منشط UNBS1450 من نبات العشار كمنظم للإشارات المتحكمة في التكاثر وموت الخلية

UNBS1450 from Calotropis procera as a regulator of signaling pathways involved in proliferation and cell death

Tom Juncker, Marc Schumacher, Mario Dicato, Marc Diederich

الخلاصة

بالرغم من التطور الكبير في علم أدوية السرطان في أخر عشرة عقود، فان الحاجة الماسة لاكتشاف وتطوير مضادات للسرطان جديدة وبديلة يبقى أمرا هاما. ولقرون مضت عرف شجيرة متخشبة باسم نبات العشار Calotropis procera على انها مصدر لـ ascaricidal و schizonticidal ومضادات البكتيريا ودواء طارد الديدان ومبيد للحشرات ومضاد للنفخة ومضاد diarrhoeal وlarvicidal وسام الخلايا ومسكن للألم. هناك مركبات مختلفة مثل الملح العضوي norditerpenic، والكربونات العضوية، والسستين البروتيني، والقويات والفلافونويد والستيرول كذلك أنواع عديدة من المنشطات أضافت لهذا النبات أهمية كبيرة لدى العلماء والباحثين. اجريت عدة دراسات حول الفئة الكيميائية للمنشطات وتقدير الأنشطة البيولوجية المتعلقة بها وعلاقة التركيب مع النشاط (structure–activity relationship أي SAR) أوضحت هذه الدراسات فائدة هذا النبات في مجال تصنيع العلاج الدوائي، وهذه الدراسات أدت إلى اكتشاف دواء ناجع. حديثا منشط ستيروييد UNBS1450 01 (المشتق من 2-oxovoruscharin 02) الناتج من نبات العشار اظهر انه يبذل جهد إضافي كمضاد للسرطان. UNBS1450 01 واثبت انه كابح مضخة صوديوم، ويظهر نشاط مضاد للتكاثر ونشاط مسبب لموت الخلية. والاستخدام المتوقع للـ UNBS1450 01 كمضاد للسرطان تم التوصل له بواسطة تشويش الـ actin cytoskeleton بعد ارتباطها بمضخة الصوديوم عند الغشاء الخلوي، والتسبب في الالتهام الذاتي المؤدي للموت، عن طريق كبح نشاط NF-kB كذلك بخفض مقدار انتظام c-Myc في الخلايا السرطانية. نحن نهدف من هذه الدراسة إلقاء نظرة فاحصة على الأهمية الدوائية لنبات العشار والتركيز أكثر على نشاط مضاد السرطان UNBS1450 01.

1. نبات العشار كمصدر دوائي طبيعي

1.1 نبات العشار C

طبقا للبحوث العلمية، فان أساس تطوير الأدوية الصناعية يقع في النهضة الصناعية القادمة. ومن المؤكد أن الكثير من المنتجات الصناعية الفعالة وزيادة في القدرة الاقتصادية لشركات تصنيع الأدوية هما السبب وراء التوجه إلى المنتجات الجديدة بالمقارنة مع المصادر الحيوانية والنباتية والغير عضوية المستخدمة لعصور مضت.

ولكن، عدد مهم من هذه الأدوية المصنعة تم الحصول عليها من مصادر طبيعية، وقدرت بحوالي 11% من الأدوية تعتبر هي الأساس بواسطة منظمة الصحة العالمية (World Health Organization (WHO)) وهي أصل هذه الأدوية. الديجوكسين Digoxin والكينين quinine والكينيدين quinidine و vincristine و vinblastine والاتروبين atropine والمورفين morphine والكودين codeine هي الأكثر أهمية. إضافة إلى ذلك، طبقا إلى Yue-Zhong Shu فان 60% من أدوية مضادات السرطان ومضادات العدوى الحالية والمستقبلية ذات أصل طبيعي (1).

نبات العشار يعتبر احد من نباتات الـ Asclepiadaceae، وهو نبات خشبي عريض الأوراق ينمو في شكل شجيرات خشنة دائمة الخضرة يتراوح طولها من 3 إلى 5 متر، تنمو بكثرة في المناطق الاستوائية. وتتوزع على المناطق الحارة وشبه الحارة من الكاريبي، ووسط أمريكا، وجنوب أمريكا وإفريقيا والهند وإسرائيل، ويظهر بالأخص في الأراضي المنبسطة والمرتفعة عن الأرض. ولعصور طويلة سميت نباتات العشار باسم تفاحة سدوم The Apple of Sodom وقد استخدمت في الطب الشعبي لخصائصها الدوائية كمركبات نشطة مركزة في الجذور واللحاء والأوراق وبالأخص في عصارة الخشب (لبن الخشب) والذي يفرز عند إصابة الأوراق بأذى. وفي غضون ذلك، فان المستخلصات الكيميائية من نبات العشار أفادت بوجود ascaricidal و schizonticidal ومضادات البكتيريا ودواء طارد الديدان ومبيد للحشرات و مضاد للنفخة و مضاد diarrhoeal و larvicidal و سام الخلايا و مسكن للألم، وهذا يفسر الطلب المتزايد عليه للأبحاث العلمية الطبية لأجزاء مختلفة منه (2-5).

2.1 عصارة الخشب لنبات العشار

أكثر من 12,000 صنف نباتي يحتوي على عصارة الخشب، وهو عبارة عن سائل يشبه الحليب حيث يوجد فيه مجموعة من البروتينات، ولـ 1000 صنف نباتي يوجد أيضا cis-polyisoprene وهي مواد بوليميرية هيدروكربونية مطاطية (6). وتكون عصارة الخشب هذه متوفرة في الأجزاء الخضراء للنبات، وهي تنتج وتتجمع كوسيلة دفاعية ضد الفيروسات، والفطريات والحشرات. وفي الحقيقة، بالإضافة إلى البروتينات الموجودة في المطاط المكون بيولوجيا وعصارة الخشب بينت على أنها تحتوي على بروتينات تتكون في عمليات الايض الدفاعية والمؤكسدة (7،8). اليوم، تعتبر عصارة الخشب مصدرا هاما للاستخدامات كعقار جزئي نشط من الممكن أن يجرى عليه تعديلات كيميائية لتحسين فعاليته.

بالرجوع إلى نبات العشار، بالرغم من أن الاستخدام الممكن لعصارته الخشبية أثبتت بنجاح، إلا أن عدد قليل من جزئيات العصارة الفعالة قد تم التعرف عليها حتى يومنا هذا، وفي الأغلب فان عصارة الخشب تستخدم ككل متكامل أو بعد معالجتها بشكل بسيط، للتخلص من المكونات المطاطية فيه. وفي العادة عصارة الخشب الجافة لنبات العشار تجمع من نباتات غير محروثة عن طريق إحداث شق بجوار الأوراق الصغيرة وتخلط بنسبة 1:1 (v/v) في مياه مقطرة. تؤخذ المادة فيما بعد وتحفظ تحت ظروف ثابتة وبهدوء لمنعها من الترسب. تحفظ في درجة حرارة الغرفة إلى أن يتم إدخالها في جهاز طرد مركزي يعمل على سرعة 5000 xg ولمدة 10 دقائق عند درجة حرارة $4^{o}C$. ثم تسحب المادة المترسبة بعيدا في حين المادة المتبقية تفرز المزيد باستخدام غشاء نباتي ذو 8000 Da، وهذا يحافظ على أجزاء البروتين، قبل أن تجفف بالتجميد. وبصفة عامة، الباحثون استخدموا طريقتين هما، سائل غشائي يحتوي على مركبات ذات وزن جزئي منخفض، تعرف باسم العصارة الغشائية dialysis latex ويرمز لها بالرمز DL، والطريقة الثانية وهي تستخدم عصارة غير غشائية (NDL) وتحتوي على بروتينات مركزة.

لقد كان الباحث .Soares et al من أوائل الباحثين الذي عمل على توضيح الأثر المفيد لمضاد الألم لعصارة الخشب (NDL) (9). بعد إدخال حمض الخليك لفأر جائع، ولقد كانت عصارة الخشب قادرة على كبح 100% من انقباضات المعدة في جرعة مقدارها (12.5-50 mg/kg). استخدم المورفين كمتحكم ايجابي (نسبة الكبح أو المنع 54.5%). تم الحصول على نفس النتائج للمورفين بواسطة اللحس في فحص خاص.

وبالمقابل للمورفين، وجد إن opioid antagonist nalaxone لم يغير عصارة الخشب التي تعمل كمضاد للألم.

في عام 2006، .Freitas et al تقدم لخطوة ابعد من ذلك واكتشف إمكانية عمل عصارة الخشب المتخثر dialysed latex والغير متخثر non-dialysable latex كمضاد للالتهاب (10)، عصارة الخشب المتخثرة لنبات العشار أظهرت زيادة في الكريات البيضاء، وبالأخص في حيوية انتقالها وحركتها في حين إن نشاط مضاد الالتهاب ومضاد الألم كانت مرتبطة في عصارة الخشب الغير متخثر.

