



جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

**التأثير السمي والمناعي لبعض مكونات العكبر المحلي المنقاة جزئياً على خط
خلايا سرطان الرئة البشري A549**

اطروحة مقدمة إلى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل درجة
الدكتوراه فلسفة في علوم الحياة - علم الحيوان

كتبت بواسطة:

علي نصير زيدي البلداوي

بإشراف:

أ.م.د. هيام عبد الرضا كريم العواد

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ

﴿يَا أَيُّهَا الَّذِينَ آمَنُوا إِذَا قِيلَ لَكُمْ تَفَسَّحُوا فِي

الْمَجَالِسِ فَافْسَحُوا يَفْسَحِ اللَّهُ لَكُمْ وَإِذَا قِيلَ انشُرُوا

فَانشُرُوا يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ

دَرَجَاتٍ وَاللَّهُ بِمَا تَعْمَلُونَ خَبِيرٌ﴾

صَدَقَ اللَّهُ الْعَلِيِّ الْعَظِيمِ

الاهداء

إلى سيد الشهداء وأبي الأحرار، إلى ابن أمير المؤمنين وسيد الوصيين الإمام الحسين بن علي (عليهما السلام)

إلى من قال السيابُ مجته عراق . . . عراق . . . ليس سوى عراق . . . اليك يا وطني العظيم

إلى من ضمّدوا جراحات الوطن، إلى رمز التضحية والإيثار اليكم يا شهداء العراق

إلى من اسمه لا يفارق اسمي، إلى من شجعني على المثابرة طوال عمري ووضعني على طريق العلم والمعرفة، إلى

صاحب القلب الكبير، إلى الرجل الأبرز في حياتي اليك يا والدي الحبيب

إلى ينبوع الحب والوفاء، إلى التي لم تدّخر جهداً في سبيل أسعادي، إلى ذات الصدر الحنون الذي كان ظلاً بارداً في

هجير الحياة، إلى من بها اعلو وعليها ارتكز، إلى صاحبة الحبل السري الذي لا زال أثره باقياً في حتى الآن

اليك وحدك والذتي الحبيبة

إلى المرأة المعجزة التي تجعل كل شيء ممكناً بصبرها ودعمها، إلى رفيقة روحي، إلى المرأة التي وقفت إلى جانبي في

طريقي إلى النجاح، إلى التي صنعت إيامي وكللتها بالجمال اليك تلك الكلمات زوجتي العظيمة

إلى من يبعث وجوده الامن والطمأنينة في نفسي، إلى سندي في الحياة، إلى ملاذي ورمز فخري واعتزازي، فأنا منك

وانت مني اليك يا اخي الغالي

إلى كل طالب علم مجتهد وطموح

اليكم أهدي ثمرة هذا الجهد المتواضع

الباحث

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على أشرف الأنبياء والمرسلين، نبينا محمد وعلى آله وصحبه أجمعين، ومن تبعهم بإحسان إلى يوم الدين، انطلاقاً من قول الله تعالى (وَمَنْ يَشْكُرْ فَإِنَّمَا يَشْكُرُ لِنَفْسِهِ) صدق الله العلي العظيم، فأني اسجد إلى الله عز وجل شاكراً لجلاله وعظمته على ما أمدني به من نعمة الصبر والتوفيق في إتمام هذه الأطروحة على هذه الصورة، فله الحمد والشكر أولاً وآخراً وظاهراً وباطناً.

أتقدم بأسمى آيات الشكر والتقدير والعرفان وعظيم الامتنان إلى مشرفتي الفاضلة الأستاذة المساعدة الدكتورة (هيام عبد الرضا كريم العواد) التي منحتني شرف نبلي شهادة الدكتوراه حين تكرمت سيادتها بقبول الإشراف على هذه الأطروحة، وشرفت بإشرافها الذي طالما حسدت عليه من الجميع، فكانت خير مثال لتواضع العلماء، فأدام الله عليها الصحة، وزادها علماً ورفعةً في الدنيا والآخرة إنه سميعٌ مجيب. كما أتقدم بالشكر الجزيل إلى رئاسة جامعة كربلاء لإتاحتها الفرصة لي لإكمال دراسة الدكتوراه، وشكري وتقديري إلى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة ورئاسة قسم علوم الحياة ومنتسبي القسم كافة لجهودهم المبذولة في تذليل الكثير من العقبات خلال مسيرة البحث.

ويطيب لي ان أقدم كلمة شكر عميقة الى مختبرات دائرة البيئة والمياه في وزارة العلوم والتكنولوجيا لمساعدتهم لي في انجاز هذا العمل فجزاهم الله عني خير جزاء المحسنين.

ومن الوفاء أن أتقدم بخالص شكري وتقديري إلى أختي وزملائي كل من كرار حسين حنيت ومحمود نعمة حمود ومهدي حمزة خشان والدكتور مصطفى تارخ إبراهيم والدكتور علي رياض مدحت لما قدموه لي من نصائح قيمة ودعم وارشاد لإنجاز هذا البحث فجزاهم الله عني خير الجزاء.

واخيراً أقدم شكري وتقديري الكبيرين إلى عائلتي التي طالما دفعتني للسير قدماً في طريق العلم وزرعاً في نفسي روح المجاهدة وصولاً إلى تحقيق الهدف المنشود، فشكراً لكم من أعماق قلبي على عطائكم الدائم.

مع خالص الوفاء والتقدير إلى كل يد امتدت لمساعدتي في انجاز هذا البحث

والله ولي التوفيق

الباحث

إقرار المشرف على الأطروحة

أشهد أن إعداد هذه الأطروحة الموسومة بـ (التأثير السمي والمناعي لبعض مكونات العكبر المحلي المنقاة جزئياً على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549) قد جرى تحت إشرافي في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه فـلسفة في علوم الحياة / علم الحيوان.

التوقيع: 

الاسم: د. هيام عبد الرضا كريم

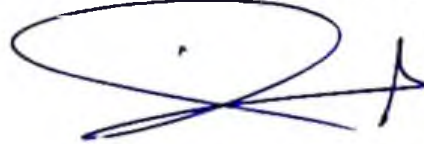
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

مكان العمل: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ: / / 2023

توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة إلى التوصية أعلاه من قبل الأستاذ المشرف، أحيل هذه الأطروحة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع: 

الاسم: د. نصير مرزا حمزة

المرتبة العلمية: أستاذ

مكان العمل: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ: / / 2023

إقرار المقوم اللغوي

أشهد أن هذه الأطروحة الموسومة بـ (التأثير السمي والمناعي لبعض مكونات العكبر المحلي المنقاة جزئياً على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية؛ وبذلك أصبحت مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.


التوقيع:

الاسم: سليمان صباح محسن


المرتبة العلمية: مدرس مساعد


مكان العمل: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الانسانية


التاريخ: / / 2023

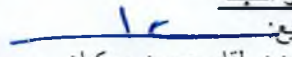
إقرار لجنة المناقشة


نشهدُ بأننا رئيس وأعضاء لجنة المناقشة قد اطلعنا على الأطروحة الموسومة بـ (التأثير السمي والمناعي لبعض مكونات العكبر المحلي المنقاة جزئياً على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549) من قبل الطالب ((علي نصير زبيدي شكر)) وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها وكل ما يتعلق بها، ووجدنا انها جديرة بالقبول بتقدير (امتياز) لنيل درجة الدكتوراه في علوم الحياة / علم الحيوان.


رئيس اللجنة
التوقيع: 
الاسم: د. وفاء صادق محسن
المرتبة العمية: أستاذ
مكان العمل: جامعة كربلاء / كلية العلوم
التاريخ: 2023 / /

عضو اللجنة
التوقيع: 
الاسم: د. حيدر علي محمد
المرتبة العمية: أستاذ مساعد
مكان العمل: جامعة كربلاء / كلية الطب البيطري
التاريخ: 2023 / 11 / 5

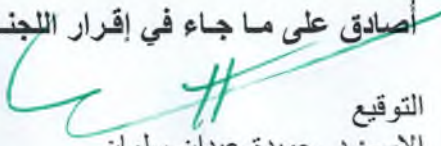
عضو اللجنة
التوقيع: 
الاسم: د. قيصر عبد السجاد محمد
المرتبة العمية: أستاذ مساعد
مكان العمل: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة
التاريخ: 2023 / /

عضو اللجنة
التوقيع: 
الاسم: د. لقاء حسون صكبان
المرتبة العمية: أستاذ
مكان العمل: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة
التاريخ: 2023 / /

عضو اللجنة
التوقيع: 
الاسم: د. أسامة باسم عبد الخالق
المرتبة العمية: أستاذ مساعد
مكان العمل: الجامعة التقنية الوسطى / المعهد التقني / بلد
التاريخ: 2023 / /

عضواً ومشرفاً
التوقيع: 
الاسم: د. هيام عبد الرضا كريم
المرتبة العمية: أستاذ مساعد
مكان العمل: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة
التاريخ: 2023 / /

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء

أصادق على ما جاء في إقرار اللجنة أعلاه
التوقيع: 
الاسم: د. حميدة عيدان سلمان
المرتبة العلمية: أستاذ
مكان العمل: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة
التاريخ: 2023 / 11 / 14

الخلاصة

هدفت الدراسة إلى معرفة التأثيرات السمية والمناعية للمركبات الفعالة المعزولة من العكبر العراقي Iraqi Propolis والتي تضمنت، Caffeic acid phenethyl و Caffeic acid (CA) و ester (CAPE) و Chrysin (CHR) على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549، ومقارنة تأثير هذه المركبات مع عقار السيسبلاتين Cisplatin، وهو عقار كيميائي يستخدم في علاج عدة أنواع من امراض السرطان، حيث استخدم خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 كنموذج لإجراء الاختبارات المطلوبة والتي شملت محورين، المحور الأول هو تقييم النشاط المضاد للورم Anti-tumor للمركبات الفعالة المعزولة من العكبر خلال فحص السمية الخلوية Cytotoxicity لكل مركب فعال على خط خلايا A549 ومقارنته مع عقار Cisplatin، أمّا المحور الثاني فتمثل بمعرفة النشاط المُعدّل للمناعة Immunomodulatory activity عن طريق قياس نسبة مستوى التعبير عن بعض المعايير المناعية المتمثلة بـ Cluster of differentiation 24 و Programmed death-ligand 1 (PDL-1) و C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4) و (CD24) على خط خلايا A549 قبل وبعد المعاملة بالمركبات الفعالة والعلاج الكيميائي. أجريت اختبارات الدراسة الحالية في مختبرات قسم علوم الحياة في كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء، ومختبرات دائرة البيئة والمياه في وزارة العلوم والتكنولوجيا ومختبر الشركة العراقية للتقنيات الاحيائية ومختبر العراق التخصصي في محافظة بغداد للفترة الممتدة من بداية شهر نيسان 2022 إلى بداية شهر تشرين الثاني 2022.

تم الكشف عن المركبات الفعالة في المستخلص الايثانولي للعكبر عن طريق استخدام تقنية كروماتوغرافيا السوائل عالية الأداء High-performance liquid chromatography، ثم جمعت بشكل فردي باستخدام جهاز Fraction Collector المربوط بجهاز (HPLC)، وكشفت النتائج أن المركب الفعال (CA) هو المركب الأكثر تركيزاً في المستخلص، إذ كان تركيزه (69.58) mg/g، في حين بلغت التراكيز (48.97 و 33.69) mg/g لكل من المركبين (CHR و CAPE) على التوالي.

تم الكشف عن التأثيرات السمية الخلوية Cytotoxicity لكل من السيسبلاتين والمركبات الفعالة المعزولة من العكبر على خلايا A549 من خلال استخدام فحص 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)، وهو اختبار يستخدم في الزراعة الخلوية Cell culture، حيث تم تعريض الخلايا السرطانية لستة تراكيز مختلفة لكل مركب من المركبات المدروسة وهي (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25) µg/mL، ولمدة (48) ساعة، وبينت

النتائج وجود تأثيرات سمية خلوية لعلاج السييسبلاتين والمركبات الفعالة على خط خلايا A549، إذ لوحظ انخفاض كبير في عدد الخلايا السرطانية مع زيادة نسبة المئوية لمعدل التثبيط (Inhibition rate) بزيادة التركيز، حيث وصل أعلى تثبيط عند التركيز (1000) $\mu\text{g/mL}$ عند المعاملة بعقار السييسبلاتين والمركبات الفعالة المستخلصة من العكبر، وبالمقارنة مع السييسبلاتين وباقي المركبات، فقد امتلك المركب (CA) أعلى نسبة تثبيط على خط خلايا سرطان الرئة عند التركيز (1000) $\mu\text{g/mL}$ ، حيث كانت (76.300%)، في حين كانت قيم النسب (70.400% و 62.500% و 67.100%) في (CIS و CAPE و CHR) على التوالي، كما كشفت النتائج عن وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$) في التراكيز الستة لكل من للسييسبلاتين والمركب الفعال (CAPE) عند مقارنتها مع خلايا السيطرة Control، وكانت هنالك فروق معنوية ($P \leq 0.05$) في التراكيز (1000, 500, 250, 125, 62.5) $\mu\text{g/mL}$ للمركبين (CA و CHR) مع خلايا السيطرة Control، في حين لم تكن هنالك فروق معنوية ($P > 0.05$) في التراكيز (31.2) $\mu\text{g/mL}$ وخلايا السيطرة Control، كما أظهرت النتائج ان سمية عقار السييسبلاتين كانت أعلى من سمية المركبات الفعالة على خط خلايا A549 باستخدام التركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50)، إذ بلغ (43.75) $\mu\text{g/mL}$ في علاج السييسبلاتين، بينما كانت قيم (IC50) (157.6 و 249.3 و 258.9) $\mu\text{g/mL}$ في المركبات الفعالة المستخلصة من العكبر (CA و CAPE و CHR) على التوالي، ومن الجدير بالذكر كلما قل تركيز المركب المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) كانت سميته الخلوية أعلى والعكس صحيح.

قُدرت قيم مستويات التعبير عن المعايير المناعية (PDL-1 و CD24 و CXCR4) على خط خلايا A549 باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry، حيث عوملت الخلايا السرطانية المزروعة في المختبر *in vitro* بالتركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) لكل من السييسبلاتين والمركبات الفعالة المعزولة من العكبر لمدة (24) ساعة من التعرض، واطهرت النتائج ان مستويات التعبير عن (PDL-1 و CD24 و CXCR4) قد ارتفعت في خط خلايا A549 بعد معاملتها بتركيز (IC50) لعلاج السييسبلاتين، حيث بينت النتائج وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$) في مستوى التعبير عن (PDL-1) في خلايا A549 المعاملة بعقار السييسبلاتين مقارنةً مع خلايا السيطرة Control، في حين بينت النتائج عدم وجود فروق معنوية ($P > 0.05$) في مستويات التعبير عن (CD24 و CXCR4)، مقارنةً مع خلايا السيطرة Control، كما أوضحت النتائج وجود انخفاض كبير في مستويات التعبير عن (PDL-1 و CD24 و CXCR4) على خط خلايا A549 المعاملة بالتراكيز (IC50) للمركبين الفعالين (CA و CAPE)، إذ

بينت النتائج وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$) في التعبير عن البروتينات المناعية (PDL-1 و CD24 و CXCR4) على خط خلايا A549 المعاملة بالمركبين المذكورين مقارنة مع خلايا السيطرة Control، في حين كانت مستويات التعبير عن (PDL-1 و CD24 و CXCR4) في خلايا A549 المعاملة بالمركب (CHR) مرتفعة مقارنةً مع المركبين الآخرين للعكبر، إذ أظهرت النتائج وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$) في مستوى التعبير عن (PDL-1) في خلايا A549 المعاملة بالمركب (CHR) مقارنةً مع خلايا السيطرة، بينما لم يكن هنالك فروق معنوية ($P > 0.05$) في مستويات التعبير عن (CD24 و CXCR4).

نستنتج مما تقدم أنّ المركبات الفعالة المعزولة من العكبر (CA و CAPE و CHR) كان لها تأثيرات سمية خلوية ضد خلايا سرطان الرئة البشري A549 بتركيز مختلفة وأنّ التركيز ($1000 \mu\text{g/mL}$) كان التركيز الأكثر فعالية للسمية الخلوية ضد خط خلايا سرطان الرئة البشري A549، بالإضافة إلى ذلك، كان للمركبات الفعالة المستخلصة من العكبر تأثيرات على انخفاض وارتفاع مستويات التعبير في بعض المعايير المناعية (PDL-1 و CD24 و CXCR4) على خط خلايا A549، وبالتالي يمكن تطوير هذه المركبات لإمكانية استخدامها كعلاجات طبية مساعدة للسيسبلاتين ضد أنواع مختلفة من مرض السرطان وخاصةً سرطان الرئة.

قائمة المحتويات LIST OF CONTENTS

رقم الصفحة	الموضوع	التسلسل
I	الخلاصة	
IV	قائمة المحتويات LIST OF CONTENTS	
X	قائمة الجداول LIST OF TABLES	
XII	قائمة الاشكال LIST OF FIGURES	
XVII	قائمة الصور LIST OF IMAGES	
XVIII	قائمة الملاحق LIST OF APPENDICES	
XVIII	قائمة المختصرات LIST OF ABBREVIATIONS	
4-1	الفصل الأول: المقدمة Introduction	.1
34-5	الفصل الثاني: استعراض المراجع Literature review	.2
5	سرطان الرئة Lung cancer	1.2
7	أنواع سرطان الرئة Types of lung cancer	2.2
8	سرطان الرئة غير صغير الخلايا Non-small cell lung cancer	1.2.2
9	سرطان الرئة صغير الخلايا Small cell lung cancer	2.2.2
10	مراحل سرطان الرئة Lung cancer staging	3.2
12	عوامل الخطورة Risk factors	4.2
12	التدخين Smoking	1.4.2

13	Radioactive material المشعة المواد	2.4.2
14	Asbestos الاسبتوس	3.4.2
14	History of family التاريخ العائلي	4.4.2
14	Chemotherapy for lung cancer العلاج الكيميائي لسرطان الرئة	5.2
15	Cisplatin drug عقار السيسبلاتين	1.5.2
17	Propolis العكبر	6.2
21	Physical characteristics الخواص الفيزيائية	1.6.2
21	Chemical constituents المكونات الكيميائية	2.6.2
23	Flavonoids الفلافونويدات	1.2.6.2
27	Phenolic acids الأحماض الفينولية	2.2.6.2
28	Anticancer potential of propolis نشاط العكبر المضاد للسرطان	3.6.2
31	Immunological parameters المعايير المناعية	7.2
31	PDL-1 برووتين مستقبل الموت المبرمج	1.7.2
32	مجموعة التمايز 24 (CD24)	2.7.2
33	مُستقبل الكيموكين من النوع الرابع CXCR4	3.7.2
55-35	Materials and Methods الفصل الثالث: المواد وطرائق العمل	.3
35	Materials المواد	1.3
35	Apparatuses and tools الأجهزة والأدوات المستعملة	1.1.3

37	Chemical materials المواد الكيميائية المستعملة	2.1.3
39	Methods طرائق العمل	2.3
39	Experiment design تصميم التجربة	1.2.3
40	Cisplatin drug عقار السيسبلاتين	2.2.3
40	Propolis sample عينة العكبر	3.2.3
40	Collection of the sample جمع العينة	1.3.2.3
40	Preparation of the sample تحضير العينة	2.3.2.3
41	Extraction method طريقة الاستخلاص	3.3.2.3
41	HPLC الكشف عن المركبات الفعالة في العكبر بواسطة جهاز	4.3.2.3
41	Standard solutions of the active compounds المحاليل القياسية للمركبات الفعالة	1.4.3.2.3
42	HPLC الكشف عن المركبات الفعالة في العكبر المحلي باستخدام تقنية	2.4.3.2.3
43	Collection of a the active compounds جمع المركبات الفعالة	3.4.3.2.3
43	Drying of the active compounds تجفيف المركبات الفعالة	4.4.3.2.3
44	Cell culture الزراعة الخلوية	4.2.3
44	A549 الخط الخلوي لسرطان الرئة البشري	1.4.2.3
44	Sterilization طرق التعقيم المستخدمة في الزراعة الخلوية	2.4.2.3
44	Moist heat sterilization التعقيم بالحرارة الرطبة	1.2.4.2.3

45	Filter membrane sterilization التعقيم بواسطة الترشيح العشائي	2.2.4.2.3
45	Media and الأوساط والمحاليل الخاصة بالزراعة الخلوية solutions	3.4.2.3
45	Fetal Bovine Serum (FBS) المصل البقري الجنيني	1.3.4.2.3
45	Phosphate Buffer Saline محلول بفر الفوسفاتي الملحي (PBS)	2.3.4.2.3
45	Trypsin solution محلول التربسين	3.3.4.2.3
45	Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) محلول	4.3.4.2.3
46	Trypsin-EDTA محلول	5.3.4.2.3
46	NaHCO ₃ محلول بيكربونات الصوديوم	6.3.4.2.3
46	RPMI-1640 تحضير الوسط الزراعي	7.3.4.2.3
46	Serum Free Medium الوسط الزراعي الخالي من المصل (SEM)	8.3.4.2.3
47	MTT تحضير صبغة	9.3.4.2.3
47	الكشف عن تأثير الفعالية المضادة للأورام لعقار السيسبلاتين والمركبات الفعالة المستخلصة من العكبر على الخط الخلوي لسرطان الرئة البشري A549.	4.4.2.3
47	Maintaining and preparing أدامة وتحضير خط الخلية	1.4.4.2.3
48	A549 الزراعة الثانوية للخط الخلوي	2.4.4.2.3
49	Prepare of freezing medium تحضير وسط التجميد	3.4.4.2.3

49	Refrigeration of cell line تجميد الخط الخلوي	4.4.4.2.3
50	اذابة مسحوق الباودر لعقار السيسبلاتين والمركبات الفعالة المستخلصة من العكبر	5.4.4.2.3
50	Cytotoxicity فحص MTT لاختبار السمية الخلوية	6.4.4.2.3
50	Principle المبدأ	1.6.4.4.2.3
51	Procedure طريقة العمل	2.6.4.4.2.3
53	تقدير تعبير المعايير المناعية على سطح خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry	5.2.3
53	مبدأ استخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry	1.5.2.3
53	Procedure طريقة العمل	2.5.2.3
53	Monoclonal antibodies الاجسام المضادة وحيدة النسيلة	1.2.5.2.3
54	Sample preparation تحضير العينة	2.2.5.2.3
55	Statistical analysis التحليل الاحصائي	6.2.3
111-56	Results and Discussion الفصل الرابع: النتائج والمناقشة	4.
56	الكشف الكيميائي عن المركبات الفعالة في المستخلص الايثانولي للعكبر	1.4
56	التحليل الكيميائي للمركبات القياسية بواسطة جهاز HPLC	1.1.4
59	التحليل الكيميائي للمركبات الفعالة في مستخلص العكبر بواسطة جهاز HPLC	2.1.4
63	التأثيرات السمية الخلوية لعقار السيسبلاتين Cisplatin في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549	2.4

70	الكشف عن تأثير الفعالية المضادة للورم للمركبات الفعالة المستخلصة من العكبر في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549	3.4
70	التأثيرات السمية الخلوية للمركب الفعال حامض الكافيك (CA) في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549	1.3.4
75	التأثيرات السمية الخلوية للمركب الفعال حامض الكافيك فينول استر (CAPE) في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549	2.3.4
79	التأثيرات السمية الخلوية للمركب الفعال كريسين (CHR) في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549	3.3.4
90	العلاقة الارتباطية بين التراكيز المستخدمة في الدراسة ونسبة معدل التثبيط في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549	4.4
93	تقدير تعبير المعايير المناعية (PDL-1, CD24, CXCR4) عن طريق تقنية التدفق الخلوي	5.4
93	تقدير تعبير المعايير المناعية (PDL-1, CD24, CXCR4) على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 بعد معاملتها بعقار السيستلاتين	1.5.4
101	تقدير تعبير المعايير المناعية (PDL-1, CD24, CXCR4) على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 بعد معاملتها بالمركبات الفعالة المستخلصة من العكبر	2.5.4
113-112	الاستنتاجات والتوصيات	
112	الاستنتاجات Conclusions	
113	التوصيات Recommendations	
159-114	المصادر References	

114	المصادر العربية	
115	المصادر الأجنبية	
162-160	الملاحق Appendices	
I	الخلاصة باللغة الانكليزية	

قائمة الجداول LIST OF TABLES

رقم الصفحة	العنوان	التسلسل
35	الأجهزة والأدوات المستعملة في الدراسة الحالية.	1-3
37	المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة الحالية.	2-3
57	نتائج التحليل الكروماتوغرافي للمركبات القياسية Standard compounds وهي Caffeic acid phenethyl ester و Chrysin و Caffeic acid باستخدام جهاز HPLC.	1-4
60	نتائج التحليل الكروماتوغرافي للمركبات الفعالة Active compounds وهي Chrysin و Caffeic acid phenethyl ester و Caffeic acid الموجودة في مستخلص عينة العكبر propolis باستخدام جهاز HPLC.	2-4
67	مقارنة متعددة عن طريق اختبار Tukey test للمقارنات المتعددة بين تراكيز عقار السيسبلاتين بعضها مع بعض عند استخدامها كفعالية مضادة ضد الخط الخلوي لسرطان الرئة البشري A549، بالإضافة إلى مقارنتها مع خلايا السيطرة Control.	3-4

74	مقارنة متعددة عن طريق اختبار Tukey test للمقارنات المتعددة بين تراكيز المركب الفعال (CA) بعضها مع بعض عند استخدامها كفعالية مضادة ضد الخط الخلوي لسرطان الرئة البشري A549، بالإضافة إلى مقارنتها مع خلايا السيطرة Control.	4-4
78	مقارنة متعددة عن طريق اختبار Tukey test للمقارنات المتعددة بين تراكيز المركب الفعال (CAPE) بعضها مع بعض عند استخدامها كفعالية مضادة ضد الخط الخلوي لسرطان الرئة البشري A549، بالإضافة إلى مقارنتها مع خلايا السيطرة Control.	5-4
83	مقارنة متعددة عن طريق اختبار Tukey test للمقارنات المتعددة بين تراكيز المركب الفعال (CHR) بعضها مع بعض عند استخدامها كفعالية مضادة ضد الخط الخلوي لسرطان الرئة البشري A549، بالإضافة إلى مقارنتها مع خلايا السيطرة Control.	6-4
97	نسبة التعبير عن البروتينات المناعية (PDL-1, CD24, CXCR4) على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 بعد استخدام عقار السيستلاتين (CIS) بالمقارنة مع خلايا السيطرة Control.	7-4
104	نسبة التعبير عن البروتينات المناعية (PDL-1, CD24, CXCR4) على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 بعد استخدام المركب الفعال (CA) بالمقارنة مع خلايا السيطرة Control.	8-4
106	نسبة التعبير عن البروتينات المناعية (PDL-1, CD24, CXCR4) على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 بعد استخدام المركب الفعال (CAPE) بالمقارنة مع خلايا السيطرة Control.	9-4
109	نسبة التعبير عن البروتينات المناعية (PDL-1, CD24, CXCR4) على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 بعد استخدام المركب الفعال (CHR) بالمقارنة مع خلايا السيطرة Control.	10-4

قائمة الاشكال LIST OF FIGURES

رقم الصفحة	العنوان	التسلسل
8	مخطط تصنيفي لأنواع سرطان الرئة.	1-2
10	مواقع الإصابة بأنواع سرطان الرئة.	2-2
16	التركيب الكيميائي للسيسبلاتين Cisplatin: البلاتين Pt يتمركز في الوسط وحوله اثنين من روابط الكلوريد Cl (على جهة الشمال) مع اثنين من مجموعات الأمين NH ₃ (على جهة اليمين).	3-2
23	التركيب الكيميائي للفلافونويد Flavonoid.	4-2
25	تأثير الفلافونويدات على مسار موت الخلية المبرمج الخارجي Extrinsic والداخلي Intrinsic.	5-2
57	مخطط كروماتوغرافي للمركب القياسي Caffeic acid بواسطة جهاز HPLC ويظهر فيه وقت الاحتجاز Retention time وارتفاع القمة Height peak ومساحتها Areal peak.	1-4
58	مخطط كروماتوغرافي للمركب القياسي Caffeic acid phenethyl ester بواسطة جهاز HPLC ويظهر فيه وقت الاحتجاز Retention time وارتفاع القمة Height peak ومساحتها Areal peak.	2-4
58	مخطط كروماتوغرافي للمركب القياسي Chrysin بواسطة جهاز HPLC ويظهر فيه وقت الاحتجاز Retention time وارتفاع القمة Height peak ومساحتها Areal peak.	3-4

61	مخطط كروماتوغرافي للمركبات الفعالة في مستخلص عينة العكبر Propolis بواسطة جهاز HPLC ويظهر فيه وقت الاحتجاز Retention time وارتفاع القمة Height peak ومساحتها Areal peak.	4-4
64	التأثيرات السمية الخلوية Cytotoxicity في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 بعد معاملتها بستة تراكيز (3 مكررات لكل تركيز) من عقار السيسبلاتين (CIS) باستعمال فحص MTT لمدة (48) ساعة.	5-4
66	تأثير التركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) لعقار السيسبلاتين على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549.	6-4
66	تأثير عقار السيسبلاتين على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 مقارنة مع خلايا السيطرة باستعمال فحص MTT لمدة (48) ساعة، ****: (P < 0.05)، SE: الخطأ القياسي.	7-4
72	التأثيرات السمية الخلوية Cytotoxicity في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 بعد معاملتها بتراكيز مختلفة (3 مكررات لكل تركيز) من المركب الفعال (CA) باستعمال فحص MTT لمدة (48) ساعة.	8-4
72	تأثير التركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) للمركب الفعال (CA) على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549.	9-4
73	تأثير المركب الفعال (CA) على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 مقارنة مع خلايا السيطرة باستعمال فحص MTT لمدة (48) ساعة، **، ****: (P < 0.05)، non – significant : ns، SE: الخطأ القياسي.	10-4
76	التأثيرات السمية الخلوية Cytotoxicity في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 بعد معاملتها بتراكيز مختلفة (3 مكررات لكل تركيز) من المركب الفعال (CAPE) باستعمال فحص MTT لمدة (48) ساعة.	11-4

77	تأثير التركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) للمركب الفعال (CAPE) على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549.	12-4
78	تأثير المركب الفعال (CAPE) على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 مقارنة مع خلايا السيطرة باستعمال فحص MTT لمدة (48) ساعة، ****: (P < 0.05)، SE: الخطأ القياسي.	13-4
81	التأثيرات السمية الخلوية Cytotoxicity في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 بعد معاملتها بتراكيز مختلفة (3 مكررات لكل تركيز) من المركب الفعال (CHR) باستعمال فحص MTT لمدة (48) ساعة.	14-4
81	تأثير التركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) للمركب الفعال (CHR) على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549.	15-4
82	تأثير المركب الفعال (CHR) على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 مقارنة مع خلايا السيطرة باستعمال فحص MTT لمدة (48) ساعة، **، ****: (P < 0.05)، non – significant : ns، SE: الخطأ القياسي.	16-4
91	العلاقة الخطية بين تراكيز عقار السيسبلاتين (CIS) ونسبة معدل التثبيط في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549.	17-4
91	العلاقة الخطية بين تراكيز المركب الفعال (CA) ونسبة معدل التثبيط في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549.	18-4
92	العلاقة الخطية بين تراكيز المركب الفعال (CAPE) ونسبة معدل التثبيط في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549.	19-4
92	العلاقة الخطية بين تراكيز المركب الفعال (CHR) ونسبة معدل التثبيط في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549.	20-4

94	نسبة تعبير (PDL-1) في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالسيستبلاتين باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).	21-4
94	نسبة تعبير (CD24) في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالسيستبلاتين باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).	22-4
95	نسبة تعبير (CXCR4) في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالسيستبلاتين باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).	23-4
95	نسبة تعبير (PDL-1) في خط خلايا A549 غير المعالجة (خلايا السيطرة Control) باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).	24-4
96	نسبة تعبير (CD24) في خط خلايا A549 غير المعالجة (خلايا السيطرة Control) باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).	25-4
96	نسبة تعبير (CXCR4) في خط خلايا A549 غير المعالجة (خلايا السيطرة Control) باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).	26-4
102	نسبة تعبير (PDL-1) في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالمركب الفعال (CA) باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).	27-4

103	نسبة تعبير (CD24) في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالمركب الفعال (CA) باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).	28-4
103	نسبة تعبير (CXCR4) في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالمركب الفعال (CA) باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).	29-4
105	نسبة تعبير (PDL-1) في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالمركب الفعال (CAPE) باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).	30-4
105	نسبة تعبير (CD24) في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالمركب الفعال (CAPE) باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).	31-4
106	نسبة تعبير (CXCR4) في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالمركب الفعال (CAPE) باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).	32-4
107	نسبة تعبير (PDL-1) في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالمركب الفعال (CHR) باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).	33-4
108	نسبة تعبير (CD24) في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالمركب الفعال (CHR) باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).	34-4

108	نسبة تعبير (CXCR4) في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالمركب الفعال (CHR) باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمَّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).	35-4
-----	--	------

قائمة الصور LIST OF IMAGES

رقم الصفحة	العنوان	التسلسل
65	خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 تحت المجهر المقلوب بعد معاملتها بالتركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) لعقار السييسبلاتين (صبغة Crystal violet، قوة التكبير 100X).	1-4
65	خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 السيطرة Control غير المعالجة Untreated تحت المجهر المقلوب (صبغة Crystal violet، قوة التكبير 100X).	2-4
73	خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 تحت المجهر المقلوب بعد معاملتها بالتركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) للمركب الفعال CA (صبغة Crystal violet، قوة التكبير 100X).	3-4
77	خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 تحت المجهر المقلوب بعد معاملتها بالتركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) للمركب الفعال CAPE (صبغة Crystal violet، قوة التكبير 100X).	4-4
82	خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 تحت المجهر المقلوب بعد معاملتها بالتركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) للمركب الفعال CHR (صبغة Crystal violet، قوة التكبير 100X).	5-4

قائمة الملاحق LIST OF APPENDICES

رقم الصفحة	العنوان	رقم الملحق
160	العكبر العراقي ذو اللون البني المستخدم في الدراسة الحالية.	1
160	جهاز حمام الموجات فوق الصوتية Ultrasonic bath المستخدم في عملية استخلاص مادة العكبر.	2
161	جهاز HPLC المستخدم لتشخيص وفصل المركبات الفعالة في المستخلص الايثانولي لعينة العكبر.	3
161	جهاز Fraction collector المربوط على جهاز HPLC المستخدم لجمع المركبات الفعالة من المستخلص الايثانولي لعينة العكبر.	4
163	جهاز التدفق الخلوي Flow cytometry المستخدم في تقدير مستوى التعبير عن نسبة المعايير المناعية المدروسة.	5

قائمة المختصرات LIST OF ABBREVIATIONS

الاختصار	المصطلح
5-FU	5-Fluorouracil
833K	Embryonal carcinoma cell line
A1235	Glioma cell line
A549	Adenocarcinoma human alveolar basal epithelial cells (Non-small Lung cancer cell line)
AC	Adenocarcinoma

AJCC	American Joint Committee on Cancer
B16-BL6	Melanoma cell lines
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
C°	Celsius degree
C6–C3–C6	Phenyl-benzo-γ-pyran
CA	Caffeic acid
Caco2	Human colorectal adenocarcinoma cell line
CAPE	Caffeic acid phenethyl ester
CD24	Cluster of differentiation 24
CD28	Cluster of differentiation 28
CD44	Cluster of differentiation 44
CDDP-II	CIS- DiamineDichloroPlatine II
CDK4,6	Cyclin-dependent kinase 4,6
CHR	Chrysin
CT	Computed tomography
CXCL12	C-X-C motif chemokine 12 (stromal cell-derived factor 1)
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid

DNMT1	DNA methyltransferase 1
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases
ES-SCLC	Extensive-stage small cell lung carcinoma
FAK	Focal adhesion kinase
FBS	Fetal bovine serum
G0/G1	Growth 0 phase/Growth 1 phase
G2/M	Growth 2/Mitotic phase
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry
HCT-116	Human colorectal carcinoma cell line
HepG2	Hepatocellular carcinoma cell line
HGC27	Gastric cancer cell line
HIV	Human immunodeficiency virus
HL-60	Human leukemia cell line
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HO8910PM	Human ovarian cancer cell line
HPLC	High-performance liquid chromatography

IARC	International Agency for Research on Cancer
IC50	The half maximal inhibitory concentration
IMR-90	Normal lung fibroblast cell line
KCL	Potassium chloride
KIT	Proto-oncogene-c
LCC	Large cell carcinoma
LLC1	Lewis lung carcinoma-1
LNCaP	Prostate adenocarcinoma cell line
LS-SCLC	Limited-stage small cell lung carcinoma
mAU.s	milli-absorbance unit
MCF7	Michigan Cancer Foundation-7 (breast cancer cell line)
MDA-MB-231	Human breast cancer cell line
MDA-MB-436	Human breast cancer cell line
MDR	Multiple drug resistance
MEK	MAPK/ERK pathway
MRI	Magnetic resonance imaging
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
NaCl	Sodium chloride

NaH ₂ PO ₄	Monosodium phosphate
NaHCO ₃	Sodium bicarbonate
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	Natural killer cells
NSCLC	Non-small cell lung carcinoma
NT2/D1	Human testicular embryonal carcinoma cell line
OD	Optical density
p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1
p27	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
p38	Mitogen-activated protein kinases
p53	Tumor suppressor protein
PANC1	Pancreatic cancer cell line-1
PBS	Phosphate Buffer Saline
PC-3	Human prostate cancer cell line
PD-1	Programmed cell death protein 1
PDL-1	Programmed death-ligand 1
PI3K/AKT	Phosphoinositide 3-kinases/Protein kinase B
R	Correlation coefficient

RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
RPMI-1640	Roswell park memorial institute medium
RT	Retention time
SCC	Squamous cell carcinoma
SCLC	Small cell lung carcinoma
SKBR-3	Human breast cancer cell line
SSC	Side-scattered light
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
SW480	Human colon adenocarcinoma cell line
TGCT	Tenosynovial giant cell tumor
TLC	Thin layer chromatography
TNM	Tumor, Node, Metastasis
UICC	Union for International Cancer Control
UM-SCC-10B	Head and neck squamous cell carcinoma cell line
UM-SCC-15s	Head and neck squamous cell carcinoma cell line

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

1. المقدمة Introduction

السرطان Cancer مصطلح يشمل مجموعة كبيرة من الأمراض التي يمكن ان تنشأ في أي جزء من الجسم، وهناك مصطلحات أخرى مستخدمة وهي الأورام الخبيثة Malignant tumors والتنشؤات أو النيوبلازم Neoplasm وتعني باللاتينية "النشوء الجديد". ومن السمات المميزة للسرطان هي النمو والتولد السريع Rapid cell proliferation لخلايا شاذة غير طبيعية تنمو خارج نطاق حدودها المعتادة لها القدرة على الانقسام اللانهائي وبإمكانها ان تغزو بعد ذلك أجزاء مجاورة من الجسم وتنتشر في أعضاء أخرى منه عن طريق الأوعية الدموية؛ وتطلق على العملية الأخيرة تسمية النقيلة Metastasis، وتمثل النقايل المنتشرة على نطاق واسع اهم أسباب الوفاة نتيجة الإصابة بمرض السرطان (الأرناؤوط، 2016 ؛ (American Cancer Society, 2023).

إنَّ السرطان هو أحد اهم الأسباب الرئيسية التي تؤدي إلى الوفاة في العالم، حيث يموت على الأقل ما يقارب 7.6 مليون شخص سنوياً بسبب السرطان ومن المرشح ان ترتفع نسبة الوفيات إلى 13.1 مليون حالة وفاة بحلول عام 2030 (Rayan et al., 2017)، وحسب التوقعات التي اشارت إليها منظمة التعداد السكاني العالمية Global demography، فإن حوالي 420 مليون حالة إصابة بالسرطان ستكون بحلول عام 2025 (Saini et al., 2020). ووفقاً لمنظمة الصحة العالمية WHO، فقد بلغ عدد الحالات المصابة بالسرطان حوالي 18 مليون حالة إصابة في عام 2018 موزعة بين الجنسين، حيث بلغت الإصابات في الرجال حوالي 9.5 مليون إصابة في حين بلغت الإصابات في النساء حوالي 8.5 مليون إصابة وتشير التوقعات إلى ارتفاع عدد حالات الإصابة إلى الضعف حيث تتراوح بين 29-37 مليون حالة إصابة بحلول عام 2040، وكانت الوفيات تقريباً 9.6 مليون حالة وفاة، وان أكثر الأنواع سبباً في الوفاة كانت موزعة على التوالي والتي احتل فيها سرطان الرئة الصدارة ، حيث حصد أرواح ما يقارب 1728000 مليون حالة وفاة، يليه سرطان القولون والمستقيم 864000 حالة وفاة، وسرطان المعدة والكبد 787000 حالة وفاة، ومن ثم سرطان الثدي 633000 حالة وفاة (WHO, 2020). إنَّ حدوث مرض السرطان لا يمكن حصره بسبب معين، فهناك عوامل تخص الورم نفسه وعوامل أخرى تخص المريض، بالإضافة إلى ذلك هناك عوامل خارجية منها ثلاثة عوامل رئيسة متداخلة تؤثر تأثيراً كبيراً في تطور مرض السرطان وهي التعرض إلى عوامل بيئية مسرطنة، والاستعداد الوراثي بالإضافة إلى الجهاز المناعي للشخص، حيث ان هذه العوامل عللت التنوع في تطور الورم من فرد لآخر حتى لو تعرض كلٍ منهم لنفس المخاطر (محمد، 2022).

وبزيادة معدل الإصابات بمختلف أنواع الأمراض السرطانية في جميع انحاء العالم، لا تزال هناك حاجة ماسة لاكتشاف وتطوير علاجات جديدة تتميز بفعاليتها الحيوية ضد السرطان، بالإضافة إلى تأثيراتها الجانبية القليلة أو المعدومة، إذ تحتوي هذه العلاجات على المواد النباتية الطبيعية التي تستخدم في الوقاية والعلاج من الأمراض السرطانية المختلفة، وتمتاز بأن لها القدرة على حث عملية الموت المبرمج Apoptosis، وبالتالي تساهم في توقف دورة الخلية Cell cycle arrest في الخلايا السرطانية (Vit *et al.*, 2015)، ولهذا السبب اتجه العديد من الباحثين إلى استخدام المنتجات الطبيعية كطرق علاجية بديلة لاحتوائها على مركبات كيميائية متعددة فعالة في علاج السرطان، كما يمكن ان يكون لها تأثير فعال في تحفيز الجهاز المناعي للمرضى المصابين بمقاومة الأمراض، بالإضافة إلى تأثيراتها الجانبية القليلة مقارنةً بالعلاج الكيميائي (Wargo *et al.*, 2016 ; Koosha *et al.*, 2016)، كما ركزت العديد من الأبحاث على كشف هذه المركبات في المنتجات الطبيعية وتقييم امكانياتها البيولوجية ضد الكثير من الأمراض (Kim *et al.*, 2018)، بالإضافة إلى وظائفها البيولوجية، فإن المركبات الكيميائية الموجودة في المنتجات الطبيعية لها القدرة على انتاج نواتج ايضية ثانوية Secondary metabolism products يمكن ان تفيد الانسان بشكل عام (Rivera-Yanez *et al.*, 2023)، ومن بين المنتجات الطبيعية التي تم التركيز عليها من قبل الباحثين هو العكبر Propolis، الذي اكتشف ليكون بديلاً واعداءً نظراً لاحتوائه على مجموعة كبيرة من المركبات الكيميائية الفعالة داخل الجسم الحي *In vivo* وفي المختبر *In vitro* (Zullkiflee *et al.*, 2022).

عرف العكبر (غراء النحل) منذ العصور القديمة عندما استخدم كمادة علاجية في الطب الشعبي القديم (Vica *et al.*, 2023)، حيث نسبت له الكثير من الخصائص البيولوجية، إذ يعمل كمادة حافظة ومضاد للأكسدة Antioxidant، ومضاد للميكروبات Antimicrobial، وله تأثير مثبط للدمو Antiproliferative effect في الخلايا السرطانية، ومضاد للالتهابات Anti-inflammatory، بالإضافة إلى عمله كمعدّل للمناعة Immunomodulatory (Kocot *et al.*, 2018 ; Da Rosa *et al.*, 2022)، كما يمكن ان يعمل العكبر كمضاد لتكوين الأوعية الدموية Antiangiogenic action، ونشاطه المضاد للضغط Antihypertensive activity، ومضاد للقرحة Anti-ulcers، يمكن أن يعمل أيضاً كمساعد للقاح Vaccine's adjuvant، ومضاد للطفيليات Antiparasitic activity، بالإضافة إلى دوره في حماية القلب Cardioprotective action، ونشاطه المنظم لسكّر الدم (AL-Fatlawi, 2014)، إذ انه يعتبر بشكل عام مادة آمنة وغير سامة عادةً ولا يسبب تحسناً لمعظم

الأشخاص عند استخدامه كمكملات أو وضعه على الجلد، ومع ذلك هناك بعض الأشخاص لديهم تحسس من بعض منتجات نحل العسل الأخرى، إضافة إلى تحسسهم من العكبر، حيث لوحظ هذا التحسس لأول مرة في مربى النحل وهو مرتبط بالعامل المهني، ولكن تمت ملاحظته أيضاً في الأشخاص الذين يستخدمون العكبر في مستحضرات التجميل والمكملات الغذائية لعلاج مختلف الحالات الصحية (Shruthi & Suma, 2012). يتميز العكبر بقدرته الكبيرة على تثبيط نمو العديد من الأورام السرطانية؛ وذلك لأنه يحتوي على الكثير من المركبات النشطة حيويًا مثل فينول استر حامض الكافيين وكريسين Chrysin، وهما مركبان يمتازان بقدرتهما على بدء تحفيز المسارات الخاصة بعملية الموت المبرمج Apoptosis في الخلايا السرطانية، ونظراً لأن الخلايا السرطانية تطور مقاومة لأنواع متعددة من الأدوية الكيميائية، استخدم العكبر كنوع من العلاجات البديلة للعلاج الكيميائي المستخدم في علاج السرطان (Sawicka et al., 2012 ; Vit et al., 2015)، كذلك يمتاز العكبر بأن مركباته الكيميائية سامة للخلايا السرطانية، وتمنع تلف الخلايا السليمة وعدم حدوث الطفرات فيها، أي أنها تقوم بدور وقائي في الخلايا الطبيعية (Campoccia et al., 2021).

يحتوي العكبر على العديد من المركبات الذبائية المتمثلة بالفينولات والأحماض الفينولية والمركبات الفلافونويدية، إذ يعد من أكبر مصادر هذه المركبات على الإطلاق، كما أن الدراسات العلمية ايدت مفهوم أن الفينول ومتعدد الفينول هي مركبات آمنة غذائياً ولها تأثيرات إيجابية على صحة الإنسان، إذ يمكن أن تعمل كمركبات وقائية ضد الأورام السرطانية، بالإضافة إلى قيامها بأدوار مناعية من خلال تحفيز عامل نخر الورم Tumor necrosis factor في الخلايا السرطانية (Szliszka & Krol, 2013)، أن النشاط المضاد للأورام السرطانية للمركبات الفلافونويدية في العكبر يمكن أن يمنع نمو السرطان عن طريق منع تكوين الأوعية الدموية Angiogenesis وبالتالي يمنع انتقال الورم من مكان إلى آخر في الجسم وفي النهاية تعمل على حث الخلية الورمية على عملية الموت المبرمج Apoptosis (Szliszka et al., 2011)، حيث أن التأثير الوقائي للعكبر ضد عدة أنواع من السرطان بما في ذلك سرطان الرئة قد يحدث بشكل مباشر عن طريق تثبيط الخلايا السرطانية ثم بدء عملية الموت المبرمج (Valente et al., 2011)، أو بشكل غير مباشر عن طريق إزالة مركبات الأوكسجين التفاعلية Reactive oxygen species وزيادة تنشيط الانزيمات المضادة للأكسدة (Orsollic et al., 2013 ; Brihoum et al., 2018)، ولأجل معرفة التأثيرات السمية الخلوية لمركبات العكبر أو أي مستخلص نباتي آخر، توصل الباحثون إلى تطوير تقنية تسهل من دراسة التأثيرات العلاجية في المختبر ضد أنواع مختلفة من الخلايا

السرطانية واطلقوا على هذه التقنية باسم الزراعة النسيجية (Tissue culture)، إذ يتم ذلك عن طريق استخدام خطوط خلوية سرطانية Cancer cell lines، حيث يمكن عن طريقها معرفة مدى التأثير السمي الخلوي Cytotoxic effect للمركبات المراد اختبارها على الخلايا المزروعة، كما يمكن التحكم بوقت التعرض والظروف البيئية الخاصة بتنمية الخلايا السرطانية، بالإضافة إلى ذلك، يمكن التحكم أيضاً بأعداد الخلايا المزروعة من أجل الوصول إلى مدى كفاءة هذه المواد الكيميائية عند استخدامها في المختبر *In vitro* على الخلايا السرطانية (محمد، 2022).

الهدف من الدراسة Aim of the study

هدفت الدراسة الحالية الى تقييم الفعالية السمية الخلوية Cytotoxic activity والتعديل المناعي Immunomodulatory للمركبات الفعالة المعزولة من المستخلص الايثانولي للعكبر مقارنةً مع أحد العلاجات الكيميائية (السيسلاتين) على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549، وذلك من خلال دراسة المحاور الآتية:

1. دراسة التأثيرات السمية الخلوية للمركبات الفعالة (CA و CAPE و CHR) المستخلصة من العكبر على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 ولمدة 48 ساعة ومقارنة هذه التأثيرات مع عقار السيسلاتين على نفس الخط الخلوي السرطاني.
2. دراسة تأثير المركبات الفعالة (CA و CAPE و CHR) المستخلصة من العكبر على بعض المعايير المناعية المدروسة (PDL-1 و CD24 و CXCR4) على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 ومقارنتها مع تأثير عقار السيسلاتين على نفس المعايير المناعية والخط الخلوي السرطاني.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literature review

2. استعراض المراجع Literature review

1.2 سرطان الرئة Lung cancer

يعد سرطان الرئة البشري السبب الأول للوفيات بسبب مرض السرطان في آخر عشر سنوات ولكلا الجنسين في جميع انحاء العالم، في العراق، احتل سرطان الرئة المرتبة الثانية بعد سرطان الثدي من بين أعلى عشر امراض سرطانية منتشرة في المجتمع العراقي حيث تم تسجيل أكثر من 2000 إصابة بسرطان الرئة في السنين الماضية، (Ferlay et al., 2019)، ويحتل هذا النوع من السرطان المرتبة الأولى من بين الأنواع السرطانية التي تصيب الرجال على وجه الخصوص، حيث يصاب به الذكور بنسبة تصل إلى أكثر من 70% بينما تصل نسبة إصابة الاناث به إلى 30% فقط (الورد، 2019) وبحسب منظمة الصحة العالمية WHO في عام 2018 فإن عدد الإصابات بسرطان الرئة في العراق بلغ أكثر من 2000 إصابة من مجموع 25000 إصابة بأمراض سرطانية مختلفة اخرى حيث احتل فيها سرطان الرئة المركز الثاني بعد سرطان الثدي، أمّا الوفيات فقد تسبب سرطان الرئة في العراق بوفاة أكثر من 1960 مريض من مجموع 14500 حالة وفاة بمختلف أنواع الأمراض السرطانية الاخرى وبذلك يكون قد احتل المرتبة الأولى من ناحية الوفيات (WHO, 2020)، أمّا في عام 2020 فقد كان عدد الإصابات بسرطان الرئة في العراق (2548) إصابة من مجموع (33873) إصابة بأنواع مختلفة من السرطان، حيث كان ثانياً بعد سرطان الثدي، وكان نصيب الرجال فيها هو الأكبر، إذ بلغ حوالي (2138) إصابة، كما احتل سرطان الرئة المركز الثاني في العراق بعد سرطان الثدي ايضاً من ناحية الوفيات حيث بلغ العدد حوالي (2326) حالة وفاة من مجموع (19780) حالة وفاة بأمراض سرطانية مختلفة (WHO, 2021).

عدّ سرطان الرئة من بين أكثر أنواع السرطان فتكاً بالمجتمع البشري، إذ أنّ نسب فرص البقاء على قيد الحياة بعد الإصابة به لمدة 5 سنوات لا تتجاوز 17.7% (Vachani et al., 2017)، والسبب في ذلك يعود إلى المرحلة المتأخرة التي تظهر في معظم أنواع سرطانات الرئة، حيث كشفت العديد من الأبحاث عن هذه المشكلة وأوضحت ان حوالي 57% من المصابين بالمرحلة السريرية الرابعة IV من سرطان الرئة لديهم فرص في البقاء على قيد الحياة أقل من 8% (Brainard & Farver, 2019)، عموماً يعزى السبب في تضائل فرص النجاة بعد الإصابة بالمراحل المتقدمة من سرطان الرئة إلى عاملين مهمين هما: أولاً: لا يوجد اختبار فحص فعال يكشف عن سرطان الرئة في المرحلة المبكرة على عكس ما يحدث في

السرطانات الأخرى مثل سرطان القولون والمستقيم وسرطان الثدي (Aberle, 2011)، أمّا العامل الثاني هو عدم الاستفادة من العلاجات الكيميائية والاشعاعية من قبل المصابين (Socinski et al., 2013).

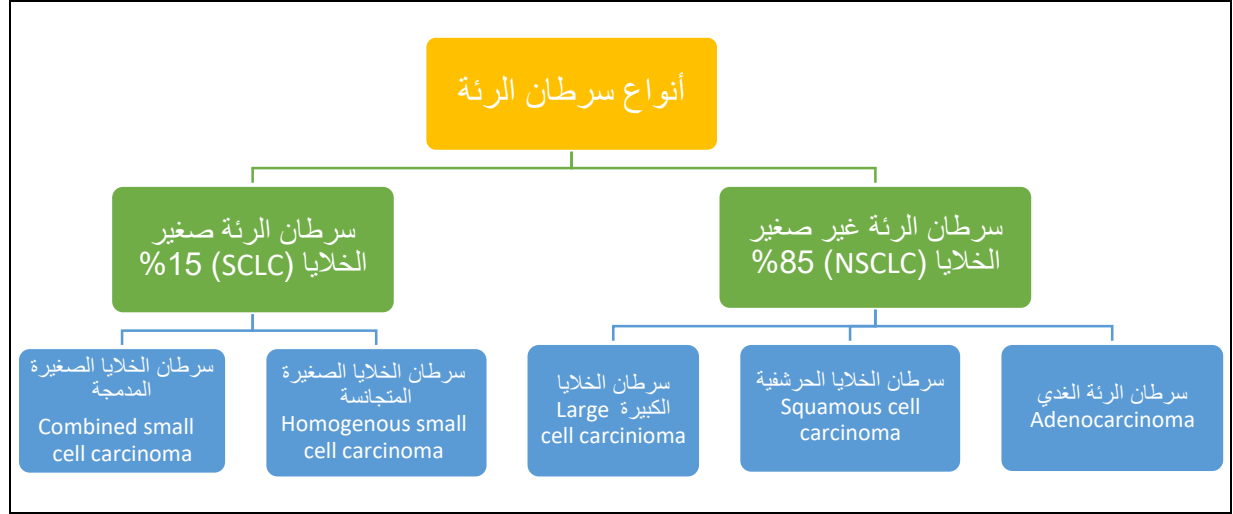
يتطور سرطان الرئة من النمو غير الطبيعي للخلايا داخل الرئتين أو القصبة الهوائية أو القصيبات الهوائية (Scobie, 2021)، حيث تبدأ اغلب سرطانات الرئة بمختلف أنواعها بالغشاء الذي يبطن القصبات الهوائية، والذي يتكون بجانب الرئتين على الاغلب واحياناً يتكون في خلايا الغدد الموجودة تحت غشاء القصبات الهوائية، يعد سرطان الرئة مهدداً للحياة وذلك لأنه ينتشر عن طريق الدم بعملية تدعى النقائل Metastasis، لكن عندما ينتشر سرطان من جزء اخر من الجسم مثل سرطان الأمعاء أو سرطان الثدي إلى الرئة فإن السرطان الذي أصاب الرئة يتم تعيينه على انه سرطان ثانوي، فيجب على المريض ان يكتشف فيما إذا كان السرطان قد بدأ في الرئة أو انتشر إليها من مكان اخر في الجسم، إذ ان عملية التحقيق هذه سوف تفيد المريض في تحديد خطوات العلاج (Drake et al., 2014)، في الغالب لا تظهر اعراض على المصابين بسرطان الرئة الا بعد انتشاره بعيداً في الجسم، ولكن يمكن ان تظهر بعض الاعراض عند بعض الأشخاص المصابين في المراحل المبكرة من المرض والتي تشمل سعال شديد ومستمر، وضيق في التنفس والام في الصدر، وحُمى ونفث في الدم، وفقدان في الوزن، وصوت خشن مع صفير، بالإضافة إلى صعوبة البلع ومشاكل ثانوية متكررة في الرئة مثل الالتهاب الرئوي أو التهاب الشعب الهوائية (محمد، 2022).

