Agriculture College – Wasit University

Dijlah Journal of Agricultural Sciences

ISSN 2790 – 5985
eISSN 2790 – 5993

**Dijlah J. Agric. Sci.، 3(2): 189-202 ، 2024**

# Study of the effect of the aqueous extract of the roots of (*Beta vulgaris*) on the cancer cell line A549 and the normal cell line REF

**Hussein Mohsen Kazim and Aseel Raheem Mardan**

Department of Biology، College of Education،Al-Qadisiyah University

***Corresponding author e-mail**: husseinalgabry99@gmail.com

**Abstract**:

The study included studying the cytotoxic effect of the aqueous extract of beet roots (*Beta vulgaris*) on the lung cancer cell line A549،using six diluted concentrations of the aqueous extract of the plant roots (7،8 ، 31،25 ، 62،5 ، 125 ، 250 ، 500 ) (µg/ml) and for three periods of exposure (24،48،72) hours. The quantitative estimation of the active compounds of the aqueous extract of the plant was calculated، as it was found that the aqueous extract of beet roots contains many active compounds، they are (Saponins- Tannins - Phenols - Flavonoids - Glycosides). The study showed that the concentration causing inhibition of normal cell proliferation REF by the aqueous extract of the plant 50% (Ic50) was 6.35 mg/ml. The aqueous extract of beet roots was tested to detect the cytotoxic effect of the aqueous extract and all concentrations used on the lung cancer cell line A49.An increase in the percentage of cancer cell growth inhibition has been observed for all exposure periods (24،48،72) hours، with significant differences at the probability level ($p \leq 0.05$) and compared with the control، where the percentage rate of inhibition at the lowest concentration ranges (µg/ml 7.8) (4.661±1.864)، (5.640±2.743)، (6.584±4.159) respectively، and the rate of inhibition increased at the concentration (µg/ml 500) (90.250±1.409) (92.743±1.252) and (94.738±1.416) respectively .

***Keywords: Beet (Beta vulgaris)، cancer ، lung cancer (A549)،REF.***

---

# دراسة تأثير المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *Beta vulgaris* على الخط الخلوي السرطاني A549 والخط الخلوي الطبيعي REF

**حسين محيسن كاظم و اسيل رحيم مردان**

**جامعة القادسية / كلية التربية / قسم علوم الحياة**

**الخلاصة**

تضمنت الدراسة دراسة التاثير السمي الخلوي للمستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *Beta vulgaris* على خط خلايا سرطان الرئة A549 والخط الخلوي الطبيعي REF باستخدام ست تراكيز مخففة من المستخلص المائي لجذور النبات وهي ( 7،8 ، 25،31 ، 5،62 ، 125 ، 250 ، 500 ) µg/ml وبثلاث فترات تعريض 24 ، 48،72 ساعة حيث تم حساب التقدير الكمي للمركبات الفعالة للمستخلص المائي للنبات ، اذ وجد ان المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر تحتوي على العديد من المركبات الفعالة وهي (الصابونينات ، التانينات ، الفينولات، الفلافونيدات ، الكلايكوسيدات). ان تاثير المستخلص على الخلايا الطبيعية REF وبعد فترة تعريض 72ساعة والمتمثله بشكل التركيز المسبب لتثبيط تكاثر الخلايا الطبيعية REF بنسبة 50% هو( IC50) بواسطة المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *Beta vulgaris* هو (6.35) mg/ml كان اقل سمية حيث سجل المستخلص المائي تاثير تثبيطي قليل جدا مقارنة مع الخط السرطاني A549. تم اختبار المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر للكشف عن التاثير السمي الخلوي للمستخلص المائي ولجميع التراكيز المستخدمة في خط خلايا سرطان الرئة A549 ، لقد تم ملاحظة ارتفاع معدل النسبة المئوية لتثبيط نمو الخلايا السرطانية وخلال فترات التعرض الثلاثة 24و 48 و 72 ساعة وبفروقات معنوية عند مستوى احتمال( $p\leq0.05$ ومقارنتها مع السيطرة حيث يتراوح معدل النسبة المئوية للتثبيط عند اقل تركيز 7.8µg/ml عند فترات التعرض الثلاث 24و48و72 ساعة (1.864±4.661) (2.743±5.640)، (6.584± 4.159) على التوالي ، وازداد معدل التثبيط عند التركيز 500 (90.250 ±1.409)µg/ml، (92.743 ±1.252)،1.416 ±94.738 ) ) على التوالي .

***الكلمات المفتاحية: الشمندر ، السرطان ، A549، REF.***

**المقدمة**

تعد المستخلصات النباتية مصدر لعدد كثير من المركبات الفعالة و المهمة و التي تعمل كمضادات لنمو الخلايا السرطانية (Stefkó et al.)،2020، حيث بين كل من (Kusz et al.2021 و Ma et al. 2016) أن مركبات الفينانثرين Dihydrophenanthrenes والفلافونويد Flavonoid والابيجينين Apigenin والفينولات Phenoles لها تأثير سام لخلايا بعض الخطوط البشرية السرطانية ، بألاضافه إلى تأثيرها المضاد للالتهابات Anti-inflamenation و نمو الجراثيم كما تعمل كمضادات أكسدة (Petrovska،2012 ). وقد أشارت دراسات (Keskin et al. 2018) وRoy and Bharadvaja، (2017). التي تم إجرائها على النباتات الطبية وألمواد الفعالة المشتقة منها ألى زيادة الاهتمام بهذه النباتات في السنوات الأخيرة وبينت اهمية استعمال هذه المنتجات النباتية بشكل عام من قبل الاشخاص المرضى الذين يعانون من السرطان و الامراض المزمنة وأمراض الكبد والاضطرابات الروماتيزمية وجهاز الدوران.

الشمندر *Beta vulgaris* L والمعروف محليا باسم الشامندر، يحتوي الشمندر على مركبات فينولية قوية مضادة للأكسدة وحمض الأسكوربيك والكاروتينات والبيتالين (Clifford et al.،2015)، كما أكد التحليل الكروماتوجرافي السائل عالي الضغط لمستخلص الشمندر وجود مادة البوليفينول النشطة بيولوجيا مثل كيرسيتين وحمض السينابيك وحمض الكوماريك وحمض السرنجيك وحمض الغاليك والكومارين وحمض الكافيك وحمض الكلوروجينيك والكاتشين (Indu et al.،2017 ). كما تشير النتائج الحالية إلى أن مستخلصات بيتا الشائع (الجذر) لها أنشطة خافضة لضغط الدم وخفض السكر في الدم ومضادات الأكسدة (El Gamal et al.،2014)، ومضادة للالتهابات، وأنشطة وقائية للكبد (Charde،.Singh et al ;2011 ،2011). يعرف السرطان على نطاق واسع بأنه قاتل صامت ولا يزال يندرج ضمن الأسباب الرئيسية للوفاة في جميع أنحاء العالم، حيث يحصد أرواح الملايين كل عام، وهو شائع جدا في جميع أنحاء العالم، في كل من البلدان النامية والمتقدمة على الرغم من المخاطر المرتبطة بالسرطان، والتوعية لا تزال ضعيفة في مجتمعنا، الوقاية من عوامل الخطر والتخفيف منها هي أفضل طريقة لمكافحة السرطان (Tezerjani et al. 2015). هدفت البحث الى دراسة تأثير المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر Beet root على خلايا سرطان الرئة والخط الطبيعي REF .