حيث أن نبات العشار يعرف بان له تأثير مضاد للعديد من الأمراض التي تصيب البشر، فان الهدف من أبحاث ,.Ramos et al هو شرح النشاط الكيميائي للقضاء على الجراثيم لأجزاء عديدة من عصارة الخشب (11). وقد اعتمدوا في تقييمهم على فقس بيض وعلى يرقات ناتجة من بعوضة الحمى الصفراء Aedes aegypti. حيث إن تركيز 10 mg/mL من NDL كان قادرا على منع فقس البيض، وإمكانية المنع لجزء من DL كانت اقل بكثير حيث استخدم تركيز اكبر بخمس مرات (50 mg/mL) للحصول على 0% فقس للبيض. كلا من NDL وكذلك DL كانتا السبب في موت الكثير من اليرقات بشكل يعتمد زمنيا على مقدار الجرعة وزمن تعرضها. التحليلات اللونية كشفت عن أحماض أمينية وبروتينات مختلفة لعصارة الخشب DL و NDL، وعليه فان هذا يعد بإمكانية تحضير متخصصة لعصارة خشب نبات العشار للحصول على مركب قادر على قتل يرقات الحشرات.

بالمقارنة مع عصارة الخشب المقطرة، بعض الباحثين استخدموا عصارة الخشب المجففة بواسطة الهواء، في معظم الأمثلة، فان عصارة الخشب استخلصت من الأجزاء العليا للنبات قبل أن تجف تحت الظل (DL, dried latex) العصارة الجافة.

بعد أن تمت عملية تحويله إلى مسحوق وخلطه بنسبة 1:1 مع صمغ عربي، فان DL استخدم مع جرذان تفتقر إلى الصبغة اللونية الطبيعية وخنازير غينية تسببت في منع مركب كارجينان carrageenan وهو عديد سكر جلاكتوز مكبرت وكذلك مركب Freund المساعد على الاستسقاء كذلك منع تكوين الورم الحبيبي granuloma. بالإضافة إلى نشاط DL في منع الالتهاب عن طريق منع تحلب السائل وتقليل الالتهاب الجلدي الناتج عن الأشعة فوق البنفسجية (12). وقد حصل .Arya and Kumar على نتائج مشابهة بتجفيف DL ثم أجريت لها عملية soxhlated لاستخلاص الميثانول ثم سحق مع صمغ عربي كما ذكر من قبل، وقد بينت هذه الأبحاث إن نشاط مضاد الالتهاب ضد مركب الهيستامين histamine، والسيروتونين serotonin

80/48، وbradykinin، وprostaglandin يعمل على تسوية الالتهاب في أقدام الجرذان (13). وقد وضح نفس فريق البحث إن DL، وقد سحق هذه المرة في محلول ملحي، قادرا على أن يلعب دور المقاوم للتأكسد وanti-hyperglycemic أي مقاوم لتجمع الجلوكوز في الدم في الجرذان المصابة بداء السكر المستحث (14). وبالتناقض مع هذه النتائج، هناك بعض الإثباتات تفيد إن DL قادرا على استحثاث تأثيرات الالتهاب. في 2003 اثبت Shivkar et al إن DL قادرا على إنتاج جرعة تعتمد على الاستجابة للالتهابات الناتجة في أصابع قدم فأر مشابه لمركب كارجينان. ودراسات أخرى اقترحت تكون الأمينات بفعل الكائنات الحية، وبالأخص الهيستامين histamine، والتي تشارك DL في التحكم في الالتهاب.

بالمثل، باستخلاص DL بالتسلسل مع الأثير البترولي والميثانول يتبع بتقطير لوني لسليكا الجل، قام Choedon et al. باستخدام علاج DL على فئران معدلة وراثياً مصابة بسرطان الكبد (16). لم يكتشفوا فقط تأثير DL كعلاج، إلا إنهم لاحظوا أن DL له تأثيرات سامة على الخلايا السرطانية من النوع Huh-7 وCOS-1. بواسطة الفصل اللوني، قاموا بفصل الأجزاء القطبية المسئولة عن التأثير السام، وبتحليل الموت المبرمج للخلايا اكتشف انه يستحث عملية انقسام DNA.

3.1 استخلاص كحول الايثانول والميثانول والسائل المائي

تم التحقق من مادة "فيوتوكيميكل Phytochemically في النبات منذ الستينات وبالأخص منشط الـ cardenolides (17،18)، و triterpenoids (19،20)، و الانثوسيانين anthocyanins (21)، و الهيدروكربون (22). بالإضافة إلى استخدام عصارة الخشب، المحلول المائي، والميثانول والايثانول وغيرها من المواد العضوية الأخرى المستخلصة من الأجزاء المختلفة للنبات، مثل الورود والبراعم والجذور السيقان والأوراق، والتي كانت من بين الوسائل الأولية لتطوير الأدوية الطبيعية للاستخدام الكلاسيكي والطب البديل. في العام 1987، وصفا الباحثين Malik and Chughtai نشاط مضاد للميكروبات ضد الكائنات البكتيرية الممرضة (23). علاوة على ذلك استخلاص المركبات العضوية من نبات العشار اثبت انه يعمل كمبيد للديدان السلكية (24،25)، ومبيد الحشرات المصمم لقتل اليرقات larvicidal (26)، ومضاد الخصوبة anti-fertility (27) وحتى مضاد السرطان المحتمل (28،29). في العام 1987، تمكن Mascolo et al. من شرح الخصائص البيولوجية لنبات العشار واستخدمه مع الحيوانات المجترة، واكتشف إن عصارة أزهار نبات العشار مضادة للالتهاب ومسكنة للألم، ومضاد جرثومي ومقاوم لنشاط الحمى. وفي نهاية الثمانينات من

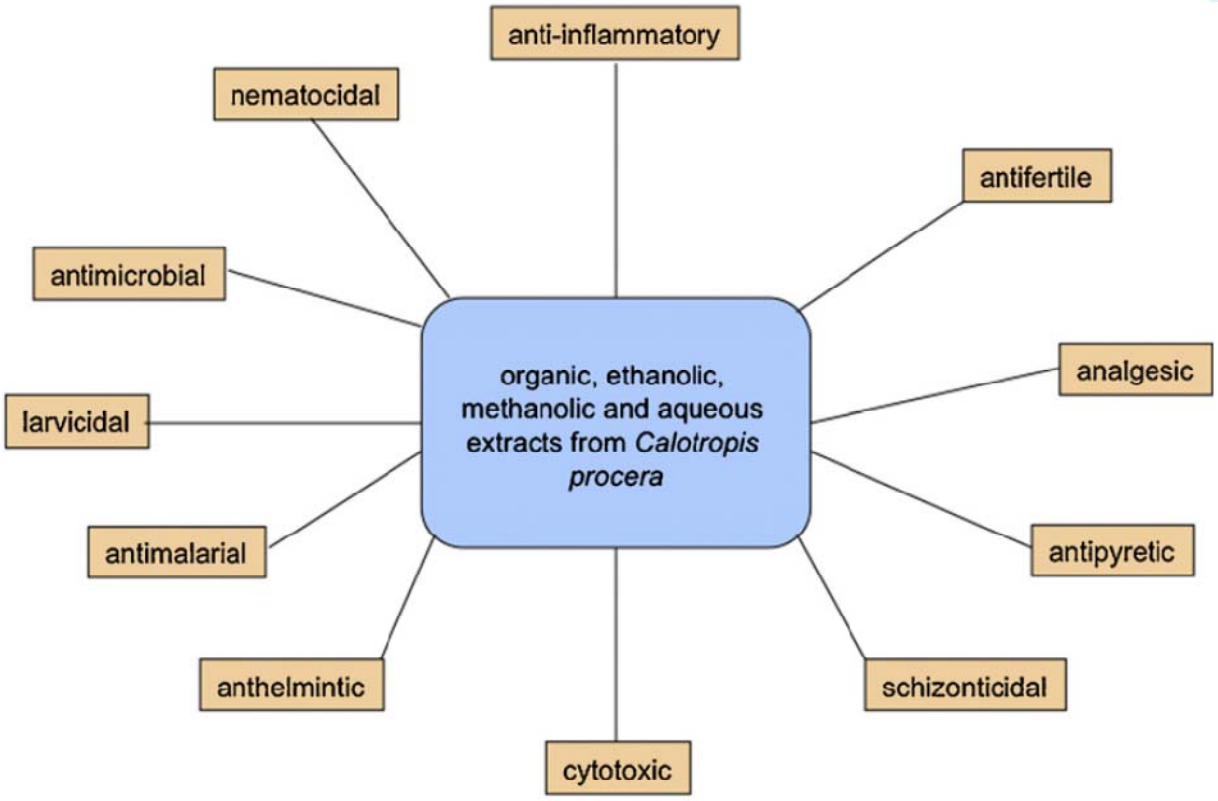
القرن العشرين .Fenado et al أسس طريقة قياسية للحصول على العصارة المائية الخام crude aqueous extracts (CAE) من مسحوق أزهار العشار (30). وبالمثل، في العام 1994 تمكن الباحثين Asuzu و Onu من الحصول على عصارة الميثانول الخام crude methanolic extracts (CME) المستخلص نبات العشار باستخدام أدوات Soxhlet (31). آخرون استخدموا الكحول الايثيلي المفلتر المستخلص لتوضيح أهمية الدواء المستخلص من النباتات (32،33).