إنّ سرطان الرئة هو من السرطانات الصلبة Solid tumors التي يصعب علاجها، إذ ان حوالي 50% من الأشخاص المصابين بسرطان الرئة يموتون خلال مدة أقصاها 12 شهراً الأولى بعد ان يتم تشخيص المرض، وحوالي 15% - 18% فقط يعيشون لمدة 5 سنوات إذا تلقوا العلاج المناسب (Zappa & Mousa, 2016)، ويرتبط خطر الإصابة بسرطان الرئة بشكل أساسي بالتدخين Smoking، إذ يعد التدخين عاملاً مهماً وخطراً للإصابة بسرطان الرئة (Tyczynski et al., 2003) (Adami et al., 2018؛)، فقد ذكر (Mattson et al. (1987 ان تدخين السجائر يعد سبباً رئيسياً لسرطان الرئة، إذ ان 86% من المدخنين يتطور لديهم سرطان الرئة في المرحلة المتأخرة من حياتهم و10-15% بالنسبة للتدخين السلبي، بالإضافة إلى التدخين، فان نمط الحياة وما يترتب عليه من حالات التوتر والاكتئاب الناتجة من التعرض للضوضاء من البيئات الصناعية المحيطة بالفرد يساهم ايضاً بشكل جزئي في الإصابة بسرطان الرئة، حيث أوضحت نتائج ما لا يقل عن 25 دراسة تضمنت مشاركة أكثر من 1400000 شخصاً، ان 89716 ألف حالة إصابة بسرطان الرئة كان سببها حالات التوتر والاكتئاب،

حيث ان هنالك علاقة بين سرطان الرئة والاكنتئاب ولكن لا توجد مثل هذه العلاقة في السرطانات الأخرى (Jia *et al.*, 2017)، إذ ان الاكنتئاب يرتبط ارتباطاً وثيقاً بانخفاض الخلايا القاتلة الطبيعية (Natural killer cell (NKC) (Irwin & Miller , 2007)، الامر الذي يسبب زيادة في مستويات الكورتيزول cortisol (Katuri *et al.*, 2016)، ومن عوامل خطر الإصابة بسرطان الرئة ايضاً هي التعرض للإشعاعات النووية، حيث يزيد التعرض للإشعاع النووي معدل الطفرات الجينية في الأنسجة الطبيعية مما يؤدي إلى تحول هذه الانسجة من طبيعية إلى خبيثة (Li *et al.*, 2017)، ويساهم التعرض المستمر لمواد الاسمنت والاسبستوس في زيادة القابلية للإصابة بسرطان الرئة لدى الافراد المصابين بأمراض سابقة متعلقة بالرئة (Oddone *et al.*, 2014)، بالإضافة إلى ذلك يمكن ان يكون الاستعداد الوراثي للإصابة بسرطان الرئة عاملاً مهماً للإصابة، إذ ان موت احد افراد العائلة بسرطان الرئة يمثل عامل خطر يساهم في تعرض افراد الاسرة الاخرين للإصابة بسرطان الرئة في المستقبل (Hmmier, 2018).

2.2 أنواع سرطان الرئة Types of lung cancer

اعتماداً على الاختلافات في التشريح النسيجي، يمكن تصنيف سرطان الرئة على صنفين رئيسيين هما: سرطان الرئة ذو الخلايا غير الصغيرة (Non-small cell lung carcinoma (NSCLC) الذي يشكل نسبة 85% من مجموع الأورام السرطانية للرئة، والنوع الثاني هو سرطان الرئة ذو الخلايا الصغيرة (Small cell lung carcinoma (SCLC) الذي يشكل نسبة قليلة مقارنةً بالنوع الأول، إذ يشكل حوالي 15% من مجموع الأورام السرطانية للرئة (Guo *et al.*, 2022 ; Yang *et al.*, 2022)، كما هو موضح في الشكل (1-2) (محمد، 2022).



شكل (1-2) مخطط تصنيفي لأنواع سرطان الرئة (محمد، 2022).

ان الأنواع المختلفة من سرطان الرئة تنشأ من أنواع خلايا مختلفة في الأنسجة الظهارية في الرئة (Lofling, 2020) Epithelial tissues، ومن المهم جداً التفريق بين هذين النوعين لسرطان الرئة؛ لأن طرق العلاج تكون مختلفة ومتنوعة لكل نوع بالإضافة إلى ذلك تعتمد أهمية تشخيص وتقديم المرض على معرفة كل نوع بشكل دقيق (Travis et al., 2015 ; Pandi et al., 2016).

1.2.2 سرطان الرئة غير صغير الخلايا Non-small cell lung cancer

يشكّل سرطان الرئة ذو الخلايا غير الصغيرة NSCLC نسبة تتراوح بين (85 – 95%) من مجموع أنواع سرطانات الرئة الأخرى (Travis et al., 2015 ; Akbulut et al., 2020)، وان فرص البقاء على قيد الحياة بعد الإصابة بهذا النوع من السرطان لمدة خمس سنوات تتراوح بين (10 – 15%)، ومن الاعراض التي تظهر على المريض هي فقدان الوزن والحمول التام (Balta et al., 2013)، يتضمن هذا النوع ثلاثة انواع فرعية رئيسية وهي سرطان الخلايا الغدية Adenocarcinoma وسرطان الخلايا الحرشفية Squamous cell carcinoma وسرطان الخلايا الكبيرة Large cell carcinoma وتختلف هذه الأنواع من حيث الشكل والحجم عند فحصها تحت المجهر (القتلاوي وآخرون ، 2018)، ولكن تدمج معاً لان طريقة التشخيص والعلاج تكون مماثلة بين الأنواع الثلاثة (Pandi et al., 2016).

إنّ تطور سرطان الرئة ذو الخلايا غير الصغيرة يمكن ان يمر بأربع مراحل (I ، II ، III ، IV) (Lovgren et al., 2008)، يتم تصنيفها اعتماداً على نظام Tumor size, Nodules، Metastasis (TNM) للتدرج السريري (Zhang et al., 2010)، ترتبط هذه المراحل بارتفاع عدد

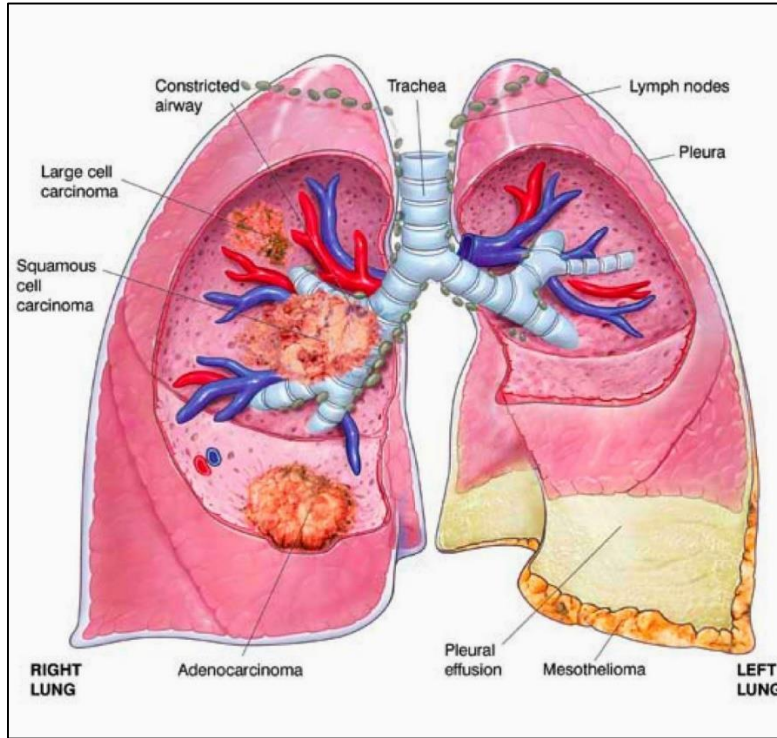
الوفيات، إذ ان السبب الرئيس لارتفاع معدل الوفيات هو تشخيص 15% من المرضى في المرحلة المبكرة من الإصابة في حين يتم تشخيص 70% منهم في المرحلة المتأخرة (Sha'Shonda & Lee , 2018)، والسبب في ذلك يعود إلى ان الاعراض الظاهرة على المريض تكون طفيفة نسبياً في المراحل المبكرة وبالتالي قد يتجاهلها المرضى (Guo et al., 2022)، وأشار (Ahern et al. (2021 ان سرطان الرئة ذو الخلايا غير الصغيرة لا ينتقل في المراحل المبكرة، وبالتالي يمكن اجراء استئصال جراحي للورم من شأنه ان يطيل عمر المريض، ولكن قد يكون التدخل الجراحي غير مجدي إذا كان المريض في المرحلة المتقدمة من المرض، ولذلك فإن معدل تشخيص NSCLC في المراحل المبكرة لايزال يمثل مشكلة كبيرة.

2.2.2 سرطان الرئة صغير الخلايا Small cell lung cancer

يمثل سرطان الرئة ذو الخلايا الصغيرة SCLC أو سرطان خلية الشوفان Oat cell carcinoma نسبة تتراوح بين (15 – 20 %) من كل حالات سرطان الرئة المشخصة، وعلى الرغم من نسبته القليلة مقارنةً بأنواع سرطان الرئة الأخرى، فإنه يوصف بالعدوانية وسرعة نموه وانتشاره المبكر للأنسجة المجاورة مما يجعل اكتشافه في وقت مبكر أكثر صعوبة في المراحل الأولى من الإصابة (Scobie, 2021)، يرتبط بالتدخين وتاريخ المدخن بشكل كبير جداً (Lewis et al., 2014)، يبدأ هذا النوع من السرطان في المسالك التنفسية الهوائية الكبيرة (القصبات الهوائية الرئيسية الأولية والثانوية)، ومن ثم ينمو وينتشر بسرعة كبيرة جداً (Collins et al., 2007)، بشكل عام تظهر الخلايا تحت المجهر بشكل كتلة رمادية اللون باهتة تكون ذات شكل دائري أو مغزلي تحتوي على سيتوبلازم قليل جداً مع كروماتين حبيبي ودقيق، تحتوي هذه الخلايا على حويصلات محتوية على هرمونات الغدد الصم العصبية Neuroendocrine hormone؛ لذلك ارتبط هذا الورم بمتلازمة الغدد الصماء Paraneoplastic endocrine syndrome (الورد، 2019)، بالإضافة إلى ذلك يمتاز سرطان الرئة ذو الخلايا الصغيرة بوجود نسبة عالية من الطفرات الجسدية Somatic mutation (Tian et al., 2019)، وبالرغم من حساسيته للعلاج الكيميائي فإنه يعد اخطر الأنواع السرطانية المرتبطة بالرئة، إذ انه غالباً ما يكون منتشرراً إلى الخلايا المجاورة (Pandi et al., 2016)، وعادة ما يحدث لمعظم المرضى انتكاسة خلال أول عامين من العلاج (Zheng, 2016).

يمكن تصنيف سرطان الرئة ذو الخلايا الصغيرة إلى فرعين هما: سرطان الخلايا الصغيرة المتجانسة Homogenous small cell carcinoma وسرطان الخلايا الصغيرة المدمجة Combined

small cell carcinoma (Tamasi & Muller, 2011)، يتم تصنيف سرطان الرئة ذو الخلايا الصغيرة SCLC على مرحلتين: المرحلة الأولى هي المرحلة المحدودة Limited-stage small cell lung carcinoma (LS-SCLC) والمرحلة الثانية هي المرحلة الواسعة Extensive stage small cell lung carcinoma (ES-SCLC) (Tian *et al.*, 2019)، إذ إن المرحلة المحدودة تعادل تقريباً المراحل من (I – IIIA) من NSCLC، أي إن السرطان في هذه المرحلة قد أصاب إحدى الرئتين أو كليهما أو قد يصيب العقد الليمفاوية في الصدر، أمّا المرحلة الواسعة فتعادل تقريباً المرحلتين (IIIB و IV) من NSCLC، وهذا يعني انتشار السرطان إلى مناطق بعيدة في الجسم (Tamasi & Muller, 2011)، والشكل (2-2) يوضح مواقع الإصابة بأنواع سرطان الرئة (محمد، 2022).



شكل (2-2) مواقع الإصابة بأنواع سرطان الرئة (محمد، 2022).

3.2 مراحل سرطان الرئة Lung cancer staging

إن معرفة مراحل سرطان الرئة لها أهمية بالغة في تحديد العلاج المناسب لكل مرحلة، فقد يستخدم الأطباء علاجات مثل العلاج الإشعاعي والجراحي إذا كان انتشار السرطان في موقع محدد داخل الرئة، أمّا إذا انتشر في الأماكن البعيدة من الجسم فقد يستخدم علاجات مختلفة مثل العلاج الكيميائي

Chemotherapy، والعلاج الهرموني hormone therapy، وبعض الأدوية التي تستهدف الخلايا السرطانية ويطلق على هذا النوع من العلاجات بالعلاجات الجهازية (systemic treatments Omar) (et al., 2020)، وبالتالي فإن معرفة مراحل سرطان الرئة تسهل تبادل المعلومات بين الأطباء حول المرضى المصابين من أجل اختيار العلاج الأمثل لكل مريض، إذ إن تحديد درجة المرحلة له أهمية كبيرة في تشخيص المرض وتطوره والتنبؤ بنتائج العلاج (Telloni, 2017).

ذكر (Brierley et al. (2017)، إنه يمكن تقسيم مراحل أنواع السرطان ومن ضمنها سرطان الرئة على أربع مراحل يتم كتابتها بالأرقام اللاتينية (I، II، III، IV) وهذه المراحل هي كالآتي:

a- المرحلة الأولى Stage I: في هذه المرحلة يكون الورم صغير نسبياً وعادةً ما يكون داخل جزء من الرئة.

b- المرحلة الثانية Stage II: في هذه المرحلة يكون الورم أكبر نسبياً من المرحلة الأولى ولم ينتشر في الأنسجة المحيطة أو يكون قد بدأ بالانتشار إلى العقد اللمفاوية التي تكون قريبة من الورم.

c- المرحلة الثالثة Stage III: في هذه المرحلة يكون الورم أكبر مما هو عليه في المرحلة الثانية، إضافةً إلى انتشاره في الأنسجة المحيطة والعقد اللمفاوية في منطقة الورم.

d- المرحلة الرابعة Stage IV: وهي الأخطر من بين مراحل سرطان الرئة، وفيها ينتشر الورم إلى الأعضاء الأخرى في الجسم حيث يسمى السرطان في هذه المرحلة بالسرطان النقيلي Metastatic cancer.

يعتمد تشخيص مرحلة السرطان على نظام TNM والمقصود به نظام الورم والعقدة والانتشار، وهو عبارة عن نظام تدرج سريري يستخدم في تشخيص مراحل السرطان ومن ثم توجيه علاج نهائي لكل مرحلة، تم اقتراحه بشكل تعاوني من قبل اللجنة الأمريكية المشتركة لمكافحة السرطان American Joint Committee on Cancer (AJCC) والاتحاد الدولي لمكافحة السرطان Union for International Cancer Control (UICC) على شكل إصدارات مختلفة آخرها كان الإصدار الثامن eighth edition (Detterbeck et al., 2017)، حيث يوفر هذا النظام تقسيماً سريرياً وموضعياً للورم بشكل تدرجي، ويختلف هذا التدرج في SCLC عنه في NSCLC، إذ يتم تصنيف SCLC إلى مرحلتين هما: المرحلة المحدودة وفيها تبقى عقيدات الورم في فص واحد من الرئة والمرحلة الواسعة والتي ينتشر فيها الورم إلى الرئة الأخرى وأجزاء من الجسم مثل نخاع العظم (Chan & Coward, 2013)؛ (Hmmer, 2018). أمّا في NSCLC فيصنف نظام TNM السرطانات اعتماداً على حجم الورم ومكانه

ويرمز له (T) وتندرج من (T4 – T0)، ووجود أو عدم وجود عقد للمفاوية مصابة (أي امتداد الورم إلى العقد للمفاوية من عدمه) ويرمز لها (N) وتندرج من (N3 – N0)، واخيراً يصنف سرطان الرئة اعتماداً على وجود انتشار للمرض إلى أماكن أخرى في الصدر أو أعضاء بعيدة في الجسم من عدمه ويرمز له (M) وتندرج من (M1 – M0) (Kale & Yadav, 2020)، وهكذا فإن TNM النهائي يتضمن مزيجاً من خصائص الورم والعقد للمفاوية بالإضافة إلى وجود أو عدم وجود انتشار لهذا الورم (Nooreldeen & Bach, 2021)، ولغرض العمل بهذا النظام يخضع المرضى المصابين بسرطان الرئة لسلسلة من الفحوصات المتمثلة بالتصوير المقطعي المحوسب "المفّرّاس" Computerized tomography (CT)، والتصوير بالموجات فوق الصوتية Magnetic Resonance Imaging (MRI) التي تعد أفضل طريقة للكشف عن العقد الليمفاوية المنتشرة إليها الورم، أمّا الأطباء فيفضلون (CT) على كل أجهزة الفحص الأخرى كونهم يتعاملون مع الرأس وامراض العقد الليمفاوية في الرقبة، بالإضافة إلى ذلك فإن التصوير المقطعي المحوسب يتميز بإخراج صور دقيقة لتحديد مراحل سرطان الرئة (Hmmier, 2018).

4.2 عوامل الخطورة Risk factors

1.4.2 التدخين Smoking

يعد تدخين التبغ من أهم العوامل المساهمة في الإصابة بسرطان الرئة، إذ ان حوالي 72% من حالات سرطان الرئة مسؤول عنها استهلاك التبغ (Brown et al., 2018)، وان معدل الوفيات أعلى بحوالي 15 مرة لدى المدخنين مقارنةً مع غير المدخنين (Doll et al., 2005)، حيث ان هذا الخطر يزداد بزيادة الاستهلاك اليومي للسجائر، وطول مدة التدخين بالإضافة إلى بدء التدخين في سن مبكرة (Kenfield et al., 2010)، وان نسبة 10 – 15% من المدخنين يتطور لديهم سرطان الرئة في المراحل المتأخرة من حياتهم أي انها تشكل ما يقارب 86% من كل حالات سرطان بما في ذلك التدخين السلبي Passive smoking (Hmmier, 2018)، حيث ان التدخين السلبي أقل خطورة من التدخين المباشر، ولكن على الرغم من ذلك فإنه يمكن ان يزيد من قابلية الإصابة بسرطان الرئة بنسبة 25% بالمقارنة مع الأشخاص الذين لم يتعرضوا للتدخين السلبي اساساً (Wang et al., 2015). وذكر (Kim et al., 2014) ان التدخين السلبي مرتبط بسرطان الرئة ذو الخلايا الصغيرة بصورة أكبر مما هو عليه في سرطان الرئة ذو الخلايا غير الصغيرة. ان دخان السجائر عبارة عن خليط من المواد الكيميائية السامة وأثبتت ذلك العديد من

الدراسات العلمية، حيث اشارت هذه الدراسات إلى ان دخان السجائر يؤدي إلى احداث تغييرات في الجينات المسؤولة عن ظهارة الانف والبلاعم السنخية Alveolar macrophage، بالإضافة إلى الدم المحيطي (الورد، 2019). لقد شار (Al-Azzawi et al. 2017) ان التدخين هو أحد اهم الأسباب الرئيسية التي تؤدي إلى الاصابة بسرطان الرئة لدى الكثير من المرضى العراقيين الذين لا تتجاوز أعمارهم 40 عام.

إن الآلية الرئيسية للمواد الكيميائية المسرطنة التي توجد في التبغ ترتبط بالحمض النووي DNA وتكوّن ما يسمى DNA adducts (جزء من الحمض النووي DNA مرتبط بمادة كيميائية مسرطنة)، وهذه المواد لا يمكن ازالتها مما يؤدي إلى حدوث طفرات على مستوى الجينات التي تسيطر على نمو الخلايا Cell growth، وهذه الجينات إذا لم يتم إصلاحها تؤدي إلى عدم التحسس لإشارات تثبيط النمو وبالتالي تهرب الخلية من عملية الموت المبرمج مما يؤدي إلى حدوث انقسامات غير محدودة بالإضافة إلى تكوّن مستمر للأوعية الدموية التي بدورها تساهم في غزو الانسجة المجاورة بعملية تدعى الانتشار النقيلي Metastasis (Hecht, 2012)، لذلك وبسبب كل هذه المخاطر فإن التوقف عن التدخين هي الطريقة المثلى لتقليل خطر الإصابة بسرطان الرئة (Pirie et al., 2013).

2.4.2 المواد المشعة Radioactive material

بشكل عام هناك نوعان من مصادر الاشعاع التي قد يتعرض لها الانسان في حياته وهي أمّا مصادر طبيعية التي تمثل الاشعاعات الأرضية الداخلية والنظائر المشعة التي يكون أصلها الكون والطبيعة، أو مصادر اصطناعية التي تمثل كل الاشعاعات التي يتدخل الانسان في صناعتها، وفي كلتا الحالتين (المصادر الطبيعية والاصطناعية) تنبعث جزيئات الفا وبيتا عن طريق النظائر المشعة Radionuclides الناتجة من تفكيك اليورانيوم Uranium أو الثوريوم Thorium، والتي يمكن ان تدخل إلى جسم الانسان عن طريق الاستنشاق مسببةً اضراراً كبيرةً على خلايا الجسم (Aswood et al., 2017). من الأمثلة على المواد المرتبط بسرطان الرئة هو غاز "الرادون" Radon، وهو عبارة عن غاز طبيعي نبيل مشع ناتج عن تفكك اليورانيوم-238، تم الاعتراف به كأول مادة بيئية مسرطنة للرئة (Sethi et al., 2012)، يعد التعرض للرادون السبب الرئيس الثاني لسرطان الرئة بين المدخنين والسبب الرئيس الأول بين غير المدخنين (Bush, 2018)، إذ انه بمجرد دخول الرادون إلى جسم الانسان خلال عملية الاستنشاق فإنه يتحلل وبيعت اشعاع الفا الذي يؤدي إلى تلف الحمض النووي DNA ولاحقاً يتطور الورم، وتشير الأبحاث العلمية إلى ان التعرض للرادون في الأماكن المغلقة يساهم تقريباً بنسبة 10% من حالات سرطان الرئة (Lofling, 2020). وفي دراسة أجريت على بعض الأشخاص المصابين بسرطان الرئة في محافظة بابل وجد ان

تركيز جزيئات الفا المنبعثة من غاز الرادون تكون أكبر في الاناث مقارنةً بتركيزها في الذكور، وتُعزى أسباب ذلك إلى أنّ الاناث يمكثون فترات أطول في المنزل مقارنةً بالذكور، ووفقاً لكل ما تقدم، صَنَفَت الوكالة الدولية لأبحاث السرطان (IARC) International Agency for Research on Cancer الرادون على انه مادة مسرطنة (Naji & Hassoon, 2021).

3.4.2 الاسبستوس Asbestos

الاسبستوس مادة ذات بنية بلورية ينتمي لعائلة السليكا الليفية يحتوي على الكثير من المواد الكيميائية ويتمتع بخواص فيزيائية فريدة من نوعها، مقاوم للحرارة والظروف البيولوجية والانحلال الكيميائي (Suraya, 2020). يعد الاسبستوس السبب المهني الأكثر شيوعاً لسرطان الرئة، إذ قدرت منظمة الصحة العالمية أنّ 125 مليون شخصاً تقريباً حول العالم ممن يتعرضون للأسبستوس يكونون عرضة للإصابة بسرطان الرئة (Lofling, 2020)، حيث ان الأشخاص الذين يتعاملون مع مادة الاسبستوس اثناء عملهم في المناجم والمصانع التي يستعمل فيها العزل ولا سيما المدخنين منهم، معرضين للإصابة بسرطان الرئة أكثر من الأشخاص الذين لم يعملوا في هذه الأماكن قط (Dodic Fikfak et al., 2007).

4.4.2 التاريخ العائلي History of family

إنّ وجود تاريخ عائلي للإصابة بسرطان الرئة يزيد بشكل كبير من خطر الإصابة بهذا النوع من السرطان، إذ يزداد خطر الإصابة بنسبة 50% لدى الأشخاص الذين لديهم تاريخ عائلي مع الإصابة، هناك ارتباط مهم بين الأشقاء والإصابة بسرطان الرئة، حيث اكدت بعض الدراسات ان خطر الإصابة مرتبط بالأشقاء أكثر مما هو مرتبط بالوالدين بالنسبة للتاريخ العائلي للإصابة (Cote et al., 2012)، وقد يكون خطر الإصابة مرتبط بالعوامل الوراثية التي تساهم في الاستعداد الوراثي للإصابة بسرطان الرئة (Scobie, 2021)، أو ربما يعزى إلى التعرض المشترك للأشقاء إلى نفس العوامل البيئية المسببة للسرطان أو إلى وراثة بعض الجينات المتنحية (Lofling, 2020).

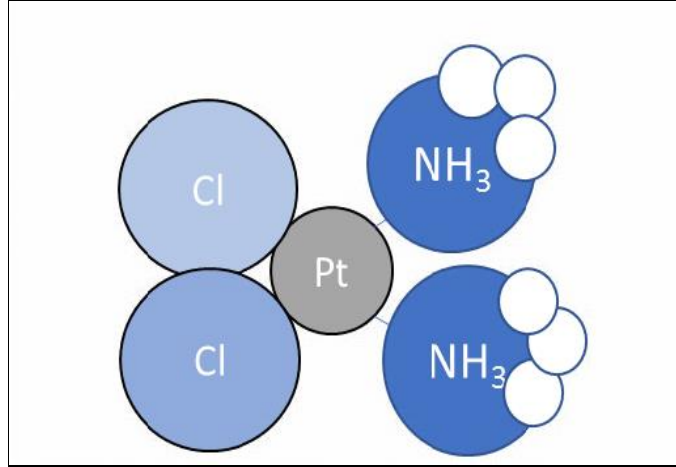
5.2 العلاج الكيميائي لسرطان الرئة Chemotherapy for lung cancer

تم اكتشاف العلاجات الكيميائية المعتمدة على البلاتين في عام 1945 من قبل الكيميائي الإيطالي Michele Peyrone، في حين تأكدت قدرتها المضادة للخلايا السرطانية في عام 1965 من قبل عالم الاحياء الأمريكي Barnett Rosenberg (Ghosh, 2019)، ومن خلال الدراسات السريرية على

علاجات البلاتين، تم اكتشاف عقار السيسبلاتين لأول مرة عام 1977 عندما استخدم ضد سرطان المثانة وسرطان الخصية (Ghosh, 2019)، وبعد ذلك اظهر فعالية ضد الكثير من الأورام السرطانية (Amable, 2016)، إذ استخدم منذ سنوات عديدة تحت مسمى Peyrone chloride نسبةً إلى اسم مكتشفه Michele Peyrone، لكن لم تثبت خصائصه العلاجية حتى عام 1978 بعد نجاحه في علاج عدة أنواع من الأمراض السرطانية مثل سرطان المبيض، وسرطان العنق، وسرطان القولون والمستقيم، وسرطان البروستات، وسرطان الرئة، وقد ظهر تأثيره لاحقاً في سرطان الغدد اللمفاوية lymphoma، وكذلك في Osteosarcoma، وأنواع أخرى من السرطان (Roldan-Fidalgo et al., 2016 ; Achkar et al., 2018 ; Szturz et al., 2019)، ليبقى أول علاج كيميائي تم استخدامه ضد مرض السرطان (Zheng et al., 2017).

1.5.2 عقار السيسبلاتين Cisplatin drug

السيسبلاتين أو سيس – ثنائي كلوروبلاتين الثنائي - II - (CDDP) (Awad et al., 2020)، وهو علاج كيميائي معتمد على البلاتين يستخدم لعلاج الأمراض الخبيثة المرتبطة بعدة أنواع من السرطان في العديد من الأنسجة (Riddell, 2018 ; Nasiri et al., 2020)، مثل سرطان المثانة Bladder cancer، وسرطان المبيض Ovarian cancer، وسرطان الرئة Lung cancer، وسرطان الخصية Testicular cancer، وسرطان المريء Esophageal cancer، وسرطان عنق الرحم Cervical cancer، وسرطان الثدي Breast cancer، والذي يعطى غالباً عن طريق الحقن الوريدي Intravenous injection (Aldossary, 2019)، حيث ثبت نجاحه سريرياً في معالجة الأورام السرطانية بسبب ارتباط اثنين من روابط الكلوريد حول البلاتين (Zhu et al., 2016)، كما هو موضح في الشكل (3-2) (Brown et al., 2019).



شكل (2-3) التركيب الكيميائي للسيسبلاتين **Cisplatin**: البلاتين Pt يتمركز في الوسط وحوله اثنين من روابط الكلوريد Cl (على جهة الشمال) مع اثنين من مجموعات الأمين NH₃ (على جهة اليمين) (Brown et al., 2019).

يبدأ عمل السيسبلاتين داخل الجسم بعد أن يدخل إلى سيتوبلازم الخلايا السرطانية ليشكل فيما بعد روابط تساهمية مع الحمض النووي DNA، وهذه الروابط تقوم بعرقلة عملية نسخ وتضاعف الحمض النووي في الخلايا السرطانية (Comsa et al., 2018)، وبالتالي يتم تنشيط آلية اصلاح الحمض النووي DNA مؤدية إلى الموت الخلوي المبرمج للخلايا المصابة (Morovati et al., 2019)، وان نشاطه المضاد للسرطان ليس مقتصرأ فقط على الارتباط بالحمض النووي DNA وتثبيط عملية الانقسام الخلوي (هذه الأحداث بدورها تؤدي إلى الموت المبرمج للخلايا)، بل يتعدى ذلك، حيث اكدت بعض الدراسات ان للسيسبلاتين تأثيرات مناعية عن طريق استخدامه كمعدّل مناعي Immunomodulatory (تنظيم التوازن في الجهاز المناعي)، وهذه التأثيرات ربما تكون مهمة جداً لمكافحة الأورام وقتل الخلايا الليمفاوية المنتشرة، ويأتي استخدام السيسبلاتين كمعدّل للمناعة في الوقت الذي تعمل فيه الأورام السرطانية على اشراك جهاز المناعة بشكل مباشر عن طريق استراتيجيات مضادات الورم (De Biasi et al., 2014). وأشار (Ock et al., 2017) ان للسيسبلاتين تأثير على تعبير البروتين PDL-1 في الخط الخلوي لسرطان الخلايا الحرشفية للرأس والعنق HNSCC، وبعد استخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry لوحظ ان هنالك زيادة في تعبير هذا البروتين مقارنةً مع تعبيره الأساسي قبل المعالجة بالسيسبلاتين وكانت هذه الزيادة بسبب تأثيره على مسارات البروتينات التي تنقل الإشارة من سطح الخلية إلى الحمض النووي مثل مسارات MEK Pathways، كما أوضح (Gi et al., 2019) ان عقار السيسبلاتين له تأثيرات سمية

خلوية في المختبر على خط الخلايا السرطانية للرئة البشري A549 وذلك عن طريق تنشيط البروتين الكابح للورم p53 والذي عند تنشيطه تبدأ عملية الاستجابة لتعطيل الحمض النووي DNA مما يؤدي إلى توقف الخلية عن الانقسام الخلوي وموتها في المزرعة، وذكر (Obied *et al.*, 2018) ان عدد الخلايا Cell viability انخفض في الخط الخلوي السرطاني A549 بعد معالجته بتراكيز منخفضة من السيسبلاتين في المختبر، كما اتضح تأثيره السمي الخلوي على الكثير من الخطوط الخلوية السرطانية مثل HepG2 و MCF7 و CaCo2 و PANC1 بعد معالجتها بتراكيز مختلفة منه (Awad *et al.*, 2020)، وبذلك عدّ السيسبلاتين من أكثر أنواع العلاجات الكيميائية المستخدمة ضد السرطان ولاسيما سرطان الرئة بنوعيه (SCLC و NSCLC)، إذ أنه اظهر فائدة كبيرة تساعد المرضى في البقاء على قيد الحياة لمدة 5 سنوات بنسبة 5.3% بعد استخدامه في العلاج (Dasari & Tchounwou, 2014).

إنّ الخاصية السمية للسيسبلاتين مماثلة لكل أنواع العلاجات الكيميائية، حيث انه لا يؤثر على الخلايا السرطانية فحسب بل كذلك يمكن ان يؤثر على الخلايا الطبيعية ويرتبط بالحمض النووي الخاص بها وبالتالي يثبط تضاعفه ونسخه (Siddik, 2003)، ولهذا السبب يؤدي استخدامه إلى آثار ضارة للمريض بما في ذلك نقص المغنيسيوم hypomagnesemia، والتسمم الكلوي nephrotoxicity، وتثبيط عمل المناعة Immunosuppression، والتهاب الإذن Otitis، واعتلال الاعصاب Neuropathies (Katabalo *et al.*, 2018)، إضافة إلى ذلك، فأن بعض المرضى يطورون مقاومة لعلاج السيسبلاتين وذلك بسبب تطور بعض الجينات أو البروتينات المقاومة للأدوية المتعددة Multiple drug resistance (MDR) (Cheng *et al.*, 2018)، وأنّ هذه المقاومة للأدوية تشكل عقبة كبيرة أمام علاج السرطان، وبالتالي فإن إعطاء السيسبلاتين مع منتجات طبيعية ممكن ان يقلل الآثار الجانبية له ويعطي آلية عمل مختلفة كنهج محتمل لمنع تطور السرطان، بالإضافة إلى تحسين كفاءة العلاج الكيميائي (Awad *et al.*, 2020).

6.2 العكبر Propolis

إنّ المنتجات الطبيعية Natural products مثل المواد الكيميائية النباتية Phytochemicals لها القدرة على استهداف الخلايا السرطانية بشكل انتقائي دون التأثير على الخلايا السليمة حتى بكمية من الجرعات الصغيرة (Tanveer *et al.*, 2011)، حيث أظهرت دراسات متعددة ان بعض المنتجات الطبيعية المستخلصة من الفواكه والخضراوات لها تأثيرات وقائية كيميائية ضد سرطان الرئة (Surien *et al.*, 2019)، وبما ان العلاج الكيميائي له آثار جانبية عند الاستخدام، اصبح من الضروري تطوير

منتجات طبيعية تكون أكثر فعالية مع آثار جانبية قليلة بحيث تقل بشكل كبير من وفيات المرضى المصابين بسرطان الرئة، ومن هذه المنتجات هو العكبر (Brihoum *et al.*, 2018)، حيث أظهرت بعض الدراسات ان العكبر قد يؤثر على فعالية العلاج الكيميائي ويقلل من آثاره الجانبية في العديد من الأمراض السرطانية (Sameni *et al.*, 2021).

العكبر مادة راتنجية طبيعية صمغية ينتجها نحل العسل ويجمعها من مصادر طبيعية معتمدة على النباتات مثل براعم الأشجار والزهور الشقوق وغيرها ثم يقوم بمزجها مع الإفرازات اللعابية عن طريق انزيم β -glucosidase، وهو انزيم موجود في إفرازات اللعاب والشمع المهضوم جزئياً (Ipek *et al.*, 2022) ويستخدمها النحل للحماية من العدوى والالتهابات وكذلك لسد فجوات الفتحات في الخلية إضافة إلى استخدامه للحفاظ على درجة الحرارة الداخلية للخلية وكذلك تسوية سطح خلية النحل للحماية من الطقس المتقلب والحيوانات المفترسة (Elumalai *et al.*, 2022). كما ان النحل يستخدم العكبر لمنع هجوم الأعداء كالسحالي والضفادع والعناكب من الدخول إلى الخلية بالإضافة لتطهير البيوت السداسية وتحنيط أي كائن دخيل بعد ان يتم قتله بلسعات من قبل جيش النحل المدافع وذلك لمنع تفسخه وتعفنه إلى ان يتم سحبه إلى الخارج (Kuropatnicki *et al.*, 2013). يلعب نحل العسل *Apis Mellifera* الذي يعيش في أوروبا وجبال الأورال وإفريقيا وآسيا دوراً كبيراً في إنتاج العكبر (Dundar & Yildirim, 2018). يكون العكبر ناعماً ومرناً في درجات الحرارة المرتفعة بينما يكون صلباً وهشاً في درجات الحرارة المنخفضة ولكن بعد التبريد يبقى هشاً حتى في ارتفاع درجات الحرارة (Zabaiou *et al.*, 2017)، إضافة إلى ذلك يتميز العكبر بروائح عطرية معينة مع ألوان مختلفة بما في ذلك البني والأصفر والأخضر والأحمر وذلك اعتماداً على المصدر الذي تم الحصول عليه منه ووقت التخزين (Iqbal *et al.*, 2019 ; Dogan *et al.*, 2020).

يحتوي العكبر على العديد من المكونات المهمة المتمثلة بالمواد الراتنجية Resin حيث يحوي على ما يقارب (50%) إضافة إلى (30%) من الشمع Wax و(10%) زيوت عطرية Aromatic oils و(5%) حبوب لقاح Pollen و(5%) مواد أخرى مثل الأحماض الامينية Amino acids والفيتامينات Vitamins والاملاح المعدنية Mineral salts (Falcao *et al.*, 2019) وغيرها من المركبات الكيميائية بما في ذلك السكريات ومركبات الفلافونويدات والفينولات (Ahangari *et al.*, 2018)، وفي دراسة أجريت على التركيب الكيميائي للعكبر العراقي أوضحت ان المكونات الرئيسية له هي مركبات الفينولات المتعددة Polyphenole مثل الفلافونوات Flavones والتربينات Terpenes والأحماض

الدهنية Fatty acid وحمض الفينول Phenolic acid والاسترات Esters، إضافة إلى ذلك وجد ان العكبر العراقي يحوي على ما يقارب 32 نوعا مختلفا من الفلافونويدات Flavonoids تم التعرف عليها بواسطة الاستخلاص الكحولي لمادة العكبر عن طريق تقنية كروماتوغرافيا السوائل ذات الضغط العالي المرتبطة باستخدام مطياف الكتلة المتأينة بالرش الكهربائي (HPLC-ESI-MS) (Al-Seray et al., 2022)، هذه المكونات الموجودة في العكبر تمنحه خصائص مضادة للأكسدة ومضادة للالتهابات ومضادة للسرطانات بسبب التركيبة الغنية للمواد الفينولية (Falcao et al., 2019). ان آليات استخدام العكبر تطورت بمرور الوقت وهذا الشيء ساعد في الكشف عن الخصائص البيولوجية له بما في ذلك مضادات الجراثيم Antimicrobials ومضادات الاكسدة Antioxidants والتحور المناعي Immunomodulatory بالإضافة إلى التأثير المضاد للالتهابات (Alday et al., 2015 ; Przybyłek & Karpinski, 2019 ; de Mendonca et al., 2019)، لذلك يتم حالياً ادخال مادة العكبر أو مستخلصاته في مجموعة واسعة من منتجات الرعاية الصحية التكميلية مثل الكريمات والجل والمواد الهلامية ومستحضرات البشرة والشامبو إضافة إلى العلكة وبخاخات الحلق وشراب السعال وكذلك صناعة الصابون ومعجون الاسنان (Zulhendri et al., 2021)، بالإضافة إلى الخصائص المذكورة أعلاه، فإن العكبر ومركباته له تأثيرات مضادة للسرطان حيث اشارت العديد من الدراسات ان مستخلصات العكبر ومركباته الفعالة يمكن ان تؤثر على المسارات أو العمليات الرئيسية لتطور السرطان أي بمعنى انها تؤثر على التكاثر الخلوي Cell proliferation وكذلك الهروب من الموت المبرمج للخلايا Apoptosis وتكوين الأوعية الدموية Angiogenesis بالإضافة إلى تأثيرها على عملية انتقال الورم من نسيج إلى اخر داخل الجسم أي انها تؤثر على الأورام الخبيثة Metastasis ويمنع عملية الغزو Invasion للأماكن السليمة في الجسم، ويمكن استخدام العكبر ايضاً عن طريق اعطائه المرضى الخاضعين للعلاج الكيميائي والعلاج الاشعاعي لتقليل الآثار الجانبية لهذه العلاجات (Forma & Brys, 2021). هنالك دراسات عديدة بينت التأثيرات المضادة لمادة العكبر في الانقسام الخلوي والتأثير المناعي (Demir et al., 2016)، حيث أوضح (Vatansever et al., 2010) ان المستخلص الكحولي للعكبر اظهر تأثيرات مضادة للورم في الخط الخلوي لسرطان الثدي عن طريق زيادة عملية الموت المبرمج للخلايا خلال مسارات Caspase، حيث ان نشاط العكبر ومركباته الرئيسية المضادة للسرطان ثبت من خلال التجارب التي أجريت في المختبر In vitro وايضاً خارج الجسم الحي In vivo، حيث تم توضيح هذا النشاط بشكل جيد من خلال الدراسات التي أجريت على نوعين من العكبر هما العكبر الصيني والعكبر البرازيلي، حيث أوضحت الدراسات انهما يعملان على تثبيط نمو الخلية وزيادة عملية الموت

المبرمج في خط خلايا سرطان القولون البشري HCT116 cells (Jiang *et al.*, 2020) ، كما اظهر العكبر التاييلندي والعكبر التركي ايضاً صفات مضادة للأورام وذلك عن طريق تفتيت الحمض النووي DNA وتوقف دروة الخلية Arrest the cell cycle على الخط الخلوي لسرطان الرئة البشري A549 وأيضاً على خط خلايا هيلا HeLa cells (Demir *et al.*, 2016 ; Khacha *et al.*, 2016) ، وبطبيعة الحال كثيراً ما يتم ذكر العكبر في الأبحاث والمراجعات العلمية كعامل مضاد للورم antitumor بالإضافة إلى إمكانيته في عملية التعديل المناعي Immunomodulatory ، حيث بينت العديد من الدراسات في المختبر وفي الجسم الحي آلية عمل العكبر ومكوناته الكيميائية وخصائصه الحيوية المضادة للورم (Bankova, 2005 ; Sforcin, 2007) ، حيث ذكر (Bufalo *et al.* (2010) في دراسته حول تأثير العكبر ومركباته المعزولة على الخط الخلوي السرطاني (HEp-2 cell line) في المختبر وبينت الدراسة ان للعكبر تأثير سام للخلايا على الكثير من الخطوط الخلوية السرطانية، فضلاً عن تأثيراته السامة للخلايا في الجسم الحي وذلك عن طريق قيامه بالتحور المناعي Immunomodulatory (Orsollic *et al.*, 2005) ، حيث ان الكثير من الخلايا المناعية تتزايد باستمرار عند حدوث ورم معين داخل الجسم وذلك عن طريق تنشيط الخلايا البلعمة Macrophage والتي بدورها يمكن ان تتداخل مع الخلايا السرطانية أو مع وظائف خلايا مناعية أخرى عن طريق انتاجها عوامل قابلة للذوبان (Orsollic *et al.*, 2006) ، وفي دراسة أخرى أجريت على العديد من الخطوط الخلوية لسرطان الثدي Breast cancer cell line مثل BT-20, BT-474, BT-549, SKBR-3, MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-436, T47D, Hs578T أو وضحت ان مكونات العكبر لها تأثير مضاد للسرطان من خلال آلية الموت المبرمج للخلايا (Hermansyah *et al.*, 2022) ، حيث ذكر (Kamiya *et al.* (2012) ان المستخلص الايثانولي للعكبر ومركباته الفعالة حيويماً مثل CAPE لها القدرة على حث عملية الموت المبرمج في الخط الخلوي لسرطان الثدي MCF-7 من خلال تنظيم نشاط Caspase-3 وتجزئة الحمض النووي DNA fragmentation ، وأشار (Elnakady *et al.* (2017) في دراستهم على أهمية العكبر السعودي وتأثيراته على الخلايا السرطانية ، حيث بينت الدراسة ان الخلايا السرطانية المعالجة بالعكبر شوهد فيها عملية تثبيط للتكاثر الخلوي Cell proliferation بالإضافة إلى حث عملية الموت المبرمج وذلك بعدما اكدت تقنية (GC-MS) على وجود مركبات نشطة في العكبر السعودي المعزول من منطقة الباحة Al Bahah ، حيث أوضحت الدراسة ان لهذه المركبات القدرة على تثبيط نشاط التبولين Tubulin من خلال توقف دورة الخلية cell cycle في مرحلة G2M وبالتالي حث الخلية السرطانية على عملية الموت الخلوي المبرمج.

1.6.2 الخواص الفيزيائية Physical characteristics

يأخذ العكبر لوناً بنياً مع كل تدرجات الألوان الممكنة بين الأصفر والأسود ، وأحياناً تكون الألوان ضاربة إلى الاحمرار أو الاخضرار ويعود هذا الاختلاف باللون إلى الاختلاف في مصادر جمع العكبر، الطعم مميز ولكن يمكن ان يكون لاذع أو مُر بعض الشيء في بداية الامر لكنه يتلاشى تدريجياً اثناء عملية المضغ ، تتميز رائحته بانها عطرية وقوية حيث تجمع بين الروائح المميزة لكل من الراتنج والشمع والعسل والفانيليا ، على سبيل يأخذ عكبر الحور رائحة واضحة ومميزة جداً تماثل رائحة براعم هذه الأشجار ، أمّا من ناحية الصلابة فإن العكبر مادة متفاوتة الصلابة وذلك تبعاً لدرجة الحرارة (بالفار، 2016)، حيث يصبح صلباً وهشاً في درجات الحرارة أقل من 15 درجة مئوية أو في درجة حرارة التجميد بينما يصبح ليناً ومرناً ولزجاً بين درجات الحرارة التي تتراوح من (25 – 45) درجة مئوية، حيث عند تجميده سيبقى هشاً حتى بعد ارتفاع درجات الحرارة أعلى من 45 درجة مئوية ، أمّا في درجات الحرارة التي تتراوح بين (60 – 70) درجة مئوية سيصبح سائلاً ولكن نقطة انصهار بعض العينات قد تصل إلى 100 درجة مئوية (Sedra, 2019)، بالنسبة للتحليل الكيميائي فيمكن استخلاص العكبر عن طريق استخدام عدد كبير من المستخلصات المتوفرة تجارياً مثل الايثانول، والميثانول، والكلوروفورم، والايثر، والاسيتون، والماء ولكن الأكثر شيوعاً في الاستخدام هو الايثانول (Martinotti & Ranzato, 2015 ; Sedra, 2019).

2.6.2 المكونات الكيميائية Chemical constituents

إنّ التركيب الكيميائي للعكبر يعتمد بشكل كبير على الموقع الجغرافي والمصدر النباتي، أي العوامل المناخية ونوع النبات والمكان والوقت الذي تم جمعه فيه من قبل النحل (; Stojanovic et al., 2020) حيث أوضح (Sun et al., 2019) في دراستهم على معرفة الجودة لنوعين من العكبر هما العكبر الصيني والعكبر الأخضر البرازيلي ان أصل المصدر النباتي والتركيب الكيميائي للعكبر تربطهما علاقة وثيقة تؤدي إلى تغيير كبير في المكونات الكيميائية للعكبر، حيث ان المكونات الكيميائية للعكبر تختلف من منطقة إلى أخرى وباختلاف الموسم أيضاً وهذا قد يكون اكبر عقبة لمراقبة فعالية هذه المادة بشكل ثابت لذلك وعلى الرغم من إمكاناته العلاجية الواعدة فإن استخدامه كدواء أو كمكملات عشبية لم يحظى بالقبول الواسع في معظم بلدان المعمورة، وهذا السبب أدى إلى جمع هذه المادة من أماكن مختلفة حول العالم لمعرفة مكوناتها الكيميائية مما يساعد في توحيد المعلومات في عينات العكبر

التي تم جمعها بالإضافة إلى خصائصه الكمية والنوعية (; Pobiega *et al.*, 2019 ; Shahinozzaman *et al.*, 2021).

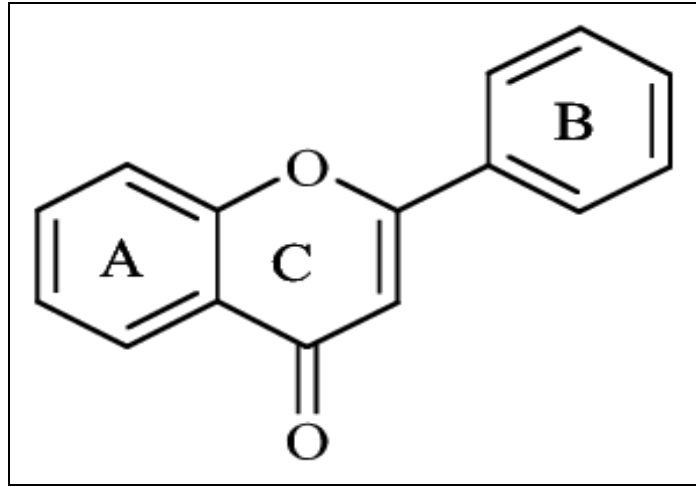
يعد التركيب الكيميائي للعكبر معقد جداً وقابل للتغيير، حيث يتكون بشكل عام من راتنج Resin وبلسم Balsam بنسبة تصل إلى (70 %)، شمع العسل Beeswax (أكثر من 10 %)، مركبات عضوية متطايرة Volatile organic compounds (1 % - 3 %)، بالإضافة إلى حبوب اللقاح (غبار الطلع) والمكونات الأخرى المتمثلة بالأحماض الاليفاتية Aliphatic acids واستراتها والأحماض العطرية Aromatic acids واستراتها، إضافة إلى احتوائه على المركبات الفلافونويدية Flavonoids والفينولات النباتية والتربينويدات Terpenoids والكربوهيدرات والأحماض الامينية (Burdock, 1998 ; De Almeida & Menezes, 2002 ; Cunha *et al.*, 2004 ; Kasote *et al.*, 2022)، كما يحتوي العكبر على العديد من الفيتامينات مثل (B1 , B2 , B3 , B5 , B6 , C , E)، إضافة إلى الكثير من المعادن مثل (Aluminum, Antimony, Calcium, Cesium, Copper,)، (Iron, Lanthanum, Manganese, Mercury, Nickel, Silver, Vanadium, and Zinc) (Anjum *et al.*, 2019)، وأشار (Sturm & Ulrich (2020) في دراستهما على التطورات الحديثة في التركيب الكيميائي للعكبر إلى انه يمكن ان يحتوي على 35 معدناً على الأقل بالإضافة إلى احتوائه على انزيمات مثل انزيم (β - glycosidase).

إنّ التحليل الكيميائي للعكبر العراقي من مناطق جغرافية مختلفة اظهر وجود مركبات مثل الفلافونويدات ومركبات التانين (عص) Tannin والقلويات Alkaloids والصبغ Mucilage والسابونين Saponin والدهون والتربينويدات Terpenoids، بالإضافة إلى الزيوت الطيارة والكومارين Coumarins (Hindi *et al.*, 2015). ان المركبات الفلافونويدية والمركبات الفينولية والتربينويدات هي المركبات الأكثر وفرة في العكبر (Alotaibi, 2020)، وأشار (Sturm & Ulrich, 2020) في دراستهما على التركيب الكيميائي للعكبر ان المركبات الفينولية هي أكثر المركبات النشطة حيويّاً في العكبر وخاصة في نوع الحور، حيث بينت الدراسة ان هذه المركبات تمثل ما يقارب 28% من مجمل ما يحتويه عكبر الحور Poplar propolis، كما ان التركيب الكيميائي لأنواع العكبر المختلفة تتشابه إلى حد ما والسبب في ذلك يعود إلى احتوائها على مواد بلسمية (أصلها من الصمغ الذي جمعه النحل) وغير بلسمية اضافها النحل وهكذا فان العكبر يتكون بجزئه الأكبر من مواد مشتقة من النباتات أمّا الجزء الأصغر فهي مواد مشتقة من النحل وغبار الطلع (Bogdanov, 2011).

1.2.6.2 الفلافونويدات Flavonoids

إنّ كلمة "Flavonoid" أتت من المصطلح اليوناني "Flavus" والذي يعني "الأصفر" واعتماداً على ذلك فإن المركبات التي تحتوي على نواة ذات لون اصفر أو ما تسمى بنواة الفلافون Flavone nucleus يطلق عليها المركبات الفلافونويدية، هذا التصنيف توسع وأصبح يشمل جميع المركبات التي تحتوي على نواة الفلافون سواء كانت ملونة Flavanone أو عديمة اللون Flavan-3-ol، توجد هذه المركبات بشكل عام في النباتات (Das et al., 2019).

تحتوي الفلافونويدات على العديد من المركبات الفينولية وتكون وفيرة في النباتات بالإضافة إلى احتوائها صبغات مختلفة الألوان وظيفتها الأساسية حماية النبات من الأشعة فوق البنفسجية بالإضافة إلى ذلك تقوم بوظيفة أخرى مهمة وهي حاجز للدفاع عن النبات من مسببات النبات البكتيرية والفطرية. إن التركيب الكيميائي للفلافونويدات مختلف ومع ذلك فإنها تتكون بشكل عام من فينيل-بنزوبيران Phenyl- (C6-C3-C6) benzo-γ-pyran الذي يتكون من خمسة عشر ذرة من الكربون تعرف أيضاً بأسم نواة فلافا Flava nucleus التي تتكون من حلقتين فينيل Phenyl rings (A, B) وحلقة بيران غير متجانسة Ring heterocyclic pyran (C) التي تتفرع عنها، كما هو موضح في الشكل (2-4) (Alotaibi, 2020).



شكل (2-4) التركيب الكيميائي للفلافونويد Flavonoid (Alotaibi, 2020).

