



جامعة بغداد

تأثير المستخلص القلوويدي الخام لاوراق نبات المديد  
( Convolvulus arvensis L. )

في الانقسام الخلوي

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية العلوم للنبات - جامعة بغداد

وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم

في علوم الحياة

من قبل

نمارق هادي منصور السعدي

بكالوريوس علوم الحياة - كلية العلوم للنبات

2003

آب 2008م

شعبان 1429هـ



جمهورية العراق  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
جامعة بغداد

تأثير المستخلص القلويدي الخام لأوراق نبات  
المديد ((*Convolvulus arvensis* L.) في  
الأنقسام الخلوي

رسالة مقدمة الى  
مجلس كلية العلوم للبنات-جامعة بغداد  
وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم  
في علوم الحياة

من قبل  
نمارق هادي منصور السعدي  
بكلوريوس علوم حياة-كلية العلوم للبنات  
2003

بإشراف  
أ.م.د. ندى عبد المجيد الأنصاري

آب 2008 م

شعبان 1429 هـ

## إقرار المشرف على الرسالة

أشهد أن أعداد هذه الرسالة الموسومة (تأثير المستخلص القلويدي الخام لأوراق نبات المديد (*Convolvulus arvensis* L.) في الإنقسام الخلوي) قد جرى تحت إشرافي في قسم علوم الحياة / كلية العلوم للبنات/ جامعة بغداد وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة للطالبة (نمارق هادي منصور).

التوقيع:  
اسم المشرف: د. ندى عبد المجيد الأنصاري  
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد  
العنوان: كلية العلوم للبنات/جامعة بغداد  
التاريخ: ٢٠٠٨/ /

### توصية رئيس قسم علوم الحياة

أشارة إلى التوصية المقدمة من الأستاذ المشرف أحيل هذه الرسالة على لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:  
رئيس القسم: د. محمد عبد الهادي غالي  
المرتبة العلمية: أستاذ  
العنوان: قسم علوم الحياة/ كلية العلوم للبنات/ جامعة بغداد  
التاريخ: ٢٠٠٨/٨٠/٢٧

## المقوم العلمي

أشهد ان تقييم رسالة الماجستير الموسومة (تأثير المستخلص القلويدي الخام لاوراق نبات  
المديد (*Convolvulus arvensis* L.) في الإنقسام الخلوي ) علمياً قد جرى باشرافي  
وهي جزء من متطلبات نيل درجة (شهادة) الماجستير في علوم الحياة.



التوقيع : د. أحمد محمد النداء

الاسم : أ.م.د. سعد محمد النداء

المرتبة العلمية: رئيس باحثين

العنوان: وزارة العلوم والتكنولوجيا

التاريخ: ٧ / ٩ / ٢٠٠٨

## المقوم اللغوي

أشهد ان هذه الرسالة الموسومة (تأثير المستخلص القلويدي الخام لأوراق نبات المديد  
(*Convolvulus arvensis* L.) في الإنقسام الخلوي) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية  
وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة  
بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.



التوقيع : بان محمد طاهر

الاسم : بان محمد طاهر

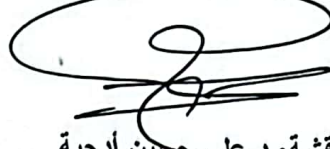
المرتبة العلمية : مدرس مساعد

العنوان: كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد

التاريخ: ٢٢ / ٦ / ٢٠٠٨

## أقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة نشهدُ بإننا أطلعنا على الرسالة الموسومة بـ " تأثير المستخلص القلويدي الخام لأوراق نبات المديد (*Convolvulus arvensis* L.) في الأنقسام الخلوي" وناقشنا الطالبة (نمارق هادي منصور) في محتوياتها وفيما له علاقة بها ونعتقد أنها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة/ وراثه خلوية .



التوقيع:

رئيس لجنة المناقشة: د.علي حسين أدحية

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان: وحدة الابحاث البايولوجية للمناطق الحارة/كلية العلوم/ جامعة بغداد

التاريخ: ٢٠٠٨/٩/٢



التوقيع

عضو اللجنة: الست بشرى فارس حسن

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان: كلية العلوم للبنات/ جامعة بغداد

التاريخ: ٢٠٠٨/٩/٢



التوقيع

عضو اللجنة: د.عباس عبد الله محمد

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان: قسم العلوم التطبيقية / الجامعة

التكنولوجيا .

التاريخ: ٢٠٠٨/٩/٢

التوقيع

عضو اللجنة مشرفاً: د.ندى عبد المجيد

الأنصاري

العنوان: كلية العلوم للبنات/ جامعة بغداد

التاريخ: ٢٠٠٨ / /

مصادقة عمادة كلية العلوم للبنات/ جامعة بغداد

نصادق على قرار لجنة المناقشة

التوقيع:

العميد: د. ندى عبد المجيد الأنصاري

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان: كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد.

التاريخ: ٢٠٠٨ / /

## الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية إلى إختبار تأثير القلويدات الخام المستخلصة من نبات المديد *Convolvulus arvensis* في الإنقسام الخلوي لخلايا القمة النامية لجذور البصل (*Allium cepa*) وفي نقي العظم للفأر الأبيض (*Mus musculus*) وفي خطين خلويين سرطانيين, Hep-2 و AMN-3 وخط خلوي طبيعي.

تم الكشف الكيميائي عن بعض المكونات الكيميائية لمستخلص أوراق نبات المديد, فوجد إن النبات يحتوي على أغلب المركبات الكيميائية مثل القلويدات والصابونينات والكلايكوسيدات والفلافونات والراتنج والستيرويدات والتربينات , وتم الحصول على 30 ملغم من المستخلص القلويدي الخام من أصل 50 غم من الأوراق الجافة للنبات بنسبة إستخلاص 0.06% وأن هذه النسبة أعلى من النسب التي تم الحصول عليها في دراسات سابقة للنبات نفسه.

درس تأثير التراكيز 24,12,8,4,2,1 ملغم/مل من المستخلص القلويدي الخام على الإنقسام الخلوي في القمة النامية لجذور البصل بعد تعرضها لمدة أربع ساعات, وكانت النتيجة إنخفاض دليل الإنقسام في جميع التراكيز حيث أنخفض إلى 50% من معاملة السيطرة عند أعلى تركيز. أدت جميع المعاملات إلى توقف الخلايا في الطور الإستوائي Captured metaphase بنسب مختلفة وصلت إلى 91.81% عند أعلى تركيز, وظهرت بعض الإنحرافات الكروموسومية , منها الجسور (Bridges) و الكروموسومات المتخلفة (Lagging chromosomes) والطور الإستوائي المتميع (Sticky metaphase) .

تم تحديد الجرعة المميّئة النصفية LD<sub>50</sub> للمستخلص المائي الخام للأوراق الطازجة في الفئران المختبرية وكانت 100 ملغم/كغم/يوم.

قورنت فعالية المستخلص القلويدي الخام للأوراق الجافة لنبات المديد مع فعالية المستخلص الخام للأوراق الطازجة في تثبيط معام الإنقسام الخلوي في نقي عظم الفأر عند الجرع 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 ملغم/كغم وقورن كل منهما مع فعالية الكولجسين. ففي الجرع المنخفضة, حقق المستخلص القلويدي الخام نسب توقف

ب

الطور الإستوائي أعلى مما حققها المستخلص المائي، وفي الجرعة العالية (640 ملغم/كغم) حقق كل منهما نسبة تزيد عن 90% من فعالية الكولجسين.

تم التحري عن التأثير السمي الخلوي للمستخلصين المائي الخام والقلويدي الخام في خط خلايا سرطان الحنجرة البشري (Hep-2) وخلايا سرطان الغدة اللبئية الفأري (AMN-3) وخلايا جنين الجرذ الطبيعي (Ref.) وبعشرة تراكيز مختلفة (8000, 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63) مكغم /مل لمدة 48 ساعة.

توصلت الدراسة إلى وجود تأثير سمي واضح لكلا المستخلصين. حقق المستخلص القلويدي الخام نسب تثبيط للخط Hep-2 (20.35%-72.66%) أعلى من المستخلص المائي (18.68%-48.26) عند التراكيز: 2000-62.5 مكغم/مل. وفي الخط AMN-3 تراوحت نسب التثبيط للمستخلص القلويدي الخام من 39.45% إلى 90.98% بينما كانت نسب التثبيط للمستخلص المائي 7.46% إلى 81.03% عند التراكيز: 8000-125 مكغم/مل بينما تقارب تأثير المستخلصين (المائي الخام والقلويدي الخام على التوالي) في التركيز 8000 مكغم /مل.

لم يكن لكلا المستخلصين تأثيراً مثبطاً عند التراكيز الواطئة (125-15.625) مكغم/مل على خلايا الخط الطبيعي Ref , ظهر التثبيط عند التراكيز الأعلى إذ بدأ التثبيط المعنوي عند التركيز 4000 مكغم/مل للمستخلص المائي الخام وعند التركيز 250 مكغم/مل للمستخلص القلويدي الخام.

ومن هذه النتائج تم الإستنتاج إن نبات المديد يعد نباتاً واعداً في علاج السرطان من خلال تأثيره على آليات الإنقسام الخلوي وتثبيطه لتكاثر الخلايا السرطانية

## قائمة المحتويات

الصفحة	الموضوع	التسلسل
1	المقدمة	
	الفصل الأول: استعراض المراجع	
3	الانقسام الخيطي Mitotic division	1-1
3	النيبيات الدقيقة Microtubules	1-2-1
6	دور النيبيات الدقيقة في انفصال الكروموسومات في الأنقسام الخيطي Mitosis	2-2-1
9	المواد المضادة للنيبيات الدقيقة Anti-microtubules agents	3-1
15	المواد التي تؤثر على آليات أخرى في الخلايا السرطانية.	4-1
19	نبات المديد <i>Convolvulus arvensis</i>	5-1
19	تصنيف النبات plant classification	1-5-1
20	المكونات الكيميائية لنبات المديد	2-5-1
22	التأثيرات المدروسة	3-5-1
	الفصل الثاني: المواد وطرائق العمل	
26	المواد	-2
26	الأجهزة والادوات المستخدمة	1-2
27	المواد الكيميائية	2-2
28	طرائق العمل	3-2
28	جمع العينات النباتية وتصنيفها	1-3-2
28	الكشف الكيميائي التمهيدي لبعض المواد الكيميائية في أوراق نبات المديد	2-3-2
30	الكشف عن القلويدات Alkaloids	1-2-3-2
30	الكشف عن الصابونينات Saponines	2-2-3-2
30	الكشف عن الكلايكوسيدات Glycosides	3-2-3-2
30	الكشف عن التانينات Tanins	4-2-3-2
31	الكشف عن التربينات والسترويدات Terpens and Steroids	5-2-3-2
31	الكشف عن الفلافونوات flavonoids	6-2-3-2
31	الكشف عن الراتنجات Resins	7-2-3-2
31	تحضير المستخلصات	3-3-2
32	تحضير المستخلص المائي الخام لأوراق النبات الطازجة	1-3-3-2
32	تحضير المستخلص القلويدي الخام لأوراق النبات الجافة	2-3-3-2
34	دراسة تأثير المستخلص القلويدي الخام لأوراق نبات المديد <i>Convolvulus arvensis</i> على الانقسام الخلوي في جذور البصل	4-3-2
34	المخاليل والملونة المستخدمة في الدراسة.	1-4-3-2
35	معاملة الجذور وتحضير الشرائح.	2-4-3-2
35	دراسة الانقسام الخيطي في جذور البصل <i>Allium cepa</i>	3-4-3-2
36	احتساب الجرعة القاتلة لنصف العدد LD <sub>50</sub>	5-3-2

الصفحة	الموضوع	التسلسل
37	اختبار نشاط المستخلص المائي الخام للأوراق الطازجة في إيقاف انقسام الخلايا الجسمية لنقي العظم في الفئران البيض <i>Mus musculus</i>	6-3-2
37	المحاليل	1-6-3-2
38	طريقة العمل	2-6-3-2
40	اختبار نشاط المستخلص القلويدي الخام للأوراق الجافة لنبات المديد في إيقاف الخلايا الجسمية	7-3-2
41	دراسة تأثير المستخلص القلويدي الخام للأوراق الجافة والمستخلص المائي الخام للأوراق الطازجة لنبات المديد في تكاثر خطين خلويين سرطانيين والخط الخلوي الطبيعي.	8-3-2
41	المحاليل الخاصة بالزرع النسيجي الأساسي والزرع الثانوي	1-8-3-2
43	الخطوط الخلوية Cell lines	2-8-3-2
45	اختبار سمية المستخلصات الخام لنبات المديد على تكاثر الخطوط السرطانية.	3-8-3-2
47	التحليل الإحصائي.	9-3-2
	<b>الفصل الثالث: النتائج والمناقشة</b>	
48	الكشف الكيميائي التمييزي لبعض مكونات مستخلص أوراق نبات المديد	1-3
49	استخلاص القلويدات من الأوراق الجافة لنبات المديد	2-3
51	دليل الانقسام ونسبة الأطوار في خلايا جذور البصل <i>Allium cepa</i> المعاملة بالمستخلص القلويدي الخام لأوراق نبات المديد المجففة	3-3
60	احتساب الجرعة القاتلة لنصف العدد LD <sub>50</sub>	4-3
63	اختبار فعالية المستخلص المائي الخام للأوراق الطازجة والمستخلص القلويدي الخام لأوراق المديد في إيقاف انقسام خلايا نقي عظم الفئران المختبرية البيض <i>Mus Musculus</i> من الضرب Balb/C	5-3
72	التأثير السمي للمستخلص المائي الخام للأوراق الطازجة والمستخلص القلويدي الخام للأوراق الجافة لنبات المديد في نمو خلايا الخطوط السرطانية وخلايا الخط الطبيعي لجنين الجرذ	6-3
72	الخط الخلوي السرطاني Hep-2	1-6-3
72	المستخلص المائي الخام للأوراق الطازجة	1-1-6-3
73	المستخلص القلويدي الخام للأوراق الجافة.	2-1-6-3
76	مقارنة التأثير السمي على الخط الخلوي السرطاني Hep-2 بتأثير المستخلصين المائي الخام والقلويدي الخام.	3-1-6-3
77	الخط الخلوي السرطاني AMN-3	2-6-3
77	المستخلص المائي الخام للأوراق الطازجة	1-2-6-3
77	المستخلص القلويدي الخام للأوراق الجافة	2-2-6-3

	الموضوع	التسلسل
80	مقارنة التأثير السمي على الخط الخلوي السرطاني AMN-3 بتأثير المستخلص المائي الخام والقلويدي الخام.	3-2-6-3
81	الخط الخلوي الطبيعي Ref	3-6-3
81	المستخلص المائي الخام للأوراق الطازجة	1-3-6-3
81	المستخلص القلويدي الخام للأوراق الجافة	2-3-6-3
84	مقارنة التأثير السمي على الخط الخلوي الطبيعي Ref. بتأثير المستخلص المائي الخام والقلويدي الخام.	3-3-6-3
85	مقارنة بين الخطوط الخلوية السرطانية والخط الطبيعي Ref. بتأثير المستخلص المائي الخام والقلويدي الخام.	4-6-3
100	الاستنتاجات	
102	التوصيات	
103	المصادر	

## قائمة الأشكال

الصفحة	الموضوع	التسلسل
5	أنواع النبيبات الدقيقة الثلاث.	1-1
8	السيطرة على الإنتقال من الطور الإستوائي إلى الطور الإنفصالي.	2-1
28	صورة حقلية لنبات المديد <i>Convolvulus arvensis</i>	3-1
33	الطريقة العامة للحصول على المستخلص القلويدي الخام من المستخلص الميثانولي الخام.	1-2
53	العلاقة بين التركيز ودليل الإنقسام لجذور البصل المعاملة بالمستخلص القلويدي الخام ولمدة أربع ساعات.	1-3
54	خلايا جذور البصل المعاملة بالمستخلص القلويدي الخام للأوراق الجافة لنبات المديد.	2-3
61	تحديد الجرعة المميئة النصفية LD50 للمستخلص المائي لأوراق المديد	3-3
66	زيادة نسبة الطور الإستوائي المتوقف بزيادة الجرعة للمستخلصين المائي الخام و القلويدي الخام.	4-3
67	طور إستوائي متوقف C.metaphase في خلية نقي عظم الفأر <i>Mus musculus</i>	5-3
75	المقارنة بين خلايا Hep-2 عند تركيز 8000 مكغم/مل بعد 48 ساعة من التعريض.	6-3
76	نسبة التثبيط في خط Hep-2 المعاملة بالمستخلص المائي والمستخلص القلويدي الخام.	7-3
79	المقارنة بين خلايا AMN-3 عند تركيز 8000 مكغم/مل بعد 48 ساعة من التعريض.	8-3
80	نسبة التثبيط في خط AMN-3 المعاملة بالمستخلص المائي والمستخلص القلويدي الخام.	9-3
83	المقارنة بين خلايا Ref. عند تركيز 8000 مكغم/مل بعد 48 ساعة من التعريض.	10-3
84	نسبة التثبيط في خط Ref. المعاملة بالمستخلص المائي والمستخلص القلويدي الخام.	11-3
85	نسب التثبيط للخطوط الخلوية الثلاثة بتأثير المستخلص المائي الخام.	12-3
86	نسب التثبيط للخطوط الخلوية الثلاثة بتأثير المستخلص القلويدي الخام.	13-3

