دراسة التاثير السمي لمستخلصات نبات القنب *Bidens tripartita* و الجينسينج *Panex ginseng* و قلف نبات القرفة *Ceylon cinnamon* ونبات الحنظل *Citrullus colocynthis* الخام في الخط السرطاني لخلايا غدة الثدي الفاري

حنان عدنان شاكر النعيمي

معهد الهندسة الوراثية و التقنيات الاحيائيه للدراسات العليا ،جامعة بغداد

استلم البحث في :20، كانون الاول، 2010

قبل البحث في: 18 ،نيسان، 2011

الخلاصة

درس التاثير السمي للمستخلصات النباتية لنبات القنب ، و الجينسينج، وقلف القرفة ،و الحنظل بتراكيز مختلفة 125و250و500و1000 مايكروغرام / مليلتر على خط الخلايا السرطاني لغدة الثدي الفاري . اذ حُضّرت المستخلصات بطريقة الاستخلاص المائي الحار ، و تم الكشف عن مكوناتهم الكيميائية ووجد ان المستخلصات ذو رقم هيدروجيني حامضي . وتم تعريض المستخلصات بثلاث مدد (24 و48 و 72) ساعة و كانت السمية واضحة للمستخلصات النباتية اعتمادا على الوقت و الجرعة و كان لمستخلص قلف نبات القرفة افضل فعالية سمية للخلايا السرطانية بنسبة 87.33 % ، و يليه مستخلص نبات القنب 86.79% ، و الحنظل 74.39% ، و اخيرا مستخلص نبات الجينسينج 70.71% على التوالي .

الكلمات المفتاحية :– المستخلص ،نبات القنب، الجينسينج ،القرفة ،الحنظل ،السرطان.

المقدمة

تعد الامراض السرطانية احدى المشكلات الصحية الخطيرة والمهلكة التي تتحدى الانسانية في العصر الحديث فهي تنتشر بشكل كبير في الجسم لتكون اهم اسباب الوفيات في العالم ، اذ تأتي في المرتبة الثانية بعد امراض القلب والشرايين ، وصلت نسبة الاصابة بالسرطان في العراق الى اكثر من 10888حالة للمدة بين 1999–2000 (وزارة الصحة – مركز تسجيل السرطان في العراق) وارتفعت النسبة في السنوات اللاحقة ،واصبح بمثابة الشبح الذي يثير الرعب بين الكثير من الناس ويهدد حياتهم . ويطلق مصطلح (cancer) على جميع انواع الاورام الخبيثة والحميدة في حين ان مصطلح carcinogenesis يعني التغيرا التي تشترك في نشوء كل انواع الاورام الخبيثة[1].

و يعد سرطان الثدي في مقدمة الامراض السرطانية التي تصيب الاناث في جميع الاعمار ويزداد خطر الاصابة بالمرض في عمر 50 سنة فما فوق مع اتجاه عام في الوقت الحاضر نحو زيادة الاصابة به في المجاميع صغيرة العمر تحت سن الـ 40 سنة . ان سرطان الثدي اما ان يكون وراثيا inherited form او غير وراثيا (sporadic form) ويظهر بالصدفة نتيجة لاسباب مختلفة[2] . ان الشكل الموروث من المرض سببه جين مكتشف حديثاً يسمى جين BRC A1 ويقع على الذراع الطويل للكروموسوم رقم 17 . وهناك جين اخر فضلاً عن لهذا الجين له علاقة بسرطان الثدي هو BRC A2 موجود على الكروموسوم رقم 13 [3]. والشكل غير الوراثي متعلق بعوامل هرمونية او فيروسية

او عوامل بيئية اوالنمط الحياتي والتغذوي او عوامل مرضية[4] او عوامل فيزيائية مثل التعرض للأشعاع [5] . وتنتقل الاورام التي تصيب خلايا الثدي الى العقد اللمفاوية الابطية والرئة والكبد و الدماغ و العظام [6].

وصار الباحثون يعدون العدة عن اسباب الداء وعلاجه والوقاية منه فاتحين بذلك عصراً جديداً يبشر بحدوث تغير جذري في مسيرة علاج هذا الداء ، فالسرطان مدفون في غموض الحياة نفسها ، وفي اسرار الخلية البشرية يكمن المفتاح فيها الذي يعتقد العلم انه سيحل لغز السرطان و اتجهت الابحاث العلمية الحديثة الى مسلك جديد يختلف عن الاتجاه السابق في العلاج الكيميائي للسرطان الذي اعتمد في الاساس على انتخاب مركب كيميائي ما لعلاج نوع سرطاني معين ولسوء الحظ فأن غالبية هذه المركبات لها عيب العلاج الاشعاعي نفسه فهي تدمر الخلايا الطبيعية الى جانب الخلايا السرطانية ، ويميل علاج السرطان حديثاً نحو الطبيعة الام التي اتحفنا بها الخالق عز وجل وبما وهبنا من نباتات واعشاب طبيعية حاوية على الكثير من المواد الكيميائية التي تؤلف مجموعها كما هائلاً من الاسرار التي لا نعرف عنها سوى القليل لذا استعملت مستخلصات مائية حارة لنباتات (القنب و القرفة و الجينسينج والحنظل) لاختبار سميتها على الخلايا السرطانية ، اذ ان لهذه المركبات اليات عديدة من شأنها ان تؤدي الى تثبيط قدرة الخلية السرطانية على النمو او الانتشار او القتل [7] .