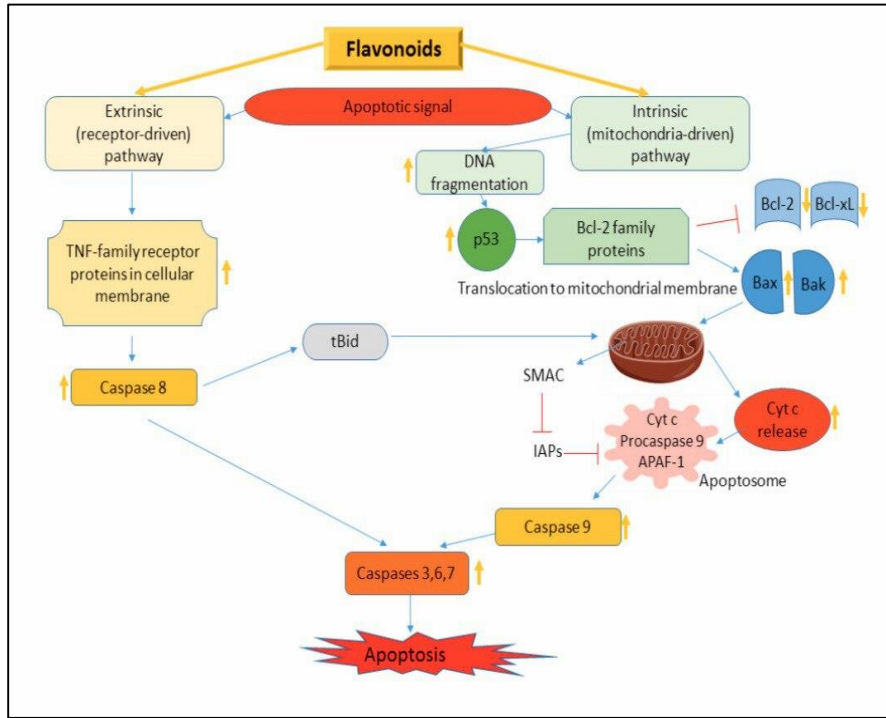
إنّ الفلافونويدات تتضمن العديد من المركبات مثل الفلافونولات Flavonols والفلافونات Flavones والفلافونونات Flavanones والاييسوفلافونات Isoflavones والانثوسيانيدات Anthocyanidins (Hernandez-Rodríguez *et al.*, 2019)،

يعتقد ان الخصائص الحيوية للعكبر سببها مركبات الفلافونويدات خاصة بالنسبة لعينات عكبر المناطق المعتدلة التي تحتوي على عدد كبير من هذه المركبات مثل بينوسيمبرين Pinocembrin وبينوبانكسين Pinobanksin وأبيجينين Apigenin وكريسين Chrysin وغالانجين Galangin (Burdock, 1998)، حيث تمت دراسة الفلافونويدات بشكل واسع بسبب خصائصها الحيوية التي تعد ضرورية لصحة الانسان بالإضافة إلى خصائصها الطبية، حيث تستخدم في صناعة الأدوية بالإضافة إلى استخدامها كمكملات غذائية للوقاية من العديد من الأمراض، وايضاً استخدمت كمضادات للأكسدة ومضادات للحساسية ومضادات للالتهابات، بالإضافة إلى ذلك، استخدمت ايضاً لعلاج أنواع كثيرة من الأورام السرطانية (Kumar & Pandey, 2013 ; Karuppagounder *et al.*, 2015).

أوضح كل من (Betances-Salcedo *et al.*, 2017) و (Devequi-Nunes *et al.*, 2018) أنّ تقدير المركبات الفلافونويدية التي شخّصت في عينات من العكبر لتحديد نشاطه الحيوي تشير إلى انها مسؤولة بشكل كبير عن هذا النشاط. وأشار (Sandhar *et al.*, 2011) ان الفلافونويدات لها علاقة بالحمية الغذائية حيث ان تناول (1-2 غرام أو 23 ملغم) في اليوم الواحد منها يمكن ان يحمي الجسم من الاضرار التي تسببها تفاعلات الاكسدة التي تؤدي في النهاية إلى الإصابة بالسرطان، حيث تعد الفلافونويدات مضادات قوية للأكسدة، لذلك جذبت انتباه واهتمام الكثير من الباحثين حول العالم واستخدمت في العديد من الدراسات الوبائية والتجريبية لتقييم تأثيراتها المحتملة في الحالات المرضية الحادة والاضطرابات البشرية المزمنة Chronic human disorders (Kopustinskiene *et al.*, 2020). بالإضافة إلى ذلك أظهرت الدراسات التي أجريت في المختبر والجسم الحي ان الفلافونويدات تعمل كمضاد للالتهابات ويمكن أيضاً ان تعمل كمحفزات Stimulates أو مثبطات Suppresses لجهاز المناعة (Immunomodulatory) (Yahfoufi *et al.*, 2018)، إضافة إلى ذلك يمكن ان تعمل الفلافونويدات كمضادات قوية للسرطان (Chirumbolo *et al.*, 2018 ; Abotaleb *et al.*, 2018)؛ حيث أشار (Rodriguez-Garcia *et al.*, 2019)؛ حيث أشار (Gorlach *et al.*, 2015 ; Vizcaino & Fraga, 2019) ان المركبات الفلافونويدية تقوم بمجموعة متنوعة من التأثيرات المضادة للخلايا السرطانية أهمها:

- 1- تقوم بتنشيط الانزيمات التي تشارك في إزالة مركبات الأوكسجين التفاعلية ROS.
- 2- المشاركة الفعالة في توقف دورة الخلية Arresting the cell cycle.
- 3- الحث على عملية الموت المبرمج Apoptosis.
- 4- تشارك في عملية الالتهام الذاتي Autophagy.
- 5- تشارك في عملية تثبيط الأورم Tumor suppresses وبالتالي تمنع تكاثر الخلايا وانتشارها من مكان إلى اخر في الجسم Invasiveness.

كما أشار (Kopustinskiene et al., 2020) ان الفلافونويدات يمكن ان تؤثر على مسار إشارات الموت المبرمج للخلايا التي تحفز موت الخلية السرطانية، أي انها تحفز البروتينات التي تؤدي إلى حدوث عملية الموت المبرمج مثل p53 وتقوم بكبح البروتينات المضادة للموت المبرمج مثل عائلة بروتينات Bcl-2، كما هو موضح في الشكل (5-2).



شكل (5-2) تأثير الفلافونويدات على مسار موت الخلية المبرمج الخارجي Extrinsic والداخلي Intrinsic (Kopustinskiene et al., 2020).

أظهرت الدراسات أن العديد من المركبات الفلافونويدية لها تأثير سام للخلايا Cytotoxic effect على الكثير من خطوط الخلايا السرطانية Cancer cell lines ومنها خط خلايا سرطان الدم

Leukemia cell lines، حيث استخدمت خمسة مركبات فلافونويدية مختلفة هي (Quercetin,) (Caffeic acid, Chrysin, Naringenin, Naringin) وخمسة خطوط خلوية لسرطان الدم هي (MOLT, JURKAT, HL-60, RAJI , U937) (Josipovic & Orsolic , 2008)، حيث أظهر الكيرسيتين Quercetin اقوى تأثير سام للخلايا وعلى جميع الخطوط الخلوية السرطانية واظهر الكريسين Chrysin وحمض الكافيبك CA ايضاً تأثيرات سامة للخلايا وعلى جميع الخطوط الخلوية السرطانية للدم ولكن بدرجة أقل من الكيرسيتين (Watanabe *et al.*, 2011).

كما بينت بعض الدراسات على أنواع معينة للعكبر ومكوناته حول العالم ان له نشاطات مضادة للخلايا السرطانية ففي دراسة على العكبر الأحمر البرازيلي Brazilian red propolis الذي يحتوي على المركب (7-hydroxy-6-methoxyflavanone) وجد ان له تأثير قوي على خطوط الخلايا السرطانية (B16-BL6, LLC, HT-1080) بينما اظهر المركب الاخر Mucronulatol تأثيرات قوية ضد خلايا الخطوط الخلوية لسرطان رئة لويس (LLC1) Lewis lung carcinoma وأيضا الخط الخلوي لسرطان الرئة البشري (A549) وان هذه الدراسات توجي إلى أن لكلا المكونين مستقبل واعد لاستخدامهما كعقار ضد الأورام السرطانية (Li *et al.*, 2008)، كما اظهر المركب الفلافوني الراسيمي Racemates المعزول من العكبر الصيني الخام أن له تأثيرات سمية خلوية على خط خلايا سرطان عنق الرحم HeLa cell line (Sha *et al.*, 2009)، وأشار (Li *et al.*, 2010) في دراستهم على السمية الخلوية للمكونات الكيميائية للعكبر المكسيكي Mexican propolis ضد ستة خطوط مختلفة من الخلايا السرطانية أن الفلافانول Dimethoxyflavan البديل للفينيل بروبانويد Phenylpropanoid اظهر تأثيراً سميّاً ضد الخطوط الخلوية السرطانية (A549, HT-1080) والذي كان اقوى من المركب 5-fluorouracil، وهو ايضاً علاج استخدم سريرياً ضد السرطان. وفي دراسة أخرى أجريت على العكبر الجزائري ومكوناته الكيميائية، وجد انه يحتوي على مجموعة واسعة من الخصائص الحيوية بما في ذلك خصائصه المضادة للسرطان (Benguedouar *et al.*, 2016)، حيث يحتوي على مركبات فينولية مضادة للسرطان (Boutabet *et al.*, 2011)، وايضاً الخاصية المبيدة للجراثيم Bactericidal (Soltani *et al.*, 2017)، بالإضافة إلى ذلك خاصيته المضادة للأكسدة (Mouhoubi-Tafinine *et al.*, 2016).

2.2.6.2 Phenolic acids الأحمض الفينولية

تعد الأحمض الفينولية صنفاً فرعياً من مجموعة متعدد الفينول الكبيرة التي توجد في النباتات على شكل أسترات أو غليكوسيدات Glycosides مقترنة بمركبات طبيعية مثل الفلافونويدات والكحوليات والأحمض الدهنية وغيرها (Goleniowski *et al.*, 2013)، ان الأحمض الفينولية (الأحمض الفينولية الكربوكسيلية Phenol carboxylic acids) هي مركبات حمضية عطرية تحتوي على حلقة فينولية وحمض كربوكسيلي عضوي (Caruso *et al.*, 2022)، تتربك من مجموعة هيدروكسيل (OH) مرتبط بحلقة اروماتية أو عطرية Aromatic ring، وهي قاعدة التركيب الأساسية للمركبات الفينولية (Alotaibi, 2020)، واعتماداً على عدد ذرات الكربون في السلسلة الجانبية المرتبطة بالحلقة الفينولية فقد تم تصنيف الأحمض الفينولية إلى ثلاث فئات هي (C6-C3, C6-C2, C6-C1)، عموماً جميع الأحمض الفينولية تمتلك نفس التركيب الأساسي ولكنها تختلف من ناحية موقع وعدد مجموعات الهيدروكسيل المرتبطة بالحلقة العطرية (Heleno *et al.*, 2015).

بشكل عام تم تصنيف الأحمض الفينولية إلى مجموعتين كبيرتين هما: مجموعة أحمض السيناميك Cinnamic acid التي تتضمن الكثير من الأحمض مثل (-P, Caffeic acid, Ferulic acid) مع مشتقاتها ومجموعة أحمض البنزويك Bbenzoic acids التي تتضمن (P-hydroxybenzoic acid, Allic acid, Gentisic acid, Salicylic acid, Protocatechuic acid, Vanillic acid, Syringic acid) مع مشتقاتها (Demir, 2019).

تعد الأحمض الفينولية هي الصنف الآخر من المركبات الفينولية الموجودة في العكبر وخاصة في عكبر المناطق المعتدلة حيث تم تحديد العديد منها مثل (Phenylethyl-cinnamyl-esters, Caffeic acid phenyl ester) (Ristivojevic *et al.*, 2015)، حيث تمت دراسة أنواع كثيرة من العكبر ومكوناته الفينولية على سبيل المثال (العكبر الأخضر البرازيلي) الذي يحتوي على ما لا يقل عن 300 مركب بضمنها الأحمض الفينولية مثل Caffeic acid و Ferulic acid و P-coumaric acid و Cinnamic acids acid (Marcucci *et al.*, 2001)، وفي دراسة أخرى أجريت على العكبر التركي الذي تم استخلاص المركبات الكيميائية منه بتقنيتي الكروماتوغرافيا والتقنية الجزيئية (Girgin *et al.*, 2009)، حيث وجد انه يتكون من محتوى عالي من الأحمض الفينولية (Popova *et al.*, 2005)،

ولوحظ ان له نشاط مضاد للسرطان وتحديدًا على الخط الخلوي لسرطان الثدي (BCCLs Vatansever) (et al., 2010 ; Ozdal et al., 2018).

3.6.2 نشاط العكبر المضاد للسرطان Anticancer potential of propolis

إن السمة المميزة لجميع الأورام السرطانية تكاثر الخلايا بطريقة غير مسيطر عليها، إذ أن معظم أنواع السرطان وان لم يكن جميعها تفشل في تنظيم دورة انقسام الخلية Cell cycle division والتحكم فيها، مما يؤدي إلى نشوء ما يسمى بالورم السرطاني، حيث أن التكاثر والانقسام الخلوي هي من الآليات المهمة في تطور وتقدم الآفات الورمية، وهذه العملية مرتبطة بحدوث اضطرابات في تعبير ونشاط العديد من البروتينات المشاركة في دورة الخلية وكذلك في مسارات الإشارات الخلوية الخارجية والداخلية (Koyunoglu, 2018)، وبهذا اشارت بعض الدراسات العلمية إلى أهمية تأثير العكبر ومكوناته الفعالة ضد الأمراض السرطانية من خلال سميته الخلوية التي تثبط عملية الانقسام الخلوي في الخلايا السرطانية دون اختراق الآلية الجزيئية (Jiang et al., 2020 ; Misir et al., 2020 ; Zülhendri et al., 2021)، حيث ذكر (Chiu et al., 2020) في دراسته على التأثير الوقائي للعكبر ان له تأثيرات على بعض البروتينات المنظمة لدورة الخلية السرطانية مثل (2, 6, Cyclin 4, و Cyclin D و CDK inhibitors)، الامر الذي يؤدي إلى إيقاف تقدم دورة الخلية في المرحلتين (G0/G1) و (G2/M) من خلال تنظيم التعبير عن p21 و p27، وأشار (Kabała-Dzik et al., 2017) ان المركبات الفعالة المستخلصة من العكبر مثل (CA و CAPE) لها القدرة على تحفيز إيقاف دورة الخلية في المرحلة (S) في خط خلايا سرطان الثدي (MDA-MB-231)، وفي دراسة (Zabaïou et al., 2017) على الخصائص البيولوجية للعكبر، اظهر ان المركب المعزول CAPE يثبط عمل S6 beta-1 ribosomal protein وkinase (P70S6K)، وهو انزيم مسؤول عن تخليق البروتين في مسار PI3K/AKT وبعض إشارات AKT، مما يؤدي إلى منع تكاثر وانتشار خلايا سرطان البروستات PC-3، DU-145، وLNCaP، كما أوضح ان المركب Genistein، وهو أحد مكونات العكبر ايضاً له تأثيراً على سرطان البروستات من خلال تثبيط دورة الخلية في المرحلة G2/M phase، وذلك عن طريق تقليل التعبير عن Cyclin B وتحفيز بروتين p21، واطهر (Ren et al., 2019) ان CAPE يمنع تكاثر الخلايا الظهارية البشرية HEP2 عن طريق مسار Stat3/Pik1 وتحفيز إيقاف دورة الخلية في المرحلة (S phase)، وأشار (Omene et al. 2013) في دراسته على CAPE كمكون نشط في العكبر ومضاد للخط الخلوي لسرطان الثدي BCCLs، ان CAPE له تأثيرات سمية على هذه الخلايا، على الرغم من اكتشاف هذا

التأثير لأول مرة على الخط الخلوي السرطاني SK-BR3، حيث تبين ان CAPE يقلل من التعبير عن عوامل النسخ NF-κB، إضافة إلى إيقاف الدورة الخلوية Cell cycle والحث على عملية الموت المبرمج apoptosis (Seyhan et al., 2019)، وبين (Frion-Herrera et al., 2019b) ان Poly-(Nem) isoprenylated benzophenone، وهو مركب نباتي موجود بشكل رئيسي في العكبر البني الكوبي يثبط نسبة عالية من خلايا سرطان الكبد HepG2 من خلال إدخالها إلى مرحلة G0/G1 phase في دورة الخلية.

ترتبط آلية السمية الخلوية Cytotoxicity التي تعمل من خلالها المركبات الفعالة المضادة للورم بعدة عوامل رئيسة تتضمن التحفيز على عملية الموت المبرمج وتنظيم دورة الخلية، بالإضافة إلى انتشار الورم Metastasis، وان الطريقة المثلى لاختبار هذه السمية هي باستخدام فحص MTT، وهو اختبار لقياس نشاط المركبات الكيميائية الايضي والسام للخلايا (Adan et al., 2016). اشارت العديد من الدراسات إلى تأثير العكبر ومركباته الفعالة السامة للخلايا على أنواع مختلفة من الخلايا السرطانية، حيث اظهر العكبر الأخضر البرازيلي الذي يحتوي على المركبين الفعالين P-coumaric acid و Artepillin C نشاطاً ساماً للخلايا ضد خط خلايا سرطان المعدة AGP-01 (Arruda et al., 2020)، كما اظهر مستخلص العكبر الأحمر البرازيلي تأثيرات سمية خلوية ضد خط خلايا سرطان القولون والمثانة T24 وخط خلايا سرطان البروستاتا PC-3 (dos Santos et al., 2019 ; Botteon et al., 2021)، وفي دراسة (Aru et al., 2019) على فعالية العكبر التركي المضادة للتكاثر Antiproliferative activity، أوضح ان المستخلص الايثانولي للعكبر له تأثيرات سامة للخلايا ضد الخطوط الخلوية لسرطان الثدي MCF-7 وسرطان المعدة HGC27 وسرطان الرئة A549، وذلك من خلال تحفيز إيقاف دورة الخلية Cell cycle عند الانتقال من مرحلة G1 phase إلى S phase، أو عن طريق تنشيط بروتين p21 الذي يؤدي إلى توقف دورة الخلية في المرحلة G0/G1 phase، بالإضافة إلى زيادة التعبير عن بروتينات نقاط الفحص Checkpoints في دورة الخلية، ومن المركبات الفعالة الموجودة في هذا النوع من العكبر هي (3-O-methylquercetin, Chrysin, Caffeic acid, CAPE, Galangin,) (and Pinocembrin)، وذكر (Ucar & Deger, 2019) ان مستخلص العكبر التركي كان له تأثير سام ضد خلايا سرطان الثدي MDA-MB-231، كما ثبت ان المستخلص الايثانولي للعكبر التركي ايضاً له نشاط سام على خلايا سرطان البروستاتا PC-3 المقاومة للهرمونات (Turan et al., 2015)، وأشار (Salem et al., 2020) إلى ان المستخلص الايثانولي للعكبر المصري اظهر تأثيرات سمية

خلوية ضد الخطوط الخلوية لسرطان القولون HCT-116 وسرطان الثدي بخطيه الخلويين MDA-MB-231 و MCF-7 وسرطان عنق الرحم HeLa cells، كما بين (Rivero-Cruz *et al.*, 2020) ان مستخلص العكبر الايثانولي المكسيكي كان له تأثير سام على خطي خلايا HeLa و Cuski، وفي دراسة أجريت من قبل (السعدي، 2022) على العكبر العراقي، حيث بينت ان كلا المستخلصين الايثانولي والنانوي للعكبر اظهرا تأثيراً سائماً ضد خط خلايا سرطان القولون البشري SW480، وفي دراسة أجريت على العكبر الصيني، لوحظ ان له القدرة على تحفيز عملية الموت المبرمج في خط خلايا سرطان المعدة البشري وذلك عن طريق الزيادة في مستوى تعبير مركبات الأوكسجين التفاعلية ROS وانخفاض كفاءة غشاء المايتوكوندريا، بالإضافة إلى زيادة التعبير في مستوى البروتينات المؤيدة للموت المبرمج مثل بروتينات Bax و Bid وبالمقابل انخفاض التعبير في البروتينات المضادة للموت المبرمج مثل بروتين Bcl-2، وبالتالي يتم اطلاق Cytochrome-c من المايتوكوندريا، الأمر الذي يؤدي إلى تنشيط مسارات Caspase-3 (Jiang *et al.*, 2020)، كما بينت دراسة أخرى ان مستخلصي كل من العكبر الكوبي الأحمر والعكبر البرازيلي الأحمر اثرا على خطي خلايا سرطان الحنجرة وسرطان الثدي على التوالي عن طريق حثهما على عملية الموت المبرمج من خلال تنشيط البروتينات p53 و p21 و Bac وتنشيط إشارات Caspase-3، وتقليل التعبير عن Bcl-2 و Bcl-XL و PUMA، ولكن في دراسة مماثلة وجد الباحثون أن العكبر البرازيلي لم يؤثر على تعبير البروتينات Bcl-2 و Bcl-XL و PUMA (Frion-Herrera *et al.*, 2019a ; Frion-Herrera *et al.*, 2018).

كما ذكرت بعض التجارب العلمية السريرية ان العكبر وبعض مكوناته الفعالة اظهر تأثيراً مضاداً لتكوين الأوعية الدموية Antiangiogenics في الخلايا السرطانية وهذه طريقة اخرى لتبيان آلية العكبر الفعالة ضد الأمراض السرطانية (Santos *et al.*, 2020)، حيث يقوم العكبر و CAPE بتنشيط عامل النمو البطاني الوعائي أو ما يسمى بعامل نفاذية الأوعية الدموية VEGF (Zulhendri *et al.*, 2021)، ويعتقد ان نشاط العكبر المضاد لتكون الأوعية الدموية مرتبط بانخفاض تنشيط مسارات إشارات الخلية NF-KB, ERK1/2 (Sepulveda *et al.*, 2020)، ولهذا عادة ما يتحمل مرضى السرطان العكبر كعلاج بشكل جيد في التجارب السريرية، إضافة إلى ذلك فانهم يقدرون حقيقة استخدامهم لمادة طبيعية ومعروفة (Piredda *et al.*, 2017)، بالرغم من ان بعض المرضى قد يكون لديهم حساسية تجاه العكبر مما يسبب لهم مشاكل في الجهاز الهضمي (Nyman *et al.*, 2020)، لذلك من الضروري إيجاد طرق تسمح بتحديد المركبات ذات النشاط البيولوجي فقط من أنواع مختلفة من العكبر بسبب تنوعه الكيميائي من

منطقة إلى أخرى الذي قد يسبب بعض المشاكل الصحية للمرضى الذين يستخدمون المادة كعلاج لهم (Toreti et al., 2013).

7.2 المعايير المناعية Immunological parameters

أشارت العديد من الأبحاث العلمية الحديثة إلى أهمية العكبر كمادة طبيعية لها تأثيرات قوية على جهاز المناعة، إذ أجريت الكثير من التجارب العلمية السريرية على العكبر ومكوناته الكيميائية لاختبار تأثيراته المعدلة للمناعة Immunomodulatory effects، بالإضافة إلى استخدامه كعلاج بديل في الاضطرابات المناعية (Al-Hariri, 2019). ان تأثيرات العكبر ومركباته الفعالة المضادة للسرطان قد ترتبط ارتباطاً وثيقاً بتنظيم جهاز المناعة من خلال عملية تنشيط البلاعم الكبيرة Macrophage (Yonar et al., 2014)، ولهذا تمت دراسة تأثير العكبر وبعض المركبات الفعالة المعزولة منه على تقييم مستوى التعبير عن بعض المعايير المناعية على سطح خلايا A549 والتي تتمثل بثلاثة بروتينات وهي:

1.7.2 بروتين مستقبل الموت المبرمج PDL-1

Programmed death-ligand – 1 (PDL-1)

تعد نقاط الفحص المناعية Immune checkpoints منظمات للجهاز المناعي، إذ تحمي الانسجة من الاضرار عندما تكون هناك استجابة مناعية ضد عدوى ممرضة، وأن هذه البروتينات ضرورية لإحداث عملية التوازن المناعية ومنع ما يسمى بالمناعة الذاتية Autoimmunity، وان التعبير عنها في الخلايا السرطانية يعد من الآليات الرئيسية لمقاومة السرطان للجهاز المناعي، الامر الذي يؤدي إلى هروب الخلايا السرطانية من المراقبة المناعية Immune surveillance؛ بسبب الاستجابة المناعية غير الكافية ضد الورم السرطاني (Ipek et al., 2022).

PDL-1 ويدعى أيضاً باسم مجموعة التمايز CD274، وهو مستقبل حيوي لنقاط التفتيش المناعية ينتمي إلى عائلة مجموعة التمايز CD28، يتم التعبير عنه في العديد من الخلايا المناعية النشطة مثل خلايا T و B و NK، وله دور مهم في هروب الخلايا السرطانية من الجهاز المناعي، إضافة إلى تعبيره في الخلايا المناعية، فإن PDL-1 يتم التعبير عنه في مجموعة متنوعة من امراض السرطان مثل سرطان القولون والمستقيم والثدي والرئة ذو الخلايا غير الصغيرة، بالإضافة إلى سرطان الغدة الدرقية وسرطان الخصية

(Ajdary et al., 2021)، كما ذكر (Wu et al., 2015) ان البروتين PDL-1 لوحظ تعبيره بشكل مفرط في خلايا سرطان البنكرياس والمبيض والمعدة والرئة، حيث صُنِّف هذا التعبير كعلامة تنبؤية سيئة للمرضى. ان السرطان يتطور بعدة اشكال واستراتيجيات مختلفة، ومن هذه الاستراتيجيات هي الهروب من المراقبة المناعية عن طريق تنظيم بروتين PDL-1 والذي بدوره يرتبط ببروتين الموت المبرمج PD-1، وبالتالي يصعب تمييز الخلايا السرطانية بسبب تعبيرها العالي عن هذا الارتباط، لذلك فإن تثبيط محور الارتباط PD-1/PDL-1 قد يحفز الاستجابة المناعية ضد السرطان، حيث أظهرت الدراسات ان عميلة تثبيط هذا المحور له فعالية كبيرة وواحدة في مجال علاج مختلف الأورام السرطانية (Robert et al., 2015)، إذ بيَّن (Xue et al., 2017) في دراسته على سرطان الخلايا الدبقية Glioma، ان استغلال التفاعل في محور PD-1/PDL-1 فتح الافاق لتطوير اجسام مضادة أحادية النسيلة Monoclonal antibodies تستهدف PDL-1 الموجود على سطح الخلايا السرطانية، مما يؤدي إلى تعطيل الإشارات المثبطة للخلايا المناعية، حيث ان هذا الاجسام المضادة رُحِّصت من قبل إدارة الغذاء والدواء الأمريكية Food and Drug Administration (FDA) لعلاج خلايا سرطان الرئة التي تظهر تعبيراً ايجابياً للبروتين PDL-1، إذ ان التعبير العالي عن PDL-1 في خلايا سرطان الرئة يحفز الورم على الانتشار وغزو أعضاء مجاورة في الجسم (Chen et al., 2012)، وبالتالي فإن تثبيط مسارات محور PD-1/PDL-1 قد يؤدي إلى استجابة مستمرة ومضادة للورم في مختلف أمراض السرطان ومن ضمنها سرطان الرئة (Zou et al., 2016).

2.7.2 مجموعة التمايز 24 (CD24) Cluster of differentiation 24

CD24 ويدعى ايضاً بالمستضد الثابت للحرارة Heat stable antigen وهو عبارة عن بروتين عالي الغليكوزيلات Glycosylated مرتبط بسطح الخلية ويحتوي على (31 – 34) حامض اميني (Altevogt et al., 2021)، يتم التعبير عنه عادة في مجموعة من الخلايا اللمفاوية تتضمن خلايا B و T و Monocytes و Granulocytes (Fang et al., 2010). قد يكون تعبير CD24 مرتفع في الخلايا التائية المنظمة Treg، مما يؤثر على نشاطها المثبط للمناعة (Shi et al., 2022)، كما يتم التعبير عن CD24 بشكل مفرط في الكثير من الخلايا السرطانية مثل سرطان الثدي (Song et al., 2022)، وسرطان الرئة والقولون والكبد والبنكرياس والبروستات (Panagiotou et al., 2022)، بالإضافة إلى سرطان الرأس والعنق (Mishra et al., 2020)، وأورام الجهاز العصبي المركزي (Sanden et al., 2015)، ومن الجدير بالذكر فإن التعبير عن CD24 في الخلايا الورمية قد يرتبط

بسوء حالة المريض الصحية، إضافة إلى وجود سمات أكثر عدوانية للورم تتمثل بانتشاره إلى أعضاء أخرى في الجسم (Baumann *et al.*, 2005)؛ لذلك فإن التعبير عنه قد يعزز من نمو الورم وسلوكه الخبيث (Shapira *et al.*, 2011)، حيث بينت دراسات متعددة ان CD24 قد يلعب دوراً مهماً في عملية تكوين الورم Tumorigenesis وذلك من خلال عمله على التغيرات الحاصلة في مسارات الإشارات الخلوية والتي تتضمن STAT3 و EGFR و MAPK (Bretz *et al.*, 2012 ; Deng *et al.*, 2012 ; Lu *et al.*, 2018 ; Eyvazi *et al.*, 2018 ; *al.*, 2016)، كما ذكر (Altevogt *et al.*, 2021) ان تراكم CD24 في سيتوبلازم الخلية السرطانية قد يكون هو المسؤول عن تكاثرها غير المسيطر عليه، الامر الذي يؤدي في النهاية إلى عدم تنشيط بروتين p53، وبَيَّن (Song *et al.*, 2012) في دراسته على المرضى الذين يعانون من سرطان المرارة Gallbladder carcinoma ان ارتفاع CD24 لديهم كان من الأسباب التي أدت إلى انتشار الورم إلى العقد اللمفاوية وغزوها بشكل متكرر، ونتيجة لذلك قد يصبح المريض في مرحلة متقدمة من مراحل TNM، وأوضح (Ni *et al.*, 2020) ان التعبير عن CD24 في خلايا سرطان الثدي كان أعلى بكثير مما هو عليه في الانسجة الطبيعية، وفي دراسة (Paoletti *et al.*, 2019) أوضح ان حجم الورم Tumor size ودرجة النسيج وانتشاره الى العقد اللمفاوية هي من العوامل التي ترتبط بالتعبير المفرط عن CD24 في خلايا سرطان الثدي، وأشار (Majores *et al.*, 2015) إلى ان CD24 يعد علامة تنبؤية لتطور مرض السرطان، لا سيما سرطان الرئة ذو الخلايا غير الصغيرة، وبذلك فإن تطوير اجسام مضادة وحيدة النسيلة Monoclonal antibodies تستهدف CD24 تعد من الاستراتيجيات العلاجية المهمة لتثبيطه في مرضى السرطان الذين يعانون من زيادة عالية في التعبير عن CD24، إذ ان نمو الورم وانتشاره إلى أعضاء أخرى في الجسم قد قلَّ بعد تثبيط CD24؛ ولذلك فإن ادواره المتعددة في تنظيم الاستجابة المناعية وتكوين الأورام السرطانية جعلت منه هدفاً مهماً للعديد من الباحثين لاستخدامه في العلاج المناعي للسرطان (Panagiotou *et al.*, 2022).

3.7.2 مُستقبل الكيموكين من النوع الرابع CXCR4

C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4)

CXCR4 ويدعى أيضاً CD184، وهو مستقبل مقترن بروتين G الغشائي (GPCR)، اصبح محط اهتمام الكثير من الباحثين حول العالم بسبب عمله كمستقبل مساعد Co-receptor لدخول فيروس

نقص المناعة البشرية HIV إلى خلايا CD4 T cell (Grande et al., 2019). يتم التعبير عن CXCR4 في مجموعة مختلفة من الأنسجة تتضمن الجهاز المناعي والدوراني، إضافةً إلى الجهاز العصبي المركزي، إذ يعمل في كل جهاز عملاً بيولوجياً محدداً، على سبيل المثال يلعب CXCR4 في جهاز المناعة دوراً في تمايز وتطوير كريات الدم البيض في الدم المحيطي والخلايا المكونة للدم في نخاع العظم وتسهل عمل الخلايا المناعية مثل الهجرة والالتصاق بالخلايا البطانية (Garcia-Cuesta et al., 2019)، كما يتم التعبير عن CXCR4 في أنواع متعددة من الخلايا السرطانية مثل سرطان الرئة والمريء والمعدة والثدي، إذ بينت العديد من الدراسات ان الدور الحيوي لـ CXCR4 في السرطان هو العمل على انتشار الورم إلى الأعضاء المجاورة في الجسم، وبالتالي تتكاثر الخلايا السرطانية بسبب التعبير العالي عن CXCR4، مما يؤدي إلى سوء تشخيص الحالة الصحية للمريض (Xie et al., 2017)، كما ذكر (Hummel et al., 2014) ان الآلية التي من خلالها يساهم CXCR4 في انتشار الورم وتكوين الأوعية الدموية هي عن طريق ارتباطه بالسيتوكين CXCL12، ويدعى ايضاً SDF-1 وهو سيتوكين يلعب دوراً مهماً في عملية تكوين الأوعية الدموية وانتشار الورم إلى أماكن مجاورة في الجسم في أنواع متعددة من الأمراض السرطانية مثل سرطان القولون والمستقيم وسرطان الورم الدبقي Glioma، بالإضافة إلى سرطان الكلى والمبيض والبنكرياس، وفي دراسة أجريت من قبل (Kajiyama et al., 2008) بين فيها ان التعبير عن CXCR4 في خلايا سرطان المبيض الظهاري Epithelial ovarian carcinoma قد ارتبط بتطور المرض وانتشاره إلى أعضاء أخرى في الجسم، وبالتالي فإن استهداف CXCR4 قد يكون هدفاً علاجياً ناجحاً لمرضى السرطان، واطهرت دراسة أخرى وجود علاقة قوية بين تطور سرطان الرئة والتعبير المفرط لـ CXCR4، حيث كشفت النتائج ان التعبير عن CXCR4 كان عالي جداً في الأنسجة المجاورة للرئة مقارنةً بالخلايا الطبيعية، كما ان CXCR4 كان مرتفع في المرضى الذين يعانون من انتشار الورم مقارنةً بالذين ليس لديهم انتشار ورمي (Gangadhar et al., 2010)، وأشار (Rodriguez-Lara et al., 2017) إلى ان الإفراط في التعبير CXCR4 في الخلايا السرطانية ربما يظهر في المراحل المتقدمة من مرض السرطان، إذ أن تعبيره في الخلايا الورمية بعد ارتباطه بالسيتوكين الخاص به CXCL12 كافٍ لدعم تسرطن الرئة، وبالتالي انتشار الورم إلى داخل العضو نفسه أو إلى أعضاء مجاورة في الجسم.

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials

and

Methods

3. المواد وطرائق العمل Materials and Methods

أُجريت جميع الاختبارات المتعلقة بالدراسة الحالية في مختبرات قسم علوم الحياة في كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء، ومختبرات دائرة البيئة والمياه في وزارة العلوم والتكنولوجيا، ومختبر الشركة العراقية للتقنيات الاحيائية، ومختبر العراق التخصصي في محافظة بغداد للمدة من 2022 /4/1 إلى 2022/11/1.

1.3 المواد Materials**1.1.3 الأجهزة والأدوات المستعملة Apparatuses and tools**

استُخدمت في الدراسة الحالية عدد من الأجهزة والأدوات كما هو موضح في الجدول (1-3).

جدول (1-3) الأجهزة والأدوات المستعملة في الدراسة الحالية.

Origin المنشأ (الدولة Country ، الشركة Company)	الأجهزة والأدوات Apparatuses and tools
(K & K Scientific Supplier , Korea)	Laminar flow hood
(Cypress Diagnostics , Belgium)	Incubator
(Gennex Lab , USA)	Microtiter reader
(Cypress Diagnostics , Belgium)	Micropipette
(Santa Cruz Biotechnology , USA)	Cell culture plates
(Hitachi , Japan)	Refrigerator
(Eppendorf , Germany)	Centrifuge
(Sigma , Japan)	Water bath
(T.C Meiji techno , Japan)	Inverted microscope

(Digital Laboratory Electronic , China)	Sensitive electronic balance
(Lenovo , USA)	Computer
(Yeson , China)	Autoclave
(// , China)	Knife
(Hitachi , Japan)	Electric grinder
(// , USA)	Ultrasonic Bath
(// , Slovenia)	Rotary evaporator
(Sykam GmbH , Germany)	HPLC
(//)	Auto sampler
(Teledyne FOXY R1 , USA)	Fraction collector
(// , China)	Freeze dryer
(//)	Filter paper (0.22 , 0.45)
(BD Bioscience , USA)	Flow cytometry
(Scotech , Germany)	Magnetic stirrer
(//)	Flasks
(Eppendorf , Germany)	Refrigerated centrifuge

2.1.3 المواد الكيميائية المستعملة Chemical Materials

استُخدمت في الدراسة الحالية عدد من المواد الكيميائية كما هو موضح في الجدول (2-3).

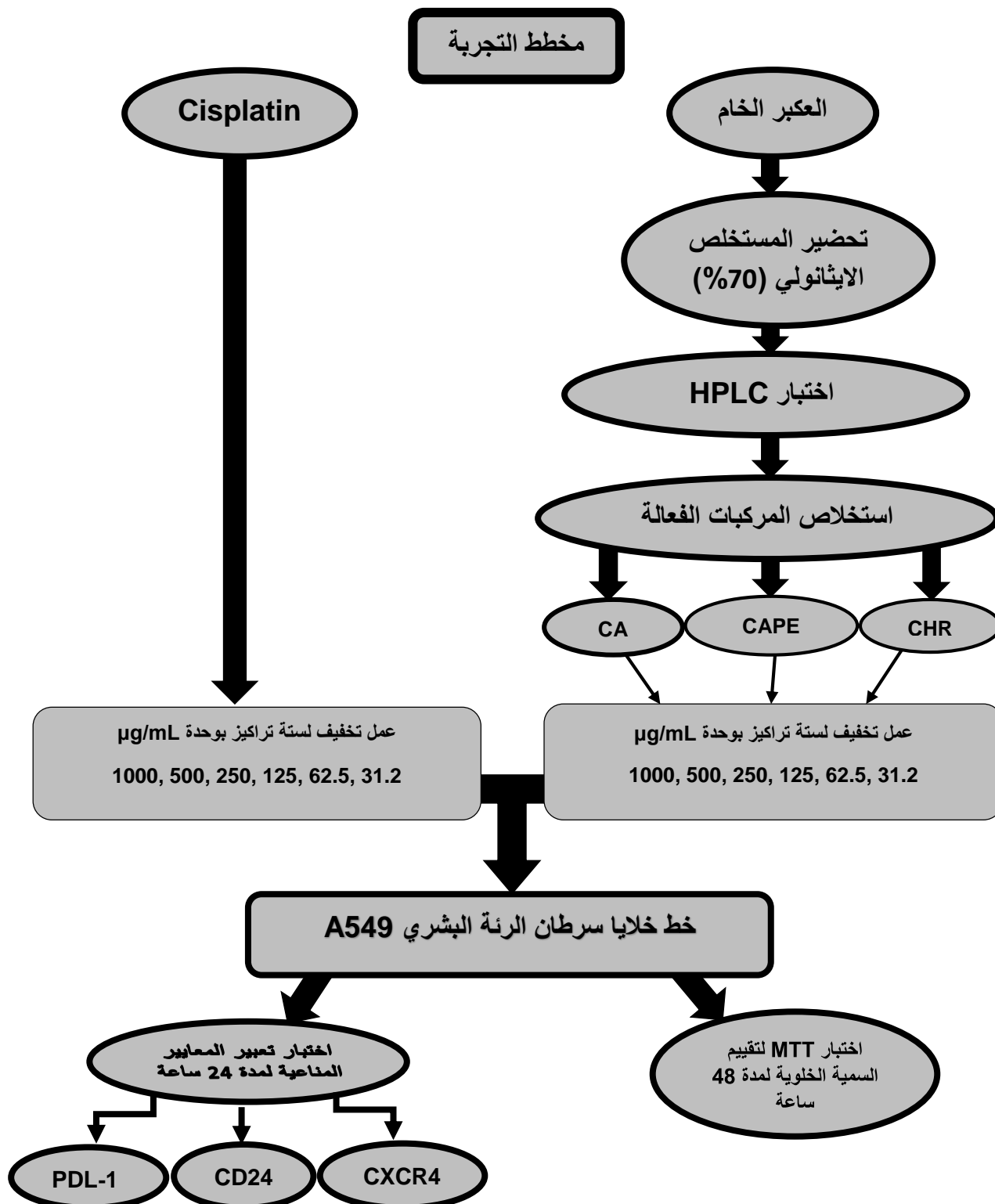
جدول (2-3) المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة الحالية.

المنشأ Origin (الدولة Country ، الشركة Company)	المواد الكيميائية Chemical materials
(OZ BIOSCIENCES , France)	MTT kit
(Capricorn , Germany)	Trypsin / EDTA solution
(Capricorn , Germany)	(RPMI 1640) medium
(Capricorn , Germany)	Fetal bovine serum
(Santacruz Biotechnology , USA)	DMSO solution
(Santacruz Biotechnology , USA)	Cisplatin drug powder
(// , Spain)	Ethanol absolute
(// , Iraq)	Caffeic acid standard powder
(Santacruz Biotechnology , USA)	Caffeic acid phenethyl ester standard powder
(Santacruz Biotechnology , USA)	Chrysin standard powder
(Sigma , USA)	Phosphate Buffer Saline (PBS)
(Sigma , USA)	NaCl
(Sigma , USA)	KCL

(Sigma , USA)	Trypsin
(Sigma , USA)	NaHCO ₃
(BDH , England)	NaH ₂ po ₄
(Santacruz Biotechnology , USA)	PerCP-Cyanine5.5 Anti-human CD274/PDL-1 antibody
(Santacruz Biotechnology , USA)	PE Anti-human CD24 antibody
(Santacruz Biotechnology , USA)	APC Anti-human CXCR4 antibody

2.3 طرائق العمل Methods

1.2.3 تصميم التجربة Experiment design



2.2.3 عقار السيسبلاتين Cisplatin drug

تم الحصول على عقار السيسبلاتين على شكل مسحوق Powder من شركة (Santa Cruz Biotechnology) بوزن 100 ملغم، ورقم تسلسلي (Sc-200896)، ثم نقل إلى مختبر الشركة العراقية للتقنيات الاحيائية الكائن في بغداد / الحارثية وذلك تمهيداً لإجراء الاختبارات على الخلايا السرطانية للرئة بعد عمل ستة تراكيز مخففة إلى النصف بشكل متسلسل وهي: (1000, 500, 250,) $\mu\text{g/mL}$ (125, 62.5, 31.2) حضرت عن طريق إذابة 0.01 غم من مسحوق البودر في وسط خالي من المصل (RPM1-1640) Media free serum.

3.2.3 عينة العكبر Propolis sample

1.3.2.3 جمع العينة Collection of the sample

تم جمع 50 غم من مادة العكبر العراقي ذو اللون البني المنتج عن طريق نحل العسل من النوع الكرينولي *Apis mellifera carnica* من ناحية الحسينية في محافظة كربلاء خلال المدة من نهاية شهر نيسان لعام 2022 إلى بداية شهر حزيران لعام 2022، اذ تم كشط مادة العكبر من إطارات خلايا النحل وعلى فترات محددة ومن ثم وضعها في حاوية بلاستيكية ونقلت إلى مختبرات دائرة البيئة والمياه في وزارة العلوم والتكنولوجيا العراقية في محافظة بغداد لغرض القيام بعملية الاستخلاص والكشف عن المركبات الفعالة في المستخلص.

2.3.2.3 تحضير العينة Preparation of the sample

تم الاعتماد على طريقة كل من (Chong & Chua, 2020) للحصول على مسحوق باودر من عينة العكبر الخام Raw propolis وحسب الخطوات الآتية:

1- نُقلت عينة العكبر إلى فرن هوائي ساخن Hot air oven بدرجة حرارة تتراوح من 40-60 درجة مئوية لمدة 72 ساعة لغرض التجفيف.

2- بعد الانتهاء من عملية التجفيف، نُقلت العينة إلى مرحلة التجميد بدرجة حرارة تصل إلى -4 درجة مئوية.

3- بعد عملية التجميد، قُطعت العينة إلى قطع صغيرة، ثم طُحنت للحصول على عينة متجانسة أو مسحوق باودر ذو لون بني.

4- حُزّن المسحوق عند درجة حرارة -20 درجة مئوية لحين القيام بعملية استخلاص المركبات الفعالة منه.

3.3.2.3 طريقة الاستخلاص Extraction method

تم استخلاص المركبات الفينولية من عينة العكبر المتجانسة وذلك بالاعتماد على طريقة (Reis *et al.*, 2019) وحسب الخطوات الآتية:

- 1- تم إضافة (3 غم) من مسحوق العكبر المتجانس إلى مذيب يحتوي على (70%) من الايثانول.
- 2- تم نقل الخليط إلى حمام الموجات فوق الصوتية Ultrasonic bath لمدة ساعة واحدة وبدرجة حرارة الغرفة.
- 3- رُشّح المستخلص باستخدام مرشحات السليلوز الغشائية للحصول على مستخلص نقي جداً.
- 4- ثم نقل (5 مل) من المستخلص السائل ووضعه في جهاز الطرد المركزي المبرد عند 2000 دورة بالدقيقة ولمدة 10 دقائق في درجة حرارة تصل إلى 4 درجة مئوية ثم رُشّحت المادة الطافية باستخدام ورق ترشيح نوعي وزنه (80 غم).
- 5- بعد ذلك أزيل المذيب من المستخلص بواسطة جهاز المبخر الدوار تحت التفريغ Rotary evaporator، وتم تجفيفه تحت درجة حرارة تصل إلى 40 درجة مئوية حتى الوصول إلى ثابت الكتلة المولية Constant mass Mu.
- 6- حُزّن المستخلص المجفف (البودر) في قارورة زجاجية عند درجة حرارة تصل إلى 4 درجة مئوية لمنع الضرر التأكسدي لحين القيام بالاختبارات المطلوبة.

4.3.2.3 الكشف عن المركبات الفعالة في العكبر بواسطة جهاز HPLC

Detection of active compounds in propolis by HPLC

1.4.3.2.3 المحاليل القياسية للمركبات الفعالة

Standard solutions of the active compounds

تم الحصول على المحاليل القياسية Standards solutions للمركبات الفعالة المدروسة والمتمثلة بحمض الكافيينك CA من مختبرات دائرة البيئة والمياه في وزارة العلوم والتكنولوجيا في بغداد، ومشتقات

حمض الكافيك CAPE ذو الرقم التسلسلي 104594-70-9 وبوزن 20 ملغم، بالإضافة إلى الكريسين CHR ذو الرقم التسلسلي 480-40-4 وبوزن 1غم، ولتحضير هذه المحاليل تم وزن 0.5 ملغم من كل مركب قياسي وإذابته في 1مل من الميثانول بتركيز 100%، وخرنت في الثلاجة بدرجة حرارة 4 درجة مئوية حتى الاستعمال في جهاز HPLC وذلك بالاعتماد على طريقة (Adamcova *et al.*, 2022).

2.4.3.2.3 الكشف عن المركبات الفعالة في العكبر المحلي باستخدام تقنية HPLC

Detection of active compounds in local propolis using HPLC technology

تم الاعتماد على طريقة (Radovanovic *et al.* (2015) للكشف عن المركبات الفعالة في المستخلص الايثانولي للعكبر عن طريق اتباع الخطوات الآتية:

1- استُخدمَ جهاز التحليل (كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء ذو الطور العكسي Reversed phase HPLC analysis)، مجهز بكاشف للأشعة فوق البنفسجية SYKAM HPLC (Chemstation,) chromatographic system equipped with a UV detector (a Zorbax Eclipse Plus-C18-OSD).

2- استخدام عمود فصل (25cm, 4.6mm) وهو عبارة عن طور ثابت يفصل المركبات الموجودة في العينة المستخدمة في الدراسة اعتماداً على الحجم والقطبية الانجذابية حيث كانت درجة الحرارة داخل العمود 30 درجة مئوية.

3- استخدام طور متحرك Mobile phase وهو عبارة عن (Methanol 100%) Eluent A و(1% Formic acid) Eluent B مذابة في الماء (V/V)، حيث تم استخدامها اعتماداً على ظهور التدرجات اللونية في جهاز HPLC لكل مركب من المركبات الفعالة المدروسة ووفقاً للوقت الآتي: من 0-4 دقائق (40%) من محلول B، ومن 4-10 دقائق (50%) من محلول B، وبمعدل تدفق 0.7 mL/min، وطول موجي 280 نانومتر.

4- حقنت 100 مايكرو ليتر من المحاليل القياسية المعلومة التركيز، ثم بعد ذلك تم حقن 100 مايكرو ليتر من المستخلص الايثانولي للعكبر وذلك عن طريق الحقن الأوتوماتيكي للعينة بواسطة Auto sample.

5- تم الكشف عن كل مركب من المركبات الفعالة بالاعتماد على وقت الاحتجاز Retention time ومقارنته مع وقت احتجاز المحاليل القياسية Standards تحت نفس ظروف التحليل في جهاز HPLC.

6- حددت كمية كل مركب من المركبات الفعالة الموجودة في عينة الدراسة الحالية اعتماداً على قياس مساحة القمة Peak area والتي قدرت في منحنيات المحاليل القياسية Standards على أساس المعادلة الآتية:

$$\text{Sample concentration} = \frac{\text{standard concentration} + \text{sample area}}{\text{standard area}}$$

3.4.3.2.3 جمع المركبات الفعالة Collection of the active compounds

بعد اجراء تحليل الكروماتوغرافيا للعينة وتحديد زمن احتجاز المركبات الفعالة Retention time حسب الكشف العضوي للمركب بواسطة زمن الاحتجاز وبالمقارنة مع زمن احتجاز المحاليل القياسية للمركبات Standards المعلومة التركيز، تم استخدام جهاز Fraction collector المربوط على جهاز HPLC، وذلك لجمع المركبات الفعالة من مستخلص العكبر والمتمثلة بحمض الكافيك CA ومشقات حمض الكافيك استر CAPE والكريسين CHR، حيث تم تحديد بداية القمة ونهايتها (وقت اكتشاف المركب على جهاز HPLC)، بالإضافة إلى تحديد كمية المحاليل المستخدمة في الطور المتحرك Mobile phase (Methanol and Formic acid)، ومن ثم القيام بجمع المركبات الفعالة في انابيب خاصة لكل مركب على حده، تمت إعادة حقن مستخلص العينة لعدة مرات عن طريق Auto sample وذلك للحصول على كمية مناسبة لكل نوع من أنواع المركبات الفعالة المدروسة.

4.4.3.2.3 تجفيف المركبات الفعالة Drying of the active compounds

للحصول على مادة نقية أو مسحوق باودر لكل مركب فعال بعد عملية الجمع، تم الاعتماد على طريقة (Zainal et al., 2021) وهي استخدام التجفيف بالتبريد أو ما يسمى بعملية التجفيد (freeze-drying) وحسب الخطوات الآتية:

1- جُمِدَت المركبات الفعالة التي تم الحصول عليها بعد عملية الجمع في مجمدة المختبر وبدرجات حرارة متفاوتة تراوحت من -50 إلى -80 درجة مئوية.

- 2- وضعت المركبات في أنابيب الطرد المركزي بحجم 5 مل ومن ثم تغطية فوهة الانبوب لتسهيل عملية التجميد وتقليل الضغط الذي يمكن ان يؤثر على عملية التجميد بالإضافة إلى تجنب تلوث المركبات المستخلصة.
- 3- استمرت عملية التجميد لمد 48 ساعة، ومن ثم نقل المركبات المجمدة إلى مكثف من نوع مجفف التجميد Drying freeze، حيث خضعت لعملية التسامي لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 35 درجة مئوية.
- 4- وبعد اكتمال عملية التجفيف والتأكد من عدم وجود أي بقايا مسحوق ملتصقة بالأنبوب وتحول المركبات إلى باودر نقي، تم جمع مساحيق المركبات في حافظات خاصة لغرض اجراء الاختبارات اللاحقة.

4.2.3 الزراعة الخلوية Cell culture

1.4.2.3 الخط الخلوي لسرطان الرئة البشري A549

Lung cancer cell line A549

تم الحصول على الخط الخلوي لسرطان الرئة البشري A549 من مختبر الشركة العراقية للتقنيات الاحيائية في بغداد/الحارثية، حيث تمت ادامتها وتنميتها واجراء الفحوصات المختبرية عليها. A549 هي خلايا ظهارية قاعدية سنخية بشرية غدية لسرطان الرئة البشري Adenocarcinoma human alveolar basal epithelial cells، تمثل خطأً خلويًا تم تطويره لأول مرة في عام 1972 من قبل (Giard, et al., 1973) من خلال استئصال انسجة الرئة السرطانية لرجل فوقازي يبلغ من العمر 58 عاماً، ومن ثم القيام بزراعتها في المختبر (A549 Cell Line, 2012)، تستخدم هذا الخطوط كنماذج لدراسة المركبات والأدوية لعلاج سرطان الرئة (Foster et al., 1998).

2.4.2.3 طرق التعقيم المستخدمة في الزراعة الخلوية Sterilization methods

1.2.4.2.3 التعقيم بالحرارة الرطبة Moist heat sterilization

في هذه الطريقة يتم تعقيم بعض المحاليل وبعض الأدوات المستخدمة في المختبر عن طريق جهاز المؤسدة autoclave وهو جهاز تعقيم بالبخار بدرجة حرارة تصل إلى 121 درجة مئوية وضغط يصل إلى (15 باوند / انج²) لمدة (15 – 20) دقيقة.

2.2.4.2.3 Filter membrane sterilization التعقيم بواسطة الترشيح الغشائي

في هذه الطريقة يتم تعقيم المحاليل الحساسة باستعمال ورق الترشيح الدقيق جداً وبقطر $0.22 \mu\text{m}$.

3.4.2.3 الأوساط والمحاليل الخاصة بالزراعة الخلوية Media and solutions

تم تحضير الأوساط والمحاليل المستخدمة في زراعة الخط الخلوي A549 حسب طريقة Freshney (2015):

1.3.4.2.3 المصل البقري الجنيني (FBS) Fetal Bovine Serum

استُخدم المصل البقري الجنيني (FBS) وتم تثبيته حرارياً بدرجة حرارة تصل إلى 56 درجة مئوية لمدة لا تقل عن 30 دقيقة ومن ثم تمت اضافته إلى الوسط الزراعي.

2.3.4.2.3 محلول بفر الفوسفاتي الملحي (PBS) Phosphate Buffer Saline

تم تحضير محلول (PBS) بإذابة 8 غم من كلوريد الصوديوم و0.2 غم من كلوريد البوتاسيوم و1.15 غم من مركب فوسفات احادي الصوديوم NaH_2po_4 في 800 مل من الماء المقطر، وحرّك المحلول بواسطة محرك مغناطيسي بدرجة حرارة الغرفة، ثم عدل الالاس الهيدروجيني PH إلى (7.2) بعد اكمال الحجم إلى 1 لتر، ثم وضع المحلول في المؤصدة Autoclave لغرض التعقيم، وتم خزنه بدرجة حرارة تصل إلى 4 درجة مئوية لحين استعماله في الاختبارات.