## قائمة الجداول

الصفحة	الموضوع	التسلسل
48	الكشوفات الكيميائية النوعية لبعض المركبات الكيميائية في مستخلص أوراق نبات المديد	(1-3)
52	دليل الإنقسام الخيطي والنسبة المئوية لأطوار الإنقسام والحالات الشاذة في جذور البصل <i>Allium cepa</i> المعاملة لمدة أربع ساعات وبتراكيز مختلفة من المستخلص القلويدي الخام لأوراق نبات المديد	(2-3)
53	النسبة المئوية من السيطرة لدليل الإنقسام الخيطي والأطوار في جذور البصل <i>Allium cepa</i> المعاملة بالمستخلص القلويدي الخام ولمدة أربع ساعات	(2-3ب)
61	تحديد الجرعة المميّنة النصفية للمستخلص المائي الخام للأوراق الطازجة بعد 24 ساعة من حقن الفئران.	(3-3)
65	نسبة خلايا نقي عظم الفئران في الطور الإستوائي عند حقنها بالمستخلص المائي الخام للأوراق الطازجة والمستخلص القلويدي الخام للأوراق الطازجة والنسبة المئوية من السيطرة (المعاملة بالكولجسين).	(4-3)
74	نسب التثبيط في الخط الخلوي السرطاني Hep-2 بتأثير تراكيز مختلفة من المستخلص المائي الخام والمستخلص القلويدي الخام لأوراق نبات المديد ولمدة 48 ساعة	(5-3)
78	نسب التثبيط في الخط الخلوي السرطاني AMN-3 بتأثير تراكيز مختلفة من المستخلص المائي الخام والمستخلص القلويدي الخام لأوراق نبات المديد ولمدة 48 ساعة	(6-3)
82	نسب التثبيط في الخط الخلوي الطبيعي Ref بتأثير تراكيز مختلفة من المستخلص المائي الخام والمستخلص القلويدي الخام لأوراق نبات المديد ولمدة 48 ساعة	(7-3)

## المقدمة

تحتل النباتات الطبية في العالم حالياً مكانة كبيرة في الإنتاج الزراعي والصناعي والدوائي وتتلقى عناية بالغة في كثير من الدول المنتجة لها، و النباتات الطبية من المصادر الرئيسة للعقاقير أو المواد الفعالة التي تدخل في تحضير الدواء على شكل خلاصات أو مواد فعالة تستعمل بوصفها مادة خام لإنتاج بعض المركبات الكيميائية التي تعد النواة للتخليق الكيميائي لبعض المواد الدوائية المهمة مثل مادة الكورتزون (cortisone) وهرمونات الجنس (sex hormones) وبدل بلازما الدم وغيرها (قطب، 1979).

وتظهر العديد من المستخلصات النباتية نشاطها المضاد للسرطان نتيجة احتوائها على مركبات كيميائية عدة ذات سمية عالية تجاه الخلايا بتأثيرها على آليات الانقسام الخلوي أوفي مرحلة تسبق الانقسام مثل آليات تضاعف الدنا (DNA) أو انزيماته. ونظراً للدور المهم الذي تلعبه النبيتات الدقيقة في انقسام الخلية مما جعلها الهدف المناسب في تطور أدوية العلاج الكيميائي chemotherapeutic drugs ضد الانقسام السريع للخلايا السرطانية.

إن أغلب المواد المضادة للانقسام Anti mitotic agent تؤثر في ديناميكية نبيتات المغزل (Jordan and Wilson, 2004) ومنها استخدام مادة الكولجسين (Colchicine) المستخلصة من نبات *Colchicum autumnale* وهي من المواد الشائعة الاستخدام في إيقاف الانقسام الخلوي، إذ ترتبط هذه المواد مع جزيئة التيوبولين (tubulin) وتمنع بلمرتها وتكوين النبيتات الدقيقة وبالتالي منع تكوين خيوط المغزل وتوقف الانقسام الخلوي في الطور الاستوائي (Usui et al., 1998)، كذلك مادة sangumarine وهي من قلويدات benzo phenanthridin إذ وجد أنها تثبط عدة أنواع من الخطوط الخلوية السرطانية البشرية المقاومة للعقاقير المتعددة من خلال منع بلمرة النبيتات الدقيقة وتثبيطها لتكاثر الخلايا وحثها على

المتعددة من خلال منع بلمرة النيببات الدقيقة وتثبيطها لتكاثر الخلايا وحثها على الموت المبرمج لها، كما انها تثبط تجمع النيببات وتغير من شكل البوليمر في التراكيز العالية (Lopus and Panda,2006).

كما جرت دراسة حول اختبار فعالية مستخلصات نبات المديد على الانقسام الخلوي لجذور البصل والخلايا الجسمية لنقي عظم الفأر، فوجدت القيسي (2006) ان مستخلصات هذا النبات لها فعالية مقاربة للكولجسين في إيقاف الانقسام الخلوي في طور الاستوائي، فضلاً عن إفتراض بتأثيرات أخرى من خلال تأثيره في الأطوار المختلفة لإنقسام القمة النامية لجذور البصل لذا هدفت دراستنا إلى :

- 1- استخلاص القلويدات من أوراق نبات المديد *C. arvensis*
- 2- اختبار فعالية المستخلص القلويدي الخام في إيقاف الانقسام الخلوي في القمة النامية لجذور البصل.
- 3- تحديد الجرعة المميئة النصفية LD<sub>50</sub> للمستخلص المائي الخام للأوراق الطازجة لنبات المديد.
- 4- اختبار فعالية المستخلص المائي والقلويدي الخام في إيقاف الانقسام الخلوي للخلايا الجسمية في الفئران البيض ومقارنة بنشاط الكولجسين.
- 5- اختبار فعالية المستخلص المائي والقلويدي الخام في تثبيط الخطوط السرطانية الخلوية والخط الطبيعي.

# إستعراض المراجع

### 1-1: الانقسام الخيطي Mitotic Division

تتكاثر الخلايا حقيقية النواة (Eukaryotic cells) عند دخولها سلسلة من الخطوات المعقدة تدعى الدورة (Cell cycle) تنتهي بانقسام الخلية الى خليتين بنويتين مماثلتين للخلية الام وتقسّم هذه الدورة الى اربع اطوار هي G1,s,G2,M ، وتخضع دورة الخلية لتنظيم تسهم به بروتينات تدعى بالكاينيزات التي تكوّن معقدات فعّالة عند ارتباطها ببروتينات أخرى تدعى بالسايكلينات Cyclins, نتيجة لاعتماد فعالية انزيم الكاينيز على السايكلينات وقد أطلق عليه بـ Cyclin-dependent Kinase (cdk) (Cooper and Hausman,2004).

ولكي تحصل كل خلية ناتجة على المادة الوراثية التي سبق أن تضاعفت في الطور البيني وتحديداً في طور تضاعف الدنا (S-phase)، كان لابد للكروموسومات المتضاعفة من أن تنفصل لضمان توزيعها بالتساوي على الخليتين البنويتين وهذا يتم خلال انقسام النواة Karyokinesis وغالبا ما يعقبه انقسام السايكوبلازم Cytokinesis.

### 1-2-1: النبيبات الدقيقة Microtubules

أن حركة الكروماتيدات الشقيقة الحاملة للنسخ المماثلة للمادة الوراثية المتضاعف إلى النهايات المتقابلة للخلية قبل انقسامها هي عملية مهمة وتعتمد على خيوط المغزل mitotic spindle وهو أحد الأجهزة الجزيئية ويتكون من تجمع النبيبات الدقيقة والبروتينات المحركة Motor proteins، إذ يبدأ تشكل المغزل خلال الطور التمهيدي وبداية الطور الاستوائي (Mogilner et al.,2006).

تعد النبيبات الدقيقة من مكونات الهيكل الخلوي Cytoskeleton وهي ضرورية وأساسية في جميع الخلايا الحقيقية النواة ومن وظائفها المحافظة على شكل الخلية وقطبيتها ونقل الحويصلات والعضيات داخل الخلية، ونقل إشارات الخلية وفي انقسامها في تكوين نبيبات المغزل (Jordan and Wilson,2004) (Zhou and Giannakakou,2005).

إن مصدر نشوء النببيات الدقيقة في الخلايا الحيوانية هو الجسم المركزي centrosome الذي يجاور النواة في الخلايا غير المنقسمة (Cooper,2000). أما في الخلايا النباتية فينشأ جهاز المغزل من حزم تنشأ من قشرة الخلية التي تستبدل في بداية الانقسام بحلقة متراسة كثيفة من النببيات الدقيقة محيطة بالنواة تدعى بـ Preprophase band وتستبدل هذه لاحقاً بجهاز المغزل ( Dhonukshe and Gadell,2003; ) (Dhonukshe *et al.*,2006).

تتألف النببيات الدقيقة من ثنائيات متباينة heterodimers هي الفا وبيتا تيوبولين  $\alpha, \beta$ -tubulin تجتمع بطريقة رأس إلى ذيل لتكوّن الخويطات الأولية protofilaments التي تقترن طولياً لتكوّن صفيحة sheet والتي بعد ذلك تغلق لتكوّن النبيب الدقيق بقطر 25nm (Zhou and Giannakakou,2005). ويوجد نوع ثالث من التيوبولين يسمى بكاما تيوبولين  $\gamma$ -tubulin الذي يتمركز في الجسم المركزي وله دور مهم في بداية تجمع النببيات الدقيقة (Cooper,2000; Drykiva *et al.*,2003). يمتلك كل من الفا وبيتا تيوبولين موقعاً لإرتباط GTP، وفي حالة إضافتهما إلى النبيب عند تجمع ثنائيات الالفا والبيتا فإن GTP المرتبط بالبيتاتيوبولين يتحلل إلى GDP.

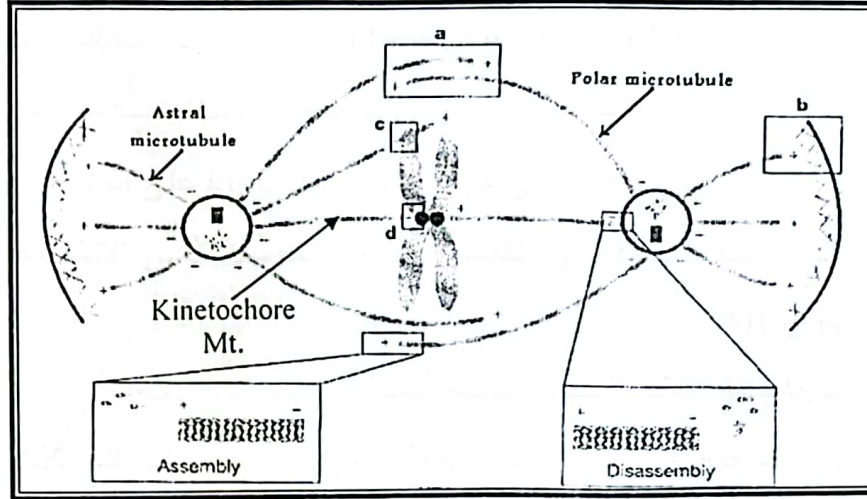
تعد النببيات الدقيقة تراكيب قطبية ذات نهايتين مختلفتين نهاية موجبة plus end ذات النمو السريع ونهاية سالبة Minus end ذات النمو البطيء ولهذه القطبية أهمية في تحديد اتجاه الحركة (Cooper,2000).

تصنف النببيات الدقيقة التي تُسهم في تشكل مغزل الانقسام على ثلاثة أنواع: إثنان منها تكون خيوط المغزل وهي مبينة في الشكل ( 1-1).

1- النببيات الكروموسومية (Kinetochores microtubules) المرتبطة بالكروموسومات المتكاثفة للخلايا المنقسمة عند منطقة السنترومير الذي يرتبط ببروتينات متخصصة لتكوين الجسم الحركي، ولهذا الارتباط دور مهم في فصل الكروماتيدات الشقيقة.

2- النيبات القطبية (Polar microtubules) هذه النيبات لا ترتبط بالكروموسومات وتمتد من قطب إلى قطب .

3- النيبات النجمية (Astral microtubules) تمتد خارج الجسم المركزي إلى محيط الخلية



شكل (1-1) أنواع النيبات الدقيقة الثلاث  
(Sharp, et al., 2000)

ان التنوع الوظيفي للنيبات الدقيقة كان من خلال عدة طرائق منها:

أولاً- ارتباط بروتينات منظمة متنوعة بالتوبيولين الذائب (Soluble tubulin) وبسطوح ونهايات النيبات وهذه البروتينات تدعى بـ البروتينات المصاحبة للنيبات الدقيقة Microtubule-associated proteins (MAPs) ومن أنواعه Dynein و Kinesin ويعدان من البروتينات المحركة فضلا عن عدد من البروتينات المنظمة مثل Survivin ، Dynactin ، Stathmin (الذي يعرف أيضا بالـ P<sub>150</sub>).

ثانياً- التعبير عن نظائر التوبيولين المختلفة isotubuline التي تمتلك وظائف مختلفة.

ثالثاً- التحورات التي تجري على التوبيولين بعد عملية الترجمة Post-translational modification (Jordan and Wilson,2004). وتتضمن عملية detyrosination ، acetylation ، phosphorylation ، palmitoylation ، polyglutamylation و polyglycylation. إذ تحدث عملية اضافة استايل acetylation لجزيئة Lysine

للألفاتيوبولين لتصبح النبيبات اكثر استقرارية أما عملية detyrosination فتتضمن إزالة التايروسين في الطرف الكاربوكسيلي من الفاتيوبولين. وكل من عملية polyglycylation و polyglutamylaton تحدث لجزيئة حامض الكلوتامك في الطرف الكاربوكسيلي لتيوبولين الفا وبيتا (Rosenbaum,2000).

وقد أشار Okada and Hirokawa (1999) الى ان التحورات التي تجري على التيوبولين تؤثر في ارتباط المحركات بالنبيبات الدقيقة وجميعها تحدث في الطرف الكاربوكسيلي السالب الشحنة المهم في حركة بروتين kinesin على طول النبيبات.

2-2-1 : دور النبيبات الدقيقة في انفصال الكروموسومات في الإنقسام الخيطي

### Mitosis

إنّ الديناميكية العالية للنبيبات الدقيقة أهمية في العمليات الآتية:

أولاً: الارتباط الصحيح للكروموسومات بخيوط المغزل عند جسيماتها الحركية وفي الوقت المناسب وهو بداية طور الاستوائي prometaphase وبعد اضمحلال الغلاف النووي.

ثانياً: الحركات المعقدة للكروموسومات التي تجلبها لمواقع الاصطفاف الصحيح عند الصفيحة الوسطى تسمى بـ congression.

ثالثاً: الانفصال المتزامن للكروموسومات في طور الانفصالي والنهائي بعد اكتمال metaphase-Anaphase check point (Jordan and Wilson,2004). ويتضمن انفصال الكروماتيدات الشقيقة حركة الكروموسوم الى القطب (Anaphase A) وإبتعاد قطبي الخلية (Anaphase B) الشكل (1-1)، اما ميكانيكية الانفصال (Anaphase A) فتتطلب عمل المحركات المقترنة بالجسيم الحركي وتفكيك وقصر النبيبات المرتبطة بالقطعة المركزية وهذا يضمن السحب الفعال للكروماتيدات باتجاه الأقطاب. ولتحقيق آلية الانفصال B (Anaphase B) تزداد المسافة من القطب إلى القطب، ويزداد طول النبيبات القطبية المترابطة وإنزلاقها عند صفيحة المغزل spindle equator دافعة الأقطاب عن بعضها فضلا عن القوى التي تبذلها النبيبات النجمية نحو الخارج دافعة الأقطاب باتجاه قشرة الخلية (Dhonukshe et al.,2006).