**المواد وطرق العمل**

**جمع النبات واستخلاصة Plant collection and Extraction**

اجريت الدراسة في مختبرات مركز البحوث والتقنيات الاحيائية / جامعة النهرين، تم جمع جذور النبات من اسواق محافظة المثنى وتم تصنيف النبات من قبل الاستاذ المساعد الدكتور ازهار عبد الامير سوسه في قسم علوم الحياة / كلية التربية / جامعة

القادسية ، تم تنظيف الجذور من الاتربة وبعد تجفيف جذور النبات بدرجة حرارة الغرفة تم طحنها في جهاز كهربائي ثم تم استخدام جهاز السكسليت من خلال وضع 20 غم من المسحوق النباتي مع 300 مل من الماء المقطر بدرجة حرارة 100 مo لمدة ثلاث ساعات ، وتم استخدام جهاز Lypholyzer لفرض تحويل المستخلص السائل الى باودر لتحديد التراكيز المستخدمة في الدراسة .

**الكشف الكيميائي للمركبات الفعالة في المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر**

تم اجراء الكشوفات الكيميائية على المستخلص المائي الذي تم تحضيرة سابقا لغرض التعرف على المكونات الكيميائية الموجودة فيه .

**الكشف عن التانينات ( الدباغيات ) Detection of tannins**

تم اجراء الكشف وفقا لطريقة (Naing،2018).

**الكشف عن الفلافونيدات Detection of Flavonoids**

تم اجراء الكشف وفقا لطريقة (.Naing،2018).

**الكشف عن القلويات Detection of Alkaloids**

تم اجراء الكشف وفقا لطريقة (Hussein and Ameer،2017).

**الكشف عن الفينولات Detectio of Poly phenols**

تم اجراء الكشف وفقا لطريقة (Hussein and Ameer،2017).

**الكشف عن الصابونيات Detection of Saponins**

تم الكشف عن الصابونينات عن طريق رج المستخلص المائي للنبات جيدا وعند تكون رغوة في الاعلى دلالة على وجود الصابونينات ( + ) .

**الكشف عن الكلايكوسيدات Detection of glycosides**

تم اجراء الكشف وفقا لطريقة (Hussein and Ameer،2017).

**المحاليل الخاصة بالزراعة النسيجية :**

حضرت المحاليل طبقا لطريقة ( .Freshney،2000) والتي تخص الزرع النسيجي

**بيكاربونات الصوديوم Sodium bicarbonate(NaHCO3 )**

حضر بإضافة 4.4 غم من بيكاربونات الصوديوم ( NaHCO3 ) الى100 مل من الماء المقطر، وبعدها تم تعقيمه بالمؤصدة وفي درجة حرارة 121مْ ولمدة 15 دقيقة ومن ثم يحفظ في درجة حرارة منخفضة 4مْ .

**المضادات الحيوية Antibiotics**

تم تحضيرها من خلال اذابة مكونات العلبة Benzyl penicillinذات سعة 1000000 IU في حجم 5مل من الماء المقطر، وبعدها تم اخذ 0.5 مل منة و تم اضافة 1 لتر من الوسط الزرعي وحفظ في درجة حرارة منخفضة -20.

**المصل البقري الجنيني Fetal Bovine Serum**

تم استخدامه من الشركة المزودة Sigma وتم تثبيطه في درجة حرارة ( 56 م° ) لمدة نصف ساعة ومن ثم يضاف للوسط الزرعي .

**التربسين Trypsin**

حضر عن طريق اذابة غرام واحد من مسحوق التربسين في 100 مل من PBS ، ثم يعقم بمرشح ذا ثقوب بقطر 0،22 um ويوضع بدرجة حرارة – 20 م° .

**الوسط الزرعي (RPMI- 1640 ) 1640- Rosswell Park Memorial Insitute**

| المادة | الكمية / الحجم |
|---|---|
| الوسط الزرعي RPMI-1640 with hepes buffer and L-glutamine | 10.4غم |
| بيكاربونات الصوديوم NaHCO3 % 4.4 | 14مل |
| المضاد الحيوي البنسلين Penicillin | 0.5 مل |
| المضاد الحيوي الستربتومايسين Streptomycin | 0.5 مل |
| مصل الدم البقري الجنيني Fetal Bovine Serum | 100 مل |

تم اضافه 800 مل من الماء المقطر الخالي من الايونات الى (10.4) غم من الوسط الزرعي ( RPM-1640 ) في ، ثم اضيفت محاليل المضادات الحيوية و بيكاربونات الصوديوم ،عدل PH)) الى 7.2 ، و بعدها تم اضافة مصل الدم البقري الجنيني ، ثم نقوم بترشيح الوسط الزرعي و يكمل الحجم الى 1لتر من خلال اضافة الماء المقطر،ثم بعدها يتتم تعقيمه باستخدام المرشح ذي ثقوب um0.22 ثم يوضع في قناني زجاجية نضيفه و معقمة وتحفظ في الحاضنة وبدرجة حرارة 37 ) مo ) لمدة ثلاث ايام لغرض التأكد من عدم تلوثها ، ثم تحفظ بدرجة حرارة ( 4 م O) لحين الاستعمال ( Yaseen،1990).

**الوسط الزرعي الخالي من المصل Serum Free Media**

حضر بالطريقة نفسها سابقة الذكر بالفقرة (5) لكن بدون اضافة المصل للوسط الزرعي .

**محلول دارئ الفوسفات الملحي (phosphate buffer saline saline (PBS**

حضر بإذابة (0.20 غم) من KCl و (8 غم ) من Nacl و (0.20 غم) من KH2PO4 و( 0.92 غم) من Na2HPO4 ثم يكمل ب( (100 m من الماء المقطر ويتم تعقيمه بالمؤصدة في درجة حرارة 121 م° ولمدة 15 دقيقة ، وبعدها يتم حفضه بدرجة حراره 4 م° لحين الاستخدام .

**تحضير صبغة Methyl Thiazolyl Tetrazolium Stain ( MTT)**

حضرت عن طريق اذابة ( 0.005 غم ) من مسحوق الصبغة في 1مل واحد من محلول PBS في دورق زجاجي ، ثم يوضع الدورق على صفيحة مغناطيسية هزازة ثم يتم ترشيح المزيج بمرشح ( 0.22 um ) لكي يتم ازالة البلورات الزرقاء المتشكلة عنها ، حيث تم تحضير الصبغة انيا وعند الاستخدام و تم حفضها في مكان مظلم وظروف معقمة وذلك لعدم تاكسدها بسبب الضوء (Betancur-Galvis et al.،1999 ).

