تأثير المركب Salicyl hydroxamic acid على نمو الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي

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

الخلاصة

تم في هذا البحث دراسة تأثير المركب Salicyl hydroxamic acid (المصنع مختريا) على تكاثر الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي وقد تضمنت الدراسة اختبار الفعالية السمية لهذه المادة في نو عين من الخطوط الخلوية السرطانية، النوع الأول من خلايا سرطان الحنجرة والثاني من خلايا سرطان الغدد اللبنية في الفئران(من المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية). وقد استخدمت أربعة تراكيز من المركب أعلاه هي 62.5 و125 و250 و500 مايكروغرام/ مليلتر ولمدتي تعريض 24 و48 ساعة. وقد وجد ان التأثير السام لهذا المركب في خلايا الخط السرطاني الأول لم يظهر حتى المعاملة 250 مايكروغرام/ مليلتر في مدة التعريض الأولى 24 ساعة فيما ابتدأ منذ المعاملة الأولى 62.5 مايكروغرام/ مليلتر خلال مدة التعريض الثانية 48 ساعة. أما بالنسبة للخط الخلوي السرطاني الثاني فانه ابتدأ منذ المعاملة الأولى خلال مدتي التعريض. ا ن هذه التأثيرات المعنوية ازدادت بالنسبة لنوعي الخطوط السرطانية مع ازدياد الجرعة والزمن إلا ا نهذه الزيادة لم تكن خطية دائماً .

Effect of Salicyl hydroxamic acid on growth of tumer cell line *in vitro*

A.A. Thaker* , S. A. Ahmed and R. M. Rasheed*****
**College of Education\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 Salicyl hydroxamic acid (synthesized in the laboratory).Two cell lines were used ,the first from epidermal laryngeal and the second from mammary glands of mice(Iraq center for cancer and medical genetics research).

No considerable cytotoxic effect was detected for this compound on the first cell line until the concentration of (250 µg/ml) for the first exposure periode of 24 hours, whereas the effect of compound observed at the concentration of 62.5 µg/ml at the two exposure time . The cytotoxic effect of this compund increases with both dose and time.

المقدمة

ينتمي Salicyl hydroxamic acid إلى مجموعة الحوامض العضوية الضعيفة حيثتتكون طبيعياً ، وتنتشر هذه الحوامض المسماة Hydroxamic acid في أنسجة النباتات والبكتريا والفطريات. ولهذه الحوامض ومشتقاتها أهمية متغايرة في حقول الطب والبايولو جي. اكتشفت هذه الاحماض من قبل Virtanen

و Wahlross في العام 1959 ومنذ ذلك الحين نالت الكثير من الاهتمام في مجال الأدوية والسموم وفي حقل الط بـ أيضاً (1).

تتفاعل هذه الحوامض مع البروتينات والأحماض النووية وتمتلكتأثيراً مثبطاً لمختلف الإنزيمات، ولقد أظهر ت العديد من نظائر هذه الأحماض فعالية تثبيطية لعملية تضاعف الـ DNA وذلك من خلال تثبيط فعالية الإنزيم Reverse transcriptase (RNR). وهو الإنزيم المسؤول عن حث عملية تحول الحمض النووي RNA إلى DNA مما جعله هدفاً للعديد من العوامل المضادة للسرطان (2).

درست الخصائص المضادة للسرطان لبعض أحماض Hydroxamic acid ومنها المركب Chlorohydroxamic acid إذ وجد انه مثبط لنمو الخلايا السرطانية Ehrlich Ascites (EAC) Carcinoma من خلال إعاقة عملية بناء الـ DNAو وبالتالي تأثيره على تكوين البروتين. أما المركب benzo hydroxamic acidفقد اظهر تأثيراً معنوياً مضاداً للورم وان معقداته مع النحاس Cu - benzo hydroxamic acid كانت ذات تأثير معنوي واضح ضد الأورام (3). كما واستخدم المركب Doseferrioxamine وهو من مركبات الـ trihydroxamic acid في علاج مرضى فرط الحديد لإزالة الحديد الفائض.

ان الطيف الواسع من الأهمية الفسلجية لأحماض hydroxamic acid وتطبيقاتها في حقول الطب(5) كان سببا في إجراء هذه الدراسة لتقصي فعالية المركب على الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي.