يعتمدُ التفسير بكيفية زيادة طول بعض النبيبات وقصر البعض الآخر على إن النبيبات الدقيقة تظهرُ نوعين من الديناميكية غير المتوازنة (non-equilibrium dynamic) ، النوع الأول سائدٌ بشكلٍ كبير في الخلايا ويسمى بـ (dynamic instability) وتتحول كل من نهايتي النبيبات الدقيقة من أطوار النمو والتقصير بحيث تنمو وتقصير إحدى النهايات وتسمى بـ Plus end بسرعة أكبر من النهاية الثانية التي تسمى بـ Minus end إما الديناميكية الثانية فتسمى بـ الشكل الدوراني treadmilling dynamic وفيها تكون محصلة النمو عند إحدى النهايات متوازنة مع محصلة التقصير في النهاية المتقابلة، إذ تُفقد جزيئات التيوبولين المرتبطة بـ GDP بصورة مستمرة من النهاية السالبة وتُستبدل بإضافة الجزيئات المرتبطة بـ GTP إلى النهاية الموجبة للنبيب الدقيق نفسه (Cooper,2000; Jordan and Wilson,2004).

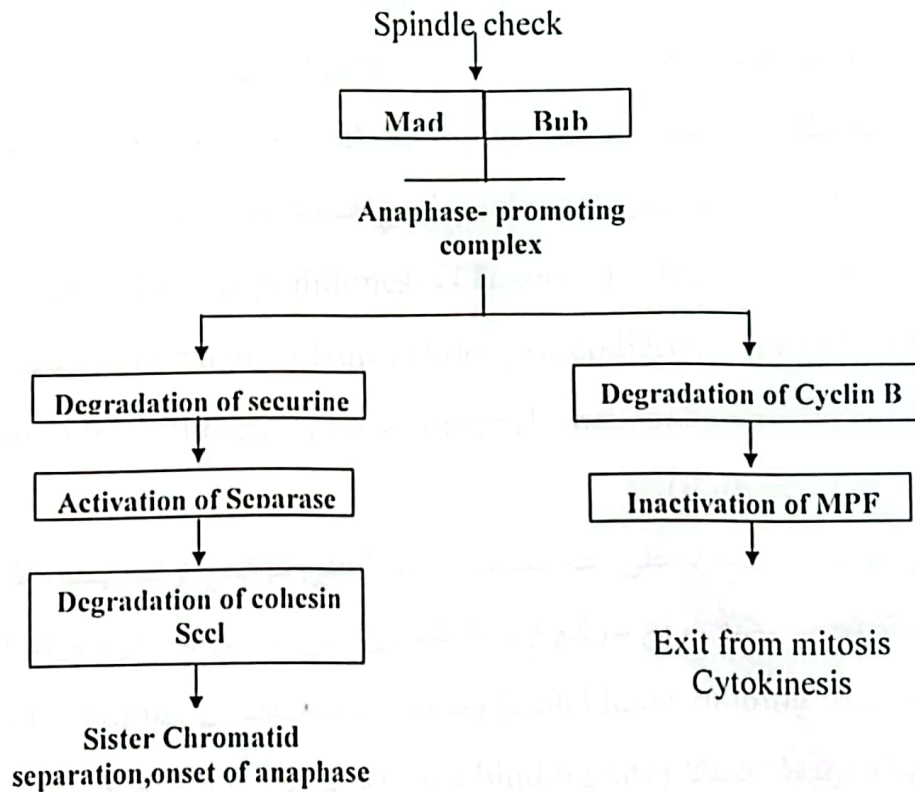
تبدل البروتينات المحركة خلال الانقسام الاعتيادي والنبيبات الدقيقة قوى على الكروموسوم لغرض وضعه في الموقع المناسب واصطفافه ثم فصله، وقد صُنفت هذه القوى على:

الصف الأول: القوى الناشئة من الجسيم الحركي تعمل ضد حزم النبيبات الدقيقة المرتبطة به.

الصف الثاني: القوة القطبية التي تدفع ذراع الكروموسوم باتجاه خط استواء المغزل وهذه القوة مهمة في اصطفاف الكروموسوم في الطور الاستوائي.

بعد المعقد البروتيني الذي يدعى بـ Anaphase-promoting complex (APC)، مهما للانتقال من الطور الاستوائي إلى الطور الانفصالي والخروج من الانقسام، ففي الطور الاستوائي تتماسك الكروماتيدات الشقيقة مع بعضها بواسطة معقد بروتيني يدعى بـ cohesin ويتألف من اربع وحدات فرعية هي Scm<sub>3</sub> و Scm<sub>1</sub> (Structural maintenance of chromosomes) والـ Scc<sub>1</sub>/Mcd<sub>1</sub>/Rad-21 و Scc<sub>3</sub> (Sister chromatid cohesion)، إذ يؤدي APC سلسلة من التفاعلات تؤدي إلى تحطيم بروتين cohesin وذلك عن طريق تحطيم بروتين securine الذي

يرتبط بانزيم الفصل separase، ويثبطه خلال الطور الاستوائي. وعند تنشيط separase بانفصاله عن securine يقوم بتحطيم البروتين cohesin وفقدان التصاق الكروماتيدات الشقيقة وفصلها بواسطة النيببات الدقيقة للمغزل (Yeong,2004). عند وجود كروموسومات غير مرتبطة بخيوط المغزل يتحرر إنتاج مؤشرات بروتينية معقدة في منطقة السنتروميير هي Mad (Mitotic arrest defective) و Budding uninhibited by benomyl) Bub التي بدورها تثبط نشاط APC وبالتالي عدم الانتقال إلى الطور الانفصالي . في الحالة الاعتيادية يقوم APC بتحطيم بروتين cyclin B مما يؤدي إلى تثبيط MPF (Maturation promoting factor) المتكون من cyclin B و cdc<sub>2</sub> وبالتالي خروج الخلية من الانقسام والرجوع إلى الطور البيني كما في الشكل (2-1) (Cooper and Hausman,2004).



شكل (2-1): السيطرة على الانتقال من الطور الاستوائي إلى الطور الانفصالي (Cooper and Hausman,2004).

### 1-3: المواد المضادة للنيبيبات الدقيقة Anti-microtubules agents

نظرا لأهمية الدور الذي تؤديه النيبيبات الدقيقة في انقسام الخلية مما جعلها الهدف المناسب في تطور أدوية العلاج الكيميائي (chemotherapeutic drugs) ضد الانقسام السريع للخلايا السرطانية (Zhou and Giannakakou,2005)، فإن أغلب المواد المضادة للانقسام (Anti-mitotic drugs) والشائعة الإستخدام تؤثر في ديناميكية نيبيبات المغزل (Jordan and Wilson,2004).

تقسم العقاقير المضادة للانقسام والهادفة للنيبيبات الدقيقة على مجموعتين رئيسيتين هما:

1- المجموعة الاولى: تعرف بـ (Microtubule-destabilizing agents) وتثبط بلمرة النيبيبات الدقيقة عند التراكيز العالية وتتضمن هذه المجموعة الكولجسين colchicine وعددا من vinca alkaloids (vinblastin و vincristine و vinorelbine و vindesin و vinflunine و cryptophycins و halichondrins و estramustine و combretastatins).

2- المجموعة الثانية: تعرف بـ Microtubule-stabilizing agents وتمنع هذه المواد إزالة البلمرة وتتضمن paclitaxal (وهي المادة الأولى التي شخّصت في هذه المجموعة) و docetaxol (Taxotere) و epothilones و discodermolide و eleutherobins و sarcodictyins و laulimalide و rhazinalam وستيرويدات معينة و polyisoprenyl beuzophenones (Jordan,2002; Jimenez-). (Barbero et al.,2002).

يمكن تقسيم هذه المواد على عدة مجاميع اعتمادا على موقع ارتباطها وطريقة تفاعلها إذ تم تعرف ثلاثة أنواع لمواقع ارتباط العقاقير على التيوبولين هي: موقع ارتباط الكولجسين (Colchicine binding site) وموقع ارتباط التاكسول (Taxol-binding site) وموقع ارتباط الفينكا (vinca binding site)، أما المواد الأخرى فقد تتنافس على هذه المواقع عند ارتباطها (Correia and Lobert, 2001).

تعد مادة الكولجسين من المواد الشائعة الاستخدام في إيقاف الانقسام الخلوي وهي من انواع الامينات Alkaloidal amine المعزولة من جذور نبات *Colchicum autumnale* (Sharma and Sharma,1980)، إذ ترتبط هذه المواد بالسطح الداخلي للثنائيات المختلفة بين الألفا والبيتا تيوبولين (Hastie, 1991)، فتكون معقد تيوبولين كولجسين (TC) tubulin colchicine complex الذي يثبط تكاثف التيوبولين وتكوين النيببات الدقيقة نتيجة حثه للتغيرات في هيئة التيوبولين مما يغير التماسك او الالتصاق ضمن النيببات الدقيقة وتشويه النمو الطبيعي لها (Corriea and Lobert,2001; Jordan and Wilson,2004)، وهناك مواد ترتبط بموقع ارتباط الكولجسين منها podophyllotoxin فهو يتنافس مع موقع ارتباط الكولجسين لكنه لا يحث نشاط GTPase أو يحث تغيرات شكلية، أما RPR112378 و RPR115781 و T138067 فهي مركبات تعود الى مجموعة مثبطات النيببات الدقيقة وترتبط بموقع ارتباط الكولجسين من دون زيادة في نشاط GTPase لكنها تحث على التجمع الذي ينشأ نتيجة للتفاعلات التساهمية مع Cysteine 239 بين السطوح الداخلية للجزيئات الثنائيات ، وتعد هذه التفاعلات ذات سمية عالية وتؤثر في فاعلية الخلايا الورمية المقاومة للعقاقير المتعددة (Correia and Lobert2001) وقد عُزل من نبات الصفصاف *Combretum caffrum* في جنوب افريقيا، مادة combretastine التي أظهرت نشاطا فعّالا مضادا للسرطان بواسطة تثبيط تقدم دورة الخلية في الانقسام مما يساعد على موت الخلية المبرمج (apoptosis) ومادة 2-methoxyestradiol من الهرمونات الاسترودية التي تثبط نمو الأورام من خلال ارتباطها بالتيوبولين بموقع ارتباط الكولجسين (Zhou and Giannakakou, 2005). إن مركبات vinca alkaloids مثل vinblastin و vincristine المعزولان من أوراق نبات عين البزون *Cathranthus Roseus* (F. Apocinaceae) (Rosea L) يستعملان في علاج الأورام و ابيضاض الدم، مما يسبب منع بلمرة بروتين التيوبولين إلى نيببات دقيقة بارتباطها بوحدة بيتا للجزيئات الثنائية للتيوبولين عند منطقة vinca binding site وعملها يعتمد على تركيز، في

التراكيز العالية اذ انها تحت تجمع التيوبولين الى بلورات paracrystalline ( Jordan )  
 vinca (et al.,1986; Himes,1991) وجدَ Jordan (2002) ان التراكيز الواطنة للـ  
 alkaloid تكبح ديناميكية النبيبات من دون ازالة بلمرة نبيبات المغزل لكنها تبقى قدرتها  
 على إيقاف الانقسام وحث عملية موت الخلية المبرمج. ووجدَ أيضاً إن vinca alkaloid  
 تحت التيوبولين لتكوين بوليمرات حلزونية متبادلة تفسد ديناميكية النبيبات إذ وجدت  
 علاقة في قابلية vinca alkaloid لتكوين الشكل الحلزوني والسمية الخلوية لها.

شُخصت مركبات عديدة ترتبط بموقع ارتباط vinca alkaloid على البيئاتيوبولين  
 منها halichondrins التي عزلت من *Halichondria okadai* و *Axinella sp.* و  
*Phakellia carteri* و *Lissodendoryx sp.* ، ومادة hemiasterlin المعزولة من  
 الإسفنج البحري *Cymbastela sp.* ومادة spongistatin المعزولة من *spirastrella*  
*spinispirulifera*، ومادة cryptophysin المعزولة من الطحالب الخضراء المزرقفة  
*Nostoc sp.* فجميع هذه المواد توقف تقدم الانقسام وتحت عملية الموت المبرمج للخلايا  
 السرطانية (Hamel, 1992; Duflos et al.,2002).

وعلى العكس من دواء vinblastin فهناك دواء Taxol، ويطلق عليها أيضاً  
 Paclitaxel وهي نوع من التربينات الثنائية Diterpen المستخلصة من نبات الطقوس  
*Taxus brevifolia* التابع للعائلة Taxaceae أستخدمت بشكل فعال في معالجة أنواع  
 مختلفة من السرطانات منها سرطان الثدي والرئة والمبيض والمثانة والحوض  
 (Skeel,1999)، وتتخلص آلية عمل هذا المركب بتثبيت واستقرار النبيبات الدقيقة وذلك  
 من خلال منع عملية ازالة بلمرة النبيبات الدقيقة إلى التيوبولين الذائب نتيجة ارتباطه  
 بالتيوبولين الموجود على طول هذه النبيبات وبألفة عالية جداً وحث التغيرات في هيئة  
 التيوبولين مما يزيد من ألفته بالجزيئات المجاورة، وان موقع ارتباطه يقع على وحدة بيتا  
 في السطح الداخلي للنبيب الدقيق ويعرف بـ Precision ، إذ يوجد موقع ارتباط واحد  
 لجزيئة paclitaxel على كل جزيئة تيوبولين في النبيب، وهذا يعني إن النبيب الدقيق  
 الذي يتألف من 10000 وحدة تيوبولين يتطلب ارتباط 5000 جزيئة Paclitaxel لكل

يتألف من 10000 وحدة تيوبوليولين يتطلب ارتباط 5000 جزيئة Paclitaxel لكل نيبب لكي يؤدي إلى تثبيت بلمرته (Nogales *et al.*,1995; Jordan and Wilson,2004).  
شُخصت عدة مركبات من أصل طبيعي ترتبط بموقع ارتباط Taxol منها Sorangium epothilones A,B الذي عُزل من myxobacterium وهي discodermolide التي عزلت من الإسفنج البحري celluloseum ومادة Discodermia dissoluta (Hung, *et al.*,1996) ومادة eleutherobin المعزولة من المرجان البحري marine soft carol وهو Eleutherobia sp وهذه المواد جميعها توقف الانقسام وتحت عملية apoptosis (Zhou and Giannakakaou,2005).

أستخدم مركب PC-SPES في الحماية بشكل مستخلص لثمانية أعشاب مختلفة هي Scutelloria baicalensis و Glycyrrhiza glabra و Gonoderma lucidum و Isatis indigotica و Panaxpseudo-ginseng و Dendranthema morifolium و Rabdosia rebescens و Serenoa repenes ، فعند تحليل كل عشبة وجد إنها تحتوي فضلاً عن هذا المركب على مواد أخرى مثل phytoestrogen و Trace و Flavonoids و Alkaloid و Triterpenes و Polysaccharide و element، وان المعاملة بهذا المركب تقلل من التعبير عن عدد من الجينات المشفرة إلى البروتينات التركيبية للخلية التي تتضمن الفا وبيتا تيوبوليولين و dystroglycan و collagen12 يثبط التعبير عن الجينات المتضمنة لدورة الخلية ويحث عملية الموت المبرمج في خلايا LNCaP فضلاً عن الخطوط الخلوية السرطانية للبروستات Du145 و AIPC<sub>3</sub> (Bonham *et al.*,2002).

وقد ذكرَ Li وآخرون (2002) إن مركب Ajoene الموجود في نبات الثوم الغني بمادة Sulphur يستطيع أن يفكك بشكل كامل شبكة النيببات الدقيقة المتكونة من Microtubule network من الخطوط الخلوية السرطانية البشرية نتيجة التثبيط الكلي للبروتينات المسؤولة عن عملية ترتيب النيببات الدقيقة خلال عملية الانقسام.