**الخطوط الخلوية التي استخدمة بالدراسة Cell Lines**

تم تجهيزنا بالخطوط الخلوية من قبل مركز البحوث والتقنيات الاحيائية / جامعة النهرين وهي خط خلايا سرطان الرئة A549 (Adenocarcenomic 549) ، والخط الخلوي الطبيعي Rat Embryo Fibroblast ( REF) ، ثم اجريت اختبار السمية الخلوية للمستخلص المائي لجذور نبات الشمندر على خلايا الخطوط وحسب طريقة ( Khashan et al.، 2020 ).

**دراسة تاثير المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر في نمو الخطوط الخلوية**

1- تهيئة الوسط الزرعي وخطوط الخلايا Preparation of medium and cell lines

وزع الوسط الزرعي المحضر سابقا وتم وضعة داخل قناني زجاجية مغطاة بغطاء محكم سعتها 200 مل و حفظت القناني بدرجة حرارة -20 مo لحين الاستعمال ، وتم تهيئة الخط الخلوي السرطاني والخط الطبيعي الخاصة بالدراسة وهي ( A549،REF ) وتم اجراء الخطوات الخاصة بالزرع النسيجي في ظروف معقمة ( Freshney.، 1994 ) وحسب الخطوات التالية :

تم اضافة 2 مل من محلول التربسين الى قنينة الزرع النسيجي ذات الحجم 50 سم الحاوية على الخلايا بعد ازالة الوسط الزرعي وغسلها بالمحلول ( PBS)، وحركة القنينة برفق وتم حضنها في الحاضنة بدرجة حرارة 37 مo لمدة 5 دقائق وذلك لتفكيك الخلايا الملتصقة وخلخلة التصاقها بجدار القنينة للحصول على الخلايا الاحادية المفردة.

اضفنا 15 مل من وسط نمو جديد ( RPMI-1640 ) الى القنينة الحاوية على الخلايا المفككة ، يتم تحريك القنينة جيدا وبعد ذلك وزعت محتويات القنينة بالتساوي مع قنينة اخرى جديدة بحيث تكون كمية الخلايا مع الوسط الزرعي متساوية بين القنينتين حيث تسمى هذه العملية بالزرع الثانوي (Subculturing Process)

بعدها حضنت القناني في درجة حرارة 37 مo لمدة يوم ، بعد ان كتب عليها معلومات كاملة عن رقم التمرير الجديد ونوع الخلايا وتاريخ اجراء الزرع وتم متابعة القناني وذلك لكي نتأكد من خلوها من التلوث وان الخلايا المزروعة بحالة جيدة ، عن طرق فحصها بمجهر الطور المقلوب (Inverted-phase Microscope)، وعندما كانت الطبقة الاحادية للخلايا متكاملة Confluent monolayer تكون القناني جاهزة للاستخدام .

**اختبار سمية المستخلص المائي للنبات في نمو الخط الخلوي السرطاني**

بعد تحضير المستخلص المائي يتم اذابة 0.5 غم لمسحوق المستخلص في 10 مل من الوسط الخالي من المصل ، وتم تعقيم المستخلص باستخدام مرشح ذو الثقوب بقطر 0.22 مايكرومتر ،ثم يحضر منة ست تراكيز ( تخافيف نصفية ) باستخدام الوسط الخالي من المصل وهي125، 250، 500) 7.8،31.25،62.5)ml/ug وتحت ظروف معقمة ، حيث تم استخدام كل التراكيز التي حضرت مباشرة بعد اكتمال عملية التحضير ، وتم تجهيز عالق الخلايا بواسطة اضافة محلول التربسين حجم 50 سم 2 الى طبقة الخلايا المزروعة في القنينة الخاصة بالزرع النسيجي ، وبعدها تم اضافة 20 مل لة من الوسط الزرعي الحاوي على المصل بنسبة 10% ، بعدها مزج العالق جيدا بعد كل مزجة يتم نقل 0.2 مل الى حفر طبق معايرة الزرع النسيجي ذي القعر المسطح (Microtiter plates with 96- fat bottom well) من خلال استخدام ماصة اوتوماتيكية دقيقة Micropipette وبعدها تم وضع الاطباق داخل الحاضنة في درجة حرارة 37 مo ولمدة 24 ساغة الى حين التصاق الخلايا داخل الحفرة Well وبعدها يتم التخلص من الوسط الزرعي القديم في الحفرة ويتم اضافة 0.2 مل من تراكيز المستخلص التي تم تحضيرها سابقا وبثمان مكررات لكل تركيز منها ، وتم عمل ثمان مكررات كوحدة سيطرة Control . وتم حضن الاطباق في درجة حرارة 37 مo لمدة 24 ساعة ، ثم اخرجنا الاطباق من الحاضنة وازلة الوسط الزرعي بعدها غسلنا الخلايا بمحلول ( PBS ) ، وبعد ذلك اضفنا لكل حفرة 0.1 مل من صبغة (MTT stain) وتركناها لمدة ثلاث ساعات ، بعدها تم غسل الحفرة بمحلول ( PBS ) وذلك لكي يتم ازالة الصبغة الزائدة ، حيث تصطبغ الخلايا الملتصقة بقاع الحفرة باللون الاصفر ، ثم اضفنا 0.1 مل من محلول ثنائي ميثيل سلفوكسيد DMSO متبوعا بفترة حضن تحت درجة حرارة37 م o لمدة 15 دقيقة وبعد جفاف الاطباق تم قراءة النتائج باستخدام جهاز الاليزا Eliza plate Reader وعند الطول الموجي 620 نانومتر ،حيث تم اجراء هذه الخطوات السابقة الذكر على الخطوط الخلوية ( A549،REF ) عن طريق استخدام المستخلص المائي وبثلاث فترات تعريض وهي 24)، 48، 72 ) ساعة ، وتم حساب معدل التثبيط لنمو الخلايا ( النسبة المئوية للسمية الخلوية ) بالمعادلة الاتية

$$Inhibition\ rate\ (IR) = (A-B)/A * 100$$

حيث ان A تشير الى الكثافة الضوئية للسيطرة ، و B تشير الى الكثافة الضوئية للعينات ( Abdullah et al.، 2020).

**النتائج**

**الكشف الكيميائي عن المركبات الفعالة للمستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *Beta vulgaris*.**

اظهرت النتائج التي تم الحصول عليها والمبينة في الجدول رقم (1) عند اجراء الكشف عن مركبات الايض الثانوي والمركبات الفعالة الموجودة في المستخلص المائي لنبات *Beta vulgaris* على وجود مركبات الفلافونويد، الفينولات والقلويدات والصابونين و التانينات و الكلايكوسيدات .

