

סריקה של צמחי מרפא לחומרים ביולוגיים חדשים המשפיעים על שלד התא בתאי בע"ח

**A screen of medicinal plants for new biological active compounds affecting the cytoskeleton
in mammalian cells**

מוגשת לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

עינת שדות, צמחי נוי, מנהל המחקר

מוחמד אבו-עבד, צמחי נוי, מנהל המחקר

אבנר כהן, צמחי נוי, מנהל המחקר

אבי פרל, מטעים, מנהל המחקר

זהר כרם, המכון לביוכימיה, מדעי המזון והתזונה, הפקולטה לחקלאות

Einat Sadot, Ornamental Horticulture, Bet-Dagan POBox 6 50250 vhesadot@agri.gov.il

Mohamad Abu-Abied, Ornamental Horticulture, Bet-Dagan POBox 6 50250

abuabied@agri.gov.il

Avner Cohen, Ornamental Horticulture, Bet-Dagan POBox 6 50250 vhacohen@agri.gov.il

Avi Perl, Fruit Tree Sciences Bet-Dagan POBox 6 50250, vhlperl@agri.gov.il

Zohar Kerem, Institute of Biochemistry, Food Science and Nutrition, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, kerem123@gmail.co

July 2011

תמוז תשע"א

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: כן/לא מחק את המיותר

חתימת החוקר

רשימת פרסומים: Halpert M, Abu-Abied M, Avisar D, Moskovitz Y, Altshuler O, Cohen A, Weissberg M, Riov J, Gottlieb H.E, Perl A and Sadot E (2010) Rac-dependent doubling of HeLa cell area and impairment of cell migration and cell cycle by compounds from *Iris germanica* Protoplasma. Jan 5 2011.

תקציר

1. **הצגת הבעיה:** צמחיית הארץ עשירה בצמחים בעלי ערך רפואי על פי מקורות שונים אולם מרובם עדין לא בודדו החומרים הפעילים 2. **מטרות המחקר** הן לאסוף מירב דוגמאות הצמחים מתוך הפלורה של הארץ, להכין ספריית מיצויים ולבדוק אותם על תאים אנושיים בתרבית. למצוא פעילות נגד מרכיבי שלד התא ולבודד את החומר הפעיל 3. **שיטות העבודה** כוללים סיוורם בכל הארץ בלווי בוטנאים ואיסוף צמחים וחלקי צמחים בנפרד. טחינה, יבוש והקפאה של הדוגמאות והכנת מיצויים שונים ב- 80% מתנול. גידול תאים בתרבית וחשיפתם למיצויים השונים בפלטות של 96 באריות כדי לאפשר סריקת חומרים רבים בכל פעם, צביעה עם סמנים פלואורסנטים לשלד התא ובדיקה במיקרוסקופ פלואורסנטי. מיצויים שיראו פעילות המכוונת נגד מרכיבי שלד התא יסומנו ועליהם נעמיק את המחקר בנוגע למנגנון הפעילות ואופיים הכימי. 4. **תוצאות עיקריות:** עד כה נאספו 2000 דוגמאות צמחים מכל הארץ. נמצאה פעילות באירוס גרמניקה של הגברת סיבי אקטין והצמדות תאים למדיום החוץ תאי HeLa. החומר הפעיל זוהה כאיריפלדיל והעבודה פורסמה. בנוסף נמצאה פעילות בצמח מהחרמון של פירוק ספציפי של מיקרוטובולי 5. **מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות:** החומר שנמצא מאירוס היה ידוע בספרות כבעל אינדיקציות לטיפול בסרטן ולכן לא ניתן למסחרו. אנו ממשיכים את העבודה לזיהוי החומר החדש.

מבוא

צמחים משמשים כמקור לתרופות כבר אלפי שנים. הידע לבחירת הצמחים ואופן השימוש עבר בעל פה מדור לדור ובהמשך הועלה על הכתב. בהתחלה רקחו מצמחים חליטות, משחות ואבקות למיניהן ובהמשך החלו לבודד את החומרים הפעילים כדוגמת מורפין (morphine) מהאופיום (opium) שבודד מפרגים (*Papaver somniferum* L) בתחילת המאה ה-19, דיגיטוקסין (digitoxin) שבודד מ *Digitalis purpurea* and *Digitalis lanata*, קודאין (codeine) שבודד מהצמח *Papaver somniferum* L, קוקאין (cocaine) מצמח הקוקה *Erythroxylum coca* וכינין (quinine) מ- *Cinchona calisaya* Wedd. and *Cinchona succirubra* Pav. ex Klotzsch (שחלקם עוד בשימוש כיום, 1) בידוד ואפיון מרכיבים טבעיים פעילים, במיוחד מצמחים ממשיך גם היום ומהווה מקור חשוב לתרופות חדשות וכבסיס לפיתוח חומרים סינטטיים. התרכובות הטבעיות מספקות מגוון מבני עצום, לעיתים בעלי פעילות ביולוגית חזקה ועל כן בעלות תפקיד משמעותי בפיתוח תרופות, בין היתר לטיפול בסרטן (1-3). מדינת ישראל ושטחי הגדה עשירים במיני צמחים, עם מעל 2600 מינים, מתוכם יותר מ 700 מוזכרים במאגרי מידע אתנו בוטניים וידועים כבעלי פעילות רפואית וכקוטלי מזיקים (4-10). כ- 30% נחשבים נדירים ורבים מהם בסכנת הכחדה (6, 11). חלק מהצמחים כגון *Silybum marianum*, *Artemisia herba alba* או *Ricinus communis* נמצאים בשימוש נרחב במזרח התיכון וידועים גם ברפואה האירופאית בעוד מינים אחרים כגון *Artemisia judaica* נמצא בשימוש מקומי בלבד (6). שלד התא מעניק לתא את צורתו ומשמש במספר תפקידים נוספים כמו תנועה, הובלה תוך תאית, וחלוקת התא. מחקרים אף מראים כי שלד התא בעל תפקיד בבקרה על מגוון תהליכים תאיים הקשורים לטרנספורמציה סרטנית המלווה במגוון שינויים תאיים הכוללים שינוי בקצב גדילת התאים ושינויים מבניים משמעותיים המשפיעים על הידבקות וצורת התא, תנועתיות וסידור שלד התא. השינויים מתבטאים ביכולת גדילה שאינה תלויה היצמדות למדיום החוץ תאי, שינויים ברמת הפריסה על משטח, התנועתיות וקצב חלוקות. תאים סרטניים בתרבית יהיו בעלי סידור לוקה של סיבי אקטין

ואחיזה לקויה. (12, 13) מכאן, ששלב התא מהווה מטרה חשובה לפיתוח תרופות. שלד התא כולל שלושה מרכיבים מרכזיים: מיקרוטובולי, סיבי אקטין וקורי ביניים (בהם לא נעסוק בעבודה זו).