بينما أشار Madari وآخرون (2003) إلى مركب dicoumarol وهو من مركبات الكومارين حيث وجد ان هذا المركب يوازن بقوة ديناميكية النمو والتقصير عند النهاية الموجبة للنبيبات الدقيقة في خارج الجسم من خلال ارتباطه بالتيوبولين كما انه يزيد النسبة المئوية لوقت قضاء النبيبات الدقيقة في الحالة المتوقفة (paused) وبهذا يسبب اختزالا في ديناميكية النبيبات ككل. إذ تمتلك الكومارينات Coumarins تأثيرات في كيميائية وفسلجة النبات بوصفها مضادات للأكسدة ومثبطات إنزيم وبواديء لمواد سامة.

اظهر الكومارين في داخل الجسم تأثيره المضاد للسرطان ضد allogenic sarcoma 180 عند التركيزين 10 و 40 ملغم/كغم مع نسبة تثبيط 49% و 60% على التوالي على الرغم من سمية هذه التراكييز، وقد اظهر الكومارين و 4-hydroxycoumarin و 7-hydroxycoumarin سمية ضد الخطوط الخلوية P-388 . P-815 بدءا من التركيز 100 µg/ml فضلا عن ذلك فإن الكومارين ومشتقه 7-hydroxycoumarin تثبطا الانقسام في قمة جذر نبات البصل *Allium cepa* من خلال إحداث خلل في نبيبات المغزل مما أدى إلى التوزيع العشوائي للكروموسومات في تطور الاستوائي (Kostova,2005).

ترتبط أغلبية المواد المثبطة للنبيبات الدقيقة مباشرة بالتيوبولين، بينما توجد مواد أخرى لها عمل مثبط مختلف فعلى سبيل المثال Estramustine phosphate يرتبط البروتينات المصاحبة للنبيبات الدقيقة Microtubule associated proteins (MAP<sub>s</sub>) . وايضا بالتيوبولين وبذلك يثبط تجمع النبيبات الدقيقة (Dahllof et al.,1993)، تتفاعل مادة 5',5'-Bis [8-(phenylamino)-1naphthalene-sulphonate مع الطرف الكاربوكسيلي للجزيئات الثنائية المتباينة وبصورة خاصة تثبط تجمع النبيبات المعتمدة على MAP مما جعل هذه المواد مفيدة في علاج السرطان وتظهر سمية تآزرية في داخل وخارج الجسم عند اتحادها مع مواد أخرى مضادة للنبيبات الدقيقة (Usui et al.,199).

تعطى E7010 مادة sulfonamide عن طريق الفم وهي مضادة للسرطان، وقد أظهرت نشاطا مثبطا لنمو 62 خط خلوي سرطاني، من خلال نشاطها المثبط لبلمرة التيوبولين اعتمادا على الجرعة نتيجة ارتباطها بموقع الكولجسين على التيوبولين فضلا عن انها فعالة جدا ضد نوعين من الخطوط الخلوية المقاومة vincristine وهي - VCR resistant P<sub>388</sub> (Yoshimatsu, *et al.*, 1997).

ومن دراسة النواتج الطبيعية التي تتداخل مع تقدم دورة الخلية تمت تنقية Aspergillus fumigatus من Tryprostatins A,B (TPS-A و TPS-B) فكلا المركبين وقفا دورة الخلية عند الطور G<sub>2</sub>/M عند التركيزين 125µM و 62.5µM على التوالي، وعند التركيز 20µm وجد إن TPS-A يشوه كليا شبكة النيببات الدقيقة واستنتج انه يتفاعل عند موقع غير موقع ارتباط colchicine و vinblastine على التيوبولين (Usui *et al.*, 1998). كذلك وجد إن TPS-A يثبط تجمع النيببات الدقيقة في خارج الجسم المنقاة من أدمغة البقر بنسبة 40% عند التركيز 250µM ، نتيجة إيقاف تجمع التيوبولين المحث بوساطة الحاثات inducer التي تتفاعل مع C-terminal domain و MAP<sub>2</sub> و tau و poly-(L-lysin) ، وهذا يشير إلى إن TPS-A مثبط جديد لتجمع النيببات الدقيقة المعتمدة على MAP من خلال تشويه نيببات المغزل وبالتالي يثبط تقدم دورة الخلية عند الطور M (Usui *et al.*, 1998).

أما Dilantin الذي يستخدم بشكل شائع بوصفه مضادا للصرع، فيحث التوقف في الطور الاستوائي نتيجة تداخله مع بلمرة بروتينات النيببات الدقيقة ويقوي التأثير المضاد للسرطان vincristine و vinblastine في زرع الخلايا، فضلا عن ذلك فإن Dilantin يزيل الكولجسين من موقع ارتباطه بالتيوبولين لكنه لا يشبه الكولجسين في إزالة البلمرة ولا يرتبط بموقع ارتباط vinca alkaloids ولكن لوحظت زيادة في الاستجابة لعملية الموت المبرمج للخلية في زرع الخلايا المتعرضة vinblastine و Dilantin قياسا عند استخدام المادة لوحدها (Lobert *et al.*, 1999).

تضم عائلة Convolvulaceae 55 جنسا و (1600-1700) نوع يضم الجنس Convolvulus 250 نوعا (Welman,2000) ونحو 6 أنواع منها في العراق (Chakravarty,1976).

أن المديد عشبة معترشة زاحفة متسلقة دائمية ذات سيقان اسطوانية ملساء ملتفة ومنتشرة على سطح التربة وتتسلق المزروعات والشجر، طولها أكثر من ثلاثة أمتار، الأوراق مفردة حرابية الشكل متبادلة، الأزهار قمعية الشكل بيضاء أو وردية شاحبة مفردة أو مزدوجة على ساق طويلة تبرز من قاعدة الورقة وتزهّر في المدة بين نيسان وتشرين الأول، الجذور بيضاء تشبه الحبل، هشة سهلة الانكسار، واسعة الانتشار تمتد بعمق يصل إلى 30 قدما وتتج الجذور الأفقية البراعم والجزء الخضري (Dockstader,2005).

ينتشر المديد بوساطة البذور الموجودة داخل كبسولة غير مغطاة، ذات لون بني غامق، عددها 2-4 بذور يمكن أن تحملها الحيوانات والأمطار إلى مناطق واسعة البذور بيضاوية الشكل يتراوح طولها من 3-4 ملم (Wilken and Hannah,1998).

تعد آسيا وأوربا الموطن الأصلي للمديد، وتم تسويقه إلى الولايات المتحدة الأمريكية في بداية عام 1800 بوصفها نباتات زينة ومع نهاية هذا القرن انتشر المديد تماما في مناطق العالم المختلفة (Wilken and Hannah,1998; Dockstader,2005)، فضلا عن انتشاره عن طريق تسويق الحبوب الملوثة ببذور المديد إلى مناطق مختلفة من العالم، وينمو المديد بصورة برية في معظم أنحاء العراق (Al-Rawi,1988).

#### 1-5-2: المكونات الكيميائية لنبات المديد

يحتوي المديد على أنواع من قلويدات التروبين Tropane alkaloids وتتضمن Pseudotropine و Tropine و Tropinone و Meso-cuscohygrine (Schultheiss et al.,1995)، فضلا عن أنواع Pyrrolidin alkaloids ومنها Hygrine و Cuscohygrine (Todd et al.,1995).

المعادن، وتم إثبات فعالية الحديد في تجميع أكثر من 3800 mg من Cr و 1500 mg من Cd و 560 mg من Cu لكل كيلوغرام من الوزن الجاف للحديد، وبناءً على ذلك عدّ الحديد مناسباً في معالجة التربة الملوثة بهذه المعادن، من الأنواع النباتية عالية التخزين للكروميوم (Cr-Hyperaccumulator plant species (Gardea-Torresdey et al., 2004).

تعد مركبات الايض الثانوي التي تعمل على تثبيط عملية Angiogenesis من العوامل المضادة للسرطان، ومنها المركب (PGM) proteoglycan molecules المستخلص من أوراق الحديد وهو غير سام ذوقاً بلية على تثبيط عملية تكوين الاوعية الدموية الجديدة عند اختبار تأثيره في الغشاء الكوريوني لبيض الدجاج chicken egg chorioallantoic membrane بنسبة 18% ، 55% ، 73% وبالجرع 50، 100، 200 مايكروغرام على التوالي، كما ثبت هذا المركب وبالجرع 250-1000 مايكروغرام يومياً لمدة اسبوعين سواء بالتجريب فمويًا أو الحقن تحت الجلد subcutaneous وداخل البريتوني Intra peritoneal والوريدي Intravenous ، نمو الأورام السرطانية في الفئران من نوع Lewis Lung Carcinoma Fibrosarcoma (S-180 kun ming) و (C57) وبنسبة 54%-77% من وزن الورم، فضلاً عن زيادة نشاط الخلايا البلعية phagocytes في بلعمة خلايا الخمائر بنسبة 85% أكثر من الخلايا البلعية للسيطرة، وهذا يفسر قابلية PGM في زيادة الفاعلية المناعية (Imunnostimulatory activity) (Meng et al., 2002).

أشار Meng وآخرون (2002) إلى أن نمو الأورام قد ثبت بنسبة 70% عند تجريب الفئران من ضرب Kun Ming mice (50-200 mg/kg/day) بالمركبات ذات الأوزان الجزيئية العالية High molecular mass extract المستخلصة من أوراق الحديد، بطريقة الحقن تحت الجلد أو داخل البريتوني، كما وجدوا أن متوسط الجرعة المميّنة لنصف العدد LD<sub>50</sub> للفئران المستخدمة كانت 500 mg/kg/day، وأن تثبيط نمو الورم تم بجرعات غير سامة.

إن مركب PGM أكثر فاعلية بما يقارب 100 مرة من غضروف القرش shark cartilage الشائع الاستعمال بين الناس في إيقاف نمو الأورام السرطانية، فضلا عن تكاليفه الباهضة وصعوبة الحصول عليه وتناقص كميته ولاعتبارات اقتصادية وبيئية صدرَ قانون يمنع استخدامه بوصفها عقارا، فكان PGM البديل الأمثل والأوفر نتيجة وفرة المديد في الطبيعة وسهولة الحصول عليه وتحضيره (Calvino,2002).

# المواد وطرائق العمل

2- المواد

1-2 : الأجهزة والأدوات المستخدمة

اسم الجهاز	ت
Microtiter plate for tissue culture with 96 flat bottom wells	1
أطباق الزرع النسيجي متعدد الحفر ذو 96 حفرة مسطحة	
ELISA (Enzyme Linked Immuno sorbent assay)	2
قاريء الألايزا	
Test tubes	3
أنابيب زجاجية نبيذة حجم (10مل)	
Refrigerator	4
ثلاجة	
Contineous extraction apparatus soxhlet	5
جهاز الاستخلاص المستمر	
Autoclave	6
جهاز التعقيم (مؤصدة)	
Universal centrifuge	7
جهاز النبذ المركزي العادي	
Incubator	8
حاضنة	
Water bath	9
حمام مائي	
Blender	10
خلاط كهربائي	
Slides	11
شرائح زجاجية	
Reflux	12
عاكس	
Oven	13
فرن حراري	
Filter Millipore	14
فلتر تعقيم 0.22 M	
Laminar air flow	15
كابينة معقمة	
Light Microscope	16
مجهر ضوئي	
phase contrast Inverted microscope	17
مجهر ضوئي مقلوب الطور	
Magnetic stirrer	18
محرك مغناطيسي	
pH meter	19
مقياس الأس الهيدروجيني	
Balance	20
ميزان حساس	
Shaker	21
هزاز	

## 2-2 المواد الكيميائية

المادة	
Absolute methanol (Analar)	كحول ايثيلي مطلق
Absolute methanol (Analar)	كحول مثيلي مطلق
Glacial acetic acid	حامض الخليك الثلجي
Hydrochloric acid	حامض الهيدروكلوريك
Hexane	هكسان
Diethyl ether	الاثير ثنائي الاثيل
Chloroform	كلوروفورم
Ammonia	أمونيا
Mercuric chloride	كلوريد الزئبقيك
Potassium iodide	يوريد البوتاسيوم
Bismuth nitrate	نترات البزموت
Sodium chloride	كلوريد الصوديوم
Sulfuric acid	حامض الكبريتيك
Ferric chloride	كلوريد الحديدك
Sodium hydroxide	هيدروكسيد الصوديوم
Acetocarmin	صبغة الاسيتوكارمن
Tris-base	Tris القاعدي
Monohydrat sodium carbonate	كربونات الصوديوم الهيدروجينية
Giemsa stain	صبغة كمزا
Glycerol	كليسول
Sodium bicarbonate	بيكاربونات الصوديوم
Lead acetate	خلات الرصاص
Acetic acid	حامض الخليك
Cooper sulphate bentahydrate	كبريتات النحاس المائية
Sodium citrate	سترات الصوديوم
Trypsin-versin	ترسين-فرسين
Crystal violet	صبغة البنفسج البلوري
Fetal calf serum	مصل العجل البقري
Streptomycin	المضاد الحيوي ستربتومايسين
Penicilline	المضاد الحيوي البنسلين
Rosswell Park Memorial Institute-1640	الوسط الزرعي RPMI-1640

## 2-3 طرائق العمل

## 2-3-1 جمع العينات النباتية وتصنيفها

جمع النبات من حدائق الجادرية في وتم التأكد من تصنيفه من قبل الأستاذ الدكتور علي الموسوي/كلية العلوم/جامعة بغداد.



الشكل (2-3): صورة حقلية لنبات المديد *Convolvulus arvensis*

2-3-2 الكشف الكيميائي التمهيدي لبعض المكونات الكيميائية في أوراق نبات المديد.

أولاً: الكواشف المستخدمة

أ- الكشف عن القلويدات

أ-1 كاشف ماير Mayer's Reagent

حُضِرَ بحسب ما ذكِرَ في (Atherder (1969 وكالاتي:

1- المحلول (أ): حُضِرَ بإذابة 1.358 غرام من كلوريد الزئبقيك ( $HgCl_2$ ) في 60 مليلتر من الماء المقطر.

2- المحلول (ب): حُضِرَ بإذابة 5 غرام من يوديد البوتاسيوم (KI) في 10 مليلتر من الماء المقطر.

مُزَجَّ 60 مليلتر من المحلول (أ) مع 10 مليلتر من المحلول (ب) وأكمل الحجم إلى 100 مليلتر من الماء المقطر وحفظ الكاشف إلى حين الاستخدام.

أ-2 كاشف دراجندروف Dragendroff's Reagents

حُضِرَ على وفق ما ذكر في Stahl (1969) وكالاتي:

1- المحلول (أ): حُضِرَ بإذابة 0.85 غرام من نترات البزموت القاعدية في خليط من 10 مل حامض الخليك و 40 مل من الماء المقطر.

2- المحلول (ب): حضر بإذابة 8 غرام من يوديد البوتاسيوم (KI) في 20 مليلتر من الماء المقطر.

3- المحلول الخزين Stock solution: يحضر بخلط كميات متساوية من المحلول (أ) والمحلول (ب)، ويمكن أن يحفظ لمدة طويلة في قنار زجاجية معقمة.

4- محلول الرش Spray reagent: يحضر بخلط 1 مل من محلول الخزين مع 2 مل من حامض الخليك مع 10 مل من الماء المقطر ويحضر أنياً قبل الاستعمال.

ب- الكشف عن السكريات

كاشف بندكت: حضر بحسب ما ذكر في Stahl (1969) وذلك بإذابة المواد الآتية في 100 مل من الماء المقطر.

1- 1.73 غم من كبريتات النحاس المائية  $(\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O})$ .

2- 17.3 غم من سترات الصوديوم.

3- 10 غم من كربونات الصوديوم الهيدروجينية.

ثانياً: المحاليل

أ- محلول كلوريد الزئبقيك

حضر بإذابة 1 غم من كلوريد الزئبقيك  $\text{HgCl}_2$  في 100 مل من الماء المقطر ويستخدم هذا المحلول في الكشف عن الصابونينات للمستخلص النباتي.

ب- محلول كلوريد الحديدك  $\text{FeCl}_2$

حضر بإذابة 1 غم من كلوريد الحديدك في 100 مل من الماء المقطر.

## ج- محلول خلات الرصاص

حضر بإذابة 1 غم من خلات الرصاص في 100 مل من الماء المقطر.  
يستخدم المحلولان (ب و ج) للكشف عن التانينات.