**جدول (1)** : نتائج الكشف عن المركبات الفعالة في المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر

| ت | المركبات الفعالة | اسم الكاشف | دليل الكاشف | نتيجة الكشف |
|---|---|---|---|---|
| **1** | الفينولات | كاشف كلوريد الحديديك 1% | راسب ازرق مخضر | + |
| **2** | الفلافونويدات | الكشف باستخدام خلات الرصاص المائية C4H6O4Pb | لون اصفر رائق | + |
| **3** | التانينات | الكشف باستخدام خلات الرصاص المائية C4H6O4Pb | راسب جيلاتيني | + |
| **4** | الكلايكوسيدات | كاشف بندكت | راسب برتقالي احمر | + |
| **5** | القلويات | كاشف دراجندروف | راسب بني | - |
| **6** | الصابونيات | بواسطة رج المحلول | فقاعات | + |

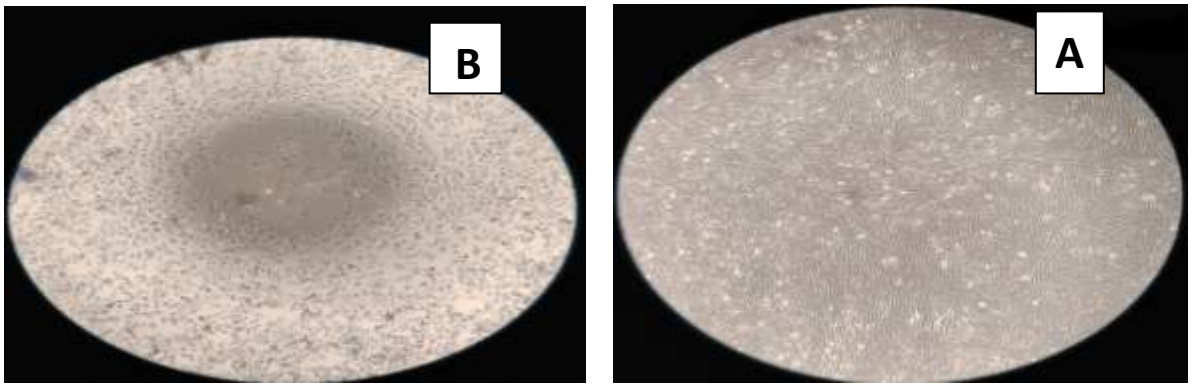
العلامة ( + ) تدل على ايجابية الكشف ، العلامة ( - ) تدل على سلبية الكشف

**التأثير السمي الخلوي للمستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *Beta vulgaris* على خط الخلايا الطبيعية REF**

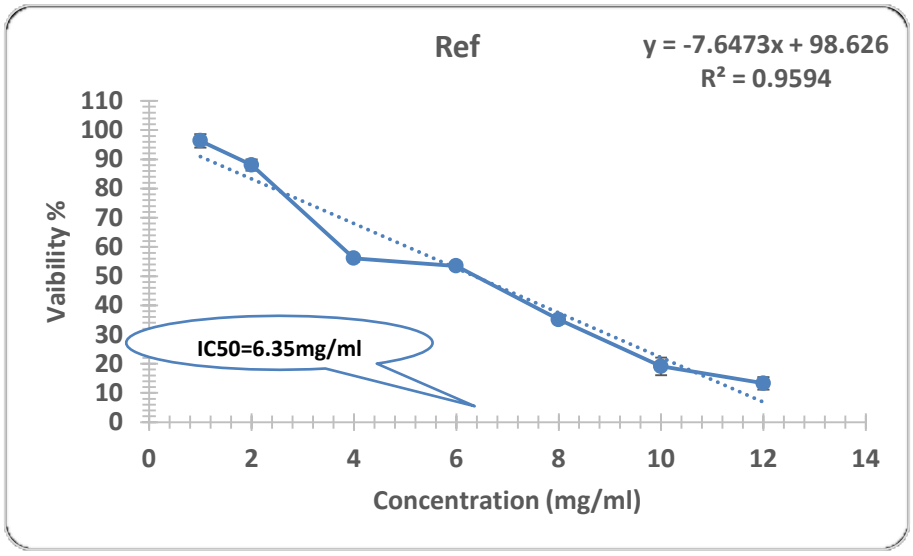
أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها ان تاثير المستخلص على الخلايا الطبيعية والمتمثله بشكل التركيز المسبب لتثبيط تكاثر الخلايا الطبيعية REF بنسبة 50% هو IC50) ) بواسطة المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر beta vulgaris كان mg/ml6.35 كما في الشكل (2) كما اظهرت النتائج تغيار في نسبة حيوية الخلايا في التراكيز المستخدمة المختلفة كما في الجدول 2

**جدول (2)** معدل حيوية خط الخلايا الطبيعية المعرضة للمستحلص في تراكيز مختلفة

| Con. mg/ml | Mean± SD |
|---|---|
| 1 | 96.329±2.310 |
| 2 | 88.080 ±1.920 |
| 4 | 56.103±1.103 |
| 6 | 53.473±1.383 |
| 8 | 35.144±1.372 |
| 10 | 19.128±3.014 |
| 12 | 13.289±2.130 |




**شكل (1)** A- خلايا الخط الطبيعي REF غير المعرضة للمستخلص المائي لنبات الشمندر B- خلايا الخط الطبيعي REF المعرضة للمستخلص المائي لنبات الشمندر




**شكل (2)** التركيز المسبب لتثبيط تكاثر الخلايا الطبيعية (IC50 ) للمستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *Beta vulgaris*

**تأثير المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *Beta vulgaris* على خط خلايا سرطان الرئة A549**

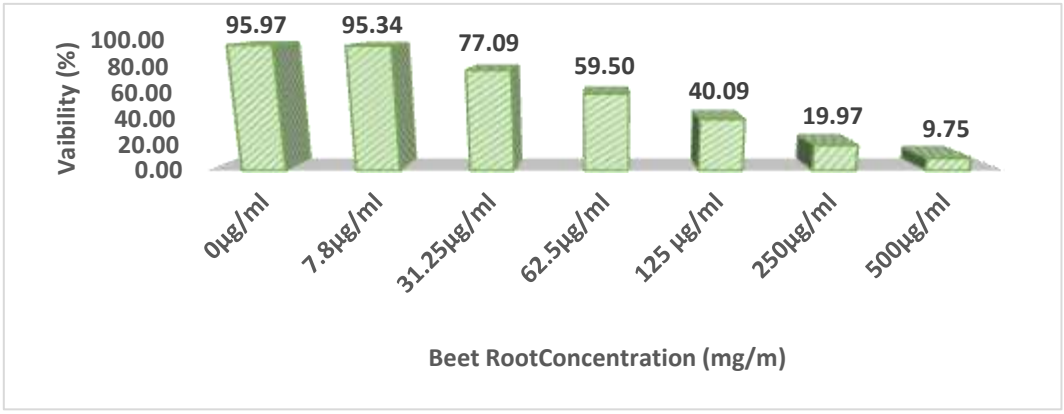
أظهرت نتائج التحليل الاحصائي التي تم الحصول عليها والموضحة في جدول (3) أن تأثير المستخلص المائي بدأ بعد 24 ساعة من التعريض و بفروق معنوية عند مستوى احتمال ($p\leq0.05$) بالمقارنة مع السيطرة أذ سجل معدل النسبة المئوية لتثبيط الخلايا السرطانية لأقل التراكيز 7.8 mg/ml هو 4.661±1.864 وأزداد التأثير السمي في الخلايا عند اعلى التراكيز 500 mg/ml اذ بلغت 90.250±1.409 عند نفس مستوى الاحتمال وفتره التعريض نفسها أما عند انقضاء فترة 48 ساعة من التعرض للمستخلص تم ملاحظة أن معدل النسبة المئوية للتثبيط أرتفع و لجميع التراكيز تقريبا أذ سجل عند التركيز 7.8 mg/ml بلغت 5.640±2.743 وأزداد التأثير السمي في الخلايا عند اعلى التراكيز500 mg/ml بلغت 92.743±1.252 ، في حين بعد 72 ساعة من التعريض بلغت النسبة المئوية لمعدل التثبيط اعلى مستوياتها وبالمقارنة مع التراكيز ذاتها اذ سجلت نسبة التركيز في الخلايا السرطانية6.584±4.195 عند التركيز 7.8 m g/ml مقابل 94.738±1.416 عند التركيز 500 mg/ml.