المواد وطرق العمل

- **تحضير مركب Salicyl hydroxamic acid.**

حضر المركب حسب طريقة Vogel (6) والتي تتضمن ما يأتي :

1. يذاب 5 غرام من هيدروكسيل امين هيدروكلوريد NH_2OH . HCl في 50 مل من الميثانول المطلق وتمت إذابته بالكامل.
2. أضيف 10 مل من Methyl Salicylate إلى المحلول المحضر في الخطوة الأولى مع التحريك المستمر.
3. أضيف 10 مل من هيدروكسيد الصوديوم (10%) NaOH.
4. سخن المزيج في حمام مائي لمدة 20–25 دقيقة.
5. ترك المحلول ليبرد في الثلاجة ولمدة 24 ساعة.
6. فصل الراسب وغسل بالميثانول للحصول على الراسب البلوري ابيض اللون والذي يمثل المرك بـ Salicyl hydroxamic acid

- **الزرع النسيجي Tissue culture**.

تم تحضيرالوسط الزرعي الخاص بالزرع النسيجِ ي وفقا لطريقة Freshney (7) الخاصة بالزرع النسيجي حيث يتكون من الوسط الزرعي من:

10.4 gm	RPMI-1640 with hepes and L-glutamin
15 ml	Sodium bicarbonate
0.5ml	Streptomycin
0.5ml	Crystalline pencilline(100000 I.U)
100 ml	Bovine serum

أكمل الحجم إلى 1 لتر بإضافة ماء مقطر، وعقم بمرشح غشائي Nalgen ذو ثقوب (0.22 um)، ثم حضن الوسط بدرجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24–72 ساعة للتأكد من خلوها من الملوثات، ثم حفظت بدرجة حرارة –20 درجة مئوية لحين الاستعمال.

- **الخطوط الخلوية Cell Lines.**

1– الخط الخلوي السرطاني Human epidermoid Laryngeal Carcinoma (HeP-2)

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

2 – الخط الخلوي السرطاني Ahmed-Mohammed-Nahi- 2003(AMN-3)

وهو سرطان الغدة اللبنية (Mammary adenocarcinoma) لإناث فئران نوع Balb/c المصابة بسرطان الغدة اللبنية التلقائي من المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية.

- **اختبار سمية Salicyl hydroxamic acid على نمو الخطوط الخلوية السرطانية.**

تم تحضير المحاليل وفقا لطريقة Abdul-Majeed (8):

حضرت المركب Salicyl hydroxamic acid عن طريق إذابة 0.02 غرام منه في 10 مللتر من المذيب {الوسط SFM + (DMSO) Dimethyl sulf oxide} ثم عقم باستعمال مرشح ذو ثقوب بقطر 0.22 مايكرون وحضرت منه أربعة تراكيز مختلفة هي (62.5،125،250،500) مايكروغرام/مليلتر وتحت ظروف معقمة. استخدمت جميع التراكيز المحضرة مباشرة بعد إكمال 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 الخالي من السيرم (لان السيرم مثبط لفعالية التربسين)، بعد ذلك غسل المحلول وعدل الوسط الزرعي بوسط جديد يحتوي على سيرم العجول. ثم مزج عالق الخلايا جيدا وتم نقل 0.2 مليلتر بعد كل مزجة 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 دار ئ الفوسفات 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،قرئت النتائج باستخدام جهاز الاليزا بطول موجي 492 نانومتر.

تم إجراء التحليل الإحصائي بإيجاد قيمة اقل فرق معنوي عند مستوى احتمالية 5% للمقارنة ما بين المتوسطات لعاملي التركيز والوقت.

النتائج

- **الخط الخلوي السرطاني Hep – 2.**

الجدول رقم (1) يوضح نتائج التحليل الإحصائي الخاصة بالتأثيرات السمية للتراكيز المختلفة من المركب Salicylhydroxamic acid خلال مدتي تعريض 24 و84 ساعة في تثبيط نمو خلايا الخط الخلوي السرطاني Hep – 2.