ثالثاً: طريقة العمل

## 2-3-2-1: الكشف عن القلويدات Alkaloids

تم الكشف عن القلويدات باستخدام المحاليل الوارد ذكرها في الفقرة (أ-1 وأ-2) إذ يدل ظهور الراسب الأبيض على وجود القلويدات في حالة استخدام كاشف ماير ويدل ظهور الراسب البني على وجودها في حالة استخدام كاشف دراجندروف.

## 2-3-2-2: الكشف عن الصابونينات Saponines

تم الكشف عن الصابونينات بالطريقة الوارد ذكرها في (Harborn 1973), إذ وضع 1 غم من المستخلص المائي للأوراق في أنبوبة اختبار, ثم أضيف له 10 مل من الماء المقطر, وبعد رج المزيج بشدة ظهرت رغوة كثيفة وبقاؤها لمدة طويلة يعد دليلاً على ايجابية الفحص. كذلك تم الكشف بحسب الطريقة الوارد ذكرها في الشامي (1982) وذلك بإضافة (1-3) مل من محلول كلوريد الزنبيق إلى 5 مل من المستخلص المائي لأوراق النبات, ان ظهور الراسب الابيض يعد دليلاً على وجود الصابونينات.

## 2-3-2-3: الكشف عن الكلايكوسيدات Glycosides

أجري الكشف بأخذ 1 مل من المستخلص المائي الخام وأضيف له قطرات من HCl, وتم غليهما لمدة دقيقتين في حمام مائي؛ وبعدها أخذ 2 مل من كاشف بندكت في أنبوبة اختبار وأضيف إليه 1 مل من المستخلص, ووضعت الأنبوبة في حمام مائي مغلي لمدة 5 دقائق ثم برّد, إذ يدل تكون الراسب الأحمر على ايجابية الفحص (Evans,1999).

## 2-3-2-4: الكشف عن التانينات Tanins

أتبعت الطريقة التي ذكرت من الشامي (1982) وذلك بغلي 10 غم من المسحوق النباتي في 50 مل ماء مقطر ثم رشّح المزيج وترك ليبرد, قسم بعدها الراشح إلى قسمين،

أضيف إلى القسم الأول منه خلاص الرصاص (1%)، إذ يدل وجود راسب أبيض هلامي القوام على وجود التانينات، أما القسم الثاني فأضيف إليه محلول كلوريد الحديدك (1%)، ويدل ظهور اللون الأخضر المزرق على ايجابية الفحص.

#### 5-2-3-2 الكشف عن التربينات والسترويدات Terpens and Steroids

تم الكشف وفقاً لما ورد في (Al-Maisary, 1999) وذلك بمزج 1 مل من المستخلص النباتي مع 2 مل من الكلوروفورم وأضيف إليه قطرة من حامض الخليك اللامائي وقطرة من حامض الكبريتيك المركز. ان تكون اللون البني الفاتح يدل على ايجابية الفحص للتربين أما ظهور اللون الأزرق الداكن بعد ترك المزيج لمدة طويلة (يوم كامل) فإنه يدل على وجود السترويد.

#### 6-2-3-2: الكشف عن الفلافونات Flavonoids

تم الكشف وفقاً لما ورد في (Jaffer et al., 1983) إذ حضر المحلول (أ) وهو المستخلص النباتي الخام بحجم 5 مل، وحضر المحلول (ب) بإذابة 10 مل من الكحول الأيثلي بتركيز 50% إلى 10 مل من هيدروكسيد البوتاسيوم بتركيز 50%، مزجت كميات متساوية من كل من محلولي (أ) و (ب) إذ يدل ظهور اللون الأصفر على وجود الفلافونات.

#### 7-2-3-2: الكشف عن الراتنجات Resine

تم مزج 10 غم من المسحوق النباتي مع 50 مل من الكحول الأيثلي (95%) وترك المزيج لمدة دقيقتين في حمام مائي مغلي، ثم رشح المحلول وأضيف له 100 مل من الماء المحمض بحامض الهيدروكلوريك (4%). الاستدلال على وجود الراتنجات هو ظهور العكورة الواضحة في المحلول (Harborn, 1984)

#### 3-3-2 تحضير المستخلصات

تم فصل الأجزاء النباتية المستخدمة في الدراسة وغسلت جيداً بماء الحنفية Tap water لإزالة التربة والأوساخ منها مع مراعاة أن تكون هذه الأجزاء خالية من الأضرار الظاهرية وبعدها جففت بدرجة حرارة الغرفة ثم أجريت عمليات الاستخلاص كما يأتي:

## Tris-base buffer -6

حضر بإذابة 12.11 غم من مادة Tris base في 950 مل من الماء المقطر،  
وإستخدام هذا المحلول في إذابة المستخلص القلويدي الخام الجاف (Voyer,2000).

## 2-3-4-2 : معاملة الجذور وتحضير الشرائح.

1- للحصول على جذور البصل اللازمة للدراسة وضعت الأبخال بعد غسلها جيداً بماء الحنفية في فوهة قناني زجاجية مناسبة وحاوية على ماء عادي الى حين نمو الجذور بطول 1-2 سم، مع مراعاة إبدال الماء يومياً.

2- قطعت الجذور ونقلت مباشرة إلى قناني زجاجية صغيرة Vials (حجم 5 مل) حاوية على المستخلص القلويدي الخام وبتراكيز متدرجة هي (1، 2، 4، 8، 12، 24) ملغم/مل مع الأخذ بعين الأهمية وجود ثلاثة مكررات لكل من المعاملة والسيطرة وبمدة معاملة أربع ساعات، وبدرجة حرارة الغرفة (23-25) °م .

3- بعد انتهاء مدة المعاملة تم نقل الجذور إلى قناني زجاجية أخرى حاوية على المثبت لمدة 6-24 ساعة.

4- نقلت الجذور بعد الغسل بالماء المقطر إلى قناني زجاجية صغيرة Vials حاوية على INHCl ووضعت في الفرن الكهربائي Oven لمدة 12 دقيقة وبدرجة حرارة 60 °م.

5- تم غسل وتنشيف الجذور بعد إخراجها من الفرن الكهربائي ثم وضعت في قناني زجاجية صغيرة حاوية على صبغة الاسيتوكارمن ووضعت في الفرن الكهربائي لمدة 10 دقائق.

6- حضرت الشرائح المهجرية المؤقتة بطريقة الهرس (Squash Method ) Sharma (and Sharma,1980).

2-3-4-3 دراسة الانقسام الخيطي في جذور البصل *Allim cepa*

تم فحص 1000 خلية لكل مكرر فكان مجموعها 3000 خلية لكل تركيز، وطبقت الدراسة نفسها على مكررات السيطرة control فكان عددها للتركيز الواحد (المعاملة

والسيطرة) وبالمدة الزمنية 6000 خلية، تم تقدير دليل الانقسام ونسب الأطوار والحالات الشاذة بالمقارنة مع السيطرة وفقاً للطريقة المذكورة في (Stick and San, 1981)

$$100 \times \frac{\text{عدد الخلايا المنقسمة}}{\text{العدد الكلي للخلايا}} = \text{دليل الانقسام}$$

$$100 \times \frac{\text{عدد خلايا الطور}}{\text{عدد الخلايا المنقسمة}} = \text{دليل الطور}$$

$$100 \times \frac{\text{عدد الخلايا غير الطبيعية في الطور}}{\text{عدد الخلايا الكلي في الطور نفسه}} = \text{دليل الحالات الشاذة}$$

وكذلك قُدرت النسبة المئوية من السيطرة لكل من دليل الانقسام ودليل الطور في جذور البصل المعاملة بالمستخلص القلويدي الخام.

$$100 \times \frac{\text{دليل انقسام المعاملة}}{\text{دليل انقسام السيطرة}} = \text{النسبة المئوية من السيطرة لدليل الانقسام}$$

$$100 \times \frac{\text{دليل طور المعاملة}}{\text{دليل طور السيطرة}} = \text{النسبة المئوية من السيطرة لدليل الطور}$$

### 2-3-5 : احتساب الجرعة القاتلة لنصف العدد LD<sub>50</sub>

تم تحديد الجرعة المميّنة الوسطية للمستخلص المائي للأوراق الطازجة لمعرفة السمية الحادة Acute toxicity للمستخلص وذلك بأخذ 48 فاراً من سلالة albino Balb/c بأعمار متقاربة (7-8 أسابيع) وبأوزان تراوحت بين 15 و20 غم، وقسمت على 8 مجاميع كل مجموعة تحوي (6) من الحيوانات المختبرية، ووضعت في أقفاص بلاستيكية نظيفة.

8- صبغت الشرائح بصبغة كمزا لمدة 20 دقيقة. ثم غسلت بالماء المقطر وتركت بعد ذلك لتجف.

9- فحصت الشرائح بواسطة المجهر الضوئي الاعتيادي، إذ تم فحص 1000 خلية وتم حساب الخلايا المنقسمة والخلايا غير المنقسمة منها، واستخرج في ضوء ذلك معامل الانقسام MI بدلالة الخلايا المتوقفة في الطور الاستوائي وفق المعادلة الآتية:

$$\text{معامل الانقسام MI} = \frac{\text{عدد الخلايا المنقسمة}}{\text{العدد الكلي للخلايا}} \times 100$$

(Stich and San, 1981).

وقدرت النسبة المئوية من السيطرة:

$$\text{النسبة المئوية من السيطرة} = \frac{\text{دليل الانقسام للمعاملة}}{\text{دليل الانقسام للسيطرة}} \times 100$$

7-3-2 اختبار نشاط المستخلص القلويدي الخام للأوراق الجافة لنبات المديد في إيقاف انقسام الخلايا الجسمية لنقي العظم في الفئران البيض *Mus Musculur*

اتبعت الخطوات والجرع نفسها عند اختبار نشاط المستخلص القلويدي الخام للأوراق الطازجة للنبات في إيقاف انقسام الخلايا الجسمية لنقي العظم في الفئران البيض.

والوراثة الطبية. إذ جرى استحداث هذا الخط الخلوي خارج الجسم بعد إخراج الأجنة من رحم الأم الحامل ومن ثم التخلص من محتويات بطن كل جنين تحت ظروف معقمة، هرس الأجنة بعد ذلك باستخدام انزيم التربسين. وفي النهاية نقلت الخلايا إلى قناني الزرع النسيجي المعقمة بعد اضافة الوسط الغذائي لها الذي يبلغ تركيز مصل عجل البقر فيه 20% , وعند تكون الطبقة الأحادية الكاملة، عولت الخلايا بمحلول التربسين/فرسين لتقسيمها على مزرعة ثانوية أخرى.

#### • تهيئة الوسط الزرع Preparation of medium of cancer cell lines

تمت تهيئة الوسط الزرع وفقاً لـ (Freshney, 2000) بخلط مكوناته مع بعضها البعض لتحضير 1 لتر منه، ومن ثم عقت باستعمال مرشح ذي ثقوب بقطر 0.22 مايكرون لضمان تعقيمه، ثم وزع الوسط الزرع في قناني زجاجية ذات غطاء محكم سعة 200 مل وحفظت القناني بدرجة حرارة -20°م إلى حين الاستعمال. لقد تم الحصول على الخطين الخلويين السرطانيين (Hep-2 و AMN-3) والخط الخلوي لجنين الجرذ (REF) من المركز العراقي لأبحاث السرطان والوراثة الطبية/بغداد. تم إجراء الخطوات الخاصة بالزرع النسيجي تحت ظروف معقمة كالآتي:

1- أضيف 2 مليلتر من محلول التربسين/فرسين المحضر في الفقرة (2-ب-8-1-6) إلى قنينة الزرع النسيجي حجم 25 سم<sup>2</sup> الحاوية على الخلايا بعد تفريغها من الوسط الزرع القديم. ثم حركت القنينة برفق وحضنت في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م لمدة 15 دقيقة لتفكيك الخلايا الملتصقة وكذلك خلخلة التصاقها بجدار القنينة للحصول قدر الإمكان على خلايا أحادية مفردة.

2- أضيف إلى القنينة الحاوية على الخلايا المفككة ما يقارب 15 مليلتر من وسط نمو جديد (RPMI-1640) وتم تحريك القنينة جيداً وبعدها أفرغت محتويات القنينة الحاوية على الوسط الغذائي الجديد مع الخلايا إلى قنينة أخرى جديدة بحيث يكون مستوى الوسط الزرع مع الخلايا متساو بين القنيتين. أي كل قنينة وضع فيها نفس

- كل مزجه جيدة إلى حفر طبق معايرة الزرع النسيجي ذي القعر المسطح Microtiter plate for tissue culture باستعمال ماصة أو توماتيكية دقيقة.
- b- ترك الطبق في الحاضنة بدرجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة إلى حين التصاق الخلايا في الحفرة , بعدها تم التخلص من الوسط الزرع القديم في الحفر وتمت إضافة 0.2 مل من التراكيز المحضرة سابقاً لكل تركيز (النباتي الخام، القلويدي الخام)، بواقع ثلاثة مكررات لكل تركيز. تم عمل ثلاثة مكررات للسيطرة (خلايا فقط) وثلاثة مكررات للـ PBS في حالة المستخلص الخام.
- و ثلاثة مكررات للـ DMSO في حالة المستخلص القلويدي الخام للأوراق الجافة للنبات.
- c- بعد مرور مدة التعريض (Exposure time) المحددة للحضن وهي 48 ساعة أخرج الطبق من الحاضنة وأضيف إليه محلول صبغة البنفسج البلوري لجميع الحفر الحاوية على الخلايا بمقدار 0.2 مل لكل حفرة.
- d- أعيد الطبق مرة ثانية إلى الحاضنة ليحضن لمدة نصف ساعة، بعدها اخرج الطبق وأزيلت محتوياته وغسلت الخلايا بمحلول (PBS) إلى حين زوال الصبغة الزائدة إذ إن الخلايا الحية تأخذ الصبغة أما الميتة فلا تأخذها.
- e- قرأت النتائج باستخدام ELISA بطول موجي 492 نانوميتر.
- f- أجريت الخطوات السابقة على كل من الخططين الخلويين السرطانيين Hep-2 والـ AMN-3 ، والمزرعة الطبيعية REF باستعمال المستخلصين الخام (النباتي والقلويدي) بمدة تعرض 48 ساعة
- g- تم حساب نسبة التثبيط لكل تركيز

2-ب-9 التحليل الإحصائي

حللت النتائج إحصائياً باستخدام التصميم العشوائي الكامل Complete Randomized Desing (CRD) ولمعرفة فيما إذا كانت الفروقات بين المعاملات معنوية أم لا، باستخدام إختبار دنكن متعدد الحدود (Duncun Multiple Test) وباستخدام البرنامج الإحصائي الجاهز SPSS (Duncan, *et al.*, 1983)

# النتائج والمناقشة

3-1 الكشف الكيميائي التمهيدي لبعض مكونات مستخلص أوراق نبات المديد. أظهرت نتائج الكشف الكيميائي لمستخلص أوراق نبات المديد باستعمال الكواشف والمحاليل التي سبق ذكرها وجود المركبات الموضحة في الجدول (3-1).  
الجدول (3-1): الكشوفات الكيميائية النوعية لبعض المركبات الكيميائية في مستخلص أوراق نبات المديد.

النتيجة	دليل الكشف	الكاشف المستخدم	المركب الكيميائي
+	راسب بني	دراجندروف	القلويدات
+	راسب أبيض	ماير	
+	رغوة تبقى لمدة	رج المستخلص المائي	الصابونينات
+	راسب اصفر	KOH مع كحول الايثيلي	الفلافونات
+	راسب احمر	بندكت	الكلايكوسيدات
+	راسب ابيض هلامي أخضر مزرق	خلات الرصاص 1% كلوريد الحديدك	التانينات
+	لون بني فاتح (التربينات) لون ازرق داكن بعد يوم (سترويدات)	كلورفورم+حامض الخليك اللامائي+قطرة حامض الكبريتيك	التربينات والسترويدات
+	العكورة	كحول ايثيلي+ماء حمض بحامض HCl 4%	الراتنجات

العلامة (+) تدل على ايجابية الفحص.

إن النبات يحتوي على المركبات القلويدية وهذا أكده تشخيص Todd وآخرون (1995) القلويدات من مجموعة Tropane alkaloid مثل Tropine و Pseudotropine و Tropinone ومجموعة Pyrolidine alkaloid مثل Cuscohygrine و Hygrine من الأجزاء الهوائية aerial part للنبات بواسطة تقنية كروماتوغرافيا الغاز GC-SM.