المواد وطرائق العمل

*** تحضير المستخلصات المائية الخام لنباتات (القنب، و الجينسينج، و القرفة والحنظل).**

حضر المستخلص المائي الخام [8] على النحو الاتي :-

. وضع 50 غرام لكل من مساحيق النباتات في دوارق حجمية واضيف لكل منها 250 مليلترمن الماء المقطر اغلقت فتحات الدوارق بوساطة فلينة ووضعت على سخان صفيحي مغناطيسي وترك ليمتزج جيدا بوساطة مازج مغناطيسي وبدرجة حرارة 45 درجة مئوية .بعدها رشح المحلول بأستعمال الشاش الطبي اولاُ ثم ورق الترشيح واتمان رقم (1). لحين الحصول على راشح عديم اللون جفف الراشح بأستعمال جهاز المبخر الدوار وعلى درجة حرارة لا تتعدى 40 م . اعيدت الخطوات التالية لكل من المستخلصات المذكورة اعلاه لحين الحصول على راشح مجفف للمستخلصات اعلاه واستخرجت اوزان المستخلصات الخام الناتجة من 50 غرام من مساحيق النباتات.

***تحضير الكشوفات الكيميائية للمستخلصات الخام** :- تم الكشف وفقاً لما جاء عن [9] كمايأتي.

1 -الكشف عن الكلايكوسيدات (Glycosides):-

• مزج جزءان متساويان من كاشف فهلنك و المستخلص المائي لمسحوق النبات ثم ترك في حمام مائي مغلي مدة 10 دقائق واستدل على إيجابية الفحص من خلال وجود الكلايكوسيدات بظهور راسب احمر.

• للتثبت من هذه النتيجة أضيف 1 مللتر من المستخلص المائي إلى 5 مللتر من كاشف بندكت ،اذ يؤكد ظهور راسب احمر على وجود الكلايكوسيدات .

2 - الكشف عن التانينات (Tannins): -غليت 10 غرام من المسحوق النباتي في 50 مللتر ماء مقطر رشح المحلول باستعمال ورقة الترشيح(Ederol No.2) وترك الراشح يبرد، ثم أضيف 1% خلات الرصاص للاستدلال على وجود التانينات بظهور راسب هلامي القوام .

3 – **الكشف عن الفينولات (Phenols)**:-غليت 10 غرام من المسحوق النباتي في 50 مللتر ماء مقطر رشح المحلول باستعمال ورقة الترشيح(Ederol No.2) وترك الراشح يبرد، ثم أضيف 1%كلوريد الحديديك اذ يدل ظهور اللون الأخضر المزرق على وجود الفينولات.

4 – الكشف عن الصابونينات(Saponins)

تم الكشف بطريقتين :

A– رج المحلول المائي لمسحوق النباتات بشدة في أنبوبة اختبار واستدل على وجود الصابونينات بظهور رغوة كثيفة تبقى مدة طويلة .

B– اضيف 5 مللتر من المستخلص المائي لمسحوق النباتات إلى (1 – 3) مللتر من محلول كلوريد الزئبقيك يشير ظهور الراسب الابيض إلى إيجابية الفحص.

5 – الكشف عن الراتنجات (Resins):-

اضيف 50 مللتر من الكحول الاثيلي بتركيز 95 % إلى 5 غرام من المسحوق النباتي وبعد ان ترك في حمام مائي يغلي مدة دقيقتين رشح بورقة (Ederol No.2) ثم اضيف للراشح 10 مللتر ماء مقطر مستحمض بحامض الهيدروكلوريك و يستدل على وجود المواد الراتنجية بظهور عكارة .

6 – الكشف عن القلويدات (Alkaloids):-

غلي 10 غرام من المسحوق النباتي مع 50 مللتر ماء مقطر مستحمض 4 % من حامض الهيدروكلوريك ثم رشح المحلول بورقة ترشيح (Ederol No.2) بعد تبريده واختبر 0.5 مللتر من الراشح في زجاجة ساعة (Watch glass) مع كل من الكواشف الاتية كل على انفراد :

كاشف واكنر: ظهور راسب بني يشير إلى وجود القلويدات .