חלק נכבד מהחיפושים אחר מרכיבים פעילים מצמחי מרפא, מטרתם הטיפול בסרטן. מתוך 155 תרופות אנטיסרטניות שפותחו החל מ 1940 רק 27% לא פותחו מתרכובות טבעיות ורק תרופה אחת, התרכובת האנטיסרטנית sorafenib, מקורה מכימיה קומבינטורית (14). החומרים הנמצאים כיום בשימוש קליני נגד סרטן ומקורם בצמחי מרפא ניתנים לחלוקה לארבע קבוצות (1, 3) :

1. **Vinca alkaloids** (וינבלסטין ווינקריסטין שמקורם ב- *Catharanthus rosea*) וחלק מהנגזרות החצי סינטטיות עוצרים מיטוזה במטאפאזה על ידי קשירה ספציפית לטובולין ובכך לדהפולימריזציה של מיקרוטובולי (15).

2. **epipodophyllotoxins** (פודופילוטוקסין שמקורו *Podophyllum peltatum*) נקשרים לטובולין וגורמים לשברים בדנ"א במהלך פאזה G2 במעגל התא על ידי עיכוב בלתי הפיך של topoisoemrase II (16).

3. **taxanes (פאקליטקסל)** (טקסול) שמקורו ב- *Taxus brevifoli*) מייצב מיקרוטובולי ע"י קשירה של הפולימר (17, 18).

4. **camptothecins** (קאמפטוטצין מ- *Camptotheca acuminata*) מעכב באופן סלקטיבי את topoisoemrase I המעורב בביקוע וסידור הדנ"א (19)

חשוב לציין שכולם מעכבים חלוקות תאים וכי שלושת החומרים הראשונים קושרי מיקרוטובולי או טובולין. צמחים מסנתזים מגוון עצום של חומרים קטן מולקולריים המכונים מטאבוליטים שניוניים (20). מטאבוליטים אלו כוללים מגוון רחב מאוד של תרכובות ממשפחות שונות המעורבים בהגנה על הצמחים כנגד עקות ביוטיות ואביוטיות (21, 22) הם מיוצרים בכל רקמות הצמח, אך לעיתים הופעתם הינה ספציפית לאיבר, רקמה, תא, שלב התפתחותי או גורמים סביבתיים. תרכובות מסיסות במים מובלות אל החללית (vacuole) ונאגרות בה, בעוד תרכובות ליפופיליות נאגרות בממברנות, קוטיקולות וכיו"ב. במקרים רבים, תרכובות בעלות פעילות ביולוגית עוברות קישור לקבוצה פונקציונאלית לצורך נטרול ו/או אגירה (23, 24) מטאבוליטים שניוניים הינם בעלי מבנים שונים ותכונות כימיות שונות ועל כן בעלי פוטנציאל בשימוש ברפואה (25, 26). תרכובות ממשפחת הטרפנואידים, אלקלואידים ופלבנואידים משמשות כתרופות ותוספי מזון בכדי לטפל ולמנוע מחלות שונות כמו כן במניעה ובעיכוב מגוון סוגי סרטן (14, 25, 26). ברפואה המודרנית מספר התרופות הרב ביותר הוא ממשפחת האלקלואידים. תרופות אלו בעלי פעילויות מגוונות כגון פעילות אנטיכולינרגיות המסייעות לשיכוך עווית שרירים (atrophine), יעילות כמשככי כאבים (opium alkaloids), כטיפול נגד טפילים (quinine), פעילות אנטי סרטנית (vinblastine/vincristine) ועוד (25). גם טריטרפנואידים תרמו רבות לרפואה המודרנית לדוגמה, תרופות לטיפול באי ספיקת לב על ידי עיכוב משאבות Na^+/K^+ בלב, תרופות אנטי סרטניות (taxol) וכנגד מלריה (artemisinin) ותרופות אנטי דלקתיות (triptolide) (14). במשפחת הפלבנואידים קיימים לדוגמה quercetin (בבצלים) היעיל לטיפול בסרטן הפרוסטטה ו- genistein (מצוי בסויה) היעיל בעיכוב שגשוג של מספר סוגי סרטן (26). לפיכך פנינו לסריקת צמחי א"י לחומרי טבע חדשים.

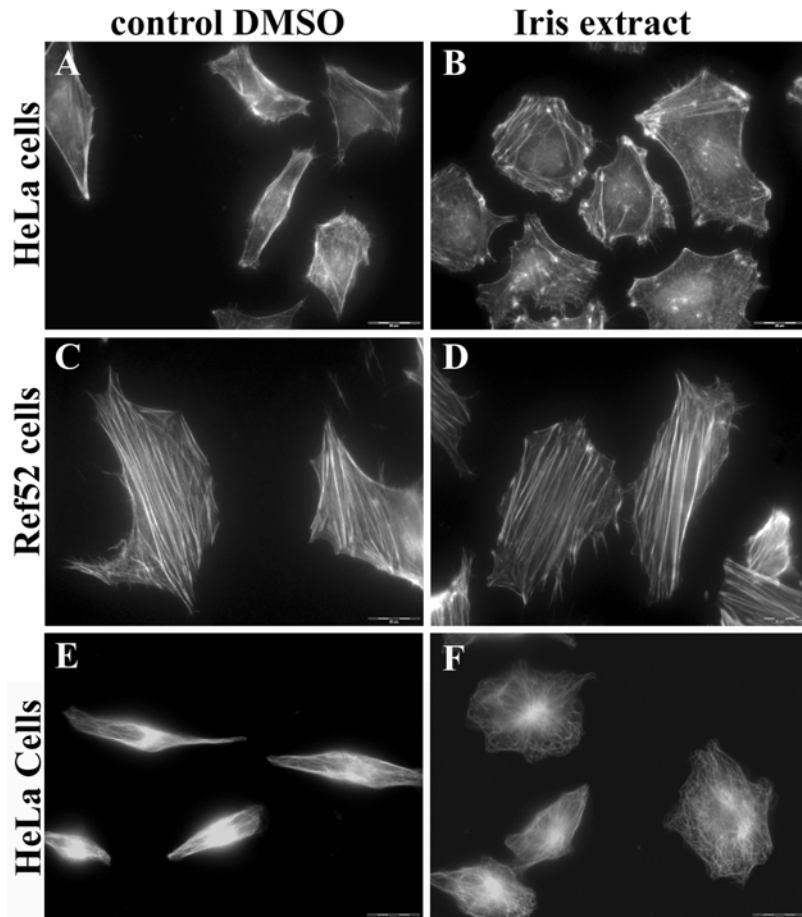
מטרות המחקר

1. יצירת ספרית מיצויים של מטבוליטים מצמחיית הארץ.

2. סריקה וזיהוי חומרי טבע חדשים בעלי פעילות נגד שלד התא.
3. בידוד ואפיון כימי של החומר הפעיל.
4. ברור מנגנון הפעולה של החומר הפעיל.