وفي غضون ذلك، اكتشفت في عصارة الكحول الايثيلي من الأزهار والبراعم والجذور والسيقان والأوراق وجود schizontocidal. الأجزاء المختلفة في نبات العشار تظهر تأثيرات مثبطة على الكلوروكين الحساس وسلالات مقاومة الملاريا الجرثومية. وقد أجريت فحوصات مضادة للملاريا طبقا للطريقة المذكورة في البحث Ang et al (34)، وقد تم تعديل الطفيليات في الدم لتكون 1-1.5% قبل إضافة أي التراكيز المختلفة لنبات العشار. وبعد فترة الاحتضان والتي كانت 36 ساعة، تم تحليل كل عينة تحت الميكروسكوب.

إضافة إلى ذلك، فان كلا من المحلول المائي وعصارة الميثانول لمسحوق أزهار نبات العشار، أظهرت امتلاكها لنشاطات كدواء خارجي طارد لديدان الأمعاء (35). وبالاستناد على بيض الديدان السلكية الموجود في براز الغنم، أكدوا الباحثون نتائجهم هذه في أنبوبة اختبار: أعلى قيمة لتقليل البيض كانت بنسبة 88.4% في الأغنام المعالجة بوساطة CAE و 77.8% في الأغنام المعالجة بواسطة المسحوق الخام. والطريقة CME أثبتت إنها الأقل فعالية.

بالإضافة إلى المزيد من خصائص مبيدة للحشرات (36)، عصارة العشار العضوية أيضا لها أثار سامة على الخلاية. بالمقارنة مع المركب المرجعي cisplatin (IC50 0.9 mg/mL)، وضح .Smit et al أن عصارة كحول الايثانول (IC50 1.4 mg/mL) لها قدرة فعالة على منع النمو عندما تستخدم على الخلايا السرطانية COLO 320.

أكثر تحديدا كشفت تحاليل البيانات الطيفية للعصارة العضوية للنبات عن وجود الملح العضوي norditerpenyl و calotropterpenyl و pentacyclic triterpenoids وخلات calotropursenyl وخلات calotropfriedelenyl وكذلك كربونات عضوية تعرف باسم 2-propenyl-20-hydroxyethyl carbonate (37،38) الشكل 1.



الشكل 1. مخطط توضيحي يبين الإمكانيات الدوائية المختلفة لعصارة نبات العشار

4.1 الأنزيم المستخلص من نبات العشار Procerain

بالمزيد من طرق المعايرة والعمل على تحسين الظروف وضبطها، فان الخطوة القادمة هي تشخيص إمكانية تحضير أدوية من النبات وذلك من خلال عزل البروتينات والمركبات المهمة من الناحية الدوائية، وبالأخص تلك التي لها نشاط أنزيمي.

باستخدام الطرق الافتراضية، تعتبر النباتات مصادر غنية بالعديد من أنواع الأنزيمات المفككة proteases، تمكن من حماية النبات وتطوره، وتمكن من نضج الفواكه (39)، والاحتفاظ بالغذاء، وتحليل البذور المحفوظة التي تسمح بنموها (40)، وتنشيط الأنزيمات وكذلك التخلص من البروتينات الفاسدة (41). أنزيمات تفكيك البروتينات enzymes Proteolytic من مصادر النبات تعتبر مهمة جدا من ناحية الأبحاث الدوائية كما اثبت إنها تكون نشطة على مدى واسع من درجات الحرارة وpH (42). وبناء على ذلك، عدد مهم من هذه الأنزيمات تم عزله من الفواكه والبذور. ومن بين أهم هذه الـ cysteine وهو من عائلة الامينوأسيد، واحد من

خمس أنواع محفزات الأنزيمات المفككة proteases (43). وفيما يتعلق بأصناف Calotropis المختلفة، منذ العام 1979 فانه يعرف إن عصارة خشب Calotropis gigantean تحتوي على أربعة أنزيمات امينوأسيد، ما يعرف باسم Calotropin FI, FII, DI, DII (44). وحديثا، تمكن Dubey et al من اكتشاف نوع جديد من نبات العشار يعرف باسم procerain.

الأنزيم المستخلص من نبات العشار procerain تم عزله عن طريق استخدام 50% أمونيوم مقطر، وعصارة gumless تبعها عملية فصل لوني CM-sepharose و SPsepharose. خصائص كيميائية وفيزيائية مختلفة تم تحليلها: باستخدام التحليل الكهربي اكتشف متوسط M_r ما يعادل 28.8 kDa للأنزيم procerain، وبوضعه في مدى الكتلة الجزئية الشائعة وهي 20-35 kDa للأنزيم النباتي cysteine proteases. لم يتم تحديد كربوهيدرات بطريقة فينول حامض الكبريتيك (45) ولهذا فان هذا الأنزيم procerain يختلف عن glycoproteins. نقطة التوازن الكهربي هي 9.32، والتي تعرف بواسطة التركيز على جل بوليمر يعرف باسم polyacrylamide، وهذا يشير إلى تواجد بأغلبية للامينو اسيد الأساسي. التحليل الكامل للامينو أسيد كشف عن وجود 7 أنواع من الأنزيم cysteines، واحد منها حر والآخرون يشكلون disulfides (46)، و8 أحماض امينية متبلرة و 20 أنزيم. بالإضافة إلى نشاط أنزيم التفكيك proteolytic ضد الكثير من المركبات مثل casein, azocasein, azoalbumin, haemoglobin فان أنزيم procerain أيضا اظهر نشاط هيدروليكي ضد مركبات اصطناعية. النشاط الأنزيمي كان أفضل ما يمكن عندما كانت pH في المدى من 7.0 إلى 9.0 وكذلك أظهرت استقرار عالي بالنسبة لدرجة الحرارة، وهذا يجعلها مفيدة جدا كأداة في الصناعات الغذائية والدوائية.

5.1 منشط الـ Cardenolides

منذ الستينات من القرن الماضي كان معروفا إن المركب الرئيسي السام في نبات العشار قادرا على أن يسبب الوفاة في الثدييات عندما يصل إلى تركيز عالي، وهو أيضا منشط cardenolides (47). وكيميائيا فان cardenolides عبارة عن cardiac glycosides وقد تم تسميته بهذا الاسم بعد اكتشاف قدرته كمنشط ومؤثر على ضربات القلب، ويكون 5βH, 14β-hydroxy α, β-unsaturated γ-lactones والذي ينتشر بكثرة في النباتات. في العام 1983، كان Erdman أول من قاس المواد المغذية وتراكيز الـ cardenolide في عصارة نبات العشار (48). العديد من cardenolide عرفت: وهي ascleposide

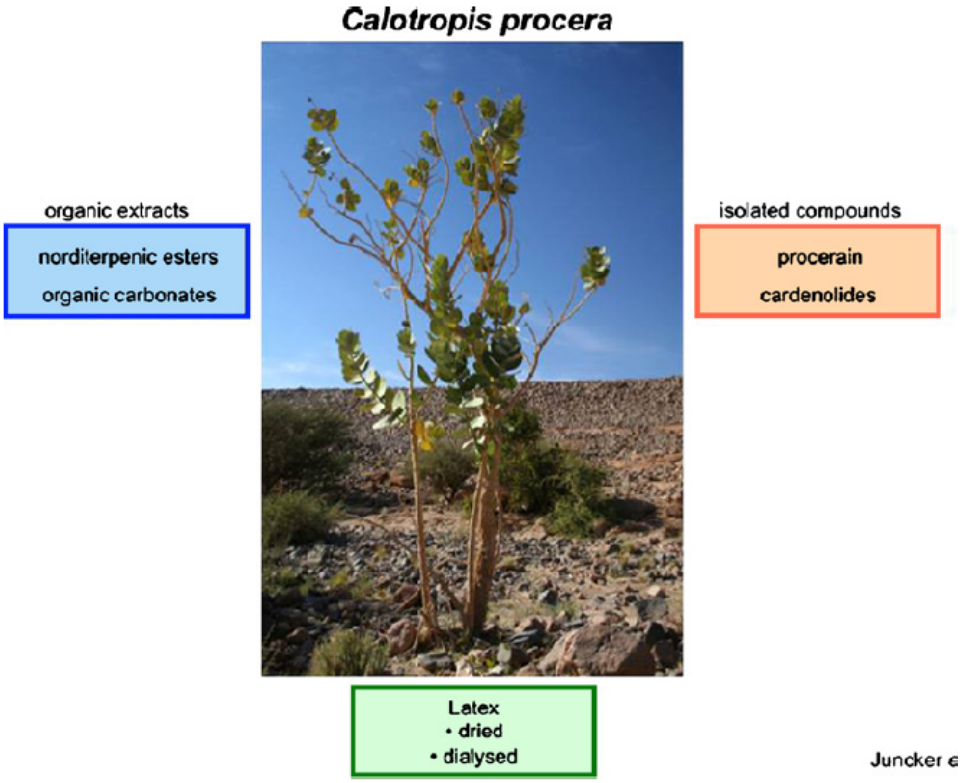
وcalactin و calotoxin و calotropin و calotropagenin و coroglaucigenin و proceroside و usharidin و uzarigenin. حديثا، وباستخدام aimto مع cardenolides كأداة محتملة مضادة للسرطان، قائمة جليكوسيدات cardiotonic التي وجدت في نبات العشار ازدادت بـ 2-oxovoruscharin 02 وvoruscharin المشتق (49). ولكن، نتيجة لسميتها العالية التي لوحظت على الفئران، فان التعديلات الكيميائية ضرورية لتحسين تجاوبها في داخل الجسم. ونتيجة التعديلات الكيميائية ظهرت المادة المعروفة بالاسم UNBS1450 01، والتي كان سميتها اقل وكذلك لوحظ زيادة في نشاطها العلاجي المضاد للسرطان (50).

