



الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

كلية الهندسة الزراعية

قسم التقانات الحيوية

تأثير الخلاصة النباتية للزعفران *Crocus sativus* L. في سرطان القولون

في المختبر

Effect of *Crocus sativus* L. Extraction in Coloroctal Cancer

in Vitro

رسالة أعدت لنيل درجة الماجستير في التقانات الحيوية

إعداد الطالبة:

م. ميادة قريشي

د. عروب المصري

قسم الحيوانات الطبية والحيوانية

الهيئة العامة للتقانة الحيوية

أ.د. بسام عيسى

كلية الزراعة

جامعة دمشق

قدمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الماجستير في قسم التقانات الحيوية في كلية الزراعة - جامعة دمشق. وأجيزت من قبل السادة أعضاء لجنة الحكم.

This thesis has been submitted as partial fulfillment of the requirements for the Master's Degree in Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture - Damascus University. The thesis has been approved by referee committee.

نوقشت هذه الرسالة بتاريخ 2023/9/3 وأجيزت

لجنة الحكم على الرسالة:



عضواً مشرفاً

أ.د. بسام عيسى



عضواً

أ.د. رامي يعقوب



عضواً

د. حسام مراد

شهادة

نشهد بأن العمل الموصوف في هذه الرسالة " تأثير الخلاصة النباتية للزعفران *Crocus sativus* L. في سرطان القولون في المختبر " جاء نتيجة بحث علمي قامت به المرشحة ميادة منصور قريشي بإشراف الأستاذ الدكتور بسام عيسى في قسم الانتاج الحيواني - كلية الزراعة - جامعة دمشق، والدكتورة عروب المصري في الهيئة العامة للتقانة الحيوية، وأن المراجع المستخدمة في هذه الرسالة موثقة أصولاً ضمن النص.

المشرفون

المرشح

د. عروب المصري

أ. د. بسام عيسى

ميادة منصور قريشي



CERTIFICATE

It is hereby certified that the work described in this thesis " **Effect of *Crocus sativus* L. Extraction in Colorectal Cancer in Vitro** " is the result of the scientific research done by candidate Mayada Mansour Karyshi, under the supervision of Dr. Bassam Issa, Faculty of Agriculture-Damascus University, and Dr. Aroub Almasri, National Commission for Biotechnology, and any reference to other research works has been duly acknowledged in the text.

Candidate

Supervisors

Mayada Mansour Karyshi

Dr. Bassam Issa

Dr. Aroub Almasri

تصريح

أصرح بأن البحث الموصوف في هذه الرسالة تحت عنوان:

"تأثير الخلاصة النباتية للزعفران *Crocus sativus* L. في سرطان القولون في المختبر " لم يسبق أن قدم للحصول على أي درجة جامعية أخرى، وغير مقدم حالياً لذلك، وأن كافة العمل، والنتائج المذكورة هي جهودي الشخصية، وبتوجيه من الأساتذة المشرفين وأن المراجع التي ذكرت في الأطروحة نسبت إلى مصادرها ضمن النص وفي قائمة المراجع.

المرشحة

ميادة منصور قريشي

DECLARATION

To Whom It May Concern: I declare that the present research work entitled "Effect of *Crocus sativus* L. Extraction in Colorectal Cancer in Vitro" is a new research work, and has neither been already accepted for any degree, nor has been submitted concurrently for any other degree. All the mentioned results are my own efforts and done by direct supervision of my guides. All the referred literature are cited, and well- documented in the list of references.

Candidate

Mayada Mansour Karyshi

شكرو تقدير

بسم الله الرحمن الرحيم

ليس بعد تمام العمل من شيء أجمل ولا أسمى من الحمد فالحمد لله والشكر له.

ثم أنه لا يسعني إلا بأن أشيد بالفضل و أقر بالمعروف لكل من ساهم في إنجاز هذا البحث وأخص بالذكر

- الأساتذة المشرفين :

أ.د. بسام عيسى

على ما خصني به من التوجيه والتصويب وما علمني من فيض إنسانيته وخلقه الرفيع ومستواه الراقى.

د.عروب المصري

التي ساندتني من بداية المشوار وقدمت لي يد العون والمساعدة وزودتني بالمعلومات اللازمة لإتمام هذا البحث وكانت خير السند والدعم . لكي مني كل الشكر والأمتان و أدامك الله رمزا من رموز العلم .

- أعضاء لجنة الحكم :

أ.د. رلى يعقوب د.حسام مراد

لقبولهم تحكيم هذه الرسالة و إبداء ملاحظاتهم القيمة .

- د.منال الصالح شريكة النجاح لكي مني كل الاحترام والمحبة

- د.عايدة جلول لمساندتها ودعمها العلمي الدائم

- د.نورس الأبرص للمساعدة في تحضير المستخلص

- م.اسماعيل الصالح للمساعدة في التحليل الإحصائي

- إدارة الهيئة العامة للتقانة الحيوية لدعمها البحث

الإهداء

أهدي نجاحي وباقة ورد معطر

إلى :

أبي ...

لقد حكمت بفرقتنا الليالي

ولم يك عن رضاي ولا رضاكا

فليتك لو بقيت لضعف حالي

وكان الناس كلهم فداك

إلى الغائب الحاضر دائما .. إلى جذري العظيم .. إلى موضع فخري واعتزازي .. إليك دائما و أبدا

أهدي نجاحي

لروحك الرحمة أبي الغالي

أمي ...

بوركت يا حرم الأمومة والصبأ كم فيك تكتمل الحياة وتقديس

إلى بركة العمر .. بطلتي وقديستي

إلى من كانت لي كل شيء وأنا بدونها لا شيء

إلى أغلى ما وهبني الله

أدامك الله أمي الغالية

إلى بسمات حياتي .. الحب الذي لا يموت

إلى الملجأ والأمان ..كتفي الثابت وسندي الدائم

إلى مشاعل دربي و نقطة ضعفي في هذه الحياة

إلى أشقاء روحي وضحكة قلبي

أسامة-باسل-سليم-ميساء

إلى أجمل عطايا الله..

إلى شريكي ونصفي الثاني..

إلى الأعلى على قلبي دوما.. مشجعي وداعمي الدائم

إلى من أشد عضدي به..

رفيق الدرب سماح الغالي

إلى الضحكة البريئة التي ملأت حياتنا بالفوضى والمحبة..

إلى سر سعادتي .. وأمير قلبي..

إلى قطعة السكر..

طفلي المدلل أمير

إلى عائلتي الثانية

إلى من شاركوني هذا المشوار الصعب فكانو خير العون والسند .. لكم مني كل الشكر والامتنان

سمير ورور - سميرة الحاج علي

إلى من جمعتني بهم صدف الحياة .. فكانوا نعم اللقاء ..

إلى معنى الحب الصادق والصحبة الصالحة .. إلى شركاء النجاح ..

دعاء الخليل - رهام - سارة

بلغ الثناء لأجلك أمداداً .. وعلاً الجبين

إلى معلمي الأول ..

إلى من أكبر به وأصغر أمامه .. إلى من تشرفت بالنهل من علمه

د: مازن كنج

فهرس المحتويات List of contents

المحتوى	رقم الصفحة
الملخص	1
الفصل الأول : المقدمة	2
1 - 1 - المقدمة	3
1 - 2 - الدراسة التصنيفية	4
1-3- الدراسة المورفولوجية	5
1-4- التركيب الكيميائي	6
1-5- الإشكالية البحثية	9
1-6- بعض الأمثلة المستعملة للنباتات الطبية في علاج السرطانات المختلفة	10
1-7- تساؤلات البحث	12
1-8- فرضيات البحث	12
1-9- تعاريف البحث	12
1-10- أهداف البحث	14
1-11- أهمية البحث	14
1-12- مبررات البحث	15
1-13- حدود البحث	15
الفصل الثاني : الدراسات المرجعية	16
2-1- الدراسات المرجعية	17
2-1-1- الزعفران وسرطان القولون	17

17	2-1-2- الزعفران وسرطان الرئة
17	3-1-2 ابيضاض الدم والزعفران
18	4-1-2 سرطان عنق الرحم ، المبيض أو الثدي و الزعفران
18	5-1-2- الآليات التي يعمل بها مستخلص الزعفران على السمية الانتقائية للخلايا السرطانية
20	2-2- المرجعية النظرية
20	1-2-2- التشنؤات الخلوية
21	2-2-2- السرطان
23	3-2-2- لمحة عن سرطان القولون
24	4-2-2- دور الطفرات في تشكّل سرطان القولون
26	5-2-2- الزرع الخلوي
26	1-5-2-2- تعريف الزرع الخلوي والنسجي
26	2-5-2-2- الفرق بين الزرع الأولي والزرع الثانوي
27	3-5-2-2- شروط الزرع الخلوي
28	6-2-2- الخطوط الخلوية السرطانية Cancer Cell Line
28	1-6-2-2- الخط الخلوي
28	2-6-2-2- أنماط الخلايا
30	7-2-2- اختبار تأثير الخلاصات النباتية في عيوشية الخلايا السرطانية Cell Viability
30	1-7-2-2- اختبار سمية الخلاصات النباتية في عيوشية الخلايا السرطانية

	المزروعة في المختبر <i>in-vitro</i>
31	2-7-2-2- مقايصة عيوشية الخلايا Cell Viability Assay
31	3-7-2-2- مبدأ طريقة زرقة التريبان Trypan Blue
32	4-7-2-2- مبدأ طريقة MTT
33	8-2-2- هجرة الخلايا السرطانية Cell Migration
34	1-8-2-2- مقايصة هجرة الخلايا السرطانية cell Migration assay
35	الفصل الثالث : مواد وطرائق البحث
36	1-3- المواد والطرائق
36	1-1-3- مخطط الدراسة
36	2-1-3- الأجهزة و الأدوات
38	3-1-3- محاليل أوساط الزرع والملونات الخارجية
38	4-1-3- العينات النباتية
39	5-1-3- خط الخلايا السرطانية المستخدم cancer cell line
40	2-3- الطريقة المتبعة في تحضير المستخلص النباتي
40	3-3- الطريقة المتبعة في الزرع الخلوي
41	1-3-3- تحضير أوساط الزرع medium
41	2-3-3- البرنامج المتبع protocol في الزرع الخلوي cell culture

41	3-2-1- cell thawing إذابة الخلايا
42	3-2-2- تغيير الوسط
42	3-2-3- subculture الزرع الثانوي
43	3-2-4- cell count عد الخلايا
44	3-2-5- cryopreservation حفظ الخلايا بالتجميد
45	3-4- الطريقة المتبعة في دراسة تأثير الخلاصة النباتية في عيوشية الخلايا السرطانية Cell Viability
45	3-4-1- الخلاصة النباتية المدروسة
45	3-4-2- البرنامج المتبع protocol في مقايصة عيوشية الخلايا cell viability assay
48	3-5- الطريقة المتبعة في دراسة تأثير الخلاصة النباتية في هجرة الخلايا Cell Migration
48	3-5-1- الخلاصة النباتية المدروسة
48	3-5-2- البرنامج المتبع protocol في مقايصة هجرة الخلايا cell migration assay
49	3-6- التحاليل الإحصائية Statistical analysis والبرامج المعتمدة في تقييم النتائج
50	الفصل الرابع : النتائج والمناقشة
51	4-1- النتائج
51	4-1-1- نتائج الاستخلاص

52	4-1-2- نتائج تأثير الخلاصة النباتية للزعفران <i>crocus stuiivus</i> L. في عيوشية الخلايا السرطانية cell viability
55	4-1-3- نتائج تأثير الخلاصة النباتية للزعفران <i>crocus stuiivus</i> L. في هجرة الخلايا السرطانية cell migration
56	4-2- المناقشة
56	4-2-1- مناقشة نتائج اختبار تأثير المستخلص النباتي للزعفران <i>Crocus sativus</i> L. في عيوشية خلايا الخط الخلوي CACO – 2
59	4-2-2- مناقشة نتائج اختبار تأثير المستخلص النباتي للزعفران <i>Crocus sativus</i> L. في هجرة خلايا الخط الخلوي CACO – 2
63	الفصل الخامس : الاستنتاجات والتوصيات
64	5-1- الاستنتاجات conclusions
65	5-2- المقترحات والتوصيات suggestions and recommendations
66	الفصل السادس : المراجع
67	6-2- المراجع الأجنبية

فهرس الأشكال

رقم الصفحة	عنوان الشكل	رقم الشكل
7	الكروسين Crocin	1
7	البكروكروسين Picrocrocin والسافرنال safranal	2
25	المسارات الرئيسية المسببة لتسلسل الورم الحميد القولوني والمستقيم إلى ورم سرطاني	3
32	تصبغ الخلايا الميتة بال Trypan Blue	4
32	آلية عمل طريقة MTT كيميائياً	5
33	آلية هجرة الخلايا السرطانية Cell Migration	6
34	الأورام الأولية وأماكن انتشارها ثانوياً	7
34	طريقة مقايسة هجرة الخلايا السرطانية باستخدام طريقة wound healing assay	8
38	المياسم الجافة من الزعفران <i>Crocus sativus L. L.</i> التي تم استخدامها	9
39	خلايا الخط الخلوي لسرطان القولون CACO -2 بتكبير X10	10
39	خلايا الخط الخلوي لسرطان القولون CACO -2 بتكبير X20	11
43	خلايا CACO-2 في بداية الزرع	12
43	خلايا CACO-2 حققت نسبة امتلاء أكثر من 90%	13
44	العدادة الآلية ^TM Automated Cell counter countess	14
47	بلورات الفورمازان الأرجوانية غير المنحلة المتشكلة في الآبار	15
47	تلون خلايا CACO-2 باللون البنفسجي عند إضافة MTT	16
51	مستخلص الزعفران <i>Crocus Sativus L.</i>	17

18	سلسلة التراكيز المستخدمة من مستخلص الزعفران <i>Crocus sativus</i> L. السابق	52
19	طبق رقم (1) 96 بئراً بعد تطبيق سلسلة التراكيز المدروسة من المستخلص المائي الكحولي للزعفران <i>Crocus Sativus</i> L.	52
20	طبق 96 بئراً لقياس نسبة تثبيط الخلايا السرطانية للخط الخلوي CACO-2 بعد تشكل بلورات الفورمازان الأرجوانية غير المنحلة وذلك في تجربة معالجة الخلايا بتراكيز (300,150,75,37.5,18.75,9.37 µg/ml) من مستخلص الزعفران الذي تم استخدامه	53
21	تأثير التراكيز المختلفة للخلاصة النباتية للزعفران <i>Crocus sativus</i> L. في حيوية الخلايا السرطانية للخط الخلوي CACO-2 ومعامل الارتباط	53
22	تأثير التراكيز المختلفة للخلاصة النباتية للزعفران <i>Crocus sativus</i> L. في خلايا CACO-2 والعلاقة بين النسبة المئوية لتثبيط نمو الخلايا وتراكيز الخلاصة	54
23	تأثير تراكيز المستخلص النباتي للزعفران <i>Crocus sativus</i> L. في هجرة الخلايا السرطانية CACO-2 خلال الزمن 24 و 48 ساعة حيث إن النتائج عبارة عن المتوسط $\pm$ الانحراف المعياري mean $\pm$ SD	59

فهرس الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	رقم الصفحة
1	Wound healing assay يمثل تجربة مقايسة هجرة الخلايا باستخدام طريقة	55
2	Crocus نتائج دراسات مرجعية أخرى تم فيها استخدام المستخلص النباتي للزعفران sativus L. على خطوط سرطانية أخرى	56
3	Wound healing assay يمثل تجربة مقايسة هجرة الخلايا باستخدام طريقة	60

List of Abbreviations قائمة الاختصارات

المختصر	الاسم
MTT	3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide
APC	Adenomatous polyposis coli
BCL-2	B-Cell Lymphoma 2
CACO-2	Caucasian Colon Adenocarcinoma
U-937	Cell Line Exhibiting Monocyte Morphology
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles DMEM Medium
EMT	Epithelial to Mesenchymal Transition
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
FBS	Fetal Bovine Serum
VA-13	Fibroblast Cell Line
Hep G2	Hepatoblastoma Cell Line
WI-38	Human Diploid Cell Line
HL-60	Human Leukemia Cell Line
A549	Human Lung Adenocarcinoma
A-204	Human Muscle Rhabdomyosarcoma

	cell line
22rv1	Human Prostate Carcinoma Epithelial Cell Line
K562	Leukemia Cell Line
MCV-7	Michigan Cancer Foundation
NCI	National Cancer Institute
SKOV-3	Ovarian Cancer Cell Line
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC3	Prostate Cancer Cell Line

الملخص summary:

يعد الزعفران من النباتات الطبية التي تمت دراستها وتحديد فعاليتها على الخلايا السرطانية ومنها سرطان القولون لذا نفذ هذا البحث في مخبر التقانات الطبية والحيوانية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية. يهدف هذا البحث إلى دراسة تأثير المستخلص النباتي للزعفران *Crocus sativus* L. في عيوشية وهجرة الخلايا السرطانية للخط الخلوي CACO-2 في الزجاج

حيث تضمنت الدراسة الاستخلاص الكحولي لمياعم الزعفران *Crocus sativus* L. وزرع الخلايا السرطانية للخط الخلوي CACO-2 في المختبر وحضنها مع تراكيز مختلفة من مستخلص الزعفران ومن ثم تقييم عيوشية الخلايا باستخدام مقايصة MTT وهجرة الخلايا باستخدام Wound healing assay

أظهرت النتائج أن المستخلص النباتي للزعفران *Crocus sativus* L. له تأثير سام في خلايا CACO-2 وأن التركيز المثبط ل 45% تقريبا 300µg/ml ، وهذا التركيز نفسه يحرض هجرة الخلايا السرطانية والسبب يكمن بما يسمى التحول الظهاري الميزانشيمي Epithelial to Mesenchymal Transition – EMT

الكلمات المفتاحية:

سرطان القولون - الزعفران - مقايصة MTT - مقايصة هجرة الخلايا - التحول الظهاري الميزانشيمي

الفصل الأول

المقدمة

1-1 - المقدمة Introduction:

استعمل الإنسان النباتات الطبية والأعشاب المفيدة التي تنمو في محيطه الجغرافي في الطب الشعبي والتغذية منذ أقدم العصور لدى الفراعنة واليونان وفي الهند والصين وعند العرب. ثم بدأ يتعرف على أسرار هذه النباتات وطرائق استعمالها، حتى في أيامنا هذه ثمة استخدامات واسعة للنباتات الطبية والأعشاب، لأن ما قدمته هذه النباتات وما زالت تقدمه من فوائد صحية للبشرية جعلها ترقى إلى مكانة خاصة.