3.3.4.2.3 محلول التربسين Trypsin solution

تم تحضير هذا المحلول عن طريق إذابة 1 غم من التربسين في 100 مل من محلول بفر الفوسفاتي الملحي PBS، ثم جرت عملية التعقيم الخاصة به عن طريق ورق الترشيح Filter paper بقطر $0.22 \mu\text{m}$ ، ثم نقل المحلول إلى انبوب بحجم 10 مل وحفظ في درجة حرارة -20 درجة مئوية بالتجميد لحين الاستعمال.

4.3.4.2.3 محلول Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)

حُضِر هذا المحلول من إذابة 1 غم من ثنائي امين الاثيلين رباعي حامض الالاسيتيك Ethylene Diamine Tetra Acetic acid (EDTA) في 100 مل من محلول بفر الفوسفاتي الملحي PBS، ثم

جرت عملية تعقيمه عن طريق المؤسدة autoclave لمدة لا تقل عن 10 دقائق، ثم نقل إلى انبوب بحجم 10 مل وخنن بدرجة حرارة 4 درجة مئوية.

5.3.4.2.3 محلول Trypsin-EDTA

حُضِرَ هذا المحلول عن طريق خلط ثلاثة أنواع من المحاليل وهي 20 مل من محلول التربسين مع 10 مل من محلول EDTA بالإضافة إلى 370 مل من محلول بفر الفوسفاتي الملحي PBS، ومن ثم نقل هذا الخليط إلى دورق زجاجي وحفظ بدرجة حرارة 4 درجة مئوية.

6.3.4.2.3 محلول بيكربونات الصوديوم NaHCO₃

حُضِرَ هذا المحلول من إذابة 4 غم من NaHCO₃ في 100 مل من الماء المقطر، ثم نقل إلى جهاز المؤسدة autoclave لغرض تعقيمه وبدرجة حرارة 121 درجة مئوية لمدة لا تقل عن 15 دقيقة، ثم حفظ في الثلاجة بدرجة حرارة 4 درجة مئوية.

7.3.4.2.3 تحضير الوسط الزراعي RPMI-1640

Preparation of culture media RPMI-1640

هو وسط غذائي جاهز تم تحضيره عن طريق استخدام عبوة جاهزة خاصة بالوسط (RPMI-1640) بسعة 100 مل، ثم زود هذا الوسط بمادة (4 - 2-هيكروكسي اثيل) -1 بييرازين-ايتان حمض السلفونيك (HEPES)، ومضاف له أيضاً نوعين من المضادات الحيوية: البنسيلين Penicillin 100 units/mL، والستربتوميسين Streptomycin 100 µg/mL، بالإضافة إلى بيكربونات الصوديوم، ثم بعد ذلك أضيف 10% من المصل البقري الجنيني، ثم نقل المحلول إلى قناني زجاجية نظيفة وضعت في الحاضنة Incubator بدرجة حرارة 37 درجة مئوية لضمان عدم تلوثها لحين الاستعمال.

8.3.4.2.3 الوسط الزراعي RPMI-1640 الخالي من المصل

Serum Free Medium (SEM)

حُضِرَ بنفس الطريقة المذكورة في الفقرة (7.3.4.2.3) ولكن بدون إضافة المصل البقري الجنيني للوسط الزراعي.

9.3.4.2.3 تحضير صبغة MTT صبغة MTT Preparation of MTT Stain

تم تحضير هذه الصبغة بإذابة 50 ملغم من مسحوق صبغة MTT في 100 مل من محلول بفر الفوسفاتي الملحي PBS وذلك للحصول على تركيز 5 ملغم/مل، ثم عقم المحلول عن طريق ورق الترشيح Filter paper ذو ثقوب بقطر 0.22 µm ثم ورق ترشيح بقطر 0.45 µm، ثم وضع في زجاجات معقمة ونظيفة وفي مكان معتم وبعيد عن اشعة الشمس، وخن بدرجة حرارة 4 درجة مئوية (Meerlo) (et al., 2011).

4.4.2.3 الكشف عن تأثير الفعالية المضادة للأورام لعقار السيسبلاتين والمركبات الفعالة المستخلصة من العكبر على الخط الخلوي لسرطان الرئة البشري A549.

Detection the effect of anti-tumor activity of cisplatin drug and the active compounds extracted from propolis used in the study on the human lung cancer cell line A549.

1.4.4.2.3 أدامة وتحضير خط الخلية Maintaining and preparing

لإدامة وتحضير خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 تم الاعتماد على طريقة (Freshney, 2015) وحسب الخطوات الآتية:

1- وضعت خلايا A549 في حمام مائي بشكل انفرادي بدرجة حرارة 37 درجة مئوية لإزالة تجمدها، ثم وزعت في الدوايق الخاصة بالزراعة (Culture flasks) المحتوية على الوسط الزراعي RPMI-1640.

2- سُمح للخلايا بالانتشار الكامل في الوسط الزراعي لمدة 24 ساعة وفي جو رطب، ثم نقلت إلى حاضنة تحتوي على ثنائي أوكسيد الكربون CO₂ بدرجة حرارة 37 درجة مئوية.

3- بعد التأكد من نمو الخلايا في المزرعة وخلوها من التلوث، تم عمل مزارع ثانوية Subcultures لغرض اكثارها.

4- ثم فُحصت الخلايا عن طرق المجهر المقلوب Inverted microscope للتأكد من حيوية الخلايا وخلوها من أي ملوثات ونموها إلى العدد المطلوب (600 – 700 خلية/مل)، أي وصول الخلايا إلى التكاثر بنسبة تتجاوز 80 % في الوسط الزراعي.

- 5- نُقلت الخلايا إلى كابينة الوسط الزراعي حيث تم إزالة الوسط الزراعي RPMI-1640 وُغسلت الخلايا الملتصقة باستخدام محلول بفر الفوسفاتي PBS ولمرتين على الأقل.
- 6- نُضيف 2 - 3 مل من محلول Trypsin-EDTA المحضر حسب ما ورد في الفقرة (5.3.4.2.3) إلى الخلايا المزروعة لغرض تحويل الخلايا من طبقة أحادية الخلية Confluent monolayer إلى خلايا مفردة Single cells بعد حضن الدورق عند درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة لا تزيد عن دقيقتين إلى ان تنفصل الخلايا على سطح الدورق.
- 7- ثم إضافة الوسط الزراعي RPMI-1640 مرة أخرى لإيقاف فعالية الترسين بالكامل.
- 8- جمعت الخلايا بأنابيب خاصة بجهاز الطرد المركزي ووضعت في الجهاز وطردت بسرعة 2000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة الغرفة وذلك لترسيب الخلايا والتخلص من الراشح وتوزيع العالق الخلوي (خلايا + وسط) على دوارق أخرى تحتوي على الوسط الزراعي RPMI-1640.

2.4.4.2.3 الزراعة الثانوية للخط الخلوي A549 Subculture of A549 cell line

- اعتمدت طريقة (Phelan & May (2017)، المستخدمة في الزراعة الثانوية عن طريق استخدام الانزيم المحلل للبروتين (الترسين) لفصل الخلايا احادية الطبقة الملتصقة في قعر قارورة الاستنبات، إذ يتم ذلك عند احتياج الخلايا للزراعة الثانوي والعد الخلوي ويتم تنفيذ هذا البروتوكول على النحو الآتي:
- 1- التخلص من الوسط الزراعي عندما يصل نمو الخلايا إلى طبقة أحادية الخلية (في المرحلة الاسية).
- 2- ثم بعد ذلك تم غسل الخلايا بـ 3 مل من محلول بفر الفوسفاتي الملحي PBS.
- 3- إضافة 1 - 2 مل من محلول Trypsin-EDTA لتغطية الطبقة أحادية الخلية مع التحريك المستمر للدورق الخاص بالزراعة 4 - 5 مرات وذلك لغمر الخلايا بالكامل.
- 4- ثم تمت إعادة الدورق إلى الحاضنة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية، وذلك للسماح للخلايا بالانفصال عن السطح الداخلي للدورق (ان المدة الزمنية اللازمة لحدوث عملية الانفصال تعتمد على خط الخلية ولكن ذلك قد يحدث في غضون 2 - 10 دقائق على الأقل).
- 5- يجب عدم ترك محلول الترسين Trypsin لفترة طويلة كونه يهضم الخلايا؛ لذلك من الضروري فحصها كل بضع دقائق.

6- فحص الخلايا باستخدام مجهر مقلوب Inverted microscope لغرض التأكد من ان جميع الخلايا قد انفصلت، ومن ثم القيام بتعليقها بمجرد حدوث الانفصال (قد يتطلب هذا الامر تحريك الدورق بين الحين والآخر).

7- ثم بعد ذلك تمت إزالة محلول التربسين Trypsin من الوسط الزرعى عن طريق إضافة مصل البقر الجنيني FBS بنسبة 5 – 10%.

8- نقل الحجم المطلوب من الخلايا المعلقة إلى دوارق جديدة، ثم تم اكمالها إلى الحجم المطلوب من الوسط الزرعى الخاص بعملية الاستزراع، ثم تركت الخلايا للتجدد والاستقرار في الحاضنة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية حتى صباح اليوم التالي (كررت هذه العملية اعتماداً على متطلبات النمو الخاصة بالخط الخلوي).

3.4.4.2.3 تحضير وسط التجميد Prepare of freezing medium

اعتماداً على طريقة (Meleady & Connor (2006)، حضر هذا الوسط عن طريق إضافة 6 مل من الوسط الخالي من المصل SFM و 3 مل من مصل بقري جنيني FBS و 1 مل من محلول DMSO الذي تمت اضافته قطرة تلو الأخرى مع الخلط، ثم بعد ذلك خزّن عند درجة حرارة -20 درجة مئوية اثناء الاستخدامات.

4.4.4.2.3 تجميد الخط الخلوي Refrigeration of cell line

جُمّد الخط الخلوي A549 اعتماداً على طريقة (Yang *et al.* (2019) وحسب الخطوات الآتية:

1- غُسل دورق الاستزراع الخلوي أحادي الطبقة (المرحلة الاسية) مرتين باستخدام 5 مل من محلول

بفر الفوسفاتي الملحي PBS، ثم اضيف 3 مل من محلول Trypsin-EDTA.

2- حُضن الدورق عند درجة حرارة 37 درجة مئوية في الحاضنة؛ لغرض مساعدة الخلايا على التفكك إلى خلايا مفردة بعد انفصال الخلايا أحادية الطبقة (انفصلت الخلايا عن طريق التحريك الخفيف على جوانب الدورق).

3- أُجريت عملية الطرد المركزي للخلايا بعد نقلها إلى أنابيب الطرد المركزي المعقمة سعة 15 مل، حيث طردت مركزياً عند 800 دورة في الدقيقة ولمدة 10 دقائق.

4- بعد اجراء عملية الطرد المركزي، تم صب المادة الطافية ومن ثم إعادة تعليق حبيبات الخلية عن طريق إضافة 1مل من وسط التجميد المحضر حسب ما ورد في الفقرة (3.4.4.2.3)، ثم نُقلت إلى دورق مجمد ومعقم سعة 1.5مل.

5- حُفظت الدوارق لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة الغرفة، ثم نُقلت إلى التجميد بدرجة حرارة -80 درجة مئوية لمدة 24 ساعة (Deep freezer)، ثم حُزنت في مجمدة سائل النتروجين للحفاظ عليها لمدة طويلة.

5.4.4.2.3 اذابة مسحوق الباودر لعقار السيسبلاتين والمركبات الفعالة المستخلصة من العكبر

Dissolving the powder for cisplatin drug and the active compounds extracted from propolis

حُضرت تراكيز كل من العلاج الكيميائي (Cisplatin) والمركبات الفعالة المستخلصة من العكبر وهي (CA, CAPE, CHR)، حيث تم إذابة 0.01 غم من المستخلص الجاف لكل من السيسبلاتين والمركبات الفعالة المستخلصة من العكبر في وسط زرعي RPMI-1640 خالي من المصل SFM، تمهيداً للقيام بالاختبارات اللاحقة.

6.4.4.2.3 فحص MTT لاختبار السمية الخلوية Cytotoxicity

1.6.4.4.2.3 المبدأ Principle

إنَّ الغاية من عمل اختبار MTT هو لقياس حيوية الخلايا Cells viability، بالإضافة إلى تحديد السمية الخلوية Cytotoxicity للعديد من الأدوية المستخدمة في الدراسة أو المركبات الفعالة المستخلصة من مادة العكبر، إذ يتم استخدام صفيحة تحتوي على 96 حفرة وبتراكيز مختلفة ومكررة لكل حفرة، ان مبدأ الاختبار يعتمد على بيوت الطاقة للخلايا Mitochondria ولذلك فإن الزيادة أو النقصان في عدد الخلايا يرتبط ارتباطاً خطياً بنشاط المايكوكوندريا، وينعكس هذا النشاط من خلال تحويل املاح Tetrazolium ذو اللون الأصفر الباهت (صبغة MTT) إلى صبغات الفورمازان Formazan التي تكون على شكل بلورات Crystals ارجوانية اللون داكنة بعض الشيء والتي يمكن إذابتها للقياس المتجانس وبالتالي معرفة الزيادة والنقصان في عدد الخلايا الحية من خلال قياس تركيز الفورمازان Formazan المنعكس في

الكثافة البصرية (الامتصاصية) باستخدام جهاز القارئ الدقيق Microplate reader عند طول موجي 492 نانومتر، حيث كلما كان المحلول اعمق كلما كانت اعداد الخلايا الحية متزايدة (Meerloo *et al.*, 2011).

2.6.4.4.2.3 طريقة العمل Procedure

اعتمدت طريقة محمد (Ahmed *et al.* (2023) في تجربة كشف الحيوية والسمية الخلوية وكما يلي:

1- زُرعت الخلايا ثم نُميت ($10^4 \times 1$ خلية/حفرة) بحسب فقرة ادامة وتحضير الخلايا (1.4.4.2.3)، ثم وضع المعلق الخلوي في صفيحة تحتوي على 96 حفرة well ذات قاعدة مسطحة، تمت تغطيتها بغلاف بلاستيكي Para film معقم، بعد ذلك رَجّت برفق، ثم اضيف 200 ميكرو لتر من الوسط الزراعي لكل حفرة.

2- تمت إزالة الوسط الزراعي بعد حضن الخلايا لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 درجة مئوية؛ وذلك لتكوين طبقة أحادية متكلسة.

3- تم عمل ستة تراكيز مخففة من عقار السيسبلاتين والمركبات الفعالة المستخلصة من العكبر وهي (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2) $\mu\text{g/mL}$ في حفر الصفيحة لاستخدامها كمادة علاجية بواقع ثلاث مكررات لكل تركيز مع عينة السيطرة (خلايا A549 غير معالجة).

4- تم قياس حيوية الخلية Cell viability بعد 48 ساعة من تعريض الخلايا للعلاج وذلك عن طريق إضافة 28 مايكرو لتر بتركيز 2 ملغم/مل من صبغة MTT.

5- بعد إضافة صبغة MTT، حضنت الخلايا بدرجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 1.5 ساعة.

6- تمت إزالة صبغة MTT من الحفر Wells، بعد ظهور بلورات الفورمازان Formazan داخل الخلايا بشكل طافي.

7- أُضيف محلول الإذابة (DMSO) بحجم 130 مايكرو لتر في كل حفرة؛ وذلك لإذابة بلورات الفورمازان الناتجة، ثم حضنت لمدة 15 دقيقة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية مع التحريك المستمر حتى تتحلل الخلايا وتذوب البلورات الأرجوانية.

8- تم قياس الامتصاصية Absorbance عن طريق جهاز Microplate reader وبطول موجي 492 نانومتر (تم اجراء الفحص لثلاث مكررات).

9- تم حساب معدل تثبيط الخلايا (نسبة السمية الخوية) حسب المعادلة الآتية:

$$\text{Cell viability} = \frac{\text{absorbance of treated cells}}{\text{absorbance of non treated cells}} \times 100$$

$$\text{Cytotoxicity} = 100 - \text{cell viability}$$

10- خُضعت نتيجة جهاز Microplate reader (الكثافة البصرية OD) إلى التحليل الاحصائي لتحديد التركيز المثبط لنصف عدد الخلايا السرطانية لعقار السييسبلاتين والمركبات الفعالة المستخلصة من العكبر (IC50) وحسب المعادلة الآتية:

$$\text{Viability \%} = \frac{\text{Optical density of the sample}}{\text{Optical density of the control}} \times 100$$

حيث ان:

Viability %: النسبة المئوية لحيوية الخلايا

Optical density: الكثافة البصرية

Sample: العينة

Control: السيطرة القياسية

11- تم اختبار المقارنات المتعددة بين التراكيز الستة المستخدمة ولكل مركب مع اختبار المعنوية لها.

5.2.3 تقدير تعبير المعايير المناعية على سطح خط خلايا سرطان الرئة البشري A549

Flow cytometry باستخدام تقنية التدفق الخلوي

Estimation the expression of immunological markers on the surface of the human lung cancer cell line A549 using flow cytometry assay

1.5.2.3 مبدأ استخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry

Principle use of flow cytometry assay

تعد تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry أحد أهم التقنيات المستخدمة في المختبرات البيولوجية إذ تستخدم بشكل شائع في تحديد الأنماط الظاهرية إلى جانب اكتشاف الآليات في الاختبارات المعتمدة على

الخلية، وان الذي يجعل هذه التقنية فعالة هو إعطائها لتحاليل سريعة ومفصلة لتجمعات خلوية معقدة في مدة قصيرة، بالإضافة إلى ذلك فإن البيانات التي يتم الحصول عليها تكون كمية ونوعية.

يعتمد مبدأ استخدام هذه التقنية على قياس التآلق البصري والميزات التألقية Fluorescent features لجزيئات محددة ومعلّمة تمر من خلال مجرى السائل الخلوي، إذ يمكن تحديد بعض الخصائص الفيزيائية مثل حجم الخلية والمحتويات الداخلية للخلية من خلال قياس الضوء الذي تمتصه الخلايا أو تنثره أثناء استخدام الفلورات، حيث يمكن للمعايير ان تُمَيِّز بين مجموعة واسعة من مستضدات سطح الخلية والمستضدات السيتوبلازمية، بالإضافة إلى قياس محتوى الحمض النووي (DNA, RNA) ومجموعة واسعة من البروتينات داخل الخلية (Adan *et al.*, 2017 ; Sabir, 2020).

2.5.2.3 طريقة العمل Procedure

1.2.5.2.3 الاجسام المضادة وحيدة النسيلة Monoclonal antibodies

تم الحصول على الاجسام المضادة وحيدة النسيلة Monoclonal antibodies من شركة (Santa Cruz Biotechnology, USA)، وكانت هذه الاجسام المضادة مرتبطة بالوان معينة، حيث ان لكل جسم مضاد لون خاص به يلائم اللون المعرّف في جهاز التدفق الخلوي Flow cytometry، وهي كالاتي: الاجسام المضادة الخاصة بالمعيار المناعي PDL-1 (PerCP-Cyanine5.5 Anti-human CD274/PDL-1 antibody) ذو الرقم التسلسلي (E-AB-F1133J)، والاجسام المضادة الخاصة بالمعيار المناعي CD24 (PE Anti-human CD24 antibody) ذو الرقم التسلسلي (E-AB-F1147D)، والاجسام المضادة الخاصة بالمعيار المناعي CXCR4 أو CD184 (APC Anti-human CXCR4 antibody) ذو الرقم التسلسلي (E-AB-F1157E)، تم وضعها في التجميد بدرجة حرارة -4 درجة مئوية لحين استخدامها في الاختبارات اللاحقة.

2.2.5.2.3 تحضير العينة Sample preparation

تم تحضير العينات اعتماداً على طريقة Schulz *et al.* (2021) و Sabir (2020) وحسب الخطوات الآتية:

1- لمعرفة تعبير المعايير المناعية (PDL-1 و CD24 و CXCR4)، تم تحضير 5 أنابيب زجاجية سعة 10 مل، ثم زرع فيها (1×10^5) من الخط الخلوي لسرطان الرئة البشري A549 المخزون في ورق خاص به.

2- تم تعليم الأنابيب الزجاجية الخمسة، حيث كان الانبوب الأول خاص بالسيسبلاتين Cisplatin والثاني والثالث والرابع خاصة بالمركبات الفعالة المستخلصة من العكبر (CA و CAPE و CHR) والخامس هو الانبوب الخاص بالسيطرة Control (خلايا سرطانية غير معالجة).

3- عرضت الخلايا السرطانية للتراكيز القاتلة لنصف عدد الخلايا (IC50) لكل من السيسبلاتين والمركبات الفعالة المستخلصة من العكبر ولمدة 24 ساعة.

4- أضيفت مادة التريبسين Trypsin المحضرة بحسب ما ورد في الفقرة (3.3.4.2.3) إلى جميع الأنابيب المحضرة مسبقاً؛ وذلك لغرض الحصول على خلايا مفردة Single cell.

5- نُقلت الأنابيب إلى المختبر الخاص بإجراء عملية التدفق الخلوي Flow cytometry؛ لغرض إجراء الاختبارات اللازمة.

6- حضّرت 5 أنابيب زجاجية سعة 10 مل خاصة بجهاز التدفق الخلوي Flow cytometry، لفرز الخلايا الفلورية وتكون ذات قطر (12 x 75 mm).

7- أضيفت 400 µl مايكرو لتر من الخلايا السرطانية A549 المعالجة بالسيسبلاتين إلى الأنبوب الأول، ثم أضيفت (100) مايكرو لتر من الاجسام المضادة المرتبطة بالفلوروكروم والخاصة بكل نوع من المعايير المناعية المدروسة (PDL-1 و CD24 و CXCR4) (تمت إضافة 100 µl لكل نوع من هذا الاجسام مجتمعة مع بعضها في نفس الانبوب).

8- كُدرت العملية في الخطوة رقم (7) لكل من الأنابيب المحتوية على المركبات الفعالة المستخلصة من مادة العكبر وكذلك بالنسبة لخلايا السيطرة غير المعالجة.

9- حُضنت الأنابيب في غرفة مظلمة لمدة 15 دقيقة وبدرجة حرارة الغرفة.

10- بعد عملية الحضانة، تم حساب التقدير على جهاز Flow cytometry analysis FACS (BD Bioscience) canto II، ثم تم تحليل النتائج على برنامج Dive software version

2016 على جهاز الكمبيوتر، حيث تم حساب (100000) على الأقل لكل عينة، وتم كشف تشتت الضوء الناتج عن الخلايا عن طريق Side scatter (SSC) والذي يقيس التشتت الضوئي بزاوية (90) درجة بالنسبة لليزر، إذ تم استخدامه مع جميع الاجسام المضادة لمعرفة كمية التعبير الخاصة بكل بروتين مناعي ولتحديد الخلايا التي تعبر عن هذه البروتينات في كل أنبوب وهي كالاتي:

SSC vs. CD24 monoclonal antibody -a

SSC vs. PDL-1 monoclonal antibody -b

SSC vs. CXCR4 monoclonal antibody -c

6.2.3 التحليل الاحصائي Statistical analysis

تم تحليل البيانات الإحصائية الخاصة باختبار السمية الخلوية عن طريق استخدام اختبار توكي للمقارنات المتعددة Unpaired t-test، مع استخدام برنامج Graph pad prism 6 (Mohammed *et al.*, 2019)، وتم حساب قيم معدل الانحراف المعياري \pm SD لقياس ثلاث مكررات (Al-Ziaydi *et al.*, 2020). اما البيانات الإحصائية الخاصة بتقدير مستوى التعبير للمعايير المناعية فقد تم اجراء جميع التحليل الإحصائية باستخدام البرنامج الاحصائي Statistical Package for Social Sciences (SPSS 24)، والوسائل الإحصائية المستخدمة هي اختبار مربع كاي (Chi-Square).

الفصل الرابع
النتائج والمناقشة

Results
and
Discussion

4. النتائج والمناقشة Results and Discussion

1.4 الكشف الكيميائي عن المركبات الفعالة في المستخلص الايثانولي للعكبر

Chemical detection of active compounds in ethanolic extract of propolis extracts

شُخصت المركبات الفعالة في مادة العكبر عن طريق استخدام جهاز HPLC، حيث بينت نتائج التحليل الكروماتوغرافي Chromatographic analysis في الدراسة الحالية ان هنالك تقارب وثيق الصلة بين المحاليل القياسية للمركبات المدروسة والمركبات الفعالة المستخلصة من مادة العكبر من ناحية وقت الاحتجاز Retention time، ولكن كانت هنالك اختلافات متوسطة عند مقارنتها من ناحية ارتفاع القمة Height peak ومساحة القمة Areal peak.

1.1.4 التحليل الكيميائي للمركبات القياسية بواسطة جهاز HPLC

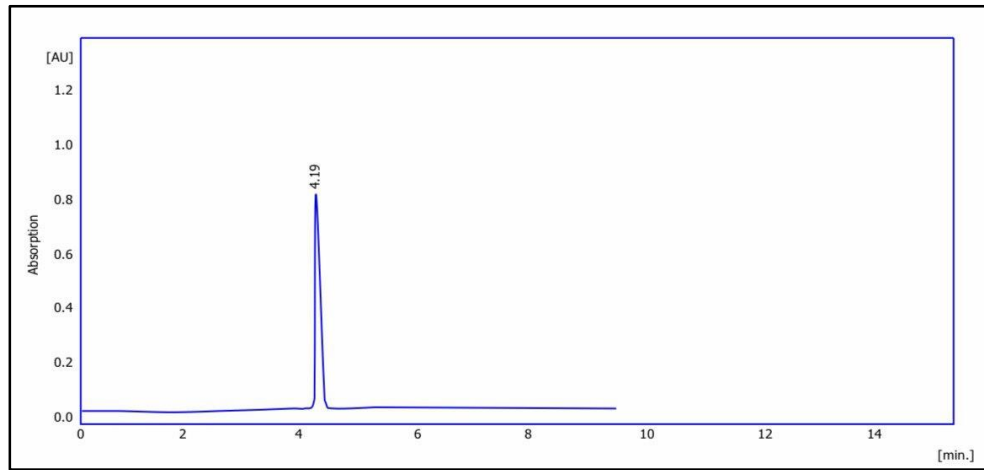
Chemical analysis of standard compounds by HPLC

بعد استخدام تدرجات مختلفة Gradient elution في المرحلة المتحركة Mobile phase في عمود الفصل الموجود في جهاز HPLC عن طريق إضافة (100 %) من محلول الميثانول Methanol باعتباره eluent A و(1 %) من حامض الفورميك Formic acid باعتباره eluent B وبأوقات احتجاز مختلفة تبدأ من (0 – 4) دقيقة كانت فيها نسبة eluent A (60 %) ونسبة eluent B (40 %)، ومن (4 – 10) دقائق كانت فيها نسبة eluent A و(50 %)، أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان وقت احتجاز RT المركب القياسي CA كان في الدقيقة (4.19) بينما بلغ ارتفاع القمة Height peak نحو (621.49 mAU)، في حين كانت مساحة القمة Areal peak حوالي (520.14 mAU.s)، كما بينت النتائج ان وقت احتجاز RT المركب القياسي CAPE كان أقل مما هو عليه في المركب CA، حيث احتجز في الدقيقة (2.80)، بينما بلغ ارتفاع القمة Height peak حوالي (120.15 mAU)، وكانت مساحتها بحدود (725.14 mAU.s)، كما بينت نتائج الدراسة الحالية ان وقت احتجاز RT المركب القياسي CHR كان أعلى من المركبين السابقين، حيث احتجز في الدقيقة (7.80)، وكان ارتفاع القمة Areal peak حوالي (811.47 mAU)، بينما كانت مساحتها بحدود (621.49 mAU.s)، كما هو موضح في الجدول (1-4).

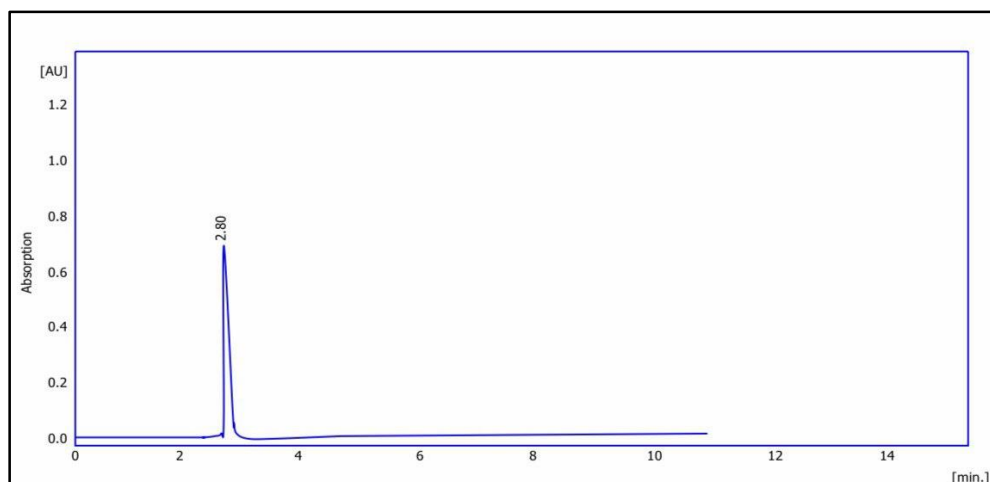
إنّ النتائج الموضحة في الجدول (1-4) تم الحصول عليها بشكل أساسي من الاشكال (1-4 و 2-4 و 4-3) الخاصة بالتحليل الكروماتوغرافي Chromatographic analysis في جهاز HPLC، حيث فسرت هذه الاشكال وقت الاحتجاز الخاص بكل مركب قياسي، بالإضافة إلى تفسير كل من ارتفاع القمة ومساحتها.

جدول (1-4) نتائج التحليل الكروماتوغرافي للمركبات القياسية Standard compounds وهي Caffeic acid و Caffeic acid phenethyl ester و Chrysin باستخدام جهاز HPLC.

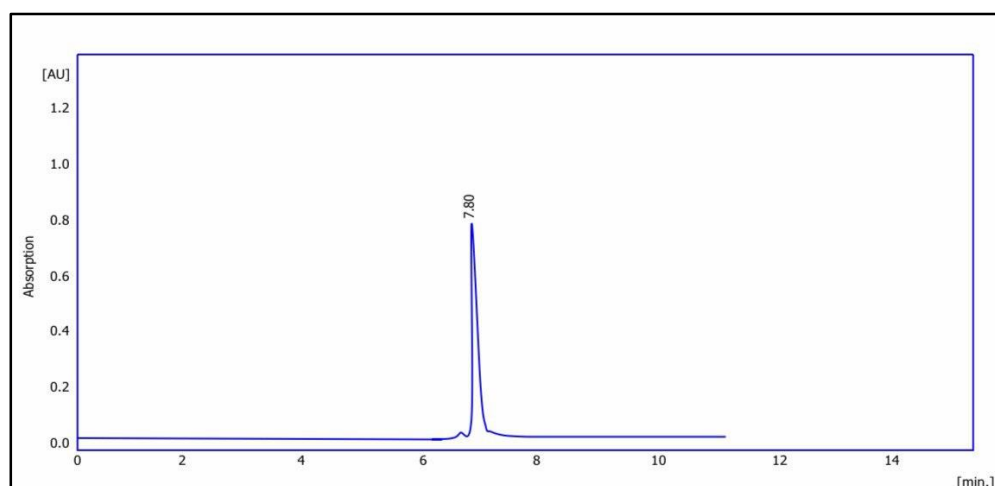
مساحة القمة Areal peak (mAU.s)	ارتفاع القمة Height peak (mAU)	وقت الاحتجاز Retention Time (min)	المركب القياسي Standard compound
520.14	621.49	4.19	Caffeic acid
725.14	120.15	2.80	Caffeic acid phenethyl ester
621.49	811.47	7.80	Chrysin



شكل (1-4) مخطط كروماتوغرافي للمركب القياسي Caffeic acid بواسطة جهاز HPLC ويظهر فيه وقت الاحتجاز Retention time وارتفاع القمة Height peak ومساحتها Areal peak.



شكل (2-4) مخطط كروماتوغرافي للمركب القياسي Caffeic acid phenethyl ester بواسطة جهاز HPLC ويظهر فيه وقت الاحتجاز Retention time وارتفاع القمة Height peak ومساحتها Areal peak.



شكل (3-4) مخطط كروماتوغرافي للمركب القياسي Chrysin بواسطة جهاز HPLC ويظهر فيه وقت الاحتجاز Retention time وارتفاع القمة Height peak ومساحتها Areal peak.

2.1.4 التحليل الكيميائي للمركبات الفعالة في مستخلص العكبر بواسطة جهاز HPLC

Chemical analysis of the active compounds in propolis extract by HPLC

عند القيام بالتحليل الكيميائي للكشف عن المركبات الفعالة الموجودة في مستخلص عينة العكبر عن طريق جهاز HPLC وبنفس ظروف التحليل التي استخدمت عند الكشف عن المركبات القياسية Standard compounds، أوضحت نتائج الدراسة الحالية وجود تشابه في وقت الاحتجاز RT بين المركبات القياسية والمركبات الفعالة الموجودة في العينة، حيث كان وقت احتجاز المركب الفعال CA هو (4.19) دقيقة، في حين كان وقت احتجاز المركب الفعال CAPE هو (2.89) دقيقة، بينما احتجز المركب الفعال CHR في الدقيقة (7.86)، كما بينت نتائج الدراسة أيضاً وجود اختلافات متوسطة بين المركبات القياسية والمركبات الفعالة من ناحية ارتفاع القمة Height peak ومساحتها Areal peak، حيث كان ارتفاع القمة في المركب الفعال CA أعلى بقليل مما هو عليه في المركب القياسي، إذ بلغ حوالي (798.25 mAU)، في حين كانت مساحة القمة Areal peal بحدود (3249.88 mAU.s)، كما بينت النتائج الحالية ان ارتفاع القمة ومساحتها للمركب الفعال CAPE كانت أقل من CA، حيث بلغ الارتفاع حوالي (710.59 mAU)، بينما كانت مساحة القمة بحدود (2635.58 mAU.s)، بالإضافة إلى ذلك بينت النتائج وجود اختلافات أيضاً بين المركب الفعال CAPE والمركب القياسي على مستوى ارتفاع ومساحة القمة، إذ كان ارتفاع القمة ومساحتها أعلى بكثير مما هو عليه في المركب القياسي، في حين بينت نتائج الدراسة الحالية أيضاً ان ارتفاع القمة ومساحتها في المركب الفعال CHR كانت أقل بكثير مما هو موجود في المركبين الفعالين CA وCAPE، حيث بلغ ارتفاعها حوالي (325.66 mAU)، في حين كانت مساحتها بحدود (1256.98 mAU.s)، كما كانت هنالك اختلافات أيضاً بين المركب الفعال CHR والمركب القياسي من ناحية ارتفاع القمة ومساحتها، حيث كان ارتفاعها في المركب الفعال أقل مما هو عليه في المركب القياسي، بينما كانت المساحة أكبر في المركب الفعال مما هو عليه في المركب القياسي، كما هو موضح في الجدول (2-4).

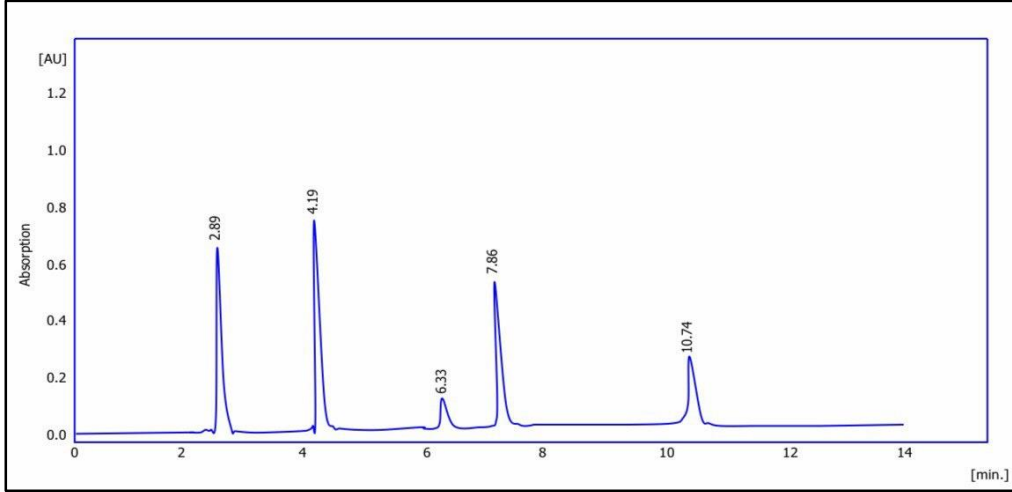
إنّ النتائج الموضحة في الجدول (2-4) تم الحصول عليها بالاعتماد على المعلومات الموجودة في الشكل (4-4) الخاص بالتحليل الكروماتوغرافي Chromatographic analysis لمستخلص عينة

العكبر في جهاز HPLC، حيث فسر هذا الشكل أوقات الاحتجاز RT لكل مركب فعال من المركبات الثلاثة الموجودة في مستخلص العكبر.

كما أظهرت نتائج الدراسة الحالية التراكيز الخاصة بكل مركب فعال في مستخلص عينة العكبر المستخدمة في الدراسة، حيث امتلك المركب الفعال CA أكبر نسبة تركيز بين المركبات الثلاث وكانت (69.58) mg/g، في حين كانت تراكيز كل من المركبين CAPE و CHR (48.97 و 33.69) mg/g على التوالي.

جدول (2-4) نتائج التحليل الكروماتوغرافي للمركبات الفعالة **Active compounds** وهي **Caffeic acid** و **Caffeic acid phenethyl ester** و **Chrysin** الموجودة في مستخلص عينة العكبر **propolis** باستخدام جهاز HPLC.

مساحة القمة Areal peak (mAU.s)	ارتفاع القمة Height peak (mAU)	وقت الاحتجاز Retention Time (min)	المركب الفعال Active compound
3249.88	798.25	4.19	Caffeic acid
2653.58	710.59	2.89	Caffeic acid phenethyl ester
1256.98	325.66	7.86	Chrysin



شكل (4-4) مخطط كروماتوغرافي للمركبات الفعالة في مستخلص عينة العكبر Propolis بواسطة جهاز HPLC ويظهر فيه وقت الاحتجاز Retention time وارتفاع القمة Height peak ومساحتها Areal peak.

ووفقاً لما اظهرته نتائج الدراسة الحالية عند الكشف عن المركبات الفعالة المستخلصة كحولياً من العكبر الخام، تبين ان هذه المركبات لها دور فعال في تثبيط نمو خط خلايا سرطان الرئة البشري A549، وذلك عن طريق آلية السمية الخلوية Cytotoxicity، حيث تم استخلاص المركب عن طريق تقنية كروماتوغرافيا السوائل عالية الأداء HPLC، وهي تقنية مهمة جداً تستخدم لتوصيف أو الكشف عن المركبات الفينولية والفلافونويدية الموجودة في مستخلصات العينية النباتية (Deseva et al., 2020).

اشارت العديد من الدراسات إلى أهمية العكبر في العديد من الأنشطة الحياتية بسبب ما يحتويه من مركبات كيميائية سواء كانت احماض فينولية أو مركبات متعددة الفينول، حيث أشار (Shahbaz et al., 2021) في دراسته على التركيب الكيميائي للعكبر الباكستاني الذي تم جمعه من الأماكن المحيطة بمنطقة فيصل اباد، ان مستخلص العكبر الايثانولي احتوى على عدد من المركبات الكيميائية الفعالة مثل CA بتركيز (8.21 mg/kg)، و Ferulic acid بتركيز (4.74 mg/kg)، و p-coumaric acid بتركيز (12.31 mg/kg)، في حين أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان تركيز CA في العكبر الراقي هو (69.58 mg/kg)، كما ذكر (Tosi et al., 2007) ان مستخلص العكبر الارجنطيني يحتوي على المركبات Coumaric acid و Syringic acid بتركيز (2.1% و 12.1%) على التوالي، كما قام (Christov et al., 2005) بتحديد تراكيز المركبات Ferulic acid و CA و p-coumaric acid في مستخلص العكبر الكندي، حيث كانت (10 و 1 و 18.8) على التوالي، وأشار (Mello et al., 2010) إلى ان كمية

CA كانت (1.04 ug/mL) في المستخلص الايثانولي للعكبر البرازيلي، وكانت هذه النتائج قابلة للمناقشة مع نتائج الدراسة الحالية، إذ اختلفت كمية المركبات الموجودة في مستخلصات العكبر من مناطق ودول مختلفة عما هو عليه في المستخلص الايثانولي للعكبر المحلي العراقي، وان سبب هذه الاختلافات بين النتائج ربما تعود إلى المناخ والتوزيع الجغرافي للعكبر ونوع النبات الذي جمع منه، وفي دراسة (Cunha *et al.*, 2021) على العكبر، اظهر ان المستخلص الكحولي يتكون من عدة مركبات كيميائية فعالة حيويًا وتساهم في تثبيط نمو العديد من الأورام السرطانية، بالإضافة إلى ذلك، تعمل أيضاً كمعدلات مناعية Immunomodulatory من خلال عملها كمثبطات للجهاز المناعي، كما يمكن ان تلعب دوراً كبيراً في الحد من عملية الموت المبرمج في الخلايا وإزالة الجذور الحرة Free radicals، وأوضح ان هذه المركبات هي CA بتركيز (0.278 mg/mL) و Baccharin بتركيز (2.263 mg/mL) و-4,5 Di-O-caffeoylquinic acid بتركيز (4.761 mg/mL) و Artepillin C (10.96 mg/mL)، وبين (Ozidal *et al.*, 2018)، في دراسته على العكبر التركي، ان المستخلص الايثانولي للعكبر اظهر تأثيراً مضاداً للتكاثر الخلوي Cell proliferation في نوعين من خطوط خلايا سرطان الثدي (MDA-MB-231, UACC-3199)، وان السبب في ذلك يعود إلى احتوائه على بعض المركبات الكيميائية الفينولية مثل Pinocembrin بتركيز (18.7 mg/g)، و Chrysin بتركيز (16.65 mg/g)، و Galangin بتركيز (13.66 mg/g)، بالإضافة إلى وجود العديد من الأحماض الفينولية مثل CA بتركيز (0.88 mg/g)، و Ferulic acid بتركيز (0.56 mg/g) و T-cinnamic acid بتركيز (0.51 mg/g)، حيث اختلفت هذه التراكيز مع تراكيز المركبات المستخلصة من العكبر في الدراسة الحالية، إذ كانت التراكيز (33.69 و 48.97 و 69.58) mg/kg في CA و CAPE و CHR على التوالي، وذكر (Mot *et al.*, 2011) ان الاختلاف الموجود في تراكيز المركبات والأحماض الفينولية في عينات العكبر، قد يكون سببه التغيرات الحاصلة في مناخ المنطقة الجغرافية والاصل النباتي الذي جمعت منه المادة الكيميائية عن طريق النحل، وفي دراسة (Barbaric *et al.*, 2011) على التركيب الكيميائي لـ (20) عينة من العكبر الكرواتي وتأثيرها على خط خلايا (HeLa)، بين ان المستخلص الكحولي للعكبر يحتوي على العديد من المكونات الكيميائية والتي تم الكشف عنها باستخدام جهاز HPLC المستخدم للكشف عن الأحماض الفينولية والمركبات الفلافونويدية، حيث أظهرت الدراسة ان المركب Chrysin كان يتواجد في (8) من اصل (20) عينة للمستخلصات الكحولية للعكبر وبتركيز تتراوح من (0.7844 – 4.1356 mg/g)، وكشف (Ali *et al.*, 2012) في دراسته على التحليل الكيميائي والصفات الفيزيائية للعكبر العراقي، عن (10) مركبات كيميائية فعالة حيويًا وهي (Flavanone, 3- Hydroxyflavone,)

Chrysin, Quercetin, Galangin, Apigenin, Kaempferol, O-coumaric acid, Caffeic acid and Ferulic acid. حيث تم تشخيص هذه المركبات بالاعتماد على القيمة المعلومة للمركبات القياسية Standard compounds لكل مركب في مستخلص العكبر، وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية، إذ تم الكشف عن المركبات (CA و CAPE و CHR) بالاعتماد ايضاً على القيمة المعلومة للمركب القياسي Standard compound، ولكن الاختلاف كان في استخدام جهاز HPLC في الدراسة الحالية بدلاً من TLC، وذكر (Zabaiou *et al.*, 2017 ; El-Seedi *et al.*, 2022) ان المركبات والأحماض الفينولية ومشتقاتها والمركبات الفلافونية ومشتقاتها تعد من المركبات الرئيسية المسؤولة عن الأنشطة الحيوية والتأثيرات العلاجية في العكبر، وهذا ما اظهرته نتائج الدراسة الحالية التي بينت ان المركبات الفعالة في العكبر العراقي هي مركبات نشطة ضد خلايا السرطان ولاسيما خط خلايا سرطان الرئة البشري A549.

2.4 التأثيرات السمية الخلوية لعقار السيسبلاتين Cisplatin في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549

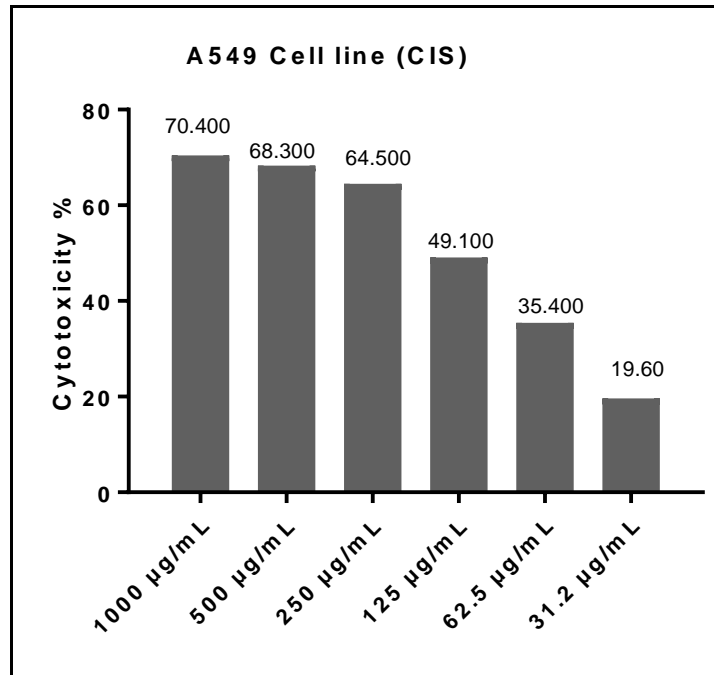
Cytotoxic effect of cisplatin drug in human lung cancer cell line A549

بينت نتائج الدراسة الحالية وجود تأثيرات سمية خلوية Cytotoxicity للسيسبلاتين في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 بعد استخدام ستة تراكيز وهي (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25) $\mu\text{g/mL}$ ، ولمدة (48) ساعة، حيث تم حساب السمية الخلوية اعتماداً على حساب معدل النسبة المئوية لتنشيط الخلايا (Inhibition rate)، وتم تصيغ الخلايا بصبغة MTT ثم قيست الكثافة البصرية Optical density عند الطول الموجي 492 نانوميتر، ثم قورنت جميع التراكيز مع خلايا السيطرة control (خلايا سرطانية غير معالجة).

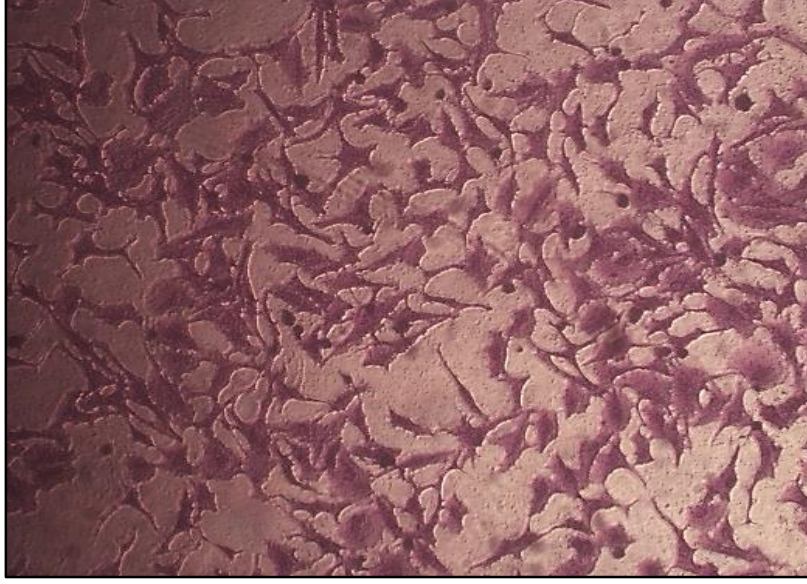
أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود تأثيرات سمية خلوية للسيسبلاتين في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549، حيث كانت أعلى نسبة معدل لتنشيط الخلايا عند التراكيز (1000 و 500 و 250) $\mu\text{g/mL}$ ، إذ بلغت (70.400% و 68.300% و 64.500%) على التوالي، بينما كانت أقل نسبة لتنشيط عند التركيز (31.2) $\mu\text{g/mL}$ ، حيث كانت (19.60%)، كما هو موضح في الشكل (4-5)، كما بينت نتائج الدراسة الحالية ان تركيز عقار السيسبلاتين المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) هو (43.75)

$\mu\text{g/mL}$ ، إذ انه تراوح بين (24.77 – 77.28) $\mu\text{g/mL}$ ، كما هو موضح في الشكل (4-6)، ومن الجدير بالذكر ان كلما قل التركيز المثبط لنصف عدد الخلايا كلما كان أكثر تأثيراً من ناحية السمية الخلوية وبالتالي ازدياد الفعالية المضادة للورم، وان الصورة (4-1) توضح شكل الخلايا السرطانية تحت المجهر المقلوب والتي تأثرت بالتركيز المثبط لنصف عدد الخلايا لعقار السيسبلاتين مقارنة مع خلايا السيطرة control الموضحة في الصورة (4-2).

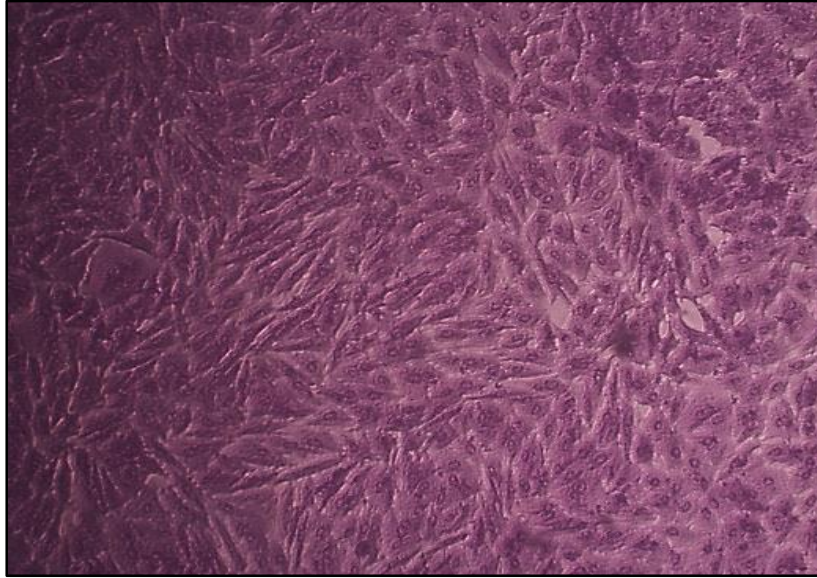
أوضحت نتائج الدراسة الحالية وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$) في التراكيز الستة للسيسبلاتين عند مقارنتها مع خلايا السيطرة Control، حيث كانت هنالك فروق معنوية ($P \leq 0.05$) بين التراكيز 1000 و(0.2663 ± 0.02876) و500 و(0.2857 ± 0.00318) و250 و(0.3193 ± 0.007839) و125 و(0.458 ± 0.01473) و62.5 و(0.582 ± 0.01617) و31.25 و(0.7243 ± 0.005207) مقارنةً مع خلايا السيطرة Control (0.9013 ± 0.02106)، كما هو موضح في الشكل (4-7).



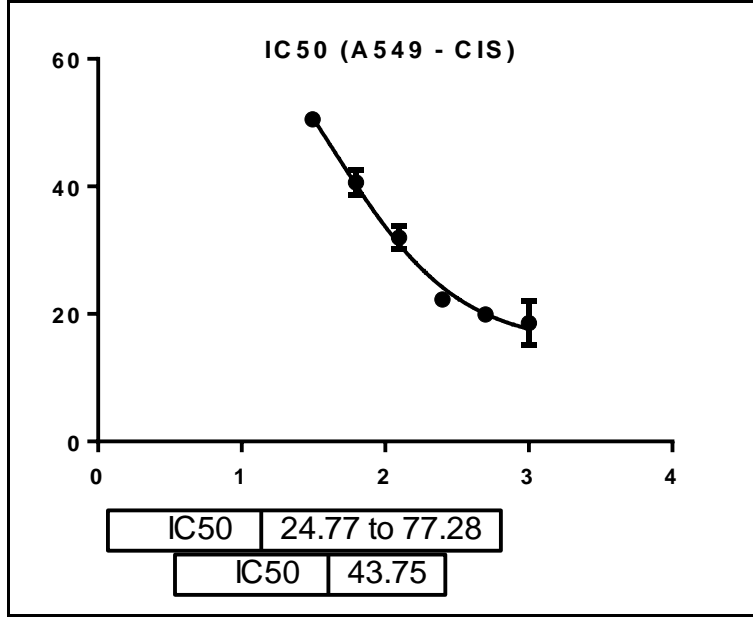
شكل (4-5) التأثيرات السمية الخلوية Cytotoxicity في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 بعد معاملتها بستة تراكيز (3 مكررات لكل تركيز) من عقار السيسبلاتين (CIS) باستعمال فحص MTT لمدة (48) ساعة.



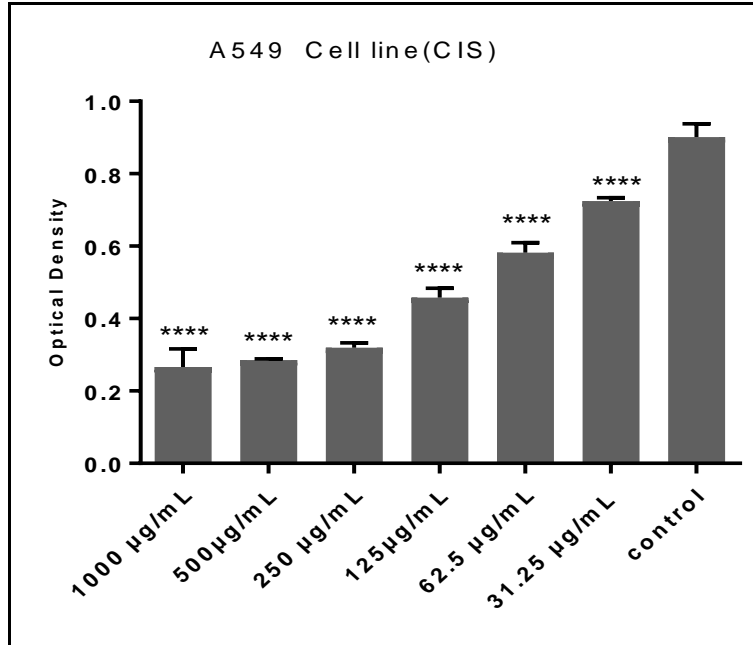
صورة (1-4) خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 تحت المجهر المقلوب بعد معاملتها بالتركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) لعقار السيسبلاتين (صبغة Crystal violet، قوة التكبير 100X).