كاشف ماير: ظهور راسب ابيض يشير إلى وجود القلويدات.

حامض البكريك: ظهور راسب اصفر يشير الى وجود القلويدات.

كاشف دراكندروف: ظهور راسب برتقالي يشير الى وجود القلويدات.

7 – الكشف عن الكومارينات (Coumarins):-

ذيبت كمية قليلة من المستخلص النباتي في الكحول في أنبوبة اختبار ،غطيت فوهة الأنبوبة بورقة ترشيح مرطبة بمحلول هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) المخفف ووضعت في حمام مائي مغلي لبضع دقائق ، ثم عرضت الورقة للاشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز (U.V) بطول موجي 336 نانومتر ان ظهور لون اصفر – مخضر براق دلالة على وجود الكومارين.

8 – الكشف عن الفلافونات (Flavones) :-

حضر المحلول(A) بإذابة 10 غرام من المسحوق النباتي في 5 مللتر من الكحول الاثيلي بتركيز 95 % ثم رشح المحلول بورقة ترشيح (Ederol No.2) .

حضر المحلول (B) بإضافة 10 مللتر من الكحول الاثيلي بتركيز 50%وعند مزج كميات متساوية من كلا المحلولين يدل ظهور اللون الأصفر على وجود الفلافونات.

- **تهيأة خطوط الخلايا السرطانية لغدة الثدي الفأري (AMN–3)** تسلّم هذا الخط من المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية \ الجامعة المستنصرية اجريت الخطوات الخاصة بالزرع النسيجي تحت ظروف معقمة [10] وكمايأتي .

اضيف 2 مل من محلول التربسين / فرسين المحضر (بأضافة 20 مل تربسين مع 10 لتر فرسين و 370 مل PBS مزجت المحاليل اعلاه في ظروف معقمة وحفظت في 4 درجات مئوية . الى صفيحة الزرع النسيجي حجم 50سم الحاوي على الخلايا بعد تفريغها من الوسط الزرعي و غسلها بمحلول PBS المعقم و المحضر كمايأتي.

8gm NaCl +0.2gkCl + 0.15g Na_2HPO_4 +0.20gKH_2PO_4+1000ml distilled water

عقمت المحاليل بالموصدة بدرجة حرارة 121م مدة 15 دقيقة و قيس pH 7.2 ثم حفظت بدرجة 4م . ثم حركت الصفيحة برفق و حفظت في حاضنة بدرجة حرارة 37م مدة 15دقيقة لتفكيك الخلايا الملتصقة و كذلك خلخلة التصاقها بجدار الوعاء للحصول قدر الامكان على خلايا احادية مفردة.

اضيف الى الوعاء الحاوي على الخلايا المفككة حوالي 15 مل من وسط نمو جديد (RPMI-1640) Ross well park memorial Institute (sigma,USA)

و المحضر RPMI-1640 with hepes buffer , L –glutamin 10.4 gr +Sodium Bicarbonate 4.4% + Pencillin o.5 ml +Streptomycin 0.5%ml+Bovine calf serum 10%. اكمل الحجم الى لتر باضافة الماء المقطر مزدوج التقطير / ثم عقم بمرشح ذي ثقوب بقطر 0.22 مايكرون } .

و حُرَك الوعاء جيدا و بعدها افرغت محتويات الوعاء الحاوي على الوسط الغذائي الجديد مع الخلايا الى وعاء أخر جديد بحيث يكون مستوى الوسط الزرعي مع الخلايا و تسمى هذا العملية بالمزرعة الثانوية .

حضنت الاوعية بدرجة حرارة 37م مدة 3 ايام و تمت متابعة القناني يومياً لتأكيد خلوها من اي تلوث ،و ان الخلايا بحالة جيدة و ذلك لفحصها بوساطة المجهر المقلوب Inverted microscope و عندما تصبح الخلايا ذا نمو جديد متمثل بتكوين طبقات عديده من الخلايا over growth تكون بتلك الخلايا جاهزة للأستعمال .

***عد الخلايا الحية Viable cell count**

عدت الخلايا الحية وفقا [10] لكل نوع من الخلايا بأستعمال صبغة التريبان الزرقاء (Trypan blue) والمحضرة كمايأتي .

(اذيب 1 غرام من مسحوق الصبغة في 100 ملليلتر محلول هانكس ثم رشح بورق واتمان رقم 1 ، وحفظ بدرجة حرارة 4 درجة مئوية الى حين الاستعمال وحينها خفف بنسبة 1 : 10 بأستعمال محلول هانكس مباشرة)

اذ تأخذ الخلايا الحيه الصبغة ببضع ثوان مما يجعلها سهلة التمييز عن الخلايا الميته ويتم ذلك بمزج 0.2 مليلتر من الخلايا و 0.2 مليلتر من الصبغة مع 1.6 مليلتر من PBS المحضر سابقاً ، ثم تحسب الخلايا بأستعمال شريحة العد التفريقي .

