مقارنة تأثير معقد النحاس (II) الجديد والمستخلص المائي لنبات المردقوش Origanum Vulgare L. مع عقار السايكلوفوسفومايد على نمو الخط الخلوي L20B.

جنان حسين مرتضى

قسم الكيمياء، كلية العلوم للبنات، جامعة بغداد.

الخلاصة

يعد نبات المردقوش origanum vulgare L. من النباتات الطبية المستخدم ة لعلاج الالتهابات الصدرية والقصبية وغيرها. كما يعتبر النحاس احد العلاجات الكيمياوية المستخدمة كمضاد للسرطان من خلال تأثيرها السمي الخلوي اتجاه انواع من الخطوط الخلوية السرطانية. تم دراسة تأثير المركبات الفعالة لمستخلص نبات المردقوش Origanum Vulgare L. وتأثير معقد النحاس (II) المحضر الجديد على الخط الخلوي L20B المحور وراثياً مقارنة مع العقار الكيمياوي ذو التأثير السمي الخلوي سايكلوفوسفومايد cyclophosphamide (cp) كسيطرة موجبة،من خلال توظيف نظام خارج جسم الكائن الحي *in vitro* عن طريق دراسة معدلات النسب المئوية للتثبيط على نمو الخط الخلوي L20B لارومة الخلايا الليفية للفئران المحورة وراثياً. تم مـن خلالـه استخـدام اربـع تراكيـز هـي (250,125,62.5,31.25) مايكـروغرام/مل ضمن مدتي تعريض (72,48) ساعة. وقد اظهرت النتائج زيادة النسبة المئوية للتثبيط بزيادة التركيز من خلال وجود فروق معنوية بمستوى احتمالية ($p< 0.05$) لكل من المستخلص المائي لنبات المردقوش ومعقد النحاس (II) مقارنة بعقار السايكلوفوسفومايد (cp)، وعدم حصول اي تأثير لزيادة فترة التعريض على النسب المئوية للتثبيط كما بينت الدراسة تأثير المستخلص المائي لنبات المردقوش ومعقد النحاس (II) مشابهة لتأثير العقار (cp) ذو التأثير السمي الوراثي حيث لم تظهر فروق معنوية بينهم بالتراكيز المستخدمة .وقد بلغت مستويات التثبيط 52.41% ,58.21% ,58.93% على التوالي عند التركيز 250 مايكروغرام/ مل خلال مدة تعريض 72 ساعة.

المقدمة

السرطان مرض متعدد العوامل multifactorial يستحث او يحفز بواسطة عوامل خارجية وعمليات داخلية وتزداد فعاليته نتيجة خلل في الخلايا وهذا الخلل ينتج من تأثير العامل نفسه او نتيجة عوامل اخرى كيمياوية او نواتج داخليـة، توفـر الخطوط السرطانيـة للباحثين في مجال السرطان اعداداً كبيرة من الخلايا السرطانية وبسبب اهمية هذه الخطوط ، فقد تم استحداث عدد كبير من الخطوط السرطانية والطبيعية من اعضاء مختلفة من جسم الكائن الحي سواء من الانسان او اللبائن الاخرى (الفأر،الجرذ وغيرها) [1].

يعتبر عقار السايكلوفوسفومايد 2H-1,3,2-Oxaza phosphorin,2-[bis-2chloroethyl) amino]tetra hydro-2-Oxide) احد العقاقير المضادة للسرطان غير فعال يتطلب تنشيط ايضي بدائي يتحول الى 4-hydroxy cyclophosphamide لتظهر فعاليته وهو يمتلك اشكال تأيضية اخرى، وقد عرف التأثير السمي الخلوي للعقار من خلال مختلف الفحوصات التي اجريت داخل جسم الكائن الحي وخارجه. وهو من المواد ذات التأثير القلوي فهو مصدر مطفر ومسرطن مسبباً التشوهات الخلقية من خلال كسر وربط اشرطة الـ DNA(cross-linking) في الخلايا اللمفاوية لاشخاص مصابين باللوكيميا المزمنة وكذلك في خلايا نقي العظم للفئران [2]. من العلاجات الكيمياوية المضادة للسرطان هي معقدات النحاس (II) حيث اثبتت الدراسات قدرتها على احداث السمية الخلوية كمواد مضادة للاورام السرطانية من خلال تأثيرها على نمو الخلايا الورمية المزروعة للانسان والفئران خارج جسم الكائن الحي *in vitro* وذلك بتثبيط تصنيع الـ DNA وتأثيرها الرئيسي على مسار البيورين [3]. وقد تم تقييم مجموعة من معقدات النحاس (II) المتضمنة مشتقات Salicyl aldehyde pyrazole التي اثبتت سميتها الخلوية اتجاة الخط الخلوي السرطاني A-549 من سرطان الرئة