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

متوسطات الكثافة الخلوية			تركيز Salicylhydroxamic acid مايكرو غرام / مليلتر
$\overline{X}_C$	48	24	
0.634	0.624	0.644	0
0.583	0.532	0.635	62.5
0.540	0.455	0.626	125
0.514	0.430	0.598	250
0.445	0.343	0.547	500
	0.476	0.610	$\overline{X}_t$

$L.S.D\ \ P \geq 0.05\ \ T*C = 0.03009\ \ \ C = 0.02127\ \ T = 0.01345$

يتضح من هذه النتائج ان بداية التأثير المعنوي لهذا المركب خلال مدة التعريض 24 ساعة كانت عند المعاملة 250 مايكروغرام/ مليلتر فيما بدأ تأثيره المعنوي في مدة التعريض 48 ساعة عند المعاملة الأولى 62.5 مايكروغرام/ مليلتر، وان أفضل تأثير معنوي حصل خلال مدة التعريض 48 ساعة عند المعاملة 500 مايكروغرام/ مليلتر أما اقل تأثير معنوي فقد تحقق عند المعاملة 250 مايكروغرام/ مليلتر في مدة التعريض الأولى 24 ساعة.

كذلك يتضح من نتائج التحليل الإحصائي ان خلايا الخط الخلوي السرطاني Hep – 2 كانت أكثر تحسساً تجاه التأثيرات السمية لهذا المركب خلال مدة التعريض 48 ساعة بالمقارنة مع مدة التعريض 24 ساعة وا ذ الفر ق كل معنوياً . وان التراكيز المستخدمة كانت ذات تأثير معنوي وان هذا التأثير ازداد معنوياً مع ازدياد التراكيز المستخدمة.

- **الخط الخلوي السرطاني Amn3 .**

الجدول رقم (2) يبين نتائج تعريض خلايا الخط الخلوي السرطاني Amn3 لأربعة تراكيز مختلفة من المركب Salicylhydroxamic acid خلال مدتي التعريض 24 و 48 ساعة.

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

تركيز Salicylhydroxamic acid مايكرو غرام / مليلتر	متوسطات الكثافة الخلوية		
	24	48	$\overline{X}_C$
0	0.237	0.223	0.230
62.5	0.194	0.192	0.193
125	0.165	0.100	0.132
250	0.131	0.092	0.111
500	0.099	0.097	0.098
$\overline{X}_t$	0.165	0.140	

$L.S.D\ P \geq 0.05\ T*C = 0.007084\ \ C = 0.005009\ T = 0.003168$

تشير النتائج إلى ا ن التأثير المعنوي لهذا المركب بدأ منذ المعاملة الأولى 62.5 مايكروغرام/ مليلتر خلال مدتي التعريض، كما تشير إلى ان جميع التأثيرات كانت معنوية في مدة التعريض الأولى وا ن هذا التأثير ازداد تدريجياً مع ازدياد التركيز. وفي مدة التعريض الثانية كان التأثير المعنوي يزداد تدريجياً إلى حد المعاملة 250 مايكروغرام/ مليلتر ويبين الجدول ان أفضل تأثير معنوي فكان خلال مدتي التعريض تحقق مع المعاملة 250 مايكروغرام/ مليلتر في مدة التعريض الثانية أما اقل تأثير معنوي فكان في مدة التعريض الأولى عند المعاملة الأولى 62.5 مايكروغرام/ مليلتر.

عند المقار نة بين مدتي التعريض نجد ان الخلايا كانت أكثر تأثيراً في مدة التعريض الثانية وان الفرق بين المدتين كان معنوياً. كما أظهر ت التراكيز المستخدمة تأثيراً معنوياً متزايداً مع ازدياد التركيز إذ كان أفضل تأثير معنوي عند المعاملة 500 مايكروغرام/ مليلتر.

المناقشة

تشير النتائج التي تم التوصل إليها إلى وجود تأثير سمي للتراكيز المستخدمة من المركب Salicyl hydroxamic acid في نمو خلايا الخطوط السرطانية خلال مدتي التعريض 24 و48 ساعة. وقد يعزى هذا التأثير إلى امتلاك هذه الأحماض ومشتقاتها القدرة على التأثير على البروتينات والأحماض النووية إضافة إلى تأثيرها المثبط لمختلف الإنزيمات ومنها الإنزيمات المسماة Matrix Metallo Proteinase (MMP) وهي عائلة من الأنزيمات يرتبط وجودها مع تقدم الورم(9). وا ن تأثيرها السمي هذا يعود إلى قدرتها على تثبيط فعالية هذه الإنزيمات من خلال عملية الخلب الدائمية لايونات الزنك والنيكل الموجودة في المواقع الفعالة لها وبالتالي إيقاف نمو وتقدم الخلايا السرطانية (10). إضافة إلى ذلك فان لهذه الحوامض القدرة على تثبيط الأنزيمات المسماة Histone deacetylase (HDACs) وهي عائلة من الأنزيمات التي تنظم عملية تجديد بناء وصيانة الكروماتين Chromatin remodelling وعملية استنساخ الجين من خلال عمليات acetylation and deacetylationللهستون مما جعلها هدفاً علاجياً جذاباً لأمراض السرطان، ويتم ذلك من خلال التأثير على ايونات الزنك في المركز الفعال لهذه الأنزيمات (11).