***اختبار سمية المستخلصات الخام لنباتات (القنب و الجينسينج و الحنظل والقرفة) على نمو الخطوط الخلوية السرطانية :-**

اذيب 0.02 غم من المستخلص الخام في 10 مليلتر من المذيب (0.9 مل وسط PRMI بدون اضافة مصل عجل البقر ويسمى SFM + 0.001% (Dimethyl sulfoxide (DMSO)

ثم عقم بأستعمال مرشح ذي ثقوب بقطر 0.22 مايكرون وحضرت منه 4 تراكيز وهي(125 و250 و500و1000) مايكروغرام / مليلتر وتحت ظروف معقمة . استعملت جميع التراكيز المحضرة مباشرة بعد اكمال عملية التحضير [11] و[12].

جهز عالق الخلايا عن طريق معاملة قنينة الزرع النسيجي حجم 25 سم2 بمحلول التربسين / فرسين ثم اضيف له 20 مليلتر من الوسط الزرعي الجديد الخالي من المصل (Serum Free Media (SFM والمحضر كمايأتي (وسط RPMI- 1640 ولكن بدون اضافة مصل عجل البقر) ثم مزج عالق الخلايا جيداً وتم نقل 0.2 مليلتر بعد كل مزجة جيدة الى حفر طبق معايرة الزرع النسيجي ذي القعر المسطح بأستعمال ماصة اوتوماتيكية دقيقة ، بحيث احتوت كل حفرة على عدد معلوم من الخلايا الحية (10^5x1 / حفرة ، بعد ان تم عد الخلايا الحية من الميته بوساطة صبغة Trypan blue. ترك الطبق في الحاضنة بدرجة حرارة 37م مدة تتراوح بين 12 – 18 ساعة الى حين التصاق الخلايا في الحفرة وبعدها تم التخلص من الوسط الزرعي القديم في الحفر وتم اضافة 0.2 مليلتر من التراكيز المحضرة سابقاً لكل من المستخلصات وبواقع 3 مكررات لكل تركيز . كما تم عمل ثلاثة مكررات لكل من السيطرة الموجبة (خلايا مضافاً اليها DMSO) والسيطرة السالبة (خلايا فقط) وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م في حاضنة مزودة بـ 5 % من غاز CO_2 بعد مرور مدة التعريض المحددة للحضن ، اخرج الطبق من الحاضنة واضيف اليه 50 مايكرولتر من محلول صبغة الاحمر المتعادل واعيد الطبق ثانية الى الحاضنة ليحضن ساعتين ، بعدها اخرج الطبق وازيلت محتوياته وغسلت الخلايا بمحلول PBS المحضر سابقاً لحين زوال الصبغة الزائدة ، اذ ان الخلايا الحية تأخذ الصبغة اما الخلايا الميتة فلا تأخذها.بعد ذلك اضيف لكل حفرة 50 مايكروليتر من محلول داريء الفوسفات الملحي المحمض بالايثانول المطلق بنسبة 1:1 (محلول استخلاص الصبغة) . اما المزرعة الطبيعية فقد استعملت المستخلصات الاربعه الخام انفسها . قرأت النتائج بأستخذام جهاز الاليزا بطول موجي 492 نانومتر ووجد الـ Cytotoxic Concentration وفقاً لما جاء في [10] .

التحليل الاحصائي:- كما تم تحليل البيانات اعتمادا على التصميم العشوائي الكامل لدراسة تاثيرالتراكيز المختلفة من المستخلصات و جرى مقارنة المتوسطات باستعمال اختبار T-test و بمستوى احتمال 5% و نفذ التحليل باستعمال البرنامج الاحصائي[13] .

النتائج و المناقشة

بلغت نسبة المستخلص المائي لنبات القنب، و الجينسينج، و القرفة، والحنظل نسبة الى اوزانها الجافة6,2%، 3,5% ،8,3% و4,1% على التوالي وتلون مستخلص نبات القنب بلون بني مخضر ، أما مستخلص الجينسينج والحنظل ظهرا بلون اصفر مخضر ، بينما كان مستخلص القرفة متميزا" باللون البني الغامق وهذا يعود الى المركبات الكيميائية المتواجدة في كل مستخلص كما موضحة في الجدول (1).