للانسان مسببه موت الخلايا المبرمج Apoptosis[4]. كما وجد ان معقدات Cu-Thio semi carbazone المعوضة بالمجموعة 3-Acyl Pyridazines او المجموعة 4-acetyl Pyrimidine تعمل كمواد مضادة للورم السرطاني لسرطان الدم اللمفاوي وسرطان القولون في الانسان [5]. وقد اشارت الدراسة التي قام بها Dichen وجماعته [6] الى تأثير معقد Cu-Disulfiram من خلال تثبيط عمل انزيم Aldehyde dehydrogenase كما لها القدرة على تثبيط فعالية الـ Proteasome لخلايا سرطان الثدي المزروعة MDA-MB-231 وذلك بتثبيط نمو الخلايا الورمية. كما لوحظ التأثير السمي لمعقدات النحاس (I)و(II) على الخط الخلوي السرطاني PA-1 لخلايا سرطان مبيض الانسان [8,7]. لقد اتجهت انظار الباحثين في السنوات الاخيرة الى دراسة المركبات الموجودة في الاعشاب الطبية في محاولة لعلاج السرطان، حيث نجحت هذه الدراسات باستخدام المستخلصات النباتية ومركباتها الفعالة في تثبيط خطوط الخلايا السرطانية ومنها الدراسة التي قام بها Lopoz وجماعته [9]، حيث وجد ان المستخلص المائي لنبات القمعية الارجوانية *Digitals Purpuree L.* تأثير تثبيطي ضد خط Tk-10 لسرطان الكلية في الانسان. يمثل نبات المردقوش احد النباتات الطبية المتوطنة في حوض البحر المتوسط، الجزيرة العربيـة، مصـر، العـراق وغيـرها. يعـود الى العائلة Lamiaceae ويتبع الجنس Origanum والاسم العلمي Origanum Vulgare L.، يحتوي نبات المردقوش على العديد من المركبات الكيميائية الفعالة مثل Terpinolene, Sabinene, Thymol, Quercetin, apigenin, Linalool, وغيرها [10]. وقد وجد ان مستخلص نبات المردقوش لها القدرة على حماية الخلايا من مختلف انواع التلف وخاصة الناتجة عن الاكسدة،كما وجد للمستخلص تأثير سمي على الخطوط الخلوية السرطانية لسرطان الدم اللمفاوي مسببة موت الخلايا المبرمج[11].

الغرض من الدراسة هو مقارنة تأثير المستخلص المائي لنبات المردقوش ومعقد النحاس (II) المحضر لاول مره والذي صيغته الكيميائية 2-Amino-5-[2-amino-5-(3,4,5-trimethoxy-benzyl)-Pyrimidinyl-4-azo]-phenol.copper(II) على نمو خط خلايا L20B لأرومة الخلايا الليفية للفئران المحورة وراثياً مع العقار السام وراثياً سايكلوفوسفومايد (cp) سيطرة موجبة عند تراكيز مختلفة وخلال مدتي تعريض (72,48) ساعة.

المواد وطرائق العمل

تم تحضير المواد ادناه (معقد النحاس (II)، المستخلص المائي لنبات المردقوش، عقار السايكلوفوسفومايد (cp) في مختبرات قسم الكيمياء/كلية العلوم للبنات، وقد تم اختبار سمية المركبات المختلفة على نمو الخط الخلوي L20B بالتعاون مع مركز بحوث التقنيات الاحيائية جامعة النهرين خلال مدة البحث.

1- تحضير عقار السايكلوفوسفومايد *Cyclophosphamide*

تم استخدام عقار السايكلوفوسفومايد (cp) والمجهز من شركة Ebewe الاسترالية بتركيز 5 ملغم/ مل.

2- تحضير معقد النحاس Cu(II)

جهزنا بالمعقد 2-Amino-5-[2-amino-5-(3,4,5-trimethoxy - benzyl) – Pyrimidinyl – 4 - azo] - phenol.copper (II) من كلية العلوم للبنات/ قسم الكيمياء [12]. وقد تم اذابة 10ملغم من المعقد في 10مل من المحلول المنظم (Ph=7.4,Nacl 0.9%). وحفظ المحلول كخزين (stock).

3- تحضير المستخلص المائي لنبات المردقوش.

تم استخلاص المواد غير المتطايرة من نبات المردقوش باستخدام جهاز الاستخلاص، حيث تم وزن 15غم من نبات المردقوش ووضع في الانبوب المرشح Thimble المثبت في جهاز الاستخلاص ثم يوضع 100 مل من الماء المقطر في دورق دائري (دورق الاستخلاص) وقد استخدم كمذيب مناسب لاستخلاص المواد غير المتطايره، بعد الاستخلاص يحول جهاز الاستخلاص الى جهاز تقطير للحصول على المسحوق النهائي وحفظ في قنينـة معقمـة. حيـث بلـغ وزن المستخلـص المجفـف 0.5gm (33%).