الشكل 2. يعطي عرض مختصر لكيف يمكن أن يستخدم نبات العشار في علم العقاقير، إما بتطبيق طرق بسيطة لاستخلاص عصارة الشجر، أو بواسطة باستخدام طرق معقدة للحصول على مركب محدد وفصله مثل منشط cardenolides.

2. النشاط البيولوجي لمنشط cardenolides

1.2. تأثير منشط الـ cardenolides على مضخة الصوديوم

يعرف أنزيم Na,K-ATPase عادة بمضخة الصوديوم sodium pump وهو غشاء نباتي بروتيني متكامل له وظيفة كلا من الأنزيمات والنواقل: في الحالة المتطابقة E1، فان البروتين المتحول إلى فوسفات عضوي يرتبط مع ثلاثة خلايا بروتوبلازمية Na^+. هذه الايونات Na^+ تتحرر بعد ذلك في السائل خارج الخلية، ويتبادل مع ايونين K^+ ويتشكل الفوسفات (الحالة E2). مع التدرج في Na^+/K^+ وارتباطه في تنظيم الخلية الحيوانية، وفي منع موت الخلية، وفي التحكم في الغشاء النباتي، وفي pH وتحويل الطاقة اللازمة للانتقال الايوني، فان مضخة الصوديوم تعتبر مهمة جدا لحياة الخلية ولهذا فهي لها تواجد مطلق في الكثير من الخلايا المختلفة (51،52).



الشكل 2. مخطط يوضح نبات العشار ويبين الطرق الأساسية الثلاثة للاستخدامات الجوهرية للنبات في المستحضرات الدوائية

أنزيم Na,K-ATPase هو عبارة عن heterodimer يتشكل من وحدات فرعية α و β. الوحدة الفرعية α، لها كتلة جزيئية تساوي 106 kDa، وتحتوي على 10 أجزاء غشاء نباتي انتقالي (M) و 3 أنواع مختلفة من العصارة الخلوية، تعرف باسم مجال الرابط النووي domain nucleotide binding (N) وتربط ATP، والتحويل إلى فوسفات عضوي phosphorylation domain (P) ومجال التحريك actuator domain (A). والوحدة الفرعية glycosylated b لها كتلة جزيئية تساوي 40 kDa تحتوي على جزء واحد من الغشاء النباتي الانتقالي، ورابط خلوي قصير لتحفيز الوحدة الفرعية، الوحدة الفرعية β مطلوبة لنشوء الحياة وكذلك لنشاط أنزيم holoenzyme. وحدة فرعية ثالثة هي FXYD تربط كلا من α و β في بعض الأغشية.

جليكوسيدات القلب cardiac glycosides ذات التكون الداخلي أو الخارجي، على سبيل المثال منشط cardenolides، يعمل على ربط حلقات H1–H2, H3–H4, H5–H6 خارج الخلية مع الوحدة الفرعية المحفزة لمضخة الصوديوم. كما بينت الدراسة إن مركبات cardenolide مثبتة بقوة في الحالة E2 المطابقة للأنزيم، وهذا يقود إلى الخمول (53). المركب المعقد E2-phosphoenzyme-cardiotonic وجد انه

يتشكل بطريقة غير عكسية. مع العديد من قيم Kd، والمركبات المانعة من المحتمل أن تضمحل. الموانع للنواقل K^+ , Na^+ تؤدي إلى زيادة تركيز العصارة الخلوية للـ Na^+ ولهذا فهي تؤثر على الديناميكا الحرارية لمضخة التبادل بين Na^+ و Ca^{2+} والنتيجة النهائية زيادة في تركيز Ca^{2+} في النسيج الشبكي للعضلات (نقصان Na^+) (54).

على كل حال، دراسات حديثة اقترحت أن منع مضخة الصوديوم Na^+ ليس ضروريا للحصول على تأثير inotropic على myocytes (55). وبالتفاعل مع جليكوسيدات القلب، فان مضخة Na^+-K^+ المركبة أظهرت إنها تتفاعل كبوتين معقد وهو signalosome. العديد من مسارات الإشارات الواقعة ضمن الخلية البروتوبلازمية تستجيب لارتباط جليكوسيدات القلب، ويلعب Ca^{2+} دور المراسل الثانوي، و30-kinase phosphatidylinositide والبروتين kinase B يمكن أن ينشطا كذلك SRCEGFR-RAS-RAF-ERK. بهذه الطريقة، فان جليكوسيدات القلب يمكن أن تؤثر على توالد الخلايا، وتخليقها وأخيرا الموت المبرمج للخلايا (الشكل 3).

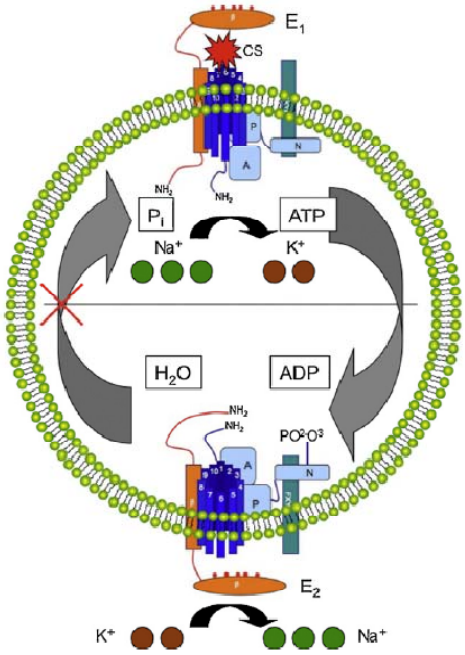
2.2 منشط الـ Cardenolide المشتق والعلاقة بين تركيبه ونشاطه

حديثا، تم عزل مركب Toxicaroside D 03 بواسطة فحص بيولوجي للايثانول المستخلص من ساق شجرة تعرف باسم Antiaris toxicaria في استراليا، وقد أظهرت منع لتكاثر الخلايا في العديد من خلايا سرطانية متنوعة مع 10 أنواع من منشط الـ cardenolides منقى من نفس المصدر. فيما يتعلق بعلاقة التركيب بالنشاط، فان نقصان للـ 19-CHO و glycosidation الأحادي لمجموعة الهيدروكسي-3 نتج عنه درجة عالية من السمية لأنواع مختلفة من الخلايا السرطانية بمقدار 2 و 100 على التوالي. بالمقارنة، فان عملية إدخال الهيدروكسيل OH للكربون 12 يعمل على تقليل الموت المبرمج للخلايا (56). على كل حال، فان المزيد من مجموعة الـ acetoxy لم تغير من درجة السمية cytotoxicity (57،58). هذه الملاحظات تم تأكيدها في نشرات علمية سابقة (57). إن التعديل في التركيب للوحدة الرئيسية مثل إضافة مجموعة كحول أو مجموعة ابوكسي عند C8 أو مضاعفة الرابطة بين C16 و C17 أدت إلى نقصان درجة السمية cytotoxicity (58). بالإضافة إلى ذلك فان Ueda et al. قام بعزل 15 منشط cardenolides من نبات

دوائي اسمه Streptocaulon juventas. هذه أثبتت إن di-glycosidation لم يتغير أو حتى لم يقل نشاطه. ولهذا فان مجموعات الهيدوركسيل عند C1 و C5 كانت مهمة للخاصية المضادة للتكاثر. هؤلاء الباحثون استنتجوا إن النشاط البيولوجي لمجموعة الـ cardenolides المعزولة تعتمد على امتصاص وحدات السكر للماء (hydrophilicity) والارتباط مع C3-OH لان الهيدروكسيل الحر C2’ و acetylating مركب C3’OH التي تقلل درجة السمية (57).

طور مجموعة الباحثين بقيادة O’Doherty طريقة التصنيع الاختيارية المزدوجة للعملية الأنزيمية (glycosylate) للـ aglycone والتي هي الوحدة المركزية للمنشط cardenolides. الدراسة المقارنة لتصنيع مشتقات الـ saccharide الأحادية والثنائية والثلاثية 07 – 05 للمركب الكيميائي digitoxigenin 04 بين أن في ارتباطه للـ saccharide الأحادي يعمل على زيادة نشاطه البيولوجي (59)، والذي يؤكد الدراسات السابقة الذكر بواسطة Yao و Kadota (56،57). والخصائص المضادة للتكاثر العالية للـ saccharide الثلاثي مشتقة من digoxin و gitoxin تؤكد هذه النتيجة (60). وبالتفصيل، فان المركز المزدوج عند C2’ لوحدة السكر تلعب دورا جوهريا في درجة السمية، حيث إن الـ epimers الغير طبيعية لمنشط cardenolides تفقد معظم نشاطها الخلوي ضد الخلايا السرطانية (61).