و في الآونة الأخيرة تتجه الاهتمامات حول دراسة دور النباتات في معالجة الأمراض الخبيثة وخصوصاً مرض السرطان Cancer فقد بينت إحصائيات منظمة السرطان العالمية National Cancer Institute (NCI) عام 2008 أن هناك حوالي 35.000 نوعاً من النباتات الطبية المستعملة في علاج الأورام الخبيثة سواء في الطب الشعبي أو الطب المعاصر.

وسيتطرق هذا البحث إلى تسليط الضوء على نوع من أنواع الزعفران المزروع وهو الزعفران السوسني *Crocus sativus* L. نظراً لأهميته الطبية وانتشاره الواسع في أماكن مختلفة من العالم ودراسة مدى تأثير الخلاصة في عيوشية الخلايا السرطانية Cell Viability للخط الخلوي لسرطان القولون CACO-2 وسلوكيتها من خلال دراسة تأثيرها في هجرة الخلايا السرطانية Cell Migration حتى يتم الاستفادة منها وذلك باعتبار سرطان القولون مساهماً أساسياً في عدد الوفيات التي يسببها السرطان بشكل عام، حيث يتم تشخيص مليون حالة جديدة سنوياً حول العالم (Hewish and Cunningham, 2011)

الزعفران Saffron :

1-2- الدراسة التصنيفية:

الزعفران جنس نباتي ينتمي إلى الفصيلة السوسنية يضم حوالي 90 نوعاً ينتشر معظمها في العالم القديم أهم أنواعه الزعفران المزروع *Crocus sativus* ، يوجد منه عدة أنواع متوطنة في بلاد الشام.

التصنيف العلمي للزعفران: (Abdullaev, 2003)

الاسم العلمي: *Crocus sativus* L.

المملكة: النباتية Plantae

تحت المملكة: النباتات الوعائية

الشعبة: حقيقيات الأوراق

الشعيبة: البذريات

الصف: أحاديات الفلقة Monocotyledona

الرتبة: الهليونيات Asparagales

الفصيلة: السوسنية Iridaceae

الجنس: الزعفران المزروع *Crocus sativus* L.

1-3- الدراسة المورفولوجية:

الزعفران من النباتات المعمرة منخفض الارتفاع طوله عادة من 10 - 25 cm يتطور من الكورمة Corm التي تظهر كل سنة. تتكون الزهور من ست بتلات petals و ثلاث أسدية stamens ومدقة style تتوج بثلاث مياسم متفرعة.

تستعمل المياسم stigmas وجزء من الأقلام style في الحصول على توابل الزعفران

(Cusano, 2018)

يزرع الزعفران في مناطق مختلفة وواسعة من العالم وتعد إيران أكثر دولة منتجة له، حيث يقدر معدل الإنتاج في إيران حوالي 430 طناً ، تعد الهند ثاني أكثر دولة منتجة له بحوالي 22 طناً وذلك في عام 2019 ، الدول المنتجة الأخرى هي إسبانيا واليونان وإيطاليا والمغرب ومصر وأستراليا

(Statista, 2020)

تتأثر زراعة الزعفران بعدة عوامل مثل: التربة والمناخ وهطول الأمطار وموعد الحصاد ومعاملات ما بعد الحصاد (Bolandi and Ghoddusi, 2006)

الأنواع والانتشار:

بالنسبة لأنواع الزعفران المنتشرة، يوجد حوالي 90 نوعاً منها في صربيا الأوربية والبحر المتوسط والجبال الإيرانية: (zohary, 1986)

1- *Crocus ochroleucus*:

المنطقة: يوجد شرق البحر الأبيض المتوسط (شمال فلسطين - لبنان - سورية).

2- *Crocus pallasii*:

المنطقة: يوجد شرق البحر الأبيض المتوسط وغرب الجبال الإيرانية وجنوب يوغسلافيا وجنوب شرق بلغاريا وشرق رومانيا وشبه جزيرة القرم).

3- *Crocus moabiticus*:

المنطقة: متوطنة شرق الأردن وغرب الجبال الإيرانية.

4- *Crocus cancellatus*:

المنطقة: يوجد شرق البحر الأبيض المتوسط وغرب الجبال الإيرانية (لبنان - سورية - جنوب تركيا - إيران).

5- *Crocus damascenus*:

المنطقة: يوجد غرب الجبال الإيرانية (فلسطين - سورية - العراق - إيران).

وسيدرس في هذا البحث نوع الزعفران السوسني *Crocus sativus*:

وهو من النباتات المعمرة، الموطن الأصلي له جنوب غرب آسيا ومن المحتمل أن أول زراعة له كانت

هناك أو قريبة من اليونان (GRIGG, 1974) (McGee, 2007)

1-4- التركيب الكيميائي:

يحتوي على أكثر من 150 مركباً متطائراً وغير متطائراً ويتكون من :

سكريات محبة للماء والدهن -بروتينات -حموض أمينية -معادن -مستحلبات -فيتامينات وخاصة

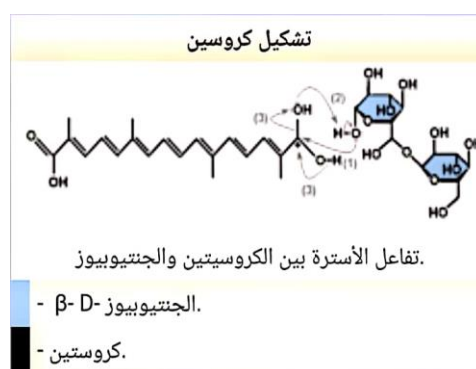
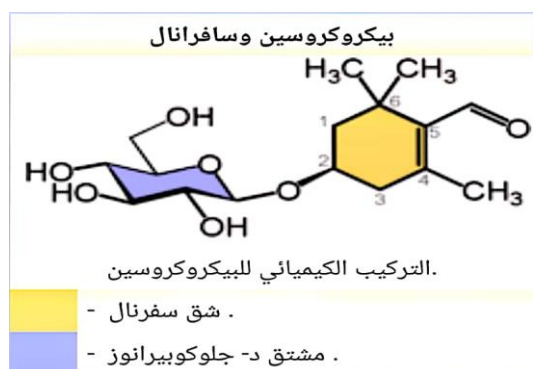
(Riboflavin - Thymine) وأصبغة منها : (Crocin - Anthocyanin -Carotene -)

(Lycopene - Flavonoid) ونشاء ومواد كيميائية أخرى

(Abdullaev, 2002)

أما عن مركباته النشطة بيولوجيا فقد أجريت دراسة تحليلية مختلفة لوصف عدد كبير منها ويمكن حصر أهمها في أربعة مركبات هي:

- الكروسين Crocin والكروستين Crocetin وهما نوعان من الكاروتينات الجليكوسيدية تعطي اللون الأصفر للزعفران وتشكل 3.5% من وزن المياسم.
- البيكروكروسين Picrocrocin الذي يعطي الزعفران نكهته ومذاقه المر ويشكل 3.7% من وزن المياسم.
- السافرانال Safranal وهو الزيت الطيار المسؤول عن مذاق ورائحة الزعفران المميزتين ويشكل 0.02% من وزن المياسم.



الشكل (2): البيكروكروسين
والسافرانال safranal

الشكل (1): الكروسين Crocin

وهذه المكونات الرئيسية للزعفران لا تسهم فقط في إعطائه الخصائص المذكورة لكنها ذات خواص طبية مفيدة جداً

(Maggi, 2020) ; (Rezaee and Hosseinzadeh, 2013) ; (Anastasaki *et al.*, 2010)

استخدامات الزعفران:

- الاستخدامات غير الطبية: استعمل في التعطير والطب لأكثر من 3000 سنة فقد استخدم في المطبخ بكثرة، فهو يدخل في تحضير الكثير من المأكولات مثل: الأرز، تتبيل الدجاج، الشوربات، وحتى الحلويات.

- الاستخدامات في الطب الشعبي: يستعمل لمعالجة الأمراض المزمنة مثل : الربو – الروماتيزم – التصلب اللويحي ويستعمل أيضا لمعالجة الزكام والسعال وحب الشباب (Nilakshi *et al*, 2011)

- الاستخدامات الطبية: له خواص مضادة للطفرات وممخلبة للجذور الحرة ومحورة للاستجابة المناعية و يحرض الزعفران الموت الخلوي المبرمج للخلايا السرطانية عن طريق استهداف الخلايا التي لديها عوز (-/-p53) (Nilakshi *et al.*, 2011) ; (Gutheil *et al.*, 2012)

يشمل البحث دراسة في علم كيمياء العقاقير Phytochemistry والعقاقير التطبيقية Applied Pharmacognosy

تتضمن الدراسة الكيميائية العقاقيرية Phytochemistry البحث في المواد الفعالة في النبات وذلك من خلال استخلاصها Extraction وفصلها عن الأنسجة النباتية دون تخريبها

وتتضمن الدراسة العقاقيرية التطبيقية Applied Pharmacognosy تحديد التأثيرات الدوائية للنبات ومدى سميته وذلك وفق نوعين من التجارب : في الزجاج *In-vitro* وفي الأحياء *In-vivo* وسنكتفي بالدراسة في الزجاج .

1-5- الإشكالية البحثية:

إن اختيار دراسة الخلايا السرطانية كانت نتيجة ما تعانيه المجتمعات من تزايد انتشار مرض السرطان بكافة أشكاله فقد أفادت الوكالة الدولية التابعة لمنظمة الصحة العالمية في تقرير لها في عام 2018 بأن سوريا احتلت المركز الخامس من بين دول غرب آسيا في عدد الإصابات بأمراض السرطان قياساً لعدد السكان وثمة 196 شخصاً مصاباً بالسرطان من بين كل 100 ألف سوري و 105 وفيات من بين كل 100 ألف و هذا يتطلب مزيداً من البحث والوقاية والكشف المبكر والعلاج لمواجهة هذا المرض

(<https://alarab.co.uk>)

إضافة إلى التكاليف الباهظة التي تدفعها الحكومات لعلاج

بالإضافة إلى أن هناك الكثير من النباتات التي تمت دراستها وتحديد فعاليتها تجاه الخلايا السرطانية، اعتمد بعض هذه النباتات في الدساتير الدوائية وأصبح على شكل مستحضرات صيدلانية ، مثل نبات الفنكا *Vinca minor* و نبات باكوبا منيرة (*Bacopa monnieri* (Brahmi) وبعضها الآخر لايزال ضمن قائمة الأبحاث ولم ير النور بعد

(Ghosh *et al.*, 2011) ; (Thackery, 2002)

1-6- بعض الأمثلة المستعملة للنباتات الطبية في علاج السرطانات المختلفة:

• في الجسم الحي *IN VIVO*:

تمت دراسة تأثير أنماط غذائية مختلفة على تطور السرطانات عند حيوانات تجريبية لديها استعداد وراثي لتطور المرض حيث لوحظ أن زيادة عدد السعرات الحرارية المستهلكة يؤدي إلى نقصان متوسط العمر المتوقع بنسبة 10%

ولوحظ أن هناك صلة وصل بين تناول أنواع معينة من الألياف وهبوط نسب الإصابة بسرطان القولون (Palmer, 1985) ; (Rogers *et al.*, 1993)

في الزجاج *IN VITRO*:

هناك العديد من الأمثلة عن دراسة تأثير بعض أنواع النباتات الطبية في عدد من الخطوط السرطانية في المختبر:

- الزعفران *Saffron*:

يعمل على حث السمية الخلوية ضد الخلايا الورمية A549 , MCF-7 and Hela human cancer cells وتجزئة DNA الخلايا الورمية الأنفة الذكر ويعدل من نشاط وتعبير Urokinase و Metalloproteinases في خلايا سرطان البروستات PC3 and 22rv1

(Festuccia *et al.*, 2014) ; (Gezici, 2019)

- الفوانيس *Cardiospermum halicacabum* :

يعمل على منع تخليق وتركيب سلسلة عديد الببتيد بواسطة الريبوسوم لخلايا الخط الخلوي لسرطان الرئة A549

(Niranjana *et al.*, 2012)

- ديلينا هندية *Dillenia indica* :

- يحث على موت الخلايا المبرمج لخلايا الخطوط الخلوية لسرطان الدم البشري U937

و HL60 و K562

(Kumar *et al.*, 2010)

• سريريا CLINICAL:

بعض النباتات التي درست سريريا:

- الثوم *Allium sativum* :

تم اعطاء جرعة مقدارها 4 كبسولات مصنوعة من 500mg من مستخلص ثوم معتق لمدة

12 أسبوعاً لمرضى سرطان كولون وكبد وبنكرياس غير قابل للجراحة فكان التأثير زيادة عدد

ونشاط الخلايا القاتلة الطبيعية Natural Killer Cell

(Ishikawa *et al.*, 2006)

- الكركم *Turmeric* :

تم إعطاء جرعة فموية مقدارها 8g لمرضى لديهم سرطان متطور مدة شهر تبين أن أكثر من

21 مريضاً أصبح لديهم استقرار للمرض لأكثر من 18 شهراً و واحد من المرضى تراجع لديه

الورم (Dhillon *et al.*, 2008)

- الشاي الأخضر *Camellia sinensis* :

تبين أن استهلاك الشاي المعتاد لدى مرضى لديهم سرطان مريء مرتبط مع خفض مخاطر

السرطان (Gao *et al.*, 1994)

- الجينسينج *Panax ginseng* :

أدى تناول 300mg باليوم لمدة اسبوع من قبل مرضى لديهم سرطان رحم ومبيض إلى

التحسن في الأداء النوعي والفيزيائي للمرضى (Kim and Choi, 2016)

1-7- تساؤلات البحث:

هل يمكن للخلاصة النباتية للزعفران أن تؤدي دوراً فعالاً في سرطان القولون؟

هل يمكن للخلاصة النباتية للزعفران أن تحد من انتقال الخلايا السرطانية؟

ماهي المادة الأكثر تأثيراً من المستخلص النباتي للزعفران وعند أي تركيز تحقق التأثير الفعال؟

ماهي الطريقة الأكثر فعالية في الاستخلاص؟

هل يمكن لهذا البحث أن يوجه الاهتمام إلى دراسة تأثير الخلاصات النباتية على الخلايا السرطانية

المزروعة في المختبر In-vitro؟

1-8- فرضيات البحث:

يفترض أن للزعفران خصائص مضادة للسرطان

يفترض أن للزعفران دور فعال في تأثيره في هجرة الخلايا السرطانية وبالتالي يقلل من استخدام المركبات

الكيميائية

يفترض أن للزعفران تأثير انتقائي على الخلايا السرطانية ولكن ليس له أي آثار جانبية على الخلايا

الطبيعية

1-9- تعاريف البحث:

يعتبر الزرع الخلوي من أهم الطرق المستخدمة في مجالات البيولوجيا الجزيئية والخلوية ومن أبرزها:

(Clarke *et al.*, 2006) ' (Nema and Khare, 2012)

1. البحث العلمي والتجريبي Scientific Search : يشكل الزرع الخلوي نظاماً جيداً للدراسة في

مجالات عدة منها : بيولوجيا الخلية وعلم الكيمياء الحيوية ودراسة التداخلات بين العوامل

المسببة للمرض والخلايا ودراسة تأثيرات الأدوية في الخلايا بالإضافة إلى الدراسات الغذائية

2. فحوص السمية Toxicity testing : تستخدم الخطوط الخلوية بالإضافة إلى حيوانات التجربة

بشكل كبير في دراسة تأثير الأدوية الحديثة ومستحضرات التجميل والمواد الكيميائية في نمو

وحويية عدد كبير من الخلايا خصوصا تلك الخلايا المعزولة عن الكبد والكلية

3. أبحاث السرطان Cancer research : باعتبار أن كلاً من الخلايا السوية والسرطانية تنمو

في الأوساط الزرعية فإنه من الممكن دراسة الفروقات بين هذين النوعين بدقة بالإضافة إلى أنه

يمكن استخدام المواد الكيميائية والفيروسات والإشعاع لتحويل الخلايا السوية المزروعة إلى

خلايا مسرطنة وبالتالي دراسة آلية هذا التحول بينما زراعة الخلايا السرطانية وحدها تعطي

نموذجاً ممتازاً لدراسة الأدوية والطرق التي من الممكن أن تقضي بشكل انتقائي على أنماط

مدروسة من السرطانات

4. علم الفيروسات Virology : كان أهمها استخدم في مضاعفة الفيروسات ضمن أوساط الزرع

بغية الاستفادة منها لاحقاً في إنتاج اللقاحات (مثل: التهاب الكبد Hepatitis الحصبة

Measles شلل الأطفال Infantile Paralysis ... وغيرها) بالإضافة إلى تحديد الفيروسات

وعزلها بهدف دراسة آليتها ونموها وكيفية إصابتها

5. التصنيع الخلوي Cell based Manufacturing : تستخدم زراعة الخلايا في إنتاج كميات

ضخمة من الخلايا المعدلة وراثياً بالإضافة إلى تصنيع اللقاحات بهدف إنتاج بروتينات

وصادات حيوية وهرمونات لها أهمية كبيرة من الناحيتين الطبية و الاقتصادية ومن الجدير

بالذكر أيضاً أن من فوائد هذه العملية استخدام الخلايا المزروعة لإنتاج نسج و أعضاء بديلة

ومازال البحث متواصلاً لتطبيق هذه التقنية

6. المعالجة الجينية Gene therapy : أتاحت الهندسة الوراثية (القدرة على تعديل جينات

الخلايا) مجالاً واسعاً للمعالجة الجينية ، حيث تعزل الخلايا التي ينقصها جين محدد عن

العضو ويتم زراعتها ثم إعادتها للمريض

7. فحوص الأدوية وتطويرها Drug screening and development: أصبحت المعالجة

الخلوية في الآونة الأخيرة مهمة جدا في مجال الصناعة الصيدلانية ليس فقط بغية فحص

السمية وإنما أيضا بغية استكشاف واسع للمركبات التي تملك تأثيرات علاجية محتملة من أجل

تصنيعها كأدوية في نهاية المطاف

10-1- أهداف البحث:

- تحضير المستخلص النباتي للزعفران *Crocus sativus* L.
- الكشف عن تأثير الخلاصات النباتية لهذا النوع في عيوشية الخلايا Cell Viability
- دراسة تأثير المستخلص النباتي لهذا النوع في سلوكية هذه الخلايا، وذلك من خلال دراسة تأثيرها في هجرة الخلايا السرطانية Cell Migration.