ا ن هذا الحامض Salicyl hydroxamic acid والذي ينتمي إلى هذه المجموعة من الحوامض اظهر في هذه الدراسةتأثيراً سمياً واضحاً في نمو الخطوط الخلوية السرطانية ونلاحظ ان التأثير المعنوي لهذا الحامض خلال مدتي التعريض كان يزداد مع ازدياد التركيز أي ان التأثيرالسمي كان يز داد باتجاه التركيز الأعلى بالنسبة

لنوعي الخطوط السرطانية وان هذا التأثير كان أكثر وضوحاً عند مدة التعريض الثانية 48 ساعة بالمقارنة مع مدة التعريض 24 ساعة، وهي الظاهرة المسماة بـ Dose and time dependant phenomenon وبشكل عام كان التأثير السمي يزداد مع زيادة التركيز ومدة التعريض أي ان مدة التعريض 48 ساعة أعط ت أعلى شدة قتل من الناحية الإحصائية، أما التباين في شدة التأثير السمي ما بين الخطوط الخلوية فهو ربما يعود إلى الاختلاف في السلوك الايضي، إذ ان لكل خط خلوي سلوكاً ايضياً مختلفاً فضلاً عن اختلاف المستقبلات الموجودة على سطوح الخلايا مما يؤدي إلى تباين الاستجابة للمؤثر الخارجي (Salicylhydroxamic acid).

نستنتج من هذه الدراسة ان المركب Salicyl hydroxamic acid ذو تأثير مهم على الخلايا السرطانية ومن المفيد جدا استكمال الدراسات للمساهمة في المحاولات المستمرة لإيجاد حلا مناسبا لمشكلة الأورام السرطانية.

المصادر

1- Ahmed, E.; Mohamed, M.; Aly, F. & Tantawy, A. (2001). The Role of Hydroxamic acids in Biochemical Processes Med. J. of Islamic Acad. Sci., 14: 107– 114.

2- Elford, H. L.; Wampler, G. L. & Riet, B. V.(1979). New ribonucleotide reductase inhibitors with antineoplastic activity. Cancer Res., 39: 844.

3- Khanam, J. A.; Bag, S. P. & sur, B. (1998). Comparative study of antineoplastic activity of some aliphatic and aromatic hydroxamic acid against ahrlich ascites Carcinoma (EAc) in mice. Med. J. Islamic Acad. Sci., 11: 2.

4- Guido, C. V.; Roberta, S. & Gavino, F. (1999). Oral Iron chelators for clinical use. polyhedron, 18: 3219.

5- Miller, M. J. & Malouin, F. (1994). In The Development of Iron chelators for clinical use. edited by Bergeron, R. J. and Brittenhan, G. M. chapt. 13, CRC Press, Boca Raton, FL.

6- Vogel, A. (1972). Text – book of practical organic chemistry, P1602, Longman.

7- 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.

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

9- Roomi, M. W.; Ivanov, V.; Netke, S. P.; Niedzwiecki, A. & Rath, M. (2003). Inhibitory effect of nutrient synergy, A specific formulation of nutrients Containing lysine, Proline, Ascorbic acid, and Epigallocatechin Gallate, on matrix metallo proteinase Activity and Invasion of Human Fibro sarcoma HT-1080 Cells . FASEB . San Diego, CA, 11-15.

10- Sawa, M.; Kiyoi, T.; Kurokawa, K.; Kumihara, H.; Yamamoto, M.; Miyasaka, T.; Ito, Y.; Hirayama, R.; Inoue, T.; Kirii, Y.; Nishiwaki, E.; Ohmoto, H.; Maeda, Y.; Ishibushi, E.; Inoue, Y.; Yoshino, K. & Kondo, H. (2002). New type of metallo proteinase inhibitor : Design and synthesis of new phosphono hydroxamic acids. J. Med. Chem., 45: 919.

11- Paul, T.; Stefan, S.; Bernhard, H.; Wolfgang, W.; Florian, S. & Rolf, R. (2004). Expressional changes after histone deacetylase inhibition by Valproic acid in LNCaP human prostate Cancer Cells. J. oncology, 24: 25 – 31.