النشاط المضاد للتكاثر لمنشط الـ cardenolides اثبت انه ممكن على التعديلات الكيميائية للوحدة المركزية. وبالرغم من ذلك، فان إضافة وظيفة acetoxy لل C16 لم تغير الخواص الملحوظة، والمزيد من مجموعة الكحول عند C8، تعدل مجموعة الهيدروكسيل C14 أو تضاعف الرابطة المزدوجة بين C16 و C17 وهذا يؤدي إلى إنقاص النشاط المضاد للتكاثر (58).



الشكل 3. مخطط توضيحي لكبح الـ Na^+/K^+ ATPase بواسطة إستيروييد cardiotonic. حالتين مختلفتين متطابقتين معروفتين لـ Na^+/K^+ ATPase: في الحالة E1، تأثير أنزيم phosphorylation على النطاق P يمكن الترابط ضمن الخلية البروتوبلازمية لـ $3\ Na^+$ في عملية تحول إلى $2\ K^+$، وعليه فان هذا يؤدي إلى الحالة E2. وتحرر $3\ Na^+$ في السائل خارج الخلية حيث يتم استيراد عنصرين جديدين من K^+. ومن خلال عملية التحليل المائي، فان الأنزيمات المركبة تعود إلى الحالة E1 مع تحرير P_i. إستيروييد Cardiotonic مثل منشط cardenolides يصبح مرتبطا بشدة مع الحلقات خارج الخلية المختلفة (H1–H2, H3–H4, H5–H6) للأنزيمات مما يجعل التبادل الأيوني ممكنا أكثر.

ليس ضروريا أن يكون النشاط ضد التكاثر منخفضا للحصول على نتيجة عكسية للمقاومة متعددة للدواء multi-drug resistance (MDR) مثل الـ cardenolide، حتى يظهر درجة سمية عند تراكيز تصل إلى 77 mM، يمكن أن تؤدي إلى مقاومة متعددة للمساعد العكسي للسرطان ناتج عن تراكم calcein في المقاومة المتعددة للدواء في الخلايا السرطانية في المبيض 2780AD (58). هذا المركب تم عزله أولا بواسطة Neumann وتم تحديد تركيبه بواسطة فريق بحثي بقيادة Reichstein و Yamauchi (61-64) (الشكل 4 و 5).

ومن الشيق والمهم، في هذه الحالة إن تصنيع 02 200-oxovoruscharin، والذي هو تقليل وظيفة الكاربوكسيل في الكحول الأساسي لم يعطي زيادة في درجة السمية ولكن في حالة السمية الداخلية قل بمعامل 10 (49) (الشكل 4). التصميم الجديد للأدوية مضادة السرطان اشتقت من منتجات طبيعية لازالت قيد

التطوير للحصول على أدوية سرطان فعالة. وهذه لازالت بحاجة إلى المزيد من الجهود والأبحاث لدراسة موانع مضخات الصوديوم الطبيعية.

3.2 النشاط العلاجي لمنشط الـ cardenolides

مع مشاكل القلب المزمنة فان هناك مشكلة صحية في المجتمع العصري، وهناك ضرورة ملحة لأدوية علاجية جديدة. ووفقا لمعرفة اليوم، فان ارتفاع ضغط الدم ومشاكل الشريان التاجي تعتبر من الأسباب الرئيسية لأمراض فشل القلب. والتعرض المستمر لتركيز مرتفع من ضغط الدم ينتج هرمون مثل الأدرنالين يؤدي كلا من أمراض في القلب وخلل كهربي في التركيب الجزيئي على سبيل المثال يؤثر على مستقبلات هرمون التوتر، عن طريق تغير سمة البروتين G، بتقليل قناة K^+ وزيادة مضخات $Na+/Ca^{2+}$، وهذا يقلل بشكل كبير تركيز Ca^{2+} intrasarcoplasmic (65).

النمو الخارجي مثل الجدران والنمو الداخلي مثل دواء جليكوسيدات لعلاج أمراض القلب تعمل طبقا لـ Na^+-Lag hypothesis: كما لوحظ من قبل، منع جزئي لمضخة Na^+–K^+ بواسطة عقار جليوسيدات القلب وينتج عنها زيادة في تركيز Na^+ مما يؤدي إلى زيادة في تركيز Ca^{2+} وهذا يسبب زيادة في ضخ الدم بواسطة القلب. بعض الفقاريات ذات التطور الطبيعي تنتج عقار جليكوسيدات القلب مع ستيرويد، يعرف باسم cardenolides Ouabain و Digoxin وكذلك Marinobufagenin Bufadienolides وTelocinobufagin و 19-Norbufalin. إضافة إلى ذلك، ومنذ التسعينات هناك زيادة في الاهتمام في الدور الممكن لمضخات الصوديوم في زيادة وتوسيع الشرايين والأوعية (66). في تجربة خارجية على مزرعة لفحص الإشارة الكهربية، فان كبح الـ Na^+,K^+-ATPases بواسطة مركبات cardiotonic مثل ouabain أدى إلى زيادة في الانقباض والزيادة في تكوين البروتين والنمو الاستجابة المبكرة لعملية proto-oncogene، ونشاط معامل الاستنساخ AP-1 و NF-kB وهذا يشرح فائدة منشطات نبضات القلب، وكذلك تأثير منشط cardiotonic على فشل القلب. وبالرغم من انه عقار قديم في طب الأوعية الدموية، إلا أن منشط نبضات القلب digitalis لا زالت تستخدم في علاج أمراض القلب.

وبسبب إن المنشط cardiotonic يوجه طريق الإشارة، فان العديد من جليوسيدات القلب التي تتكون في داخل الجسم تحتوي على فئة جديدة من هرمونات الستيرويد، ينظم ضغط الدم، والشد في الأوعية وإطلاق الأنسولين.

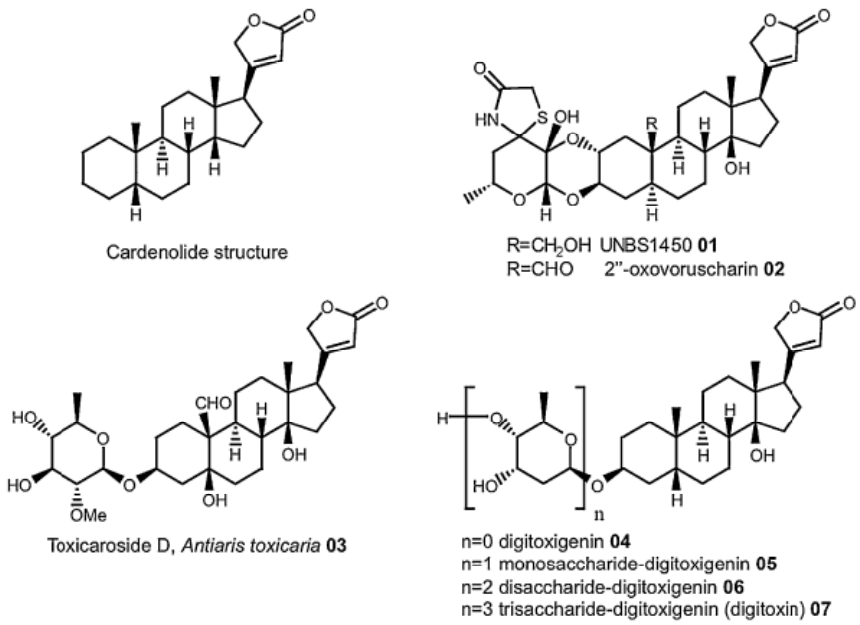
لان هناك إثبات إن دواء علاج الاحتقان القلبي قد يؤثر على تكاثر الخلايا وتوليدها وبالتالي فان الخلايا السرطانية تزيد من نشاط NA^+ و K^+، ولهذا فان هناك دراسات إضافية تحاول فهم تأثير دواء علاج الاحتقان القلبي على نمو الخلايا السرطانية. في العام 2001، اكتشف Stenkvist نقصان معدل الموت (6% مقابل 34%) لحالات مرضى الإصابة بسرطان الثدي عندما تمت معالجتهم لمدة طويلة (22 عام) باستخدام digitalis glycosides (67). وفي نفس السياق، فان مرض اللوكيميا اظهر انه اقل حدوثا في مجموعة المرضى المعالجين بدواء الاحتقان القلبي cardiac glycosides لمرض فشل القلب. كذلك كلا من bufalin و bufadienolide cardiac glycoside استخدموا لفترات طويلة كدواء في الصين لعلاج اللوكيميا و hepatocarcinom . وفي غضون ذلك، الكثير من الدراسات تشير إلى أن دواء الاحتقان القلبي قادرا على أن يمنع الخلايا السرطانية من النوع G_2/M (68،69). ولمزيد من تقييم تأثير نسبة السمية في دواء علاج احتقان القلب، فانه من المهم جدا تطوير noncardiotonic (علاج لا يزيد نبضات القلب) للجلوسيدات القلبية. لذلك فان UNBS1450 01 و 02 2-oxovoruscharin يعتبران من احد مركبات non-cardiotonic، والذي وصف في عام 2005، والذي دخل الطور I للتجارب الطبية (الجدول 1).