4- الكشف الكيميائي (الاستدلالي) عن المركبات الفعالة في المستخلص المائي لنبات المردقوش.

اتبعت طريقة Ayoola وجماعته [13] في تحضير المواد الخاصة بالكشف عن المركبات الفعالة الممكن وجودها في المستخلص المائي،وفي الكشف عن المركبات الثانوية في المستخلص المائي والتي تشمل الفينولات phenols، التربينات Trepens، القلويدات Alkaloids، الكلايكوسيدات Glycosides، التانينات Tanens، الستيرويدات steroids، الراتنجات Resins والفلافونيدات Flavonoids.

5- المواد الخاصة بدراسة تأثير المستخلص المائي ومعقد النحاس (II) وعقار (cp) على نمو الخط الخلوي المحور وراثياً L20B.

تم تحضير المحاليل وفقاً لطريقةSalmman [14] .

6- الخط الخلوي المحور وراثياً L20B.

تم العمل على الخط الخلوي L20B عند التمريره 13 وهو عبارة عن ارومة الخلايا الليفية للفئران المحورة وراثياً. وهذا الخط تم تنميته على وسط زرعي MEM/ شركة sigma والمجهز بــ 10% من مصل جنين البقر Fetal calf serum / شركة Ginnagen وعند تكون الطبقة الاحادية Confluent monolayer المغطية لكل ارضية الوعاء الزرعي يتم معاملة الخلايا بمحلول التربسين/ فرسين/ شركة Usbiolgical بمقدار 2-5 مل ولمدة 5-10 دقائق وذلك لتهيئة المزرعة الثانوية.

7- تهيئة الوسط الزرعي وخطوط الخلايا.

تم تهيئة الوسط الزرعي وفقاً لطريقة Freshney [15] وذلك بخلط مكوناته ومن ثم عقم الوسط باستعمال مرشح ذي ثقوب 0.22 مايكرون، وزع الوسط الزرعي في قناني زجاجية ذات غطاء محكم سعة 200 مل وحفظت القناني بدرجة 20°م لحين الاستعمال. تمت تنمية الخط الخلوي L20B في قناني الزرع النسيجي سعة 25م^2 وذلك بتوفير كل مايحتاجه الخط لاجراء الزرع الثانوي.

8- اختبار سمية المستخلص المائي ومعقد النحاس (II) والعقار (cp) على نمو خط الخلايا المحورة وراثياً L20B.

-حضر كل من المستخلص المائي ومعقد النحاس (II) باذابة 10 ملغم من كل منها في 20مل من المحلول المنظم (pH=7.4,Nacl %0.9) والمعقم بمرشح ذي قطر 0.2um في ظروف معقمة وحفظت المحاليل كخزين (Stoc).

-تم تحضير اربعة تراكيز نهائية لكل من المستخلص المائي ومعقد النحاس(II) والعقار (cp) باستعمال المحلول المنظم وهي (250,125,62.5,31.25) مايكروغرام/ مل وتحت ظروف معقمة، وقد استخدمت التراكيز المحضرة جميعاً بعد اكمال عملية التحضير.

-حضر عالق الخلايا وفقاً لطريقة freshney[15] عن طريق معاملة قنينة الزرع النسيجي حجم 25سم^2 بمحلول التربسين/ فرسين،ثم اضيف له 20 مل من الوسط الزرعي الحاوي على المصل 10% ثم مزج عالق الخلايا جيداً وتم نقل 0.2 مل بعد كل مزج جيد الى حفر طبق معايرة الزرع النسيجي ذي القعر المسطح باستعمال ماصة اوتوماتيكية Micropipte. يترك الطبق في الحاضنة بدرجة 37°م لمدة 24 ساعة لحين التصاق الخلايا في الحفر مكونة الطبقة الاحادية وبعدها التخلص من الوسط الزرعي القديم الموجود في الحفر وتم اضافة 0.2 مل من التراكيز المحضرة سابقاً لكل من المستخلص المائي ومعقد النحاس(II) والعقار (cp) وبواقع ثلاث مكررات لكل تركيز. فضلاً عن تحضير ثلاث مكررات كسيطرة سالبة (L20B+محلول منظم) وحضنت الاطباق بدرجة 37°م. بعد مرور مدة التعريض (Exposure time) المحددة للحضن (72,48) ساعة، يخرج الطبق من الحاضنة وازيل الوسط الزرعي ثم يضاف له محلول صبغة البنفسج البلوري المحضر وفقاً لطريقة Duguid[16] للحفر الحاوي على الخلايا جميعاً وبحجم 0.2 مايكرولتر لكل حفرة. يعاد الطبق مرة ثانية الى الحاضنة ليحضن لمدة 20 دقيقة، بعدها يخرج الطبق ويجري التخلص من المحلول بغسل الخلايا بالماء المقطر

لحين زوال الصبغة الزائدة التي تكون الخلايا الحية قد اصطبغت بها.