11-1- أهمية البحث:

- تعتبر النباتات أو مستخلصاتها مادة دسمة للأبحاث السرطانية في الآونة الأخيرة حيث تعد هذه المكونات ذات أهمية في علاج مرض السرطان والحد منه.
- يعد زرع الخلايا السرطانية البشرية من التقنيات البحثية المهمة لدراسة تأثير الأدوية والمستخلصات النباتية والمواد الكيميائية المختلفة في الإنسان وبذلك يتم تأسيس تقانة زرع الخلايا السرطانية البشرية وتطويرها لأغراض بحثية مستقبلية.
- توجيه الاهتمام إلى دراسة تأثير الخلاصات النباتية في الخلايا السرطانية المزروعة في المختبر.

1-12- مبررات البحث:

تحضر حوالي ربع وصفات الأدوية باستخدام الأعشاب والنباتات الأخرى وتم علاج العديد من الأمراض بواسطة الأعشاب البرية والنباتات الطبية ومن تلك الأمراض السرطان ، إن العلاجات الحديثة لهذا المرض مبنية على أساس العلاج الجراحي أو العلاج الإشعاعي أو العلاج الكيميائي أو العلاج بها مجتمعة ، وبشكل عام فإن العلاجات الجراحية والإشعاعية يستعملان في حالات الأورام الموضعية ، أما العلاج الكيميائي فيستعمل عند انتشار الخلايا السرطانية في الجسم

على الرغم من فوائد هذه العلاجات إلا أنها تمتلك تأثيرات جانبية تعود سلباً على صحة المريض لاسيما العلاجات الكيميائية والإشعاعية التي تتسم بسميتها للأنسجة الطبيعية في الجسم أو بإحداث الطفرات الوراثية لخلاياه أو إضعاف الجهاز المناعي فيه

لقد لجأ مرضى السرطان وكثير من الأطباء إلى المنتجات الطبيعية في علاج الأمراض التي تواجههم لكونها تبعد أعراض المرض وتحسن من صحة الإنسان بالإضافة إلى أنها قليلة التكلفة (Hellman, 2001)

وقد وجد أن هناك الكثير من الأعشاب التي أظهرت قدرة علاجية للأورام السرطانية ومن تلك النباتات الطبية التي لها أثر مهم في علاج السرطان الزعفران *Crocus sativus* (Katz, 2002)

1-13- حدود البحث:

تم تحديد الحدود الزمانية والمكانية للدراسة من خلال تحضير المستخلص النباتي للزعفران لمدة لا تتجاوز أسبوعاً تقريباً وذلك في مخبر الحيوانات الطبية والحيوية التابع للهيئة العامة للتقانة الحيوية ومن ثم زرع الخلايا السرطانية للخط الخلوي لسرطان القولون CACO-2 وإجراء الاختبارات اللازمة عليه وذلك أيضاً في مخبر الحيوانات الطبية والحيوية التابع للهيئة العامة للتقانة الحيوية

الفصل الثاني

الدراسة المرجعية

2-1-الدراسات المرجعية:

لا يفتأ العلماء والباحثون يبحثون عن مواد وأعشاب تحمي الجسم من خطر الإصابة بالأورام وتساعد في العلاج وتُجرى الأبحاث المختبرية والسريرية على العديد من العلاجات البديلة. وفيما يلي أهم الدراسات التي قام بها عدة علماء على أنواع مختلفة من الخلايا السرطانية:

2-1-1- الزعفران وسرطان القولون:

وجدت إحدى الدراسات التي تمت على إناث الجرذان التي حقنت تحت الجلد بخلايا DHD/K12-PROb أن لمستخلص الزعفران المحقون في البريتوان بعيار (400mg / kg body) خواص تعيق نمو الورم وتزيد من العمر الافتراضي لإناث الجرذان و يحرض الموت الخلوي المبرمج للخلايا السرطانية عن طريق استهداف الخلايا التي لديها عوز (-/p53) (Amin *et al.*, 2011) ; (Bajbouj *et al.*, 2012)

2-1-2- الزعفران وسرطان الرئة:

درس Samarghanian وزملائه تأثير المستخلص المائي للزعفران في الموت الخلوي المبرمج في الخط الخلوي لسرطان الرئة A549 وقد وجدوا زيادة تقويض النمو الخلوي للخلايا السرطانية المعاملة بالمستخلص المائي للزعفران بشكل طردي مع التراكم والزمن عن طريق تحفيز مسار الموت الخلوي المبرمج المعتمد على CASPASE و P53 (Samarghandian *et al.*, 2013)

2-1-3- ابيضاض الدم والزعفران:

تم ضبط الدورة الخلوية لخلايا HL-60 عند الطور G0/G1 باستخدام الكروسين و قلل الكروسين من وزن وحجم الورم المزروع في الفئران العارية إضافة إلى تثبيط تعبير BCL2 و BAX في

الطعم المزروع كما أدى استخدام السافرون والكروسين إلى تثبيط تعبير جين BCR-ABL في خلايا K562 بفعالية أكبر مقارنة بال imatinib (عقار طبي يستخدم في معالجة اللوكيميا)

(Sun et al., 2013) ; (Geromichalos *et al.*, 2014)

2-1-4- سرطان عنق الرحم ,المبيض أو الثدي والزعفران:

لوحظ هناك قدرة كامنة للكروستين كمحسس كيميائي لل Vincristine في خلايا MCF-VCR (خط خلوي لسرطان الثدي) المقاوم لل Vincristine كما تمت دراسة تأثير الكروستين في خلايا سرطان عنق الرحم HeLa وخلايا سرطان المبيض SKOV3 وخلايا سرطان الرئة A549 وحده وبالمشاركة مع ال Vincristine حيث وجد أن هناك تثبيطاً ملحوظاً للنمو الخلوي في الخطوط الأنفة الذكر بشكل طردي مع التركيز و الزمن المستخدمين للمعالجة (Zhong *et al.*, 2011) ; (Sasieni, 2006)

2-1-5- الآليات التي يعمل بها مستخلص الزعفران على السمية الانتقائية للخلايا

السرطانية:

يعمل مستخلص الزعفران من خلال الموت الخلوي المبرمج ، ومنع تقدم دورة حياة الخلية ، وتعديل التمثيل الغذائي للخلايا السرطانية ، وتثبيط تخليق DNA RNA ، وتجزئة DNA ، والحد من التعبير عن جينات التجديد الذاتي بالإضافة إلى أنه يمنع تكوين الورم عن طريق التفاعل مع الجذور الحرة

وفيما يأتي بعض الدراسات:

3- في الزجاج *IN VITRO*:

1. تم إجراء تجارب على الخلايا الهدف التالية:
 - خلايا A549 (خلايا مشتقة من ورم رئوي)
 - خلايا WI-38 (خلايا ليفية رئوية طبيعية)
 - خلايا VA-13 (مجموعة من الخلايا تم إنشاؤها عن طريق تحويل خلايا WI-38 بواسطة فيروس SV40)

وكانت النتيجة تثبيط تخليق DNA و RNA بشكل انتقائي في الخلايا الورمية (Abdullaev and Frenkel, 1992)
2. تم إجراء تجارب على الخلايا الهدف التالية:
 - الخلايا الورمية (Hela , A-204 and HepG2)
 - خلايا بشرية سليمة

كانت النتيجة تثبيطاً انتقائياً للخلايا الورمية في الإنسان (Abdullaev *et al.*, 2003)
3. تم تحفيز الموت الخلوي المبرمج لخلايا سرطان الثدي MCF-7

(Mousavi *et al.*, 2009)
4. تفعيل طريق CASPASE الذي يسبب الموت الخلوي المبرمج

(Samarghandian *et al.*, 2013)

• في الجسم الحي *IN VIVO*:

تم إجراء التجارب التالية على حيوانات التجربة :

1. لوحظ نقص تطور الورم عند الجرذان المحرصة كيميائياً بسرطان معوي وذلك عند إعطائها

الجرع التالية من الزعفران (100, 150, 175 mg/kg bw) لمدة 50 يوماً

(Bathaie *et al.*, 2013)

2. لوحظ تأخير حدوث تطور للورم وتنشيط غزو للخلايا الورمية لفئران التجربة المطعمة

بسرطان بروتستات (PC3 and 22rv1) Xenografted Prostate Cancer Cells

وذلك عند إمدادها بجرعة 300 mg لكل كيلو غرام من وزن الجسم مدة 5 أيام كل أسبوع

لمدة أسبوعين (Festuccia *et al.*, 2014)

3. انخفاض في عدد البوليبيات المعوية بشكل مباشر مع زيادة التركيز عند الفئران المصابة

بداء البوليبيات المعوية عند إعطائها جرعة من مستخلص الزعفران مقدارها (0.1% and

0.5%) من وزن الجسم متبوعة بحمية وذلك مدة أربعة اسابيع (Fujimoto *et al.*,)

(2019)

4. منع نمو الورم في سرطان الثدي المزروع تحت الجلد T14 لسلالة من إناث الفئران التي

تعاني من نقص المناعة BALB وذلك عند إعطائها جرعة 75 mg/kg bw من المستخلص

المائي للزعفران لمدة أربعة أسابيع (Nezamdoost *et al.*, 2020)

2-2- المرجعية النظرية:

2-2-1- التنشؤات الخلوية Neoplasm :

المقصود بالتنشؤ الخلوي Neoplasm حسب المعجم الطبي الموحد (Unified Medical

:Dictionary)

الورم (Tumor) ويعرف بأنه نمو شاذ للأنسجة abnormal growth of tissue Neo

وللورم نوعان : (Thackery, 2002)

4- ورم حميد Benign neoplasm

5- ورم خبيث Malignant neoplasm الذي يدعى بالسرطان Cancer

2-2-2- السرطان:

• تعريف السرطان:

- زيادة غير طبيعية في كتلة الأنسجة
- نمو غير منظم (سريع وكبير) لخلايا هذه الأنسجة
- استمرار الخلايا بالنمو حتى بعد توقف تأثير عوامل النمو Growth Factor عليها وهذا ما نسميه استقلالية الخلية السرطانية حيث تصبح قادرة على صنع عوامل نمو Growth Factor خاصة بها مما يجعلها تنمو باستمرار
- هذا النمو الكبير لا يخدم أي هدف للخلية (النمو لمجرد النمو) بينما الأنسجة الطبيعية تنمو لتخدم بهذا النمو هدفاً للعضوية
- الانتشار غير الطبيعي لهذه الخلايا في الأنسجة الأخرى الطبيعية
- و النتيجة غالبا ما تكون الموت وذلك بسبب إصابة كل من (الكبد , الدماغ , الرئتين , انسداد أوعية ناتج عن السرطان ,....) (Castro, 2001)

• أسباب السرطان:

1. طفرات ال DNA Mutation : وتنتج هذه الطفرات عن :

الإشعاعات - التدخين - الكحول

يمكن أن تكون طفرات جسمية عشوائية وممكن ان تكون طفرة موروثية نتيجة وجود

سوابق بالعائلة

2. الإنتانات Sepsis: وإما أن تكون

إنتانات فيروسية: مثل فيروس HPV الذي يسبب سرطان عنق الرحم

إنتانات جرثومية: مثل بكتيريا H.Pylori التي تسبب سرطان المعدة

(Suzuki and Mori, 2018) ; (Crosbie *et al.*, 2013)

• الصفات المميزة للسرطان على المستوى الجزيئي:

نشر العالمان Hanahan & Weinberg في عام 2000 مقالة في مجلة Cell وضحا فيها

الصفات المميزة للسرطان على المستوى الجزيئي وكل الكتب والأبحاث اللاحقة اعتمدت على

هذه المقالة الفريدة وهذه الصفات هي: (Hanahan and Weinberg, 2000)

1. الخلية السرطانية ذات اكتفاء ذاتي بإشارات النمو

2. الخلية السرطانية غير حساسة بالإشارات التي توغر بالموت

3. الخلية السرطانية لاتموت موتاً مبرمجاً

4. الخلية السرطانية لها قدرة لا محدودة على التضاعف والتكاثر

5. صنع أوعية دموية بشكل مستمر حتى تتغذى الخلايا السرطانية الجديدة

6. غزو الأنسجة الأخرى والانتشار

حسب إحصائيات منظمة الصحة العالمية (WHO) world Health Organization لعام 2020

يُعد سرطان القولون ثالث أنواع السرطان انتشاراً بحوالي 1.93 مليون حالة بعد سرطان الثدي 2.26

مليون حالة وسرطان الرئة 2.21 مليون حالة ، وثاني سبب رئيسي من أسباب الوفاة من جراء

السرطان بنسبة 935000 وفاة .

2-3-2- لمحّة عن سرطان القولون:

أثناء عملية الهضم يتحرك الطعام من خلال المعدة والأمعاء الدقيقة إلى القولون الذي يمتص الماء والمغذيات ويخزن الفضلات وينقلها إلى المستقيم ثم فتحة الشرج للتخلص منها. يتطور حوالي 95% من سرطان القولون في الخلايا الغدية التي تشكل بطانة القولون والمستقيم. ويسمى السرطان الذي يبدأ بالخلية الغدية بالسرطان الغدي adenocarcinoma حيث يبدأ السرطان في الطبقة العميقة من البطانة ويتقدم ببطء لبقية الطبقات المكونة للقولون. غالباً ما يبدأ سرطان القولون والمستقيم بنمو الخلايا على شكل بوليبيات polyps تتشكل على الجدار الداخلي للقولون والمستقيم مكونة ورماً حميداً قد يتحول إلى ورم خبيث مع الوقت. (Half *et al.*, 2009)

يعد الأشخاص الذين يعانون من التهاب الأمعاء معرضين لخطر مرتفع للإصابة بسرطان القولون. ويمكن لاكتشاف البوليبيات والتخلص منها أن يمنع سرطان القولون من التشكل. كما يمكن أثناء التنظير إزالة الأورام الحميدة الصغيرة إن وجدت. وإذا عثر على ورم كبير يمكن إجراء خزعة للتحقق إن كان خبيثاً أم لا. وهناك أعراض تشير إلى وجود السرطان تشمل وجود دم في البراز، وتغير في حركة الأمعاء، وفقدان الوزن والشعر طيلة الوقت (Jawad *et al.*, 2011)

ينتج سرطان القولون من تراكم التغيرات الوراثية والتغيرات فوق الوراثية في الجينات الورمية والجينات الكابحة للورم في الخلايا الظهارية للقولون الأمر الذي يحولها من خلايا طبيعية إلى خلايا سرطانية غدية adenocarcinomas.

أظهرت نتائج سلسلة الجينوم السرطاني أن معظم الجينومات السرطانية تحمل المئات من الطفرات، وهو ما يشكل تحدياً كبيراً لتحديد أي من هذه الطفرات يلعب دوراً في مسار تشكل السرطان ، وتدعى driver mutations وأي منها طراً نتيجة لهذه العملية يدعى passenger mutation

علاوة على ذلك يمكن أن نصنف سرطان القولون والمستقيم بشكل أدق إلى تحت مجموعات sub-group وذلك حسب عدم الاستقرار الجيني والوراثي الذي تبديه:

1- مجموعة الصبغيات غير المستقرة chromosomal instability CIN والتي تتميز بخلل في الصيغة الصبغية aneuploidy من خلال زيادة أو نقصان لأجزاء كاملة أو كبيرة من الكروموسومات

2- مجموعة السوائل الدقيقة غير المستقرة microsatellite instability والتي يتم تحديدها من خلال طفرة إدخال وحذف في التسلسلات التكرارية لل DNA.