פירוט עיקרי הניסויים שבוצעו וכלל התוצאות שהתקבלו לתקופת הדו"ח

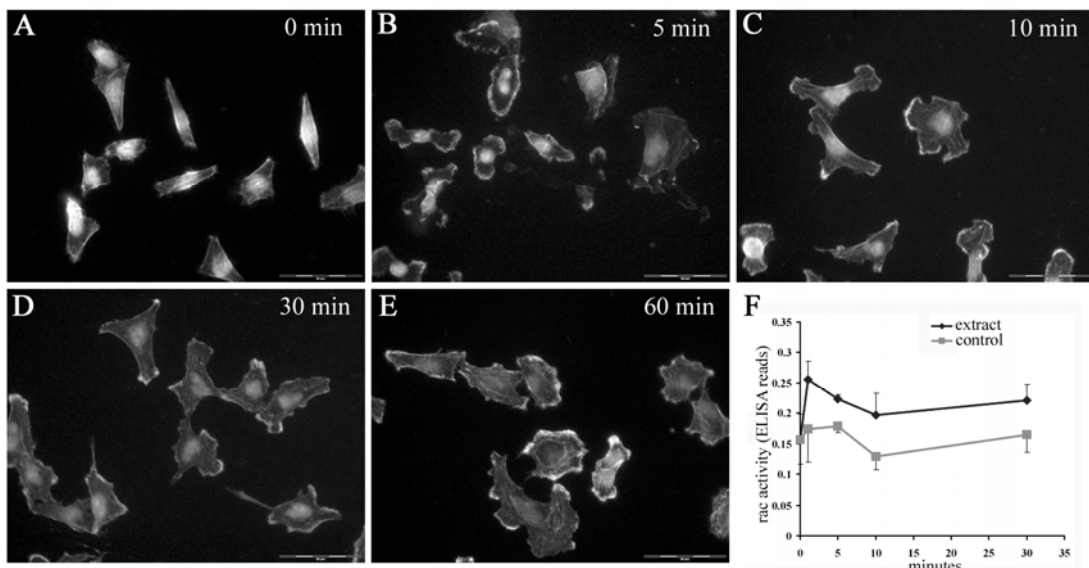
1. איסוף הצמחים נערך בליווי הבוטנאית מימי רון או דר' אבנר כהן. מספר הדוגמאות שנאספו מסתכם לכ- 2000 דוגמאות. עבור כל צמח נרשמו הפרטים הבאים: מועד ומיקום מדויק של האיסוף, החלק של הצמח שנאסף ושמו המלא בעברית ובלטינית. הצמחים נאספו במבחנות 50 מ"ל והועברו לקירור כבר בשטח. בסוף היום הם הוקפאו ל- -80°C ולאחר מכן נטחנו בהקפאה ויובשו בואקום.
2. הסריקה נעשתה בצלחות שחורות, עם 96 באריות וקרקעית זכוכית בעובי 0.17 מ"מ. תאים נזרעו בצלחות אלו, טופלו במיצויים, עברו קיבוע וצביעה ואז נבדקו במיקרוסקופ פלואורסנטי. נסרקו תאי HeLa שסומנו בפלואידין לזיהוי שינויים בשלד האקטין, תאי Ref52 שסומנו ע"י נוגדנים למיקרוטובולי ותאי SW480 שנסרקו לנוכחות של ביטא קטנין בגרעין. הסריקה של תאי HeLa הובילה לאפיון וזיהוי פעילות שמדווחת להלן. הסריקה של תאי Ref52 הובילה למציאת פעילות של פירוק מיקרוטובולי. אפיון החומר הפעיל מתבצע בימים אלו. הסריקה של תאי SW480 טרם נסתיימה.
3. על מנת לסרוק את המיצויים לפעילות שמהותה הגברת התאחיזה של התאים למשטח החוץ תאי והופעה מוגברת של סיבי האקטין השתמשנו בתאי HeLa בהם אין מערכת מפותחת של סיבי אקטין. נמצא שמיצוי מאיריס גרמניקה מגביר cell adhesion והופעת סיבי אקטין בתאים אלו (איור 1 A,B). על מנת לבדוק האם תופעה דומה תראה גם בתאי פיברובלסטים שאינם סרטניים טופלו תאי Ref52 במיצוי מאיריס. תאים אלו בעלי מערכת מפותחת מאד של סיבי אקטין ועליהם לא נראה שינוי בנוכחות המיצוי (איור 1 C,D). בנוסף משתמע מכך שהמיצוי אינו רעיל. פירוק שלד המיקרוטובולי נמצא בעבר כמשרה הופעה מוגברת של סיבי אקטין (27). לפיכך נצבעו תאי HeLa לסיבי המיקרוטובולי אחרי טיפול במיצוי מאיריס. לא נראה פירוק של מיקרוטובולי בנוכחות המיצוי למרות עליה בשטח התאים (איור 1E,F) ולפיכך הוסק שלא זה הגורם להגברת תאחיזה והופעת סיבי אקטין.



איור 1. השפעת המיצוי מאיריס על תאי HeLa ותאי Ref52. תאים טופלו במיצוי במשך 1.5 שעות, עברו קיבוע וצביעה פלואורסנטית. התמונות צולמו במיקרוסקופ פלואורסנטי. תאי HeLa (A,B) מסומנים לאקטין. תאי Ref52 (C,D) מסומנים לאקטין. תאי HeLa (E,F) מסומנים לאקטין. סמן גודל 50 מיקרון.

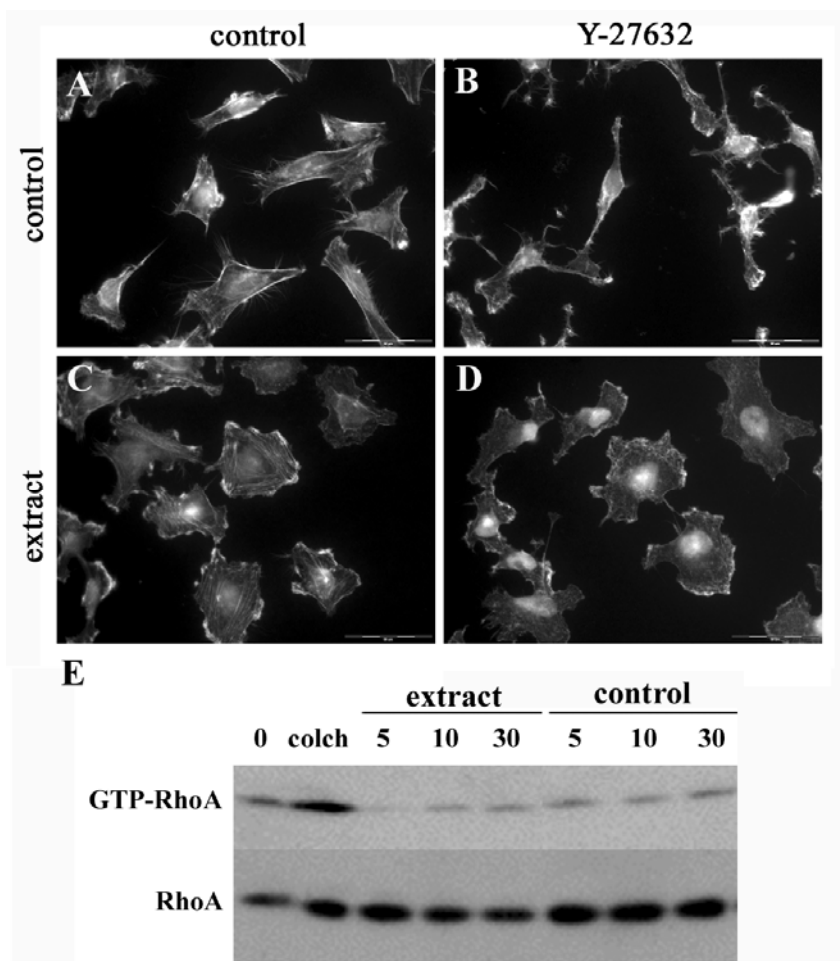
מכיון שידוע שהדבקות של תאים למשטח החוץ תאי תלויה בחלבונים