- اما الميتة فقد ازيلت لانها فقدت خاصة الالتصاق. بعد ذلك تجفف الاطباق لتهيئتها للقراءة .قراءة النتائج باستخدام جهاز الاليزا بطول موجي 492 نانومتير.

9- قياس النسبة المئوية لتثبيط الخلايا.

يتم تحويل قيم التأثير التثبيطي للمستخلص المائي ومعقد النحاس(II) وعقار(cp) سيطرة موجبة الى نسبة مئوية وفق المعادلة الاتية:

$$\text{النسبة النسبة المئوية لتثبيط الخلايا} = \frac{\text{قراءة امتصاصية السيطرة السالبة} - \text{قراءة امتصاصية المعاملة}}{\text{قراءة امتصاصية السيطرة السالبة}} \times 100$$

10- التحليل الاحصائي

اخضعت نتائج الدراسة الى التحليل الاحصائي لغرض معرفة الفروق المعنوية بين التراكيز المستخدمة لكل من المستخلص المائي ومعقد النحاس (II) الجديد مقارنة بالعقار السايكلوفوسفومايد (cp) سيطرة موجبة .تم تحليل النتائج باستخدام اختبار (SPSS)ANOVA حيث تم ايجاد المعدل± الخطأ القياسي على مستوى احتمالية $p< 0.05$.[17].

النتائج والمناقشة

تم دراسة تأثير المستخلص المائي لنبات المردقوش ومعقد النحاس (II) الجديد مقارنة بالعقار سايكلوفوسفومايد (cp) السام خلوياً.

- **نتائج الكشف الاستدلالي (النوعي) للمركبات الفعالة في نبات المردقوش**

تم الحصول على نتائج الكشف الاستدلالي لبعض المركبات الفعالة لنبات المردقوش كما موضح في الجدول رقم (1).

جدول رقم (1)

نتائج الكشف الاستدلالي للمركبات الفعالة في نبات المردقوش.

	المركب الكيميائي	الكاشف المستخدم	دليل الكشف	النتيجة
1	التانينات Tanens	a.خلات الرصاص 1% b.كلوريد الحديديك 1%	راسب ابيض هلامي اخضر مزرق	+ +
2	الكلايكوسيدات Glycosids	كاشف بندكت	راسب احمر	+
3	الفلافونات Flavonoids	كحول اثيلي+ هيدروكسيد البوتاسيوم	راسب اصفر	+
4	الفينولات Phenols	كلوريد الحديديك 1% خلات الرصاص1 % هيدروكسيد البوتاسيوم	راسب اخضر مزرق راسب ابيض هلامي لون اصفر	+ + +
5	الصابونيات saponins	رج المستخلص	رغوة كثيفة	+
6	الراتنجات Resins	كحول اثيلي 95% غليان ← 4% HCl	عكورة	+
7	التربيينات Trepenoids	كلوروفورم← حامض الخليك اللامائي+ H_2SO_4	لون بني	+
8	الستيرويدات steroids	نفس كاشف التربينا ت لكن يترك لمدة يوم حتى يظهر اللون الازرق	لون ازرق داكن	−
9	القلويدات Alkaloids	كاشف ماير	راسب ابيض	−

(+) تدل على ايجابية الكشف.

(−) تدل على سلبية الكشف.

- **دراسة التأثير السمي الخلوي**

تم دراسة التأثير السمي لكل من المستخلص المائي لنبات المردقوش ومعقد النحاس (II) مقارنة بالعقار (cp)

على نمو الخط الخلوي المحور وراثياً L20B خلال مدة تعريض 48 ساعة وقد اظهرت النتائج المبينة في الجدول رقم (2) وجود تأثير سمي لكل من المستخلص المائي ومعقد النحاس (II) مقارنة بالعقار (cp) سيطرة موجبة من خلال زيادة النسبة المئوية للتثبيط بازدياد التركيز حيث ظهرت فروق معنوية بمستوى احتمالية $p < 0.05$ لكل من المستخلص المائي ومعقد النحاس (II) وان اعلى مستوى للتثبيط عند التركيز 250 مايكروغرام حيث بلغت (51%) لكل من المستخلص المائي ومعقد النحاس(II). كما لم تظهر النتائج اي فروق معنوية بين المستخلص المائي ومعقد النحاس(II) مقارنة بالـــعقار (cp) ولاربع تراكيز مستخدمة (250,125,62.5,31.25) مايكروغرام/مل وكما يلي:-

جدول رقم (2)

معدلات النسب المئوية للتثبيط خلال مدة تعريض 48ساعة.