يحتوي نبات المديد على التانينات والصابونينات والفلافونات أيضا ، وهذا ما توصل إليه Mojab وآخرون (2003) عند دراسة تحليلية لخمسة وخمسين نباتا يعود إلى 21 عائلة ومن ضمنها نبات المديد، وكما ذكر Sowemimo and Fransworth (1973) وجود الفلافونات والقلويدات والصابونينات، وقد قاما بتشخيص المركبات السترويدية التي تتضمن  $\beta$ -sitosterol و Stigmasterol و Compesterol باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC وكروماتوغرافيا الغاز GC، التي أظهرت ان النبات يحتوي على  $\beta$ -sitosterol بنسبة 7.8% و stigmasterol بنسبة 78.2% و compesterol بنسبة 6.2% وكذلك تم تشخيص المركبات التربينية مثل مركب  $\alpha$ -amyrin باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة.

إن النتيجة الموجبة لوجود المواد الراتنجية أتفقت عم ما أشار اليه Chakravarty (1976) عند تحليل النبات إلى احتوائه على مادة الراتنج بنسبة 1.52% - 4.0% ووجودها في الرايزومات بنسبة 4.9%.

ذكر Meng وآخرون (2002) وجود كتلة عالية الوزن high molecular mass قابلة للذوبان في الماء، وهي خليط من السكريات والبروتينات المرتبطة بها وتسمى بـ proteoglycan وهذا ما أتفق مع نتائج كشفنا بوجود الكلايكوسيدات.

### 2-3 استخلاص القلويدات من الأوراق الجافة لنبات المديد

استدل على فاعلية عدد من النباتات في علاج بعض انواع السرطان اعتمادا على تأثير مركباتها في آليات الانقسام الخلوي. ومن المركبات الشائعة في هذا الخصوص القلويدات، فضلا عن اهمية القلويدات في دراسة الكروموسومات لأغراض بحثية وطبية

وفي مضاعفة العدد الكروموسومي ومنها قلويد الكولجسين ( Cooper and Hausman,2004). ونظرا لاحتواء نبات المديد على انواع من القلويدات فقد صار التوجه لاستخلاصها واختبارها لدراسة تأثيرها في الانقسام الخلوي ومقارنتها بنشاط الكولجسين وتقويم صلاحيتها عن المواد التي يتم استيرادها من خارج القطر.

فالقلويدات تعدُّ من أهم المجاميع في عالم الدواء والعلاج ومن المركبات الموجودة طبيعياً وهي ذات تأثير فسيولوجي في الكائن الحي، وان وجدت بكميات ضئيلة في النبات وهذا التأثير يختلف باختلاف طبيعة القلويدات ومقدارها (الشماع،1989).

تكون للقلويدات قابلية الذوبان بالمذيبات العضوية مثل الكلورفورم والايثر وعند تفاعلها مع الحامض تكون أملاحاً غير قابلة للذوبان بالمذيبات العضوية ولها القابلية على الذوبان بالماء وهذا يشكل طريقة جيدة لفصلها؛ لذا تم استخدام الميثانول وهذا المذيب المناسب للاستخلاص الأولي وهو أكثر قطبية من الهيدروكاربونات المكثورة فضلاً عن انه ينفذ بشكل فعال في أغشية الخلايا، ان الخلاصة النباتية قد تحوي فضلاً عن القلويدات مركبات زيتية او دهون ومواد شمعية تعيق الاستخلاص لتكوينها مستحلبات، لذا يتم التخلص من هذه المركبات قبل عملية الاستخلاص باستخدام الايثر البترولي او الهكسان.

تم الحصول باعتماد الطريقة المذكورة سابقاً على 30 ملغم من المستخلص القلويدي الخام عند استخدام 50 غم من الاوراق الجافة للنبات وبنسبة استخلاص 0.06% وهذه النسبة أعلى من التي حصل عليها Tood وآخرون (1995) عندما استخدم 107 غم وزن رطب من الأجزاء الهوائية للنبات واستخلصها بنفس الخطوات التي اتبعت في دراستنا مع بعض الاختلافات البسيطة، وحصل على 17 ملغم من المستخلص القلويدي الخام بنسبة استخلاص 0.015%. وقد يكون السبب في هذا الفرق ما يأتي:

أولاً: استعماله للسيقان والأوراق المكونة للأجزاء الهوائية بينما في دراستنا الحالية استعملت الأوراق فقط. وقد تختلف نسبة هذه المكونات من جزء لآخر في النبات، فعندما استخدم Kartal وآخرون (2001) خطوات مشابهة للتي ورد ذكرها في Cannel (1998) والتي اتبعت في هذه الدراسة لأستخلص قلويدات من نوع pyrrolizidin من

نبات *Symphytum sylvaticum*, عند استخدامه 400 غم من البذور المجففة وحصل على 780 ملغم من المستخلص بنسبة استخلاص 0.199%، وعند استخدامه 400 غم من الأجزاء الهوائية حصل على 375 ملغم من المستخلص القلويدي الخام بنسبة استخلاص 0.093%.

ثانياً: اعتمد Tood وآخرون (1995) الأجزاء الهوائية الرطبة فهناك اختلاف إذ تحتوي الأجزاء الرطبة على الماء وبذلك يمثل وزن الأنموذج المعتمد وزن الماء مع وزن المكونات الأخرى، وفي هذه الدراسة استخدمت الأوراق المجففة لتكون خالية من الماء ويكون الوزن ممثلاً لوزن المكونات الأخرى.

ثالثاً: لا يمكن إستبعاد احتمال الاختلاف في التركيب الوراثي لنباتات المديد المستخدمة في هذه الدراسة عن تلك المستخدمة في دراسات دول أخرى.

3-3 دليل الإنقسام ونسبة الأطوار في خلايا جذور البصل *Allium cepa* المعاملة بالمستخلص القلويدي الخام لأوراق نبات المديد المجففة.

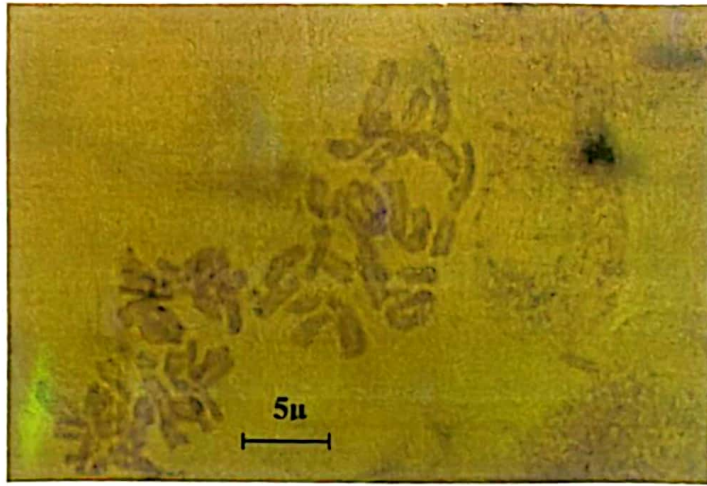
عوملت جذور البصل بالتراكيز (1، 2، 4، 8، 12، 24) ملغم/مل من المستخلص القلويدي الخام لأوراق المديد ولمدة أربع ساعات، لوحظ انخفاض دليل الإنقسام في الجذور المعاملة عن الجذور غير المعاملة كما اختلفت نسب أطوار الإنقسام، وظهرت خلايا متوقفة في الطور الاستوائي في الجذور المعاملة كما في الشكل (3-2) كذلك شوهدت كروموسومات متأخرة وحالة اللزوجة الجدول (3-12).

#### دليل الإنقسام

كان معدل دليل الإنقسام في خلايا السيطرة 9% كما موضح في الجدول (3-12) وانخفض عن ذلك بفرق معنوي في معدل دليل الإنقسام عند المعاملة بالتراكيز الأول (7.93%) والتراكيز الثاني (6.5%) والتراكيز الثالث (5.46%) والتراكيز الأخرى، وكان الفرق معنوياً أيضاً بين هذه التراكيز الثلاثة، بينما لم تكن الفروق معنوية بين التراكيز الأربعة الأخيرة. مقارنة بقيم دليل الإنقسام المحسوبة التي قد لا توضح طبيعة التأثير لذلك كان من الأفضل مقارنة دليل الإنقسام ودليل الطور كنسبة مئوية من السيطرة كما في



(أ)



(ب)

الشكل (2-3): خلايا جذور البصل المعاملة بالمستخلص القلويدي الخام للأوراق الجافة لنبات المديد

(أ): خلية في الطور الإستوائي المتوقف C. metapase

(ب): خليتان في الطور الإستوائي المتوقف C. metapase

أن تأثير المستخلص القلويدي الخام على أنقسام خلايا جذور البصل جاء مطابق لدراسة القيسي (2006) التي أظهرت ان المستخلصات الخام المختلفة لنبات المديد أدت إلى خفض نسبة دليل الإنقسام في القمة النامية لجذور البصل. إذ انخفضت النسبة إلى 60-70% من السيطرة عند المعاملة بالتركيز 5% من المستخلص المائي الخام للأوراق

إنقسام الخلايا السرطانية بوساطة التأثير على بروتين التيوبولين المكوّن لخيوط المغزل بالعقاقير المعتمدة على التيوبولين Tubuline-dependent anticancer drugs ومن هذه المواد Vincristine و Vinblastine و Colchicine و Taxol (Huang et al., 2002).

وفقا لدراسة القيسي (2006)، حقق المستخلص المائي للأوراق الطازجة لنبات المديد ارتفاع نسبة الطور الاستوائي عن السيطرة إلى 166.2% عند التركيز 5% لمدة أربع ساعات، بينما حقق المستخلص الكحولي للأوراق الطازجة أيضا النسبة إلى 181.6% من السيطرة عند التركيز والمدة نفسها، عُرِي إلى ارتفاع نسبة هذا الطور إلى توقف الكروموسومات في هذا الطور في كلا المستخلصين، فضلا عن تميعها ولزوجتها عند المعاملة بالمستخلص الكحولي.

في هذه الدراسة، سبب المستخلص القلويدي الخام لأوراق نبات المديد ارتفاع نسبة هذا الطور إلى 182.11% من السيطرة عند التركيز 8 ملغم/مل، والى 248.08% من السيطرة عند التركيز 24 ملغم/مل لمدة أربع ساعات، نتيجة توقف الكروموسومات في هذا الطور بنسبة 76.16% في التركيز الأول و 91.81% في التركيز الثاني. يستنتج من هذا إن فاعلية القلويدات في إيقاف الإنقسام عند الطور الاستوائي المتوقع تتحقق في تراكيز أقل من التراكيز المستخدمة في المستخلصات المائية الخام وهذا قد يُفسر أيضا فاعلية المستخلص الكحولي الأكثر من المستخلص المائي؛ نتيجة ذوبان أغلب القلويدات فيها. كما إن سبب لزوجة الكروموسومات في الطور الاستوائي تدل على تأثير بعض تراكيز المستخلص القلويدي في مكونات الكروموسوم وبالتالي التأثير في تركيب الكروموسوم وتشوه شكله، أو قد يكون ذلك نتيجة التأثير في المعقدات البروتينية المؤثرة في حلزونة الكروموسومات وارتباط الكروماتيدات الشقيقة، فإن أي خلل في تكوين أو تنشيط هذه المعقدات البروتينية يؤدي إلى عدم احتفاظ الكروموسوم بشكله المميز، ومن ثم تجمع المادة النووية على شكل كتل في الطور الاستوائي وتأخر انتقالها إلى الطور الاستوائي (Losada and Hirano, 2001; Yeong, 2004).

## 3-الطور الإنفصالي Anaphase

كانت نسبة الطور الإنفصالي في السيطرة 4.08%، انخفضت هذه النسبة في الجذور المعاملة، إذ سجل التركيز 4 ملغم/مل نسبة 58.82% من السيطرة، وانخفضت هذه النسبة إلى 37.99% عند المعاملة بالتركيز 24 ملغم/مل.

## 4-الطور النهائي Telophase

كانت نسبة الطور النهائي في السيطرة 4.74%، وازدادت هذه النسبة في التركيز الأول إلى 5.75%، وهذه الزيادة مشابهة لما وجدته Shehab (1980)، في تأثير مستخلص نبات *Teucrium pilosum* على الانقسام الخلوي لجذور البصل وتعزى هذه الزيادة إلى التباطؤ في الإنقسام. ثم انخفضت هذه النسبة في التراكيز التالية إذ سجل التركيز 24 ملغم/مل النسبة 32.70% من السيطرة. أما الانخفاض في نسبة الطور الإنفصالي والنهائي فسببه إحتباس الخلايا في الطور الاستوائي المتوقف وعدم إنتقالها إلى الطور اللاحق. وسجلت هذه الحالة أيضاً من العبيدي (2004) والعبودي (2005) والقيسي (2006)، وظهرت حالات من التشوهات الكروموسومية في هذين الطورين منها ظهور الجسور الكروموسومية والكروموسومات المتأخرة.

أن ظهور الجسور الكروموسومية عند المعاملة بالتركيز جميعها لمدة أربع ساعات ناتجة من لزوجة الكروموسومات التي تعيق إنفصال الكروماتيدات الشقيقة (Mercykutty and Stephan,1980)، وذلك أما بالتأثير في الكروموسوم نفسه وإما بالتأثير في عدم إزالة الفسفرة للبروتين اللاصق (cohesion protein). ونتيجة لذلك يحتفظ بنشاطه ومن ثم عدم إنفصال الكروماتيدات الشقيقة؛ وبالتالي يؤدي إلى تكوين الجسور نتيجة فعالية خيوط المغزل في سحب الكروموسومات للأقطاب و يؤدي هذا الأمر إلى حصول كسر في الكروموسومات (Losada and Hirano,2001).

أما الكروموسومات المتأخرة فيعزى سببها إلى خلل في ارتباط هذه الكروموسومات بخيوط المغزل نتيجة تشويه جهاز المغزل (Singh,1982).

لاحظ Soliman (2001) في دراسته للتركيز المختلفة من مستخلصات أوراق نبات neem انخفاضاً في نسبة الطور التمهيدي وارتفاعاً في نسبة الطور الاستوائي والإنصالي والنهائي مقارنة بالسيطرة، وقد فسر ذلك نتيجة تداخل مركبات هذا المستخلص وفعاليتها في توقف تصنيع الدنا فضلاً عن إعاقة تكون خيوط المغزل، كذلك سجلت تشوهات كروموسومية منها النواة الصغيرة، وخلايا متعددة الأنوية، وجسور وتميع وطور استوائي متوقف وكروموسومات متخلفة وتضاعف العدد الكروموسومي، وتشوه واضطراب في الطور الإنصالي والنهائي عزي تكون الجسور في الطورين الإنصالي والنهائي إلى تكسر الكروموسوم وإعادة الالتحام، أو نتيجة لزوجة الكروموسوم فهي تسبب انفصال الكروماتيدات الشقيقة غير المتكامل فتبقى مرتبطة بوساطة الجسور. فسر Bader وآخرون (1992) سبب لزوجة الكروموسومات على إنها إنحلال degraded وإزالة بلمرة الدنا الكروموسومي.