ממשפחת ה- small GTPases, עלתה ההשערה כי המיצוי מפעיל אחד או יותר מ- small GTPases מממשפחת Rho המבקרים את אירגון שלד התא, (28) ובעלי פעילות בטווחי זמן קצרים של 30 שניות עד שעה (29, 30). שלושת חברי משפחת ה-Rho שפעילותם רלוונטית ביותר לשינויים במבנה שלד האקטין וצורת התאים הם RhoA שידוע כמעודד יצירת סיבי אקטין המכונים stress fibers, Rac1 המעודד יצירת lamellipodia ו-Cdc42 המודד יצירת filopodia (28). כיוון שלא נצפו filopodia שהם כעין שלוחות ממברנליות, לא בדקנו Cdc42. על מנת לבדוק מעורבות Rac בדקנו את פעילותו ובמקביל עקבנו אחרי הקינטיקה של התפרסות והתרחבות התאים על המשטח החוץ תאי. איור 2 מראה שכבר אחרי 5 דקות נראות lamellipodia עשירות באקטין בשולי התאים המטופלים. במקביל הפעלה מתונה של Rac נמדדה בטווח הקצר לאחר התחלת הטיפול (תמונה 2). מכך עולה ש-Rac מעורב בתהליך וכנראה מופעל ע"י המיצוי ומעודד פריסה של התאים על גבי המשטח. בכדי לבדוק מעורבות RhoA, התאים נחשפו למעכב ספציפי של RhoA וכמו כן נבדקה פעילות RhoA בנוכחות המיצוי. איור 3 מראה שהמעכב (Y-27632) לא מנע מהתאים להתפשט ולהתרחב אולם בנוכחות המעכב, התרחבות זו לא לוותה ביצירת סיבי אקטין מפותחים כמו בביקורת. בנוסף לא נראתה הפעלת RhoA בנוכחות המיצוי. לפיכך הסקנו של-RhoA יש תפקיד שולי בתופעה.

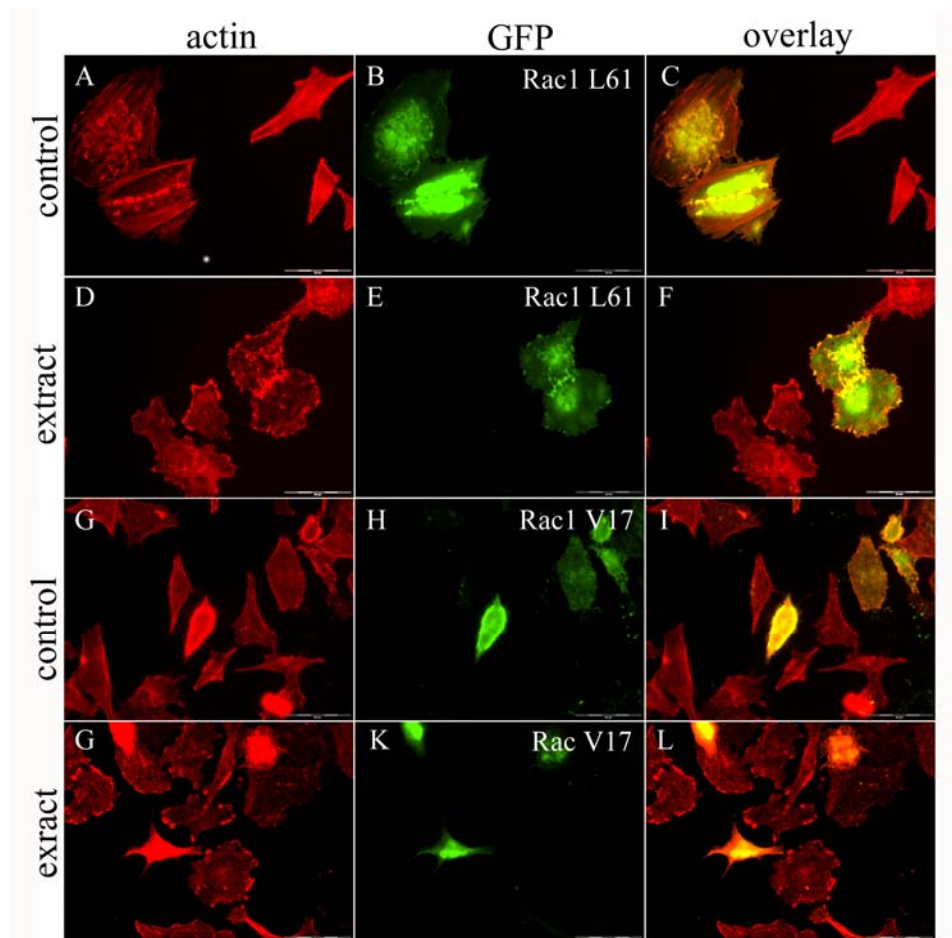


איור מס' 2. מעקב אחרי הקינטיקה של התרחבות התאים בנוכחות המיצוי ובדיקות פעילות Rac במקביל. תאי HeLa נורעו בצלחות עם זכוכיות מכסה (עבור המיקרוסקופיה) או בצלחות ללא זכוכיות (עבור הביוכימיה) וטופלו במיצוי לפרקי הזמן המצוינים בתמונה. התאים עברו קיבוע וצביעה ב phalloidine לסימון אקטין או נקצרו לבדיקת פעילות Rac באמצעות קיט ELISA של חברת E-A . Cytoskeleton התאים כפי שנצפו במיקרוסקופ, נראית התרחבות הדרגתית שמתחילה כבר לאחר 5 דקות. F. גרף המראה פעילות משמעותית של Rac כבר לאחר דקה שיוורדת לאחר 5-10 דקות מרגע הוספת המיצוי. סמן גודל 50 מיקרון.