صورة (2-4) خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 السيطرة Control غير المعالجة Untreated تحت المجهر المقلوب (صبغة Crystal violet، قوة التكبير 100X).



شكل (4-6) تأثير التركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) لعقار السيسبلاتين على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549.



شكل (4-7) تأثير عقار السيسبلاتين على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 مقارنة مع خلايا السيطرة باستعمال فحص MTT لمدة (48) ساعة، ****: (P ≤ 0.05)، SE: الخطأ القياسي.

وعند تحليل النتائج احصائياً عن طريق اختبار توكي للمقارنات المتعددة Tukey's multiple comparisons test لتراكيز عقار السييسبلاتين، أظهرت نتائج الدراسة الحالية عدم وجود فروقات معنوية ($P > 0.05$) بين التركيز ($1000 \mu\text{g/mL}$) وكل من التركيزين ($250, 500 \mu\text{g/mL}$)، إلا أنه كانت هنالك فروقات معنوية ($P \leq 0.05$) عند مقارنة التركيز ($1000 \mu\text{g/mL}$) مع كل من التراكيز ($31.25, 62.5, 125 \mu\text{g/mL}$)، بالإضافة إلى ذلك، كانت هنالك فروقات معنوية ($P \leq 0.05$) عند مقارنة التركيز ($1000 \mu\text{g/mL}$) مع خلايا السيطرة، وعند مقارنة التركيز ($500 \mu\text{g/mL}$) مع التركيز ($250 \mu\text{g/mL}$)، بينت النتائج عدم وجود فروق معنوية ($P > 0.05$)، في حين أظهرت النتائج وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$) عند مقارنته مع التراكيز ($31.25, 62.5, 125 \mu\text{g/mL}$)، بالإضافة إلى ذلك، وجود فروق معنوية عند مقارنته مع خلايا السيطرة، كما بينت نتائج الدراسة الحالية وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$) عند مقارنة التركيز ($250 \mu\text{g/mL}$) مع كل من التراكيز ($62.5, 125, 31.25 \mu\text{g/mL}$)، بالإضافة إلى ذلك، كانت هنالك فروق معنوية عند مقارنة نفس التركيز مع خلايا السيطرة، وأوضحت نتائج الدراسة الحالية وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$) بين التركيز ($125 \mu\text{g/mL}$) وكل من التركيزين ($31.25, 62.5 \mu\text{g/mL}$) بالإضافة إلى ذلك، كانت هنالك فروق معنوية عند مقارنته مع خلايا السيطرة، ولوحظ وجود فروقات معنوية ($P \leq 0.05$) عند مقارنة التركيز ($62.5 \mu\text{g/mL}$) والتركيز ($31.25 \mu\text{g/mL}$) بالإضافة إلى ذلك، كانت هنالك فروقات معنوية أيضاً بين التركيز ($62.5 \mu\text{g/mL}$) وخلايا السيطرة، كما أظهرت النتائج وجود فروق معنوية عند مقارنة التركيز ($31.5 \mu\text{g/mL}$) مع خلايا السيطرة، كما هو موضح في الجدول (3-4).

جدول (3-4) مقارنة متعددة عن طريق اختبار Tukey test للمقارنات المتعددة بين تراكيز عقار السييسبلاتين بعضها مع بعض عند استخدامها كفعالية مضادة ضد الخط الخلوي لسرطان الرئة البشري A549، بالإضافة إلى مقارنتها مع خلايا السيطرة Control.

مقارنة متعددة بين تراكيز عقار السييسبلاتين	الفروق المعنوية Significances	قيمة الاحتمالية P.value
1000 $\mu\text{g/mL}$ vs. 500 $\mu\text{g/mL}$	ns	0.5406
1000 $\mu\text{g/mL}$ vs. 250 $\mu\text{g/mL}$	ns	0.1500
1000 $\mu\text{g/mL}$ vs. 125 $\mu\text{g/mL}$	****	0.0040
1000 $\mu\text{g/mL}$ vs. 62.5 $\mu\text{g/mL}$	****	0.0007

1000 µg/mL vs. 31.25 µg/mL	****	< 0.0001
1000 µg/mL vs. control	****	< 0.0001
500 µg/mL vs. 250 µg/mL	ns	0.1640
500 µg/mL vs. 125 µg/mL	****	0.0003
500 µg/mL vs. 62.5 µg/mL	****	< 0.0001
500 µg/mL vs. 31.25 µg/mL	****	< 0.0001
500 µg/mL vs. control	****	< 0.0001
250 µg/mL vs. 125 µg/mL	***	0.0011
250 µg/mL vs. 62.5 µg/mL	****	0.0001
250 µg/mL vs. 31.25 µg/mL	****	< 0.0001
250 µg/mL vs. control	****	< 0.0001
125 µg/mL vs. 62.5 µg/mL	**	0.0048
125 µg/mL vs. 31.25 µg/mL	****	< 0.0001
125 µg/mL vs. control	****	< 0.0001
62.5 µg/mL vs. 31.25 µg/mL	***	0.0011
62.5 µg/mL vs. control	****	0.0003
31.25 µg/mL vs. control	****	0.0012
****, ***, **: (P ≤ 0.05), ns: non-significant		

اشارت العديد من الأبحاث العلمية إلى التأثيرات السمية الخلوية لعقار السيسبلاتين في مجموعة واسعة من خطوط الخلايا السرطانية، إذ بيّن (Rossini *et al.*, 2021) خلال دراسته على السمية الخلوية لعقار السيسبلاتين في الخط الخلوي لسرطان الخلايا الكبيرة الوترية (TGCT) ان السيسبلاتين له تأثيرات سمية خلوية على كلا خطي الخلايا السرطانية NT2/D1 و 833K بعد معاملتها بتركيز تراوحت من (0.01 – 10) µM، ولمدة (48) ساعة، حيث أظهرت النتائج انخفاضاً ملحوظاً في حيوية الخلايا Cell viability في كلا خطي الخلايا السرطانية، كما أوضحت النتائج ان التركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) في الخط الخلوي NT2/D1 كان (0.3) µM، في حين كان التركيز (1.02) µM في خط خلايا 833K، وهذا ما بينته نتائج الدراسة الحالية التي أظهرت زيادة في السمية الخلوية لعقار السيسبلاتين في خط خلايا A549 بعد معاملتها بتركيز مختلفة لمدة (48) ساعة، حيث كلما زاد التركيز كلما زاد السمية الخلوية وبالتالي تقل حيوية الخلايا ويزداد معدل التثبيط فيها، وذكر (Bar *et al.*, 2015) ان آلية

السيبلاطين السامة للخلايا السرطانية قد تكون عن طريق تثبيط بروتينات انقسام الخلية (CDK6 و CDK4)، الامر الذي يؤدي إلى حدوث عملية الموت المبرمج Apoptosis. وفي دراسة أجريت من قبل (GI et al., 2019) على التأثيرات السمية الخلوية للسيبلاطين في خط خلايا سرطان الرئة البشري وخط خلايا الرئة الطبيعي، أوضحت النتائج ان له تأثير سام للخلايا في خط خلايا A549 بعد معاملتها بتركيز مختلفة ولفترات تعرض (24 و 48 و 72) ساعة، بالإضافة إلى ذلك، بينت النتائج ايضاً ان التركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) قد اختلف باختلاف وقت التعرض للعلاج، حيث كان (36.94) μM بعد (48) ساعة من التعرض، في حين كانت النسبة (6.59) μM بعد (72) ساعة من التعرض، وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية، التي بينت ان نسبة (IC50) للسيبلاطين كانت (43.75) $\mu\text{g/ml}$ ، إذ كلما قل تركيز (IC50)، كلما زادت السمية الخلوية للعلاج، وبالتالي تقل حيوية الخلايا، ويشير الانخفاض في قيمة (IC50) إلى مقاومة الخلايا السرطانية للعلاج الكيميائي نتيجة الارتفاع في السمية الخلوية، والعكس صحيح كلما ارتفعت قيمة (IC50) كلما قلت مقاومة الخلايا للعلاج الكيميائي وبالتالي تقل السمية الخلوية، ومن الأسباب التي تؤدي إلى مقاومة خلايا سرطان الرئة للعلاج الكيميائي هي نقص الأوكسجين hypoxia، الذي يؤدي إلى انخفاض في عملية الموت المبرمج للخلايا (Lee et al., 2006)، مما يؤدي إلى تنشيط مسار (P13K/AKT)، ومسارات الإشارات خارج الخلية (ERK)، إذ يعد هذا المسار من المسارات المهمة جداً في دورة الخلية، وعادة ما يكون غير منتظم في معظم أنواع السرطان، حيث يؤثر على تكاثر الخلايا cell proliferation وانتشار الورم metastasis وطول عمر الخلية (Poulikakos & Solit, 2011)، وفي دراسة (Ahmed & Jamil, 2012) تم استخدام عدة عقاقير من ضمنها السيبلاطين لغرض القيام بتقييم السمية الخلوية له عن طريق اختبار MTT assay في خط خلايا سرطان عنق الرحم Human cervical cancer cell line (HeLa)، إذ أظهرت النتائج ان السيبلاطين كانت له تأثيرات سمية خلوية اعتماداً على التراكيز المستخدمة والتي تراوحت من (1 – 50) μM ، وكانت قيمة (IC50) للعلاج (13) μM ولمدة (24) ساعة من التعرض، وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية، كما أشار (Amar et al., 2021) ان استخدام علاج السيبلاطين ضد خط خلايا سرطان الخلايا الحرشفية (-SSC) (25) اظهر تأثيراً سميّاً خلويّاً، حيث لوحظ انخفاض نسبة حيوية الخلايا Cell viability كلما زادت نسبة التركيز حيث تراوحت التراكيز من (0.4 – 100) $\mu\text{g/mL}$ ، كما كانت قيمة (IC50) للعلاج هي (12.56) $\mu\text{g/mL}$ ولمدة (24) ساعة، وهذا ما أوضحته نتائج الدراسة الحالية، وأوضح (He et al., 2016) ان الغاية من تحديد التركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) هي لفهم الخصائص البيولوجية

والعلاجية للعقار مدار البحث، كما ذكر (Gajski *et al.*, 2016) ان للسيسبلاتين تأثير سام للخلايا عندما استخدمه ضد خلايا سرطان الورم الارومي الدبقي البشري (A1235) وبتراكيز مختلفة ايضاً.

3.4 الكشف عن تأثير الفعالية المضادة للورم للمركبات الفعالة المستخلصة من العكبر في

خط خلايا سرطان الرئة البشري A549

Detection of the effect of antitumor activity for the active compounds extracted from propolis in human lung cancer line A549

استخدمت المركبات الفعالة (CA و CAPE و CHR)؛ لاختبار فعاليتهم السمية الخلوية ضد خلايا سرطان الرئة البشري A549.

1.3.4 التأثيرات السمية الخلوية للمركب الفعال حامض الكافيك (CA) في خط خلايا

سرطان الرئة البشري A549

Cytotoxic effect of the active compound caffeic acid in human lung cancer cell line A549

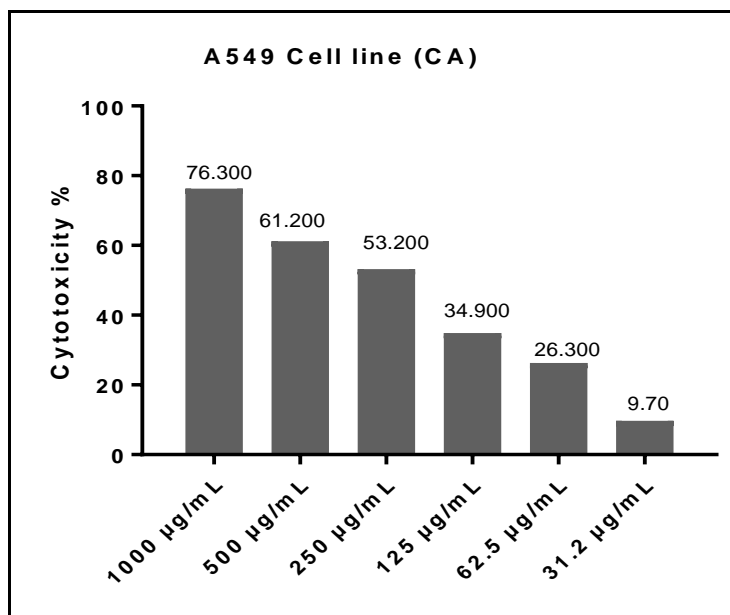
أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان المركب الفعال (CA) له تأثيرات سمية خلوية Cytotoxicity في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549، وذلك بعد استعمال ستة تراكيز (1000, 500, 250, 125,) $\mu\text{g/mL}$ (62.5, 31.25) ولمدة (48) ساعة من التعرض، حيث كانت أعلى نسبة لمعدل تثبيط الخلايا عند التركيز (1000) $\mu\text{g/mL}$ ، إذ بلغت حوالي (76.300%)، وكان معدل التثبيط هذا أعلى مما هو عليه عند استخدام نفس التركيز من عقار السيسبلاتين (CIS)، بينما كانت أقل نسبة لمعدل التثبيط عند التركيز (31.25) $\mu\text{g/mL}$ ، وبلغت (9.70%)، وبالمقارنة مع نفس التركيز لعقار السيسبلاتين لوحظ ان نسبة معدل التثبيط لحامض الكافيك أقل مما هو عليه عند معاملة الخلايا بالسيسبلاتين، كما هو موضح في الشكل (8-4).

كما بينت النتائج الحالية ان تركيز المركب الفعال (CA) المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) كان أكبر مما هو عليه في التركيز المثبط لنصف عدد الخلايا في السيسبلاتين، حيث تراوح بين (100.2 – 247.8)

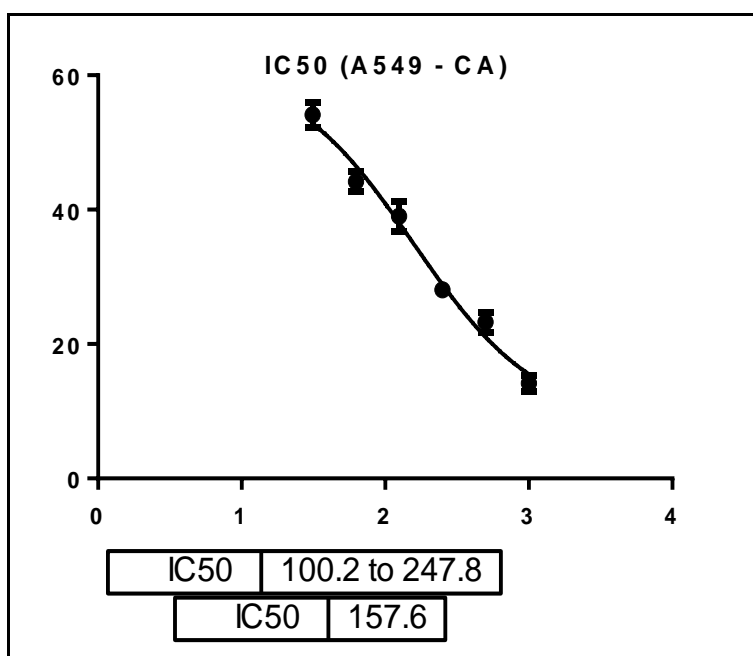
$\mu\text{g/mL}$ وكان بالتحديد (157.6) $\mu\text{g/mL}$ ، كما هو موضح في الشكل (4-9)، وان الصورة (4-3) توضح شكل الخلايا السرطانية تحت المجهر المقلوب بعد معاملتها بتركيز حامض الكافيك المثبط لنصف عدد الخلايا، مقارنةً مع خلايا السيطرة Control الموضحة في الصورة (4-2).

أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$) في التراكيز (1000 و 500 و 250 و 125 و 62.5) للمركب الفعال (CA) عند مقارنتها مع خلايا السيطرة، حيث كانت هنالك فروق معنوية ($P \leq 0.05$) في التركيز 1000 (0.203 ± 0.009866) والتركيز 500 (0.3337 ± 0.01247) والتركيز 250 (0.4023 ± 0.005207) والتركيز 125 (0.5593 ± 0.01866) والتركيز 62.5 (0.6333 ± 0.01271) مقارنةً مع خلايا السيطرة Control (0.8597 ± 0.05272)، في حين لم يكن هنالك فروق معنوية ($P > 0.05$) عند مقارنة التركيز 31.25 (0.7757 ± 0.0156) مع خلايا السيطرة كما هو موضح في الشكل (4-10).

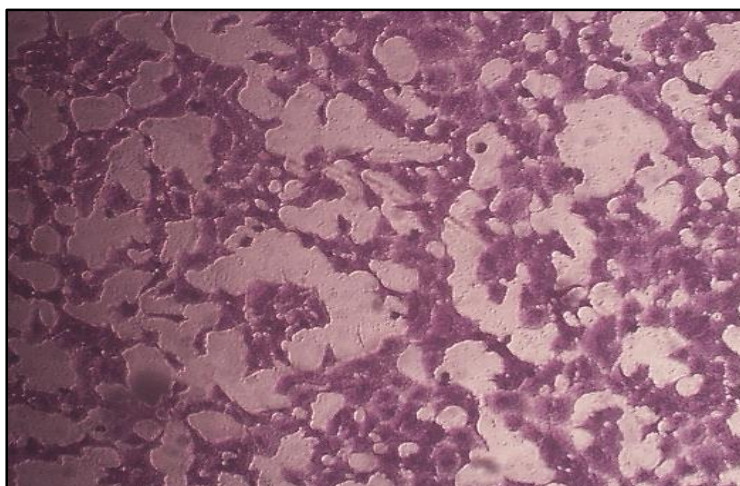
وعند تحليل النتائج احصائياً لاختبار المقارنات المتعددة بين تراكيز المركب الفعال (CA)، أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$) بين التركيز (1000) $\mu\text{g/mL}$ وكل من التراكيز (500 و 250 و 125 و 62.5 و 31.25) $\mu\text{g/mL}$ ، بالإضافة إلى ذلك، كانت هنالك فروق معنوية ايضاً عند مقارنة التركيز (1000) $\mu\text{g/mL}$ مع خلايا السيطرة، بينما لم يكن هنالك فروق معنوية ($P > 0.05$) بين التركيز (500) $\mu\text{g/mL}$ والتركيز (250) $\mu\text{g/mL}$ ، في حين أظهرت النتائج وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$) عند مقارنة التركيز (500) $\mu\text{g/mL}$ مع كل من التراكيز (125 و 62.5 و 31.25) $\mu\text{g/mL}$ ، بالإضافة إلى وجود فروق معنوية ايضاً عند مقارنته مع خلايا السيطرة، كما بينت نتائج الدراسة الحالية وجود فروق معنوية بين التركيز (250) $\mu\text{g/mL}$ وكل من التراكيز (125 و 62.5 و 31.25) $\mu\text{g/mL}$ ، بالإضافة إلى وجود فروق معنوية ايضاً عند مقارنته مع خلايا السيطرة، وعند مقارنة التركيز (125) $\mu\text{g/mL}$ مع التركيز (62.5) $\mu\text{g/mL}$ أظهرت النتائج الحالية عدم فروق معنوية ($P > 0.05$) بينهما، في حين كانت هنالك فروق معنوية ($P \leq 0.05$) عند مقارنته مع كل من التركيز (31.25) $\mu\text{g/mL}$ وخلايا السيطرة، كما بينت نتائج الدراسة الحالية وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$) بين التركيز (62.5) $\mu\text{g/mL}$ وكل من التركيز (31.25) $\mu\text{g/mL}$ وخلايا السيطرة أيضاً، الا انه لوحظ عدم وجود فروق معنوية ($P > 0.05$) عند مقارنة التركيز (31.25) $\mu\text{g/mL}$ مع خلايا السيطرة، كما هو موضح في الجدول (4-4).



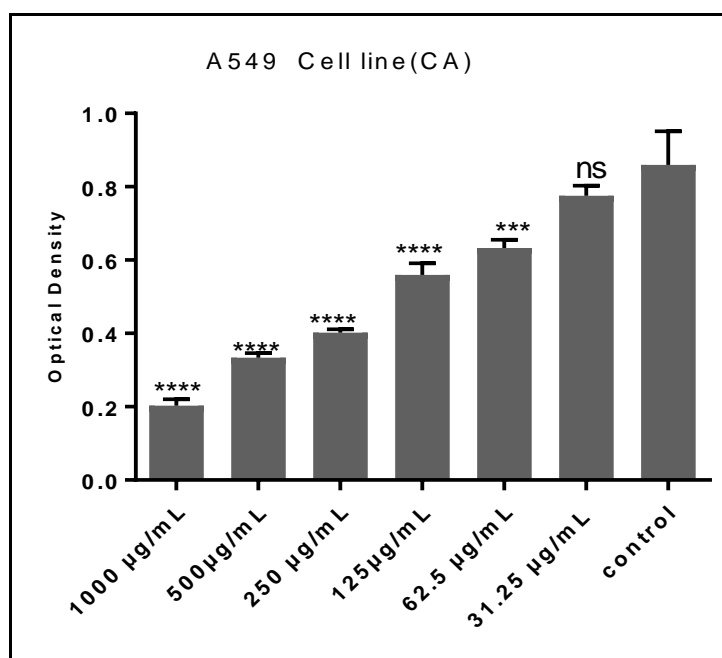
شكل (8-4) التأثيرات السمية الخلوية Cytotoxicity في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 بعد معاملتها بتركيزات مختلفة (3 مكررات لكل تركيز) من المركب الفعال (CA) باستعمال فحص MTT لمدة (48) ساعة.



شكل (9-4) تأثير التركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) للمركب الفعال (CA) على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549.



صورة (3-4) خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 تحت المجهر المقلوب بعد معاملتها بالتركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) للمركب الفعال CA (صبغة Crystal violet، قوة التكبير 100X).



شكل (4-10) تأثير المركب الفعال (CA) على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 مقارنة مع خلايا السيطرة باستعمال فحص MTT لمدة (48) ساعة، ****، ***، :ns (P ≤ 0.05) - non significant، SE: الخطأ القياسي.

جدول (4-4) مقارنة متعددة عن طريق اختبار **Tukey test** للمقارنات المتعددة بين تراكيز المركب الفعال (CA) بعضها مع بعض عند استخدامها كفعالية مضادة ضد الخط الخلوي لسرطان الرئة البشري A549، بالإضافة إلى مقارنتها مع خلايا السيطرة **Control**.

مقارنة متعددة بين تراكيز المركب الفعال CA	الفروق المعنوية Significances	قيمة الاحتمالية P.value
1000 µg/mL vs. 500 µg/mL	**	0.0012
1000 µg/mL vs. 250 µg/mL	***	< 0.0001
1000 µg/mL vs. 125 µg/mL	****	< 0.0001
1000 µg/mL vs. 62.5 µg/mL	****	< 0.0001
1000 µg/mL vs. 31.25 µg/mL	****	< 0.0001
1000 µg/mL vs. control	****	0.0003
500 µg/mL vs. 250 µg/mL	ns	0.1556
500 µg/mL vs. 125 µg/mL	***	0.0005
500 µg/mL vs. 62.5 µg/mL	****	< 0.0001
500 µg/mL vs. 31.25 µg/mL	****	< 0.0001
500 µg/mL vs. control	****	0.0006
250 µg/mL vs. 125 µg/mL	**	0.0013
250 µg/mL vs. 62.5 µg/mL	***	< 0.0001
250 µg/mL vs. 31.25 µg/mL	****	< 0.0001
250 µg/mL vs. control	****	0.0010
125 µg/mL vs. 62.5 µg/mL	ns	0.2006
125 µg/mL vs. 31.25 µg/mL	***	0.0009
125 µg/mL vs. control	****	0.0058
62.5 µg/mL vs. 31.25 µg/mL	**	0.0021
62.5 µg/mL vs. control	***	0.0014
31.25 µg/mL vs. control	ns	0.2013
****, ***, **: (P ≤ 0.05), ns: non-significant		

2.3.4 التأثيرات السمية الخلوية للمركب الفعال حامض الكافيينك فينول استر (CAPE) في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549

Cytotoxic effect of Caffeic acid phenethyl ester active compound in human lung cancer cell line A549

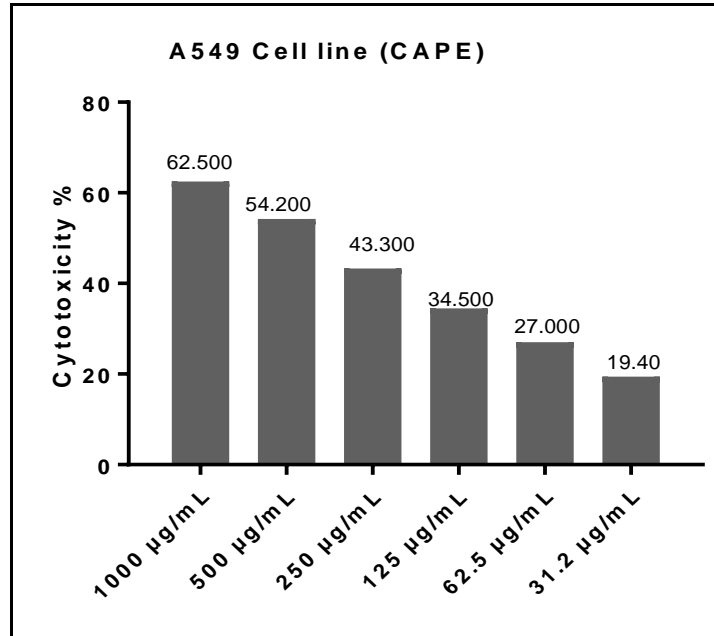
أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان المركب الفعال (CAPE) له تأثيرات سمية خلوية Cytotoxicity في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549، وذلك بعد استخدام ستة تراكيز هي (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25) $\mu\text{g/mL}$ ولمدة (48) ساعة من التعرض، حيث كانت أعلى نسبة معدل لتثبيط الخلايا عند التركيز (1000) $\mu\text{g/mL}$ ، إذ بلغت حوالي (62.500%) وعند المقارنة مع نفس التركيز المستخدم لعقار السييسبلاتين لوحظ ان معدل التثبيط أقل مما هو عليه في السييسبلاتين، في حين كانت أقل نسبة معدل تثبيط للخلايا عند التركيز (31.25) $\mu\text{g/mL}$ ، حيث بلغت (19.40%)، إذ كانت هذه النسبة أعلى مما هو عليه عند استخدام نفس التركيز من عقار السييسبلاتين، كما هو موضح في الشكل (4-11).

كما بينت نتائج الدراسة الحالية ان تركيز المركب الفعال (CAPE) المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) كان أعلى بكثير مما هو عليه في عقار السييسبلاتين، حيث تراوح بين (154.8 – 401.5) $\mu\text{g/mL}$ ، وكان بالتحديد (249.3) $\mu\text{g/mL}$ ، كما هو موضح في الشكل (4-12)، وان الصورة (4-4) توضح شكل الخلايا السرطانية تحت المجهر المقلوب بعد معاملتها بالتركيز المثبط لنصف عدد الخلايا للمركب الفعال (CAPE) مقارنةً مع خلايا السيطرة الموضحة في الصورة (4-2).

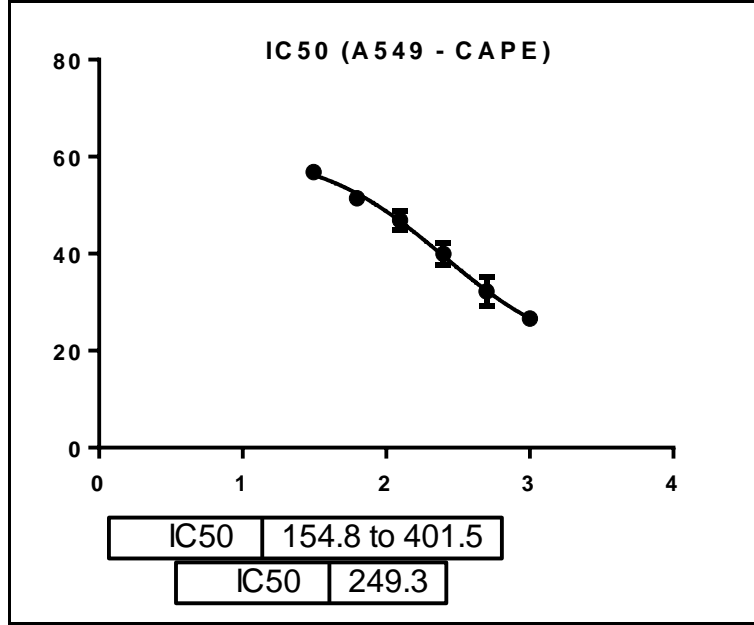
أوضحت نتائج الدراسة الحالية وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$) عند مقارنة التراكيز الستة للمركب الفعال (CAPE) مع خلايا السيطرة، حيث كانت هنالك فروق معنوية ($P \leq 0.05$) عند مقارنة التراكيز 1000 (0.382 ± 0.01097) والتركيز 500 (0.4623 ± 0.02583) والتركيز 250 (0.5723 ± 0.01965) والتركيز 125 (0.6717 ± 0.0165) والتركيز 62.5 (0.737 ± 0.005686) والتركيز 31.25 (0.8147 ± 0.0117) مع خلايا السيطرة (1.014 ± 0.014)، كما هو موضح في الشكل (4-13).

وعند تحليل النتائج احصائياً لاختبار المقارنات المتعددة بين التراكيز الستة، لوحظ وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$) عند مقارنة التركيز (1000) $\mu\text{g/mL}$ مع كل من التراكيز (500 و 250 و 125 و 62.5)

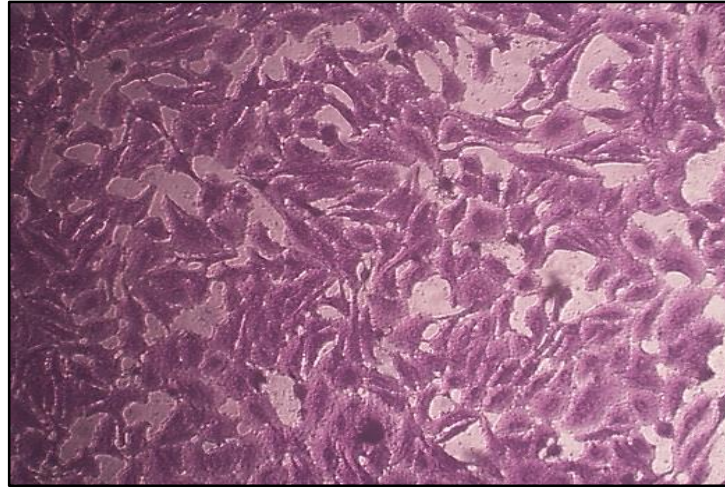
و31.25) $\mu\text{g/mL}$ ، بالإضافة إلى وجود فروق معنوية ايضاً عند مقارنته مع خلايا السيطرة، كما بينت الدراسة وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$) عند مقارنة التركيز (500) $\mu\text{g/mL}$ مع كل من التراكيز (250 و125 و62.5 و31.25) $\mu\text{g/mL}$ ، بالإضافة إلى وجود فروق معنوية ايضاً عند مقارنته مع خلايا السيطرة، وعند مقارنة التركيز (250) $\mu\text{g/mL}$ مع كل من التراكيز (125 و62.5 و31.25) $\mu\text{g/mL}$ ، كانت هنالك فروق معنوية ($P \leq 0.05$)، بالإضافة إلى وجود فروق معنوية عند مقارنته مع خلايا السيطرة، كما أظهرت النتائج الحالية عدم وجود فروق معنوية ($P > 0.05$) عند مقارنة التركيز (125) $\mu\text{g/mL}$ مع التركيز (62.5) $\mu\text{g/mL}$ ، بينما كانت هنالك فروق معنوية عند مقارنته مع كل من التركيز (31.25) $\mu\text{g/mL}$ وخلايا السيطرة Control، كما أظهرت النتائج عدم وجود فروق معنوية ($P > 0.05$) بين التركيز (62.5) $\mu\text{g/mL}$ والتركيز (31.25) $\mu\text{g/mL}$ ، في حين كانت هنالك فروق معنوية عند مقارنته مع خلايا السيطرة، وبينت النتائج ايضاً وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$) عند مقارنة التركيز (31.25) $\mu\text{g/mL}$ مع خلايا السيطرة، كما هو موضح في الجدول (4-5).



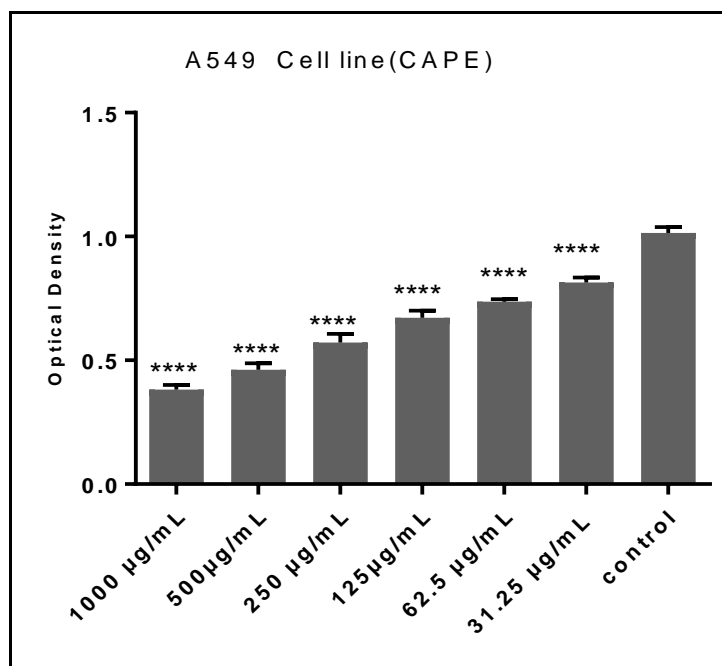
شكل (4-11) التأثيرات السمية الخلوية Cytotoxicity في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 بعد معاملتها بتركيزات مختلفة (3 مكررات لكل تركيز) من المركب الفعال (CAPE) باستعمال فحص MTT لمدة (48) ساعة.



شكل (4-12) تأثير التركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) للمركب الفعال (CAPE) على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549.



صورة (4-4) خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 تحت المجهر المقلوب بعد معاملتها بالتركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) للمركب الفعال (CAPE) (صبغة Crystal violet، قوة التكبير 100X).



شكل (4-13) تأثير المركب الفعال (CAPE) على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 مقارنة مع خلايا السيطرة باستعمال فحص MTT لمدة (48) ساعة، ****: ($P \leq 0.05$)، SE: الخطأ القياسي.

جدول (4-5) مقارنة متعددة عن طريق اختبار **Tukey test** للمقارنات المتعددة بين تراكيز المركب الفعال (CAPE) بعضها مع بعض عند استخدامها كفعالية مضادة ضد الخط الخلوي لسرطان الرئة البشري A549، بالإضافة إلى مقارنتها مع خلايا السيطرة **Control**.

مقارنة متعددة بين تراكيز المركب الفعال CAPE	الفروق المعنوية Significances	قيمة الاحتمالية P.value
1000 µg/mL vs. 500 µg/mL	*	0.0458
1000 µg/mL vs. 250 µg/mL	***	0.0011
1000 µg/mL vs. 125 µg/mL	****	0.0001
1000 µg/mL vs. 62.5 µg/mL	****	< 0.0001
1000 µg/mL vs. 31.25 µg/mL	****	< 0.0001
1000 µg/mL vs. control	****	< 0.0001
500 µg/mL vs. 250 µg/mL	**	0.0275
500 µg/mL vs. 125 µg/mL	***	0.0024
500 µg/mL vs. 62.5 µg/mL	****	0.0005
500 µg/mL vs. 31.25 µg/mL	****	0.0002

500 µg/mL vs. control	****	< 0.0001
250 µg/mL vs. 125 µg/mL	**	0.0180
250 µg/mL vs. 62.5 µg/mL	***	0.0013
250 µg/mL vs. 31.25 µg/mL	****	0.0004
250 µg/mL vs. control	****	< 0.0001
125 µg/mL vs. 62.5 µg/mL	ns	0.1204
125 µg/mL vs. 31.25 µg/mL	***	0.0021
125 µg/mL vs. control	****	< 0.0001
62.5 µg/mL vs. 31.25 µg/mL	ns	0.0733
62.5 µg/mL vs. control	****	< 0.0001
31.25 µg/mL vs. control	****	0.0004
****, ***, **, *: (P ≤ 0.05), ns: non-significant		

3.3.4 التأثيرات السمية الخلوية للمركب الفعال كريسين (CHR) في خط خلايا سرطان

الرئة البشري A549

Cytotoxic effect of Chrysin active compound in human lung cancer cell line A549

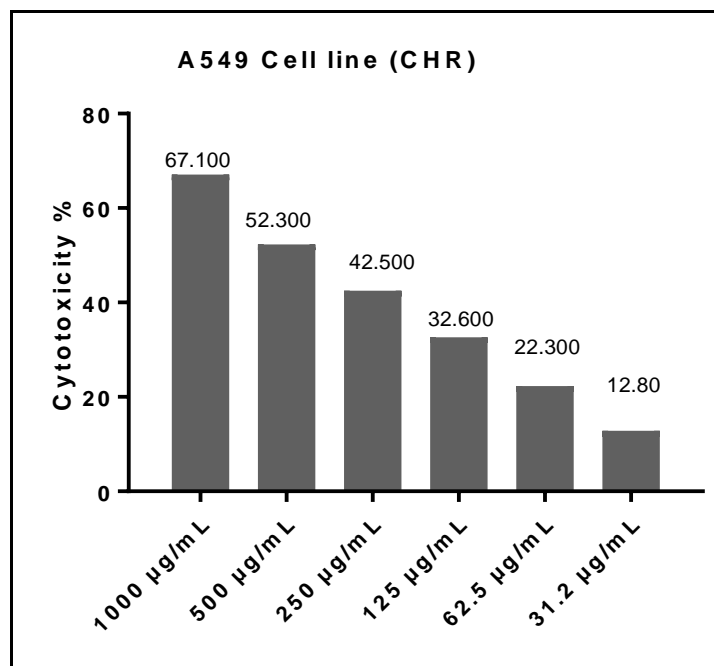
أوضحت نتائج الدراسة الحالية وجود تأثيرات سمية خلوية Cytotoxicity للمركب الفعال (CHR) في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549، بعد استعمال ستة تراكيز وهي (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 µg/mL) ولمدة (48) ساعة، حيث كانت أعلى نسبة معدل لتثبيط الخلايا عند التركيز (1000) µg/mL، إذ بلغت حوالي (67.100%)، وعند المقارنة مع نفس التركيز لعقار السيسبلاتين كانت نسبة معدل التثبيط أقل منه بقليل، في حين كانت أقل نسبة معدل لتثبيط الخلايا عند التركيز (31.25) µg/mL، حيث كانت حوالي (12.80%)، وبالمقارنة مع لعقار السيسبلاتين كانت نسبة معدل التثبيط أقل منه بقليل أيضاً، كما هو موضح في الشكل (4-14).

أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان التركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) للمركب الفعال (CHR) كان أعلى بكثير مما هو عليه في عقار السيسبلاتين، إذ تراوح بين (158.2 – 423.6) µg/mL، وكان بالتحديد (258.9) µg/mL، كما هو موضح في الشكل (4-15)، وان الصورة (4-5) توضح شكل خلايا

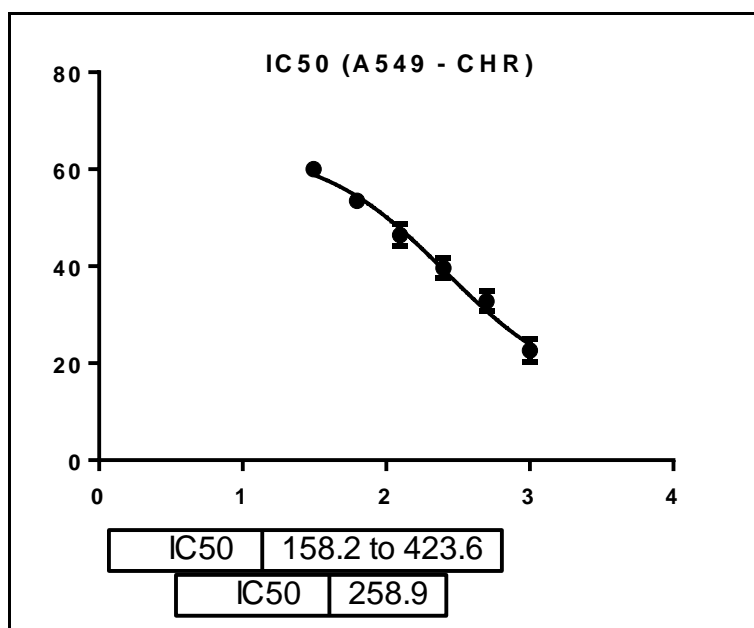
سرطان الرئة البشري A549 تحت المجهر المقلوب بعد معاملتها بالتركيز المثبط لنصف عدد الخلايا للمركب الفعال (CHR)، حيث لوحظ اختلافها عن خلايا السيطرة الموضحة في الصورة (2-4).

كما بينت نتائج الدراسة الحالية وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$) عند مقارنة كل من تراكيز المركب الفعال (CHR) (1000 و 500 و 250 و 125 و 61.5) $\mu\text{g/mL}$ مع خلايا السيطرة، إذ كانت هنالك فروق معنوية ($P \leq 0.05$) في كل من التراكيز 1000 (0.3247 ± 0.02051) والتركيز 500 (0.6657 ± 0.01744) والتركيز 250 (0.5677 ± 0.01777) والتركيز 125 (0.9877 ± 0.01876) والتركيز 62.5 (0.7667 ± 0.01146) مقارنةً مع خلايا السيطرة (0.05702 ± 0.01105)، بينما بينت النتائج عدم وجود فروق معنوية ($P > 0.05$) عند مقارنة التركيز 31.25 (0.8607 ± 0.01105) مع خلايا السيطرة، كما هو موضح في الشكل (4-16).

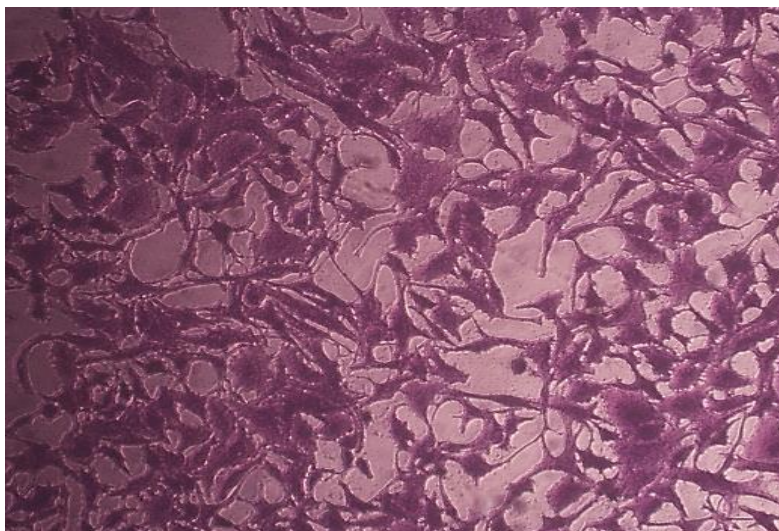
وعند تحليل النتائج احصائياً لاختبار المقارنات المتعددة بين التراكيز الستة، لوحظ وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$) عند مقارنة التركيز (1000) $\mu\text{g/mL}$ مع كل من التراكيز (500 و 250 و 125 و 62.5) $\mu\text{g/mL}$ بالإضافة إلى وجود فروق معنوية أيضاً عند مقارنته مع خلايا السيطرة، كما بينت الدراسة الحالية وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$) أيضاً عند مقارنة التركيز (500) $\mu\text{g/mL}$ مع التراكيز (250 و 125 و 62.5 و 31.25) $\mu\text{g/mL}$ ، بالإضافة إلى وجود فروق معنوية أيضاً عند مقارنته مع خلايا السيطرة، وعند مقارنة التركيز (250) $\mu\text{g/mL}$ مع كل من التراكيز (125 و 62.5 و 31.25) $\mu\text{g/mL}$ بالإضافة إلى خلايا السيطرة، لوحظ أيضاً وجود فروق معنوية في النتائج ($P \leq 0.05$)، كما أظهرت النتائج الحالية وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$) بين التركيز (125) $\mu\text{g/mL}$ والتراكيز (62.5 و 31.25) $\mu\text{g/mL}$ وكذلك مع خلايا السيطرة، كذلك لوحظ وجود فروق معنوية بين التركيز (62.5) $\mu\text{g/mL}$ والتركيز (31.25) $\mu\text{g/mL}$ وكذلك مع خلايا السيطرة أيضاً، بينما أظهرت النتائج عدم وجود فروق معنوية ($P > 0.05$) عند مقارنة التركيز (31.25) $\mu\text{g/mL}$ مع خلايا السيطرة، كما هو موضح في الجدول (4-6).



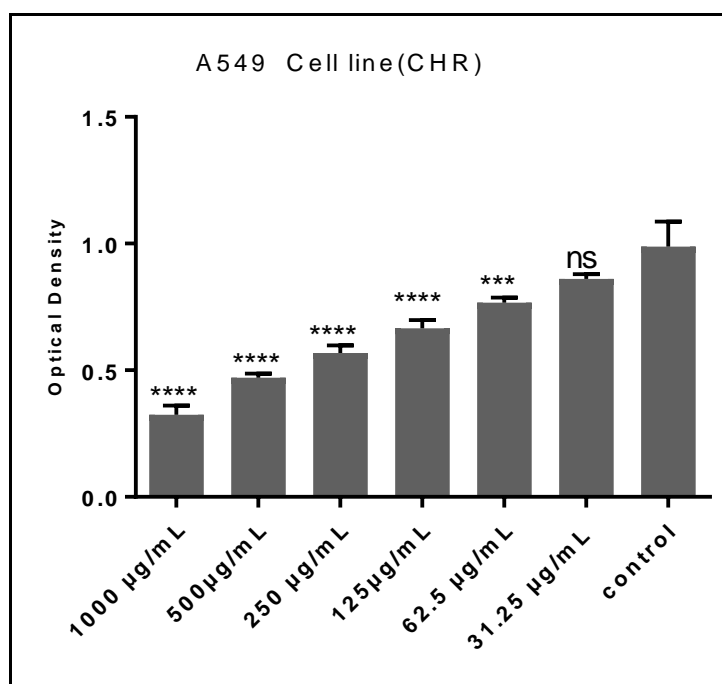
شكل (4-14) التأثيرات السمية الخلوية Cytotoxicity في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 بعد معاملتها بتركيزات مختلفة (3 مكررات لكل تركيز) من المركب الفعال (CHR) باستعمال فحص MTT لمدة (48) ساعة.



شكل (4-15) تأثير التركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) للمركب الفعال (CHR) على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549.



صورة (5-4) خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 تحت المجهر المقلوب بعد معاملتها بالتركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) للمركب الفعال CHR (صبغة Crystal violet، قوة التكبير 100X).



شكل (4-16) تأثير المركب الفعال (CHR) على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 مقارنة مع خلايا السيطرة باستعمال فحص MTT لمدة (48) ساعة، **، ****، (P ≤ 0.05) : ns، non - significant، SE: الخطأ القياسي.

جدول (4-6) مقارنة متعددة عن طريق اختبار **Tukey test** للمقارنات المتعددة بين تراكيز المركب الفعال (CHR) بعضها مع بعض عند استخدامها كفعالية مضادة ضد الخط الخلوي لسرطان الرئة البشري A549، بالإضافة إلى مقارنتها مع خلايا السيطرة **Control**.

مقارنة متعددة بين تراكيز المركب الفعال CHR	الفروق المعنوية Significances	قيمة الاحتمالية P.value
1000 µg/mL vs. 500 µg/mL	*	0.0057
1000 µg/mL vs. 250 µg/mL	***	0.0009
1000 µg/mL vs. 125 µg/mL	****	0.0003
1000 µg/mL vs. 62.5 µg/mL	****	< 0.0001
1000 µg/mL vs. 31.25 µg/mL	****	< 0.0001
1000 µg/mL vs. control	****	0.0004
500 µg/mL vs. 250 µg/mL	*	0.0171
500 µg/mL vs. 125 µg/mL	**	0.0016
500 µg/mL vs. 62.5 µg/mL	****	0.0001
500 µg/mL vs. 31.25 µg/mL	****	< 0.0001
500µg/mL vs. control	***	0.0010
250 µg/mL vs. 125 µg/mL	*	0.0191
250 µg/mL vs. 62.5 µg/mL	***	0.0007
250 µg/mL vs. 31.25 µg/mL	****	0.0001
250 µg/mL vs. control	**	0.0022
125µg/mL vs. 62.5 µg/mL	*	0.0101
125 µg/mL vs. 31.25 µg/mL	***	0.0009
125 µg/mL vs. control	****	0.0058
62.5 µg/mL vs. 31.25 µg/mL	**	0.0041
62.5 µg/mL vs. control	*	0.0191
31.25 µg/mL vs. control	ns	0.0941
****, ***, **, *: (P ≤ 0.05), ns: non-significant		

اشارت العديد من الدراسات العلمية إلى تأثير العكبر ومركباته الكيميائية الفعالة في أنواع مختلفة من الخلايا السرطانية سواء كانت في المختبر *In vitro* أو في الجسم الحي *In vivo*، حيث ذكر

(KULAKSIZ *et al.*, 2022) في دراسته حول السمية الخلوية للعكبر التركي، ان المستخلص الايثانولي للعكبر وبتراكيز تراوحت من (10 – 2400 µg/mL) كان له تأثيرات سمية خلوية في خط خلايا سرطان الحنجرة البشري (HEP-2)، إذ كانت السمية عالية في التركيز (1400 µg/mL)، ومتوسطة في التركيز (200 و 800 µg/mL)، وقليلة جدا عند التركيز (50 µg/mL)، في حين كان التركيز المثبط لنصف عدد الخلايا لمستخلص العكبر الايثانولي (IC50) هو (38.2 µg/mL)، وفي دراسة (Hamd, 2022)، على تقييم التأثير السمي للمستخلص الكحولي للعكبر العراقي في مجموعة من الخطوط الخلوية السرطانية باستخدام فحص MTT، بينت النتائج ان استخدام المستخلص الكحولي بتركيز مختلفة (31,25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/mL) ولمدة (24) ساعة من التعرض كان له تأثيرات سمية خلوية في خطي خلايا سرطان الغدد اللمفاوية (سرطان الخلايا البائية أو ما يعرف بـ لمفوما بيركت Burkitt lymphoma (Raji cell line)، وخط خلايا سرطان البروستات (LNCaP)، حيث انخفضت حيوية الخلايا Cell viability في خط خلايا (LNCaP) بعد استخدام جميع تراكيز المستخلص الكحولي، في حين لوحظ انخفاض حيوية الخلوية في خط خلايا (Raji cell line) عند التركيز (1000 µg/mL) فقط، كما أوضحت النتائج ان قيم التركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) لمستخلص العكبر الكحولي كان (717.36 و 1845 µg/mL) في خطي خلايا (LNCaP) و (Raji cell line) على التوالي، وفي دراسة (السعدي ، 2022) على العكبر العراقي وتأثيراته السمية الخلوية على خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480)، أظهرت الدراسة ان المستخلص الكحولي للعكبر كان له تثير مثبط لنمو خلايا (SW480) بعد استخدام ستة تراكيز منه (31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/mL) لمدة (24) ساعة، كما بين (Arung *et al.*, 2021) ان مستخلص العكبر الايثانولي لسبعة أنواع من النحل اظهر تأثيرات سمية خلوية على خط خلايا سرطان الثدي (MCF-7) وخط خلايا (HeLa) و (Caco2)، وأشار (Reis *et al.*, 2019) في دراسته على تأثير المستخلصات الكحولية للعكبر على خط خلايا سرطان القولون البشري (HCT-116)، إلى ان جميع المستخلصات سواء كانت المحضرة بالطريقة التقليدية أو بطريقة الموجات فوق الصوتية كان لها تأثير مثبط للنمو على هذه الخلايا بنسبة (90 %)، ونسبة (80 %) على خط خلايا سرطان الدم البشري (HL-60) وخط خلايا سرطان البروستات (PC-3)، وفي دراسة أجريت من قبل (Soltaninejad *et al.*, 2020) على العكبر الإيراني أوضح فيها ان المستخلص الايثانولي للعكبر كان له القدرة على تثبيط النمو في ثلاثة أنواع من الخطوط الخلوية لسرطان الثدي (MCF-7, SKBR, MDA-MB-231)، الامر الذي أدى إلى توقف دورة الخلية في مرحلة معينة وحدوث عملية الموت المبرمج، وان السبب في قابلية العكبر على تثبيط العديد

من أنواع الخلايا السرطانية قد يعود إلى محتوياته الفينولية الفلافونويدية التي لها تأثيرات سمية خلوية ضد أنواع متعددة من السرطان، وهذا ما أظهرته نتائج الدراسة الحالية التي بينت ان المركبات الفعالة المعزولة من العكبر العراقي (CHR, CAPE, CA) أظهرت تأثيرات سامة للخلايا على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 بتركيز مختلفة ولمدة (48) ساعة من التعريض، حيث كلما زاد تركيز المركب كلما زادت سميته الخلوية وقلت حيوية الخلايا Cell viability.