3. UNBS1450 ونشاطه المضاد للسرطان

1.3 تأثير UNBS1450 على أنزيمات Na^+K^+-ATPase

عديد من أشكال الأنزيمات تعرف بـ Na^+,K^+-ATPases، تعتمد على نوع الأغشية والخلايا: بروتين isoforms 4α و 3β تم التعرف عليهما حتى الآن، وحتى يومنا هذا، عدد متزايد من سمات الوحدات الفرعية لـ α1 ارتبطت مع النماذج الإكلينيكية لخلايا سرطان الرئة (NSCLC) و glioblastoma (70،71). ولكلا الدراستين، مضخة كبح الصوديوم سوف تنجز باستخدام نظام بروتين heterologous. وفي ضوء الاستفادة من إنتاج كميات كبيرة من إعادة الارتباط بين Na^+/K^+-ATPases و baculovirus-

transfected في خلايا حشرة Sf-9 تعطي أنزيمات α1β1 و α2β1 و α3β1 استخدموا لتحليل قدارت الكبح للعديد من الـ cardenolides، من بينها UNBS1450 01. وعندما قورنت كلا من ouabain و digoxin بينت UNBS1450 01 إن لها اكبر تأثير كبح لمضخة Na^+/K^+-ATPase. ومقدار ضئيل من α3β1 كان الأكثر تأثرا بكبح UNBS1450،



الشكل 4. التركيب الكيميائي لمقطع صغير لمضخة كبح صوديوم طبيعية ومماثلها.

مع تحديد K_i بـ 3.2 nM. الأنزيمات α2β1 و α1β1 أيضا كبحا بواسطة UNBS1450 01، ولكن بشكل اقل، مع قيم K_i 15 و 160±70 nM على التوالي. وبالمقارنة مع cardenolides الكلاسيكي، فرع السكر المزدوج الارتباط وكذلك تركيب ستيوريد transconformational يبدو انه يكبح بقوة أكثر في UNBS1450 01، مما يجعل هذا الـ cardenolide ذو أهمية خاصة للمزيد من دراسات مضادات السرطان المعتمدة على تكاثر الخلايا المعدل، وتوالد الخلايا وموتها بواسطة كبح مضخة الصوديوم الموجه بالإشارة.

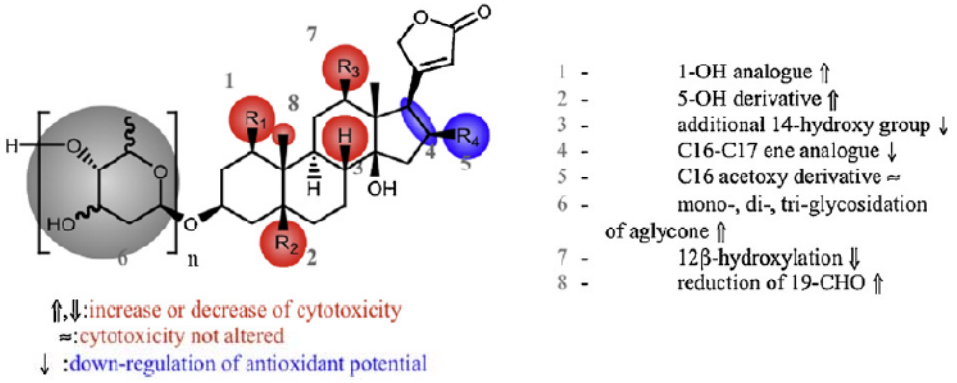
وبناءا على الاكتشافات الحديثة، فان مضخة الصوديوم الموجه بإشارات UNBS1450 01 تؤدي إلى إفساد الهيكل الخلوي الأكتيني، وزيادة موت الخلية، وعدم تفعيل NF-kB و تعديل عام على شكل نواة الخلية.

2.3 التأثير على تحويل إشارات NF-kB

كما هو في العديد من الخلايا السرطانية، A549، وخلايا سرطان الرئة، تظهر سلسلة من التغيرات الكيميائية الأساسية في NF-kB، ولهذا تصبح قادرة على الهرب من الموت المبرمج للخلايا، والموت الموضعي للخلايا، والالتهام الذاتي، والشيخوخة، والانقسام المفاجئ (72). تنشيط NF-kB يعزز من تطوير دواء متعدد مقاوم للسرطان.

لقد كان .Mijatovic et al من بين الأوائل الذين تحققوا من إمكانية كبح ستيرويبيدات cardiotonic الممكنة وبالأخص الـ cardenolides على تنشيط NF-kB (73). في بحثهم هذا استخدموا نوع جديد هو 2-oxovoruscharin 02 وهو مركب جديد تعرفوا عليه في نبات العشار وتم عزله بواسطة كروماتوغرافيا السوائل من الميثانول في لحاء جذر نبات العشار. بالمقارنة مع cardenolides، فان المركب المعدل كيميائيا 2-oxovoruscharin والذي يعرف بالاسم UNBS1450 01 يظهر سكر ذو ارتباط مزدوج واستيروييد.

في النتيجة الأولية، تمكنوا من إظهار إن UNBS1450 01 قادرا على التأثير على نشاط NF-kB في خلايا جسم الإنسان A549. وفي الحقيقة، بعد 24 ساعة معالجة بواسطة UNBS1450 01 بتركيز قدره 10nM، كان كافيا ليشير إلى التراكم المستحث لـ I-kBβ، ولكن ليس لـ I-kBα. وتحول الفوسفات انخفض بعد 4-8 ساعات بعد المعالجة. كما انخفض أيضا البروتين المشفر بجين cdc34 هو أنزيم مرتبط في I-kBα. المزيد من الارتباط في NF-kB وكذلك في الجينات المراسلة NF-kB أكدت على قدرة الـ UNBS1450 01 على كبح الخلايا السرطانية A549. ثانيا، دراسات تمهيدية كشفت عن زيادة في بقاء A549 orthotopic xenograft في فأر عندما تم معالجته بتراكيز مختلفة من لجرعات من UNBS1450 01.



الشكل 5. دراسات حول علاقة التركيب مع النشاط (SAR) على كباحات مضخات الصوديوم الطبيعية. ملخص نتائج علاقة التركيب مع النشاط لمضخات الصوديوم الطبيعية ومشتقاتها بالتركيز على الخصائص السمية لمضادات السرطان ومضادات الأكسدة. الـ pharmacophores تم التعرف عليه أثناء الدراسة وهو موضح بالألوان (49, 56-64)

الجدول 1
منشط الـ cardenolides المحضر داخليا والمحضر خارجيا ونشاطهما الدوائي

Digoxin Marinobufagenin 19-Norbufalin Ouabain Telocinobufagin	Partial inhibition of the Na^+–K^+ pump leading to increased intracellular Ca^{2+} concentrations; increased contractility and metabolism in myocytes *in vitro*	Endogenous
Bufalin	Beneficial effect in hepatocarcinoma and leukemia treatment	Exogenous
Digitalis	Still in use for heart failure treatments	
UNBS1450	One of the first non-cardiotonic cardenolides; promising anti-cancer potentials	

3.3 تأثير UNBS1450 على تكاثر الخلية والسرطان

بالبدء مع التجارب في 2005 على مضادات التكاثر خارج الخلية الحية، قام Van Quaquebeke et al. بتحليل مستويات سمية الخلية للعديد من منشطات cardenolides، من بينها UNBS1450 01، على 57 شخص مصاب بالسرطان، ولكل متوسط مجموعة تم تعيين قيمة IC_{50} بواسطة تجارب MTT بعد 72 ساعة من الاحتواء. وكمرجع دوائي، تم اختيار كابح tubulin (taxol) وكابح topoisomerase I (SN-38). بالاهتمام والتركيز على الحساسية الخاصة لكل شخص مصاب، فان اختلاف واضح تم ملاحظته بين UNBS1450 01 و taxol و SN-38 وهذا يقترح وجود أكثر من طريقة لمكافحة الأورام السرطانية

لـ UNBS1450 01. ومن حيث متوسط النمو لكبح، فإن UNBS1450 01 اثبت انه فعال مثل taxol، بمتوسط IC_{50} يساوي 2.7 nM لـ UNBS1450 01 و 2.5 nM لـ taxol. أما SN-38 كانت فعاليته منخفضة. إضافة إلى ذلك، عندما تعرض المصابين لجرعة دوائية متعددة مقاومة لسرطان المثانة، اظهر UNBS1450 01 قدرة كبيرة على كبح نمو الخلايا: كلا من vincristine و adriamycin المقاومة للخلايا السرطانية تجبر taxol للوصول إلى تركيز 10,000 nM ليصبح سام للخلايا في حين إن UNBS1450 01 يصبح فعالا عند 45 nM. وتكملة لهذه النتائج، فإن UNBS1450 01 اظهر أيضا تأثيرات سمية على جرذان مصاب بسرطان glioma الذي يصيب الدماغ والحبل الشوكي، فأر مصاب بسرطان وورم في الخلايا ولكن تأثيره إلى حد اقل بكثير عند مقارنته بـ UNBS1450 01 على السرطان الذي يصيب البشر. هذه الميزة يمكن أن ترتبط بالتحول المزدوج الملاحظ على الوحدات الفرعية α1 لمضخة الصوديوم للقوارض.

وحديثا، هذه الملاحظات تم التأكد منها: حيث إن UNBS1450 01 قادرا أيضا على كبح النمو الخارجي للخلايا السرطانية A549 كذلك نمو وهجرة خلايا glioblastoma التي تصيب الدماغ والحبل الشوكي.