על מנת להמשיך ולבסס את הרושם שהתקבל ש- Rac1 מעורב בפעילות הגדלת שטח התאים ע"י מיצוי מאירים השתמשנו בשני מוטנטים מאוחדים ל-GFP: Constitutively active (CA), מוטנט המבטא את הצורה הפעילה של Rac1 ואינו מאפשר ל GTP לעבור הידרוליזה גם בתגובה לגירוי (GTPase activating proteins) GAPs (31) ביטוי מוטנט זה בתאי HeLa כביקורת הוביל כמצופה (28) ליצירה רבה של סיבי אקטין ולעליה משמעותית בשטח שהתאים תופסים על המשטח (איור 4 A-C). כאשר תאים המבטאים מוטנט זה טופלו במיצוי מאירים לא נראתה תוספת גודל או שינוי בצורתם (איור 4 D-F). לחילופין, השתמשנו בביטוי מוטנט דומיננטי חסר פעילות (DN) dominant negative (RacV17) שלא רק שאינו פעיל בעקבות אפיניות גבוהה יותר ל GDP אלא גם מעכב את פעילות החלבון התקין האנדוגני של Rac1 על ידי מניעת זרחונו (32). בנוכחות מוטנט זה המיצוי לא הצליח להשרות הגדלה בשטח התאים וכתוצאה מכך התאים המטופלים נשארו קטנים (איור 3 G-L). סיכום תגובות התאים לטיפולים השונים מופיע באיור 5. נראה שמעכב Rho לא גרם לשינוי מובהק בשטח התאים בנוכחות המיצוי ולפיכך כנראה שהמיצוי לא מפעיל Rho על מנת להגדיל את שטח התאים. לעומת זאת, אי יכולת המיצוי להגדיל שטחם של תאים המבטאים DN Rac1 ואי הגדלה נוספת של שטחם של אלו המבטאים CA Rac1 בנוכחות המיצוי, מחזקת את המסקנה שהמיצוי גורם להפעלה של Rac1 וע"י כך להגדלת שטח התא והתחזקות סיבי האקטין.

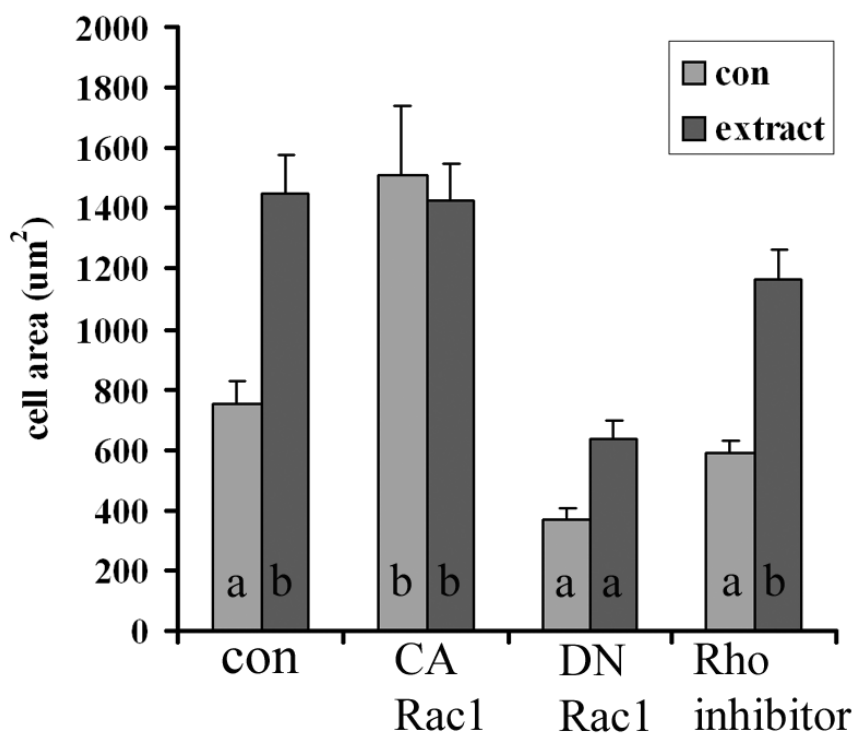


איור 3. התרחבות התאים בנוכחות מעכב ספציפי ל-*RhoA* ובדיקות פעילות *RhoA* בנוכחות המיצוי. **A-D.** תאי HeLa טופלו ב- Y-27632, מעכב *Rho* ספציפי למשך שעה וחצי לפני הוספת המיצוי, ולאחר מכן עם 0.25% DMSO (ביקורת) או עם מיצוי למשך שעה וחצי נוספים. התאים קובעו ונצבעו לאקטין. נראית התכווצות תאים בנוכחות DMSO אך לא נראית התכווצות תאים משמעותית בנוכחות המיצוי, למרות היעדר ברור של סיבי אקטין. מידת הגדלה $50\mu\text{m}$. **E.** פעילות של *RhoA* בתאי HeLa נמדדה בפרקי הזמן המצוינים לאחר הוספת המיצוי באמצעות GST-pull down ע"י קיט של חברת Cytoskeleton. בתור ביקורת חיובית להפעלה של *RhoA* טופלו התאים ב- colchicine. הפנל העליון מראה כמות *RhoA* פעיל והפנל התחתון כמות *RhoA* כללית. לא נצפתה הפעלה של *RhoA* על ידי הטיפול במיצוי.



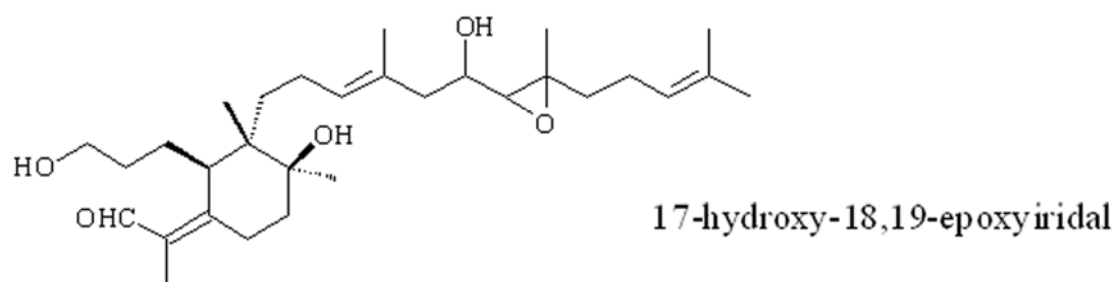
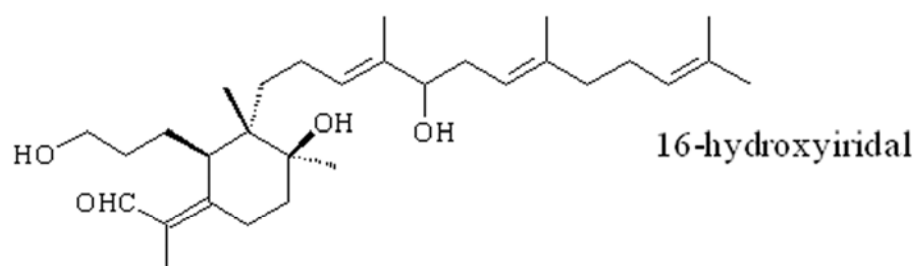
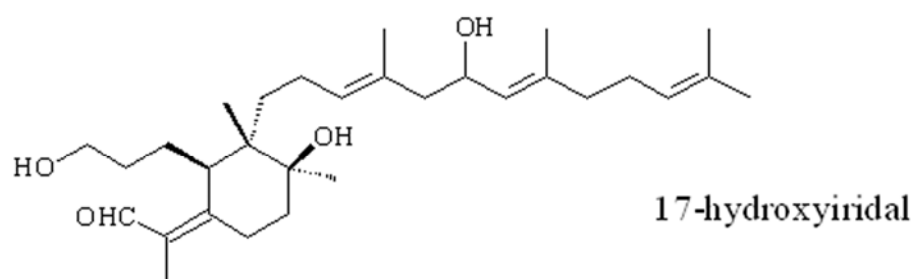
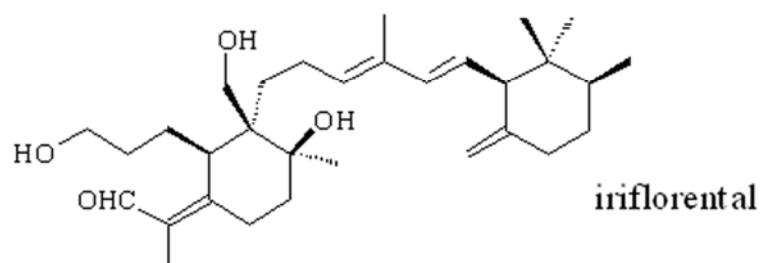
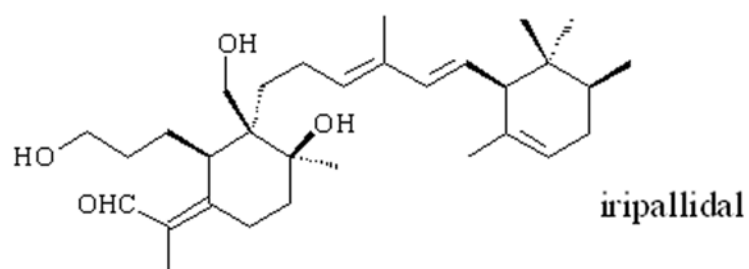
איור 4. תאי HeLa המבטאים מוטנטים של *Rac1* מאוחדים ל-GFP טופלו במיצוי. באדום צביעה לאקטין, בירוק *GFP*. C-A תאים המבטאים מוטנט הפעיל כל הזמן *constitutive active* של *Rac1* (CA-GFP-Rac1 L61). נראה ששטחם של התאים המבטאים את המוטנט גדל. F-D תאים המבטאים את CA-GFP-Rac1 L61 טופלו במיצוי. I-G תאים המבטאים מוטנט חסר פעילות *Rac1* V17 *dominant negative*. K-G תאים המבטאים מוטנט *dominant negative* של *Rac1* V17 טופלו במיצוי. נראה ששטחם של התאים המבטאים ומסומנים ב-GFP, לא גדל בנוכחות המיצוי. סמני גדל 50 מיקרון.