كما تم معرفة التأثير السمي للمستخلصات الخام في خط الخلايا السرطاني لغدة الثدي الفأري AMN-3 بعد ان عومل الخط السرطاني بأربعة تراكيز وهي 125،250،500،1000 مايكروغرام / مليلتر وخلال ثلاث مدد من التعريض 24،48 ،72 ساعة على التوالي . فكانت النتائج الاحصائية المستحصلة تشير الى نبات القنب ونبات قلف

القرفة بدء التركيز المعنوي المؤثر 125 مايكروغرام/ مليلتر خلال 24 ساعة ،بينما مستخلص نبات الجينسينج فكان التركيز المعنوي هو 250 مايكروغرام \مليلتر خلال 24 الساعة اما مستخلص نبات الحنظل فكان التركيز 500 مايكروغرام \مليلتر هو التركيز المعنوي المؤثر خلال 24 ساعة كما مبين في الجدول (2).

كما كانت هناك اختلافات معنوية بمستوى 0.05 للمستخلصات انفسها ولكن بتراكيز مختلفة بالنسبة لمستخلص نبات القنب والحنظل اما بالنسبة الى مستخلص نبات الجينسينج فلم تظهر الفروقات المعنوية بين التراكيز الثلاثة ماعدا فرق معنوي $p<0.05$ في التراكيز 1000 مايكروغرام /مليلتر وظهر فرق معنوي $p<0.05$ بالنسبة الى مستخلص نبات القرفة بين تراكيز 125و250 مايكروغرام \مليلتر ولاتوجد فروق معنوية بين التراكيز 1000 و500 مايكروغرام /مليلتر . وذلك لوجود نوعين من الخلايا العائدة للخطوط المستعملة انفسها احدهما الحساسة والاخرى المقاومة وتسمى هذه الظاهرة ب Biphasic curve .

وربما يعود السبب في وجود النسبة القليلة التي ظهرت في الخلايا السرطانية المقاومة للفعل العلاجي هو ان المادة الوراثية للخلايا السرطانية تكون في العادة غير طبيعيه ومشوهه وهذا مااثبته الباحث[14] الذي فحص بشكل شامل الكروموسومات في خط الخلايا Hep 2 السرطاني وان هذا التشوه ربما يؤدي الى حصول طفرات التي قد تستحث جينات مقاومة لفعل العلاجات الكيميائيه .اذ تؤدي المستخلصات النباتية دورا اساسيا في سمية الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي كما موضح في الجدول رقم (3) لاحتوائها على فيتامين C ومركبات الفينولات المتعددة ومن ضمنها مركبات الفلافونيدات التي تعمل بوصفها مركبات مضادة للاكسدة(Antioxidant) في تاثيرها على الخلايا السرطانية[15]. إذ ان لهذه المركبات تاثيراً تثبيطياً شديداً في نمو خلايا الخط السرطاني Hep-2 عن طريق ايقاف عملية تضاعف ال DNA [16]كذلك تؤثر هذه المركبات في الالية السرطانية من خلال تثبيط فعالية الجين BCL-2 ونتيجة للخلل الحاصل في هذاالجين تدخل الخلية السرطانية في مرحلة الموت المبرمج وذلك لقابليتها على كنس الجذور الحرة المتولدة عند تحول الخلايا الطبيعية الى خلايا سرطانية لاحتوائها على مجموعة الهيدروكسيل ومن ثم توجه الخلية للدخول في مرحلة الموت المبرمج[17].فضلا عن نفاذية اغشية الخلايا السرطانية تكون متغيرة نتيجة لتحول الخلايا الطبيعية الى خلايا سرطانية ، الامر الذي يسهل دخول المركبات الى داخل الخلية و بشكل عشوائي غير منتظم مما يؤثر سلبا في الخلية السرطانية في حين يكون هنالك نظام صارم ومسيطرعليه لدخول وخروج المواد من والى داخل الخلية الطبيعية [18] .كمايكون شريطا ال DNA في الخلايا السرطانية بشكل منبسط و الجزيئة ككل غير مستقرة بسبب تباعدالاواصر الهيدروجينيه التي تربط شريطا الدنا الامر الذي يسهل عملية ارتباط المركبات الداخلة او الخارجة بسلسلتي الDNA في حين يكون دنا الخلية الطبيعية مرصوصا بشكل قوي و الاواصر الهيدروجينيه غير متباعدة وهذا يعيق ارتباط المركبات المختلفة و التاثير فيها [19] .كما سجل التركيز السمي القاتل

لنصف عدد الخلايا CC50 Cytotoxic Concentration بعد استخراج النسبة المئوية لامتصاصية العينة في الحفرة كما في الجدول رقم (4) والشكل رقم (1).