3- شذوذ مثيلة الحمض النووي CGP Island Methylation CIMP : التي تعطل النسخ عن طريق فرط مثيلة الحمض النووي في جزر CGP للجينات الكابتة للورم (Jass, 2007) ; (Ogino and Goel, 2008) ; (Toyota *et al.*, 1999)

2-2-4- دور الطفرات في تشكل سرطان القولون:

للطفرات الجينية دور أساسي في تشكل السرطان حتى في أبكر مراحل تكون البوليبيات مما يؤدي إلى تسلسل تطور المرض. وتظهر أول آفة نسيجية متورطة في تشكل سرطان القولون في خبايا القولون حيث تصاب هذه الخبايا بطفرات في مورثة الـ APC، وهي إحدى أكثر الجينات الكابحة للورم التي تكون طافرة في سرطان القولون والمستقيم، إن تعطيل الـ APC يؤدي إلى تفعيل مسار Wingless Wnt وهو آلية معروفة لبدء استهلال تشكل البوليبي مما يؤدي إلى تسلسل تقدم السرطان . (Vogelstein *et al.*, 1988)

لاحقا قد تصاب جينات أخرى بطفرات مثل جينات الـ K-RAS و TP53 مما يؤدي إلى تعزيز التطور النسيجي لتحول خلايا البوليبي إلى سرطان، يؤدي نمو وتقدم الطفرات التي تصيب تلك

الجينات إلى طفرات في الجينات التي تنظم المسارات الإشارية المهمة للخلية مثل المسار

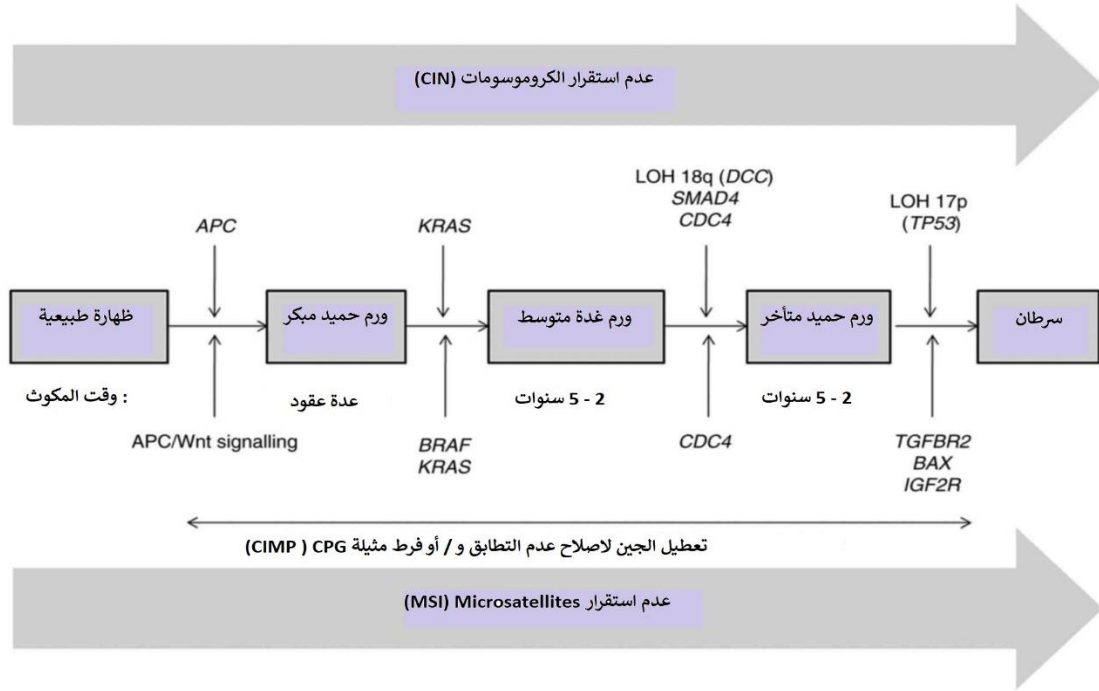
الإشاري لعامل النمو بيتا TGFB1 (Boland, 1997)

بشكل عام يبدأ تكون سرطان القولون والمستقيم CRC بتحول ظهارة القولون والمستقيم الطبيعي

إلى ورم غدي حميد مما يؤدي لاحقاً إلى أورام غازية invasive ونقيلة metastatic قد

تستغرق هذه العملية من عدة سنوات إلى عقود للهروب من الطبقات التنظيمية المتعددة للخلايا

والتطور الكامل الشكل (3) (Nguyen and Duong, 2018)



الشكل (3) : المسارات الرئيسية لتسلسل الورم الحميد القولوني والمستقيم إلى ورم سرطاني

2-2-5- النزرع الخلوي Cell Culture:

نشأ علم زراعة الخلايا والأنسجة في القرن التاسع عشر، وتطور عن طريق تطوير أساليب وتقنيات علم الأجنة، وقد كان الدافع الرئيسي لتطوير زراعة الخلايا هو دراسة النشاطات الفيزيولوجية للخلية السوية تحت المجهر (Chaudry, 2004)

2-2-5-1- تعريف النزرع الخلوي والنسجي:

يعتبر النزرع الخلوي والنسجي من أهم الأدوات التي تستخدم في مجالات الدراسات الطبية، حيث يمكن تعريفه بأنه فصل الخلية عن النسج الحيوي الحيواني أو النباتي أو البشري (بعد استخراج النسج من العضو الذي تم استخراجه من الجسم أثناء تشريحه) وإبقاء هذه الخلية حية بوضعها في بيئة مناسبة، بحيث تبقى قادرة على القيام بوظائفها الحيوية خارج الكائن الحي في المختبر *in vitro*، تتضمن هذه البيئة وعاء زرع زجاجياً أو بلاستيكياً مناسباً يحتوي على وسط زرع يؤمن كافة المواد المغذية الأساسية التي تحتاج إليها الخلايا كي تعيش وتتكاثر. (Freshney, 2005)

2-2-5-2- الفرق بين النزرع الأولي والنزرع الثانوي:

النزرع الأولي للخلايا Primary Cell Culture يتم فيه عزل الخلايا عن الأنسجة وإكثارها ضمن الظروف المناسبة إلى أن يصل عدد الخلايا إلى الحد الأعظمي ضمن الركيزة الوسط، عندئذ يجب إجراء النزرع الثانوي Subculture والذي هو نقل هذه الخلايا إلى وعاء جديد يحتوي على وسط زرع جديد New Medium لإعطاء مساحة أكبر للنمو المستمر للخلايا. (Chaudry, 2004)

2-2-5-3- شروط الزرع الخلوي:

تختلف شروط زراعة الخلايا باختلاف نمط الخلايا وباختلاف طريقة تكاثرها سواء كانت ملتصقة بعلبة الزرع Flask أو غير ملتصقة إطلاقاً حيث تطفو ضمن وسط الزرع ولكن يمكن القول إنَّ الشروط المناسبة لزراعة جميع أنواع الخلايا تتطلب توفر ما يأتي: (Segeritz, 2017)

- العناصر المعدنية الرئيسية Metallic Elements
- الفيتامينات الأساسية Vitamin
- الأحماض الأمينية Amino Acids
- الأحماض العضوية Organic Acids
- السكريات Carbohydrate
- الليبيدات Lipids
- عوامل النمو Growth Factors
- الهرمونات Hormones
- الغازات Gases مثل الأوكسجين وثنائي أوكسيد الكربون
- عناصر البيئة الفيزيوكيميائية Physicochemical والتي تتضمن ال PH والضغط الأسموزي ودرجة الحرارة

2-2-6- الخطوط الخلوية السرطانية Cancer Cell Line:

2-2-6-1- الخط الخلوي Cell Line

هو اسم يطلق على المزرعة الرئيسة بعد إجراء عملية الزرع الثانوي Subculture، حيث تمتلك الخلايا ضمن هذه الخطوط الخلوية عمراً افتراضياً محدداً، وباعتبار أنه تم نقلها فإن الخلايا التي تمتلك أعلى قدرة على النمو هي التي تسود الوسط، منتجة بذلك نمطاً واحداً من الخلايا المشتركة في كل من الصفات الوراثية والشكلية ضمن مجموعة الخلايا.

وفي الزراعة الخلوية الواحدة عادة ما تكون الخلايا من نوع واحد كالخلايا الليفية والتي تسمى الخلايا متجانسة المنشأ Homogeneous Population بينما إذا كانت الخلايا في الزراعة الواحدة أكثر من نوع فتسمى مجموعة الخلايا في هذه الزراعة الخلايا متغايرة المنشأ Heterogeneous Population

2-2-6-2- أنماط الخلايا

يعتمد في تصنيف الخلايا المزروعة على عاملين أساسيين (Clarke *et al.*, 2006):

الوصف المورفولوجي: من الجدير بالذكر أن شروط الزرع الخلوي تؤدي دوراً أساسياً في تحديد الشكل إذ باستطاعة العديد من المزارع الخلوية أن تبدي عدداً من الموصفات الشكلية وهنا لدينا ثلاثة أشكال أساسية معتمدة:

- خلايا مشابهة للخلايا الظهارية Epithelial-Like cells: خلايا ملتصقة بالركيزة وتبدو

مسطحة ومضلعة الشكل

- شبيهة الأرومة الليمفاوية Lymphoblast –Like cells: خلايا لا تكون ملتصقة بالركيزة

وعادة تبقى طافية ضمن المعلق وتبدو بشكل كروي

- شبيهة الأرومة الليفية Fibroblast –Like cells :خلايا ملتصقة بالركيزة وتبدو متطاولة

الشكل وثنائية القطب

الخصائص الوظيفية: حيث تأتي هذه الخصائص بناء على:

- اختلاف العضو الأساسي (الكبد – القلب – الرئة –...) الذي تم عزل العضو عنه
- اختلاف طريقة تكيف هذه الخلايا مع شروط الزرع

الخط الخلوي Cell Line المستخدم في هذا البحث :

الخط الخلوي السرطاني المستخدم هو الخط CACO-2 وهو من الخطوط الخلوية السرطانية البشرية وهي خلايا ظهارية معزولة عن أنسجة القولون مشتقة من ذكر أبيض يبلغ من العمر 72 عاما مصاب بسرطان القولون والمستقيم تم تطويره عام 1977 بواسطة Jorgen Fogh في معهد Sloan-Kettering (Fogh and Orfeo, 1977)

الوصف بحسب ATCC (American Type Culture Collection) (منظمة تقوم بجمع وتخزين و توزيع الكائنات الحية الدقيقة المرجعية القياسية وخطوط الخلايا وغيرها من المواد للبحث والتطوير)

Product Category:	Human cells
Organism:	Homo sapiens , human
Cell type:	Epithelial cell
Morphology:	Epithelial – Like
Tissue:	Large intestine;Colon
Disease:	Colorectal Adenocarcinoma

Applications:	3D cell culture High-throughput screening Toxicology
Product format:	Frozen
Storage Condiion:	Vapor phase of liquid nitrogen

2-2-7- اختبار تأثير الخلاصات النباتية في عيوشية الخلايا السرطانية Cell

:Viability

2-2-7-1- اختبار سمية الخلاصات النباتية على عيوشية الخلايا السرطانية المزروعة في المختبر

: *in-vitro*

توجه الاهتمام حديثاً إلى دراسة تأثير الخلاصات النباتية في الخلايا السرطانية المزروعة في المختبر لأنها تمتاز بتكلفتها القليلة مقارنة مع استخدام حيوان التجربة بشكل كامل، وأنها سريعة بإعطاء النتائج، وتتلاءم مع الاتجاه العالمي لتخفيض إجراء الاختبارات على حيوانات التجربة بشكل عام، وتوفر إمكانية التحكم بشروط التجارب والاختبارات في المختبر، كما تحد من مخاطر التجارب المرتبطة باختبار الخلاصات النباتية لنباتات سامة على سبيل المثال، وتصلح كمرحلة أولية قبل البدء بدراسة تأثير الخلاصات وفعاليتها على الخلايا السرطانية في جسم حيوان التجربة *In-Vivo* ومقارنتها مع البيانات المتوفرة والنتائج الأقرب للواقع بتأثيرها على الإنسان من خلال الدراسات الخلوية للتدريبات ، وتقدر سمية الخلاصات النباتية على الخلايا السرطانية المزروعة عادة من خلال مقايمة عيوشية الخلايا Cell

.Viability Assay

2-7-2-2-مقايضة عيوشية الخلايا :Cell Viability Assay

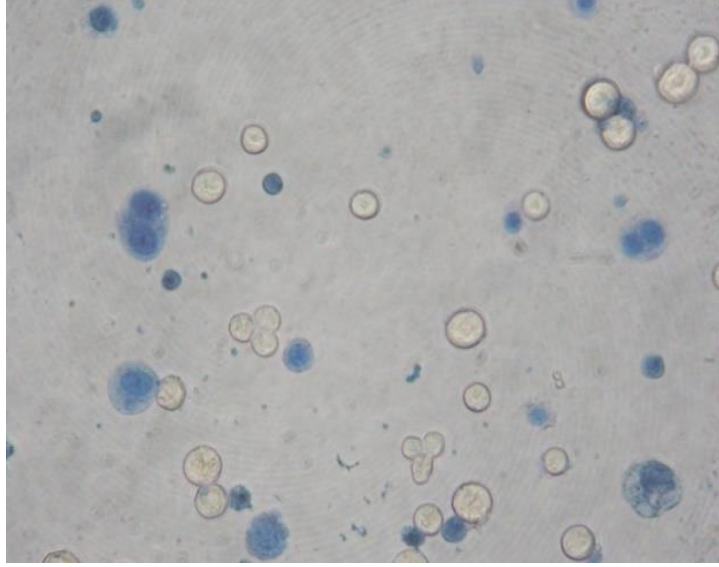
يعتبر قياس عيوشية الخلايا ومعدل تكاثرها أساساً لتجارب المقايضات في المختبر، وذلك لدراسة رد فعل الخلايا عند تعرضها للعوامل الخارجية، كالخلاصات النباتية على سبيل المثال، وتقسم طرق المقايضة حسب مبدئها إلى أربع مجموعات: (Doyle, Griffiths, & Newell, 1998)

- المقايضات التي تعتمد على تحليل الغشاء الخلوي مثل مقايضة زرقة التريبان Trypan Blue.
- المقايضات التي تعتمد على نشاط المتقدرات Mitochondrial activity مثل مقايضة الفورمازان.
- المقايضات التي تعتمد على وظائف الخلايا Functional assay.
- المقايضات الجينومية Genomic assays.

تعتبر طريقة زرقة تريبان وطريقة الفورمازان من أكثر الطرق المستخدمة في تعداد الخلايا وحساب معدل عيوشيتها، وفيما يلي مبدأ عمل كل منها:

2-7-2-3- مبدأ طريقة زرقة التريبان Trypan Blue:

يعتمد مبدأ هذه الطريقة على أن الخلايا الحية لا تلتقط صبغة زرقة التريبان بالتالي تقوم الخلايا الميتة بالتقاطها، لذا تظهر الخلايا الحية شفافة تحت المجهر في حين تتلون الخلايا الميتة باللون الأزرق، ثم يتم تعداد كل من الخلايا الحية والميتة إما يدوياً باستخدام عداد الكريات Neubauer Slide، أو آلياً. (Umpleby *et al.*, 1984)



الشكل (4) : تصبغ الخلايا الميتة بال Trypan Blue

2-2-7-4- مبدأ طريقة الـ MTT:

يعتمد المبدأ على قياس نشاط الخلايا الحية، وذلك من خلال قياس الفعالية المرجعة لأنزيم المتقدرات النازع للهيدروجين لمركب الـ MTT.



حيث يكون مركب الـ MTT أصفر اللون ومنحلا في وسط الزرع، ثم يقوم إنزيم المتقدرات المنتج من الخلايا الحية بإرجاعه ليعطي بلورات فورمازان زهرية اللون وغير منحلة بالماء أو بوسط الزرع، ويمكن حل هذه البلورات بمحل DMSO (دي ميثيل إيزوبروبيل)، ثم يقاس لون المحلول الزهري الناتج باستخدام جهاز مقياس الطيف الضوئي، وإن زيادة عدد الخلايا الحية ينجم عنه زيادة في امتصاص الضوء وبشكل طردي. (Marks *et al.*, 1992)

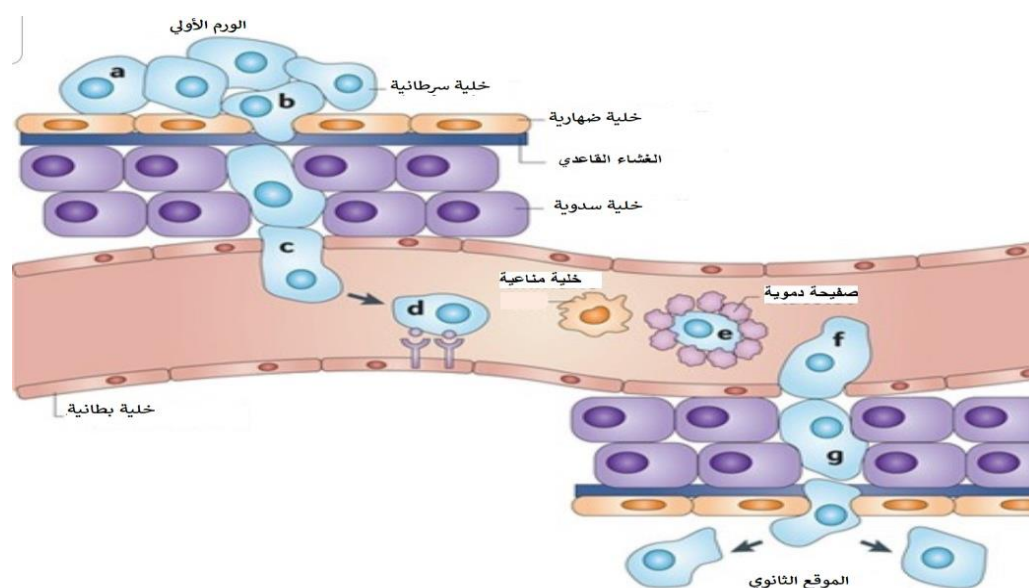


الشكل (5) : آلية عمل طريقة MTT كيميائياً

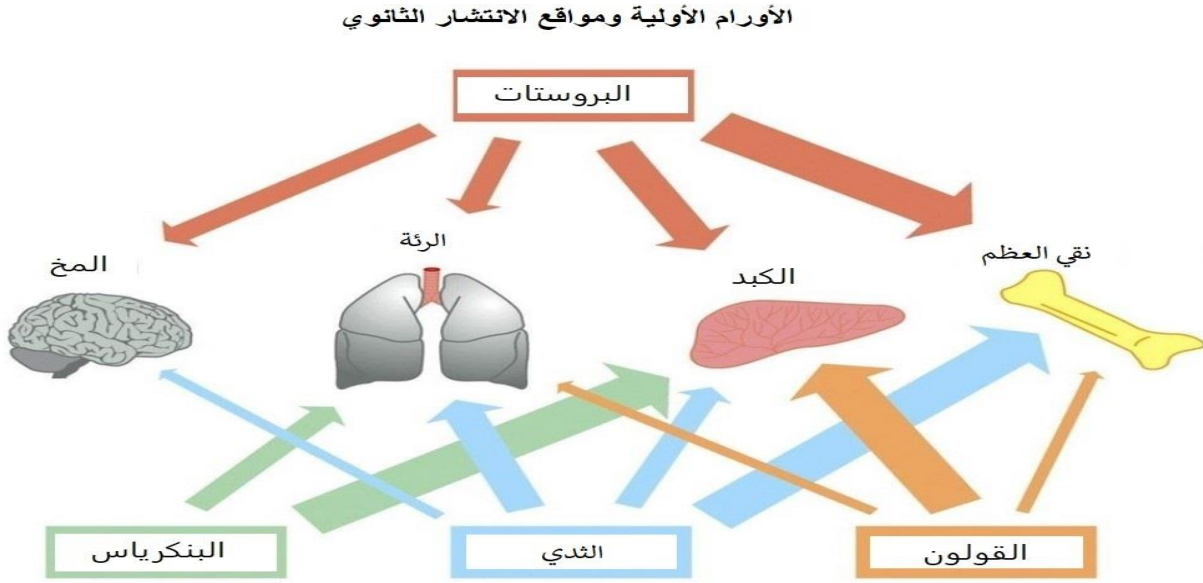
2-2-8- هجرة الخلايا السرطانية Cell Migration:

تمتلك الخلايا السرطانية القدرة على الهجرة، لذلك ينتقل السرطان إلى أعضاء أخرى وبسرعة كبيرة، حيث تهاجر الخلايا السرطانية الغازية Migratory Cells من موقع الورم الرئيسي نحو الأوعية الدموية في الأنسجة المحيطة بها، حيث تخترق هذه الخلايا جدار الوعاء الدموي Intravasate، ثم يتم نفاذ هذه الخلايا إلى أعضاء بعيدة عن ط

ريق تدفق الدم الطبيعي مشكلة الأورام الثانوية (Schroeder *et al.*, 2012) Metastatic Tumor



الشكل (6): آلية هجرة الخلايا السرطانية Cell Migration

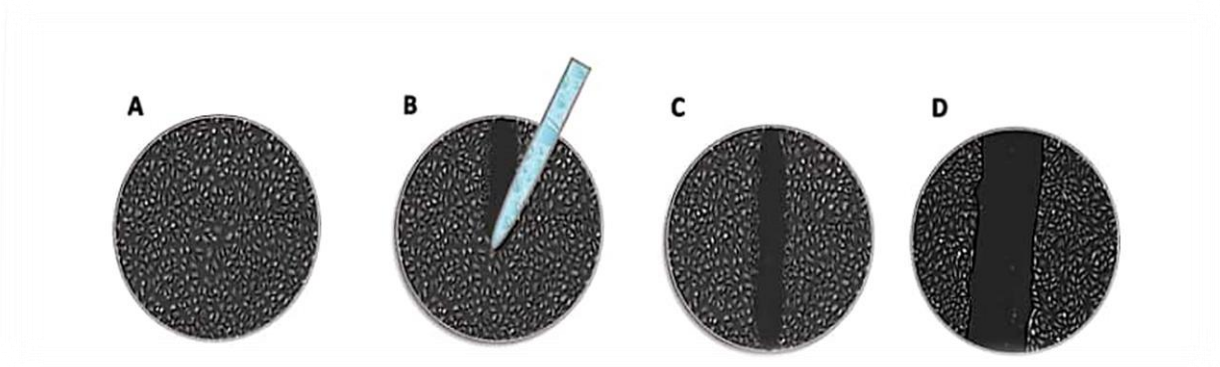


الشكل (7) : الأورام الأولية وأماكن انتشارها ثانوياً

2-2-8-1- مقايصة هجرة الخلايا السرطانية cell Migration assay :

هناك عدة طرق لمقايصة هجرة الخلايا أسهلها التتام الجروح Wound Healing Assay والتي تعتمد على إحداث شق في الوسط الزرعي ومراقبة الخلايا خلال فترة معينة يحدث خلالها انغلاق لذلك الجرح

بسبب هجرة الخلايا (Rodriguez *et al.*, 2005)



الشكل (8) : طريقة مقايصة هجرة الخلايا السرطانية باستخدام طريقة wound healing assay

الفصل الثالث

مواد وطرائق البحث

3-1- المواد والطرائق:

3-1-1- مخطط الدراسة:

مخطط دراسة الزعفران *Crocus sativus* L. على خط خلوي لسرطان الأمعاء CACO-2 :

1. الاستخلاص EXTRACTION

2. الزرع الخلوي CELL CULTURE

3. عيوشية الخلايا السرطانية Cell Viability

4. هجرة الخلايا السرطانية Cell Migration

3-1-2- الأجهزة والأدوات:

الأجهزة والمواد المستخدمة في تحضير المستخلص النباتي:

- المبخر الدوار Rotary evaporator

- فلاتر

- Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

- ميثانول 85% Methanol

الأجهزة والمعدات والمحاليل Kits المستخدمة في الزرع الخلوي:

- حاضنة Co2 Incubator (Lab Tech-Lco-065 AI)

- حجرة عقيمة Laminar Air Flow-class2

- مجهر مقلوب (Inverted Microscope) (Nikon Eclipse-TS100)

- جهاز مقايضة الممتز المناعي المرتبط بالأنزيم Enzyme-Linked immunosorbent (SCO) Assay (ELISA)
- عدادة خلايا يدوية (Neubauer Slide)
- عدادة خلايا آلية (Countess TM Automated Cell Counter) (Invitrogen)
- حافظة نتروجين سائلة
- مجمدة بدرجة حرارة -80°C
- علبة تجميد نالجين Nalgene Mr.Frosty
- جهاز الموصدة Autoclave للتعقيم بالبخار المضغوط
- مثقلة
- ممصات ميكروبية بسعات مختلفة.
- علب زرع T25 مع أغطية ذات فلتر (من شركة TPP)
- أطباق 96 بئراً 96-well plates (من شركة TPP)
- أطباق 24 بئراً 24-well plates (من شركة TPP)
- ممصات باستور
- أنابيب تنقيط 15 ml و 50 ml
- أنابيب إبيندروف
- مرشحات $0.22\ \mu\text{m}$ (Millipore)

- رؤوس ممصات

3-1-3- محاليل أوساط الزرع والملونات الخارجية:

- وسط (Euroclone) Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)
- (Euroclone) Penicillin–Streptomycin
- محلول غلوتامين (Euroclone) L–glutamine
- مصل جنين بقرى (Euroclone) Fetal Bovine Serum
- محلول (Euroclone) (DMSO) Dimethyl Sulfoxide
- محلول (PBS) Phosphate–Buffered Saline خال من الكالسيوم والمغنسيوم
- محلول Trypsin/EDTA 10X
- زرقة التريبان Trypan blue
- (Sigma) Kit MTT
- إيثانول 70 % Ethanol

3-1-4- العينات النباتية:

تم أخذ غرام واحد من المياسم الجافة للزعفران *Crocus sativus* L.

الشكل (9): المياسم الجافة من الزعفران

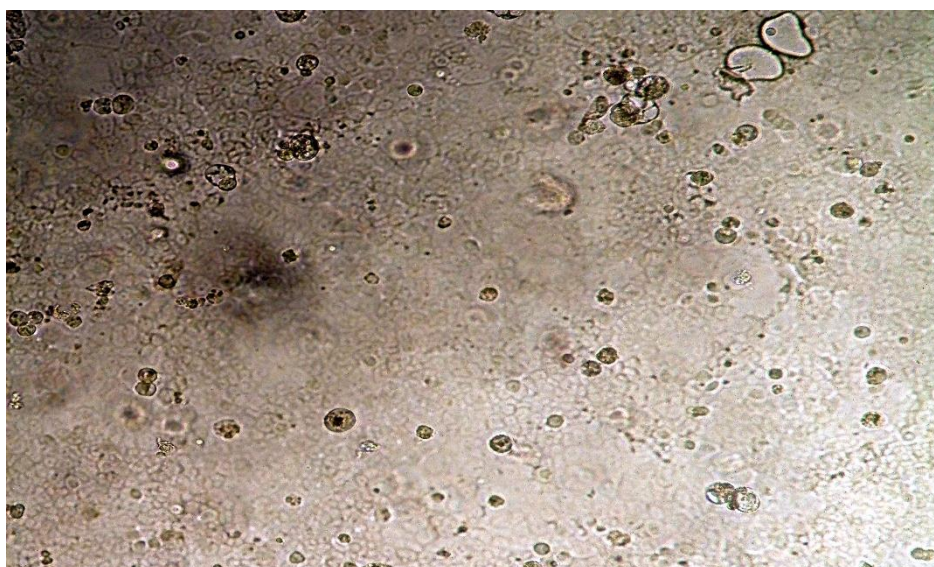
Crocus sativus L. التي تم استخدامها



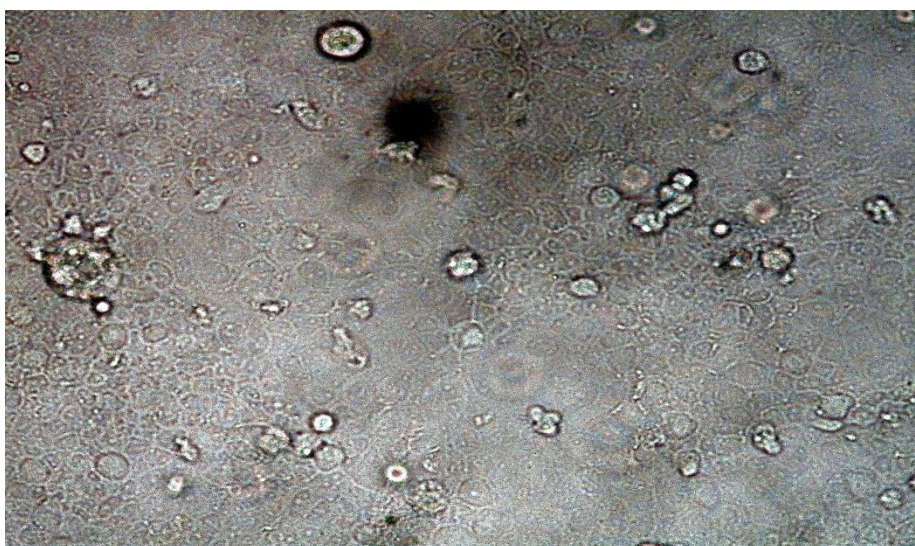
3-1-5- خط الخلايا السرطانية المستخدم Cancer Cell Line :

الخط السرطاني المستخدم هو خط خلوي لسرطان القولون والمستقيم Caco-2 وقد أحضر من

مخبر الحيوانات الطبية والحيوانية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية



الشكل(10): خلايا الخط الخلوي لسرطان القولون CACO -2 بتكبير X10



الشكل(11): خلايا الخط الخلوي لسرطان القولون CACO -2 بتكبير X20

3-2- الطريقة المتبعة في تحضير المستخلص النباتي:

هناك عدة طرق للاستخلاص:

1. الاستخلاص الكحولي

2. الاستخلاص بالماء البارد

3. الاستخلاص باستخدام Ultrasonic

تم العمل على طريقة الاستخلاص الكحولي (Festuccia *et al.*, 2014) كما يلي :

- يؤخذ 1gr من المياسم الجافة للزعفران المستورد *Crocus Sativus* L.
- تطحن المياسم بالجرن بشكل جاف
- يضاف 20ml من الإيثانول 80%
- ينقل كامل المحلول إلى أرلنماير سعة 100ml
- يحفظ المستخلص ليلة كاملة بالظلام ودرجة حرارة -4 مع الهز المستمر
- في اليوم التالي يرشح كامل المحلول في أنبوب 50ml باستخدام ورق نشاف
- تؤخذ الرشاحة السابقة ويتم تكثيفها باستخدام المبخر الدوراني Rotary evaporator حتى يتم التخلص من المذيب ثم توزن الخلاصة الناتجة
- تحفظ الخلاصة في أوعية مغلقة وعاتمة وبدرجة حرارة -20°C

3-3- الطريقة المتبعة في الزرع الخلوي :

تم زرع الخلايا السرطانية للخط الخلوي CACO-2. وذلك في مخبر الحيوانات الطبية والحيوانية التابع

للهيئة العامة للتقانة الحيوية بدمشق

3-3-1- تحضير أوساط الزرع Medium:

وسط الزرع مع الفينول (ملون بالأحمر) :

كل 100 ml من وسط الزرع يتكون من :

10 ml FBS + 1 ml L-glutamine + 1 ml penicillin/streptomycin + 0.2 ml fungizone + 87.8 ml DMEM

وسط الزرع بدون فينول وبدون مصل (بدون لون)

1 ml L-glutamine + 1 ml penicillin/streptomycin + 0.2 ml fungizone + 87.8 ml DMEM without phenol

3-3-2- البرنامج المتبع Protocol في الزرع الخلوي Cell Culture : (Hayward and)

(Whitehead, 1992)

3-3-1- إذابة الخلايا Cell thawing:

• تجهز الحجرة العقيمة Laminar Airflow بالمواد والأدوات الضرورية (حامل أنابيب -

أنابيب سعة 50 ml cell -

25 T culture flask - ممصات باستور عقيمة - إيتانول 70%)

• يتم إخراج أمبولة الخلايا من مخزن النيتروجين السائل.

• يوضع القسم السفلي للأمبولة في حمام مائي بدرجة حرارة (37 °C) حتى ذوبان الخلايا .

• تعقم الامبولة ويتم نقلها إلى الحجرة العقيمة Laminar Airflow

• يتم تنقيط الخلايا ضمن وسط الزرع ثم يتم حضنها في حاضنة CO2 بدرجة حرارة 37°C

وبتركيز 5% من CO2

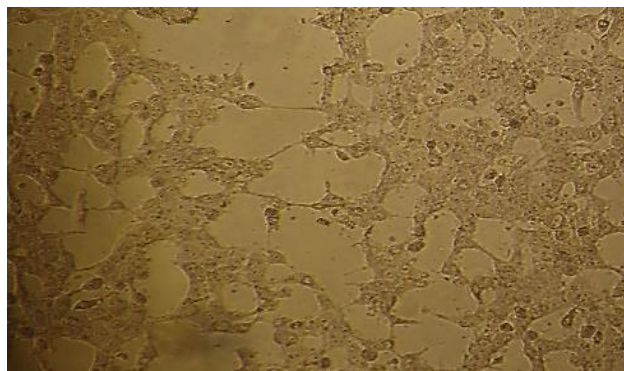
3-3-2-2- تغيير الوسط:

ويتم ذلك كل ثلاثة أيام وفق الخطوات التالية:

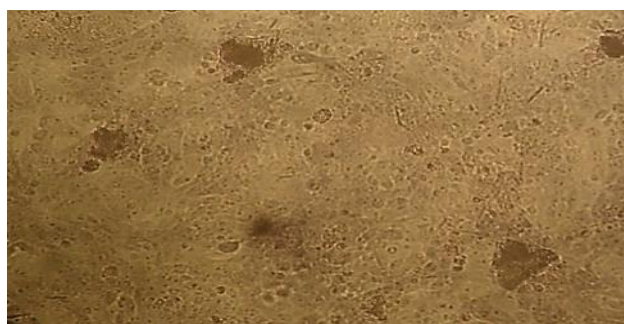
- تُفحص الخلايا باستخدام المجهر المقلوب للتأكد من عدم تلوث الخلايا بالجراثيم والفطور
- يسحب وسط الزرع.
- يضاف مقدار 2 مل من وسط جديد دافئ إلى علبه الزرع
- تُعاد الخلايا إلى حاضنة CO₂ بدرجة حرارة 37 °C وبتركيز 5% من CO₂.

3-3-2-3- الزرع الثانوي Subculture:

- تُفحص الخلايا باستخدام المجهر المقلوب للتأكد من عدم تلوث الخلايا بالجراثيم والفطور
- يسحب وسط الزرع إلى أنبوب تقفيل عقيم سعة 15 ml
- يضاف 2ml من محلول Trypsin/EDTA بتركيز 10 % لعلبة الزرع (لفك الخلايا من قعر العلبه) ويوضع في الحاضنة مدة 4 دقائق .
- تُنقل الخلايا من العلبه إلى أنبوب التثقيب السابق.
- يُنقل الأنبوب 10 دقائق سرعة 1500 دورة / دقيقة ثم يتم التخلص من الوسط.
- يضاف 6 مل من وسط جديد إلى أنبوب التثقيب وتعلق الخلايا المفصولة ثم يتم عدها
- ينقل 3 مل من معلق الخلايا إلى الفلاسك الأصلي و ينقل 3 مل المتبقي إلى علبه زرع جديدة
- توضع علبتا الزرع في حاضنة CO₂ بدرجة حرارة 37 °C وبتركيز 5% من CO₂



الشكل(12): خلايا CACO-2 في بداية الزرع



الشكل(13): خلايا CACO-2 حققت نسبة امتلاء أكثر من 90%

3-3-2-4 - عد الخلايا Cell Count:

بعد تعليق كامل الخلايا باستخدام محلول Trypsin/EDTA كما في بروتوكول الزرع الثانوي، يتم عد الخلايا باستخدام العدادة الآلية (counter countess ^TM Automated Cell) وفق الخطوات التالية:

- يُمزج مقدار 10µl من معلق الخلايا مع 30µl من PBS
- يمزج 10µl من المعلق السابق مع 10µl من أزرق التريبان .
- يضاف مقدار 10µl إلى حجرة صفيحة العد المرفقة مع الجهاز
- تدخل صفيحة العد في الجهاز ويجرى العد
- تظهر العدادة عدد الخلايا الحية وعدد الخلايا الميتة ونسبة العيوشية



الشكل (14) : العدادة الآلية

counter countess ^TM Automated Cell

3-3-2-5 - حفظ الخلايا بالتجميد Cryopreservation:

يتكون وسط التجميد من:

60% DMEM + 10% DMSO + 30% FBS

- يتم تعليق كامل الخلايا باستخدام المحلول 10 % Trypsin/EDTA كما في بروتوكول الزرع الثانوي.
- تنقل الخلايا لمدة 5 دقائق بسرعة 1500 دورة/دقيقة .
- يعاد تعليق الخلايا وذلك باستخدام وسط التجميد.
- يوضع مقدار 1 مل من المعلق في أمبولة تجميد معنونة بالمعلومات المناسبة
- توضع الأمبولة في علبة نالجين Nalgene Mr.Frosty مملوءة بالكحول الأيزوبروبيلي ثم توضع
- العلبة بدرجة حرارة -80°C لمدة 24 ساعة
- تنقل الأمبولة إلى حافظة نتروجين سائل وتُخزن لحين استخدامها في مراحل لاحقة.