**جدول (3)**: تاثير المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *Beta vulgaris* على خط خلايا سرطان الرئة A549 بعد مرور 24 ، 48 و 72 ساعة في تراكيز مختلفة

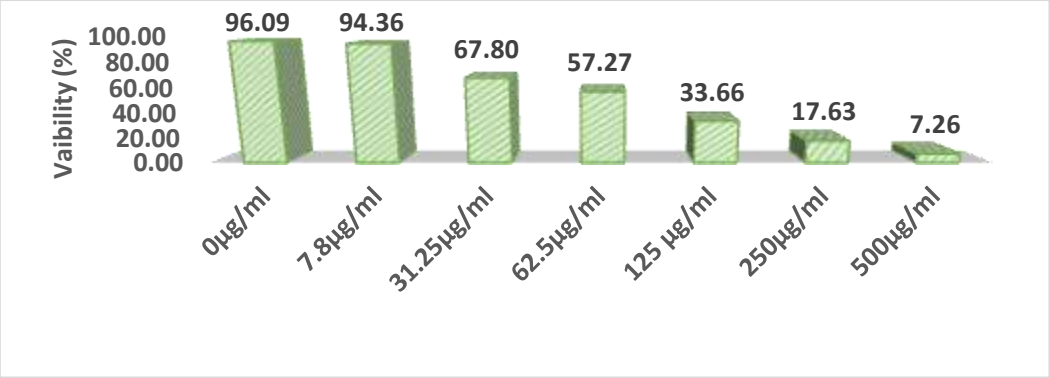
| Concentration/ Time | 24hr (Mean± SD) | 48hr (Mean± SD) | 72 hr (Mean± SD) lung |
|---|---|---|---|
| 0 µg/ml | 4.028±0.814a A | 4.111±1.026a A | 4.404±1.991a A |
| 7.8 µg/ml | 4.661±1.864a A | 5.640±2.743a A | 6.584±4.195a A |
| 31.25 µg/ml | 22.909±5.283a B | 32.199±4.685b B | 34.476±5.386b B |
| 62.5 µg/ml | 40.497±5.911a C | 42.729±5.957ab C | 46.686±5.601b C |
| 125 µg/ml | 59.914±3.041a D | 66.340±2.177b D | 72.776±2.347c D |
| 250 µg/ml | 80.033±3.638a E | 82.369±3.083ab E | 83.125±2.966b E |
| 500 µg/ml | 90.250±1.409a F | 92.743±1.252b F | 94.738±1.416c F |
| LSD0.05 | 2.98 | | |

*الاحرف الصغيرة تشير الى الفروقات بين الاوقات ، الاحرف الكبيرة تشير الى الفروقات بين التركيز. * الاحرف المتغيرة تشير الى الفروقات المعنويه ،* الاحرف المتشابه اشارة الى لا وجود فرق معنوي .

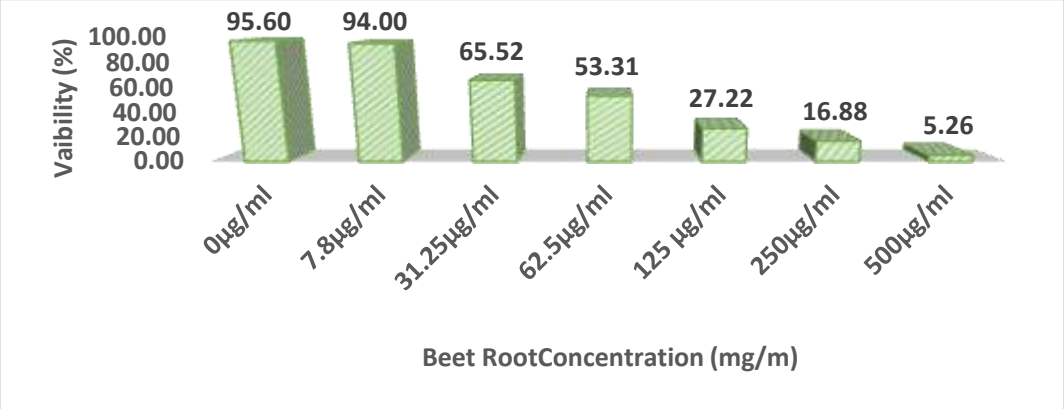
كما اظهرت النتائج بعد 24 ساعة من التعرض ان اقل نسبة حيوية للخلايا السرطانية سجلت في تركيز 500 µg/ml والتي بلغت 9.75 بينما اعلى نسبة حيوية للخلايا كانت في تركيز 7.8 µg/ml اذ بلغت 95.34 . كما لاحضت النتائج ان هذه الحيوية تقل مع مرور الوقت في نفس التراكيز المستخدمة في 48 ساعه كانت نسية الحيوية للخلايا في تركيز 500 µg/ml بلغت 7.25 بينما اعلى نسبة حيوية للخلايا كانت في تركيز 7.8 µg/ml اذ بلغت 94.36 ، واخيرا اقل نسبة حيوية للاخلايا السرطانية كانت في تركيز 500 µg/ml بعد 72 ساعة اذا بلغت النسبة الحيوية للخلايا السرطانية 5.25 كما في الشكل ( 2و 3و4)



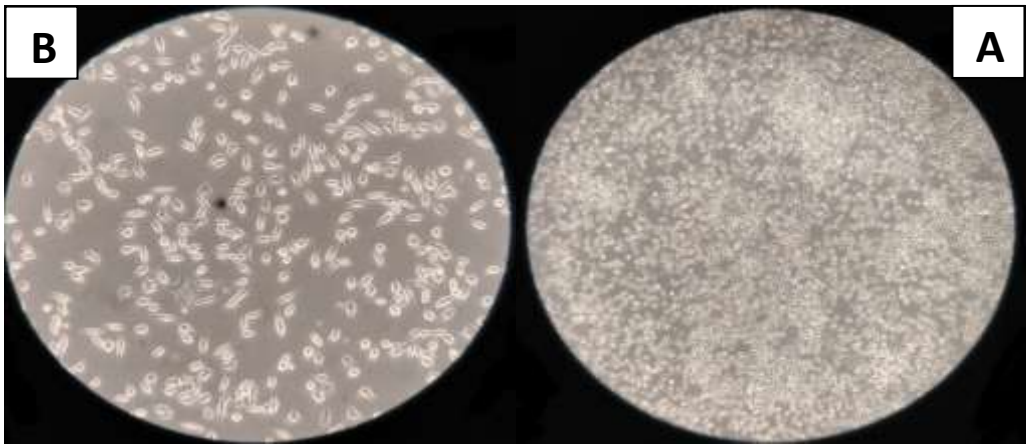

**الشكل (3)**: تاثير المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *Beta vulgaris* على خط خلايا سرطان الرئة A549-Cell بعد مرور 24 ساعة في تراكيز مختلفة




**الشكل (4)**: تاثير المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *Beta vulgaris* على خط خلايا سرطان الرئة A549-Cell بعد مرور 48 ساعة في تراكيز مختلفة




**الشكل (5)**: تاثير المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *Beta vulgaris* على خط خلايا سرطان الرئة A549-Cell بعد مرور 72 ساعة في تراكيز مختلفة.