وهذا التاثير السمي كان اكثر وضوحا وبدرجة كبيرة عند مدة تعريض72ساعة من الخط الخلوى السرطاني اذ تعد الجرعة اوالتركيز مع الوقت الظاهرة الاساسية في شدة التاثير السمي للمستخلصات الخام وتسمى هذه الظاهرة (Dose and time dependant phenomena) [20].ومن الجدير بالذكر ان هناك تباينا" بين تاثير المستخلصات الخام فيما بينها على الخط الخلوي السرطاني AMN-3 والسبب قد يعود الى طبيعة المركبات الموجودة في المسخلص الخام وتفاعلها مع الطبيعة الايضية للخط الخلوي السرطاني [21] اذ ان الشكل الحقيقي للعلاقة بين تراكيز المستخلصات الخام والاعداد السرطانية هي علاقة طردية وليست عكسية اي ان شدة التاثير السمي للمستخلصات الخام تزداد بازدياد التراكيز وهذه النتيجة تدعم فكرة التاثير السمي للمستخلصات الخام في الخط الخلوي السرطاني AMN3معتمدا اساسا على الجرعة او التركيز [22] .وبصورة عامة ان الخلايا السرطانية تمتلك خاصية مقاومة متعددة للادوية وهذه الخاصية تعد من المعوقات التي تمنع تاثير العلاجات او الادوية على الخلايا السرطانية بشكل عام لذلك يمكن التخلص منها عن طريق معاملة الخلايا مع معدلات للمقاومة المتعددة للادوية في اثناء اعطاء او تجريب مركب ما[23]. ولهذا ان النتائج المستحصلة كانت مطابقة لماشار اليه [24] في ان مركبات الايض الثانوي مثل الفلافونيدات الموجودة في المستخلصات الخام تمتلك القدرة على تحفيز المناعة الخلوية و احداث تاثير معدل مناعي Immunomodulatory Effect فضلا عن التحفيز على انتاج الانترفيرون نوع كاما و القدرة التثبيطية لانواع معينة من الخلايا السرطانية .و يستنتج من الدراسة ان للمستخلصات المائية الخام لنبات القنب و الجينسينج و القرفة و الحنظل تاثيراً سمياً واضحاً في نمو خلايا الخط الخلوي السرطاني AMN-3 خارج الجسم الحي اعتمادا على التركيز و الوقت و احتوائهم على المركبات الكيميائية التي لها اهمية من الناحية العلاجيه.

المصادر

1.Al-Saleem,T.; Al Habboby, N. and Farman , N. A. (1973). Review Of Cancer Frequency in The Teaching hospital Baghdad Iraq . J . Faculty Med. 15: 1-2.

2 . Brown, P.(1997).Breast Cancer: a lethal inheritance . New Scientist., 1891: 34-38.

3. National Cancer Institute . National Institutes Of Health(1995).Breast Cancer and BRCA1.Gene.: Questions and Answers . Cancer Net:2-3.

4. Kelsey, J. L.(1983). Epidemiology of breast cancer in women In:Dorsi,C.J.and Wilson,R.E.(eds).Carcinoma of the breast :Diagnosis and Treatment USA:1-32.

5. Oncolink Team(1994). Risk Factors and breast cancer .University of Pennsylvania . Cancer Center.

6. Noruzinia, M.; Coupier, L. and Pujol, P. (2005). Is BRCA1 `/BRCA2- related breast Cercinogenesis Estrogen dependant . Cancer .23 : 123-124.

7. Mori, T. ; Ohnishi, M. ; Komiyama, M.; Tsutsui, A.; Yabushita, H. and Okada, H. (2002) Growth inhibitory effect of *Paradicsom paprika* in cancer Cell Lines . Oncology Reports , 9:807-810.

8. Harborn, J. B.; Mabray ,T.j . and mabray, H. (1975) physiology and function of flavonoids. Academic press ,New York, 970

9 . النعيمي،حنان عدنان شاكر(2005) .تقويم فعالية بعض المستخلصات النباتية على نمو البكتيريا المرضيةالموجبة الصبغه المعزوله من حالات التهاب البلعوم و اللوزتين.رساله ماجستيرمقدمة الى معهد الهندسة الوراثية والتقانة الاحيائية للدراسات العليا /جامعة بغداد .

10. Freshney , R. I. (2000). Culture of animal cells : A manual for basic technique (4th ed). *Wiley-_liss*, A John Wiley and Sons,Inc. Publication, New York .566.

11. Abdul-Majeed, M. R. (2000) .induction and characterizatian of su.99 plasmacy cell line and its effect on mice immune response Ph.D thesis , College of Science .Nahrain University.

12. Mahony, D. E.; Gilliatt, E.; Dawson, S.; Stockdale, E. and lee,S. H. S. (1989).Vero cell assay for rapid detection of *Clostridium perfringins* enterotoxin Appl. Environ .Microbiol ., 55;2141-2143.

13-Sas,Institute,Inc.(2000)Users Guide,Version6.12Gary,NC.USA.