3-4- الطريقة المتبعة في دراسة تأثير الخلاصة النباتية في عيوشية الخلايا

السرطانية Cell Viability:

3-4-1- الخلاصة النباتية المدروسة:

تمت دراسة تأثير خلاصة الزعفران *Crocus sativus* L. وذلك من خلال زرع الخلايا السرطانية وإكثارها بالزرع الثانوي ومن ثم مقارنة عيوشية الخلايا Cell Viability بعد تطبيق الخلاصة النباتية عليها

3-4-2- البرنامج المتبع Protocol في مقارنة عيوشية الخلايا Cell Viability

:Assay

تمت مقارنة عيوشية الخلايا باتباع طريقة الفورمازان Formazan والتعليمات المرفقة لعتيدة الـ MTT ويعتمد مبدأ المقايسة على إرجاع محلول الـ MTT من خلال الأنزيمات المفردة من مقتدرات الخلايا السرطانية الحية إلى بلورات فورمازان Formazan كما يلي: (langdon, 2002)

- تُفحص الخلايا باستخدام المجهر المقلوب للتأكد من عدم تلوث الخلايا بالجراثيم والفطور
- يُنقل وسط الزرع إلى أنبوب تثقيل عقيم سعة 15ml
- يضاف 2مل من محلول 10 % Trypsin/EDTA إلى علبه الزرع
- توضع في الحاضنة مدة 4 دقائق حتى انفكاك الخلايا عن قعر علبه الزرع
- يُضاف إلى علبه الزرع وسط الزرع السابق لإلغاء تأثير Trypsin/EDTA
- تُنقل الخلايا من علبه الزرع إلى أنبوب التثقيل السابق.
- يُنقل الأنبوب لمدة 10 دقائق بسرعة 1500 دورة /دقيقة ويتم التخلص من الوسط
- يُضاف 4مل وسط جديد إلى أنبوب التثقيل وتعلق الخلايا المفصولة وتُعد

يتم عد الخلايا باستخدام الطريقة اليدوية والطريقة الآلية.

Live: 4.7×10^5 /ml

- يُوضع في طبق 96 well المحاليل التالية:

- 100µl وسط الزرع المستخدم في آبار Blank

- 100µl معلق الخلايا (تركيز 4.7×10^5 خلية /مل) في آبار الشاهد

والعينات

- تُحضان الخلايا لمدة 24 ساعة وفق شرط الزرع (درجة حرارة 37°C وبتركيز 5 % من CO_2).

- يُسحب الطافي من جميع الآبار ويضاف 100µL من وسط زرع جديد 5% FBS و 95µL

من وسط الزرع الجديد إلى آبار العينات

- يُضاف 5µL إلى آبار العينات بتركيز مختلفة من مستخلص الزعفران

($300, 150, 75, 37.5, 18.75, 9.37 \mu\text{g/ml}$) التي تمت إذابتها ب 200ml DMSO ويكرر

كل تركيز من كل عينة 4 مرات.

- تُحضان الخلايا لمدة 48 ساعة بنفس الظروف.

- يُسحب الطافي من جميع الآبار

- يُضاف 20µL من محلول MTT (بتركيز 2 mg/ml) لكل بئر ماعدا بئر البلاك ثم تحضان

الخلايا لمدة 24 ساعة بعيدا عن الضوء بحيث تغطى بورق الألمنيوم (حيث يتحول محلول

MTT الأصفر إلى بلورات الفورمازان الأرجوانية غير المنحلة وإن وجود الأنزيم المتقدي النازع

الهيدروجين الفعال Active Mitochondrial Dehydrogenase في الخلايا الحية هو

السبب في هذا التحول)

- يُسحب الطافي من جميع الآبار

- يُضاف 150µL من DMSO لحل بلورات الفورمازان المتشكلة وننتظر مدة 30 دقيقة
- تتم قراءة الامتصاص باستخدام مقياس الطيف الضوئي متعدد الآبار ELISA عند طول موجة 540 نانومتر وطول موجة مرجعية 630 نانومتر.

تعتبر نسبة عيوشية خلايا الشاهد 100 % وتحسب نسبة تثبيط الخلايا في العينات وفق

المعادلة التالية:

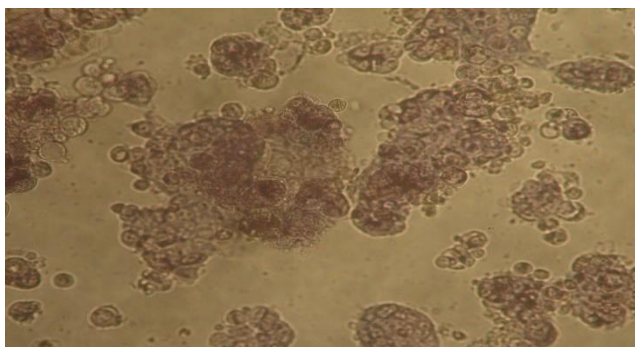
$$\% \text{ Cell Inhibition} = (1 - \text{At}/\text{Ac}) \times 100$$

حيث إن:

At: امتصاصية البئر المعالج بالخلاصة النباتية.

Ac: امتصاصية البئر الشاهد.

يتم حساب الانحراف المعياري Standard Deviation عن متوسط نسبة التثبيط



الشكل(16):تلون خلايا CACO-2 باللون البنفسجي عند

إضافة MTT



الشكل(15):بلورات الفورمازان الأرجوانية غير المنحلة المتشكلة في الآبار

3-5- الطريقة المتبعة في دراسة تأثير الخلاصة النباتية في هجرة الخلايا Cell

:Migration

3-5-1- الخلاصة النباتية المدروسة:

تمت دراسة تأثير الخلاصة النباتية للزعفران *Crocus sativus* L. وذلك من خلال زرع الخلايا السرطانية وإكثارها بالزرع الثانوي ومن ثم مقارنة هجرة الخلايا السرطانية Cell Migration بعد تطبيق الخلاصة النباتية عليها

3-5-2- البرنامج المتبع Protocol في مقارنة هجرة الخلايا Cell Migration Assay:

يعتمد مبدأ المقايسة على إحداث شق بشكل خطي في المستعمرات السرطانية وتسمى طريقة التئام الجرح Wound healing assay وسيلاحظ بعد 24 - 48 ساعة أن الشق قد عاد وامتأل بالخلايا من جديد وهذا دليل على هجرة الخلايا وانتقالها وذلك وفق الخطوات التالية:

- تُزرع الخلايا السرطانية في طبق 24 well بتركيز (4.7×10^5 خلية /مل) ضمن وسط DMEM (يحتوي 10% FBS) حتى تغطي 90% من المساحة.
 - يتم تجويع الخلايا (حرمانها من المصل serum starved) لمدة 24 ساعة وذلك ضمن وسط خال من المصل.
 - يُحدث شق (جرح) بشكل طولي (وذلك بواسطة رأس 20 μ L pipet) مع الضغط لقشط الخلايا ثم يسحب الوسط بالكامل للتخلص من الخلايا المنفصلة.
 - تُغسل الخلايا بـ PBS 1X مع التحريك ثم يُسحب المحلول ويتم التخلص منه
 - يُضاف 500 μ l من وسط الزرع إلى آبار الشاهد control (بدون تطبيق الخلاصة النباتية)
 - يُضاف 490 μ l من وسط الزرع DMEM (يحتوي 10% FBS) إلى آبار العينات
- ويُضاف إليها 10 μ L من الخلاصة النباتية ذات التركيز (300.150,75 mf/ml)

- يُحضن الطبق ضمن شروط الزرع (بدرجة حرارة °C 37 وبتركيز % 5 من CO₂) ويتم التقاط الصور للجروح في الأزمنة التالية (48 - 24 - 0 ساعة) ويقاس حجم الجرح في ثلاثة مواقع عشوائية بشكل عمودي على الجرح

3-6- التحاليل الإحصائية Statistical analysis والبرامج المعتمدة في تقييم

النتائج:

- تحديد الخطأ العشوائي Random Error :

يصعب تحديد الخطأ العشوائي ولكنه يحدث تغيراً في القيمة الحقيقية للعينة المراد قياسها وذلك سلباً وإيجاباً بمقدار واحد أي نسبة الزيادة والنقصان تكون متساوية حول القيمة الحقيقية وبالإمكان تحديد ذلك الخطأ العشوائي من خلال حساب الانحراف المعياري Standard deviation (S.D) الذي يعتمد حسابه على معرفة قيمة المتوسط Mean

تم إجراء هذا التحليل باستخدام برنامج الإحصائية Excel من شركة Microsoft Office

- معامل التحديد Coefficient (R^2) :

يُستخدم للمقارنة بين قيم y المقدرة وقيم y الفعلية وتتراوح قيمته بين صفر و واحد

- إذا كانت قيمته 1 فهذا يدل على وجود ارتباط قوي في العينة وأن معادلة

الانحدار تُفيد في التكهّن بقيمة y (أي يوجد فرق بين قيمة y المقدرة

وقيمة y الفعلية)

- وإذا كانت قيمته 0 فهذا يدل على أن معادلة الانحدار لا تفيد في التكهّن

بقيمة y

تم إجراء هذا التحليل لمعرفة درجة الارتباط بين تراكيز الخلاصة النباتية للزعفران *Crocus*

L. sativus. ونسبة العيوشية للخلايا السرطانية للقولون CACO-2 وذلك باستخدام برنامج

الإحصائية Excel من شركة Microsoft Office

الفصل الرابع :

النتائج و المناقشة

4-1- النتائج Results :

4-1-1- نتائج الاستخلاص:

تم استخلاص 1gr من الزعفران *Crocus sativus* L. باستخدام طريقة الاستخلاص المائي

الكحولي 80% Ethanol

وزن الحوالة فارغة 114.7334 gr

وزن الحوالة بعد الاستخلاص 115.3733 gr

أي تم الحصول على مايقارب 600 mg من المستخلص وتم حلها ب 200ml DMSO

أي التركيز الأعلى الذي تم العمل عليه هو 300 µg/ml



الشكل (17) : مستخلص الزعفران *Crocus Sativus* L.



الشكل (18) : سلسلة التراكيز المستخدمة من مستخلص الزعفران *Crocus sativus* L. السابق

2-1-4- نتائج تأثير الخلاصة النباتية للزعفران *Crocus sativus* L. في عيوشية الخلايا

السرطانية Cell Viability :

نتائج تطبيق الخلاصة النباتية للزعفران *Crocus sativus* L. على الخلايا السرطانية للخط

الخلوي CACO-2 لتحديد التركيز المثبط لنمو الخلايا السرطانية باستخدام مجموعة من التراكيز

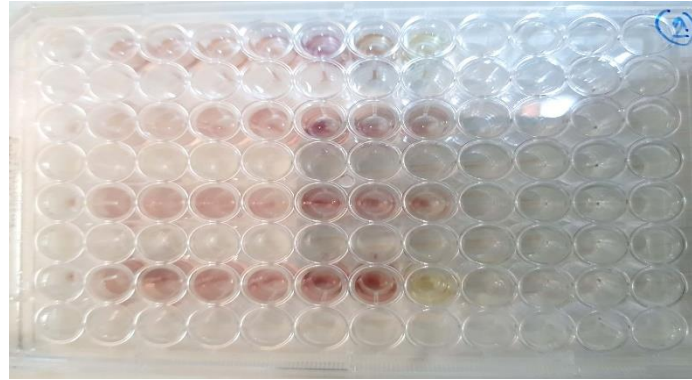
كما في الشكل 19



الشكل (19) : طبق رقم (1) 96 بئراً بعد تطبيق سلسلة التراكيز المدروسة من المستخلص المائي الكحولي للزعفران

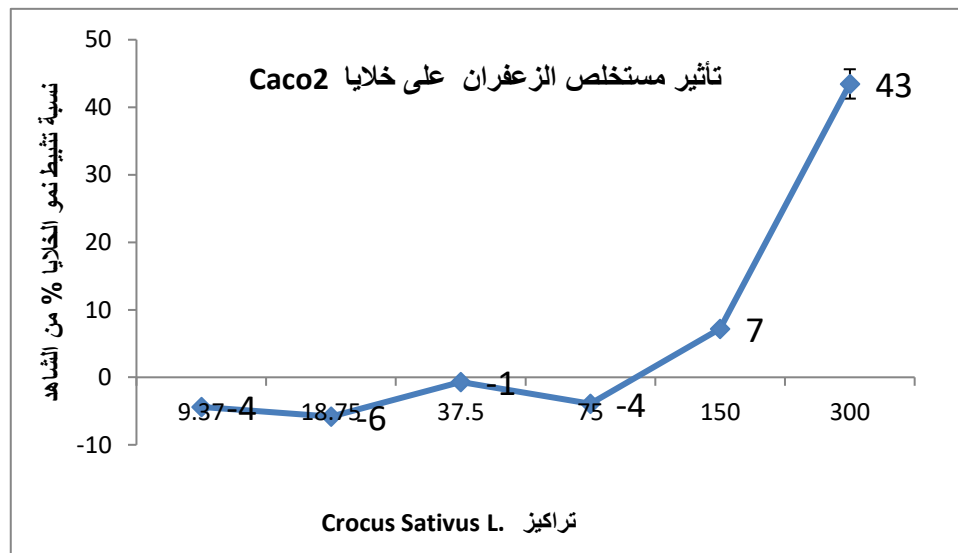
Crocus Sativus L.

(300,150,75,37.5,18.75,9.37 µg/ml)

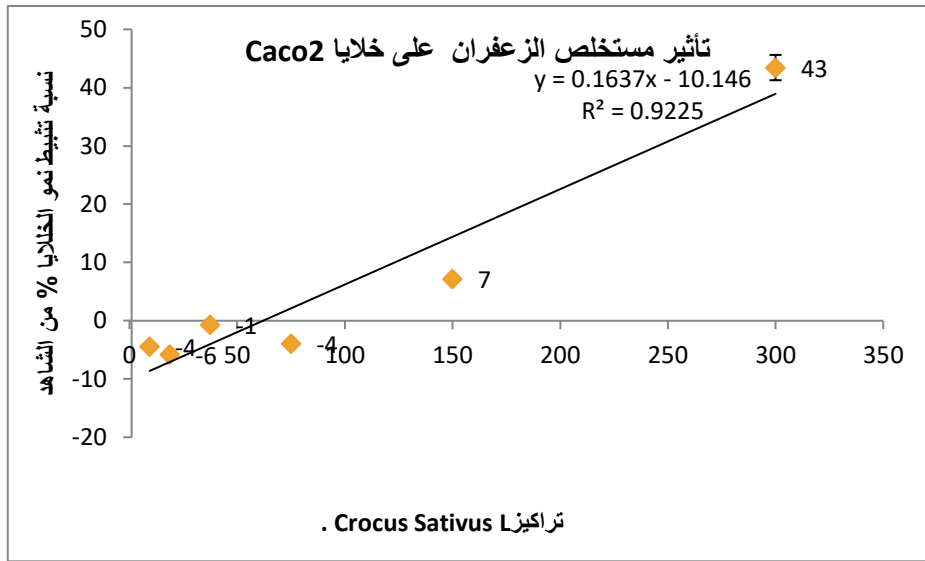


الشكل (20): طبق 96 بئراً لقياس نسبة تثبيط الخلايا السرطانية للخط الخلوي CACO-2 بعد تشكل بلورات الفورمازان الأرجوانية غير المنحلة وذلك في تجربة معالجة الخلايا بتركيز (300,150,75,37.5,18.75,9.37 $\mu\text{g/ml}$ من مستخلص الزعفران الذي تم استخدامه

تم رسم الخط البياني المعبر عن تأثير الخلاصة الكحولية للزعفران *Crocus sativus* L. على نمو الخلايا السرطانية للخط الخلوي CACO-2 وتم استنتاج معادلة الارتباط من الخط البياني بالمقارنة مع الشاهد السلبي وتم استخدام البرنامج الإحصائي Microsoft Office Excel لإجراء الدراسة الإحصائية حيث توضح الأشكال (21) و(22) المنحنيات التي تعبر عن الارتباط بين نسبة تثبيط نمو الخلايا وسلسلة تراكيز الزعفران المطبقة عليها مع المعادلة المعبرة عنها



الشكل (21): تأثير التراكيز المختلفة للخلاصة النباتية للزعفران *Crocus sativus* L. في حيوية الخلايا السرطانية للخط الخلوي CACO-2 و معاملات الارتباط



الشكل (22) : تأثير التراكيز المختلفة للخلاصة النباتية للزعفران *Crocus sativus* L. في خلايا CACO-2

والعلاقة بين النسبة المئوية لتثبيط نمو الخلايا وتركيز الخلاصة

نستنتج من خلال هذه المنحنيات أن الخلاصة النباتية للزعفران *Crocus sativus* L. لديها تأثير مثبت للخلايا السرطانية للخط الخلوي CACO-2 وأن التراكيز الدنيا من المستخلص لم تحدث أي تأثير (9.37, 18.75, 37.5, 75) ثم ازداد تأثير المستخلص مع زيادة التراكيز حيث أدى التركيز 150 μg/ml لتثبيط حوالي 10% من خلايا CACO-2 والتركيز 300 μg/ml أدى لتثبيط حوالي 45% من خلايا CACO-2

كما تبين من خلال الدراسة الإحصائية أن الارتباط Correlation كان قوياً جداً وبلغ مقداره يعادل $R=0.9604$ ويأخذ شكلاً خطياً في العلاقة بين نسبة تثبيط الخلايا وسلسلة تراكيز الخلاصة

النباتية للزعفران *Crocus sativus* L. المطبقة عليها

3-1-4- نتائج تأثير الخلاصة النباتية للزعفران *Crocus sativus* L. في هجرة الخلايا

السرطانية Cell Migration :

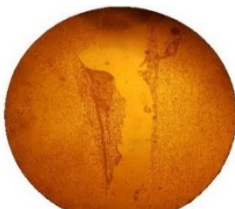
تم قياس المسافة بين حافتي الشق (μm) في ثلاثة مواضع مختلفة بكل حجرة من حجرات الطبق

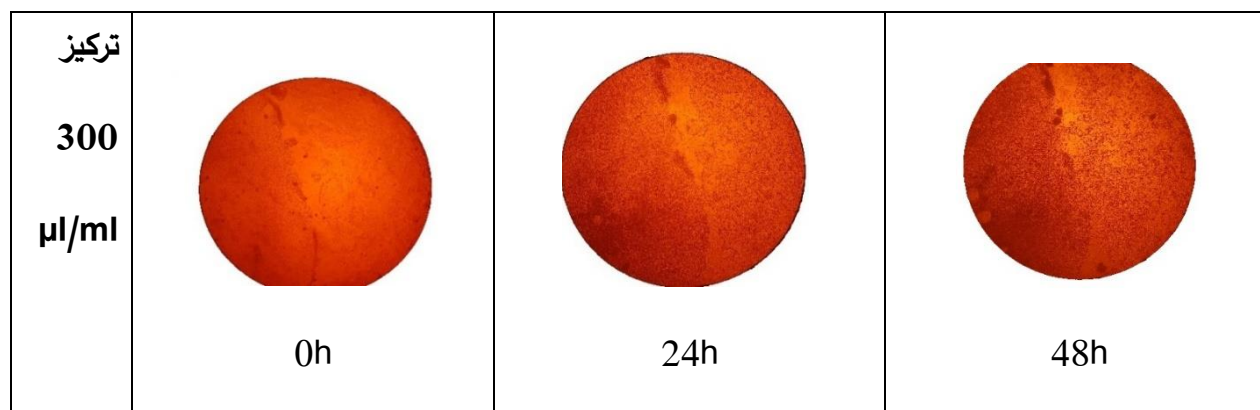
ذي 24 بئراً بعد تطبيق تراكيز مختلفة من الخلاصة النباتية للزعفران *Crocus sativus* L.