المجاميع / التراكيز µg /ml	معدل النسبة المئوية لتثبيط الخلايا (المعدل ± الخطأ القياسي) العقار (cp)	المستخلص المائي لنبات المردقوش	معقد النحاس (II)
31.25	B,a 21.07±4.375	C,a 15.42±4.529	C,a 18.54±5.856
62.5	B,a 28.42±5.698	BC,a 27.21±4.219	BC.a 32.06±2.137
125	B,a 30.77±7.693	AB,a 39.863±7.046	AB,a 40.10±5.496
250	A,a 52.97±7.395	A,a 51.41±8.330	A,a 51.13±11.583

- ❖ الاحرف الكبيرة المختلفة تعني وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية $p < 0.05$ بين معدل العمود الواحد.
- ❖ الاحرف الصغيرة المختلفة تعني وجود فروق معنوية.
- ❖ عند مستوى احتمالية $p < 0.05$ بين معدل الصف الواحد.

كما يوضح الجدول رقم (3) ارتفاع النسبة المئوية للتثبيط مع ازدياد التركيز لكل من المستخلص المائي ومعقد لنحاس (II) مقارنة بالعقار (cp) خلال مدة تعريض 72 ساعة حيث ظهرت فروق معنوية بمستوى احتمالية $p < 0.05$ ولم تبين النتائج وجود فروق معنوية بين عقار (cp) ومعقد النحاس (II) والمستخلـص المائـي لنبـات المردقوش.

جدول رقم (3)

معدلات النسب المئوية للتثبيط خلال مدة تعريض 72ساعة.

المجاميع / التراكيز µg /ml	معدل النسبة المئوية لتثبيط الخلايا (المعدل ± الخطأ القياسي) العقار (cp)	المستخلص المائي لنبات المردقوش	معقد (II) النحاس
31.25	B,a 28.76± 4.573	C,a 18.48± 1.526	B,a 23.39± 3.871
62.5	B,a 35.12± 6.352	BC,a 28.217± 4.219	B.a 38.450± 8.894
125	AB,a 43.57± 10.445	AB,a 42.86± 7.046	AB,a 38.20± 8.275
250	A,a 58.93± 12.33	A,a 52.41± 8.33	A,a 58.21± 15.017

- ❖ الاحرف المختلفة الكبيرة تعني وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية $p<0.05$ بين معدل العمود الاول.
- ❖ الاحرف المختلفة الصغيرة تعني وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية $p<0.05$ بين معدل الصف الواحد.

كما يبين الجدول رقم(4) مقارنة معدلات النسب المئوية للتثبيط خلال مدتي تعريض (48 و72) ساعة لكل من المستخلص المائي ومعقد النحاس (II) مقارنة بالعقار (cp) حيث لم يظهر اي تأثير لزيادة مدة التعريض على معدلات النسب المئوية للتثبيط اي لم تظهر فروق معنوية بينهم عند استخدام التراكيز المستخدمة.

جدول رقم (4)

معدلات النسب المئوية للتثبيط خلال مدتي تعريض (48،72) ساعة.

مدة التعريض التركيز µg /ml	معدل النسبة المئوية للتثبيط (المعدل ± الخطأ القياسي)					
	عقار (cp)		المستخلص المائي لنبات المردقوش		معقد (II) النحاس	
	ساعة 48	ساعة 72	ساعة 48	ساعة 72	ساعة 48	ساعة 72
31.25	a 21.07 ± 4.375	a 28.76 ± 4.573	a 15.42 ± 4.526	a 18.42 ± 4.526	a 18.54 ± 5.856	a 23.39 ± 3.871
62.5	a 28.42 ± 5.698	a 35.12 ± 6.352	a 27.21 ± 4.219	a 28.21 7± 4.219	a 32.06 ± 2.137	a 38.42 ± 8.894
125	a 30.77 ± 7.693	a 43.57 ± 10.445	a 39.86 ± 7.046	a 42.86 ± 7.046	a 40.10 ± 5.496	a 38.20 ± 8.275
250	a 52.97 ± 7.395	a 58.93 ± 12.33	a 51.41 ± 8.33	a 52.41 ± 8.33	a 51.13 ± 11.583	a 58.21 ± 15.017

* الاحرف المتشابهة الصغيرة تعني عدم وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية $p< 0.05$ بين معدل الصف الواحد.