14. علي ،امال محمد .(2004) . دراسة وراثية خلوية ومناعية لخط خلايا سرطان الحنجرة HEP_2 رسالة ماجستير ؛ كلية العلوم \ جامعة بغداد

15. Lopez_lazaro, M. (2002).flavonoids as anticancer agents;structure – activity relationship study .Curr .Med .Chem ., 2: 691-714.

16. Elangovan ,V.; Ramamorthy, N.; Balasubrambia, S.; Sekar ,N. and Govindsany, (1994). Studies on the antiprolifrative effect of some naturally occurring bioflavonoidal compounds against human carcinoma of larynx and sarcoma-180 cell Lines . Indian J. Pharm ., 26:266-269

17 . Pellechia ,M. and reed ,J.C.(2004).Inhidition of anti _apoptotic Bcl-2 family proteins dy cancer chemo prevention and chemo therapy . Curr . Pharm . Res ., 10 :1387-1398.

18 .Gratton , J. P.; Lin , M. I. ; yu, J.; Weiss , E. D.; Jiang, Z. L. ;Fairchild, T. A.; Iwakiri,Y.; Groszmann, R., Clafley , K.P.; Cheng. Y.C. and Sessa,W. C.(2003). Selective inhibition of Tumor microvascular premeability by cavtratin blocks tumor progression in mice . cancer cell. 4:1-39.

19. Belijanski, M. (2002) .the anti cancer agent PB_ 100 Selectivity active Malignant cell inhibits Multiplicat.o of sixteen malignant cell lines , even Multidrug resistant.Genet.Mol.Biol. 23:224-235.

20. Huang , S. T. ; Yang, R.C; Chen , M.Y. and Pang, J. H. (2004). Phyllanthus Urinaria induces The Fas Receptor/ Ligand Expression and Ceramide Mediated Apoptosis in Hl-60 Cells .Life Sci, 75:339-351 .

21. Shoieb, A. M.; Elgayyaur, M.; Dudrick, P.; Bell, E. and Titnol ,P. K.(2003) Inhibition of Growth and induction of Apoptosis in Cancer Cell Lines by Thimoquinol .Int.Oncology 22:107-113.

22. Lupi, M.; Matera, G.; Bbbrandurdi , D.; Incalci, M. and Ubezio , P. (2004) Cytostatic and Cytotoxic effects of Topotecan Decoded by a Novel Mathematical Simulation approach .Cancer Res., 64:2825-2832-

23. Coker, H.A; Tiffin , N.; Pritchard-Jones, K.; Pinkerton, C. R. and Kelland, L. R. (2001) In vitro Prevntion of the Emergency of Multidrug Resistance in Pediatric Rhabdomy – Osarcoma Cell line Clin- Cancer Res., 7:3193- 3198.

24. Chiang , L.; Chiang , W.; Chang , M. and lin, C. (2003) In vitro Cytotoxic, antiviral and Immunodulatory effect of *Plantago magor* and plantago . *Am.J. Chin Med.*, 29:245-257.

جدول (1) الكشف الكيميائي لبعض المكونات الاساسية لمستخلصات نبات القنب و الجينسينج و القرفة و الحنظل

المواد الفعالة	مستخلص نبات القنب	مستخلص نبات الجينسينج	مستخلص نبات قلف القرفة	مستخلص نبات الحنظل
الراتنجات	+	+	−	−+
التانينات	+	+	+	+
الكلايكوسيدات	+	−	+	−
القلويدات	+	−	+	+
الصابونينات	+	−+	−	−
الكومارينات	−	−+	+	−
الفينولات	+	+	+	+
الفلافونات	+	+	+	+
الرقم الهيدروجيني	6.5	6.9	6.8	6.9

+ وجود المادة الفعالة ، _عدم وجود المادة الفعالة ، +- وجود المادة الفعالة بكمية قليلة

جدول (2) التركيزالمعنوي المؤثر للمستخلصات النباتية .

بدء التركيز المعنوي المؤثرمايكروغرام \ مليلتر.

نوع المستخلص	24 ساعة	48 ساعة	72 ساعة
مستخلص نبات القنب.	125	125	125
مستخلص نبات الجينسينج	250	125	125
مستخلص نبات القرفه	125	125	125
مستخلص نبات الحنظل	500	250	125