4. על מנת לאפיין את החומר הפעיל במיצוי ביצענו כמה שלבי ניקוי והפרדה לפרקציות כאשר כל שלב לוהה בבדיקת פעילות על התאים. בתחילה נמצא שהפעילות עוברת לפרקציה של כלורופורם. כאשר פרקציה זו הופרדה על פלטה של TLC ע"י הרצה עם אתיל אצטט:אתנול:מים ביחסים של 2:97:1 נמצאו 2 פרקציות בעלות בליעה ב UV בהן נמצאה פעילות על התאים. החומרים מוצו מהסליקה והופרדו בשנית ע"י פטרול אתר: טרט-בוטנול (20:80). פרקציה 1 הופרדה לשלוש תת-פרקציות בעלות בליעה ב UV; 1a, 1b, 1c, ואילו פרקציה 2 הופרדה לשתי תת פרקציות בעלות בליעה ב UV; 2a, 2b.

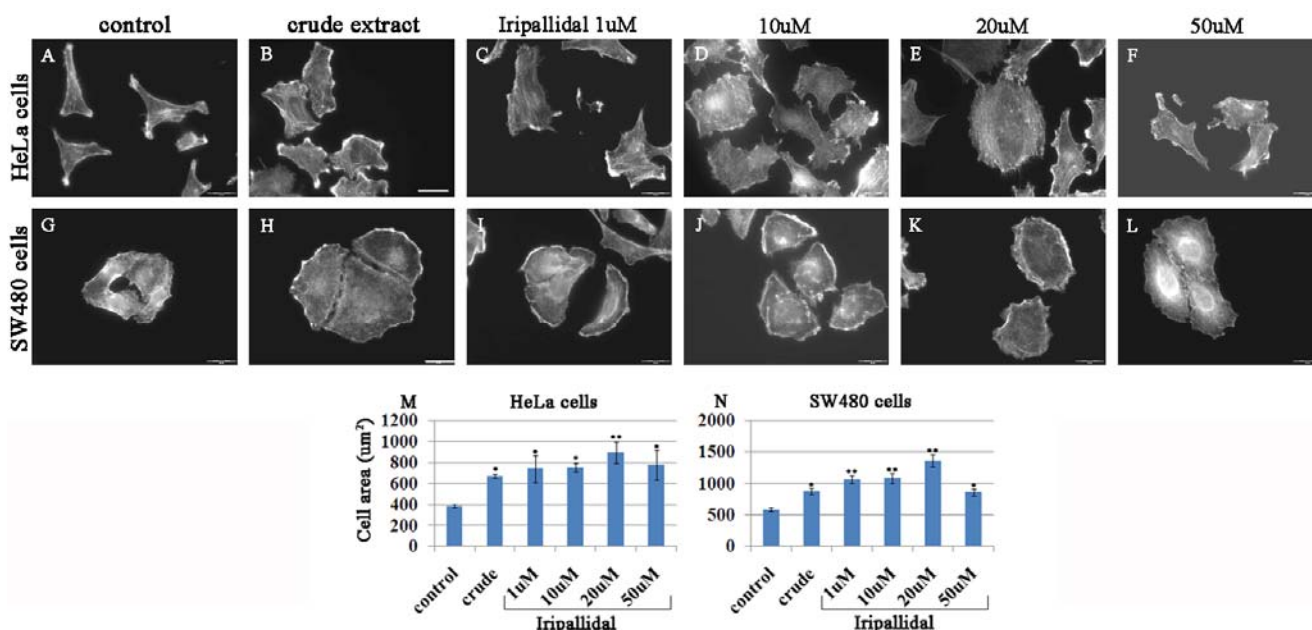


איור 5. סיכום מדידות שטחי תאי HeLa בנוכחות המיצוי והטיפולים השונים במעכבים. תאי HeLa טופלו במיצוי בנוכחות מוטנטים של Rac1 או מעכב של Rho (Y-27632) ושטחי התאים חושבו. כל ניסוי נערך בלפחות 3 חזרות כאשר בכל פעם נמדדים 50 תאים. עמודות המסומנות באותיות שונות נבדלות זו מזו במובהקות של $p < 0.05$ לפי מבחן Scheffe.

בחינת פעילות גילתה שפרקציות 1c, 2a ו-2b הכילו פעילות על תאי HeLa. חמש הפרקציות שנוקו מוצו מהסיליקה וכ-20 מ"ג מכל אחת נשלחו לזיהוי ב-NMR ע"י דר' הוגו גוטליב מאונ' בר אילן. בשלוש מתוך החמש הזיהוי הצליח והתברר שהכילו חומרים מקבוצת האירידלים המאפינים צמחי איריס שונים. נמצא שפרקציה 1a הכילה 17-hydroxy-18,19-epoxyiridal שהוא אירידל חדש שלא תואר לפניכן אך חסר פעילות במערכת שלנו. פרקציה 1c הכילה 90% iripallidal and 10% iriflorental ואילו פרקציה 2b הכילה 60% 17-hydroxyiridal, 30% 16-hydroxyiridal and 10% iripallidal (איור 6).