ويلاحظ في الجدول رقم (5) الارتباط بين التركيز ومعدلات نسب التثبيط لخلاياالخط المحورة وراثياً L20B حيث بينت النتائج وجود علاقة طردية قوية بين التركيز والنسب المئوية للتثبيط لكل من المستخلص المائي ومعقد النحاس (II) خلال مدتي تعريض (48و72)ساعة كما موضح بالجدول الاتي:-

جدول رقم (5)

الارتباط بين التركيز ومعدلات النسب المئوية للتثبيط

مدة التعريض / المجاميع	48 ساعة	72 ساعة
عقارالسايكلوفوسفومايد (cp)	+0.98	+0.99
المستخلص المائي لنبات المردقوش	0.957	+0.960
معقد النحاس (II)	+0.943	+0.96

* علاقة طردية +
* علاقة ضعيفة 0.0–0.4
* علاقة متوسطة 0.5–0.7
* علاقة قوية 0.8–0.9
* علاقة تامة 1

تتباين طرائق الاستخلاص من البسيطة الى المعقدة بحسب طبيعة المواد والمركبات الفعالة المراد استخدامها. هناك عدة طرق للاستخلاص منها طرق عامة واخرى خاصة، ومن هذه الطرق هي طريقة التنقيع والعصر والاستخلاص بجهاز السكسوليت والتقطير بالبخار وغيرها [18]. حيث تبين النتائج الموضحة في الجدول رقم (1) ان المستخلص المائي لنبات المردقوش يحتوي العديد من المكونات الفعالة وهي الفلافونيدات والفينولات والتانينات والتريبينات وغيرها. ومن اهم المركبات الفلافونيدية Flavonoids هي Quercetin، Luteolin، apigenin وغيرها، وقد وجد ان لهذه المركبات تأثير سمي على نمو الخطوط الخلوية السرطانية خارج جسم الكائن الحي وداخلة وعدت على اساسها مواد علاجية للسرطان [10]، تعمل هذه المركبات كمواد مضادة للتكاثر Antiproliferation، اذ وجد ان مركب Quercetin يعمل على تثبيط الخطوط الخلوية السرطانية Colon carcinoma(HT29) و Leukemia HL-60. كما ان وجود التانينات في المستخلص يؤثر على الخلايا السرطانية من خلال دخولها الموت المبرمج Apoptosis وتوقف الدورة الخلوية عند احد اطوار المرحلة البينية (G_1,S,G_2)[19] وكذلك عملها كمواد مضادة للاكسدة من خلال ازالة الجذور الحرة [12]. وقد توصل Sadeghi وجماعته [20] الى ان التريبينات المعزولة من نبات *Daphne mucronata* دور تثبيطي على الخط السرطاني Human myelogenous Leukemia K562 وذلك من خلال عملها على ايقاف الدورة الخلوية عند الطور G_1-Phase. ان النتائج التي توصل اليها الباحثون في دراستهم تدعم النتائج التي توصلت اليها الدراسة الحالية في امكانية استخدام نبات المردقوش في هذا المجال لانه غني بالمركبات الفعالة.

كما اظهرت النتائج تأثير معقد النحاس (II) الجديد على نمو الخط الخلوي المحور وراثياً L20B من خلال زيادة نسبة التثبيط بزيادة التركيز والذي يقارب تأثير عقار السايكلوفوسفومايد (cp) السام وراثياً. وقد يعزى هذا التأثير

الى ارتباط الليكاند Ligand العضوي في المعقد مع النحاس الموجود في الخلايا الورمية مكونة مثبطات قوية لــ Proteasome ومحفزه موت الخلايا المبرمج [7]. ان الليكاند المرتبط بأيون النحاس (II) في المعقد المحضر لاول مرة هو احد مركبات الازو، حيث اشارت الدراسة التي قام بها Tsuda وجماعتة [21] على خلايا القولون والكبد السرطانية في الفئران، وجود تأثير سمي لمركبات الازو من خلال تلف الــ DNA عند اعطاء تراكيز عالية خلال مدة قصيرة، وقابليتها على التسرطن عند المعاملة لفترة طويلة وبجرعات قليلة. كما تستخدم مركبات الازو كعقار لسرطان القولون [22]. كما بينت الدراسة التي قام بها Xiao وجماعتة [23] ان معظم معقدات -Cu(II) Schiffbase تسبب الموت المبرمج Apoptosis لخلايا سرطان الدم وسرطان الثدي في الانسان، وقد تعزى الفعالية البايولوجية لقواعد شف هي قابليتها الى تكوين معقدات كلابية مستقرة مع الفلز الانتقالي الموجود في الخلية. كما اوضحت النتائج مقارنة تأثير كل ممن المستخلص المائي لنبات المردقوش ومعقد النحاس (II) مع العقار (cp) وهو عقارمعروف تأثيره على شريط الــ DNA من خلال كسر احد الشريطين single- strand break. فقد اشارت الدراسة التي قام بها Hengstler وجماعتة [24] التي اجريت على الخط الخلوي Chinese hamster lung fibroblasts(V79) الى قدرة العقار (cp) على احداث ضرر في شريط الــ DNA بعد فترة تعريض 24 ساعة وتتفق هذه النتيجة مع الدراسة التي قام بها Pillans وجماعتة [25] على تأثير عقار cp على الفئران الحوامل (C3H) من خلال احداث كسر بالاشرطة بعد تعرضها للجرعة لمدة 11 يوم وقد لوحظ ان التلف يزداد بازدياد الوقت والتركيز. **الاستنتاج** ان النتائج التي تم التوصل اليها في هذه الدراسة اشارت الى زيادة معدلات النسب المئوية للتثبيط على الخط الخلوي المحور وراثياً L20B وبالتراكيز الاربعة المستخدمة خلال مدتي تعريض (72,48) ساعة. وقد تبين امتلاك معقد النحاس (II) الجديد والمستخلص المائي لنبات المردقوش تأثير مقارب الى تأثير عقار السايكلوفوسفومايد ذو التأثير السمي الخلوي. وقد كشفت الدراسة عن وجود تأثير سمي وراثي لكل من المستخلص المائي ومعقد النحاس (II) بالجرعة الواطئة وقد ازدادت بالجرعة العالية.