**الشكل (6)** A - خلايا سرطان الرئة A549 غير المعرضة للمستخلص المائي لنبات الشمندر B - خلايا سرطان الرئة A549 المعرضة للمستخلص المائي لنبات الشمندر

**المناقشة Discussion**

**الكشف الكيميائي عن المركبات الفعالة للمستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *Beta vulgaris*.**

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Rehman et al.،2021) ، الذين استخدموا طريقة استخلاص جهاز السوكسلت لتحضير مستخلصات الأوراق والجذور الخام وأفادوا أن التحليل الكيميائي النباتي لمستخلصات الجذور والأوراق أظهر وجود مركبات الفلافونويد، الفينولات والقلويدات والصابونين والجليكوسيدات. علاوة على ذلك، اتفقت النتائج مع (Arjeh et al.،2022) )الذي تم حصاد جذور Beta vulgaris من مقاطعة أذربيجان الغربية، إيران، واعطى مستخلص القشره للجذور قيم أعلى للمركبات في جميع التجارب التي أجريت مقارنة بالاجزاء الطازجة في مذيب الإيثانول والميثانول، والذي اتفق مع دراسة مختلفة ( Kujala et al.،2000) . تبين أن المركبات الفينولية تتوزع في الغالب على الأجزاء الخارجية من الجذر. كانت كمية المركبات الفينولية في القشرة (19.7± 1.1 g / mg db) أكثر من ضعف كمية في الجزء الطازج (8.3 ± 0.0 g / mg db ) علاوة على ذلك، كان للمذيبات أيضا تأثير معنوي على كمية المركبات الفينولية، وكان الميثانول أكثر فعالية من الإيثانول في استخلاص المركبات الفينولية .Barreca et al،(2016) .

بالإضافة إلى ذلك، أيد (El-Beltagi et al. 2022) هذه النتائج عندما تم تحديد إجمالي البوليفينول بواسطة اختبار Folin-Ciocalteu، وهي المركبات النشطة بيولوجيًا السائدة (832 mg/100 gm) في مستخلص الجذور علاوة على ذلك، تمثل مركبات الفلافونويد ما يقرب من 25% (234 mg / 100 gm) من إجمالي البوليفينول الموجود في مستخلص الجذر. وفي الوقت نفسه، وصل محتوى البيتالين betalains إلى 535 mg/100 gm. وكانت هذه النتائج التي تم الحصول عليها أعلى من تلك التي تم تقييمها بواسطة (Tumbas Šaponjac et al. 2016) والتي أظهر محتويات البوليفينول الا جمالي (326.51 مجم / GAE 100 جم) والفلافونويدات (10.23 مجم 100 / RE جم) والبيتالين (60.52 مجم بيتانين / 100 جم و 61.33 مجم ) في مستخلص الإيثانول المائي من ثفل الشمندر المجفف. بالإضافة إلى ذلك، كانت النتائج التي تم الحصول عليها أقل من تلك التي تم تقييمها من قبل (Lazăr et al 2020) الذي أظهر أن مستخلص مسحوق قشر الشمندر المائي يحتوي على نسبة عالية من محتوى بوليفينوليك (Vulić et al.،2012 ).

**التأثير السمي الخلوي للمستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *Beta vulgaris* على خط الخلايا الطبيعية REF**

أظهرت نتائج السمية الخلوية أن التركيز المسبب لتثبيط تكاثر الخلايا الطبيعية REF بنسبة 50% هو (IC50) ) بواسطة المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر beta vulgaris كان 6.35mg/ml كما في الشكل ( 4-2) كما اظهرت النتائج تغيار في نسبة حيوية الخلايا في التراكيز المستخدمة المختلفة كما في الجدول (4-2) ان النتائج التي تم الحصول عليها كانت متفقة مع (Saber et al.،2022) الذي درس تأثيرات الشمندر الأحمر والبيتانين على خطوط خلايا سرطان القولون والمستقيم البشرية بعد العلاج بجرعات مختلفة (20 إلى 140 ميكروغرام / مل) من مستخلص الشمندر والبيتانين خلال (24 و 48 ساعة)، تم تحديد IC50s على أنها 92 ميكروغرام / مل، 107 ميكروغرام / مل و 64 ميكروغرام / مل، 90 ميكروغرام / مل في خطوط الخلايا HT-29 و Caco-2 عند 48 ساعة، على التوالي أيضًا، لم تظهراي تاثير على خطوط الخلايا الطبيعية KDR/293 (المجموعة الضابطة) بأعلى تركيز محدد (140 ميكروغرام/مل) عند 24 ساعة و48 ساعة .كما اشارة الى مستخلص الشمندر والبيتانين يثبط بشكل كبير نمو خطوط الخلايا HT-29 وCaco-2 بطريقة تعتمد على الوقت والجرعة (مع زيادة التركيزات من 40 إلى 100 ميكروغرام/مل للبيتانين و60 إلى 100 ميكروغرام/مل لمستخلص الشمندر).

ومع ذلك، فقد وجد (Bouchmaa et al 2022) أن المستخلص الميثانولي لأوراق B. *vulgaris* subsp ليس له أي تأثير سام للخلايا ضد الخلايا الطبيعية (IC50 > 50) (PBMCs ميكروجرام/مل على العكس وجد المستخلص يتمتع بقدرة قتل انتقائية للغاية ضد سرطان الثدي السلبي الثلاثي ( TNBC) وخطوط خلايا سرطان الثدي الإيجابية (MDA-MB-468) وMCF-7 كذلك وجد (Rehman et al 2021) أن مستخلص الجذر يحمل قيمة IC50 تبلغ 2.32 ± 0.72 ميكروغرام / مل مقارنة بمستخلص الأوراق (2.20 ± 0.72 ميكروغرام / مل). قد يكون السبب وراء انخفاض قيمة IC50 لمستخلص الأوراق هو أنه يحتوي على محتوى فينولي أكبر مقارنةً بمستخلص الجذر واشارة الى انخفاض IC50 مع النشاط العلاجي الكبير للمكونات النشطة بيولوجيًا الموجودة في المستخلصات يعزى ذلك الى ان البيتانين الذي يكون أكثر من 95% من إجمالي البيتاسيانين غير سام بتركيزات مختلفة على الخلايا البطانية للوريد السري البشري والخلايا الليفية البشرية الطبيعية، كما يمنع إنتاج أنواع الأكسجين التفاعلية، ويقلل مستوى أنواع الأكسجين التفاعلية داخل الخلايا (Loo et al.،2003).