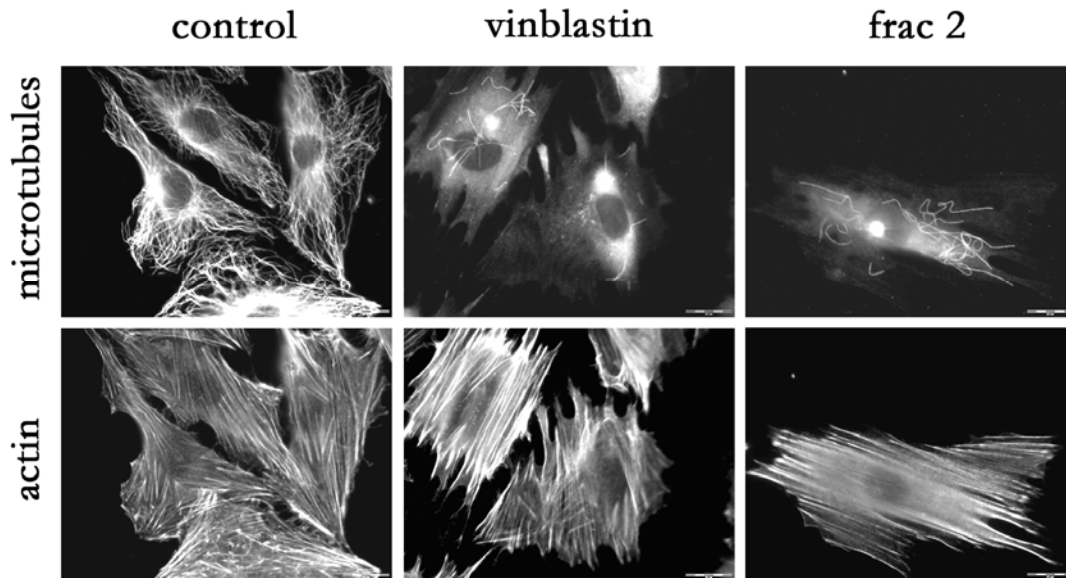
איור 6. תאור סכמתי של האירידלים שבודדו בעבודה.



איור 7. פעילות של אירידל מסחרי. תאי HeLa או SW480 טופלו בריכוזים עולים של אירידל כפי שמצויין בתמונה. התאים קובעו, נצבעו לאקטין וצולמו במיקרוסקופ. F-A תאי HeLa, G-L תאי SW480. N,M אנליזה כמותית של שטחי התאים. סמן גודל 20 מיקרון.

מכיוון ששתי הפרקציות הפעילות הכילו איריפלדל ומכיוון שניתן להשיגו נקי מחברה מסחרית בדקנו האם הוא פעיל ונמצא שכן. בהמשך בדקנו מה הריכוז האפקטיבי של החומר הנקי והאם יש ביכולתו של איריפלדל לעודד השתטחות והגדלה של תאי סרטן נוספים. תאי HeLa ותאי SW480 של סרטן מעיים טופלו בריכוזים שונים של איריפלדל מסחרי למשך שעה וחצי ולאחר מכן התאים קובעו ונצבעו לאקטין. התאים צולמו במיקרוסקופ ושטחם נמדד (איור 7). נמצא ש-20uM הוא הריכוז האפקטיבי ביותר בו הוכפל שטח התאים הן של HeLa והן של SW480.

5. המשך הסריקה לחומרי טבע המפרקים מיקרוטובולי נעשה. איור 8 מראה את פעילותה של פרקציה 2 מתהליך ההפרדה של המיצוי מהצמח שנאסף בחרמון. הפעילות דומה לזו של וינבלסטין מסחרי, אלקלואיד מוינקה, המשמש כיום בטיפול כימותרפי ואנו מקוים לגלות שזהו חומר חדש.



איור 8. תאי Ref52 טופלו בווינבלסטין או במיצוי ונצבעו לאקטין או למיקרוטובולי. פרקציה מנוקה מס' 2 מראה פעילות של פירוק מיקרוטובולי בדומה לווינבלסטין. סמן גודל 20 מיקרון.

דיון

מציאת חומר ביולוגי חדש שעדיין לא תואר בספרות היא משימה לא קלה. בעבודה זו גילינו פעילות חדשה לאיריפלדיל שהוא אירידיל ידוע. הפעילות מתאפיינת בהגברת cell adhesion בתאי סרטן משני סוגים. הגברת התכונה הזו זוהתה בסריקה הודות להגברת סיבי האקטין בתאים המטופלים. שלד אקטין הינו דינאמי ומשנה צורה לביצוע תפקידים שונים בתאים. שינויי הארגון של סיבי האקטין מתאפשרים הודות לדינאמיקה של פרוק ופילמור. במקרים רבים, שיווי המשקל בין הפירוק והפילמור מופרע בעקבות טרנספורמציה סרטנית (33). ישנן עדויות כי ההשפעה על שלד האקטין נובעת מירידה בביטוי של חלבונים קושרי אקטין וכי הגברה מלאכותית של ביטויים יכולה להוביל לשינוי הפנוטיפ הסרטני וחזרתו למצב הנורמלי על ידי יצירת סיבי אקטין, והגברת התאחיזה למדיום החוץ תאי (12, 13, 34-36). תופעה דומה ראינו בנוכחות איריפלדיל. בספרות מדווח רבות על אירידילים שהם טריטרפנים מאירוס (37-48). לאירידילים נמצאו פעילויות שונות, ביניהן גם אנטי סרטנית (42).

פרוט מלא של הפרסומים המדעיים:

Michal Halpert, Mohamad Abu-Abied, Dror Avisar, Yoni Moskovitz, Osnat Altshuler, Avner Cohen, Mira Weissberg, Joseph Rioy, Hugo E. Gottlieb, Avichai Perl and Einat Sadot (2011)