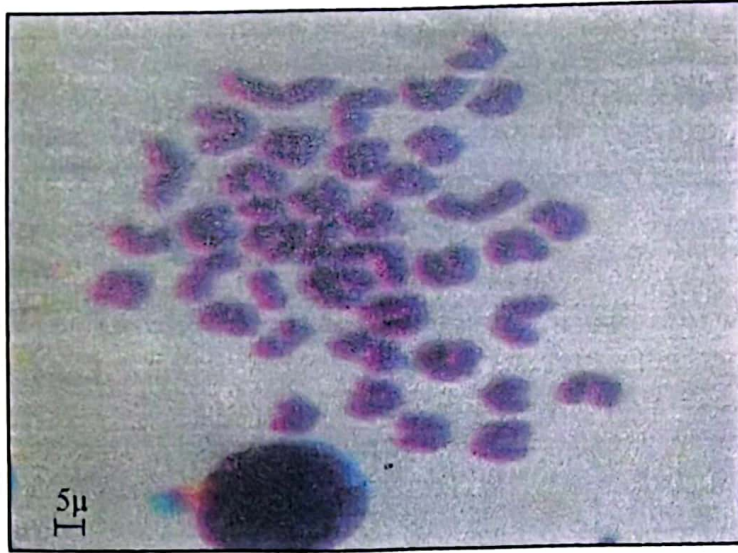
### 3-4 احتساب الجرعة القاتلة لنصف العدد LD<sub>50</sub>

الطريقة البسيطة للتقدير الأولي لسمية العقار هي تحديد الجرعة المميتة في الفئران، وتعد من المقاييس الشائعة في تحديد السمية الحادة للمادة الكيميائية (Gilman et al., 1980). كما إن الجرعة المناسبة للعقار يجب إن تحدد بوساطة دراسات أولية وممهدة للسمية الحادة وهذه الدراسات ضرورية في منع سمية الجرع العالية للعقار، أن التأثير السمي هو امتداد للتأثير العلاجي عند مستوى الجرع العالية، فالكومارين المضاد للتخثر، يطيل زمن التخثر في الجرع العالية مما يؤدي إلى النزف الشديد (Goldstein et al., 1974). يعد الموت الدليل الواضح للتأثير السمي للعقاقير على الكائنات الحية؛ لذا يتم تحديد الجرعة المميتة النصفية للعقاقير المراد استخدامها، وهي الجرعة التي تسبب الموت بنسبة 50% في حيوانات التجربة. ولهذا الغرض استخدم 48 فأراً ووزع إلى 8 مجاميع تضم كل مجموعة 6 فئران حقنت سبع مجاميع بالجرع الآتية على التوالي (25، 50، 100، 200، 300، 400، 500) ملغم/كغم فكانت النتائج بعد 24 ساعة من الحقن كما في الجدول (3-3).

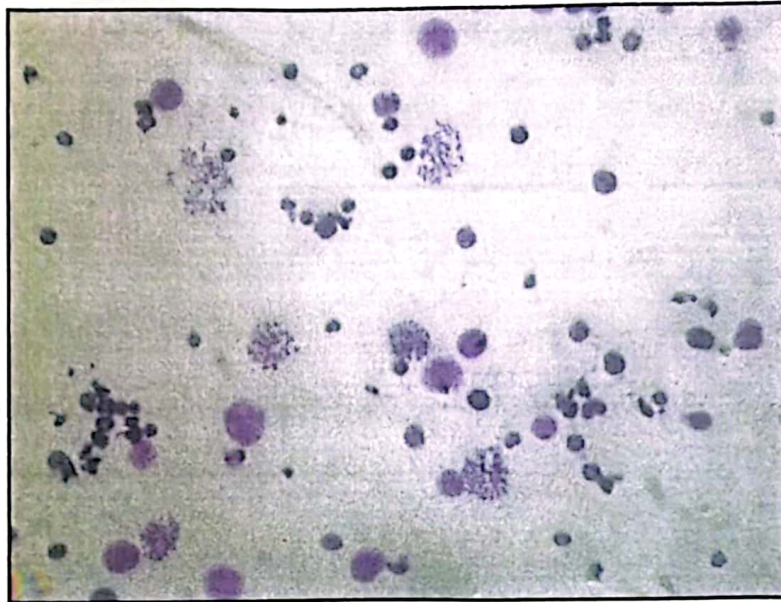
الجدول (3-4): نسبة خلايا نقي عظم الفئران في الطور الإستوائي عند حقنها بالمستخلص المائي الخام للأوراق الطازجة والمستخلص القلويدي الخام للأوراق الجافة والنسبة المنوية من السيطرة (المعاملة بالكولجسين).

المستخلص القلويدي لخام للأوراق الجافة		المستخلص المائي الخام للأوراق الطازجة		الجرع mg/kg
النسبة المنوية من السيطرة	نسبة الخلايا في الطور الإستوائي	النسبة المنوية من السيطرة	نسبة الخلايا في الطور الإستوائي	
	0.27±4.66 a		0.16±3.78 a	السيطرة*
42.27	0.12±1.97 f	38.62	0.11±1.46 c	10*
54.29	0.051±2.53 ef	45.23	0.20±1.71 de	20*
67.59	0.049±3.15 ef	58.46	0.50±2.21 cd	40*
72.96	0.10±3.40 cd	67.19	0.13±2.54 cd	80*
77.89	0.44±3.63 bcd	71.69	0.14±2.71 bc	160
82.83	0.13±3.86 bc	77.51	0.311±2.93 b	320
92.27	0.2±14.3 ab	96.82	0.09±3.66 a	640

- الحروف المختلفة في العمود الواحد تعني وجود فروق معنوية عند مستوى ( $P>0.05$ ) بحسب اختبار دنكن متعدد الحدود.
- وجود العلامة (°) على الجرعة يعني الاختلاف بين معدل دليل الانقسام كلا المستخلصين معنويًا عند مستوى ( $P<0.05$ ) بحسب اختبار دنكن متعدد الحدود.
- ± الخطأ القياسي.



(أ)



(ب)

الشكل (3-5): طور إستوائي متوقف C. metaphase في خلية نقي عظم

الفار *Mus masculus*

(أ): الجرعة 640 ملغم/كغم من المستخلص القلويدي الخام للأوراق المديد الطازجة.

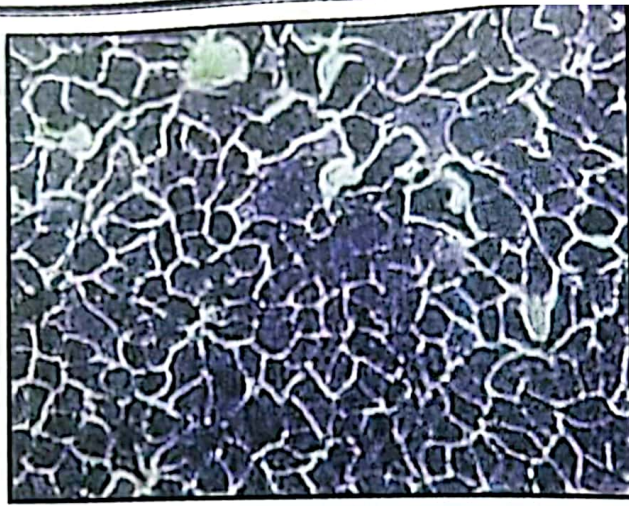
(ب): ست خلايا في الطور الإستوائي المتوقف عند الحقن بالجرعة 640 ملغم/كغم من المستخلص القلويدي الخام.

مرتفع خلال المرحلة الأولى من النمو ويأخذ بالنقصان خلال النمو الخضري، ثم يبدأ بالارتفاع مرة أخرى في أثناء طور التزهير أخذاً بالانخفاض التدريجي عقب تكوين الثمار والبذور، كما إن المحتوى القلويدي يختلف باختلاف العضو كما يختلف باختلاف أطوار النمو والتطور لنباتات أنواع السكران لأن المستوى الأعلى من القلويدات الكلية يوجد في الأزهار يليها الأوراق والجذور ثم السويق (الشحات، 1986).

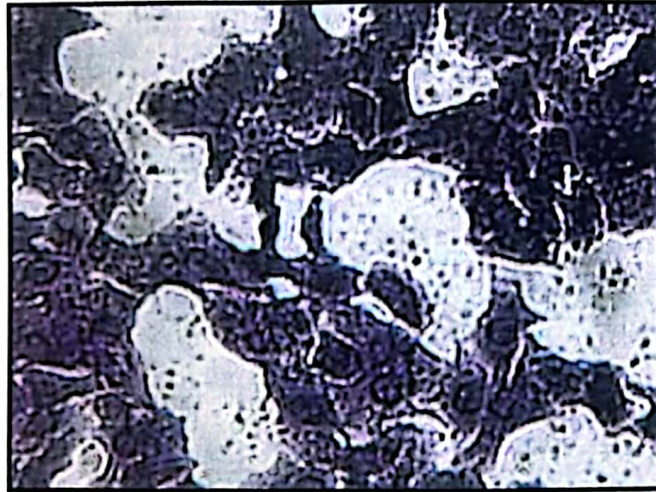
وفي الدراسة الحالية لتأثير المستخلص القلويدي الخام في الانقسام الخلوي في القمة النامية في جذور البصل، أتاحت نسبة الخلايا في الأطوار المختلفة الفرصة للاستنتاج الأولي عن طبيعة تأثير المستخلص أو المركبات الموجودة فيه وخاصة عندما تكون لهذه المركبات فعالية مضادة لأكثر من آلية واحدة في الانقسام الخلوي، إذ أدى المستخلص القلويدي الخام إلى خفض نسبة الطور التمهيدي بينما رفع من نسبة الطور الاستوائي وهذا يدل على إن المستخلص يؤثر في مرحلة تسبق الانقسام في الطور البيني (Interphase)، كما انه يؤثر في تكوين خيوط المغزل أو على آلياته فتوقف الخلايا في الطور الاستوائي. أبدت بعض المستخلصات النباتية فعالية في أكثر من مرحلة من الدورة الخلوية إذ وجد إن لمادة Cryptolepine hydrochloride وهي من القلويدات Indoloquinoline المعزولة من جذور نبات *Cryptolepis sanguinolenta* نشاطا في تثبيط إنزيم DNA Topoisomerase II وكذلك في إيقاف الخلايا B16 Melanema في مرحلة  $G_2/M$  (Bonjean *et al.*, 1998).

تؤدي مركبات podophyllotoxin المعزولة من نباتات العائلة podophyllaceae إلى توقف الانقسام الخلوي في مرحلة  $G_1$  و  $G_2$  وتثبيط إنزيم DNA Topoisomerase II ، ومنعها بلمرة التيوبولين، فضلا عن تثبيطها للسلسلة الناقلة للالكترونات في المايكوتونديريا (Salman and Sartorelli, 1992).

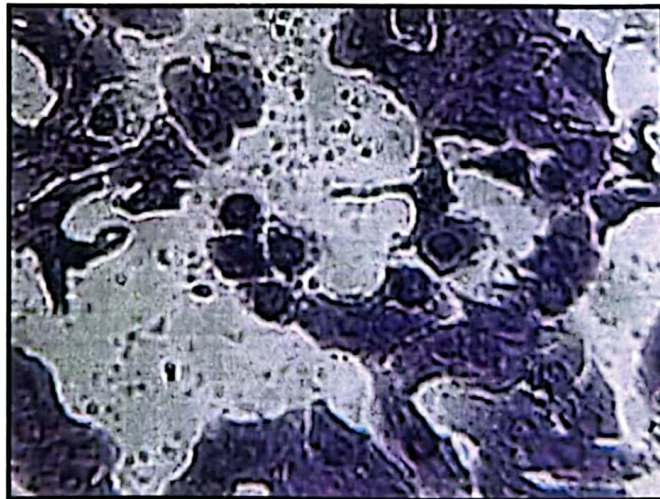
ذكرَ Huang (1999) إن القلويدات تمتلك عدة آليات في إحداث نشاطها السمي على الخلايا cytotoxicity وتتضمن عملية بلورة crystallization لبروتين النيببات الدقيقة والتداخل مع انقسام الخلية مما ينتج توقف الخلايا في الطور الاستوائي أو تثبيط تصنيع



(أ): الخط الخلوي السرطاني Hep-2 الذي يمثل السيطرة، وهو يوضح خلايا الخط الكثيفة ومكونة طبقة واحدة (100X).



(ب): الخط الخلوي السرطاني Hep-2 المعامل بالمستخلص المائي عند التركيز 8000 مكغم/مل يوضح الفراغات ما بين الخلايا مما يدل على موتها، (100 X)



الخط الخلوي السرطاني Hep-2 المعامل بالمستخلص القلويدي الخام عند التركيز 8000 مكغم/مل يوضح الفراغات بين الخلايا مما يدل على موتها وقلة اعدادها، (100 X).

(3-6): المقارنة بين خلايا Hep-2 عند تركيز 8000 مكغم/مل بعد 48 ساعة من التعريض

( Crystal violet ,100 X)

الجدول (3-5): نسب التثبيط في الخط الخلوي السرطاني Hep-2 بتأثير تراكيز مختلفة من المستخلص المائي الخام والمستخلص القلويدي الخام لأوراق نبات المديد ولمدة 48 ساعة.

المستخلص القلويدي الخام	المستخلص المائي الخام	التركيز
نسبة التثبيط ± الخطأ القياسي	نسبة التثبيط ± الخطأ القياسي	µg/ml
d 8.31± 1.15	e 8.31±1.15	السيطرة
cd 3.96± 8.99	ef 2.84± 9.68	15.625
c 5.81±14.64	de 4.18± 16.66	31.25
bc 4.89± 20.35	de 9.24±18.68	62.5
b 6.49±30.21	de 4.82± 20.23	125
a 0.95±70.06	cd 2.19±26.41	250
a 1.28±70.35	cd 3.91± 29.65	*500
a 1.50± 71.74	bc 1.21± 37.19	*1000
a 1.18± 72.66	b 7.21± 48.26	*2000
a 2.11± 76.58	a 1.67±78.71	4000
a 1.04± 79.75	a 0.40± 79.98	8000

- الحروف المختلفة في العمود الواحد تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى ( $P>0.05$ ) بحسب اختبار دنكن متعدد الحدود.
- وجود العلامة (\*) على التركيز تدل على اختلاف المستخلصين عن بعضهما معنويًا عند مستوى ( $P<0.05$ ) بحسب اختبار دنكن متعدد الحدود.
- الإشارة السالبة تشير إلى عدم وجود التثبيط

السيطرة. ولم يكن الفرق معنوياً بين التراكيز التي تراوحت بين 15.625 و 125 ، وبين التراكيزين 1000 و 2000 وبين 4000 و 8000 بينما ظهر فرق معنوي بين التراكيزين الأخيرين وبقيّة التراكيز.

### 3-1-6-2 المستخلص القلويدي الخام للأوراق الجافة

يبين الجدول (3-5) إن لهذا المستخلص تأثيراً مثبطاً في نمو الخط الخلوي السرطاني Hep-2. بدءاً بالتركيز 31.25 مكغم/مل وبفرق معنوي عن السيطرة إذ بلغت نسبة التثبيط 14.64%، وازدادت النسبة إلى 70.06% عند التركيز 250 مكغم/مل وتدرجياً إلى 79.75% عند التركيز 8000 مكغم/مل. وكان هناك فرق معنوي بين التراكيز المستخدمة والسيطرة ما عدا التركيز الأول 15.62 الذي لم يظهر فرقه المعنوي مع السيطرة ولم يكن الفرق معنوياً بين التراكيزين 62.5 و 125 ، وبين التراكيز التي تبدأ بـ 250 إلى أعلى تركيز مستخدم.

والشكل (3-6) يوضح الفرق بين خلايا Hep-2 في مجموعة السيطرة مقارنة مع الخلايا المعاملة بالمستخلص المائي الخام والمستخلص القلويدي الخام التي تميزت فيهما الخلايا بقلة العدد وفقدان الإلتصاق.

داخل وخارج الجسم اعتماداً على التركيز من خلال تثبيط بلمرة بروتين التيوبولين فضلاً عن تغيرات في شبكة النيببات مشابهة لتلك التي يحدثها الكولجسين.

3-6 التأثير السمي للمستخلص المائي الخام للأوراق الطازجة والمستخلص القلويدي الخام للأوراق الجافة لنبات المديد في نمو خلايا الخطوط السرطانية وخلايا الخط الطبيعي لجنين الجرذ.

لإختبار إمكانية استخدام قدرة المستخلص المائي الخام والقلويدي الخام في تثبيط تكاثر الأورام السرطانية، أُجري إختبار على خطين سرطانين وخط خلوي طبيعي، عُمِلت الخطوط الخلوية السرطانية والطبيعية المتوافرة بعشرة تراكيز محضرة لكل من المستخلص المائي الخام والقلويدي الخام لأوراق النبات لمدة 48 ساعة باستخدام تراكيز مختلفة، تراوحت بين (15.63-8000) مايكروغرام/مليتر. واعتمد إختبار السمية الخلوية cytotoxicity assay لتقويم تأثير تراكيز المستخلص في نمو الخلايا بدلالة النسبة المئوية لمعدل التثبيط %IR.

### 3-6-1 الخط الخلوي السرطاني Hep-2

عند معاملة الخط الخلوي السرطاني Hep-2 عند التمريرة (211) بتراكيز مختلفة من المستخلص المائي والقلويدي الخام لأوراق النبات، كانت النتائج الإحصائية تشير إلى وجود تأثير تثبيطي ملحوظ لتراكيز المستخلصين ابتداءً من التراكيز الواطئة ويستمر باتجاه التراكيز العالية ودلت النتائج على وجود تباين في التأثير التثبيطي للمستخلصين أيضاً.