خلال 24 و 48 ساعة ويبين الجدول (1) امتلاء الشق في خلايا سرطان القولون CACO-2

نتيجة تطبيق الخلاصة النباتية لنبات الزعفران بالتراكيز المدروسة.

الجدول (1) : يمثل تجربة مقايسة هجرة الخلايا باستخدام طريقة Wound healing assay

الشاهد	 0h	 24h	 48h
تركيز 75 $\mu\text{l/ml}$	 0h	 24h	 48h
تركيز 150 $\mu\text{l/ml}$	 0h	 24h	 48h



2-4 المناقشة Discussion:

2-4-1 مناقشة نتائج اختبار تأثير المستخلص النباتي للزعفران *Crocus sativus* L.

في عيوشية خلايا الخط الخلوي CACO-2 :

من خلال البحث في الدراسات المرجعية لم يتم العثور على أي دراسة تم فيها استخدام

المستخلص النباتي للزعفران لتحديد سميتها على الخلايا السرطانية للخط الخلوي CACO-2

لذلك سيتم مقارنة نتائج هذا البحث مع نتائج دراسات مرجعية أخرى تم فيها استخدام

المستخلص النباتي للزعفران *Crocus sativus* L. في خطوط سرطانية أخرى والملخصة في

الجدول (2) :

Material and species	Solvent used in extraction	Cell line	Origin	Concentration μg	Ref
Saffron extract	Aqueous ethanol extract	CACO-2	Colon	150-300	This study
Saffron		A-204 ;	Muscle	150-200	Abdullaev, <i>et al</i>

extract		HEPG-2 ; SW-480	Liver Colon		
Saffron extract		Hela ; A549 ; WI-38VA	Cervix Lung	100-250	Abdullaev and) (Frenkel, 1992
Saffron extract	Aqueous extract	TCC 5637 L929	Urinary bladder Fibroblast	400-800	FEYZZADEH <i>et</i>) (<i>al.</i> , 2008
Saffron extract	Aqueous extract	A549	Lung	200-400	Samarghandian <i>et</i>) (<i>al.</i> , 2013
Saffron extract	Aqueous ethanol extract	HCT 116(wild type) HCT 116(P53- /-)	Colon	2000-4000	Bajbouj <i>et al.</i> ,) (2012
Crocin	-	LNCaP 22Rv1 CWR22 PC3 DU145	Prostate	260-950	D'Alessandro <i>et</i>) (<i>al.</i> , 2013

يلاحظ من خلال النتائج أن المستخلص المائي الكحولي للزعفران *Crocus sativus* L. يملك تأثيراً ساماً على الخلايا السرطانية للخط الخلوي CACO-2 حيث كان التركيز المثبط لـ 45% من الخلايا $300\mu\text{g/ml}$ وهذا يتوافق مع الدراسات المرجعية للخطوط السرطانية الأخرى

أظهرت نتائج هذه الدراسة أن التركيز المثبط لـ 45% من الخلايا هو $300\mu\text{g/ml}$ وبالمقارنة مع الدراسات المرجعية فقد أظهر المستخلص الإيثانولي للزعفران فعالية مقاومة للخلايا السرطانية للخط الخلوي لسرطان القولون HCT 116 بتركيز أعلى $4000\mu\text{g/ml}$ - $2000\mu\text{g/ml}$ (Bajbouj *et al*, 2000) (2012)

بينما أظهر المستخلص الأيثانولي للزعفران تأثير مثبط على الخلايا السرطانية للخط الخلوي للرئة A549 والأرومات الليفية الطبيعية WI-38VA عند تراكيز أقل $250\mu\text{g/ml}$ - $100\mu\text{g/ml}$ (Abdullaev and Frenkel, 1992)

كما أن نطاق التراكيز المستخدمة في دراستنا كانت ضمن مجال التراكيز المختلفة المستخدمة من المستخلص المائي للزعفران ($400\mu\text{g/ml}$ - $200\mu\text{g/ml}$) على الخلايا السرطانية للخط الخلوي A549 (Samarghandian *et al*, 2013)

بالمقارنة مع الدراسات السابقة تبين أن مستخلص الزعفران يعمل على تثبيط حيوية الخلايا السرطانية بطريقة تعتمد على التراكيز ونوع الخط الخلوي المستخدم

نقطة هامة أيضاً هي أن الوظيفة المضادة للسرطان لمركبات الزعفران تزداد بشكل تآزري (Liu, 2004)

لذلك يكون لمستخلص الزعفران قوة أكبر من مركباته الفعالة وهذا يتوافق مع دراستنا حيث كان لمستخلص الزعفران فعالية مضادة للخلايا السرطانية للخط الخلوي لسرطان القولون CACO-2 عند قيمة $300\mu\text{g/ml}$ وهي أقل من القيمة الوسطية الفعالة للـ crocin على خلايا الخطوط الخلوية

لسرطان البروستات LNCap - 22rv1- CWR22- PC3- DU145 التي تتراوح 260-950

(D'Alessandro *et al*,2013) $\mu\text{g/ml}$

4-2-2- مناقشة نتائج اختبار تأثير المستخلص النباتي للزعفران *Crocus sativus* L. في

هجرة خلايا الخط الخلوي CACO-2 :

من خلال دراسة تأثير المستخلص النباتي للزعفران *Crocus sativus* L. في الخط الخلوي

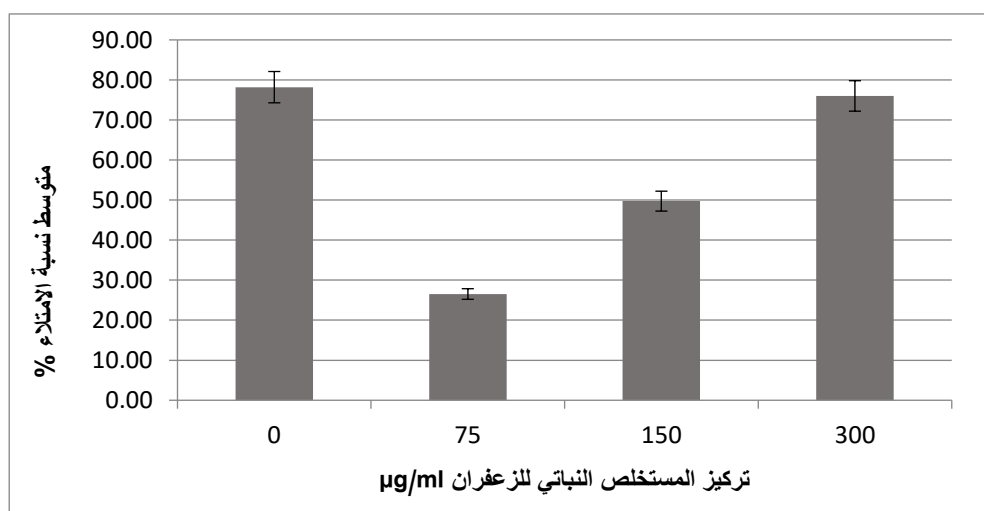
لسرطان القولون CACO-2 تبين أن أدنى تركيز تم تطبيقه أعطى تأثيرا نوعا ما مشبها لهجرة

الخلايا السرطانية $75 \mu\text{g/ml}$

بعد قياس نسبة امتلاء الشق وجد أن هذه النسبة ازدادت بزيادة التركيز المستخدم من خلاصة نبات

الزعفران وقد أحدثت التراكيز (75، 150، 300) $\mu\text{g/ml}$ نسبة امتلاء (7، 49.7، 26.5)% على

التوالي الشكل 23



الشكل (23): تأثير تراكيز المستخلص النباتي للزعفران *Crocus sativus* L. في هجرة الخلايا السرطانية CACO-

2 خلال الزمن 24 و 48 ساعة حيث إن النتائج عبارة عن المتوسط $\pm$ الانحراف المعياري $\pm \text{SD mean}$

حُللت نتائج متوسط نسبة الامتلاء للتركيز المستخدمة باستخدام برنامج SPSS.17 عن طريق اختبار Anova one way جدول (2)، وأظهرت نتائج التحليل وجود فروق معنوية بين التركيزات المختلفة حيث كانت قيمة $P \text{ value} > 0.05$ عند قيمة F محسوبة = 12.605 وانحراف معياري كلي 30.1 .

وباستخدام اختبار L.S.D حُددت أفضل المعاملات حيث كانت القيمة 22.4 ، وبالتالي ظهر أن متوسط نسبة الامتلاء عند التركيز 75µg/ml كان الأقل معنوياً بمتوسط قدره 26.5 ثم 150µg/ml بمتوسط قدره 49.7 بينما كان التركيز 300µg/ml غير معنوي مع الشاهد بمتوسط قدره 76

الجدول (3): قيم المسافة بين حافتي الشق (متوسط ثلاثة مواضع) بعد تطبيق تراكيز مختلفة من المستخلص النباتي للوعوان *Crocus sativus* L. خلال 24 و 48 ساعة:

متوسط نسبة الامتلاء %			
75µg/ml	150 µg/ml	300 µg/ml	Control
26.52 ^a ±16.59	49.73 ^b ±19.9	76 ^c ±25.3	78.19 ^c ±29.1

من خلال البحث في الدراسات المرجعية لم يتم العثور على أية دراسة تم فيها دراسة تأثير المستخلص النباتي للزعفران *Crocus sativus* L. في هجرة الخلايا السرطانية وهذا يقود إلى أهمية الخلاصة المستخدمة في هذه الدراسة

من خلال مقارنة نتائج تأثير المستخلص النباتي للزعفران *Crocus sativus* L. في عيوشية و هجرة خلايا الخط الخلوي CACO-2 تبين أن التركيز المثبط للخلايا السرطانية للخط الخلوي CACO-2 وهو 300 µg/ml يحرض هجرة هذه الخلايا والسبب يكمن فيما يلي:

معظم أنواع الأورام السرطانية لدى البالغين هي سرطانات ظهارية تنشأ عن نمو غير طبيعي للخلايا الظهارية التي تبطن الأسطح وتجاويف الأعضاء مثل الثدي والقولون والكبد والرئتين والخلايا الظهارية هي خلايا مكتملة التمايز وثابتة في مكانها لا تنتقل في حين تتمكن الخلايا المتوسطة من الهجرة بسهولة وفي الجنين هناك عملية تدعى عملية التحول الظهاري - الميزانشيمي EMT تسمح للخلايا الظهارية باكتساب خصائص الخلايا المتوسطة و أن تنقل مواقعها لتعود بعد ذلك إلى النمط الظهاري بواسطة عملية التحول الظهاري-الميزانشيمي MET لتتابع تشكيل البنى الجسدية . تشارك عملية التحول الظهاري - الميزانشيمي أيضا في انتقال الورم وهذه العملية تسمح للخلايا السرطانية الظهارية - مكتملة التمايز والثابتة في موضعها- باكتساب خصائص الخلايا المتوسطة الأكثر قدرة على الغزو (Gunasinghe *et al.*, 2012)

ترتبط عملية التحول الظهاري- الميزانشيمي EMT بالأحداث داخل الخلية بما في ذلك التطور الجنيني والتئام الجروح وتطور الأعضاء و تطور السرطان (Thiery, 2002)

يشارك التبدل بين الطرازين الظاهريين في علم الأمراض البشري المصفوفات خارج الخلية ECMS (شبكات متعددة المكونات تحيط بالخلايا في الأنسجة هذه الشبكات إلزامية لبقاء الخلية ونموها وتمايزها وكذلك تنظيم الأنسجة) في الواقع يمكن للبنية الأساسية ECM بالإضافة إلى دورها الداعم ، معالجة وتقديم عدد كبير من الإشارات إلى الخلايا ، والتي تنظم سلوكها في النهاية ، الأهم من ذلك أن الإشارات المشتقة من ECM متورطة بشكل حاسم في عملية EMT أثناء تكوين الأورام (Tzanakakis *et al.*, 2018)

بالإضافة إلى ذلك أثناء غزو الخلايا السرطانية والورم الخبيث تقوم الخلايا بهضم جزيئات ECM عن طريق تخليق وتوظيف مجموعة كبيرة ومتنوعة من الأنزيمات من بينها تعد مصفوفة البروتينات المعدنية MMPs هي المساهم الرئيسي في تدهور ECM بواسطة الخلايا السرطانية

(Cui *et al.*, 2017)

أثناء الحياة الجنينية يتم إنتاج MMPs بشكل أساسي وهي مهمة لتكوين الأعضاء في الأنسجة البالغة يتم التعبير عن MMPs عند مستويات منخفضة إلى غير قابلة للاكتشاف حيث يتم تنظيمها فقط أثناء إعادة تشكيل الأنسجة الفيزيولوجية أو في العمليات التفاعلية مثل الالتهاب و إصلاح الجروح (Vandooren *et al.*, 2013) ; (Itoh, 2015)

ومن هنا نستنتج:

5 أنه من الممكن أن الجرح المحدث (اجهاد ميكانيكي) ووجود الخلايا المعطلة p53 حرض الخلايا السرطانية على فرط التعبير عن MMPs وخاصة MMP-9 (أحد بروتينات مصفوفة البروتينات المعدنية وهو مؤشر تشخيصي فعال لمرضى سرطان القولون) الأمر الذي أدى إلى تدهور ECM وبالتالي المساهمة في عملية التحول EMT (Powell *et al.*, 2014) ; (Lee *et al.*, 2018)

6 وبما أنه تم توثيق أن الخلايا التي تخضع لعملية التحول الظهاري - الميزانشيمي EMT تتحمل المؤثرات الخارجية بشكل أفضل مما يؤدي إلى إظهار هذه الخلايا لصفة مقاومة العلاج IQ الكيمائي والإشعاعي وبالتالي يمكن أن تكون الخلايا اكتسبت صفة المقاومة للمستخلص المطبق (Thiery *et al.*, 2009)

7 تنتمي المكونات الرئيسية لمستخلصات الزعفران إلى فئة الكاروتينات وعلى الرغم الآثار المفيدة للكاروتينات ضد الانتقالات السرطانية في أنواع السرطان المختلفة فإن استخدام الكاروتينات في بعض الأحيان يمكن أن يؤدي إلى سلوك مؤيد للغزو كما يتضح من ATRA في علاج السرطان (Mezquita *et al.*, 2018)

الفصل الخامس :

الاستنتاجات والتوصيات

5-1- الاستنتاجات CONCLUSIONS:

من خلال نتائج البحث ومناقشتها تم استنتاج عدة نقاط من أهمها:

- 1- تمتك الخلاصة النباتية للزعفران *Crocus sativus* L. تأثيراً مثبطاً لنمو الخلايا السرطانية للخط الخلوي لسرطان القولون CACO-2
- 2- تمتك الخلاصة النباتية للزعفران *Crocus sativus* L. تأثيراً مثبطاً لهجرة الخلايا السرطانية عند استخدام التراكيز المنخفضة
- 3- يعد هذا البحث هو الأول الذي اختبر تأثير المستخلص النباتي للزعفران *Crocus sativus* L. في عيوشية وهجرة الخلايا السرطانية للخط الخلوي CACO-2
- 4- تعتبر طريقة MTT طريقة دقيقة وعلمية في تقدير عيوشية الخلايا السرطانية وهي طريقة معتمدة من قبل مخابر التقانات الحيوية العالمية بغية إجراء الدراسات السمية للأدوية والخلاصات النباتية
- 5- EMT هو برنامج منظم للغاية من خلال شبكة معقدة من العديد من العوامل التنظيمية ومسارات إشارات الخلايا التي تتفاعل مع بعضها البعض لتنظيم العمليات الحاسمة التي ينطوي عليها تطور الورم وتعتبر من العقبات الرئيسية في مجال تقدم السرطان السريري
- 6- تعد النواتج الطبيعية مصادر جيدة وهامة لتطوير أدوية جديدة لاسيما الأدوية المضادة للسرطان

5-2- المقترحات والتوصيات suggestions and recommendations :

من خلال النتائج الحاصلة في هذه الدراسة والمراجع العلمية يجب التأكيد على النقاط التالية:

- تحديد آلية تأثير المستخلص النباتي للزعفران *Crocus sativus* L. في تثبيط الخلايا السرطانية للخط الخلوي CACO-2 من خلال إجراء الدراسات الجزيئية و البروتينية المختلفة
- تحديد الجرعة المناسبة والأمنة من الزعفران
- متابعة دراسة المستخلص النباتي للزعفران *Crocus sativus* L. على خطوط خلوية سرطانية أخرى
- اختبار تأثير الخلاصة النباتية للزعفران *Crocus sativus* L. في الأحياء in vivo ومقارنة النتائج مع الدراسة في المختبر in vitro
- إجراء دراسات أكثر دقة لفعالية الكاروتينات وتحديد الآليات التفصيلية من أجل فهم افضل لخصائص الكاروتينات المضادة للسرطان وذلك من أجل تجارب آمنة وفعالة
- الأمل بأن يكون هذا البحث مقدمة لأبحاث لاحقة لدراسة تأثير الخلاصة النباتية لهذا النوع من الزعفران وأنواع أخرى على مرضى السرطان