**تاثير المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *Beta vulgaris* على خط خلايا سرطان الرئة A549**

اتفقت النتائج مع (El-Beltagi et al.،2022 ) على أن النشاط السام لمستخلص الجذر كعامل مضاد للسرطان (باتجاه الرئة) حيث انخفضت النسبة المئوية لخط خلايا سرطان الرئة A549 مع زيادة تركيزات المستخلص الميثانولي لجذر. من ناحية أخرى، لا تتأثر خلايا سرطان القولون والمستقيم الغدي Caco-2 بجميع تراكيز مستخلص الجذر باستثناء التركيزات العالية (800 ميكروغرام / مل) التي أظهرت انخفاضًا طفيفًا في صلاحية خط خلايا Caco-2. كما أظهرت النتائج اتفاقاً مع ( El-Mesallamy et al.،2020) على أنه تم تحديد السمية الخلوية باستخدام مقايسة MTT للمستخلص الميثانولي والتي أظهرت نشاطاً معنوياً مضاداً للسرطان ضد سرطان البنكرياس (PANC-1 بمعدل (IC50=3.69 ميكروغرام/مل). نشاط معتدل سام للخلايا ضد HepG2 مع (IC50=4.43 ميكروغرام/مل)، سرطان الرئة (A549) مع (IC50=4.9 ميكروغرام/مل) ونشاط ضعيف ضد سرطان البروستاتا PC-3 مع (IC50=6.1 ميكروغرام/مل).

وقد بين أن الا ستراجالين كان سام لخلايا سرطان الكبد البشري HepG2 المزروعة ( Kim،2013 ). كما أدى إلى انخفاض بقاء الخلية وزيادة موت الخلايا المبرمج لخطوط خلايا سرطان الرئة البشرية المزروعة (A549 وH1299)، ولكن ليس في خلايا الرئة الطبيعية (Hu et al.) (BEAS-2B،2017). ان آلية انتقائية تجاه الورم مقابل الخلايا الطبيعية غير معروفة، ولكن مضادات الأكسدة يمكن أن تمنع نمو الخلايا السرطانية من خلال توقف دورة الخلية أو موت الخلايا المبرمج عن طريق استنفاد أنواع الأكسجين التفاعلية لأن نموها يعتمد على (Loo et al.) (H2O2،2003) .

(Maurya et al. 2010) وجدوا أن حمض الغاليك يتم توزيعه على نطاق واسع في النباتات والفواكه والأطعمة مع مجموعة من الأنشطة البيولوجية. في هذه الدراسة، تم استكشاف الآليات المحتملة لخصائص حمض الغاليك المضادة للسرطان في خط خلايا سرطان الرئة A549. بينما (Chandrasekaran et al. 2022) ذكروا أن التأثيرات السامة للخلايا للبيتانين تعتمد على الجرعة خلال 24 ساعة (20-100 ميكرومتر / مل) و تزداد تأثيرات السمية الخلوية بطريقة تعتمد على التركيز. وكان IC50 للسمية الخلوية مع البيتانين 73.5 ميكرومتر / مل ان الفعالية السمية الخلوية للبيتانين هو كعامل مضاد للسرطان. وقد لوحظ تأثير البيتانين على خلايا سرطان الرئة A549 من خلال الفحص المجهري حيث مركب البيتانين النباتي النشط بيولوجيًا يؤدي إلى موت الخلايا المبرمج، مما يؤدي إلى موت الخلايا، و يؤدي إلى ظهور فقاعات وانهيار وتسرب العضية الداخلية.

**الاستنتاجات**

نستنتج من الدراسة الحالية ان المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر تحتوي على العديد من المركبات الفعالة وهي (الصابونينات، التانينات، الفينولات، الفلافونيدات، الكلايكوسيدات). ان تاثير المستخلص على الخلايا الطبيعية REF وبعد فترة تعريض 72ساعة والمتمثله بشكل التركيز المسبب لتثبيط تكاثر الخلايا الطبيعية REF بنسبة 50% هو( IC50) بواسطة المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر *Beta vulgaris* هو (6.35) mg/ml كان اقل سمية حيث سجل المستخلص المائي تاثير تثبيطي قليل جدا مقارنة مع الخط السرطاني A549. تم اختبار المستخلص المائي لجذور نبات الشمندر للكشف عن التاثير السمي الخلوي للمستخلص المائي ولجميع التراكيز المستخدمة في خط خلايا سرطان الرئة A549 ، لقد تم ملاحظة ارتفاع معدل النسبة المئوية لتثبيط نمو الخلايا السرطانية وخلال فترات التعرض الثلاثة 24و 48 و 72 ساعة وبفروقات معنوية عند مستوى احتمال( ($p\leq0.05$ ومقارنتها مع السيطرة

**المصادر**

Abdullah، S. A.، Al-Shammari، A. M.، & Lateef، S. A. (2020). Attenuated measles vaccine strain have potent oncolytic activity against Iraqi patient derived breast cancer cell line. Saudi journal of biological sciences، 27(3)، 865-872.

Arjeh، E.، Khodaei، S. M.، Barzegar، M.، Pirsa، S.، Karimi Sani، I.، Rahati، S.، & Mohammadi، F. (2022). Phenolic compounds of sugar beet (Beta vulgaris L.): Separation method، chemical characterization، and biological properties. Food Science & Nutrition، 10(12)، 4238-4246.

Barreca، D.، Laganà، G.، Leuzzi، U.، Smeriglio، A.، Trombetta، D.، & Bellocco، E. (2016). Evaluation of the nutraceutical، antioxidant and cytoprotective properties of ripe pistachio (Pistacia vera L.، variety Bronte) hulls. Food chemistry، 196، 493-502.

Betancur-Galvis، L. A.، Saez، J.، Granados، H.، Salazar، A.، & Ossa، J. E. (1999). Antitumor and antiviral activity of Colombian medicinal plant extracts. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz، 94، 531-535.

Chakole، R.، Zade، S.، & Charde، M. (2011). Antioxidant and anti-inflammatory activity of ethanolic extract of Beta vulgaris Linn. roots. International Journal of Biomedical and Advance Research، 2(4)، 124-130.

Chandrasekaran، R.، Yadav، S. A.، Periakaruppan، R.، Prabukumar، S.، Abomughaid، M. M.، Al-Dayan، N.، ... & Dhanasekaran، S. (2021). Augmented cell signaling by betanin insights cancer cell remodeling: A molecular docking and experimental approach. Biointerface Res Appl Chem، 3، 3161.