المصادر

[1] Edword, A.S. and Dan,L., "Harrison's, *Principles of internal medicine*", Mc Graw Hill company, USA, 520-521,2008.

[2]Deneve, W.; Valeriote, F.; Edelstein, M.; Everett, C. and Bischoff, M., 1989, "*In vivo* DNA cross-linking by cyclophosphamide: comparision of human chronic Lymphatic Leukemia cells with mous L1210 Leukemia and bone marrow cell",*Cancer Res.*, **49**(7), 1450-1459, 1989.

[3] West, D.X.; Liberta, A.E.; Rajendran, K.G. and Hall, I, H., "The cytotoxicity of copper (II) complexes of hetro cyclic thiosemicarbazones and 2- substituted Pyridine N-oxides", *Anti-cancer drugs*, **4**(2), 241-249, 1993.

[4] Chuan Dong, F.; Hua, S.; Fing, Z.; Baoxiang, Z.; Shangli,Z. and Junying,M., "Anovel copper complex of salicyldehyde Pyrazole hydrazone induces apoptosis through up- regulating integrin B4 in H322 lung carcinoma cells", *European Journal of medicinal chemistry*, **45** (4), 1438-1446, 2009.

[5] Johnny, E.; Gerhard, P.; Gottfried,H.; Thomas, R.; Heinz, H.; Wolfgang, H. and walter,J.," Synthesis, cytotoxicity, and Antitumor activity of copper (II) and Iron (II) complexes of N-Azabicyclo [3.2-2] nonane thiosemicarba zones derived fromacyle diazines", *J.Med.chme.*, **44** (13), 2164-2171, 2001.

[6] Dichen, R.; Qiuzhi, C.; Huanjie, Y. and PingDou, Q., "Disulfiram, aclinically used anti-alcholism drug and copper-binding agent, induced apoptotic cell death in breast cancer cultures and xeno grafts via inhibition of the proteasome activity", *Cancer Res*., **66** (21), 10425-10433, 2006.

[7] Kenyon, G.; Puja, G.; Hope, H.; Waync, C. and ping Dow Q., "Organic copper complexes as a new class of proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer cells", *Biochemical Pharmacdogy*, **67**(6), 1139-1151, 2004.

[8] Adwankar, M.; Wycliff, C. and Samuelson, A.," In vitro cytotoxic effect of new diphenyl phosphino ethane copper(I) complexes on human ovarion carcinoma cells", *Indian Journal of experimental Biology*, **35**(8), 810-814, 1997.

[9] Lopoz-Lazaro, M.; Palma, D.I.; Pera, N.; Pastor, N,; Marlin-cardero, C.; Navarro, E.; Coter, F.; Ayso, M.J. and Toro, M.V., "Antitumor activity of digitals purpurea L.subsp. Heywoodii", *Planta Med*.,**69**, 701-704, 2003.

[10] Kulisic, T.; Krist, A.; Dragovic-Uzelac, V.; Milos, M. and pifat,G., "The effect of essential oils aqueous tea infusions of oregano (origanum vulgre L. SPP.hirtum) thume (thymus vulgaris L.) and wild thyme (thymus serpullum L.) on the copper-induced Oxidation of human low-density lipoproteins",*Int.J food sci nat* ., **58** (2), 87-93, 2007.