1. M. J. Balunas, A. D. Kinghorn, *Life Sci* 78, 431 (Dec 22, 2005).
2. M. S. Butler, *J Nat Prod* 67, 2141 (Dec, 2004).
3. M. Gordaliza, *Clin Transl Oncol* 9, 767 (2007).
4. M. S. Ali-Shtayeh, M. A. Al-Nuri, R. M. Yaghmour, Y. R. Faidi, *J Ethnopharmacol* 58, 143 (Nov, 1997).
5. M. S. Ali-Shtayeh, Yaghmour, R.M.-R., Faidi, Y.R., Salem, K., Al-, M. A. Nuri, *Journal of Ethnopharmacology* 60, 265 (1998).
6. H. Azaizeh, S. Fulder, K. Khalil, O. Said, *Fitoterapia* 74, 98 (Feb, 2003).
7. A. Dafni, Z. Yaniv, D. Palevitch, *J Ethnopharmacol* 10, 295 (May, 1984).
8. J. Friedman, Yaniv, Z., Dafni, A., Palewitch, D., *Journal of Ethnopharmacology* 16, 275 (1986).
9. F. Silva, Abraham, A., *Fitoterapia* 52, 195 (1981).
10. Z. Yaniv, Dafni, A., Friedman, J., Palewitch, D., *Journal of Ethnopharmacology* 19, 145 (1987).
11. O. Said, K. Khalil, S. Fulder, H. Azaizeh, *J Ethnopharmacol* 83, 251 (Dec, 2002).
12. G. Pawlak, D. M. Helfman, *Curr Opin Genet Dev* 11, 41 (Feb, 2001).
13. J. L. Rodriguez Fernandez *et al.*, *J Cell Biol* 119, 427 (Oct, 1992).
14. B. M. Schmidt, D. M. Ribnicky, P. E. Lipsky, I. Raskin, *Nat Chem Biol* 3, 360 (Jul, 2007).
15. T. Okouneva, B. T. Hill, L. Wilson, M. A. Jordan, *Mol Cancer Ther* 2, 427 (May, 2003).
16. M. Gordaliza, P. A. Garcia, J. M. del Corral, M. A. Castro, M. A. Gomez-Zurita, *Toxicon* 44, 441 (Sep 15, 2004).
17. S. B. Horwitz, *J Nat Prod* 67, 136 (Feb, 2004).
18. P. B. Schiff, J. Fant, S. B. Horwitz, *Nature* 277, 665 (Feb 22, 1979).
19. G. M. Cragg, D. J. Newman, *J Nat Prod* 67, 232 (Feb, 2004).
20. R. A. Dixon, *Nature* 411, 843 (Jun 14, 2001).
21. S. Hattenschwiler, P. M. Vitousek, *Trends Ecol Evol* 15, 238 (Jun, 2000).
22. B. Weisshaar, G. I. Jenkins, *Curr Opin Plant Biol* 1, 251 (Jun, 1998).
23. M. Wink, *Adv. Bot. Res.* 25, 141 (1997).
24. M. Wink, *Annual Plant Reviews* 2, 1 (1999).
25. I. Raskin *et al.*, *Trends Biotechnol* 20, 522 (Dec, 2002).
26. L. Reddy, B. Odhav, K. D. Bhoola, *Pharmacol Ther* 99, 1 (Jul, 2003).
27. A. Bershadsky, A. Chausovsky, E. Becker, A. Lyubimova, B. Geiger, *Curr Biol* 6, 1279 (Oct 1, 1996).
28. S. Etienne-Manneville, A. Hall, *Nature* 420, 629 (Dec 12, 2002).
29. X. D. Ren, W. B. Kiosses, M. A. Schwartz, *Embo J* 18, 578 (Feb 1, 1999).
30. C. Soulet *et al.*, *FEBS Lett* 507, 253 (Nov 2, 2001).
31. R. Khosravi-Far, P. A. Soliski, G. J. Clark, M. S. Kinch, C. J. Der, *Mol Cell Biol* 15, 6443 (Nov, 1995).
32. C. K. Chou *et al.*, *Life Sci* 78, 1823 (Mar 13, 2006).
33. E. Friedman, M. Verderame, S. Winawer, R. Pollack, *Cancer Res* 44, 3040 (Jul, 1984).

34. V. Bhargavi, V. B. Chari, S. S. Singh, *Biochem Mol Biol Int* 46, 241 (1998).
35. U. Gluck, D. J. Kwiatkowski, A. Ben-Ze'ev, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 383 (Jan 15, 1993).
36. R. S. Maul *et al.*, *J Cell Biol* 160, 399 (Feb 3, 2003).
37. F. Benoit-Vical, C. Imbert, J. P. Bonfils, Y. Sauvaire, *Phytochemistry* 62, 747 (Mar, 2003).
38. C. Bicchi, P. Rubbiolo, M. Fresia, *phytochemical analysis* 7, 37 (1996).
39. R. D. Bonfil, Russo, D.M., Binda, M.M., Delgado, F.M., Vincenti, M., *Urologic Oncology* 7, 159 (2002).
40. M. Bonfill *et al.*, *Biomed Chromatogr* 20, 151 (Feb, 2006).
41. J. P. Bonfils, F. J. Marner, Y. Sauvaire, *Phytochemistry* 48, 751 (1998).
42. J. P. Bonfils, F. Pinguet, S. Culine, Y. Sauvaire, *Planta Med* 67, 79 (Feb, 2001).
43. J. P. Bonfils, Y. Sauvaire, *phytochemistry* 41, 1281 (1996).
44. J. P. Bonfils, Y. Sauvaire, L. Maurin, *Planta* 200, 353 (1996).
45. R. Fang, P. J. Houghton, C. Luo, P. J. Hylands, *Phytochemistry* 68, 1242 (May, 2007).
46. H. Ito, S. Onoue, Y. Miyake, T. Yoshida, *J Nat Prod* 62, 802 (May, 1999).
47. K. Takahashi, Y. Hoshino, S. Suzuki, Y. Hano, T. Nomura, *Phytochemistry* 53, 925 (Apr, 2000).
48. K. Takahashi, S. Suzuki, Y. Hano, T. Nomura, *Biol Pharm Bull* 25, 432 (Apr, 2002).
49. M. Halpert *et al.*, *Protoplasma* (Jan 5, 2011).

סיכום עם שאלות מנחות

נא להתייחס לכל השאלות בקצרה ולעניין. ב-3 עד 4 שורות לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).

שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.

הערה: נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
מטרות המחקר הושגו באופן חלקי. נמצא חומר בעל פעילות אנטי סרטנית אך מכיון שהיה ידוע לא ניתן למסחרו
עיקרי הניסויים והתוצאות.
נסרקו שלושה סוגי תאים: HeLa, Ref52, SW480 נמצאו שני חומרים פעילים: 1. איריפלידל. 2. חומר מפרק מיקרוטובולי שטרם זוהה.

מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?
המסקנה העיקרית שקשה מאד למצוא חומרי טבע חדשים שטרם זוהו. כמו כן חברות מסחריות לא מעונינות לטפל בחומרי טבע ידועים שאי אפשר לרושםם כפטנט. בנוסף הן דורשות אינדיקציות לפעילות מוכחת בחיות
בעיות שנתרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתרה לביצוע תוכנית המחקר?
המימון למחקר הסתיים, למרות זאת אנו ממשיכים בזיהוי החומר המפרק מיקרוטובולי ומשלימים את סריקה לחומרים בעלי פעילות להוצאת החלבון ביטא קטנין מהגרעין בתאי סרטן מעיים
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; פטנטים - יש לציין שם ומס' פטנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי.
תוצאות ראשוניות הוצגו בכנס של האגודה הישראלית לביולוגיה ניסויית באילת וביום עיון של שה"מ וכמו כן בכנס ביוטכנולוגיה של צמחים בסנט-לואיס, ובמכון Ordway לחקר הסרטן באלבני, ניו-יורק.
כמו כן פורסם מאמר בעיתון Protoplasma
(49)
פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)
רק בספריות <
ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) X <
חסוי – לא לפרסם <
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן - לא -

*יש לענות על שאלה זו רק בדוח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדוח שנה שניה במחקר שאושר לשלוש

שנים