Clifford، T.، Bell، O.، West، D. J.، Howatson، G.، & Stevenson، E. J. (2017). Antioxidant-rich beetroot juice does not adversely affect acute neuromuscular adaptation following eccentric exercise. Journal of sports sciences، 35(8)، 812-819،

El Gamal، A. A.، AlSaid، M. S.، Raish، M.، Al-Sohaibani، M.، Al-Massarani، S. M.، Ahmad، A.، ... & Rafatullah، S. (2014). Beetroot (Beta vulgaris L.) extract ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity associated oxidative stress، inflammation، and apoptosis in rodent model. Mediators of inflammation، 2014.

El-Beltagi، H. S.، El-Mogy، M. M.، Parmar، A.، Mansour، A. T.، Shalaby، T. A.، & Ali، M. R. (2022). Phytochemical characterization and utilization of dried red beetroot (Beta vulgaris) peel extract in maintaining the quality of Nile Tilapia Fish Fillet. Antioxidants، 11(5)، 906.

El-Beltagi، H. S.، El-Mogy، M. M.، Parmar، A.، Mansour، A. T.، Shalaby، T. A.، & Ali، M. R. (2022). Phytochemical characterization and utilization of dried red beetroot (Beta vulgaris) peel extract in maintaining the quality of Nile Tilapia Fish Fillet. Antioxidants، 11(5)، 906.

El-Mesallamy، A.، El-Latif، A.، Ahlam، E. S.، El-Azim، A.، Hassan، M.، Mahdi، M. G.، & Hussein، S. A. A. (2020). Chemical composition and biological activities of red beetroot (Beta Vulgaris Linnaeus) roots. Egyptian journal of chemistry، 63(1)، 239-246.

Freshney، R.I. (2000). Culture of animal cells: A manual for basic technique (4th ed.)Wiley-liss، A John wiley and sons، Inc. publication، New York.

Freshney، R.I.(1994). Culture of animal cells. A manual of basic technique. New York.

Hu، T.، Liu، Q. M.، He، X. W.، Huang، F.، Zhang، M. W.، & Jiang، J. G. (2017). Identification of bioactives from Astragalus chinensis Lf and their antioxidant، anti-inflammatory and anti-proliferative effects. Journal of food science and technology، 54، 4315-4323.

Hussein، N.، & Ameer،N (2017). The Antimicrobial Activity of Eucalyptus Camaldulensis Leaves against Bacteria Cause Urinary Tract Infection. Al- Mustansiriyah Journal of Science، 28(1.)

Indu، R.، Adhikari، A.، Ray، M.، Hazra، A. K.، Sur، T. K.، & Das، A. K. (2017). Antioxidant properties of polyphenolic rich HPLC standardized extract of Beta vulgaris L. roots. International Journal of Research and Development in Pharmacy & Life Sciences، 6(3)، 2619-2624.

Keskin، C.، Özen، H. Ç.، Toker، Z.، Kızıl، G.، & Kızıl، M. (2018). Determination of in vitro antioxidant and antimicrobial properties of shoot and root extracts of Astragalus

diphtherites FENZL var. diphtherites and Astragalus gymnalopecias RECH. FIL. obtained by different solvents.

Khashan، K. S.، Sulaiman، G. M.، Hussain، S. A.، Marzoog، T. R.، & Jabir، M. S. (2020). Synthesis، characterization and evaluation of anti-bacterial، anti-parasitic and anti-cancer activities of aluminum-doped zinc oxide nanoparticles. Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials، 30(9)، 3677-3693.

Kim، Y. J. (2013). Rhamnetin attenuates melanogenesis by suppressing oxidative stress and pro-inflammatory mediators. Biological and Pharmaceutical Bulletin، 36(8)، 1341-1347.

Kujala، T. S.، Loponen، J. M.، Klika، K. D.، & Pihlaja، K. (2000). Phenolics and betacyanins in red beetroot (Beta v ulgaris) root: Distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. Journal of agricultural and food chemistry، 48(11)، 5338-5342.

Kúsz، N.، Stefkó، D.، Barta، A.، Kincses، A.، Szemerédi، N.، Spengler، G.، ... & Vasas، A. (2021). Juncaceae species as promising sources of phenanthrenes: antiproliferative compounds from Juncus maritimus Lam. Molecules، 26(4)، 999.

Lazăr، S.، Constantin، O. E.، Horincar، G.، Andronoiu، D. G.، Stănciuc، N.، Muresan، C.، & Râpeanu، G. (2022). Beetroot by-product as a functional ingredient for obtaining value-added mayonnaise. Processes، 10(2)، 227.

Loo، G. (2003). Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation. The Journal of nutritional biochemistry، 14(2)، 64-73.

Loo، G. (2003). Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation. The Journal of nutritional biochemistry، 14(2)، 64-73.

Maurya، D. K.، Nandakumar، N.، & Devasagayam، T. P. A. (2010). Anticancer property of gallic acid in A549، a human lung adenocarcinoma cell line، and possible mechanisms. Journal of clinical biochemistry and nutrition، 48(1)، 85-90.

Ma، W.، Zhang، Y.، Ding، Y. Y.، Liu، F.، & Li، N. (2016). Cytotoxic and anti-inflammatory activities of phenanthrenes from the medullae of Juncus effusus L. Archives of pharmacal research، 39، 154-160.

Naing، W.(2018) Preliminary Phytochemical Investigation and Antioxident Activity of leaves from Carica papaya Linn; Thin-Baw and leaves of Dolichandrone spathacea (Lf) Tha-khut.

Petrovska، B. B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. Pharmacognosy reviews، 6(11)، 1.

Rehman، S.، Shah، S.، Butt، A. M.، Shah، S. M.، Jabeen، Z.، & Nadeem، A. (2021). Biochemical profiling and elucidation of biological activities of Beta vulgaris L. leaves and roots extracts. Saudi Journal of Biological Sciences، 28(1)، 592-602.

Roy، A.، & Bharadvaja، N. (2017). Medicinal plants in the management of cancer: a review. Int J Complement Alt Med، 9(2)، 00291.

Saber، A.، Abedimanesh، N.، Somi، M. H.، & Khosroushahi، A. Y. (2021). Antiproliferative and apoptotic effects of red beetroot and betanin on human colorectal cancer cell lines.

Singh، A.، Garg، V. K.، & Sharma، P. K. Wound healing activity of ethanolic extract of Beta vulgaris. Pharmacologyonline. 2011; 1: 1031–1038 .

Stefkó، D.، Kúsz، N.، Szemerédi، N.، Barta، A.، Spengler، G.، Berkecz، R.، ... & Vasas، A. (2022). Unique Phenanthrenes from Juncus ensifolius and Their Antiproliferative and Synergistic Effects with the Conventional Anticancer Agent Doxorubicin against Human Cancer Cell Lines. Pharmaceutics، 14(3)، 608.

Tumbas Šaponjac، V.، Čanadanović-Brunet، J.، Ćetković، G.، Jakišić، M.، Djilas، S.، Vulić، J.، & Stajčić، S. (2016). Encapsulation of beetroot pomace extract: RSM optimization، storage and gastrointestinal stability. Molecules، 21(5)، 584.

Yaseen، N. Y. (1990). Cytogenetic study on human colorectal cancer cells (Doctoral dissertation، University of Sheffield، Department of Experimental and Clinical Microbiology.