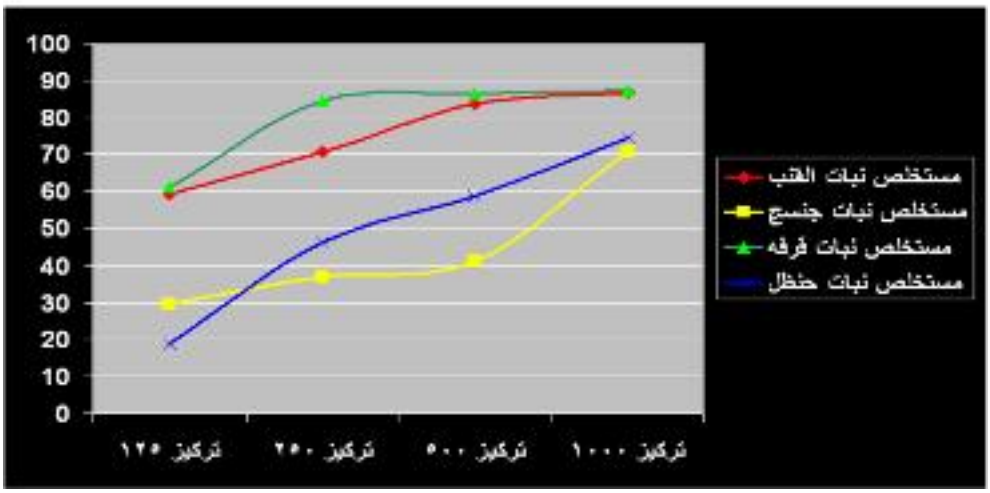
جدول (3) متوسط عدد الخلايا السرطانية المعاملة بالمستخلصات النباتية الخام مقاسة بجهاز الاليزا عند طول موجي 492 نانومتر.

التركيز مايكروغرام/مليلتر	متوسط عدد الخلايا السرطانية المعاملة بمستخلص نبات القنب ± الخطأ لقياسي	متوسط عدد الخلايا السرطانية المعاملة بمستخلص نبات الجينسينج ± الخطأ القياسي	متوسط عدد الخلايا السرطانية المعاملة بمستخلص نبات القرفة ± الخطأ القياسي	متوسط عدد الخلايا السرطانية المعاملة بمستخلص نبات الحنظل ± الخطأ القياسي
السيطرة	a 0.03±0.37	a 0.03±0.37	a 0.03 ±0.37	a 0.03±0.37
125	b 0.01 ±0.15	a0.003± 0.26	b 0.01 ± 0.14	ab0.04±0.28
250	bc 0.03±0.11	a 0.002±0.23	c 0.002 ± 0.057	bc 0.006 ± 020
500	c 0.009 ± 0.06	a 0.006±0.22	c 0.001 ± 0.05	cd 0.01± 0.15
1000	c0.001 ± 0.049	b 0.03 ± 0.11	c 0.003 ± 0.047	d 0.001 ± 0.095
قيمة LSD	0.0744	0.0704	0.051	0.0905

الحروف المختلفة (a,b,c,d,) تشير الى وجود اختلافات معنوية بمستوى 0.05

جدول (4) النسبه المئوية لامتصاصية العينة في الحفرة

نوع المستخلص	التركيز 125 مايكروغرام/مليلتر	التركيز 250 مايكروغرام/مليلتر	التركيز500 مايكروغرام/مليلتر	التركيز 1000 مايكروغرام/مليلتر
مستخلص نبات القنب	%59.29	%70.35	%83.82	%86.79
مستخلص نبات الجنيسينج	%29.64	%36.92	%40.97	%70.71
مستخلص نبات القرفة	%61.18	%84.63	%86.52	%87.33
مستخلص نبات الحنظل	%18.86	%46.09	%58.76	%74.39



الامتصاصية عند طول موجي 492 نانومتر

مايكروغرام / مليلتر

الشكل (1) التركيز السمي القاتل لنصف عدد الخلايا Cytotoxic Concentration

Study of Cytotoxic Effect of Crude Extracts of *Bidens Tripartita,Panex Ginseng,* Ceylon Cinnamon and *Citrullus Colocynthis* on Mice Mammary Adenocarcinoma Cell line

H. A. Sh. Al-Naemi

Genetic Engineering and Biotechnology Institute for Post Graduated Studies, University of Baghdad

Received in: 20, December, 2010

Accepted in: 18, April, 2011

Abstract

The cytotoxic effect of different concentrations of Crude extracts of *Bidens tripartita* , *Panex ginseng* , *Ceylon cinnamon* and *Citrullus colocynthis* on mice mammary adenocarcinoma cell line were studied . The concentration used were 125 , 250, 500, 1000 *Microgram/militer* . The exracts were prepared by using hot water method . The preliminary chemical tests revealed acidic pH of all extracts. The time of exposure used were 24, 48 and 72 hrs.The results showed a clear toxic effect of all extracts depending on the time of exposure and the dose . The *Ceylon cinnamon* had the highest effect on adenocarcinoma 87.33% , followed by *Bidens tripartita* 86.79%, *Citrullus colocynthis* 74.39% and the lowest effect was by *Panex ginseng* extract 70.71%.

Key word: Extract,*Bidens tripatita,Panex ginseng ,Ceylon cinnamon ,Citrullus colocynthis,* Cancer.