وذكر (Lee et al., 2005) ان المركب الفعال CAPE، وهو أحد المكونات الأساسية الكيميائية في مادة العكبر قد يعطل دورة الخلية Cell cycle في مرحلة (G2/M) في سرطان الخلايا الحرشفية للفم وذلك بفعل خاصيته السامة للخلايا، وفي دراسة (Orsolio et al., 2005) بين ان مكونات العكبر مثل (CAPE و CA) تعد من المركبات المفيدة للسيطرة على الانقسام الخلوي Cell proliferation للورم السرطاني، كما أظهرت دراسة (Diaz-Carballo et al., 2008) فعالية العكبر الكوبي المضادة للورم في خطوط خلوية سرطانية متعددة وبتراكيز مختلفة تراوحت من (5 – 23 µg/mL)، حيث لوحظت سميته بتركيز (10 µg/mL) على خط خلايا (PC-3)، في حين كان سميته على خط خلايا سرطان البروستات (LNaP) بتركيز (12.3 µg/mL)، وهذا ما أظهرته نتائج الدراسة الحالية، وفي دراسة (Nor et al., 2021) تم استخدام العكبر البرازيلي الأحمر والبنّي والاخضر ضد الخطوط الخلوية لسرطان الخلايا الحرشفية للرأس والعنق HNSCC بنوعيه (UM-SCC-17B) و(UM-SCC-74A)، بالإضافة إلى خط الخلايا الكيراتينية الطبيعية (HK)، حيث أظهرت النتائج ان تركيز (50 µg/mL) من مستخلص العكبر باستخدام (DMSO) كان له تأثيرات سمية خلوية، إذ قلل من حيوية الخلايا Cell viability في خطي خلايا (UM-SCC-17B) و(UM-SCC-74A)، في حين لم يكن المستخلص ساماً في خط خلايا الكيراتين الطبيعية (HK)، وأوضح (Hehlgans et al., 2011) ان الآلية التي من خلالها يعمل العكبر كمادة سامة للخلايا يمكن ان تكون من خلال تدخله في الحث على عملية الموت المبرمج Apoptosis عن طريق الانقسام في بروتين Caspase 3، أو يمكن ان يعمل كمعدّل مهم في البروتينات المشاركة في تطور السرطان مثل (Cyclin D, FAK, ERK1/2, AKT). وفي دراسة (Rzepecka-Stojko et al., 2015) الذي استخدم المستخلص الايثانولي للعكبر البولندي والمركب الفعال CAPE المستخلص منه ضد خطي خلايا سرطان الثدي (Hs758T) و(MDA-MB-231) بتركيز مختلفة تراوحت من (200 – 50 µg/mL) لمستخلص العكبر الايثانولي، بينما تراوحت من (80 – 2.5 µg/mL) للمركب CAPE، ولفترات زمنية مختلفة (24 و 48 و 72) ساعة من التعرض، حيث أظهرت

النتائج ان كلا المستخلص الايثانولي والمركب الفعال CAPE كان لهما تأثيرات سمية خلوية على كلا خطي خلايا سرطان الثدي، إذ انخفضت حيوية الخلايا Cell viability في كلا خطي الخلايا المعالجة بعد (48) و(72) ساعة من التعريض، مقارنةً بخلايا السيطرة الطبيعية (IMR-90) التي كانت فيها التأثيرات السامة غير معنوية احصائياً، كما بينت الدراسة ان قيم التركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) كانت أقل في المركب الفعال CAPE مقارنةً بالمستخلص الايثانولي للعكبر في كلا خطي الخلايا السرطانية واختلفت باختلاف وقت التعرض، حيث كانت (3.32, 3.92, 5.99 µg/mL) في خط خلايا (MDA-MB-231) المعالجة بالمركب CAPE لفترات التعرض (24 و 48 و 72) على التوالي، بينما كانت (1.37, 1.88, 4.66 µg/mL) في خط خلايا Hs758T المعالجة بالمركب نفسه وفترات التعرض نفسها، بينما كانت قيم (IC50) (40.40, 63.38, 232.31 µg/mL) في خط خلايا (MDA-MB-231) المعالجة بالمستخلص الايثانولي للعكبر لفترات محددة (24 و 48 و 72) ساعة على التوالي، في حين كانت القيم في خط خلايا (Hs758T) بعد معاملتها بنفس المستخلص الايثانولي ونفس فترات التعرض هي (31.03, 38.64, 2538.51 µg/mL)، حيث لوحظ انه كلما زاد وقت التعرض سواء كان للمستخلص الكحولي أو للمركب الفعال بمفرده كلما قل تركيز (IC50)، وبالتالي تقل حيوية الخلايا، وهذا ما بينته نتائج الدراسة الحالية ولكن الاختلاف كان في استخدام احجام كبيرة من التراكيز تراوحت من (31.25 – 1000 µg/mL) مقارنةً بدراسة (Rzepecka-Stojko et al., 2015).

ذكر (Omene et al., 2013) ان من الأسباب التي تجعل CAPE من المركبات الفعالة ضد العديد من الأمراض السرطانية تعزى إلى تدخله في عمل الهستونات، إذ ان CAPE يثبط مثبطات إزالة استئنة الهستونات Deacetylation of histones، وهذه الخاصية ربما تكون مسؤولة عن إزالة الورم وتقوي دور CAPE كعلاج محتمل ضد السرطان، وقد تبين ايضاً CAPE يثبط التعبير عن الجين (MDR-1) المسؤول عن مقاومة العلاج الكيميائي في الخلايا السرطانية، الامر الذي يسمح باستعادة هذه الخلايا حساسيتها للعلاج الكيميائي، كما يمكن ان يؤثر CAPE على عامل النسخ NF-κB، وهو عامل مهم جداً في دورة حياة الخلية، إذ يعمل CAPE على تثبيط تنشيط NF-κB، مما يؤدي إلى تنشيط عملية الموت المبرمج في الخلايا السرطانية التي عبرت بشكل مفرط عن NF-κB (Watabe et al., 2004)، ولذلك فإن نتائج التجربة التي أجراها (Lee et al., 2003) على خط خلايا (C6 glioma cells) كانت ذات أهمية كبيرة منذ ذلك الحين، حيث حدد فيها تأثير CAPE السام للخلايا من خلال عمله على تنشيط بروتينات عملية الموت المبرمج مثل (p53 و p38) وهذا دليل على ان العكبر له نشاط سام للخلايا،

وبالتالي فإن اليات CAPE السامة للخلايا قد تكون بعدة طرق وربما تكون واحدة من هذه الاليات هي التي أدت إلى السمية الخلوية الحاصلة في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالمركب الفعال CAPE المستخلص من العكبر في الدراسة الحالية، مما يجعله مركباً واعداً في المستقبل لعلاج العديد من الأمراض السرطانية.

وفي دراسة (da Silva *et al.*, 2017) على العكبر البرازيلي ضد خط خلايا سرطان الحنجرة، اظهر ان المستخلص الايثانولي للعكبر كان له تأثير مثبط للنمو على خط خلايا (HEP-2)، حيث بينت النتائج ان التركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) للمستخلص الايثانولي كان (218.5 µg/mL) بعد (24) ساعة من التعرض، فيما كانت القيم (80.1, 160.3 µg/mL) بعد (48 و 72) ساعة على التوالي، كما أوضح ان المركبات الفعالة المعزولة المتمثلة بـ (Dihydrocinnamic acid و Caffeic acid و P-coumaric acid) من العكبر كان لها تأثير مضاد للتكاثر الخلوي Antiproliferative على خط خلايا (HEP-2)، ولكن كان المركب CA هو الأكثر تأثيراً من المركبين الاخرين، حيث كانت قيمة (IC50) له هي (1.332 UM) بعد (72) ساعة من التعرض، وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية التي أظهرت ان المركب الفعال CA المستخلص من العكبر العراقي اظهر تأثيراً مثبطاً للنمو في خط خلايا A549 أكثر من المركبين الفعالين (CAPE و CHR)، حيث كانت قيمة (IC50) له هي (157.6 µg/mL) بعد (24) ساعة من التعرض، كما أشار (Brihoum *et al.*, 2018) في دراسته على العكبر الجزائري، ان المستخلص الايثانولي للعكبر اظهر تأثيراً مضاداً للورم ضد خط خلايا سرطان الرئة البشري A549، حيث قلت حيوية الخلايا بعد معاملتها بتركيز مختلفة تراوحت من (1-100 µg/mL)، كما بين ان التركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) كان (14.32 , 69.94 µg/mL) بعد (24 و 72) ساعة من التعرض، وذكر (Frion-Herrera *et al.*, 2015) ان المستخلص الايثانولي للعكبر البرازيلي ومكوناته الكيميائية اظهر انتقائية تجاه الخلايا السرطانية مقارنةً بالخلايا الطبيعية عندما استخدمه ضد خلايا سرطان الرئة البشري A549 وبتركيز مختلفة (6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL) لمدة (72) ساعة من التعرض، حيث لوحظ ان هنالك انخفاض معنوي في نسبة حيوية الخلايا كلما زاد التركيز، وبالتالي تزداد السمية الخلوية في الخلايا، الامر الذي يؤدي إلى مرور الخلايا بعملية الموت المبرمج عن طريق تعطيل غشاء الماييتوكونديريا من خلال تكوين ثقب فيه، وفي دراسة (Kabata-Dzik *et al.*, 2017) عند مقارنته بين المركبين (CA) و (CAPE) المستخلصين من العكبر واختبار سمية كل منهما على خط خلايا سرطان الثدي (MDA-MB-231)، حيث بين ان كلاهما اظهرا تأثيراً ساماً للخلايا بتركيز تراوحت من (10 – 100 µl)، وهذا ما بينته نتائج الدراسة الحالية، في حين لم تتفق نتائج الدراسة الحالية

مع الباحث من ناحية المركب الأكثر سمية خلوية، إذ بين ان (CAPE) أكثر سمية من (CA)، وهذا يختلف مع نتائج الدراسة الحالية التي أظهرت ان (CA) هو الأكثر سمية مقارنةً بـ (CAPE) في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 بعد (48) ساعة من التعرض، وان السبب في هذا الاختلاف ربما يعود إلى الاختلاف في مناطق جمع العكبر، بالإضافة إلى الاختلاف في مصدر النبات الذي جمعت منه المركبات الكيميائية عن طريق النحل، مما يشير إلى اختلاف المركبات الفعالة وكميتها في العكبر من عينة إلى أخرى.

كما أوضح (Demir et al., 2016) ان المستخلص الايثانولي للعكبر التركي اظهر تأثيرات سمية خلوية ضد خط خلايا سرطان الرئة البشري A549، بعد استخدام تراكيز مختلفة منه تراوحت من (0 -250 µg/mL) لمدة (72) ساعة، حيث بين باستخدام فحص MTT ان العكبر اظهر انتقائية سمية ضد خلايا A549 مقارنةً بالخلايا الطبيعية Normal foreskin fibroblast cells، إذ كانت قيمة (IC50) حوالي (31.7 µg/mL)، كما أوضح ان الآلية التي يعمل بها العكبر كمادة سامة للخلايا هي عن طريق الحث على عملية الموت المبرمج في الخلايا السرطانية، إذ تحقق من ذلك من خلال اجراء اختبار Annexin V لتحليل الموت المبرمج، حيث لوحظ ان المستخلص الايثانولي زاد من عدد الخلايا التي خضعت لتحليل الموت المبرمج، مما أدى إلى انخفاض في حيويتها، وذكر (Sawicka et al., 2012) ان مكونات العكبر مثل الكريسيتين والكيرسيتين وCA يمكن ان توقف دورة الخلية السرطانية في مراحل مختلفة اعتمادا على نوع السرطان وذلك عن طريق زيادة مثبطات البروتينات التي تساهم في تقدم دورة الخلية مثل بروتين p21 و p27، أو عن طريق تثبيط CDKs، وفي دراسة (Chou et al., 2010) ذكر ان الكيرسيتين، وهو احد مكونات العكبر الرئيسية اظهر تأثيراً مضاداً للورم على خط خلايا سرطان الثدي (MCF-7) من خلال عمله على تحفيز عملية الموت المبرمج في الخلايا السرطانية.

كما بين (Markiewicz-Zukowska et al., 2012) ان المركبات الفعالة المستخلصة من العكبر مثل (CAPE, CHR)، كان لها تأثيراً سميّاً خلويّاً على خط سرطان الخلايا الدبقية الجينية البشرية (SVGP12)، وذكر (So et al., 1996) ان المركبات الفلافونويدية المختلفة مثل (Baicalein, Galangin, Genistein, Quercetin and Naringenin) كان لها تأثير سام للخلايا عندما أضيفت إلى مزرعة خاصة بخط خلايا سرطان الثدي البشري MDA-MB-435، وهذا ما أوضحتها نتائج الدراسة الحالية، لذلك فإن الفلافونويدات لها عدة اليات لمنع نمو الأورام السرطانية مثل تنشيط السام للخلايا Cytotoxic effect وتثبيط تكوين الأوعية الدموية Inhibition of angiogenesis، بالإضافة إلى ذلك نشاطها المضاد للالتهابات Anti-inflammatory، وتأتي أهمية هذه الفلافونويدات من استهلاكها

كغذاء للإنسان وبالتالي يمكن ان تكون الأدوية المضادة للسرطان مطورة باستخدام المركب الفعال Chrysin كصفة دوائية (Thomas *et al.*, 2016).

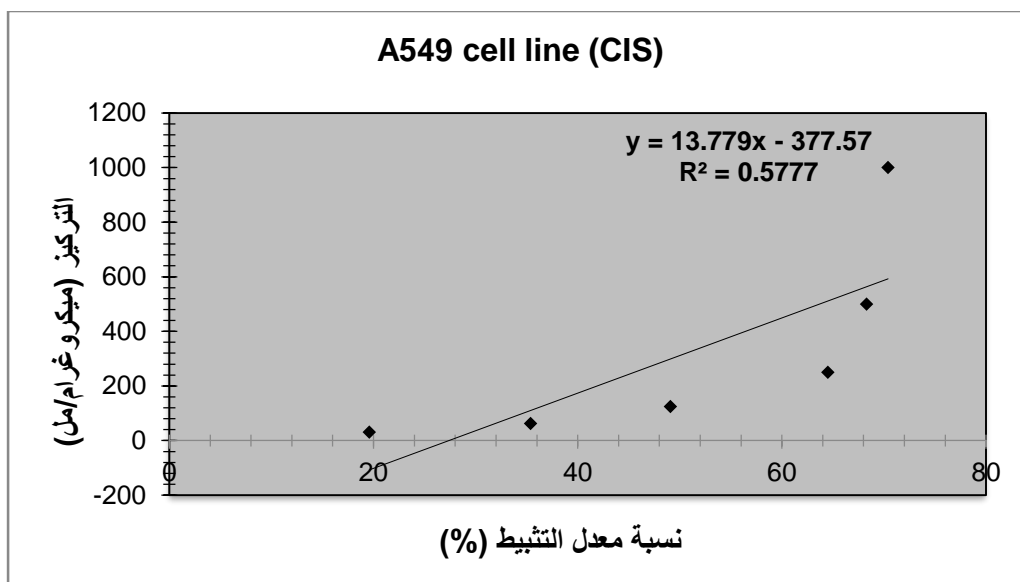
إن سمية الخلايا المستحثة بواسطة الكريسين تتحقق من خلال تثبيط الانقسام الخلوي فيها مما يؤدي إلى حدوث عملية الموت المبرمج لها، حيث أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان الكريسين يمنع نمو الخلايا السرطانية للرئة البشرية A549 اعتماداً على التركيز والوقت، وهذا يتفق مع ما توصل اليه (Samarghandian *et al.*, 2016) والذي أوضح ان الكريسين منع نمو خلايا سرطان الثدي أو قلل من حيوية الخلية Cell viability بالاعتماد على التركيز بعد (48) ساعة من العلاج، كما ذكر كل من (Parajuli *et al.*, 2009) و (Vostakolaei *et al.*, 2013) ان الكريسين المستخلص من جذور وأوراق نبات اسكوتيلاريا *Scutellaria* كان له تأثير سمي على خط خلايا سرطان الثدي MDA-MB-231، إذ أظهرت النتائج ان تركيز (100 µl) منه منع بشكل كبير نمو هذه الخلايا بعد اربعة أيام من العلاج. وفي دراسة أجريت من قبل (Puengsurin *et al.*, 2022) على العلاقة بين سرطان الخلايا الحشرافية في الفم Oral Squamous Cell Carcinoma وتأثير مركب الكريسين عليها، أظهرت النتائج ان الكريسين في تركيز (1000) ليس له تأثير مثبط على كلا خطي الخلايا السرطانية (HSC4, SCC25)، وهذا لا يتفق مع الدراسة الحالية، إذ ان النتائج أظهرت ان الكريسين في تركيز (1000) µg/mL كان له تأثير مثبط على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 بنسبة (67.100%)، ولكن عند استخدام التراكيز (100 و 200) زادت حيوية الخلية في كلا خطي خلايا (HSC4, SCC25)، وهذا يتفق مع الدراسة الحالية، إذ كلما قل التركيز كلما زادت حيوية الخلية وانخفض معدل التثبيط (السمية الخلوية) مما يجعل الكريسين بتركيزات منخفضة موصى بها لعلاج السرطان والسبب في ذلك يعود إلى سميته الخلوية المنخفضة، كما اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Samarghandian *et al.*, 2011) الذي ذكر ان الكريسين له تأثيرات سامة للخلايا في المختبر وبتراكيز مختلفة وأوقات تعرض مختلفة (24 و 48 و 72) ساعة على خط خلايا سرطان البروستاتا PC-3، وأشار (Aru *et al.*, 2019) ان المستخلص الايثانولي للعكبر التركي كان له دور كبير في توقف دورة الخلية أنواع متعددة من الخطوط الخلوية السرطانية مثل خط خلايا سرطان الثدي MCF-7 وخط خلايا سرطان المعدة HGC27 وخط خلايا سرطان الرئة البشري A549، إذ أوضح ان السبب في ذلك يعود إلى المركبات الفعالة الموجودة في مستخلص العكبر مثل (Quercetin, Chrysin, Caffeic acid, CAPE, Galangin, and Pinocembrin)، حيث كانت آلية عمل هذه المركبات على مراحل (G0/G1 و G1/S) في دورة

الانقسام الخلوي، بالإضافة إلى قيامها بزيادة التعبير في بروتينات نقاط التفتيش Check points في دورة الخلية مثل بروتين p21، كما ذكر السعدي (2022) ان المستخلص الايثانولي للعكبر العراقي اظهر تأثيراً ساماً للخلايا في المختبر على خط خلايا سرطان القولون البشري SW480، وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية، وبيّن (Sulaiman, 2010) ان المركبات الفعالة المستخلصة من العكبر مثل (Chrysin, CA, CAPE) كان لها تأثير سمي خلوي على اثنين من الخطوط الخلوية السرطانية (HL-60, HCT-). (116).

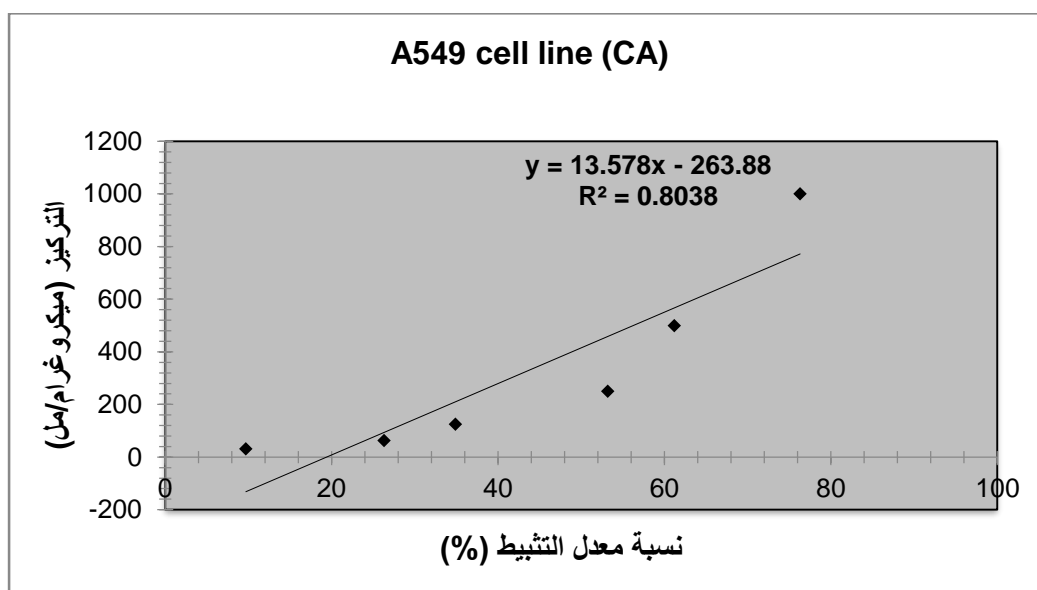
4.4 العلاقة الارتباطية بين التراكيز المستخدمة في الدراسة ونسبة معدل التثبيط في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549

Correlation between concentrations used in study and inhibition rate in human lung cancer cellline A549

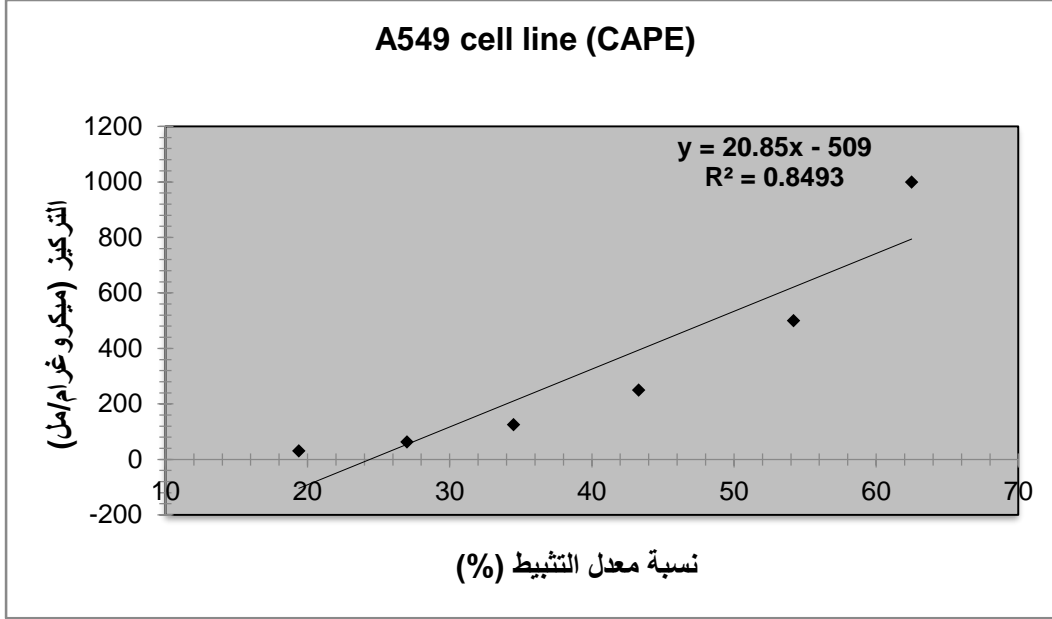
عند دراسة علاقة الارتباط (r) للتراكيز الستة لكل من السييسبلاتين (CIS) والمركبات الفعالة المستخلصة من مادة العكبر والمتمثلة بالمركب الفعال (CA) والمركب الفعال (CAPE)، بالإضافة إلى المركب الفعال (CHR) وعلاقتها بمعدل تثبيط خط خلايا سرطان الرئة البشري (A549)، فقد أظهرت النتائج وجود علاقات ارتباط بين بين التراكيز ونسبة معدل تثبيط الخلايا السرطانية، حيث أوضحت نتائج الدراسة الحالية وجود علاقات ارتباط طردية Positive correlations بين التركيز ومعدل تثبيط الخلايا السرطانية (أي تأثير التركيز على نسبة السمية الخلوية Cytotoxicity) لكل من السييسبلاتين والمركبات الفعالة للعكبر، وهذا ما أوضحته قيم معامل الارتباط (r) والتي كانت (0.5777) في عقار السييسبلاتين، كما هو موضح في الشكل (4-17)، و(0.8038) في المركب الفعال CA و(0.8493) في المركب الفعال CAPE و(0.8695) في المركب الفعال CHR، الموضحة في الاشكال (4-18) و(4-19) و(4-20) على التوالي.



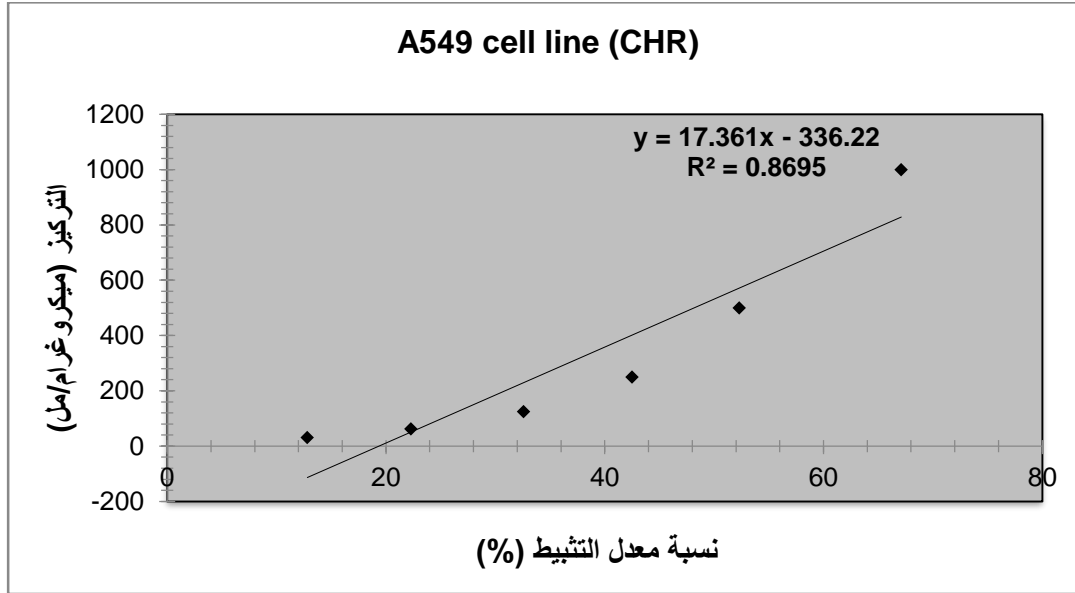
شكل (4-17) العلاقة الخطية بين تراكيز عقار السيسبلاتين (CIS) ونسبة معدل التنشيط في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549.



شكل (4-18) العلاقة الخطية بين تراكيز المركب الفعال (CA) ونسبة معدل التنشيط في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549.



شكل (4-19) العلاقة الخطية بين تراكيز المركب الفعال (CAPE) ونسبة معدل التنشيط في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549.



شكل (4-20) العلاقة الخطية بين تراكيز المركب الفعال (CHR) ونسبة معدل التنشيط في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549.

5.4 تقدير تعبير المعايير المناعية (PDL-1, CD24, CXCR4) عن طريق تقنية التدفق الخلوي

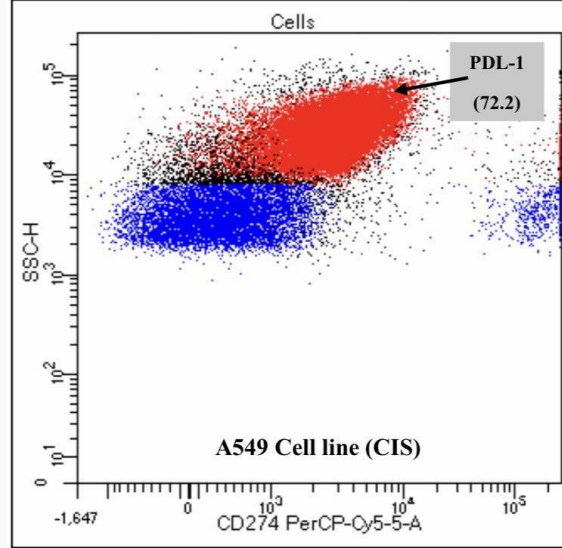
Estimation the expression of immune markers (PDL-1, CD24, CXCR4) by flow cytometry

1.5.4 تقدير تعبير المعايير المناعية (PDL-1, CD24, CXCR4) على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 بعد معاملتها بعقار السيسبلاتين

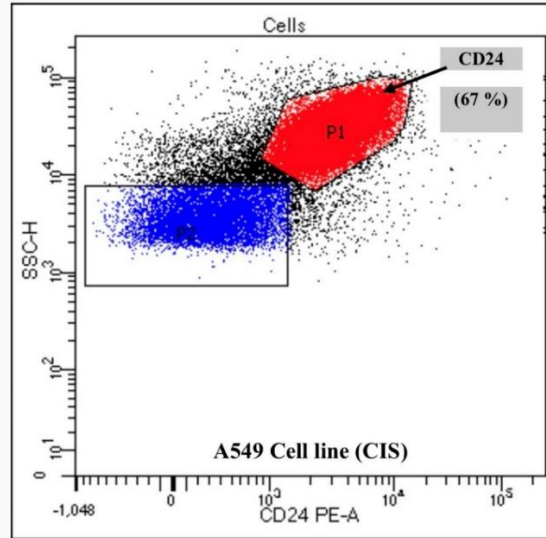
Assessment the expression of immune markers (PDL-1, CD24, CXCR4) on human lung cancer cell line A549 after treated with cisplatin drug

بعد معاملة الخط الخلوي لسرطان الرئة البشري A549 بالتركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) لعلاج السيسبلاتين ولمدة (24) ساعة، تم استخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry لتقدير تعبير البروتينات المناعية (PDL-1, CD24, CXCR4) الموجودة على سطح خلايا A549، حيث أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان مستوى تعبير هذه البروتينات قد ازداد بشكل متوسط في خلايا A549 بعد معاملتها بالسيسبلاتين عما هو موجود في خلايا السيطرة control (خلايا A549 غير معالجة Untreated)، إذ كانت نسبة مجموعة الخلايا التي أظهرت تعبيراً موجباً للبروتين المناعي (PDL-1+) هي (72.2%)، كما هو موضح في الشكل (4-21)، أمّا نسبة مجموعة الخلايا التي عبّرت ايجابياً عن البروتين المناعي (CD24+) هي (67%)، كما هو موضح في الشكل (4-22)، في حين كانت النسبة (70.3%) في مجموعة الخلايا التي اعطت تعبيراً موجباً للبروتين المناعي (CXCR4+)، كما هو موضح في الشكل (4-23)، بينما كانت النسب (50.2% و 51% و 53%) في مجموعة خلايا السيطرة Control غير المعاملة لكل من (PDL-1+ و CD24+ و CXCR4+) على التوالي، كما هو موضح في الاشكال (4-24 و 4-25 و 4-26)، وعند تحليل النتائج احصائياً، أظهرت الدراسة الحالية وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$) في التعبير عن PDL-1 في خط خلايا A549 المعاملة بالسيسبلاتين مقارنة مع خلايا السيطرة، حيث كانت قيمة Chi square (3.97)، لكن لم تظهر الدراسة وجود فروق معنوية ($P > 0.05$) في

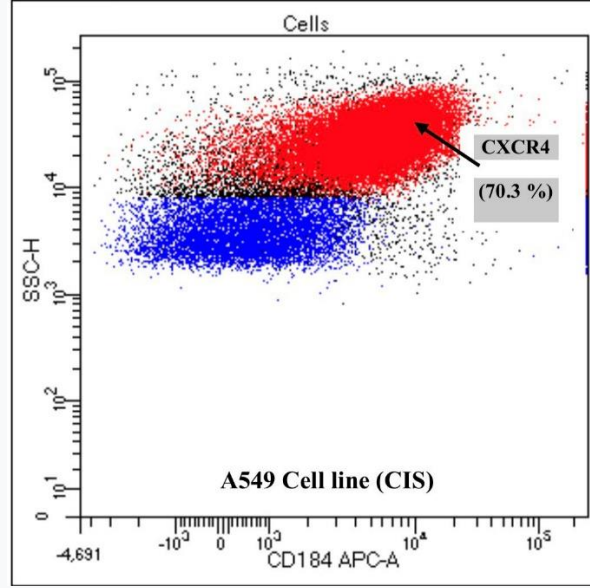
التعبير عن كلا البروتينين المناعيين (CD24 و CXCR4) في خط خلايا A549 المعاملة بالسيسبلاتين مقارنة مع خلايا السيطرة Control، إذ كانت قيمة Chi square (2.17 و 2.35) لكل من (CD24 و CXCR4) على التوالي، كما هو موضح في الجدول (4-7).



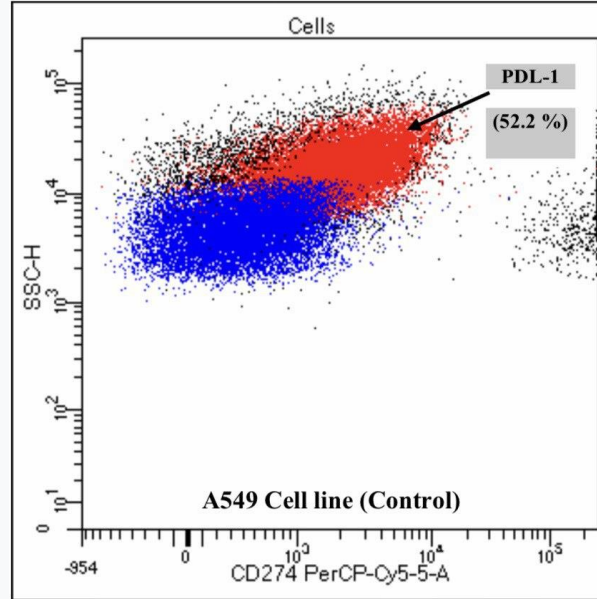
شكل (4-21) نسبة تعبير (PDL-1) في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالسيسبلاتين باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).



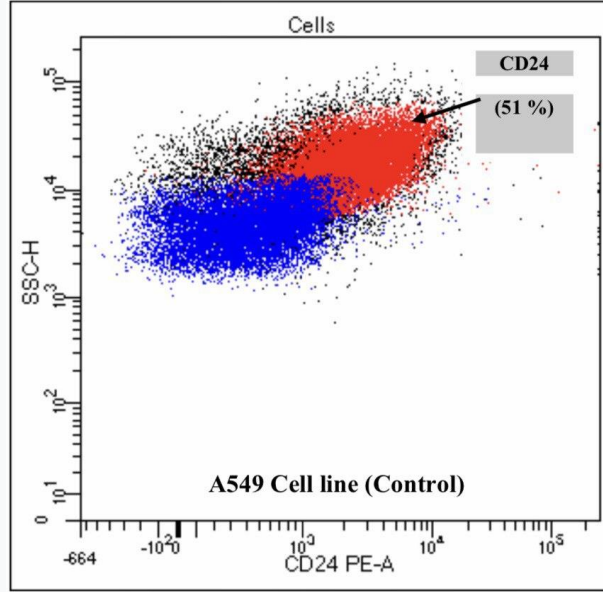
شكل (4-22) نسبة تعبير (CD24) في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالسيسبلاتين باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).



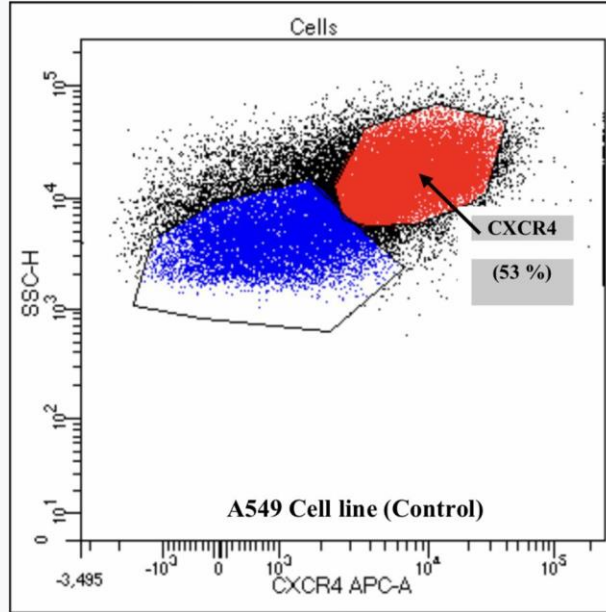
شكل (4-23) نسبة تعبير (CXCR4) في خط خلايا A549 بعد معالمتها بالسيسبلاتين باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).



شكل (4-24) نسبة تعبير (PDL-1) في خط خلايا A549 غير المعالجة (خلايا السيطرة Control) باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).



شكل (25-4) نسبة تعبير (CD24) في خط خلايا A549 غير المعالجة (خلايا السيطرة Control) باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).



شكل (26-4) نسبة تعبير (CXCR4) في خط خلايا A549 غير المعالجة (خلايا السيطرة Control) باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).

جدول (4-7) نسبة التعبير عن البروتينات المناعية (PDL-1, CD24, CXCR4) على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 بعد استخدام عقار السيسبلاتين (CIS) بالمقارنة مع خلايا السيطرة .Control

قيمة الاحتمالية P.value	الفروق المعنوية Significances	قيمة Chi-square	السيسبلاتين Cisplatin	السيطرة Control	البروتينات المناعية Immune markers
0.04	*	3.97	72.2	52	PDL-1
0.14	ns	2.17	67	51	CD24
0.13	ns	2.35	70	53	CXCR4
*: P ≤ 0.05 ، ns : Chi-square ، non-significant : مربع كاي، قيمة الفا: 0.05					

اشارت العديد من الابحاث العلمية في المختبر *In vitro* وفي الجسم الحي *In vivo* إلى تأثير عقار السيسبلاتين على مستوى تعبير (PDL-1) الموجود على سطح العديد من الخلايا السرطانية، وهو مستقبل للبروتين (PD1)، يتم التعبير عنه بشكل مفرط في العديد من أنواع الأورام السرطانية البشرية، بما في ذلك سرطان الرئة ذو الخلايا غير الصغيرة، إذ يرتبط الإفراط في التعبير عنه بسوء تشخيص حالة المريض المصاب بالسرطان (Zhou et al., 2015)، حيث ذكر (Ock et al. (2017 في دراسته على التغيرات الحاصلة في مستوى تعبير PDL-1 لدى المرضى المصابين بسرطان الخلايا الحرشفية في الرأس والعنق HNSCC بعد معالجتهم بعقار السيسبلاتين، ان من بين (35) مريضاً مصاباً بهذا النوع من السرطان تغيرت مستويات التعبير في PDL-1 في (13) منهم وبنسبة (37%)، حيث زاد التعبير في مستوى PDL-1 في (9) من اصل (13) وبنسبة (69%)، وعند خضوعهم لعلاج السيسبلاتين، أظهرت النتائج زيادة في مستوى تعبير PDL-1 لدى المرضى المصابين بنسبة (83.3%) مقارنة مع المرضى الذين لم يخضعوا للعلاج، إذ كانت نسبة PDL-1 لديهم (57%)، وعند الدراسة في المختبر أظهرت النتائج ان عقار السيسبلاتين تسبب في ارتفاع مستوى التعبير في PDL-1 في خط خلايا HNSCC، ولاحظ ان الآلية التي من خلالها يزداد مستوى تعبير PDL-1 في كلا خطي خلايا PCI-3 و SNU-

1066) بعد معاملتها بالسيسبلاتين هي عن طريق تنشيط مسارات MEK Pathways، وهذا ما بينته نتائج الدراسة الحالية التي أظهرت ان مستوى التعبير في PDL-1 قد ارتفع في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالسيسبلاتين مقارنة مع خلايا السيطرة.

وقد اشار (Ajdary et al., 2021) إلى زيادة مستوى تعبير PDL-1 في خط خلايا سرطان الرئة البشري (A549) بعد معاملتها بالتركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) لبعض العلاجات الكيميائية المستخدمة في الدراسة وهي (Carboplatin و Cisplatin و Paclitaxel و Docetaxel) ولمدة (48) ساعة من التعرض، وهذا يشير إلى ان العلاج الكيميائي كان له دور في عملية التهرب المناعي للخلايا السرطانية (مقاومة الجهاز المناعي) من خلال زيادة التعبير في PDL-1، وكذلك في دراسة (Miyazawa et al., 2019) الذي بين تأثير بعض الأدوية الكيميائية المختلفة على مستوى تعبير PDL-1 في العديد من أنواع الخلايا السرطانية، حيث اظهر ان التشخيص لدى المرضى المصابين بسرطان الرئة مرتبط بالإفراط في تعبير PDL-1 الذي يساهم بشكل كبير في عملية غزو وانتشار الورم إلى أماكن أخرى في الجسم، وفي دراسة أجريت من قبل (Funaki et al., 2017) على عينات سريرية اخذت من مرضى مصابين بسرطان الرئة وعلى الخط الخلوي لسرطان الرئة البشري A549 بعد استخدام الكاربوبلاتين والسيسبلاتين كعلاج كيميائي، أظهرت النتائج ان مستوى تعبير PDL-1 قد ازداد في العينات السريرية وخط خلايا A549، وبينت النتائج ان السبب في زيادة تعبير PDL-1 هو ان العلاج الكيميائي قد زاد من تعبير عامل النمو المحول بيتا ($TGF-\beta$)، وهو عامل يلعب دور مهم في عملية التمايز الخلوي، كما لاحظ (Wang et al., 2019) عند دراسته على تعبير PDL-1 في المرضى المصابين بسرطان الرئة ذو الخلايا غير الصغير غير النقيلي (غير المنتشر)، ان من بين (38) مريضاً خضع (8) منهم لنوعين من العلاج الكيميائي هما (Paclitaxel و Carboplatin)، حيث بينت النتائج ان (7) منهم اظهروا زيادة في مستوى تعبير PDL-1، وبالعكس ذلك أشار (Nasr et al., 2019) ان مستوى تعبير PDL-1 انخفض بشكل كبير في مريض مصاب بسرطان الرئة بعد معالجته بالكاربوبلاتين أو الجيمسيتابين Gemcitabine، حيث انخفض من (60%) في مرحلة ما قبل المعالجة إلى (5%) بعد المعالجة، وهذا لا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية التي أوضحت ان PDL-1 قد ارتفع في خط خلايا سرطان الرئة A549 بعد معاملتها بالسيسبلاتين مقارنة مع خلايا السيطرة (خلايا غير معالجة)، وربما يرجع السبب في زيادة أو نقصان مستوى التعبير في PDL-1 في الخلايا السرطانية إلى الاختلافات من مريض إلى اخر، بالإضافة إلى الاختلافات في نوعية العلاج الكيميائي المستخدم، كما ان عامل الطفرات يمكن ان يكون من العوامل

المهمة التي تسبب اختلافاً في مستوى تعبير PDL-1. وفي دراسة أجريت من قبل Ng *et al.* (2018) على نوعين من الخطوط الخلوية لسرطان الخلايا الحرشفية للمريء (KYSE150 و SLMT)، حيث لاحظ ان مستوى تعبير PDL-1 قد ازداد في كلا خطي الخلايا السرطانية بعد معاملتهما بالتركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) للعلاج الكيميائي المتكون من (5-FU والسيسبلاتين) أو (Carboplatin و Paclitaxel)، وذكر (Ito *et al.*, 2016) و (Chen *et al.*, 2016) ان السبب في زيادة مستوى تعبير PDL-1 في الخلايا السرطانية قد يعود إلى ارتباطه بمرحلة المرض وانتشاره في العقد اللمفاوية، أو بسبب المسارات المختلفة لبعض الجينات الورمية Oncogenes بما في ذلك مسار (EGFR)، حيث بينت العديد من الدراسات ان تنشيط (EGFR) عن طريق (EGF) أو عن طريق حدوث بعض الطفرات الجينية يمكن ان ينظم مستوى تعبير PDL-1 في سرطان الرئة (Inamura, 2015 ; Chen *et al.*, 2016)، كما أوضح (Yan *et al.*, 2016) دراسته على تقييم مستوى تعبير PDL-1 في نوعين من الخلايا السرطانية للرئة البشرية المقاومة لعلاج السيسبلاتين (H82R و H69R)، ان مستوى تعبير PDL-1 قد ازداد في هذه الخلايا بعد معاملتها بالسيسبلاتين، وذكر ان السبب في تلك الزيادة هو تنشيط (DNMT1) أو (Receptor tyrosine kinase (KIT)، وبالتالي فان تعطيل هذين المسارين قد يؤدي إلى انخفاض التعبير في PDL-1 في كلا نوعي الخطوط الخلوية لسرطان الرئة، الامر الذي يجعل الخلايا تستعيد حساسيتها للسيسبلاتين وتقل نسبة المقاومة له، وبالتالي يقل معدل التكاثر الخلوي cell proliferation.

وعلى الرغم من قلة الأبحاث العلمية المتعلقة بتأثير السيسبلاتين على تعبير CD24 في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549، الا ان بعض الدراسات العلمية أوضحت ان العديد من الخطوط الخلوية السرطانية المختلفة أظهرت مقاومة للعلاج الكيميائي؛ والسبب في ذلك يعود إلى الافراط في التعبير عن CD24 على سطحها، حيث ذكر (Han *et al.*, 2014) في دراسته على تأثير السيسبلاتين على نوعين من الخطوط الخلوية لسرطان الراس والرقبة (A253 و KCCT873)، ان الخلايا التي عبرت بشكل إيجابي عن CD24+ و CD44+ كانت نسبتها قليلة ولكنها أظهرت مقاومة للعلاج الكيميائي عند معالجتها بتركيز (1000 µg/mL)، حيث كانت نسبة حيويتها حوالي (53.5%)، وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية التي بينت ان نسبة تعبير CD24 على سطح خلايا A549 بعد معاملتها بالتركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) للسيسبلاتين كانت (67%)، وتشير بعض الدراسات إلى ان السبب الذي جعل من الخلايا السرطانية تُعبّر عن CD24 هو قيامها بالتعبير عن بعض الجينات الورمية مثل BMI1

وNanog، إذ ان بروتين BMI1 يلعب دوراً كبيراً في تجديد الخلايا الجذعية المكونة للدم (Park *et al.*, 2004)، كما ذكرت بعض الأبحاث العلمية ان التعبير عن CD24 ارتبط بشكل إيجابي مع سرطان الغدد اللمفاوية في المرحلتين الثالثة والرابعة (Soave *et al.*, 2013)، وأوضحت بعض الدراسات السابقة ان CD24 له علاقة بانتشار بعض الأورام السرطانية، حيث بين (Choi *et al.*, 2009) ان CD24 قد ارتبط بعملية الغزو والانتشار الورمي لخلايا سرطان القولون المتمايزة، وبالتالي فإن التعبير عن CD24 هو علامة على تفشي الورم في الأعضاء المجاورة في الجسم، لذا فإن عملية استهدافه وتنشيطه قد توعده بتطور كبير لعلاج العديد من الأمراض السرطانية ومن ضمنها سرطان الرئة.

واظهر (Modur *et al.* (2016) في دراسته على نوعين من الخطوط الخلوية لسرطان الحنجرة البشري (UM-SCC-10B و UM-SCC-15s) بعد معاملتها بالتركيز المثبط لنصف عدد الخلايا للسيسلاتين (IC50)، ان مستوى تعبير CD24 قد ازداد في كلا خطي الخلايا السرطانية، إذ كانت النسبة (85.4%) في خط خلايا (UM-SCC-10B) مقارنة بخلايا السيطرة (غير المعالجة Untreated) التي كانت نسبة CD24 فيها (46.1%)، في حين كانت النسبة (82.7%) في خط خلايا (UM-SCC-15s) مقارنة مع خلايا السيطرة (غير المعالجة Untreated) التي كانت فيها النسبة (68.8%)، وهذا يعطي دليلاً على ان هذه الخلايا مقاومة لعلاج السيسلاتين، وهذا ما أوضحت نتائج الدراسة الحالية، وبالتالي فإن استهداف CD24 بالأجسام المضادة وحيدة النسيلة Monoclonal antibodies يمكن ان يقلل هذه المقاومة واستعادة الخلايا لحساسية السيسلاتين من خلال الانخفاض في مستوى تعبير CD24.

كما أظهرت العديد من الدراسات ان البروتين المناعي (CXCR4) له دور حيوي في بقاء الخلية السرطانية من خلال مساهمته في عملية الانتشار النقيلي Metastasis إلى أماكن أخرى في الجسم، إذ ان التعبير المفرط لـ CXCR4 يرتبط ارتباطاً وثيقاً بتقدم الورم السرطاني إلى مراحل المتأخرة، وبالتالي يكشف عن سوء تشخيص حالة المريض، وهذا ما أظهرته نتائج الدراسة الحالية، والتي أوضحت ان مستوى تعبير CXCR4 كان مرتفعاً في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 بعد معاملتها بالتركيز المثبط لنصف عدد الخلايا للسيسلاتين (IC50) حيث كانت نسبته (70.3%) مقارنةً بخلايا السيطرة التي كانت فيها النسبة (53%)، حيث اتفقت هذه النتائج مع ما توصل اليه (Xie *et al.*, 2017)، الذي أشار إلى ارتفاع مستوى تعبير CXCR4 في المرضى المصابين بسرطان الرئة ذو الخلايا الصغيرة بعد معالجتهم بعقار السيسلاتين، بالإضافة إلى ذلك، لاحظ أيضاً زيادة تعبيره في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالسيسلاتين في المختبر *In vitro*، وتشير هذه النتائج إلى ان CXCR4 قد يكون مرتبطاً بمقاومة الخلايا

السرطانية لعلاج السييسبلاتين، وهذا ما أوضحه (Li *et al.*, 2014) الذي ذكر ان التعبير المفرط في CXCR4 كان مرتبطاً بشكل كبير بمقاومة العلاج الكيميائي المعتمد على السييسبلاتين في سرطان المبيض الظهاري Epithelial ovarian cancer، وكذلك (Nakamura *et al.*, 2015) الذي بين ان زيادة التعبير في مستوى CXCR4 قد يكون عامل مهم في مقاومة الأدوية الكيميائية في سرطان نخاع العظم، وبالتالي فإن العلاج بمثبطات CXCR4 يساهم في الحث على عملية الموت المبرمج في الخلايا السرطانية، الامر الذي يؤدي إلى استعادتها لحساسيتها للعلاج الكيميائي المستخدم (Sison *et al.*, 2014)، كما ذكر (Chen *et al.*, 2016) في دراسته على خط خلايا سرطان المبيض (SKOV3)، ان نسبة تعبير CXCR4 قد ارتفعت إلى (1.74 %) بعد معاملةها بـ (5 mg/L) لمدة (48) ساعة من علاج السييسبلاتين مقارنةً بالخلايا غير المعالجة والتي كانت نسبة CXCR4 فيها (0.07 %)، كما أظهرت النتائج زيادة مستوى تعبير CXCR4 في الخطتين الخلويين لسرطان الغدة الكيسية في المبيض (HO8910 و HO8910PM) بعد معاملةهما بعلاج السييسبلاتين، وهذا ما بينته نتائج الدراسة الحالية.

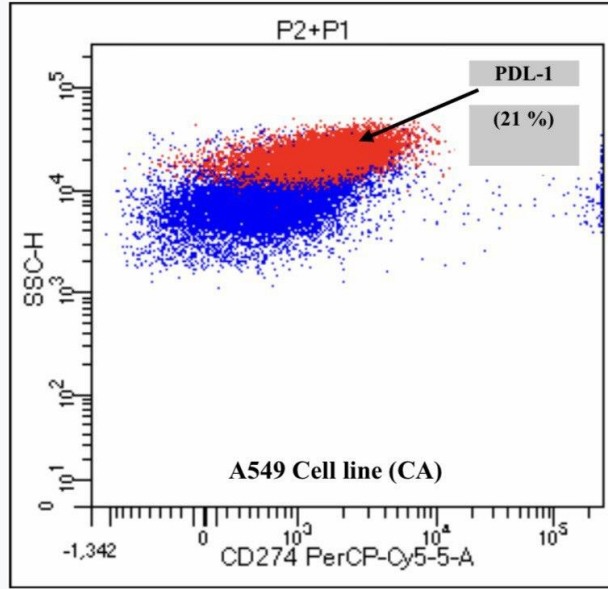
2.5.4 تقدير تعبير المعايير المناعية (PDL-1, CD24, CXCR4) على خط خلايا

سرطان الرئة البشري A549 بعد معاملةها بالمركبات الفعالة المستخلصة من العكبر

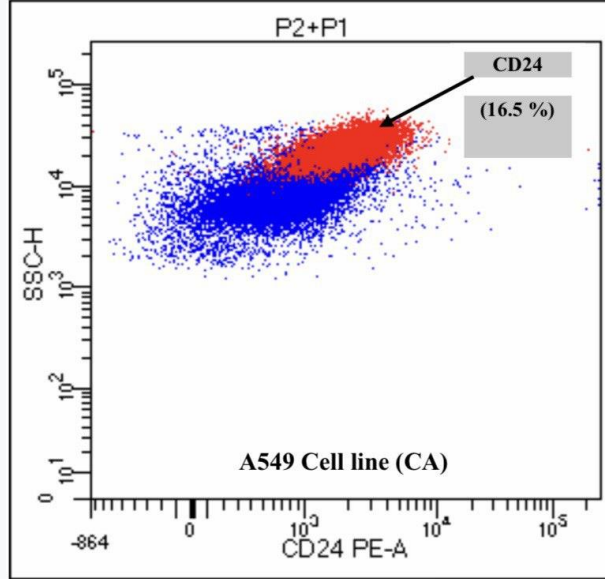
Assessment the expression of immune markers (PDL-1, CD24, CXCR4) on human lung cancer cell line A549 after treated with active compounds extracted from propolis

تم تقدير نسبة التعبير عن البروتينات المناعية (PDL-1, CD24, CXCR4) على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 بعد معاملةها بالتراكيز المثبطة لنصف عدد الخلايا (IC50) للمركبات الفعالة المستخلصة من العكبر (CA, CAPE, CHR) باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry، حيث أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان مستوى تعبير البروتينات المناعية قد انخفض بشكل كبير في خط خلايا A549 بعد معاملةها بالتركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) للمركب الفعال CA مقارنةً مع خلايا السيطرة Control (خلايا سرطانية غير معالجة)، إذ كانت نسبة مجموعة الخلايا التي عبرت ايجابياً عن البروتين المناعي (PDL-1+) هي (21%)، كما هو موضح في الشكل (4-27)، أما نسبة مجموعة الخلايا التي أظهرت تعبيراً ايجابياً للبروتين المناعي (CD24+) كانت (16.5%)، كما هو موضح في الشكل (4-28)، في حين كانت النسبة (19%) في مجموعة الخلايا التي عبرت بشكل ايجابي عن البروتين المناعي (CXCR4+)، كما هو موضح في الشكل (4-29)، مقارنةً بخلايا السيطرة Control الموضحة

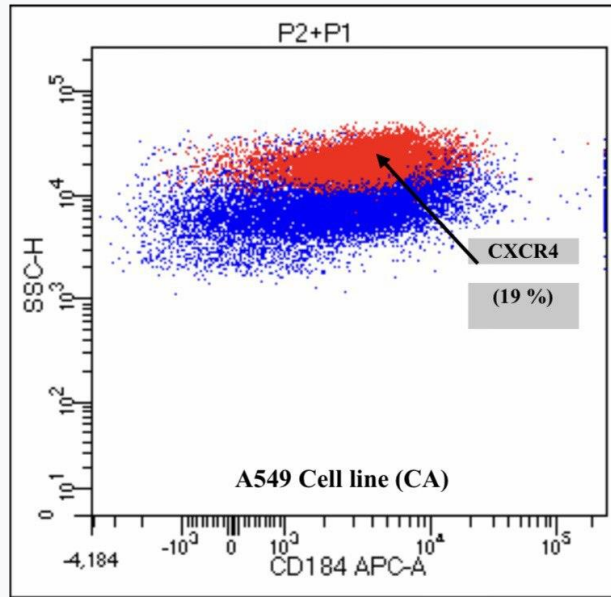
في الاشكال (24-4 و 25-4 و 26-4)، وعند تحليل النتائج احصائياً أوضحت نتائج الدراسة الحالية وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$) في التعبير عن البروتينات المناعية (PDL-1, CD24, CXCR4) على خط خلايا A549 المعاملة بالمركب الفعال CA مقارنة مع خلايا السيطرة Control، حيث كانت قيمة Chi-square (16.06 , 17 , 11.85) في (PDL-1 و CD24 و CXCR4) على التوالي، كما هو موضح في الجدول (8-4).



شكل (27-4) نسبة تعبير (PDL-1) في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالمركب الفعال (CA) باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).



شكل (4-28) نسبة تعبير (CD24) في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالمركب الفعال (CA) باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).

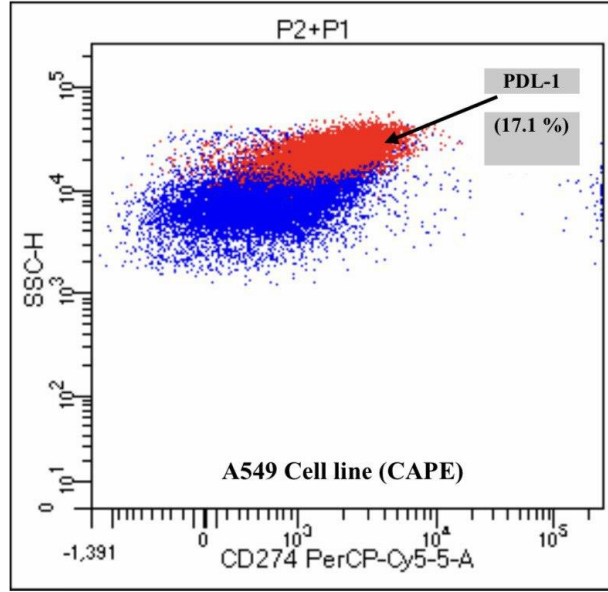


شكل (4-29) نسبة تعبير (CXCR4) في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالمركب الفعال (CA) باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).