كذلك تم التحقق من نشاط مضاد السرطان للمنشط UNBS1450 بواسطة تحاليل نمو الخلايا السرطانية في نماذج xenograft (عملية جراحة تشمل تطعيم الانسجة). بصفة عامة، عن طريق إدخال UNBS1450 01 بشكل مستمر في فأر مصاب بسرطان الرئة وسرطان الدماغ والحبل الشوكي، تم تحديد درجة السمية لمركب منشط ستيرويد cardenolide بواسطة إدخاله في التجويف البطني أو بوساطة الحقن. في كلا الحالتين، فان أقصى جرعة مسموح بها (MTD) تم تقديرها مسبقا بدقة في فأر صحي. عند مقارنة بالمنشطات الكلاسيكية مثل ouabain و digoxin كذلك الجديدة منها مثل 2-oxovoruscharin 02 و UNBS1450 01 أظهرت زيادة كبيرة في قيم MTD: فمثلا لـ ouabain و digoxin فان قيم MTD كانت 5 و 10 mg/kg على التوالي، في حين قيم MTD لـ UNBS1450 01 ازدادت لقيمة 120 mg/kg. وكنتيجة لذلك، لوحظ في حالة استخدام UNBS1450 01 بصورة مستمرة ولتراكيز مختلفة، قلت MTD من 32 إلى 8 أضعاف (73). ومن الشيق، أن UNBS1450 01 عند تراكيز من 5 إلى 20 mg/kg أثبتت على إنها قادرة على زيادة فترة بقاء الفئران المطعمة. وفي الفئران تحت التجربة، فان فترة 20 يوم كافية لتحدث انخفاض في تعداد الفئران بنسبة 45%. وبالمقارنة، الفأر الذي استخدم 10 mg/kg من UNBS1450 01 لمدة 12 مرة متواصلة اظهر أحسن النتائج، مع انخفاض في التعداد وصل إلى 45% بعد

مرور 40 يوم. تراكيز أعلى (20 mg/kg) تبدو اقل تشجيعا لان الناتج كان اقل من المرجو بالمقارنة مع 10 mg/kg، وهذا من المحتمل يعود إلى وجود تأثيرات سامة خفيفة.

نتائج مقارنة تم الحصول عليها وجدت إنها تتطلب زيادة في جرعات UNBS1450 01. وامتصاص UNBS1450 01 عن طريق الفم عند 80 mg/kg زاد بشكل ملحوظ فترة بقاء الفئران. في حين إن 50% من حاجز فترة البقاء انكسر بعد 20 يوم في حالة الفئران المطعمة بخلايا سرطانية مسبقا، وباستخدام 80 mg/kg من UNBS1450 01 وهذه الحالة تم تأجيلها لفترة 40 يوم. والتشخيص الأساسي للعديد من الخلايا السرطانية هو درجة هجوميتهم، فخلايا سرطان الدماغ والحبل الشوكي على سبيل المثال نشطة، (ذات اندفاع ذاتي)، قادرة على مهاجمة خلايا الدماغ بتعديل الشكل والحجم (74). اليوم فانه يعتقد أن الانتقال الأيوني يلعب دورا هاماً في تمكين خلايا السرطان من الهجرة (75). وحتى وقت قريب جدا، تأثير أنزيم Na^+,K^+-ATPase على هجرة الخلايا السرطانية لازال غير مفهوم. في بداية العام 2008، حاول الباحث Lefranc et al من إنشاء ربط بين هجوم خلايا سرطان الدماغ ومضخة الصوديوم واستخدام المنشطات cardenolide (71). في البداية، وضحوا في خلايا سرطان الدماغ البشري أن الوحدات الفرعية α1 لأنزيم Na^+,K^+-ATPase زاد تأثيره عند مقارنته مع أنسجة دماغ بشري طبيعي. باستخدام التحصين بالبقع اللونية، تمكنوا من توضيح أن الوحدات الفرعية α1 تلونت بـ caveolin-1 في بروزات السيتوبلازما لخلايا الدماغ السرطانية U373-MG.

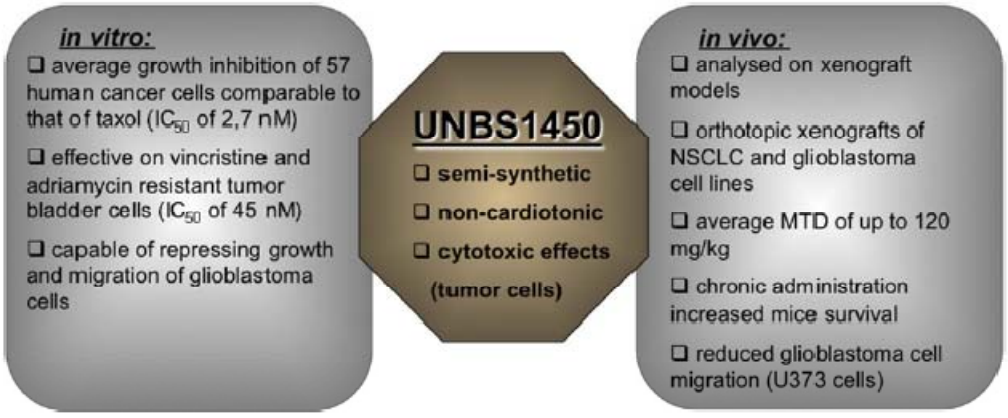
إضافة إلى ذلك، فان UNBS1450 01 كان قادرا على أن يبذل تأثير سام على خلايا الإنسان السرطانية U373-MG، وهذا كان صحيحا أيضا لخلايا الجرذان السرطانية C6، ولكن بشكل اقل إلى حدا ما. وبخصوص U373-MG، فان تراكيز حول 100 nM جعلت بقاء الخلية تقريبا مستحيلا. لخلايا الجرذان C9، فان ouabain كان غير مجديا في حين أن تراكيز عالية وصلت إلى 10 mM كانت لازمة لكي تقضي على حياة الخلية. تم اقتراح دراسة تأثير UNBS1450 01 على تركيز الخلايا البينية ATP في الخلايا السرطانية للدماغ. وفيما بعد استخدم الكمبيوتر في إجراء تحليلات باستخدام تقنية ميكروسكوب تعزيز تباين الطور وهذا أعطى تصور أوضح لتكاثر الخلايا وشكلها وقابليتها للحركة كذلك على التوازن الأيوني. لقد اكتشفوا انه في وجود 10 nM من UNBS1450 01، إن الخلايا U373 قادرة للتعرض إلى انقسام غير مباشر، ولكنها فشلت في أن تنقسم إلى خلايا ابنة وتشكل lamellipodia. ومع ذلك، فان الملاحظ، هو أن الشكل الدوراني لخلايا U373 تبقى حية لعدة أيام (بقع الميتوكوندريا). ولكن، خلافا للفرضية المحتملة، فان استخدام 10 nM من UNBS1450 01 لم ينتج عنه زيادة في تركيز Ca^{2+} ولم ينتج

عنه أيضا زيادة في تركيز Na^+، والتي عند نفس الوقت تحتوي على واحد من أهم الميزات لـ UNBS1450 عندما نقارنه مع منشطات قلب أخرى مثل digitalis. زيادة الخلايا البينية Ca^{2+} تسبب في عدم انتظام النبض في الأشخاص الأصحاء. والتغيرات الملاحظة كانت من المحتمل ناتجة عن التعديل الغير معكوس للهيكل الخلوي الاكتيني، وهذا يشرح نقصان قدرة الهجرة في خلايا سرطان glioblastoma (الشكل 6).

4.3 UNBS1450 المسبب لوفاة الخلية

1.4.3 بواسطة موت الخلايا المبرمج

أفادت البحوث العلمية أن جليكوسيدات سيروييد القلب لها إمكانية أن تسبب موت الخلية بواسطة الموت المبرمج للخلية. على سبيل المثال لوحظ في الفحوصات خارج الخلية إن هناك خلايا لوكيميا مختلفة مثل THP-1 (76)، و K562 (77)، HL-60، و U937 و ML1 (78) تتعرض لموت مبرمج عند معالجتها بواسطة تراكيز مختلفة من Bufalin أو Digoxin. ولكن، عند معالجتها بجرعات قليلة بقدر نانومولر لجليكوسيدات القلب، فإنها من المحتمل أن يكون لها الأولوية لان تستحث عملية التكاثر والتخليق. ويعتقد أن تركيز في حدود نانومولر تؤدي إلى اهتزازات ذات ترددات منخفضة لتركيز Ca^{2+} وهذا يؤدي إلى تفعيل NF-kB وحمايتها ضد عملية الموت المبرمج في حين إن تراكيز عالية سوف تؤدي إلى موت مبرمج للخلايا نتيجة لتحمل مستويات عالية من Na^+ و Ca^{2+} (79).



الشكل 6. التأثيرات الداخلية والخارجية لـ UNBS1450

بالمقارنة مع الكثير من استيروييدات القلب الأخرى، فان UNBS1450 01 لا يبدوا انه يسبب موت للخلية بواسطة الموت المبرمج بتأثير خارجي، على الأقل عند العمل مع خلية لزجة. وعلى حد علمنا، فان الدارسات بالكامل على UNBS1450 كمضاد للتكاثر ومضاد لنشاط السرطان أجريت على خلايا سرطانية صلبة. إثارة UNBS1450 01 بين أن هذا يسبب في موت غير مبرمج للخلايا (71،80).