الفصل السادس :

المراجع

6-1-المراجع الأجنبية:

1. Abdullaev, F. I. (2002). Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). *Experimental biology and medicine*, 227(1), 20-25 .
2. Abdullaev, F. I. (2003). *Antitumor effect of saffron (Crocus sativus L.): overview and perspectives*. Paper presented at the I International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology 650.
3. Abdullaev, F., & Frenkel, G. (1992a). Effect of saffron on cell colony formation and cellular nucleic acid and protein synthesis. *BioFactors (Oxford, England)*, 3(3), 201-204 .
4. Abdullaev, F., & Frenkel, G. (1992b). The effect of saffron on intracellular DNA, RNA and protein synthesis in malignant and non-malignant human cells. *BioFactors (Oxford, England)*, 4(1), 43-45 .
5. Abdullaev, F., Riveron-Negrete, L., Caballero-Ortega, H., Hernández, J. M., Perez-Lopez, I., Pereda-Miranda, R., & Espinosa-Aguirre, J. (2003). Use of in vitro assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.). *Toxicology in vitro*, 17(5-6), 731-736 .
6. Amin, A., Hamza, A. A., Bajbouj, K., Ashraf, S. S., & Daoud, S. (2011). Saffron: a potential candidate for a novel anticancer drug against hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 54(3), 857-867 .
7. Anastasaki, E. G., Kanakis, C. D., Pappas, C., Maggi, L., Zalacain, A., Carmona, M., . . . Polissiou, M. G. (2010). Quantification of crocetin esters in saffron (*Crocus sativus* L. L. L.) using Raman spectroscopy and chemometrics. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(10), 6011-6017 .
8. Bajbouj, K., Schulze-Luehrmann, J., Diermeier, S., Amin, A., & Schneider-Stock, R. (2012). The anticancer effect of saffron in two p53 isogenic

- colorectal cancer cell lines. *BMC complementary and alternative medicine*, 12(1), 1-9 .
9. Bathaie, S. Z., Miri, H., Mohagheghi, M.-A., Mokhtari-Dizaji, M., Shahbazfar, A.-A., & Hasanzadeh, H. (2013). Saffron aqueous extract inhibits the chemically-induced gastric cancer progression in the Wistar albino rat. *Iranian journal of basic medical sciences*, 16(1), 27 .
 10. Boland, C. R. (1997). Genetic pathways to colorectal cancer. *Hospital Practice*, 32(11), 79-96 .
 11. Bolandi, M., & Ghoddusi, H. (2006). Flavour and colour changes during processing and storage of saffron (*Crocus sativus* L.) *Developments in food science* (Vol. 43, pp. 323-326): Elsevier.
 12. Castro, J. (2001). *Cancer: Cause, Care & Cure*: B. Jain Publishers.
 13. Chaudry, A. (2004). Cell culture: The science cretive quarterly: Obtenido de [http://www. scq. ubc. ca/cell-culture](http://www.scq.ubc.ca/cell-culture).
 14. Clarke, G. N., McCoombe, S. G., & Short, R. V. (2006). Sperm immobilizing properties of lemon juice. *Fertility and sterility*, 85(5), 1529-1530 .
 15. Crosbie, E. J., Einstein, M. H., Franceschi, S., & Kitchener, H. C. (2013). Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, 382(9895), 889-899 .
 16. Cui, N., Hu, M., & Khalil, R. A. (2017). Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. *Progress in molecular biology and translational science*, 147, 1-73 .
 17. Cusano, E., Consonni, R., Petrakis, E. A., Astraka, K., Cagliani, L. R., & Polissiou, M. G. (2018). Integrated analytical methodology to investigate bioactive compounds in *Crocus sativus* L. flowers. *Phytochemical Analysis*, 29(5), 476-486.
 18. D'Alessandro, A. M., Mancini, A., Lizzi, A. R., De Simone, A., Marroccella, C. E., Gravina, G. L., . . . Festuccia, C. (2013). *Crocus sativus* L. stigma extract and its major constituent crocin possess significant antiproliferative

- properties against human prostate cancer. *Nutrition and cancer*, 65(6), 930-942 .
19. Dhillon, N., Aggarwal, B. B., Newman, R. A., Wolff, R. A., Kunnumakkara, A. B., Abbruzzese, J. L., . . . Kurzrock, R. (2008). Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer. *Clinical cancer research*, 14(14), 4491-4499 .
 20. Doyle, A., Griffiths, J. B., & Newell, D. G. (1998). *Cell & tissue culture: laboratory procedures* (Vol. 3): Wiley.
 21. Festuccia, C., Mancini, A., Gravina, G. L., Scarsella, L., Llorens, S., Alonso, G. L., . . . Lenzi, A. (2014). Antitumor effects of saffron-derived carotenoids in prostate cancer cell models. *BioMed research international*, 2014 .
 22. FEYZZADEH, B., TAVAKOL, A. J., Rakhshandeh, H., RAHIMI, A. R., BOROUK, A., & DOUSTI, H. (2008). Cytotoxic effect of saffron stigma aqueous extract on human transitional cell carcinoma and mouse fibroblast .
 23. Fogh, J., Fogh, J. M., & Orfeo, T. (1977). One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 59(1), 221-226 .
 24. Freshney, R. I. (2005). Culture of specific cell types. *Culture of animal cells: a manual of basic technique* .
 25. Fujimoto, K., Ohta, T., Yamaguchi, H., Tung, N. H., Fujii, G., Mutoh, M., . . . Shoyama, Y. (2019). Suppression of polyps formation by saffron extract in Adenomatous polyposis coliMin/+ mice. *Pharmacognosy Research*, 11 .(1)
 26. Gutheil, W., Reed, G., Ray, A., Anant, S., & Dhar, A. (2012). Crocetin: an agent derived from saffron for prevention and therapy for cancer. *Current pharmaceutical biotechnology*, 13(1), 173-179 .
 27. Gao, Y. T., McLaughlin, J. K., Blot, W. J., Ji, B. T., Dai, Q., & Fraumeni, J. F. (1994). Reduced risk of esophageal cancer associated with green tea consumption. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 86(11), 855-858 .

28. Geromichalos, G. D., Papadopoulos, T., Sahpazidou, D., & Sinakos, Z. (2014). Safranal, a *Crocus sativus* L. constituent suppresses the growth of K-562 cells of chronic myelogenous leukemia. In silico and in vitro study. *Food and chemical toxicology*, 74, 45-50 .
29. Gezici, S. (2019). Comparative anticancer activity analysis of saffron extracts and a principle component, crocetin for prevention and treatment of human malignancies. *Journal of Food Science and Technology*, 56(12), 5435-5443 .
30. Ghorbani, M. (2008). The efficiency of saffron's marketing channel in Iran. *World Applied Sciences Journal*, 4(4), 523-527 .
31. Ghosh, T., Maity, T. K., & Singh, J. (2011). Evaluation of antitumor activity of stigmaterol, a constituent isolated from *Bacopa monnieri* Linn aerial parts against Ehrlich Ascites Carcinoma in mice. *Oriental Pharmacy & Experimental Medicine*, 11(1), 41-49 .
32. GRIGG, D. (1974). *The Agricultural System of the World: An Evolutionary Approach* CUP: Cambridge.
33. Gunasinghe, N., Wells, A., Thompson, E. W., & Hugo, H. J. (2012). Mesenchymal–epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(3), 469-478 .
34. Half, E., Bercovich, D., & Rozen, P. (2009). Familial adenomatous polyposis. *Orphanet journal of rare diseases*, 4(1), 1-23 .
35. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70 .
36. Hayward, I. P., & Whitehead, R. H. (1992). Patterns of growth and differentiation in the colon carcinoma cell line LIM 1863. *International journal of cancer*, 50(5), 752-759 .
37. Hellman, S. (2001). Principles of cancer management: radiation therapy. *Cancer, principles and practice of oncology* .

38. Hewish ,M., & Cunningham, D. (2011). First-line treatment of advanced colorectal cancer. *The Lancet*, 377(9783), 2060-2062 .
39. Ishikawa, H., Saeki, T., Otani, T., Suzuki, T., Shimozuma, K., Nishino, H., . . . Morimoto, K. (2006). Aged garlic extract prevents a decline of NK cell number and activity in patients with advanced cancer. *The Journal of nutrition*, 136(3), 816S-820S .
40. Itoh, Y. (2015). Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biology*, 44, 207-223 .
41. Jass, J. (2007). Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*, 50(1), 113-130 .
42. Jawad, N., Direkze, N., & Leedham, S. J. (2011). Inflammatory bowel disease and colon cancer. *Inflammation and Gastrointestinal Cancers*, 99-115 .
43. Katz, A. E. (2002). Flavonoid and botanical approaches to prostate health. *The Journal of Alternative & Complementary Medicine*, 8(6), 813-821 .
44. Kim, J. H., & Choi, J.-S. (2016). Effect of ginsenoside Rh-2 via activation of caspase-3 and Bcl-2-insensitive pathway in ovarian cancer cells. *Physiological Research*, 65(6), 1031 .
45. Kumar, D., Mallick, S., Vedasiromoni, J. R., & Pal, B. C. (2010). Anti-leukemic activity of *Dillenia indica* L. fruit extract and quantification of betulinic acid by HPLC. *Phytomedicine*, 17(6), 431-435 .
46. langdon, s. p. (2002). Methods in Molecular Medicine: Cancer Cell Culture: Methods and Protocols. *Humana Press Inc*, 88, 165-169 .
47. Lee, S. Y., Ju, M. K., Jeon, H. M., Lee, Y. J., Kim, C. H., Park, H. G . . . ,Kang, H. S. (2018). Oncogenic metabolism acts as a prerequisite step for induction of cancer metastasis and cancer stem cell phenotype. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018 .
48. Maggi, M. A., Bisti, S., & Picco, C. (2020). Saffron: Chemical composition and neuroprotective activity. *Molecules*, 25(23), 5618.

49. Marks, D. C., Belov, L., Davey, M. W., Davey, R. A., & Kidman ,A. D. (1992). The MTT cell viability assay for cytotoxicity testing in multidrug-resistant human leukemic cells. *Leukemia research*, 16(12), 1165-1173 .
50. McGee, H. (2007). *On food and cooking: the science and lore of the kitchen*: Simon and Schuster.
51. Mousavi, S. H., Tavakkol-Afshari, J., Brook, A., & Jafari-Anarkooli, I. (2009). Role of caspases and Bax protein in saffron-induced apoptosis in MCF-7 cells. *Food and chemical toxicology*, 47(8), 1909-1913 .
52. Nema, R., & Khare, S. (2012). An animal cell culture: Advance technology for modern research .
53. Nezamdoost, Z., Saghebjo, M., Hoshyar, R., Hedayati, M., & Sadeghi Tabas, S. (2020). The Effect of High-Intensity Interval Training and Saffron Extract on the Expression of Some Cachexia-Related Genes in the Skeletal Muscle of Female Mice Carrying Breast Cancer Cell Line. *Sport Physiology*, 12(48), 83-104 .
54. Nguyen, H. T., & Duong, H. Q. (2018). The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy. *Oncology letters*, 16(1), 9-18 .
55. Nilakshi, N., Gadiya, R., Abhyankar, M., & Champalal, K. D. (2011). Detailed profile of *Crocus sativus*. *Int J Pharma Bio Sciences*, 2(1), 530-540 .
56. Niranjana, V., Narendhar, C., & Anbarasan, B. (2012). Synthesis and evaluation of the silver nanoparticles for the anticancer activity using *Cardiospermum Halicacabum* extract. *International Journal of Drug Discovery and Herbal Research*, 2(4), 504-508 .
57. Ogino, S., & Goel, A. (2008). Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 10(1), 13-27 .
58. Palmer, S. (1985). Diet, nutrition, and cancer. *Progress in food & nutrition science*, 9(3-4), 283-341 .

59. Powell, E., Piwnica-Worms, D., & Piwnica-Worms, H. (2014). Contribution of p53 to Metastasis p53 and Metastasis. *Cancer discovery*, 4(4), 405-414 .
60. Rezaee, R., & Hosseinzadeh, H. (2013). Safranal: from an aromatic natural product to a rewarding pharmacological agent. *Iranian journal of basic medical sciences*, 16(1), 12 .
61. Rodriguez, L. G., Wu, X., & Guan, J.-L. (2005). Wound-healing assay *Cell migration* (pp. 23-29): Springer.
62. Rogers, A. E., Zeisel, S. H., & Groopman, J. (1993). Diet and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 14(11), 2205-2217 .
63. Samarghandian, S., Borji, A., Farahmand, S. K., Afshari, R., & Davoodi, S. (2013). *Crocus sativus* L. (saffron) stigma aqueous extract induces apoptosis in alveolar human lung cancer cells through caspase-dependent pathways activation. *BioMed research international*, 2013 .
64. Sasieni, P. (2006). Chemoprevention of cervical cancer. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 20(2), 295-305 .
65. Schroeder, A., Heller, D. A., Winslow, M. M., Dahlman, J. E., Pratt, G. W., Langer, R., . . . Anderson, D. G. (2012). Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nature Reviews Cancer*, 12(1), 39-50 .
66. Segeritz, C. P., & Vallier, L. (2017). Cell culture: Growing cells as model systems in vitro. In *Basic science methods for clinical researchers* (pp. 151-172). Academic Press.
67. Statista (2020). Saffron production worldwide in 2019. <https://www.statista.com/statistics/1135621/leading-saffron-producers-worldwide/>.
68. Sun, Y., Xu, H.-J., Zhao, Y.-X., Wang, L.-Z., Sun, L.-R., Wang, Z., & Sun, X.-F. (2013). Crocin exhibits antitumor effects on human leukemia HL-60 cells in vitro and in vivo. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013 .

69. Suzuki, H., & Mori, H. (2018). World trends for H. pylori eradication therapy and gastric cancer prevention strategy by H. pylori test-and-treat. *Journal of gastroenterology*, 53(3), 354-361 .
70. Thackery, E. (2002). *The Gale Encyclopedia of Cancer: LZ* (Vol. 2): Gale Cengage.
71. Thiery, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(6), 442-454 .
72. Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *cell*, 139(5), 871-890 .
73. Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J. G., Baylin, S. B., & Issa, J.-P. J. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(15), 8681-8686 .
74. Tzanakakis, G., Kavasi, R. M., Voudouri, K., Berdiaki, A., Spyridaki, I., Tsatsakis, A., & Nikitovic, D. (2018). Role of the extracellular matrix in cancer-associated epithelial to mesenchymal transition phenomenon. *Developmental Dynamics*, 247(3), 368-381 .
75. Umpleby, H., Fermor, B., Symes, M., & Williamson, R. (1984). Viability of exfoliated colorectal carcinoma cells. *Journal of British Surgery*, 71(9), 659-663 .
76. Vandooren, J., Van den Steen, P. E., & Opdenakker, G. (2013). Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 48(3), 222-272 .
77. Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., . . . Bos, J. L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *New England Journal of Medicine*, 319(9), 525-532 .

78. Zhong, Y.-j., Shi, F., Zheng, X.-l., Wang, Q., Yang, L., Sun, H., . . . Qin, Y. (2011). Crocetin induces cytotoxicity and enhances vincristine-induced cancer cell death via p53-dependent and-independent mechanisms. *Acta Pharmacologica Sinica*, 32(12), 1529-1536 .

79. zohary, m. (1986). flora palaestina.

80. العالم-نسي-سوريا-والجمعيات-الخيرية-تذكرت-أطفالها-المصابين-بالسرطان 5/4/2022 Link:

<https://alarab.co.uk/%D8%A7%D9%84%D8%B9%D8%A7%D9%84%D9%85-%D9%86%D8%B3%D9%8A-%D8%B3%D9%88%D8%B1%D9%8A%D8%A7-%D9%88%D8%A7%D9%84%D8%AC%D9%85%D8%B9%D9%8A%D8%A7%D8%AA-%D8%A7%D9%84%D8%AE%D9%8A%D8%B1%D9%8A%D8%A9-%D8%AA%D8%B0%D9%83%D8%B1%D8%AA-%D8%A3%D8%B7%D9%81%D8%A7%D9%84%D9%87%D8%A7-%D8%A7%D9%84%D9%85%D8%B5%D8%A7%D8%A8%D9%8A%D9%86-%D8%A8%D8%A7%D9%84%D8%B3%D8%B1%D8%B7%D8%A7%D9%86>

Abstract

Saffron is one of plants that have been studied and determined for their effectiveness against cancer cells among them colorectal cancer, so this study was conducted in Biomedical and Animal lab in National Commission for Biotechnology.

This research aims to study the effect of *Crocus sativus* L. plant extract on the viability and migration of cancer cells of the CACO-2 cell line in vitro.

The study included hydroalcoholic extraction of *Crocus sativus* L. stigmas, culture of cancer cells of the CACO-2 cell line in the laboratory and incubation with different concentrations of saffron extract, and then evaluation of cell viability using the MTT assay and cell migration with the Wound healing assay.

The results showed that the plant extract of *Crocus sativus* L. has a toxic effect on CACO-2 cells, and the inhibitory concentration of 45% is approximately 300µg/ml. This same concentration stimulates the migration of cancer cells, and the reason lies in what is called Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT).

Key words: Colon carcinoma – Saffron – MTT assay – Cell migration assay – Mesenchymal epithelial transformation

Syrian Arab Republic

Damascus University

Faculty of Agriculture

Department of Biotechnology



Effect of *Crocus sativus* L. Extraction in Colorectal Cancer in Vitro

A dissertation submitted for degree of Master

Prepared by:

Mayada Qaryshi

Supervisors:

Dr. Bassam Issa

professor at the Faculty of Agriculture
Damascus University

Dr. Aroub Almasri

National Commission for Biotechnology,
Department of Medical and Animal
Biology

2024 – 2023