[11] EL-Ashmawy, I.; Saleh, A. and Salam O.," Effects of marjoram volatile oil and Grape seed extract on Ethanol toxicity in male rats", *Basic and clinical pharmacology and toxicology*, **10**(5), 320-327, 2007.

[12] Sanaa, A., "preparation and identification of some a new derivative for Trimethoprim drug", J.*of university of anbar for pure science*,**3**(3),48-53,2009.

[13] Ayoola, G.; Coker, H.; Adesequn, S; Adepoju-Bello, A.; Ezennia, E. and Alangbayila, T., "phytochemical screening and anti oxidantactivites of som selected medicinal plant used for malaria therapy in south western Nigeria", *Topical journal of pharma ceutical Rerearch*, **7**(3), 1019-1024, 2008.

[14] Salmman,L., "Effect of crude extract silybum marianum L. seeds on cancer and normal cell lines", Thesis, Education college for women, 48-50,2008.

[15] Freshney, R.I., *"Culture of animal cells: Amanual for basic techniqus*" Wiley-less,A. John wiley and sons, Inc, publication, Newyork, 64-69 ,2000.

[16] Duguid,J.P., "practical medical microbiology", Churchill living stone, Ine. NY, 257-278, 1996.

[17] AL-Mohammed, N.T.; AL-Rawi, K.M.; Younis, M.R. and AL-Morani, W.K., "Principle of statistics", J.*AL-Moustansriya University*, **7**(2), 50-52, 1986.

[18] Bruneton, J., "*Pharmacongnosy photo chemistry medicinal plant*.," Translated by: caroline, K, Hotton Tec and Doc.Laroisier, Paric, 1009-1024, 1999.

[19] Birt, F.; Hendrich, S. and Wang, W., "Dietary agents in cancer prevention: Flavonoids and iso Flavonoids *pharmacology and therapeuties*", **90**,157-177, 2001.

[20] Sadeghi, H. and Yazdanparast, R., "Anti-tumor activity and cell cycle arrest of a new Diterperne Ester from Daphane mucronata using K562 cell", *Iran Biomed.J.*,**7**(3),127-131, 2003.

[21] Tsuda, S.; Matsusaka, N.; Madarame, H.; Ueno, S.; Susa, N.; Ishida, K.; Kawamura, N.; Sekiashi, K. and Sasaki, Y.," The comet assay in eight mouse organs:results with 24 aza compounds", *Mutat Res*., **465** (2), 11-26, 2000.

[22] Eugen, B.; James, F.; David, W. and John, T.," Azo compounds in colon-speific drug delivery", *Epert opinion on Drug Delivery*, **4**(5), 547-560, 2007.

[23] Xiao, YA.; Bi, C.; Fan, Y.; Cai, C.; Zhang, Y. and Dou, O., "L-glutamin Schiff base copper complex as aproteasome inhibitor and an apoptosis inducer in human cell, *"Int Joncol*, **33**(5), 1073-1079, 2008.

[24] Hengstler, J.; Hengest, A.; Fuchs, J.; Tanner, B.; Pohi, J. and oesch,f., "Induction of DNA cross links and DNA strand lesion by cyclophosphamide after activation by cytochrome P450-2B1", *Mutat. Res/fundamental and molecular Mecchanism of mulagenesis*, **373** (2), 215-223, 1997.

[25] Pillans, P.; Ponzi, S. and parker, M., "cyclophosphamide induced DNA strand breaks in mouse embryo cephalic tissue invivo", *Oxiford Journals*, **322**(4), 1460-2180, 2010.

Abstract

Line L20B The *origanum vulgare* L. plant which used as a medical plants for treatment of chest and bronchial inflammation and others. The copper complex (II) regarded as a. chemical treatments which used as anti-cancer therapy by its cytotoxic effect towards cancer

cell line and the percentage of inhibition. This study involoved effect of the active compounds for the aqueous extract of the origanum vulgare L. and effect of a new copper(II)complex on cell comparison with cytotoxic drug cyclophosphamide (cp) positive control, through employed *in vitro* system by study of inhibition percentage rate on murine cell line L20B derived from mouse cell (fibroblasts), Using four concentrations (31.25,62.5,125,250) microgram/ ml within two exposure time (48,72) hours. The results showed that increased of inhibition percentage a according to concentration with significant difference ($p< 0.05$) for both aqueous extract plant and copper (II) complex comparison with cyclophosphamide (cp) and there is no effect of time exposure on inhibition percentage. We conclude from this study that effect of aqueous origanum vulgare extract and copper (II) complex similar to effect of cytotoxic drug (cp) and there is no significant difference between them at all concentrations. The inhibition levels reached to 52.41%, 58.21% and 58.93% respectively at 250µg/ml after 72 hour exposure time.

Keywords: cytotoxicity; copper complexes (II), origanum vulgare L., cp.