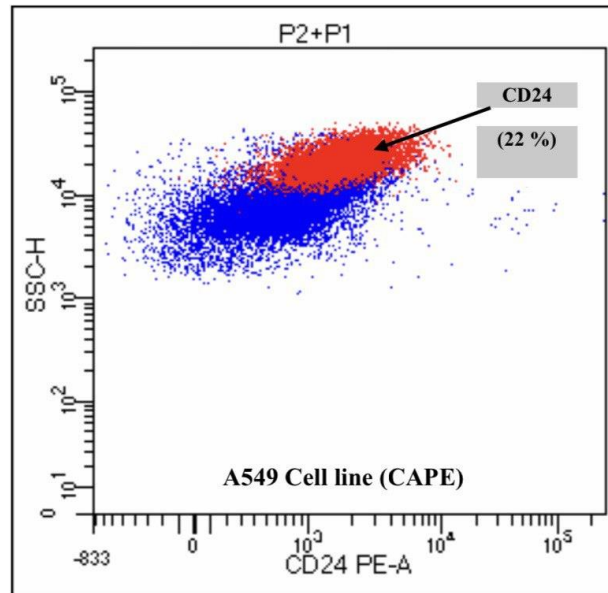
جدول (4-8) نسبة التعبير عن البروتينات المناعية (PDL-1, CD24, CXCR4) على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 بعد استخدام المركب الفعال (CA) بالمقارنة مع خلايا السيطرة Control.

قيمة الاحتمالية P.value	الفروق المعنوية Significances	قيمة Chi-square	المركب الفعال (CA)	السيطرة Control	البروتينات المناعية Immune markers
0.001	**	11.85	21	52	PDL-1
0	***	17	16.5	51	CD24
0	***	16.06	19	53	CXCR4
***, ** : P ≤ 0.05، Chi-square: مربع كاي، قيمة الفا: 0.05					

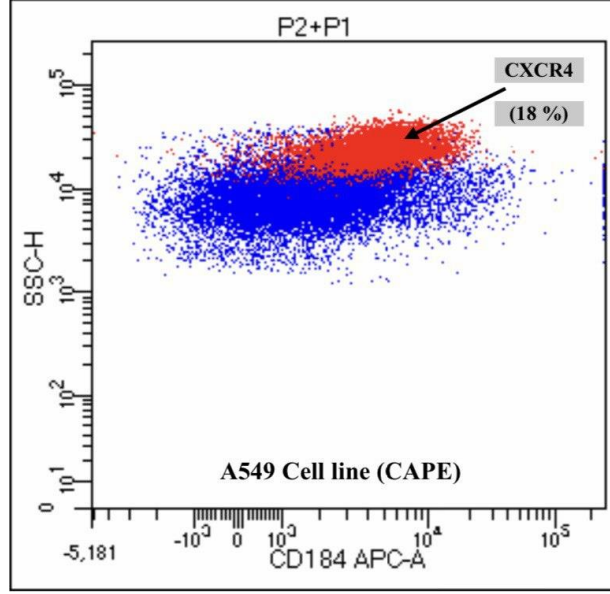
كما بينت نتائج الدراسة الحالية ان مستوى التعبير عن البروتينات المناعية (PDL-1, CD24, CXCR4) قد انخفض بشكل كبير في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالتركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) للمركب الفعال (CAPE)، مقارنةً مع خلايا السيطرة Control، إذ كانت نسبة مجموعة الخلايا التي عبرت ايجابياً عن البروتين المناعي (PDL-1+) هي (17.1%)، كما هو موضح في الشكل (4-30)، في حين كانت نسبة مجموعة الخلايا التي أظهرت تعبيراً ايجابياً للبروتين المناعي (CD24+) هي (22%)، كما هو موضح في الشكل (4-31)، بينما كانت النسبة (18%) في مجموعة الخلايا التي عبرت بشكل ايجابي عن البروتين المناعي (CXCR4+)، كما هو موضح في الشكل (4-32)، مقارنةً بخلايا السيطرة Control الموضحة في الاشكال (4-24 و 4-25 و 4-26)، وعند تحليل النتائج احصائياً أوضحت نتائج الدراسة الحالية وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$) في التعبير عن البروتينات المناعية (PDL-1, CD24, CXCR4) على خط خلايا A549 المعاملة بالمركب الفعال CAPE مقارنةً مع خلايا السيطرة Control، حيث كانت قيمة Chi-square (17.52 , 11.52 , 16.25) في (PDL-1 و CD24 و CXCR4) على التوالي، كما هو موضح في الجدول (4-9).



شكل (30-4) نسبة تعبير (PDL-1) في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالمركب الفعال (CAPE) باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).



شكل (31-4) نسبة تعبير (CD24) في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالمركب الفعال (CAPE) باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).



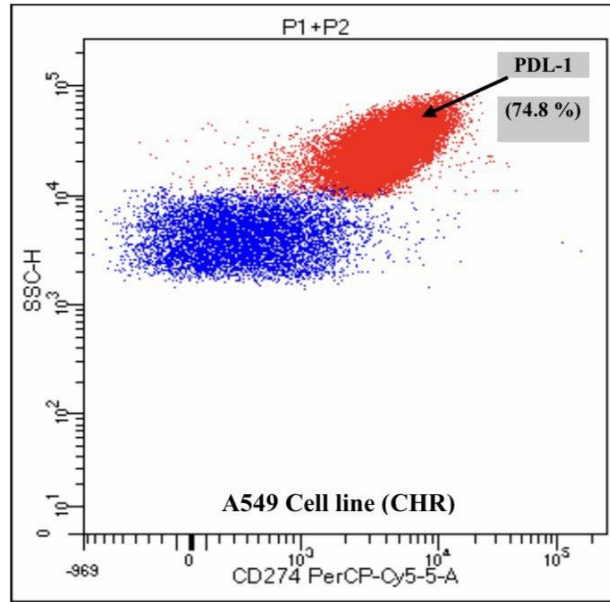
شكل (4-32) نسبة تعبير (CXCR4) في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالمركب الفعال (CAPE) باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أما الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).

جدول (4-9) نسبة التعبير عن البروتينات المناعية (PDL-1, CD24, CXCR4) على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 بعد استخدام المركب الفعال (CAPE) بالمقارنة مع خلايا السيطرة .Control

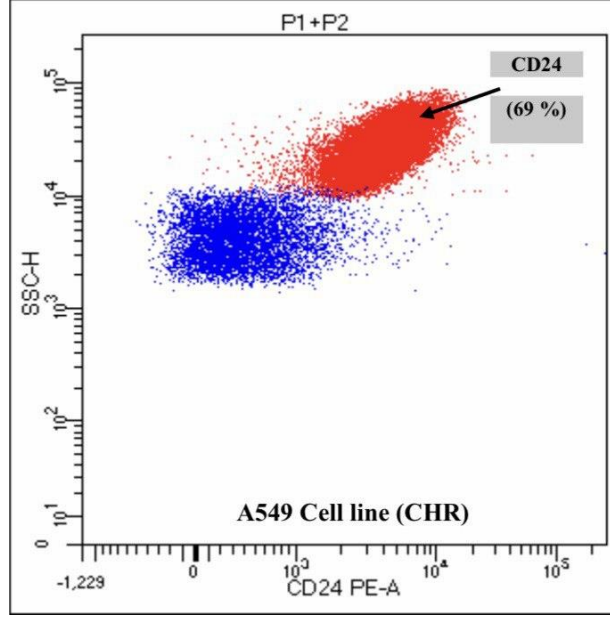
قيمة الاحتمالية P.value	الفروق المعنوية Significances	قيمة Chi-square	المركب الفعال (CAPE)	السيطرة Control	البروتينات المناعية Immune markers
0	***	16.25	17.1	52	PDL-1
0.001	**	11.52	22	51	CD24
0	***	17.52	18	53	CXCR4

***, ** : P ≤ 0.05 ، Chi-square : مربع كاي، قيمة الفا: 0.05

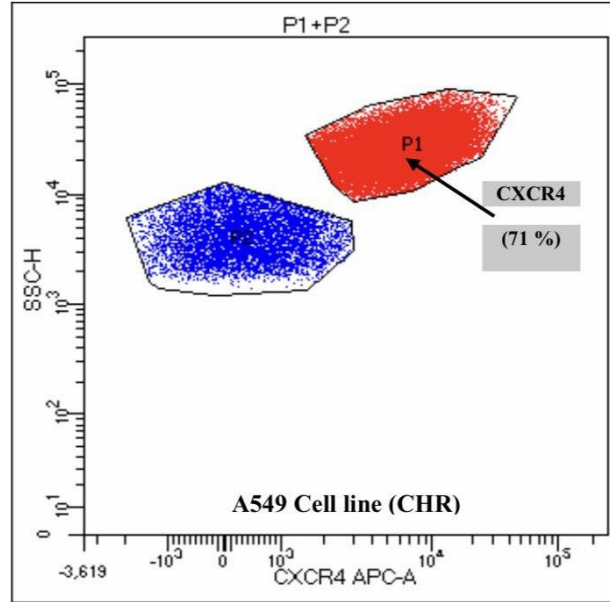
وعند معاملة خلايا A549 بالتركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) للمركب الفعال (CHR) أوضحت نتائج الدراسة الحالية وجود زيادة في مستوى تعبير البروتينات المناعية المدروسة (PDL-1, CD24, CXCR4)، مقارنةً مع خلايا السيطرة، حيث أظهرت النتائج ان نسبة مجموعة الخلايا التي عبرت ايجابياً عن البروتين المناعي (PDL-1+) هي (74.8%)، كما هو موضح في الشكل (4-33)، في حين كانت نسبة (CD24+) هي (69%)، كما هو موضح في الشكل (4-34)، بينما كانت النسبة (71%) في مجموعة الخلايا التي عبرت بشكل إيجابي عن البروتين المناعي (CXCR4+)، كما هو موضح في الشكل (4-35)، مقارنةً بخلايا السيطرة الموضحة في الاشكال (4-24 و 4-25 و 4-26)، وعند تحليل النتائج احصائياً أوضحت نتائج الدراسة الحالية وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$) في التعبير عن البروتين المناعي (PDL-1) على خط خلايا A549 المعاملة بالمركب الفعال (CHR) مقارنةً مع خلايا السيطرة Control، حيث كانت قيمة Chi-square (5)، في حين بينت النتائج عدم وجود فروق معنوية ($P > 0.05$) في التعبير عن كلا البروتينين المناعيين الاخرين (CD24 و CXCR4) مقارنةً مع خلايا السيطرة Control، إذ كانت قيم Chi-square (2.7 و 2.61) في (CD24 و CXCR4) على التوالي، كما هو موضح في الجدول (4-10).



شكل (4-33) نسبة تعبير (PDL-1) في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالمركب الفعال (CHR) باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).



شكل (34-4) نسبة تعبير (CD24) في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالمركب الفعال (CHR) باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).



شكل (35-4) نسبة تعبير (CXCR4) في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالمركب الفعال (CHR) باستخدام تقنية التدفق الخلوي Flow cytometry (الخلايا باللون الأحمر أظهرت تعبيراً ايجابياً أمّا الخلايا باللون الأزرق لم تظهر أي تعبير).

جدول (4-10) نسبة التعبير عن البروتينات المناعية (PDL-1, CD24, CXCR4) على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 بعد استخدام المركب الفعال (CHR) بالمقارنة مع خلايا السيطرة .Control

قيمة الاحتمالية P.value	الفروق المعنوية Significances	قيمة Chi-square	المركب الفعال (CHR)	السيطرة Control	البروتينات المناعية Immune markers
0.03	*	5	74.8	52	PDL-1
0.1	ns	2.7	69	51	CD24
0.106	ns	2.61	71	53	CXCR4

* : P ≤ 0.05 ، ns : non-significant ، Chi-square : مربع كاي، قيمة الفا: 0.05

اشارت بعض الدراسات العلمية إلى تأثير العكبر ومكوناته الكيميائية على بعض المعايير المناعية المتمثلة بـ (PDL-1, CD24, CXCR4) الموجودة على سطح بعض الخلايا السرطانية في المختبر وفي الجسم الحي، إذ ذكر (Zou et al. (2016) في دراسته على تثبيط مسار PD-1/PDL-1، ان بعض الخلايا السرطانية تُظهر تعبيراً ايجابياً على سطحها لـ (PDL-1) والهدف من ذلك هو محاولة التهرب من المراقبة المناعية Immune surveillance التي يقوم بها الجهاز المناعي من خلال الخلايا التائية T-cells، الامر الذي يؤدي إلى تثبيط الجهاز المناعي ومنعه من القيام بدوره الدفاعي ضد الأمراض السرطانية، كما أشار (Aru et al. (2019) في دراسته على العكبر التركي، ان المستخلص الكحولي للعكبر زاد من مستوى تعبير PDL-1 في الخط الخلوي لسرطان المعدة (HGC27)، والخط الخلوي للخلايا البطانية للوريد السري البشري (HUVEC) مقارنةً مع خلايا السيطرة، في حين أظهرت الدراسة انخفاضاً واضحاً في تعبير PDL-1 في خط خلايا A549، وهذا ما اظهرته نتائج الدراسة الحالية، والتي بينت ان بعض المركبات الفعالة المعزولة من العكبر العراقي اثرت على مستوى تعبير PDL-1 في الخط الخلوي لسرطان الرئة البشري A549، حيث كانت نسبته منخفضة جداً عند استخدام كلا المركبين الفعالين (CA و CAPE) مقارنةً مع خلايا السيطرة، إذ كانت (21%) و(17.1%) في CA و CAPE على التوالي، في حين ارتفعت النسبة إلى (74.8%) عند المعاملة بالمركب الفعال (CHR)، وعلى الرغم من

وجود العديد من الأبحاث التي اشارت إلى دور العكبر كمضاد للأورام السرطانية ومن ضمنها خط خلايا سرطان الرئة غير صغير الخلايا A549 (Demir et al., 2016)، الا ان نتائج الدراسة الحالية أوضحت ان العكبر قد يقلل من مستوى تعبير PDL-1 في خط خلايا A549، الامر الذي يجعل الجهاز المناعي فعالاً ضد الخلايا السرطانية، ومن ناحية أخرى يمكن ان يكون للعكبر تأثير وقائي عندما يعمل على زيادة مستوى تعبير PDL-1 في الخلايا الطلائية من خلال تنشيط الخلايا المناعية التائية (Aru) T cells (et al., 2019).

وعلى غرار العكبر، ذكر (Yan et al. (2017)، ان الأبيجينين Apigenin، وهو مركب كيميائي موجود في العديد من المنتجات الطبيعية كالفواكه والخضر والاعشاب والعكبر له دور كبير في علاج الأمراض السرطانية عن طريق تحفيز الجهاز المناعي من خلال تأثيره على تعبير البروتين PDL-1، وان الآلية التي يعمل من خلالها الأبيجينين على PDL-1 استهداف عامل النسخ STAT1، مما يؤدي إلى تثبيط التعبير عن PDL-1، وبالتالي يتم تحفيز عملية المراقبة المناعية Immune surveillance ضد الخلايا السرطانية.

يعد CD24 بروتين سطحي يكون مفرط التعبير في أنواع مختلفة من الخلايا السرطانية (Zhou et al., 2023)، منها سرطان البنكرياس Pancreatic cancer، وأورام الدماغ Cerebral tumors، وسرطان الرئة Lung cancer، وسرطان الخلايا الكبدية Hepatocellular carcinoma، وسرطان المبيض Ovarian cancer، وسرطان الثدي Breast cancer، وقد يلعب دوراً كبيراً في عملية الانتشار النقلي للورم في سرطان الثدي، وسرطان المعدة، وسرطان عنق الرحم، وسرطان المثانة (Okabe et al., 2018)، وفي السنوات الأخيرة زادت الأدلة حول أهمية CD24 كعلامة تنبؤية قوية في امراض سرطان الثدي والمبيض وسرطان الرئة نو الخلايا غير الصغيرة (Karimi-Busheri et al., 2013)، ونظراً لعدم توفر المصادر الخاصة بتأثير العكبر ومكوناته الكيميائية الفعالة على تعبير CD24 في خط خلايا A549، كانت نتائج دراستنا هي الأولى من نوعها في هذا الجانب، حيث أظهرت النتائج ان مستوى تعبير CD24 انخفض بشكل كبير في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالتركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) بعد (24) ساعة من التعرض للمركبين الفعالين (CA و CAPE) مقارنةً مع خلايا السيطرة، في حين لوحظ زيادة في تعبيره عند معاملة خلايا A549 بالتركيز المثبط لنصف عدد الخلايا للمركب الفعال (CHR)، مقارنةً مع خلايا السيطرة، ولهذا يمكن اعتبار التعبير الإيجابي لـ CD24 في المرضى المصابين بسرطان الرئة علامة تشخيصية سيئة للمريض، وبالتالي يمكن ان تشير هذه النتائج

إلى أهمية استخدام العكبر ومكوناته في تثبيط CD24، وبالتالي منع مقاومة الخلايا السرطانية للأدوية الكيميائية وتقليل عملية الانتشار النقيلي للورم السرطاني Metastasis، ولذلك فإن استخدام المنتجات الطبيعية ومن ضمنها العكبر يمكن ان يفتح المجال لإمكانية استعماله في مجال الطب البشري لعلاج الكثير من العوامل المرتبطة بالأمراض السرطانية، منها مقاومة الأدوية الكيميائية وتقليل آثارها الجانبية، بالإضافة إلى منع انتقال الأورام من مكان إلى آخر في الجسم.

يعد البروتين CXCR4 واحداً من أهم المستقبلات الكيموكينية Chemokine receptors المشاركة في عملية تسرطن الرئة، إذ أنّ الخلايا السرطانية التي يكون مستوى تعبير CXCR4 عالي لديها يكون لها قدرة عالية في عمليتي الغزو والانتشار النقيلي إلى أعضاء أخرى في الجسم، وذلك عن طريق هجرة CXCR4 وارتباطه بالبروتين CXCL12، وارتبط التعبير المفرط لـ CXCR4 بالمراحل المتقدمة لمرضى السرطان، حيث انخفضت فرص بقائهم على قيد الحياة (Wagner et al., 2009 ; Rodriguez-Lara et al., 2017)، كما اشارت العديد من الدراسات العلمية ايضاً إلى دور CXCR4 في عملية الانتشار النقيلي والتكاثر الخلوي Cell proliferation في مجموعة متنوعة من الأمراض السرطانية مثل سرطان المعدة وسرطان الثدي وسرطان القولون (Murakami ; Ying et al., 2012 ; et al., 2013)، ولهذا تمت دراسة تقدير مستوى تعبيره في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 بعد معاملتها بالتركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) للمركبات الفعالة المستخلصة من العكبر، حيث تم اعتبار الدراسة هي الأولى من نوعها في هذا المجال، إذ بينت النتائج انخفاض مستوى تعبير CXCR4 في خط خلايا A549 بعد معاملتها بالمركبين الفعالين (CA و CAPE)، مقارنةً مع خلايا السيطرة، في حين كانت النسبة مرتفعة عند استخدام المركب الفعال (CHR)، مقارنةً مع خلايا السيطرة، وقد تعزى أسباب الارتفاع والانخفاض في مستوى تعبير CXCR4 إلى عدة عوامل منها تنشيط مستقبل عامل النمو EGFR عن طريق EGF، أو عن طريق تنشيط مسارات PI3K / PTEN / Akt / mTOR pathway، وهو مسار إشارات مهم في دورة الخلية Cell cycle (Gangadhar et al., 2010)، وبهذا فإن النتائج التي توصلت إليها هذه الدراسة تعطي مؤشرات قيمة لوضع استراتيجيات علاجية جديدة ضد سرطان الرئة عن طريق تثبيط أو تقليل تعبير CXCR4 في خط خلايا A549 من خلال استخدام المركبات الفعالة في المستخلص الايثانولي للعكبر العراقي، مما يشير إلى ان هذه المركبات قد تكون مهمة في السيطرة على عملية الانتشار النقيلي للورم Metastasis، وعملية تكوين الأوعية الدموية Angiogenesis، حتى لا يصل المريض إلى مراحل متقدمة من المرض.

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions

and

Recommendations

الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations

الاستنتاجات Conclusions

1. إن المركبات الفعالة المعزولة من مستخلص العكبر العراقي والمتمثلة بـ (CA, CAPE, CHR) كان لها تأثيرات سمية خلوية على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549، من خلال زيادة معدل التنشيط نمو الخلايا السرطانية كلما زاد التركيز.
2. امتلك المركب الفعال CA أعلى نسبة تركيز بين المركبات الثلاث المعزولة من المستخلص الايثانولي العكبر، حيث كان تركيزه (69.58) mg/g.
3. التركيز الأكثر فعالية للمركبات الفعالة المعزولة من المستخلص الايثانولي للعكبر والذي سبب السمية الخلوية Cytotoxicity ضد خلايا سرطان الرئة A549 هو التركيز (1000) µg/mL.
4. التركيز الأكثر فعالية لعقار السيسبلاتين والذي سبب السمية الخلوية Cytotoxicity ضد خلايا سرطان الرئة A549 هو التركيز (1000) µg/mL.
5. اظهر المركب الفعال CA انه له تأثيرات سمية خلوية ضد خلايا سرطان الرئة A549 أكبر من المركبين الفعالين الاخرين، إذ كان التركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) له حوالي (157.5) µg/mL، في حين كانت التراكيز (249.3 و 258.9) µg/mL في CAPE و CHR على التوالي، ومن الجدير بالذكر ان كلما قل تركيز الـ (IC50) كلما زادت السمية الخلوية.
6. التركيز المثبط لنصف عدد الخلايا (IC50) لعقار السيسبلاتين ضد خلايا سرطان الرئة A549 هو (43.75) µg/mL، حيث كان أقل بكثير من تراكيز المركبات الفعالة المعزولة من مستخلص العكبر.
7. تسبب كل من المركب الفعال CA و CAPE بانخفاض مستوى التعبير في البروتينات المناعية (PDL-1, CD24, CXCR4) في خلايا سرطان الرئة A549 بالمقارنة مع خلايا السيطرة.
8. ازداد مستوى التعبير في البروتينات المناعية (PDL-1, CD24, CXCR4) في خلايا سرطان الرئة A549 بعد معاملتها بالمركب الفعال CHR مقارنةً مع خلايا السيطرة.
9. اظهر عقار السيسبلاتين تأثيراً أعلى مستوى التعبير في البروتينات المناعية (PDL-1, CD24, CXCR4) في خط خلايا سرطان الرئة A549، إذ تسبب بزيادتها مقارنةً مع خلايا السيطرة.

التوصيات Recommendations

1. دراسة تأثير المركبات الفعالة (CA و CAPE و CHR) المعزولة من العكبر العراقي على خطوط خلوية سرطانية أخرى في المختبر *In vitro*.
2. تشخيص مركبات كيميائية فعالة جديدة مستخلصة جزئياً من العكبر ثم دراسة تأثيرها على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549.
3. إيجاد حلول لمشكلة اختلاف المكونات الكيميائية في العكبر والتي تختلف باختلاف النبات والمنطقة الجغرافية التي يجمع منها، وبذلك يمكن توحيد التركيب الكيميائي له.
4. دراسة تأثير المركبات الفعالة على معايير مناعية جديدة في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549.
5. الجمع بين عقار السييسبلاتين وكل مركب من المركبات الفعالة واختبار تأثيرهما السام للخلايا على خط خلايا سرطان الرئة البشري A549، بالإضافة إلى تأثيرهما على المعايير المناعية (PDL-1 و CD24 و CXCR4).
6. دراسة التأثيرات السمية الخلوية للمركبات الفعالة (CA و CAPE و CHR) على سرطان الرئة في الجسم الحي *In vivo*، ثم دراسة تأثيرها على المعايير المناعية المدروسة.
7. يقدم العكبر ومكوناته قيمة وقائية وعلاجية لسرطان الرئة وبذلك يمكن اعتماده كمكمل غذائي ووظيفي.
8. السييسبلاتين هو علاج كيميائي له آثار جانبية حتى على الخلايا الطبيعية في الجسم؛ لذلك من الضروري الاستعانة بمركبات كيميائية مستخلصة من المواد الطبيعية تعمل كأدوية مكملة مضادة للسرطان بهدف تخفيف بعض الآثار الجانبية التي يسببها العلاج الكيميائي للمريض.
9. دراسة تأثير العكبر ومركباته الفعالة على الجينات الورمية Oncogenes والجينات الكابتة للورم Tumor suppressor gene في الخلايا السرطانية وعلى وجه الخصوص خلايا سرطان الرئة.
10. دراسة مستوى التعبير الجيني للبروتينات المناعية المدروسة ومعرفة مستوى التعبير في حالتها الزيادة والنقصان في خط خلايا سرطان الرئة البشري A549 بعد معاملتها بالمركبات الفعالة المستخلصة من العكبر.

المصادر

References

المصادر Referencesالمصادر العربية

الأرناؤوط، مي رمزي. (2016). حقائق عن السرطان مقدمة في علم السرطانات الحديث. دار الريان. منظمة المجتمع العلمي العربي. 264 صفحة.

الفتلاوي، ظافرة جعفر عبد علي والبوسعير، ضحى مهدي حسين. (2018). دراسة نسيجية لأنواع سرطان الرئة غير صغير الخلايا للمرضى في مركز الفرات الأوسط للأورام في النجف. مجلة جامعة بابل/ العلوم الصرفة والتطبيقية والعلوم الهندسية. 16(1): 37-45.

السعدي، كوثر نعمة نجم عبد. (2022). الفعالية السمية الخلوية لجسيمات الفضة النانوية (AgNo₃) والمستخلص الكحولي للعكبر على خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480). رسالة ماجستير، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة كربلاء: 105 صفحة.

الورد، ميس عدنان حيدر. (2019). التنميط الوراثي لجيني XPD وFOXP3 في مرضى سرطان الرئة. رسالة ماجستير، كلية التربية للعلوم الصرفة / ابن الهيثم، جامعة بغداد: 94 صفحة.

بالفار، محمد الأخضر. (2016). المساهمة في دراسة القدرة المضادة للأكسدة لبروبوليس جنوب الجزائر بالطرق الكيميائية والكهروكيميائية. أطروحة دكتوراه، كلية الرياضيات وعلوم المادة، جامعة قاصدي مرباح ورقلة: 231 صفحة.

محمد، محمد طالب خضير. (2022). تصنيع جسيمات الفضة النانوية باستخدام مستخلص عرق السوس المائي الحار. *Glycyrrhiza glabra L.* ودراسة فعاليتها على بكتريا *Klebsiella pneumonia* وتأثيرها المضاد على خط خلايا سرطان الرئة للإنسان A549. رسالة ماجستير، كلية التربية، قسم علوم الحياة، الجامعة العراقية: 133 صفحة.

المصادر الأجنبية

- A549 Cell Line: Human alveolar adenocarcinoma cell line -General Information". Retrieved 3 January 2012.
- Aberle, D.R., Berg, C.D., and Adams, A.M. (2011). Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screen. *N Engl J Med*, 365:395–409.
- Abotaleb, M., Samuel, S. M., Varghese, E., Varghese, S., Kubatka, P., Liskova, A., and Busselberg, D. (2018). Flavonoids in cancer and apoptosis. *Cancers*, 11(1), 28.
- Achkar, I. W., Abdulrahman, N., Al-Sulaiti, H., Joseph, J. M., Uddin, S., and Mraiche, F. (2018). Cisplatin based therapy: the role of the mitogen activated protein kinase signaling pathway. *Journal of translational medicine*, 16(1), 1-12.
- Adamcova, A., Horna, A., and Satinsky, D. (2022). Determination of Phloridzin and Other Phenolic Compounds in Apple Tree Leaves, Bark, and Buds Using Liquid Chromatography with Multilayered Column Technology and Evaluation of the Total Antioxidant Activity. *Pharmaceuticals*, 15(2), 244.
- Adami, H.O., Hunter, D.J., Lagiou, P., Mucci, L.A., and MacMahon, B. (2018). *Textbook of Cancer Epidemiology*. New York: Oxford University Press.
- Adan A.; Alizada G.; Kiraz Y.; Baran Y. and Nalbant A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications, *Crit Rev Biotechnol.*, 37(2):163-176. [doi: 10.3109/07388551.2015.1128876].
- Adan, A., Kiraz, Y., and Baran, Y. (2016). Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Current pharmaceutical biotechnology*, 17(14), 1213-1221.

- Ahangari, Z., Naseri, M., and Vatandoost, F. (2018). Propolis: Chemical composition and its applications in endodontics. *Iranian endodontic journal*, 13(3), 285-292.
- Ahern, E., Solomon, B. J., Hui, R., Pavlakis, N., O'Byrne, K., and Hughes, B. G. (2021). Neoadjuvant immunotherapy for non-small cell lung cancer: right drugs, right patient, right time? *Journal for immunotherapy of cancer*, 9(6).
- Ahmed, M., and Jamil, K. (2012). Cytotoxicity of neoplastic drugs Gefitinib, Cisplatin, 5-FU, Gemcitabine, and Vinorelbine on human cervical cancer cells (HeLa). *Biology and Medicine*, 3(5), 60-71.
- Ahmed, S. A., Al-Shanon, A. F., Al-Saffar, A. Z., Tawang, A., and Al-Obaidi, J. R. (2023). Antiproliferative and cell cycle arrest potentials of 3-O-acetyl-11-keto- β -boswellic acid against MCF-7 cells in vitro. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(1), 75.
- Ajdary, H., Safaei, S., Hashemzadeh, S., Kazemi, T., Shanehbandi, D., Baghbanzadeh, A., and Baradaran, B. (2021). Chemotherapeutic Agents Increase PD-L1 Expression in A549 Lung Cancer Cell Line.
- Akbulut, H., İncedayı, S., and Atasoy, Ö. (2020). Non-small cell lung cancer and its treatment. *Demiroglu Sci. Univ. Florence Nightingale Transplant. J*, 4, 23-40.
- Al-Azzawi, Q. H.; Al-Kadimi, H. M. and Salih, A. L. (2017). Bronchogenic carcinoma in patients younger than 40 years. *Karbala. J. Med.*, 10(1): 2785-2791.
- Alday, E., Valencia, D., Garibay-Escobar, A., Domínguez-Esquivel, Z., Piccinelli, A. L., Rastrelli, L., and Velazquez, C. (2019). Plant origin authentication of Sonoran Desert propolis: An antiproliferative propolis from a semi-arid region. *The Science of Nature*, 106(5), 1-13.

- Aldossary, S. A. (2019). Review on pharmacology of cisplatin: clinical use, toxicity and mechanism of resistance of cisplatin. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 12(1), 7-15.
- AL-Fatlawi, D. A. D. (2014). Effect of Ethanolic Extract of Propolis on Some Biological Activities in Diabetic Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Thesis, University of Kufa, Faculty of Science, Department of Biology, 110 pp.
- Al-Hariri, M. (2019). Immune's-boosting agent: Immunomodulation potentials of propolis. *Journal of family & community medicine*, 26(1), 57.
- Ali, I. H., Daoud, A. S., and Shareef, A. Y. (2012). Physical properties and chemical analysis of Iraqi propolis. *Tikrit Journal of Pure Science*, 17(2), 26-31.
- Alotaibi, A. H. (2020). A study of the toxicological properties of propolis samples from Europe and Saudi Arabia and of their biological activity against protozoa. Doctoral dissertation, college of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Strathclyde.
- Al-Seray, G. H., Abdullah, A. S., and AL-Mozie'l, M. S. (2022). Iraqi Propolis, Carbimazole, Levothyroxine and their Propolis Combinations Effects on Renal Histopathological Parameters in Female Rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 64.
- Altevogt, P., Sammar, M., Hüser, L., and Kristiansen, G. (2021). Novel insights into the function of CD24: A driving force in cancer. *International journal of cancer*, 148(3), 546-559.
- Al-Ziaydi, A. G., Al-Shammari, A. M., Hamzah, M. I., Kadhim, H. S., and Jabir, M. S. (2020). Newcastle disease virus suppress glycolysis pathway and induce breast cancer cells death. *Virusdisease*, 31(3), 341-348.
- Amable, L. (2016). Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. *Pharmacological research*, 106, 27-36.

- Amar, S., El-Bolok, A. H. M., El-Gayar, S. F., and Sholkamy, M. I. (2021). Synergistic Cytotoxic Effect of Honey Bee Venom and Cisplatin on Tongue Squamous Cell Carcinoma Cell Line. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 9(B), 1739-1744.
- American Cancer Society. (2023). Cancer Facts and Figures. Atlanta: American Cancer Society; 2023.
- Anjum, S. I., Ullah, A., Khan, K. A., Attaullah, M., Khan, H., Ali, H., and Dash, C. K. (2019). Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi journal of biological sciences*, 26(7), 1695-1703.
- Arruda, C., Ribeiro, V. P., Mejía, J. A. A., Almeida, M. O., Goulart, M. O., Candido, A. C. B. B., and Bastos, J. K. (2020). Green propolis: Cytotoxic and leishmanicidal activities of artepillin C, p-coumaric acid, and their degradation products. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 30(2), 169-176.
- Aru, B., Güzelmeric, E., Akgül, A., Demirel, G. Y., and Kırmızıbekmez, H. (2019). Antiproliferative activity of chemically characterized propolis from Turkey and its mechanisms of action. *Chemistry & Biodiversity*, 16(7), e1900189.
- Arung, E. T., Ramadhan, R., Khairunnisa, B., Amen, Y., Matsumoto, M., Nagata, M., and Shimizu, K. (2021). Cytotoxicity effect of honey, bee pollen, and propolis from seven stingless bees in some cancer cell lines. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(12), 7182-7189.
- Aswood, M. S., Jaafar, M. S., and Salih, N. (2017). Estimation of annual effective dose due to natural radioactivity in ingestion of vegetables from Cameron Highlands, Malaysia. *Environmental Technology & Innovation*, 8, 96-102.

- Awad, M. G., Ali, R. A., El-Monem, A., Dalia, D., and El-Magd, M. A. (2020). Graviola leaves extract enhances the anticancer effect of cisplatin on various cancer cell lines. *Molecular & Cellular Toxicology*, *16*(4), 385-399.
- Balta, B. Z., Üre, Ö. S., Erturan, S., and Aydın, G. (2013). İleri evre küçük hücreli dışı akciğer kanserinde prognostik faktörler. *Medical Bulletin of Haseki/Haseki Tip Bulteni*, *51*(2).
- Bankova, V. (2005). Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, *2*(1), 29-32.
- Banskota, A. H., Tezuka, Y., and Kadota, S. (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy research*, *15*(7), 561-571.
- Bar, J., Gorn-Hondermann, I., Moretto, P., Perkins, T. J., Niknejad, N., Stewart, D. J., and Dimitroulakos, J. (2015). miR profiling identifies cyclin-dependent kinase 6 downregulation as a potential mechanism of acquired cisplatin resistance in non-small-cell lung carcinoma. *Clinical Lung Cancer*, *16*(6), e121-e129.
- Barbaric, M., Mišković, K., Bojić, M., Lončar, M. B., Smolčić-Bubalo, A., Debeljak, Ž., and Medić-Šarić, M. (2011). Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. *Journal of ethnopharmacology*, *135*(3), 772-778.
- Baumann, P., Cremers, N., Kroese, F., Orend, G., Chiquet-Ehrismann, R., Uede, T., and Sleeman, J. P. (2005). CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. *Cancer research*, *65*(23), 10783-10793.

- Benguedouar, L., Lahouel, M., Gangloff, S. C., Durlach, A., Grange, F., Bernard, P., and Antonicelli, F. (2016). Ethanolic extract of Algerian propolis and galangin decreased murine melanoma tumor progression in mice. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 16(9), 1172-1183.
- Ben-Yehoshua, S., Borowitz, C., and Ondrej Hanuš, L. (2012). 1 frankincense, myrrh, and balm of Gilead: Ancient spices of Southern Arabia and Judea. *Horticultural Reviews*, 39(1), 3-66.
- Betances-Salcedo, E., Revilla, I., Vivar-Quintana, A. M., and González-Martín, M. I. (2017). Flavonoid and antioxidant capacity of propolis prediction using near infrared spectroscopy. *Sensors*, 17(7), 1647.
- Bogdanov, S. (2011). Propolis: Composition, health, medicine: A review. *Bee Product Science*, www.bee-hexagon.net, 4.
- Botteon, C. E. A., Silva, L. B., Ccana-Ccapatinta, G. V., Silva, T. S., Ambrosio, S. R., Veneziani, R. C. S., and Marcato, P. D. (2021). Biosynthesis and characterization of gold nanoparticles using Brazilian red propolis and evaluation of its antimicrobial and anticancer activities. *Scientific Reports*, 11(1), 1974.
- Boutabet, K., Kebsa, W., Alyane, M., and Lahouel, M. (2011). Polyphenolic fraction of Algerian propolis protects rat kidney against acute oxidative stress induced by doxorubicin. *Indian Journal of Nephrology*, 21(2), 101.
- Brainard, J., and Farver, C. (2019). The diagnosis of non-small cell lung cancer in the molecular era. *Modern Pathology*, 32(1), 16-26.
- Bretz, N. P., Salnikov, A. V., Perne, C., Keller, S., Wang, X., Mierke, C. T., and Altevogt, P. (2012). CD24 controls Src/STAT3 activity in human tumors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69, 3863-3879.

- Brierley, J. D., Gospodarowicz, M. K., and Wittekind, C. (Eds.). (2017). *TNM classification of malignant tumours*. John Wiley & Sons.
- Brihoum, H., Maiza, M., Sahali, H., Boulmeltout, M., Barratt, G., Benguedouar, L., and Lahouel, M. (2018). Dual effect of Algerian propolis on lung cancer: antitumor and chemopreventive effects involving antioxidant activity. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54.
- Brown, A., Kumar, S., and Tchounwou, P. B. (2019). Cisplatin-based chemotherapy of human cancers. *Journal of cancer science & therapy*, 11(4).
- Brown, K. F., Rungay, H., Dunlop, C., Ryan, M., Quartly, F., Cox, A., and Parkin, D. M. (2018). The fraction of cancer attributable to modifiable risk factors in England, Wales, Scotland, Northern Ireland, and the United Kingdom in 2015. *British journal of cancer*, 118(8), 1130-1141.
- Bufalo, M. C., Candeias, J. M. G., Sousa, J. P. B., Bastos, J. K., and Sforcin, J. M. (2010). In vitro cytotoxic activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis against HEP-2 cells. *Natural Product Research*, 24(18), 1710-1718.
- Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical toxicology*, 36(4), 347-363.
- Bush, K. (2018). P2. 10-15 RADON: # 1 Cause of Lung Cancer in Non-Smokers. *Journal of Thoracic Oncology*, 13(10), S778.
- Campoccia, D., Ravaioli, S., Santi, S., Mariani, V., Santarcangelo, C., De Filippis, A., and Daglia, M. (2021). Exploring the anticancer effects of standardized extracts of poplar-type propolis: In vitro cytotoxicity toward cancer and normal cell lines. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 141, 111895.
- Caruso, G., Godos, J., Privitera, A., Lanza, G., Castellano, S., Chillemi, A., and Grosso, G. (2022). Phenolic acids and prevention of cognitive decline:

- Polyphenols with a neuroprotective role in cognitive disorders and Alzheimer's disease. *Nutrients*, 14(4), 819.
- Chan, B. A., and Coward, J. I. (2013). Chemotherapy advances in small-cell lung cancer. *Journal of thoracic disease*, 5(Suppl 5), S565.
- Chen, M. F., Chen, P. T., Chen, W. C., Lu, M. S., Lin, P. Y., and Lee, K. D. (2016). The role of PD-L1 in the radiation response and prognosis for esophageal squamous cell carcinoma related to IL-6 and T-cell immunosuppression. *Oncotarget*, 7(7), 7913-7924.
- Chen, N., Fang, W., Zhan, J., Hong, S., Tang, Y., Kang, S., and Zhang, L. (2015). Upregulation of PD-L1 by EGFR activation mediates the immune escape in EGFR-driven NSCLC: implication for optional immune targeted therapy for NSCLC patients with EGFR mutation. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(6), 910-923.
- Chen, Y. B., Mu, C. Y., and Huang, J. A. (2012). Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: a 5-year-follow-up study. *Tumori Journal*, 98(6), 751-755.
- Chen, Y., Wang, S., Bu, S., Xu, M., and Lai, D. (2016). Low-dose cisplatin-induced CXCR4 expression promotes proliferation of ovarian cancer stem-like cells. *Acta Biochim Biophys Sin*, 48(3), 282-289.
- Cheng, Q., Liao, M., Hu, H., Li, H., and Wu, L. (2018). Asiatic acid (AA) sensitizes multidrug-resistant human lung adenocarcinoma A549/DDP cells to cisplatin (DDP) via downregulation of P-glycoprotein (MDR1) and its targets. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 47(1), 279-292.
- Chirumbolo, S., Bjorklund, G., Lysiuk, R., Vella, A., Lenchyk, L., and Upyr, T. (2018). Targeting cancer with phytochemicals via their fine tuning of

- the cell survival signaling pathways. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3568.
- Chiu, H. F., Han, Y. C., Shen, Y. C., Golovinskaia, O., Venkatakrisnan, K., and Wang, C. K. (2020). Chemopreventive and chemotherapeutic effect of propolis and its constituents: a mini-review. *Journal of Cancer Prevention*, 25(2), 70.
- Choi, D., Lee, H. W., Hur, K. Y., Kim, J. J., Park, G. S., Jang, S. H., and Paik, S. S. (2009). Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma. *World journal of gastroenterology: WJG*, 15(18), 2258-2264.
- Chong, F. C., and Chua, L. S. (2020). Effects of solvent and pH on stingless bee propolis in ultrasound-assisted extraction. *AgriEngineering*, 2(2), 308-316.
- Chou, C. C., Yang, J. S., Lu, H. F., Ip, S. W., Lo, C., Wu, C. C., and Chen, D. R. (2010). Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells. *Archives of pharmacal research*, 33, 1181-1191.
- Christov, R., Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V., and Bertrand, M. (2005). Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. *Natural product research*, 19(7), 673-678.
- Collins, L. G., Haines, C., Perkel, R., and Enck, R. E. (2007). Lung cancer: diagnosis and management. *American family physician*, 75(1), 56-63.
- Comsa, E., Nguyen, K. A., Loghin, F., Boumendjel, A., Peuchmaur, M., Andrieu, T., and Falson, P. (2018). Ovarian cancer cells cisplatin sensitization agents selected by mass cytometry target ABCC2 inhibition. *Future medicinal chemistry*, 10(11), 1349-1360.

- Cote, M. L., Liu, M., Bonassi, S., Neri, M., Schwartz, A. G., Christiani, D. C., and Hung, R. J. (2012). Increased risk of lung cancer in individuals with a family history of the disease: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium. *European journal of cancer*, 48(13), 1957-1968.
- Cunha, G. F., Soares, J. C., Sousa, T. L. D., Egea, M. B., Alencar, S. M. D., Belisario, C. M., and Plácido, G. R. (2021). Cassava-starch-based films supplemented with propolis extract: physical, chemical, and microstructure characterization. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11(4), 12149-12158.
- Cunha, I., Sawaya, A. C., Caetano, F. M., Shimizu, M. T., Marcucci, M. C., Drezza, F. T., and Carvalho, P. D. O. (2004). Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 15, 964-970.
- Da Rosa, C., Bueno, I. L., Quaresma, A. C. M., and Longato, G. B. (2022). Healing potential of propolis in skin wounds evidenced by clinical studies. *Pharmaceuticals*, 15(9), 1143.
- da Silva, L. M., Frión-Herrera, Y., Bartolomeu, A. R., Gorgulho, C. M., and Sforcin, J. M. (2017). Mechanisms involved in the cytotoxic action of Brazilian propolis and caffeic acid against HEP-2 cells and modulation of P-glycoprotein activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69(11), 1625-1633.
- Das, A. B., Goud, V. V., and Das, C. (2019). Phenolic compounds as functional ingredients in beverages. In *Value-added ingredients and enrichments of beverages* (pp. 285-323). Academic Press.

- Dasari, S., and Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology*, 740, 364-378.
- De Almeida, E. C., and Menezes, H. (2002). Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 8, 191-212.
- De Biasi, A. R., Villena-Vargas, J., and Adusumilli, P. S. (2014). Cisplatin-Induced Antitumor Immunomodulation: A Review of Preclinical and Clinical Evidence. *Cisplatin-Induced Immunomodulation. Clinical Cancer Research*, 20(21), 5384-5391.
- De Mendonca, I. C. G., Porto, I. C. C. D. M., do Nascimento, T. G., de Souza, N. S., Oliveira, J. M. D. S., Arruda, R. E. D. S., and Barreto, F. S. (2015). Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 1-12.
- Demir, S. (2019). EVALUATION OF ANTIVIRAL ACTIVITIES OF DIFFERENT TYPES OF PROPOLIS EXTRACTS. M.Sc. Thesis, INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES IN SCIENCE AND ENGINEERING, İSTANBUL UNIVERSITY, 70pp.
- Demir, S., Aliyazicioglu, Y., Turan, I., Misir, S., Mentese, A., Yaman, S. O., and Deger, O. (2016). Antiproliferative and proapoptotic activity of Turkish propolis on human lung cancer cell line. *Nutrition and cancer*, 68(1), 165-172.
- Demir, S., Aliyazicioglu, Y., Turan, I., Misir, S., Mentese, A., Yaman, S. O., and Deger, O. (2016). Antiproliferative and proapoptotic activity of Turkish propolis on human lung cancer cell line. *Nutrition and cancer*, 68(1), 165-172.

- Deng, W., Gu, L., Li, X., Zheng, J., Zhang, Y., Duan, B., and Du, J. (2016). CD24 associates with EGFR and supports EGF/EGFR signaling via RhoA in gastric cancer cells. *Journal of translational medicine*, *14*(1), 1-13.
- Deseva, I., Koleva, E., and Mihaylova, D. (2020). HPLC determination of twelve polyphenols: Application in wine analysis. *JHED*, *32*, 120-126.
- Detterbeck, F. C., Boffa, D. J., Kim, A. W., and Tanoue, L. T. (2017). The eighth edition lung cancer stage classification. *Chest*, *151*(1), 193-203.
- Devequi-Nunes, D., Machado, B. A. S., Barreto, G. D. A., Rebouças Silva, J., da Silva, D. F., da Rocha, J. L. C., and Umsza-Guez, M. A. (2018). Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. *PLoS One*, *13*(12), e0207676.
- Diaz-Carballo, D., Malak, S., Bardenheuer, W., Freistuehler, M., Reusch, H. P., Burstein, S., and Salmons, R. (2008). The contribution of plukenetione A to the anti-tumoral activity of Cuban propolis pp 9635–9643. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *16*(22), 9627-9634.
- Dodic Fikfak, M., Kriebel, D., Quinn, M. M., Eisen, E. A., and Wegman, D. H. (2007). A case control study of lung cancer and exposure to chrysotile and amphibole at a Slovenian asbestos-cement plant. *The Annals of Occupational Hygiene*, *51*(3), 261-268.
- Dogan, H., Silici, S., and Ozcimen, A. A. (2020). Biological effects of propolis on cancer. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, *8*(3), 573-579.
- Doll, R., Peto, R., Boreham, J., and Sutherland, I. (2005). Mortality from cancer in relation to smoking: 50 years' observations on British doctors. *British journal of cancer*, *92*(3), 426-429.

- Dos Santos, D. A., Munari, F. M., da Silva Frozza, C. O., Moura, S., Barcellos, T., Henriques, J. A. P., and Roesch-Ely, M. (2019). Brazilian red propolis extracts: study of chemical composition by ESI-MS/MS (ESI+) and cytotoxic profiles against colon cancer cell lines. *Biotechnology Research and Innovation*, 3(1), 120-130.
- Drake, R., Vogl, W., and Mitchell, A. (2014). *Gray's anatomy for students: With student consult online access*. (3ed.). Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier., pp: 167-174.
- Dundar, E., and Yildirim, H.K. Factors Affecting of Diversity of Propolis. *Arıcılık Araştırma Dergisi* 2018; 10:61-66.
- Elnakady, Y. A., Rushdi, A. I., Franke, R., Abutaha, N., Ebaid, H., Baabbad, M., and Al Ghamdi, A. A. (2017). Characteristics, chemical compositions and biological activities of propolis from Al-Bahah, Saudi Arabia. *Scientific Reports*, 7(1), 1-13.
- El-Seedi, H. R., Eid, N., Abd El-Wahed, A. A., Rateb, M. E., Afifi, H. S., Algethami, A. F., and Khalifa, S. A. (2022). Honey bee products: Preclinical and clinical studies of their anti-inflammatory and Immunomodulatory properties. *Frontiers in Nutrition*, 8, 761267.
- Elumalai, P., Muninathan, N., Megalatha, S. T., Suresh, A., Kumar, K. S., Jhansi, N., and Krishnamoorthy, G. (2022). An Insight into Anticancer Effect of Propolis and Its Constituents: A Review of Molecular Mechanisms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Volume 2022, Article ID 5901191, 14 pages.
- Eyvazi, S., Kazemi, B., Dastmalchi, S., and Bandehpour, M. (2018). Involvement of CD24 in multiple cancer related pathways makes it an interesting new target for cancer therapy. *Current cancer drug targets*, 18(4), 328-336.

- Falcao, S. I., Calhella, R. C., Touzani, S., Lyoussi, B., Ferreira, I. C., and Vilas-Boas, M. (2019). In vitro interactions of moroccan propolis phytochemicals on human tumor cell lines and anti-inflammatory properties. *Biomolecules*, 9(8), 315.
- Fang, X., Zheng, P., Tang, J., and Liu, Y. (2010). CD24: from A to Z. *Cellular & molecular immunology*, 7(2), 100-103.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., and Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International journal of cancer*, 144(8), 1941-1953.
- Forma, E., and Brys, M. (2021). Anticancer activity of propolis and its compounds. *Nutrients*, 13(8), 2594.
- Foster, K. A., Oster, C. G., Mayer, M. M., Avery, M. L., and Audus, K. L. (1998). Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Experimental cell research*, 243(2), 359-366.
- Freshney, R. I. (2015). Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications, John Wiley and Sons.
- Frion-Herrera, Y., Díaz-García, A., Ruiz-Fuentes, J., Rodríguez-Sánchez, H., and Mauricio Sforcin, J. (2018). Mechanisms underlying the cytotoxic effect of propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma cells. *Natural product research*, 32(17), 2085-2091.
- Frion-Herrera, Y., Díaz-García, A., Ruiz-Fuentes, J., Rodríguez-Sánchez, H., and Sforcin, J. M. (2019a). The cytotoxic effects of propolis on breast cancer cells involve PI3K/Akt and ERK1/2 pathways, mitochondrial membrane potential, and reactive oxygen species generation. *Inflammopharmacology*, 27, 1081-1089.

- Frion-Herrera, Y., Díaz-García, A., Ruiz-Fuentes, J., Rodríguez-Sánchez, H., and Sforcin, J. M. (2015). Brazilian green propolis induced apoptosis in human lung cancer A549 cells through mitochondrial-mediated pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(10), 1448-1456.
- Frion-Herrera, Y., Gabbia, D., Cuesta-Rubio, O., De Martin, S., and Carrara, M. (2019b). Nemorosone inhibits the proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells. *Life sciences*, 235, 116817.
- Funaki, S., Shintani, Y., Kawamura, T., Kanzaki, R., Minami, M., and Okumura, M. (2017). Chemotherapy enhances programmed cell death 1/ligand 1 expression via TGF- β induced epithelial mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *Oncology Reports*, 38(4), 2277-2284.
- Gajski, G., Čimborá-Zovko, T., Rak, S., Osmak, M., and Garaj-Vrhovac, V. (2016). Antitumour action on human glioblastoma A1235 cells through cooperation of bee venom and cisplatin. *Cytotechnology*, 68, 1197-1205.
- Gangadhar, T., Nandi, S., and Salgia, R. (2010). The role of chemokine receptor CXCR4 in lung cancer. *Cancer biology & therapy*, 9(6), 409-416.
- Garcia-Cuesta, E. M., Santiago, C. A., Vallejo-Díaz, J., Juarranz, Y., Rodríguez-Frade, J. M., and Mellado, M. (2019). The role of the CXCL12/CXCR4/ACKR3 axis in autoimmune diseases. *Frontiers in endocrinology*, 10, 585.
- Ghosh, S. (2019). Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic chemistry*, 88, 102925.
- GI, D., Chuwang, N. J., Essien, U. C., Choji, T. P. P., Echeonwu, B. C., and Lugos, M. D. (2019). Cytotoxicity analysis of etoposide and cisplatin on cell

- lines from human lung cancer and normal human lung, *Int. Res. J. Med. Med. Sci.*, 7(2), 40-47.
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., and Parks, W. P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1417-1423.
- Girgin, G., Baydar, T., Ledochowski, M., Schennach, H., Bolukbasi, D. N., Sorkun, K., and Fuchs, D. (2009). Immunomodulatory effects of Turkish propolis: changes in neopterin release and tryptophan degradation. *Immunobiology*, 214(2), 129-134.
- Goleniowski, M., Bonfill, M., Cusido, R., and Palazón, J. (2013). Natural Products. *no. January*.
- Gorlach, S., Fichna, J., and Lewandowska, U. (2015). Polyphenols as mitochondria-targeted anticancer drugs. *Cancer Letters*, 366(2), 141-149.
- Grande, F., Occhiuzzi, M. A., Rizzuti, B., Ioele, G., De Luca, M., Tucci, P., and Garofalo, A. (2019). CCR5/CXCR4 dual antagonism for the improvement of HIV infection therapy. *Molecules*, 24(3), 550.
- Guo, Q., Liu, L., Chen, Z., Fan, Y., Zhou, Y., Yuan, Z., and Zhang, W. (2022). Current treatments for non-small cell lung cancer. *Frontiers in Oncology*, 12.
- Hamd, M. H. A. (2022). An in vitro Study to Evaluate the effect of Propolis Extract on Normal and Cancer Cells. Thesis, University of Babylon, College of Medicine, Department of Pharmacology.
- Han, J., Fujisawa, T., Husain, S. R., and Puri, R. K. (2014). Identification and characterization of cancer stem cells in human head and neck squamous cell carcinoma. *BMC cancer*, 14(1), 1-11.

- He, Y., Zhu, Q., Chen, M., Huang, Q., Wang, W., Li, Q., and Di, W. (2016). The changing 50% inhibitory concentration (IC50) of cisplatin: a pilot study on the artifacts of the MTT assay and the precise measurement of density-dependent chemoresistance in ovarian cancer. *Oncotarget*, 7(43), 70803.
- Hecht, S. S. (2012). Lung carcinogenesis by tobacco smoke. *International journal of cancer*, 131(12), 2724-2732.
- Hehlgans, S., Lange, I., Eke, I., Kammerer, B., and Cordes, N. (2011). Human head and neck squamous cell carcinoma cell lines are differentially radiosensitised by the honeybee product Propolis. *International Journal of Radiation Biology*, 87(3), 243-253.
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R., and Ferreira, I. C. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food chemistry*, 173, 501-513.
- Hermansyah, D., Zuhendri, F., Perera, C. O., Firsty, N. N., Chandrasekaran, K., Abdullah, R., and Lesmana, R. (2022). The Potential Use of Propolis as an Adjunctive Therapy in Breast Cancers. *Integrative Cancer Therapies*, 21, 15347354221096868.
- Hernandez-Rodríguez, P., Baquero, L. P., and Larrota, H. R. (2019). Flavonoids: potential therapeutic agents by their antioxidant capacity. In *Bioactive compounds* (pp. 265-288). Woodhead Publishing.
- Hindi, N.K.K., Al-charrakh, A.H., Naher, H.S. and Abbas, A.S. (2015). STUDY OF CHEMICAL ANALYSIS OF IRAQI PROPOLIS AND ACTIVE COMPONENT OF PROPLIS, IRAQ. *Journal of Science*, 5(11), 1095-1103.

