهر ت نتائج التحليل الإحصائي ان للتراكيز المستخدمة في هذا البحث تأثيراسمياً واضحاً في تثبيط نمو خلايا الخطوط السرطانية خلال مدتي التعريض. إذ نجد ان التأثير السمي كان معنوياً منذ المعاملة

الأولى بالنسبة لكلا النوعين من الخلايا وخلال مدتي التعريض باستثناء مدة التعريض الأولى للخط السرطاني Hep-2 إذ ابتدأ التأثير عند المعاملة الثانية. كما ونلاحظ ان التأثير السام لهذا المركب كان يزداد مع زيادة التركيز خلال مدة التعريض الأولى لكلا النوعين من الخطوط السرطانية في ما يتوقف هذا الازدياد التدريجي عند المعاملة الثالثة في مدة التعريض الثانية لكلا النوعين من الخطوط. أ ي ا ن التأثير السام كان يزداد باتجاه التركيز الأعلى وا ن التأثير السام كان أكثر وضوحاً في مدة التعريض 48 ساعة لكلا الخطين. ان هذا يظهر بوضوح ان التأثير السام لهذا المركب يعتمد على التركيز والوقت وهو ما يعرف بظاهرة Dose and time dependant Phenomenonو ان التباين في التأثير السمي لهذا المركب ما بين الخطين Hep-2 و Amn3 قد يعود إلى ا ن لكل خط خلوي سرطاني سلوكاً أيضا مختلفاً عن الآخر إضافة إلى تباين المستقبلات الموجودة على سطح الخلية من نوع لآخر مما يؤدي إلى حدوث تباين من ناحية الاستجابة للمؤثرات الخارجية ومنها عوامل العلاج الكيميائي.

المصادر

1- Hakan, A. & Osman, N. (2001). Hydroxy Urea induces P53 Accumulation and Apoptosis in Human Cervical Carcinoma Cells .Turk. J. Biol.,26:145 – 150.

2- Adunyah, S. E.; Chander, R.; Barner, V. K. & Cooper, R. S. (1995). Regulation of C – Jun mRNA expression by hydroxy urea in human k 562 cells during erythroid differentiation. Biochem. Biophys. Acta., 1263: 123 – 132.

3- Valdan, P.; Reginald, D.; Smith, B. B.; Beleslin, C.; Joyce, M.; Njorge, J. L.; Miller, M.; Gladwin, T. and Alan, N. (2003). Hydroxy urea Induces fetal hemoglobin by the nitric oxide– dependent activation of soluble guanylyl Cyclase. J. Clin. invest., 111: 231 – 239.

4- Dechenghi, R. (1973). Organic Synthesis Collective volume 5, P645, John Wiley and Sons.

5- Freshney, R. I. (2000). Culture of animal cells: A manual for basic technique (4th ed.). wiley – Liss, A John Wiley & Sons, Inc. Publication, New York.

6- Abdul– Majeed, M. R. (2000). Introduction and Charact- erization of Su.99 Plasmacytoma Cell line and its effect on mice Immune response. PhD Thesis, Nahrain University.

7- Thelander, L. & Reichard, P. (1979). Reduction of ribonucleotides. Annu. Rev. Biochem., 48: 133 – 158.

8- Linke, S. P.; Clarkin, K. C.; Dileonardo, A.; Tsou, A. & Wahl, G. M. (1996). A reversible P53– dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. Genes Dev., 10: 937– 947.

9- Eric, R.; Sandrine, F.; Geoffrey, W.; John, M.; Karen, D.; Elzbieta, I.; John, G.; Craig, A.; Gary, C. & Daniel, D. (2001). Effect of Hydroxy urea on Extrachromosomal DNA in Patients with Advanced Ovarian Carcinomas. Clin. Canc. Res. 7: 1171-1180.

10- Reifenberger, G.; Liu, L.; Ichimura, K.; Schmidt, E. & Collins, V. P. (1993). Amplification and Over expression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without P53 mutation. Cancer Res., 53: 2736 – 2739.

11- Von Hoff, D. D.; McGill, J. R.; forseth, B. J.; Davidson, K. K.; Bradley, T. P.; Van Devanter, D. R. & Wahl, G. M. (1992). Elimination of extrachromosomally amplified MYC genes from human tumor cells reduces their tumorigenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 8165 – 8169.