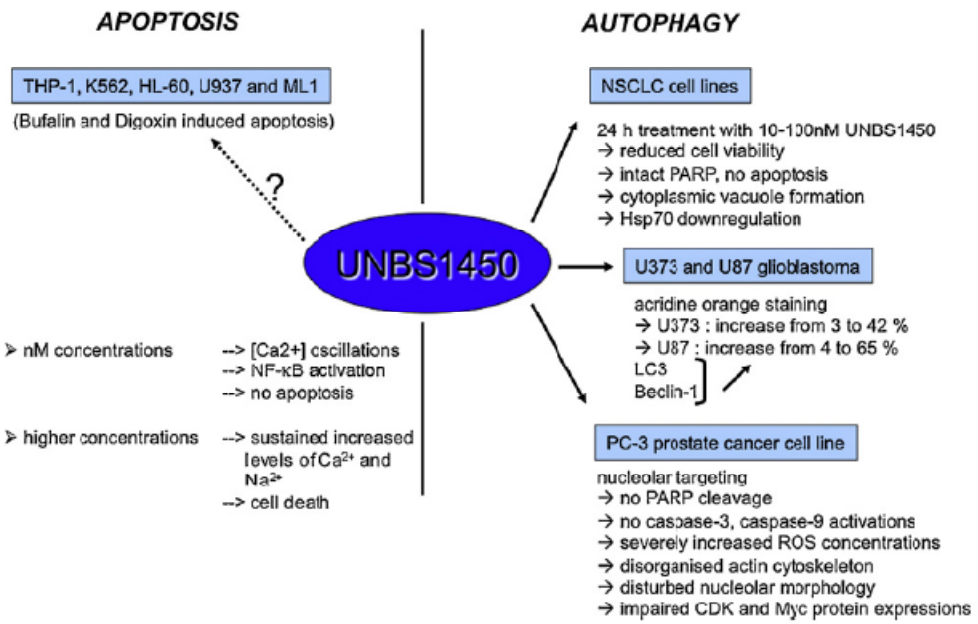
2.4.3 بواسطة الالتهام الذاتي

دراسات حديثة أجريت على UNBS1450 المسبب لموت الخلايا ادعت أن تأثير الالتهام الذاتي مسئولا عن تسمم الخلايا (71). وقد أفيد انه خلال الالتهام الذاتي، بالإضافة إلى الموت المبرمج، فان عملية أو عمليتين تدمير ذاتي تحدث، والأجزاء بين الخلايا تكون محصورة في صفة مزدوجة أو تجويف غشاء حيوي متعدد والذي في النهاية يندمج مع أنزيمات هاضمة lysosomes وهذا يؤدي إلى الانحلال (81). بالإضافة إلى الموت المبرمج فان الالتهام الذاتي للخلية لديه هدف وهو التخلص من الخلايا الغير ضرورية، والفاسدة والمعمرة منها مثل الميتاكونديريا والاندوبلازما. علاوة على ذلك، كونه ارتبط بالجزئيات الماكروية فإن عملية هدم الخلية الحية والالتهام الذاتي يساعد الخلايا على التغلب على حالات الإجهاد، وهذا يجنب موت الخلية المحتمل بوساطة الموت المبرمج على سبيل المثال. بالاعتماد على هذه الحالة فان الالتهام الذاتي في بعض الأحيان تحتوي على طرق بديلة للموت المبرمج، ففي بعض الأحيان تكون هناك إمكانية للهرب من الموت المبرمج.

في العام 2006، دراسات أولية تشير إلى أن UNBS1450 يسبب التهام ذاتي في الخلايا (80). بالعمل على خلايا NSCLC، فان موت الخلية في الحقيقة يكون مناسبا بعد المعالجة باستخدام UNBS1450 01: معالجة لمدة 24 ساعة باستخدام 100 nM من UNBS1450 01 يقلل من قابلية الخلية للحياة بمقدار 70%، عندما تزيد عملية المعالجة إلى 72 ساعة، و10 nM كانت كافية للحصول على نفس النتائج. وبناء على ذلك فان تحليل انقسام PARP يسمح باستثناء موت الخلية من خلال الموت المبرمج، كلما كانت بقايا PARP سليمة. وكعمل متمم استخدمت طريقة Tunel assays (وسيلة للكشف عن تفتيت الحمض النووي) لإثبات غياب موت الخلية المبرمج. كشف تحليل دورة الخلية زيادة في نسبة الخلايا في الطور S والطور G_2 حيث الصور الميكروسكوبية تظهر بوضوح تكون تجويف سيتوبلازما حاد. بالإضافة إلى ذلك فان Mijatovic et al أوضح أن UNBS1450 01 يتسبب في أن يكون Hsp70 خارج المألوف وعليه يمكن

ان يتكون lysosomal membrane permeabilization، الكابح النموذجي في خلايا سرطان الرئة عن طريق رفع مستوى Hsp70 والذي يحتوي على وظيفة البقاء. Lysosomal permeabilization هو مؤشر معروف لموت الخلايا بواسطة الالتهام الذاتي، هذه الاكتشافات في 2006 عملت على تدعيم فرضية عدم الموت المبرمج للخلايا بواسطة الالتهام الذاتي في الخلايا السرطانية المعالجة بـ UNBS1450.

بنفس المنطق فان UNBS1450 01 تم تحديده إلى موت الخلايا المسبب من خلال الالتهام الذاتي في خلايا سرطانية لعدة أشخاص (71). في الخطوة الأولى، بقعة من المركب العضوي acridine البرتقالي استخدم لتقدير المركب العضوي والذي وفرته مرتبطة بقوة في الالتهام الذاتي. في الحقيقة، وجود نانومولار من UNBS1450 01 يزيد كثيرا البقع في خلايا U373-MG و U87-MG (من 3 إلى 42 ومن 4 إلى 65%). وفي نفس الوقت، فان LC3 و beclin-1 عبارة عن علامات للالتهام الذاتي المخصص. والذين وجد إنهما يحفزا بواسطة UNBS1450 01



الشكل 7 الموت المبرمج والالتهام الذاتي للخلية الناتج بسبب UNBS1450

بجانب سرطان الرئة وخلايا سرطان الدماغ، فان UNBS1450 01 وجد انه يسبب التهام ذاتي لخلايا سرطان البروستاتا بواسطة استهداف النوية nucleolar (82). في الحقيقة فعالية UNBS1450 01 لكبح نمو خلايا سرطان البروستاتا PC-3 عند 100 nM، بدون تنشيط caspase-3 و caspase-9 وانشقاق PARP. تركيز Ca^{2+} لم يحدث لها تغير، بالمقارنة مع ROS. ليس فقط أن UNBS1450 01 (10 و 100 nM) يزيد بشكل كبير إنتاج ROS، وقد كشفت تقنية ميكروسكوب تباين الطور باستخدام الكمبيوتر مرة أخرى يفسد بالكامل نظام actin cytoskeleton كما لوحظ هذا من قبل وتشويه شكل توزيع النوية. يحتوي مجال النوية على موقع الرايبوزوم وهذا لا غنى عنه لبقاء الخلية. لقد أفادت البحوث إن مناطق النوية ذات أهمية كبيرة في خلايا السرطان كما إنها أثبتت إن الخلايا السرطانية تحتجز الورم، مثل p53 و MYC، داخل النوية. الضعف الملحوظ لبروتين CDK و Myc يمكن أن يكون وسيلة لتشويه النويات ويسبب التهام ذاتي (الشكل 7).

4. الاستنتاج

بأخذ كل النتائج مع بعض فان هذه النتائج تقترح تركيب مبتكر هو cardenolide hemisynthetic UNBS1450 01 من نبات العشار قادرا على إخماد تكاثر الخلية السرطانية كما ويسبب موتها. وبالرغم من حقيقة أن التأثيرات المفيدة للنباتات على الكثير من أقسام علم الأمراض التي عرفت على مر العصور، فان الاكتشاف الحقيقي لازال قادما. كلا من كامل العصارة والعصارة العضوية، أثبتت أهميتها في علاج الكثير من الحالات المرضية، وفقط حديثا كشفت الأبحاث المتقدمة عن الإمكانية الحقيقية في نبات العشار. وبواسطة التعديل الكيميائي فان عزل cardenolide من النبات الاستوائي، اكتشف الباحثون مع UNBS1450 01 سلاح قوي وفعال وواعد في مجال علاج السرطان.

بالمقابل فان العديد من مستحضرات مضادات السرطان UNBS1450 01 لا يسبب موت مبرمج للخلايا ولكن التهام ذاتي، على الأقل في خلايا الأورام الصلبة. وبشكل أساسي عن طريق تثبيط NF-kB، وتنظيم Hsp70 وتعديل التركيب النووي، UNBS1450 01 يؤدي إلى تكون حويصلة، تعمل على إضعاف الخلية وموتها.

المزيد من الأبحاث وبالأخص فيما يتعلق بأهمية استخدامه في علاج اللوكيميا لازال بحاجة إلى المزيد من البحث.

تمت الترجمة في

المركز العلمي للترجمة

www.trgma.com

2009-9-28