- Hmmier, A. (2018). *Identification of Lung Carcinoma Biomarkers Associated with Tumour Development and Drug Resistance* (Doctoral dissertation, National University of Ireland, Maynooth (Ireland)).
- Hummel, S., Van Aken, H., and Zarbock, A. (2014). Inhibitors of CXC chemokine receptor type 4: putative therapeutic approaches in inflammatory diseases. *Current opinion in hematology*, 21(1), 29-36.
- Inamura, K., Yokouchi, Y., Sakakibara, R., Kobayashi, M., Subat, S., Ninomiya, H., and Ishikawa, Y. (2016). Relationship of tumor PD-L1 expression with EGFR wild-type status and poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 46(10), 935-941.
- Ipek, N., Pinarbasi, B., and GUNES BAYIR, A. Y. Ş. E. (2022). The Place and Importance of Propolis in Cancer Immunotherapy. *Bezmialem Science*, 10(1): :123-30.
- Iqbal, M., Fan, T. P., Watson, D., Alenezi, S., Saleh, K., and Sahlan, M. (2019). Preliminary studies: the potential anti-angiogenic activities of two Sulawesi Island (Indonesia) propolis and their chemical characterization. *Heliyon*, 5(7), e01978.
- Irwin, M. R., and Miller, A. H. (2007). Depressive disorders and immunity: 20 years of progress and discovery. *Brain, behavior, and immunity*, 21(4), 374-383.
- Ito, S., Okano, S., Morita, M., Saeki, H., Tsutsumi, S., Tsukihara, H., and Maehara, Y. (2016). Expression of PD-L1 and HLA class I in esophageal squamous cell carcinoma: prognostic factors for patient outcome. *Annals of surgical oncology*, 23, 508-515.

- Jia, Y., Li, F., Liu, Y. F., Zhao, J. P., Leng, M. M., and Chen, L. (2017). Depression and cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Public Health, 149*, 138-148.
- Jiang, X. S., Xie, H. Q., Li, C. G., You, M. M., Zheng, Y. F., Li, G. Q., and Hu, F. L. (2020). Chinese propolis inhibits the proliferation of human gastric cancer cells by inducing apoptosis and cell cycle arrest. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2020*.
- Josipovic, P., and Orsolich, N. (2008). Cytotoxicity of polyphenolic/flavonoid compounds in a leukemia cell culture. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 59*(4), 299-308.
- Kabata-Dzik, A., Rzepecka-Stojko, A., Kubina, R., Jastrzębska-Stojko, Ż., Stojko, R., Wojtyczka, R. D., and Stojko, J. (2017). Comparison of two components of propolis: caffeic acid (CA) and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) induce apoptosis and cell cycle arrest of breast cancer cells MDA-MB-231. *Molecules, 22*(9), 1554.
- Kajiyama, H., Shibata, K., Terauchi, M., Ino, K., Nawa, A., and Kikkawa, F. (2008). Involvement of SDF-1 α /CXCR4 axis in the enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma. *International journal of cancer, 122*(1), 91-99.
- Kale, P., and Yadav, S. K. (2020). PREDICTION OF LUNG CANCER STAGE WITH ADVANCED TECHNOLOGIES: A COMPARATIVE REVIEW. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine, 7*(10):3599-3605.
- Kamiya, T., Nishihara, H., Hara, H., and Adachi, T. (2012). Ethanol extract of Brazilian red propolis induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through endoplasmic reticulum stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60*(44), 11065-11070.

- Karimi-Busheri, F., Rasouli-Nia, A., Zadorozhny, V., and Fakhrai, H. (2013). CD24+/CD38-as new prognostic marker for non-small cell lung cancer. *Multidisciplinary respiratory medicine*, 8, 1-9.
- Karuppagounder, V., Arumugam, S., Thandavarayan, R. A., Pitchaimani, V., Sreedhar, R., Afrin, R., and Watanabe, K. (2015). Naringenin ameliorates daunorubicin induced nephrotoxicity by mitigating AT1R, ERK1/2-NFκB p65 mediated inflammation. *International immunopharmacology*, 28(1), 154-159.
- Kasote, D., Bankova, V., and Viljoen, A. M. (2022). Propolis: chemical diversity and challenges in quality control. *Phytochemistry Reviews*, 1-25.
- Katabalo, D. M., Matinde, R., Mwita, S., Marwa, K., and Masalu, N. (2018). Awareness of chemotherapy side effects and attitude towards chemotherapy use among cancer patients attending oncology clinic at Bugando Medical Centre, in Mwanza, Northern Tanzania. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 8(5), 448-454.
- Katuri, K. K., Dasari, A. B., Kurapati, S., Vinnakota, N. R., Bollepalli, A. C., and Dhulipalla, R. (2016). Association of yoga practice and serum cortisol levels in chronic periodontitis patients with stress-related anxiety and depression. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*, 6(1), 7-14.
- Kenfield, S. A., Wei, E. K., Rosner, B. A., Glynn, R. J., Stampfer, M. J., and Colditz, G. A. (2010). Burden of smoking on cause-specific mortality: application to the Nurses' Health Study. *Tobacco control*, 19(3), 248-254.
- Khacha-Ananda, S., Tragoolpua, K., Chantawannakul, P., and Tragoolpua, Y. (2016). Propolis extracts from the northern region of Thailand suppress

- cancer cell growth through induction of apoptosis pathways. *Investigational New Drugs*, 34(6), 707-722.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., and Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2), 2328-2375.
- Kim, C. H., Lee, Y. C. A., Hung, R. J., McNallan, S. R., Cote, M. L., Lim, W. Y., and Zhang, Z. F. (2014). Exposure to secondhand tobacco smoke and lung cancer by histological type: a pooled analysis of the International Lung Cancer Consortium (ILCCO). *International journal of cancer*, 135(8), 1918-1930.
- Kim, J. H., Kismali, G., and Gupta, S. C. (2018). Natural products for the prevention and treatment of chronic inflammatory diseases: integrating traditional medicine into modern chronic diseases care. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018.
- King, D. I. (2017). *Kangaroo Island Propolis: Improved Characterisation and Assessment of Chemistry and Botanical Origins through Metabolomics* (Doctoral dissertation).
- Kocot, J., Kielczykowska, M., Luchowska-Kocot, D., Kurzepa, J., and Musik, I. (2018). Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: possible medical application. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 7074209.
- Koosha, S., Alshawsh, M. A., Looi, C. Y., Seyedan, A., and Mohamed, Z. (2016). An association map on the effect of flavonoids on the signaling pathways in colorectal cancer. *International journal of medical sciences*, 13(5), 374-385.
- Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A., and Bernatoniene, J. (2020). Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*, 12(2), 457.

- Koyunoglu, C. (2018). Cancer Cell Growth-A Mini Review Part-1: Proliferation, Nutrient, Warburg Effect. *Biochem. Anal. Biochem.*, 7.
- Kubina, R., Kabała-Dzik, A., Dziedzic, A., Bielec, B., Wojtyczka, R. D., Bułdak, R. J., and Szaflarska-Stojko, E. (2015). The ethanol extract of polish propolis exhibits anti-proliferative and/or pro-apoptotic effect on HCT 116 colon cancer and Me45 Malignant melanoma cells in vitro conditions. *Advances in clinical and experimental medicine*, 24(2), 203-212.
- KULAKSIZ, B. D., İmamoğlu, M., Değer, O., ÇAKIROĞLU, K. A., Demir, S. E. L. İ. M., and Sönmez, M. (2022). Cytotoxic effects of water and ethanolic extracts of Turkish propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma cell lines. *Food and Health*, 8(3), 218-228.
- Kumar, S., and Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The scientific world journal*, 2013.
- Kuropatnicki, A. K., Szliszka, E., Kłósek, M., and Król, W. (2013). The beginnings of modern research on propolis in Poland. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Lee, S. M., Lee, C. T., Kim, Y. W., Han, S. K., Shim, Y. S., and Yoo, C. G. (2006). Hypoxia confers protection against apoptosis via PI3K/Akt and ERK pathways in lung cancer cells. *Cancer letters*, 242(2), 231-238.
- Lee, Y. J., Kuo, H. C., Chu, C. Y., Wang, C. J., Lin, W. C., and Tseng, T. H. (2003). Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells. *Biochemical pharmacology*, 66(12), 2281-2289.
- Lee, Y. T., Don, M. J., Hung, P. S., Shen, Y. C., Lo, Y. S., Chang, K. W., and Ho, L. K. (2005). Cytotoxicity of phenolic acid phenethyl esters on oral cancer cells. *Cancer letters*, 223(1), 19-25.

- Lewis, D. R., Check, D. P., Caporaso, N. E., Travis, W. D., and Devesa, S. S. (2014). US lung cancer trends by histologic type. *Cancer*, *120*(18), 2883-2892.
- Li, F., Awale, S., Tezuka, Y., and Kadota, S. (2008). Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *16*(10), 5434-5440.
- Li, F., Awale, S., Tezuka, Y., and Kadota, S. (2010). Cytotoxicity of constituents from Mexican propolis against a panel of six different cancer cell lines. *Natural product communications*, *5*(10), 1934578X1000501018.
- Li, J., Jiang, K., Qiu, X., Li, M., Hao, Q., Wei, L., and Xin, X. (2014). Overexpression of CXCR4 is significantly associated with cisplatin-based chemotherapy resistance and can be a prognostic factor in epithelial ovarian cancer. *BMB reports*, *47*(1), 33-38.
- Li, L., Tian, T., and Zhang, X. (2017). The impact of radiation on the development of lung cancer. *Journal of Theoretical Biology*, *428*, 147-152.
- Lin, Y. M., Chen, C. I., Hsiang, Y. P., Hsu, Y. C., Cheng, K. C., Chien, P. H., and Chen, Y. J. (2018). Chrysin attenuates cell viability of human colorectal cancer cells through autophagy induction unlike 5-fluorouracil/oxaliplatin. *International journal of molecular sciences*, *19*(6), 1763.
- Lofling, L. (2020). *Lung cancer in Sweden: incidence, diagnosis and survival* (Doctoral dissertation, Karolinska Institutet (Sweden)).
- Lovgren, M., Leveälähti, H., Tishelman, C., Runesdotter, S., Hamberg, K., and Koyi, H. (2008). Time spans from first symptom to treatment in patients with lung cancer—the influence of symptoms and demographic characteristics. *Acta oncologica*, *47*(3), 397-405.

- Lu, S., Yao, Y., Xu, G., Zhou, C., Zhang, Y., Sun, J., and Chen, Y. (2018). CD24 regulates sorafenib resistance via activating autophagy in hepatocellular carcinoma. *Cell death & disease*, 9(6), 646.
- Magnavacca, A., Sangiovanni, E., Racagni, G., and Dell'Agli, M. (2022). The antiviral and Immunomodulatory activities of propolis: An update and future perspectives for respiratory diseases. *Medicinal Research Reviews*, 42(2), 897-945.
- Majores, M., Schindler, A., Fuchs, A., Stein, J., Heukamp, L., Altevogt, P., and Kristiansen, G. (2015). Membranous CD24 expression as detected by the monoclonal antibody SWA11 is a prognostic marker in non-small cell lung cancer patients. *BMC Clinical Pathology*, 15, 1-8.
- Marcucci, M. C., Ferreres, F., Garcia-Viguera, C., Bankova, V. S., De Castro, S. L., Dantas, A. P., and Paulino, N. (2001). Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of ethnopharmacology*, 74(2), 105-112.
- Markiewicz-Żukowska, R., Car, H., Naliwajko, S. K., Sawicka, D., Szynaka, B., Chyczewski, L., and Borawska, M. H. (2012). Ethanolic extract of propolis, chrysin, CAPE inhibit human astroglia cells. *Advances in Medical Sciences*, 57(2), 208-216.
- Martinotti, S., and Ranzato, E. (2015). Propolis: a new frontier for wound healing? *Burns & trauma*, 3(1), 1-7.
- Mattson, M. E., Pollack, E. S., and Cullen, J. W. (1987). What are the odds that smoking will kill you? *American journal of public health*, 77(4), 425-431.
- Meerlo, J. V., Kaspers, G. J., and Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. In *Cancer cell culture* (pp. 237-245). Humana Press.

- Meleady, P., and Connor, R. O. (2006). General Procedures for Cell Culture. In CELL AND TISSUE CULTURE: ASSORTED TECHNIQUES (3rd ed., pp. 13–20).
- Mello, B. C., Petrus, J. C. C., and Hubinger, M. D. (2010). Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. *Journal of Food Engineering*, 96(4), 533-539.
- Mishra, S., Tiwari, V., Arora, A., Gupta, S., Anand, N., and Husain, N. (2020). Increased expression of Oct4, Nanog and CD24 predicts poor response to chemo-radiotherapy and Unfavourable prognosis in locally advanced Oral squamous cell carcinoma. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 21(9), 2539.
- Misir, S., Aliyazicioglu, Y., Demir, S., Turan, I., and Hepokur, C. (2020). Effect of Turkish propolis on miRNA expression, cell cycle, and apoptosis in human breast cancer (MCF-7) cells. *Nutrition and cancer*, 72(1), 133-145.
- Miyazawa, T., Marushima, H., Saji, H., Kojima, K., Hoshikawa, M., Takagi, M., and Nakamura, H. (2019). PD-L1 expression in non-small-cell lung cancer including various adenocarcinoma subtypes. *Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 25(1), 1-9.
- Modur, V., Joshi, P., Nie, D., Robbins, K. T., Khan, A. U., and Rao, K. (2016). CD24 expression may play a role as a predictive indicator and a modulator of cisplatin treatment response in head and neck squamous cellular carcinoma. *PLoS One*, 11(6), e0156651.
- Mohammed, M.S., Al-Tae, M. F., and Al-Shammari, A. (2019). Caspase dependent and independent anti-hematological malignancy activity of AMHA1

- attenuated newcastle disease virus. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine (IJMCM)*, 8(3), 211-222.
- Morovati, A., Ahmadian, S., and Jafary, H. (2019). Cytotoxic effects and apoptosis induction of cisplatin-loaded iron oxide nanoparticles modified with chitosan in human breast cancer cells. *Molecular biology reports*, 46(5), 5033-5039.
- Mot, A. C., Silaghi-Dumitrescu, R., and Sârbu, C. (2011). Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV-vis spectroscopic data. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(4-5), 516-522.
- Mouhoubi-Tafinine, Z., Ouchemoukh, S., and Tamendjari, A. (2016). Antioxydant activity of some algerian honey and propolis. *Industrial Crops and Products*, 88, 85-90.
- Murakami, T., Kawada, K., Iwamoto, M., Akagami, M., Hida, K., Nakanishi, Y., and Sakai, Y. (2013). The role of CXCR3 and CXCR4 in colorectal cancer metastasis. *International journal of cancer*, 132(2), 276-287.
- Murtaza, G., Sajjad, A., Mehmood, Z., Shah, S. H., and Siddiqi, A. R. (2015). Possible molecular targets for therapeutic applications of caffeic acid phenethyl ester in inflammation and cancer. *journal of food and drug analysis*, 23(1), 11-18.
- Naji, T. F., and Hassoon, S. O. (2021). Measuring of Radon Gas Concentrations in serum samples of Lung cancer patients in Babylon governorate, Iraq. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1999, No. 1, p. 012054). IOP Publishing.
- Nakamura, T., Shinriki, S., Jono, H., Guo, J., Ueda, M., Hayashi, M., and Ando, Y. (2015). Intrinsic TGF- β 2-triggered SDF-1-CXCR4 signaling axis is

- crucial for drug resistance and a slow-cycling state in bone marrow-disseminated tumor cells. *Oncotarget*, 6(2), 1008.
- Nasiri, M., Farhangi, H., Badiee, Z., Ghasemi, A., Golsorkhi, M., Ravanshad, Y., and Azarfar, A. (2020). The effect of vitamin E on cisplatin induced nephrotoxicity: a clinical trial study. *Int J Pediatr*, 8(1), 10767-773.
- Nasr, F., Al Ghoche, A., Diab, S., Hallit, S., and Riachi, M. (2019). Altered PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer Patient After Induction Chemotherapy: A Case Report. *Journal of Medical Cases*, 10(2), 62-65.
- Ng, H. Y., Li, J., Tao, L., Lam, A. K. Y., Chan, K. W., Ko, J. M. Y., ... & Lung, M. L. (2018). Chemotherapeutic treatments increase PD-L1 expression in esophageal squamous cell carcinoma through EGFR/ERK activation. *Translational oncology*, 11(6), 1323-1333.
- Ni, Y. H., Zhao, X., and Wang, W. (2020). CD24, a review of its role in tumor diagnosis, progression and therapy. *Current Gene Therapy*, 20(2), 109-126.
- Nikzaban, M., Hakhamaneshi, M. S., Fakhari, S., Sheikhesmaili, F., Roshani, D., Ahsan, B., and Jalili, A. (2014). The chemokine receptor CXCR4 is associated with the staging of gastric cancer. *Advanced Biomedical Research*, 3.
- Nooreldeen, R., and Bach, H. (2021). Current and future development in lung cancer diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8661.
- Nor, F., Nör, C., Bento, L. W., Zhang, Z., Bretz, W. A., and Nör, J. E. (2021). Propolis reduces the stemness of head and neck squamous cell carcinoma. *Archives of oral biology*, 125, 105087.

- Nyman, G., Wagner, S. O., Prystupa-Chalkidis, K., Ryberg, K., and Hagvall, L. (2020). Contact allergy in western Sweden to propolis of four different origins. *Acta Dermato-Venereologica*, 100(16), 1-5.
- Obied, H. N., Enayah, S. H., Ghaleb, R. A., and Obaid, R. F. (2018). The Synergistic Effect of Cisplatin and Interferon β on Human Lung Adenocarcinoma Cell Line (A549). *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(8), 1939-1942.
- Ock, C. Y., Kim, S., Keam, B., Kim, S., Ahn, Y. O., Chung, E. J., and Heo, D. S. (2017). Changes in programmed death-ligand 1 expression during cisplatin treatment in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 8(58), 97920.
- Oddone, E., Ferrante, D., Cena, T., Tunesi, S., Amendola, P., and Magnani, C. (2014). Asbestos cement factory in Broni (Pavia, Italy): a mortality study. *La Medicina del Lavoro*, 105(1), 15-29.
- Okabe, H., Aoki, K., Yogosawa, S., Saito, M., Marumo, K., and Yoshida, K. (2018). Downregulation of CD 24 suppresses bone metastasis of lung cancer. *Cancer science*, 109(1), 112-120.
- Okuyama Kishima, M., Oliveira, C. E. C. D., Banin-Hirata, B. K., Losi-Guembarovski, R., Brajão de Oliveira, K., Amarante, M. K., and Watanabe, M. A. E. (2015). Immunohistochemical expression of CXCR4 on breast cancer and its clinical significance. *Analytical Cellular Pathology*, 2015.
- Omar, M. H., Shair, S. N., and Asmuni, N. H. (2020). Lung cancer transition rate by stages using discrete time markov model. *Indonesian J Elec Eng & Comp Sci*, 18 (3): 1295 – 1302.
- Omene, C., Kalac, M., Wu, J., Marchi, E., Frenkel, K., and O'Connor, O. A. (2013). Propolis and its active component, caffeic acid phenethyl ester (CAPE),

- modulate breast cancer therapeutic targets via an epigenetically mediated mechanism of action. *Journal of cancer science & therapy*, 5(10), 334-342.
- Orsolich, N., Car, N., Lisicic, D., Benkovic, V., Knezevic, A. H., Dikic, D., and Petrik, J. (2013). Synergism between propolis and hyperthermal intraperitoneal chemotherapy with cisplatin on Ehrlich ascites tumor in mice. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102(12), 4395-4405.
- Orsolich, N., Šaranović, A. B., and Bašić, I. (2006). Direct and indirect mechanism (s) of antitumour activity of propolis and its polyphenolic compounds. *Planta medica*, 72(01), 20-27.
- Orsolich, N., Šver, L., Terzić, S., and Bašić, I. (2005). Peroral application of water-soluble derivative of propolis (WSDP) and its related polyphenolic compounds and their influence on immunological and antitumour activity. *Veterinary research communications*, 29(7), 575-593.
- Ozidal, T., Sari-Kaplan, G., Mutlu-Altundag, E., Boyacioglu, D., and Capanoglu, E. (2018). Evaluation of Turkish propolis for its chemical composition, antioxidant capacity, anti-proliferative effect on several human breast cancer cell lines and proliferative effect on fibroblasts and mouse mesenchymal stem cell line. *Journal of Apicultural Research*, 57(5), 627-638.
- Panagiotou, E., Syrigos, N. K., Charpidou, A., Kotteas, E., and Vathiotis, I. A. (2022). CD24: A novel target for cancer immunotherapy. *Journal of Personalized Medicine*, 12(8), 1235.
- Pandi, A., Mamo, G., Getachew, D., Lemessa, F., Kalappan, V. M., and Dhiravidamani, S. (2016). A brief review on lung cancer. *Int. J. Pharma Res. Health Sci*, 4, 907-914.

- Paoletti, C., Miao, J., Dolce, E. M., Darga, E. P., Repollet, M. I., Doyle, G. V., and Hayes, D. F. (2019). Circulating tumor cell clusters in patients with metastatic breast cancer: a SWOG S0500 translational medicine study. *Clinical Cancer Research*, 25(20), 6089-6097.
- Parajuli, P., Joshee, N., Rimando, A. M., Mittal, S., and Yadav, A. K. (2009). In vitro antitumor mechanisms of various *Scutellaria* extracts and constituent flavonoids. *Planta medica*, 75(01), 41-48.
- Park, I. K., Morrison, S. J., and Clarke, M. F. (2004). Bmi1, stem cells, and senescence regulation. *The Journal of clinical investigation*, 113(2), 175-179.
- Perez-Vizcaino, F., and Fraga, C. G. (2018). Research trends in flavonoids and health. *Archives of biochemistry and biophysics*, 646, 107-112.
- Phelan, K., and May, K. M. (2017). Mammalian cell tissue culture. *Current protocols in human genetics*, 94(1), A-3G.
- Piredda, M., Facchinetti, G., Biagioli, V., Giannarelli, D., Armento, G., Tonini, G., and De Marinis, M. G. (2017). Propolis in the prevention of oral mucositis in breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy: A pilot randomised controlled trial. *European journal of cancer care*, 26(6), e12757.
- Pirie, K., Peto, R., Reeves, G. K., Green, J., Beral, V., and Million Women Study Collaborators. (2013). The 21st century hazards of smoking and benefits of stopping: a prospective study of one million women in the UK. *The Lancet*, 381(9861), 133-141.
- Pobiega, K., Kraśniewska, K., and Gniewosz, M. (2019). Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality—A review. *Trends in food science & technology*, 83, 53-62.

- Popova, M., Silici, S. Ī. B. E. L., Kaftanoglu, O., and Bankova, V. (2005). Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine*, 12(3), 221-228.
- Poulikakos, P. I., and Solit, D. B. (2011). Resistance to MEK inhibitors: should we co-target upstream? *Science signaling*, 4(166), pe16-pe16.
- Przybyłek, I., and Karpinski, T. M. (2019). Antibacterial properties of propolis. *Molecules*, 24(11), 2047.
- Puengsurin, D., Buranapraditkun, S., Leewansangtong, C., Taechaaukarakul, N., Songsivilai, P., Surarit, R., and Kitkumthorn, N. (2022). Effects of Chrysin on Oral Squamous Cell Carcinoma In Vitro. *European Journal of Dentistry*.
- Radovanovic, B., Mladenovic, J., Radovanovic, A., Pavlovic, R., and Nikolic, V. (2015). Phenolic composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of *Allium porrum* L.(Serbia) extracts. *Journal of Food and Nutrition Research*, 3(9), 564-569.
- Rayan, A., Raiyn, J., and Falah, M. (2017). Nature is the best source of anticancer drugs: Indexing natural products for their anticancer bioactivity. *PloS one*, 12(11), e0187925.
- Reis, J. H. D. O., Barreto, G. D. A., Cerqueira, J. C., Anjos, J. P. D., Andrade, L. N., Padilha, F. F., and Machado, B. A. S. (2019). Evaluation of the antioxidant profile and cytotoxic activity of red propolis extracts from different regions of northeastern Brazil obtained by conventional and ultrasound-assisted extraction. *PloS one*, 14(7), e0219063.
- Ren, X., Liu, J., Hu, L., Liu, Q., Wang, D., and Ning, X. (2019). Caffeic acid phenethyl ester inhibits the proliferation of HEP2 cells by regulating Stat3/Plk1 pathway and inducing S phase arrest. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 42(10), 1689-1693.

- Riddell, I. A., and Lippard, S. J. (2018). Cisplatin and oxaliplatin: our current understanding of their actions. *Met. Ions Life Sci*, 18, 1-42.
- Ristivojevic, P., Trifkovic, J., Andric, F., and Milojkovic-Opsenica, D. (2015). Poplar-type propolis: Chemical composition, botanical origin and biological activity. *Natural product communications*, 10(11), 1934578X1501001117.
- Rivera-Yanez, N., Ruiz-Hurtado, P. A., Rivera-Yañez, C. R., Arciniega-Martínez, I. M., Yopez-Ortega, M., Mendoza-Arroyo, B., and Nieto-Yañez, O. (2023). The Role of Propolis as a Natural Product with Potential Gastric Cancer Treatment Properties: A Systematic Review. *Foods*, 12(2), 415.
- Rivero-Cruz, J. F., Granados-Pineda, J., Pedraza-Chaverri, J., Pérez-Rojas, J. M., Kumar-Passari, A., Diaz-Ruiz, G., and Rivero-Cruz, B. E. (2020). Phytochemical constituents, antioxidant, cytotoxic, and antimicrobial activities of the ethanolic extract of Mexican brown propolis. *Antioxidants*, 9(1), 70.
- Robert, C., Schachter, J., Long, G. V., Arance, A., Grob, J. J., Mortier, L., and Ribas, A. (2015). Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma. *New England Journal of Medicine*, 372(26), 2521-2532.
- Rodríguez-García, C., Sánchez-Quesada, C., and Gaforio, J. J. (2019). Dietary flavonoids as cancer chemopreventive agents: An updated review of human studies. *Antioxidants*, 8(5), 137.
- Rodriguez-Lara, V., Ignacio, G. S., and Cerbón Cervantes, M. A. (2017). Estrogen induces CXCR4 overexpression and CXCR4/CXL12 pathway activation in lung adenocarcinoma cells in vitro. *Endocrine Research*, 42(3), 219-231.

- Rojczyk, E., Klama-Baryła, A., Łabuś, W., Wilemska-Kucharzewska, K., and Kucharzewski, M. (2020). Historical and modern research on propolis and its application in wound healing and other fields of medicine and contributions by Polish studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 262, 113159.
- Roldan-Fidalgo, A., Saldaña, S. M., Trinidad, A., Olmedilla-Alonso, B., Rodríguez-Valiente, A., García-Berrocal, J. R., and Ramírez-Camacho, R. (2016). In vitro and in vivo effects of lutein against cisplatin-induced ototoxicity. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 68(4), 197-204.
- Rossini, E., Bosatta, V., Abate, A., Fragni, M., Salvi, V., Basnet, R. M., and Sigala, S. (2021). Cisplatin cytotoxicity in human testicular germ cell tumor cell lines is enhanced by the CDK4/6 inhibitor palbociclib. *Clinical Genitourinary Cancer*, 19(4), 316-324.
- Rzepecka-Stojko, A., Kabała-Dzik, A., Moździerz, A., Kubina, R., Wojtyczka, R. D., Stojko, R., and Stojko, J. (2015). Caffeic acid phenethyl ester and ethanol extract of propolis induce the complementary cytotoxic effect on triple-negative breast cancer cell lines. *Molecules*, 20(5), 9242-9262.
- Sabir, S.H. (2020). Assessment of Regulatory T Cells in Chronic Myeloid Leukemia Patients on Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy. Doctoral thesis, University of Baghdad, College of Medicine: 157 pp.
- Saini, A., Kumar, M., Bhatt, S., Saini, V., and Malik, A. (2020). Cancer causes and treatments. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 11, 3109.
- Salem, M. M., Donia, T., Abu-Khudir, R., Ramadan, H., Ali, E. M., and Mohamed, T. M. (2020). Propolis potentiates methotrexate anticancer mechanism and reduces its toxic effects. *Nutrition and cancer*, 72(3), 460-480.

- Samarghandian, S., Afshari, J. T., and Davoodi, S. (2011). Chrysin reduces proliferation and induces apoptosis in the human prostate cancer cell line pc-3. *Clinics*, 66(6), 1073-1079.
- Samarghandian, S., Azimi-Nezhad, M., Borji, A., Hasanzadeh, M., Jabbari, F., Farkhondeh, T., and Samini, M. (2016). Inhibitory and cytotoxic activities of chrysin on human breast adenocarcinoma cells by induction of apoptosis. *Pharmacognosy magazine*, 12(Suppl 4), S436.
- Sameni, H. R., Yosefi, S., Alipour, M., Pakdel, A., Torabizadeh, N., Semnani, V., and Bandegi, A. R. (2021). Co-administration of 5FU and propolis on AOM/DSS induced colorectal cancer in BALB-c mice. *Life sciences*, 276, 119390.
- Sanden, E., Dyberg, C., Krona, C., Visse, E., Carén, H., Northcott, P. A., and Darabi, A. (2015). Aberrant immunostaining pattern of the CD24 glycoprotein in clinical samples and experimental models of pediatric medulloblastomas. *Journal of neuro-oncology*, 123, 1-13.
- Sandhar, H. K., Kumar, B., Prasher, S., Tiwari, P., Salhan, M., and Sharma, P. (2011). A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Internationale pharmaceutica sciencia*, 1(1), 25-41.
- Santos, L. M., Fonseca, M. S., Sokolonski, A. R., Deegan, K. R., Araújo, R. P., Umsza-Guez, M. A., and Machado, B. A. (2020). Propolis: Types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(4), 1369-1382.
- Sawicka, D., Car, H., Borawska, M. H., and Nikliński, J. (2012). The anticancer activity of propolis. *Folia histochemica et cytobiologica*, 50(1), 25-37.
- Schulz, D., Wetzel, M., Eichberger, J., Piendl, G., Brockhoff, G., Wege, A. K., and Bauer, R. J. (2021). Differential Expression of PD-L1 during Cell Cycle

- Progression of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 13087.
- Scobie, H. (2021). *Understanding lung cancer screening participation*. Doctoral dissertation, University of Glasgow: 328 pp.
- Sedra, S. S. M. (2019). *Physiological Studies of Honeybee Product (Propolis) on Immunity and Some Haematological Parameters in Male Rats*, M.Sc. thesis, Faculty of Veterinary Medicine Cairo University: 112 pp.
- Sepulveda, C., Núñez, O., Torres, A., Guzmán, L., and Wehinger, S. (2020). Antitumor activity of propolis: recent advances in cellular perspectives, animal models and possible applications. *Food Reviews International*, 36(5), 429-455.
- Sethi, T. K., El-Ghamry, M. N., and Kloecker, G. H. (2012). Radon and lung cancer. *Clin Adv Hematol Oncol*, 10(3), 157-164.
- Seyhan, M. F., Yılmaz, E., Timirci-Kahraman, Ö., Saygılı, N., Kısakesen, H. İ., Gazioğlu, S., and Öztürk, O. (2019). Different propolis samples, phenolic content, and breast cancer cell lines: Variable cytotoxicity ranging from ineffective to potent. *IUBMB life*, 71(5), 619-631.
- Sforcin, J. M. (2007). Propolis and the immune system: a review. *Journal of ethnopharmacology*, 113(1), 1-14.
- Sforcin, J. M. (2016). Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytotherapy research*, 30(6), 894-905.
- Sha, N., Guan, S. H., Lu, Z. Q., Chen, G. T., Huang, H. L., Xie, F. B., and Guo, D. A. (2009). Cytotoxic constituents of Chinese propolis. *Journal of Natural products*, 72(4), 799-801.
- Sha'Shonda, L. R., and Lee, J. M. (2018). Anti-angiogenic therapy in nonsquamous non-small cell lung cancer (NSCLC) with tyrosine kinase inhibition

- (TKI) that targets the VEGF receptor (VEGFR): perspective on phase III clinical trials. *Journal of Thoracic Disease*, 10(2), 61720.
- Shahbaz, M., Zahoor, T., Arshad, R., Rafiq, S., Qaisrani, T. B., Liaqat, A., and Umer, M. (2021). Chemical profiling, HPLC characterization and in-vitro antioxidant potential of Pakistani propolis collected from peripheral region of Faisalabad, *Cell Mol Bio*, 67 (1): 40 – 44.
- Shahinozzaman, M., Obanda, D. N., and Tawata, S. (2021). Chemical composition and pharmacological properties of Macaranga-type Pacific propolis: a review. *Phytotherapy Research*, 35(1), 207-222.
- Shapira, S., Kazanov, D., Weisblatt, S., Starr, A., Arber, N., and Kraus, S. (2011). The CD24 protein inducible expression system is an ideal tool to explore the potential of CD24 as an oncogene and a target for immunotherapy in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 286(47), 40548-40555.
- Shi, Y., Zhu, J., Liu, J. Q., Talebian, F., Li, M., and Bai, X. F. (2022). CD24 is expressed on FoxP3+ regulatory T cells and regulates their function. *American Journal of Translational Research*, 14(4), 2291.
- Shruthi, E. and Suma, B.S. (2012). Health from the hive: Potential uses of propolis in general health. *International Journal of Clinical Medicine.*, 3:159-162.
- Siddik, Z. H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22(47), 7265-7279.
- Sison, E. A. R., Magoon, D., Li, L., Annesley, C. E., Rau, R. E., Small, D., and Brown, P. (2014). Plerixafor as a chemosensitizing agent in pediatric acute lymphoblastic leukemia: efficacy and potential mechanisms of resistance to CXCR4 inhibition. *Oncotarget*, 5(19), 8947-8958.

- So, F. V., Guthrie, N., Chambers, A. F., Moussa, M., and Carroll, K. K. (1996). Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices.
- Soave, D. F., Oliveira da Costa, J. P., da Silveira, G. G., Ianez, R. C. F., de Oliveira, L. R., Lourenço, S. V., and Ribeiro-Silva, A. (2013). CD44/CD24 immunophenotypes on clinicopathologic features of salivary glands malignant neoplasms. *Diagnostic pathology*, 8, 1-11.
- Socinski, M. A., Evans, T., Gettinger, S., Hensing, T. A., Sequist, L. V., Ireland, B., and Stinchcombe, T. E. (2013). Treatment of stage IV non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, 143(5), e341S-e368S.
- Soltani, E. K., Cerezuela, R., Charef, N., Mezaache-Aichour, S., Esteban, M. A., and Zerroug, M. M. (2017). Algerian propolis extracts: Chemical composition, bactericidal activity and in vitro effects on gilthead seabream innate immune responses. *Fish & shellfish immunology*, 62, 57-67.
- Soltaninejad, V., Kazemipour, N., Yaghoobi, M. M., and Pardakhty, A. (2020). Ethanolic extract of propolis from Kerman area triggers apoptosis and arrests cell cycle in three human breast cancer cell lines MDA-MB-231, SKBR and MCF-7. *Journal of Kerman University of Medical Sciences*, 27(2), 120-133.
- Song, S. P., Zhang, S. B., Liu, R., Yao, L., Hao, Y. Q., Liao, M. M., and Li, Z. H. (2012). NDRG2 down-regulation and CD24 up-regulation promote tumor aggravation and poor survival in patients with gallbladder carcinoma. *Medical oncology*, 29, 1879-1885.

- Song, Y., Lu, M., Feng, L., Chen, Q., Huang, H., and Lin, Q. (2022). Identification of potential immunotherapy biomarkers for breast cancer by bioinformatics analysis. *Bioscience reports*, 42(2), BSR20212035.
- Stojanovic, S. T., Najman, S. J., Popov, B. B., and Najman, S. S. (2020). PROPOLIS: CHEMICAL COMPOSITION, BIOLOGICAL AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITY—A REVIEW. *Acta Medica Medianae*, 59(2).
- Sturm, L., and Ulrich, N. P. (2020). Advances in the propolis chemical composition between 2013 and 2018: A review. *eFood*, 1(1), 24-37.
- Sulaiman, G.M. (2010). Investigating the Anti-Tumor Properties of Iraqi Propolis in vitro and in vivo. Ph.D. thesis, Al-Nahrain University, College of Science: 200 pp.
- Sun, S., He, J., Liu, M., Yin, G., and Zhang, X. (2019). A great concern regarding the authenticity identification and quality control of Chinese propolis and Brazilian green propolis. *J. Food Nutr. Res*, 7(10), 725-735.
- Suraya, A., Nowak, D., Sulistomo, A. W., Ghanie Icksan, A., Syahrudin, E., Berger, U., and Bose-O'Reilly, S. (2020). Asbestos-related lung cancer: a hospital-based case-control study in Indonesia. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(2), 591.
- Surien, O., Ghazali, A. R., and Masre, S. F. (2019). Lung cancers and the roles of natural compounds as potential chemotherapeutic and chemopreventive agents. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 12(1), 85-98.
- Szliszka, E., and Krol, W. (2013). Polyphenols isolated from propolis augment TRAIL-induced apoptosis in cancer cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Szliszka, E., Zydowicz, G., Janoszka, B., Dobosz, C., Kowalczyk-Ziomek, G., and Krol, W. (2011). Ethanolic extract of Brazilian green propolis sensitizes

- prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *International Journal of Oncology*, 38(4), 941-953.
- Szturz, P., Wouters, K., Kiyota, N., Tahara, M., Prabhash, K., Noronha, V., and Vermorcken, J. B. (2019). Low-dose vs. high-dose cisplatin: lessons learned from 59 chemoradiotherapy trials in head and neck cancer. *Frontiers in oncology*, 9, 86.
- Tamasi, L., and Muller, V. (2011). Symptoms and diagnostics of lung neuroendocrine tumors. *Orvosi Hetilap*, 152(10), 366-370.
- Tanveer, S., Fathi, E., and Guy, F. (2011). Towards new anticancer strategies by targeting cancer stem cells with phytochemical compounds. *Cancer stem cells—the cutting edge*, 23, 431-454.
- Teicher, B. A., and Fricker, S. P. (2010). CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clinical cancer research*, 16(11), 2927-2931.
- Telloni, S. M. (2017). Tumor staging and grading: A primer. *Molecular Profiling*, 1-17.
- Thomas, A., Ranadive, N., Nayak, H., Surendran, S., Nampoothiri, M., Mudgal, J., and Nayak, Y. (2016). In vitro cytotoxicity activity of chrysin, morin and resveratrol against MCF-7 breast cancer cell lines. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 13(3), 1633-1637.
- Tian, Y., Zhai, X., Han, A., Zhu, H., and Yu, J. (2019). Potential immune escape mechanisms underlying the distinct clinical outcome of immune checkpoint blockades in small cell lung cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1), 1-12.
- Toreti, V. C., Sato, H. H., Pastore, G. M., and Park, Y. K. (2013). Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2013.

- Tosi, E. A., Ré, E., Ortega, M. E., and Cazzoli, A. F. (2007). Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. *Food chemistry*, *104*(3), 1025-1029.
- Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H., Beasley, M. B., and Wistuba, I. (2015). The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *Journal of thoracic oncology*, *10*(9), 1243-1260.
- Turan, I., Demir, S., Misir, S., Kilinc, K., Mentese, A., Aliyazicioglu, Y., and Deger, O. (2015). Cytotoxic effect of Turkish propolis on liver, colon, breast, cervix and prostate cancer cell lines. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *14*(5), 777-782.
- Tyczynski, J. E., Bray, F., and Parkin, D. M. (2003). Lung cancer in Europe in 2000: epidemiology, prevention, and early detection. *The lancet oncology*, *4*(1), 45-55.
- Ucar, M., and Deger, O. (2019). Evaluation of cytotoxic and wound healing effect of DMEM extracts of Turkish propolis in MDA-MB-231 cell lines. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *18*(2), 321-325.
- Vachani, A., Sequist, L. V., and Spira, A. (2017). AJRCCM: 100-year anniversary. The shifting landscape for lung cancer: past, present, and future. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *195*(9), 1150-1160.
- Valente, M. J., Baltazar, A. F., Henrique, R., Estevinho, L., and Carvalho, M. (2011). Biological activities of Portuguese propolis: protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, *49*(1), 86-92.

- Vatansever, H. S., Sorkun, K., Gurhan, S. I. D., Ozdal-Kurt, F., Turkoz, E., Gencay, O., and Salih, B. (2010). Propolis from Turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines. *Acta histochemica*, 112(6), 546-556.
- Vica, M. L., Glevitzky, M., Heghedűş-Mîndru, R. C., Dumitreţ, G. A., Heghedűş-Mîndru, G., Popa, M., and Teodoru, C. A. (2023). Phyto-Inhibitory and Antimicrobial Activity of Brown Propolis from Romania. *Antibiotics*, 12(6), 1015.
- Vit, P., Huq, F., Barth, O. M., Campo, M., Pérez-Pérez, E. M., Tomás-Barberán, F. A., and Santos, E. (2015). Use of propolis in cancer research. *BJMMR*, 8(2), 88-109.
- Vostakolaei, F. A., Broeders, M. J., Mousavi, S. M., Kiemeneý, L. A., and Verbeek, A. L. (2013). The effect of demographic and lifestyle changes on the burden of breast cancer in Iranian women: a projection to 2030. *The Breast*, 22(3), 277-281.
- Wagner, P. L., Hyjek, E., Vazquez, M. F., Meherally, D., Liu, Y. F., Chadwick, P. A., and Saqi, A. (2009). CXCL12 and CXCR4 in adenocarcinoma of the lung: association with metastasis and survival. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 137(3), 615-621.
- Wang, A., Kubo, J., Luo, J., Desai, M., Hedlin, H., Henderson, M., and Wakelee, H. A. (2015). Active and passive smoking in relation to lung cancer incidence in the Women's Health Initiative Observational Study prospective cohort. *Annals of Oncology*, 26(1), 221-230.
- Wang, T., Mi, Y., Pian, L., Gao, P., Xu, H., Zheng, Y., and Xuan, X. (2013). RETRACTED ARTICLE: RNAi targeting CXCR4 inhibits proliferation and invasion of esophageal carcinoma cells. *Diagnostic Pathology*, 8, 1-8.

- Wang, Yang; Kim, Tae Hyun; Fouladdel, Shamileh; Zhang, Zhuo; Soni, Payal; Qin, Angel; Zhao, Lili; Azizi, Ebrahim; Lawrence, Theodore S.; Ramnath, Nithya; Cuneo, Kyle C.; and Nagrath, Sunitha (2019). *PD-L1 Expression in Circulating Tumor Cells Increases during Radio(chemo)therapy and Indicates Poor Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer. Scientific Reports, 9(1), 566–. doi:10.1038/s41598-018-36096-7.*
- Wargo, J. A., Reddy, S. M., Reuben, A., and Sharma, P. (2016). Monitoring immune responses in the tumor microenvironment. *Current opinion in immunology, 41, 23-31.*
- Watabe, M., Hishikawa, K., Takayanagi, A., Shimizu, N., and Nakaki, T. (2004). Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NFκB and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells. *Journal of Biological Chemistry, 279(7), 6017-6026.*
- Watanabe, M. A. E., Amarante, M. K., Conti, B. J., and Sforcin, J. M. (2011). Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology, 63(11), 1378-1386.*
- WHO. (2020). report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. Geneva: World Health Organization; Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- WHO. (2021). International Agency for Research on Cancer. The Global Cancer Observatory.
- Wu, P., Wu, D., Li, L., Chai, Y., and Huang, J. (2015). PD-L1 and survival in solid tumors: a meta-analysis. *PloS one, 10(6), e0131403.*
- Xie, S., Tu, Z., Xiong, J., Kang, G., Zhao, L., Hu, W., and Zhang, Q. (2017). CXCR4 promotes cisplatin-resistance of non-small cell lung cancer in a CYP1B1-dependent manner. *Oncology Reports, 37(2), 921-928.*

- Xie, S., Zeng, W., Fan, G., Huang, J., Kang, G., Geng, Q., and Dong, P. (2014). Effect of CXCL12/CXCR4 on increasing the metastatic potential of non-small cell lung cancer in vitro is inhibited through the downregulation of CXCR4 chemokine receptor expression. *Oncology letters*, 7(4), 941-947.
- Xue, S., Hu, M., Iyer, V., and Yu, J. (2017). Blocking the PD-1/PD-L1 pathway in glioma: a potential new treatment strategy. *Journal of hematology & oncology*, 10(1), 1-10.
- Yahfoufi, N., Alsadi, N., Jambi, M., and Matar, C. (2018). The Immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients*, 10(11), 1618.
- Yan, F., Pang, J., Peng, Y., Molina, J. R., Yang, P., and Liu, S. (2016). Elevated cellular PD1/PD-L1 expression confers acquired resistance to cisplatin in small cell lung cancer cells. *PloS one*, 11(9), e0162925.
- Yan, X., Qi, M., Li, P., Zhan, Y., and Shao, H. (2017). Apigenin in cancer therapy: Anti-cancer effects and mechanisms of action. *Cell & bioscience*, 7(1), 1-16.
- Yang, D., Ma, X., and Song, P. (2022). A prognostic model of non-small cell lung cancer based on TCGA and ImmPort databases. *Scientific Reports*, 12(1), 1-12.
- Yang, T., Peng, J., Shu, Z., Sekar, P. K., Li, S., and Gao, D. (2019). Determination of the membrane transport properties of Jurkat cells with a microfluidic device. *Micromachines*, 10(12), 832.
- Ying, J., Xu, Q., Zhang, G., Liu, B., and Zhu, L. (2012). The expression of CXCL12 and CXCR4 in gastric cancer and their correlation to lymph node metastasis. *Medical oncology*, 29, 1716-1722.
- Yonar, S. M., Ural, M. Ş., Silici, S., and Yonar, M. E. (2014). Malathion-induced changes in the haematological profile, the immune response, and the

- oxidative/antioxidant status of *Cyprinus carpio carpio*: Protective role of propolis. *Ecotoxicology and environmental safety*, 102, 202-209.
- Zabaiou, N., Fouache, A., Trousson, A., Baron, S., Zellagui, A., Lahouel, M., and Lobaccaro, J. M. A. (2017). Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. *Chemistry and physics of lipids*, 207, 214-222.
- Zainal, W. N. H. W., Loganathan, E., and Ganesan, T. (2021). Encapsulation of Freeze-dried Propolis Powder: Study of in vitro Disintegration and Dissolution. *Indian J. Pharm. Educ. Res*, 55, 428-435.
- Zappa, C., and Mousa, S. A. (2016). Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Translational lung cancer research*, 5(3), 288 – 300.
- Zhang, J. G., Wang, J. J., Zhao, F., Liu, Q., Jiang, K., and Yang, G. H. (2010). MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clinica chimica acta*, 411(11-12), 846-852.
- Zheng, M. (2016). Classification and pathology of lung cancer. *Surgical Oncology Clinics*, 25(3), 447-468.
- Zheng, W., Feng, Q., Liu, J., Guo, Y., Gao, L., Li, R., and Shan, C. (2017). Inhibition of 6-phosphogluconate dehydrogenase reverses cisplatin resistance in ovarian and lung cancer. *Frontiers in pharmacology*, 8, 421.
- Zhou, M., Xie, P., Chen, L., Zhang, P., and Xu, F. (2023). Correlation between the expression of CD24 on circulating tumor cells and prognosis in breast cancer. *American Journal of Translational Research*, 15(3), 1941.

- Zhou, Z. J., Zhan, P., and Song, Y. (2015). PD-L1 over-expression and survival in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Translational lung cancer research*, 4(2), 203.
- Zhu, H., Luo, H., Zhang, W., Shen, Z., Hu, X., and Zhu, X. (2016). Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. *Drug design, development and therapy*, 10, 1885.
- Zhu, S., Pabla, N., Tang, C., He, L., and Dong, Z. (2015). DNA damage response in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Archives of toxicology*, 89(12), 2197-2205..
- Zou, W., Wolchok, J. D., and Chen, L. (2016). PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Science translational medicine*, 8(328), 328rv4-328rv4.
- Zulhendri, F., Felitti, R., Fearnley, J., and Ravalia, M. (2021). The use of propolis in dentistry, oral health, and medicine: A review. *Journal of oral biosciences*, 63(1), 23-34.
- Zullkiflee, N., Taha, H., and Usman, A. (2022). Propolis: Its role and efficacy in human health and diseases. *Molecules*, 27(18), 6120.

الملاحق

Appendices

ملحق (1) العكبر العراقي ذو اللون البني المستخدم في الدراسة الحالية.



ملحق (2) جهاز حمام الموجات فوق الصوتية Ultrasonic bath المستخدم في عملية استخلاص مادة العكبر.



ملحق (3) جهاز HPLC المستخدم لتشخيص وفصل المركبات الفعالة في المستخلص الايثانولي لعينة العكبر.



ملحق (4) جهاز Fraction collector المربوط على جهاز HPLC المستخدم لجمع المركبات الفعالة من المستخلص الايثانولي لعينة العكبر.



ملحق (5) جهاز التدفق الخلوي Flow cytometry المستخدم في تقدير مستوى التعبير عن نسبة المعايير المناعية المدروسة.



Summary

The current study aimed to know the anti-human lung cancer effects of three active compounds isolated from Iraqi propolis, which include, Caffeic acid (CA), Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and Chrysin (CHR) and to compare the effect of these compounds with cisplatin, which is a chemotherapy used in the treatment of several types of cancer. The required tests, which encompassed two targets, were carried out using the human lung cancer cell line A549, the first target assesses the anti-tumor activity by examining the cytotoxicity of each active compound on the A549 cell line, and its effects are compared with those of cisplatin treatment, the second target, it was represented by knowing the immunomodulation activity of these compounds by evaluating the expression levels of some immunological parameters which including, Programmed death-ligand-1 (PDL-1), Cluster of differentiation-24 (CD24) and C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4) on A549 cell line before and after treatment with active compounds and chemotherapy. The current study was conducted in the laboratories of the Biology Department at the College of Education Pure Sciences / University of Kerbala, the laboratories of the Department of Environment and Water in the Ministry of Science and Technology, the laboratory of the Iraqi Biotechnology Company, and the Iraq Specialized Laboratory in Baghdad Governorate for the period extending from the beginning of April 2022 to the beginning of November 2022.

The active compounds were identified in the ethanolic propolis extract using the High performance liquid chromatography technique (HPLC), and they were then separately collected using the Fraction Collector bound by the HPLC. According to the findings, the concentration of the compound (CA) in the extract is the highest, at (69.58) mg/g, compared to the concentrations of the other two compounds (CAPE and CHR), which are (48.97, 33.69) mg/g, respectively.

The cytotoxic effects of cisplatin and the extracted active compounds from propolis on A549 cells were evaluated using the cell culture test MTT assay. Cancer cells were then exposed to six different concentrations of each of the investigated compounds, which are (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25) $\mu\text{g/ml}$, for a duration of (48) hours. The results demonstrated that the treatment of the A549 cell line with cisplatin and the active compounds had cytotoxic effects, in which the results showed a reduction in the number of cancer cells, thus the rate of inhibition increases as the concentration increases, in which the highest inhibition occurring at concentration (1000) $\mu\text{g/ml}$ for both cisplatin and the active compounds, and When compared to cisplatin and other compounds, CA had the highest inhibition rate on A549 cell line at a concentration of (1000) $\mu\text{g/ml}$, where it was (76.300%), while the ratio values in (CIS, CAPE, and CHR) were (70.400%, 62.500%, and 67.100%) respectively, the results also revealed a significant differences ($P \leq 0.05$) in the six concentrations of both cisplatin and (CAPE) when compared with the control cells, and there was a significant differences ($P \leq 0.05$) in five concentrations ((1000, 500, 250, 125, 62.5) $\mu\text{g/ml}$ for the two compounds (CA and CHR) compared with the control cells, While there were no significant differences ($P > 0.05$) in the concentration (31.2) $\mu\text{g/ml}$ and control cells, and the findings also showed that the toxicity of cisplatin was higher than the toxicity of the active compounds on A549 cell line using (IC50) concentration, as it reached (43.75) $\mu\text{g/ml}$ in cisplatin, while it was (157.6, 249.3, and 258.9) $\mu\text{g/ml}$ in (CA, CAPE, and CHR), respectively, it is important to note that cytotoxicity increases with decreasing (IC50), and vice versa.

In order to estimate the expression levels of immunological parameters (PDL-1, CD24, and CXCR4) on the A549 cell line, the tumor cells were cultured in the lab and exposed to the (IC50) concentration of each of cisplatin and active compounds isolated from propolis for a period (24) hours. The results demonstrated that

following treatment with the concentration (IC50) for cisplatin therapy, the expression levels of (PDL-1, CD24, and CXCR4) were elevated in the A549 cell line, the results showed that there was a significant difference ($P \leq 0.05$) in the expression level of (PDL-1) in A549 cells treated with cisplatin compared with control cells, while there was no significant difference ($P > 0.05$) in the expression levels of (CD24 and CXCR4), compared with control cells. The results also showed decrease in the expression levels of (PDL-1, CD24, and CXCR4) on the A549 cell line treated with (IC50) concentrations of the two active compounds (CA and CAPE), in which the results demonstrated that there was a significant differences ($P \leq 0.05$) in the expression of (PDL-1, CD24 and CXCR4) on the A549 cell line treated with the two mentioned compounds, compared with the control cells, but the expression levels of (PDL-1, CD24 and CXCR4) in A549 cells treated with (CHR) were high compared with the other two compounds of propolis, and in comparison to control cells, the (PDL-1) expression level in A549 cells treated with the (CHR) it was a significant differences ($P \leq 0.05$), but (CD24 and CXCR4) expression levels there was no significant differences ($P > 0.05$).

The aforementioned information leads us to the conclusion that the active compounds identified from propolis (CA, CAPE, and CHR) have cytotoxic effects against A549 human lung cancer cell line at various doses, with (1000) $\mu\text{g/ml}$ being the most effective concentration. Additionally, the compounds had an impact on the (PDL-1, CD24, and CXCR4) expression levels on the A549 cell line, which were both decreased and increased, as a result, these compounds can be developed in the hopes that they will one day be used in conjunction with cisplatin to treat various cancers, including lung cancer.



Republic of Iraq

Ministry of Higher Education & Scientific Research

University of Kerbala / College of Education Pure Science

Department of Biology

**Cytotoxic and immunological effect of some partially
purified constituents of local propolis in human lung cancer
cell line A549**

A Thesis

**Submitted to Council of the College of Education Pure Science–
University of Kerbala, in a Partial Fulfillment of the Requirements
for the Ph.D. Degree in Biology–Zoology**

Written by:

Ali Naser Zubaidi AL-Baldawi

Supervised by:

Assist. Prof. Dr. Hiyam Abdul Ridha Karim AL-Awad

October 2023 A.D.

Rabi AL-Thani 1445 A.H.