### 3-6-1-1 المستخلص المائي الخام للأوراق الطازجة

يبين الجدول (3-5) إن لهذا المستخلص تأثيراً مثبطاً في نمو الخط الخلوي السرطاني Hep-2 بدأ بالتركيز 31.25 مكغم/مل وبفرق معنوي عن السيطرة إذ بلغت نسبة التثبيط 16.66% وازدادت إلى 78.71% و 79.98% عند استخدام التركيزين 4000 و 8000 مكغم/مل على التوالي، وكانت الفروق معنوية بين جميع التراكيز المستخدمة والسيطرة ما عدا أقل تركيز 15.625 الذي لم يظهر فرقاً معنوياً عن

## 3-6-2 الخط الخلوي السرطاني AMN-3

عند معاملة الخط الخلوي السرطاني AMN-3 عند التمريرة (112) بتركيز مختلفة من المستخلصين المائي الخام والقلويدي الخام لمدة 48 ساعة، أشارت النتائج إلى وجود نشاط في تكاثر الخلايا في التراكيز القليلة، وأيضا ظهور تثبيط يزداد بزيادة التركيز، كما لوحظ تباين في التأثير التثبيطي بين تراكيز المستخلص من جهة وبين المستخلصين من جهة أخرى.

## 3-6-2-1 المستخلص المائي الخام للأوراق الطازجة

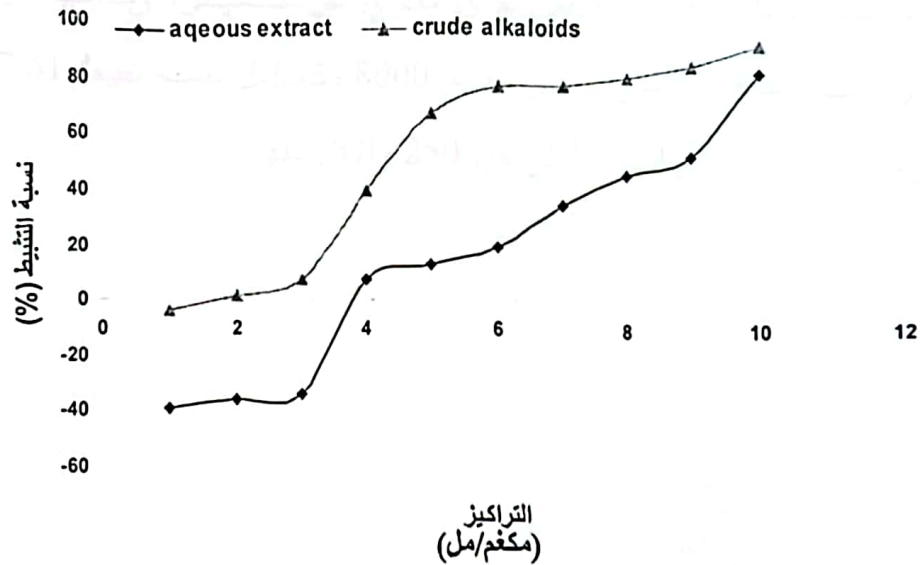
يبين الجدول (3-6) إن لهذا المستخلص تأثيرا مثبتا في نمو الخط الخلوي السرطاني AMN-3 بدءا بالتركيز 1000 مكغم/مل وبفرق معنوي كبير عن السيطرة بنسبة تثبيط 34.76% وتزداد نسبة التثبيط لتصل إلى 81.03% بفرق معنوي عند التركيز 8000 مكغم/مل. أما في التراكيز القليلة 15.62 و 31,25 و 62.5 فلوحظ تكاثر للخلايا واختلاف بفرق معنوي عن السيطرة بينما التراكيز الثلاثة وهي 125 و 250 و 500 لم يكن الفرق بينها وبين السيطرة معنويا.

## 3-6-2-2 المستخلص القلويدي الخام للأوراق الجافة

يبين الجدول (3-6) إن لهذا المستخلص تأثيرا مثبتا في نمو الخط الخلوي السرطاني AMN-3 بدءا بالتركيز 125 مكغم/مل، وبفرق معنوي عن السيطرة بنسبة تثبيط 39.45%. باتجاه التراكيز العالية، بلغت النسبة 66.78% عند التركيز 250 مكغم/مل وازدادت حتى بلغت 90.98% عند التركيز 8000 مكغم/مل. لم يكن الفرق معنويا بين التراكيز الأقل من 125 والسيطرة وكان الفرق معنويا بين السيطرة وبقية التراكيز. ولم يكن الفرق معنويا بين التراكيز الأعلى من 500.

### 3-2-6-3 مقارنة التأثير السمي على الخط الخلوي السرطاني AMN-3 بتأثير المستخلص المائي الخام والقلويدي الخام.

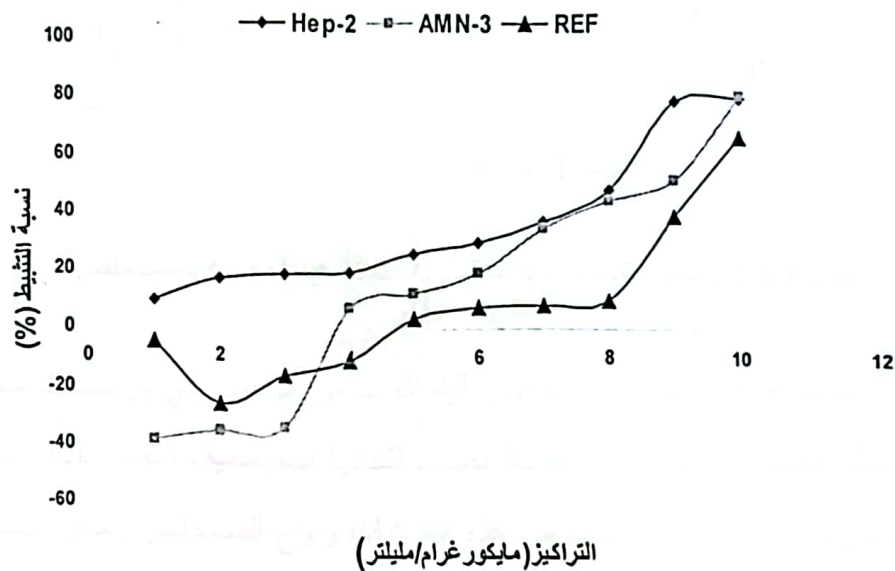
وجد من النتائج التي اعتمدت على نسب تثبيط الخلايا السرطانية AMN-3 إن المستخلص القلويدي الخام حقق نسب تثبيط أعلى مما حققها المستخلص المائي الخام كما في الشكل (3-9)، إذ بدأ تثبيط المستخلص القلويدي الخام عند التركيز 125 مكغم/مل وبفرق معنوي عن السيطرة بينما وجد أن التراكيز الأقل من 125 مكغم/مل من المستخلص المائي الخام تحث على تكاثر الخلايا بنسبة تفوق السيطرة وبفرق معنوي، بدأ التثبيط المعنوي لذلك المستخلص عند التركيز 1000 مكغم/مل. اختلف المستخلصان بفرق معنوي عند التراكيز 250 و 500 و 1000 و 2000 و 4000 ، إذ كانت نسب التثبيط للمستخلص القلويدي الخام 66.78% و 76.43% و 76.9% و 79.85% و 83.38% على التوالي وكانت نسب التثبيط للمستخلص المائي 12.25% و 19.34% و 34.76% و 45.06% و 51.72% ، بينما لم يكن الفرق معنوياً بين المستخلصين في أعلى تركيز مستخدم.



الشكل (3-9): نسبة التثبيط في خط AMN-3 المعاملة بالمستخلص المائي والمستخلص القلويدي الخام.

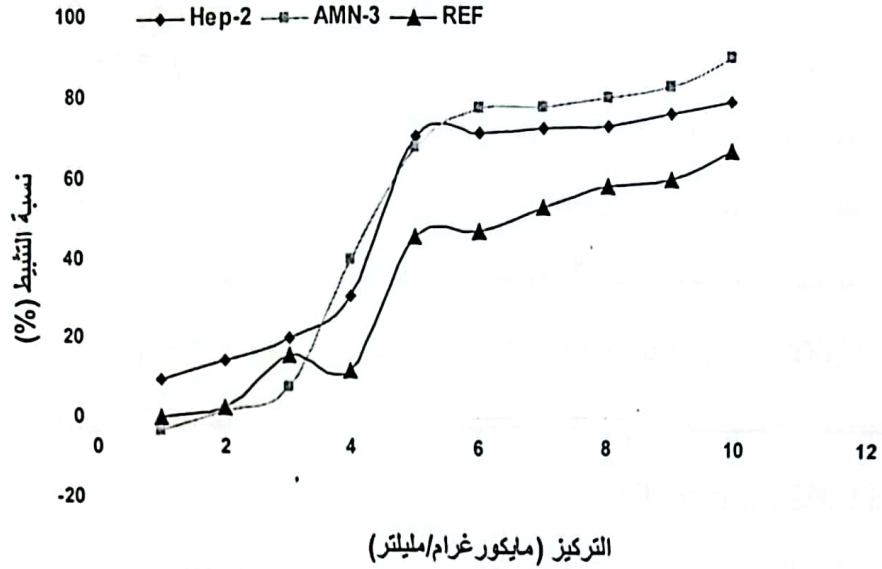
3-6-4 مقارنة بين الخطوط الخلوية السرطانية والخط الخلوي الطبيعي Ref بتأثير  
المستخلص المائي الخام والقلويدي الخام  
1- المستخلص المائي الخام

يبين الشكل (3-12) إن الخط الخلوي السرطاني Hep-2 كان أكثر حساسية لهذا  
المستخلص من النوعين الآخرين، أما الخط الخلوي السرطاني AMN-3 فكان أقل  
حساسية من النوعين الآخرين في التراكيز الواطئة جداً إذ لوحظ تكاثر ثم يبدأ التثبيط  
بزيادة التركيز إلى أن يصل إلى نسبة متقاربة في التثبيط من الخط الخلوي السرطاني  
Hep-2 أما الخط Ref فكان أكثر مقاومة للمستخلصين من النوعين الآخرين.



الشكل (3-12): نسب التثبيط للخطوط الخلوية الثلاثة بتأثير المستخلص المائي لخام

يبين الشكل (3-13) إن الخط الخلوي السرطاني Hep-2 أكثر حساسية من النوعين الآخرين في التراكيز القليلة وعند الصعود بالتراكيز وجدَّ إن الخط AMN-3 يصبح أكثر حساسية ثم يتبعه Hep-2 ثم يليه Ref الذي يكون أقل حساسية من النوعين السابقين.



الشكل (3-13): نسب التثبيط للخطوط الخلوية الثلاثة عند المعاملة بالمستخلص القلويدي الخام.

عززت نتائج هذه الدراسة ما توصل إليه العديد من الباحثين في دراسات محلية حول امتلاك المستخلصات النباتية فعالية مضادة للخلايا السرطانية، وتعتمد هذه الفعالية بشكل أساس على التركيز المستخدم من هذه المركبات ونوع المستخلص ومدى حساسية الخلايا السرطانية.

تعمل العديد من المركبات الفعالة باتجاهين متعاكسين اعتماداً على التركيز المستخدم ونوع الخلايا، فكما يلحظ من خلال النتائج المذكورة أن التراكيز المرتفعة قد تثبط نمو خلايا AMN-3، في حين حقزت التراكيز الواطئة على نمو تلك الخلايا فأزدادت الحيوية وقد يعزى ذلك إلى ظاهرة (hormetic effect) التي هي ظاهرة بايولوجية شائعة في علم السموم والتي تتميز بوجود تعاكس لعمل الجرعات الواطئة بالمقارنة مع

حصل الموسوي (2007) على أعلى نسبة تثبيط لخلايا Hep-2 كانت 86.7% عند معاملتها بالتركيز 1000 مكغم/مل من المستخلص المائي لبذور نبات الكتان لمدة 48 ساعة وفي خلايا AMN-3 كانت 89.8% وفي خط خلايا RD كانت 86.2% ، بينما حققت الموسوي (2006) أعلى نسبة تثبيط مقدارها 65% عند معاملة خط خلايا Hep-2 بالمستخلص المائي الخام لأوراق نبات الصفصاف *Salix acmophylla* عند التركيز 1000 مكغم/مل لمدة 48 ساعة، وبنسبة تثبيط مقدارها 67% لخلايا AMN-3 ، ولم يلاحظ أي تأثير مثبت معنوي على خط الخلايا الطبيعي Ref ووجد ذلك التباين أيضا في دراسة الحلبي (2004) في تأثير مستخلصات نبات السعد على الخطوط الخلوية السرطانية Hep-2 و RD و AMN-3 و الخط الخلوي الطبيعي Ref.

تفرد الخلايا السرطانية بصفات تفتقر لها مثيلاتها الطبيعية، إذ تتميز بالانتهازية والقبالية على الغزو والانتشار وفرط الحاجة، فضلا عن حدوث تغيرات في بروتيناتها ومستضداتها السطحية، كذلك تتميز الخلايا السرطانية ببنفاذية أغشيتها وهذه الصفة تسهل عملية دخول المركبات إلى داخلها بشكل عشوائي غير منتظم مما يؤثر سلبا في تلك الخلايا ويسهل من استجابتها للمواد المضادة التي تتعرض لها ( Belijanski,2000; Gratton et al.,2003).

كما تختلف حساسية الخطوط الخلوية السرطانية لبعض المواد فقد تم إيقاف انقسام الخلايا عند الطور G<sub>2</sub>/M لخط PC—3M لخلايا البروستات البشري عند استخدام المستخلص المائي الحار لاوراق نبات الدفلة بتركيز واطئة مما أدى إلى موت الخلايا السرطانية، بينما لم يؤثر هذا المستخلص في خط K1735-121 لسرطان المثانة الفاري كما أظهر المستخلص نفسه سمية عالية ضد خط C4-2 لخلايا البروستات البشري الذي تمثل بإحداث تشوهات عديدة في الكروموسوم polyploidy ونقص في مستوى عامل النمو fibroblast growth factor-2 (Pathake et al.,2000).

الخلوية عند طور G<sub>1</sub>, كما وجد Uedo وآخرون (1999) إنها تعمل على تثبيط سرطان المعدة وذلك بخفض تصنيع الدنا وحث الخلايا نحو الموت المبرمج للخط الخلوي السرطاني HL-60 Leukemia cell ، أما التانينات فإنها تؤثر في الخلايا السرطانية للخط الخلوي السرطاني HL-60 من خلال تجزئة شريط الدنا وحث الخلايا نحو الموت المبرمج (Sakagami,1995).

وجد Meng وآخرون (2002) إن مركب proteoglycan المعزول من الأجزاء الهوائية لنبات المديد ثبت نمو الأورام السرطانية في الفئران ضرب Lewis Lung Carcinoma Fibrosarcoma (S-180 Kun Ming) بنسبة 54% - 77% من وزن الورم وبالجرع 250-1000 مكغم يوميا لمدة أسبوعين سواء بالتجريع فمويا أو الحقن تحت الجلد أو داخل الغشاء البريتوني أو الوريدي.

إن الميزة المهمة في أدوية العلاج الكيميائي هي تهدافها الخلايا السرطانية دون الخلايا الطبيعية، لذا ففي دراستنا الحالية، وجدنا إن مستخلصات نبات المديد تؤثر في دورة انقسام الخلية وبأكثر من آلية، كما إنها تؤثر في الخلايا السرطانية من نوع Hep-2 و AMN-3 وتؤثر بنسبة أقل في نمو الخلايا الطبيعية عند التراكيز العالية مما يجعل هذا النبات واعداد في علاج السرطان، فضلا عن توافره وسهولة الحصول عليه.

# الإستنتاجات والتوصيات

## الأستنتاجات

- 1- يعد المستخلص القلويدي الخام للأوراق الجافة لنبات المديد مثبطاً للانقسام الخلوي، بدلالة خفضه لنسبة دليل الانقسام إلى 50% من السيطرة في خلايا القمة النامية للبصل *Allium cepa*.
- 2- المستخلص القلويدي الخام للأوراق الجافة لنبات المديد له فعالية في تثبيط الانقسام الخلوي بأكثر من آلية ويؤثر في مرحلة تسبق الانقسام بدلالة انخفاض نسبة الخلايا المنقسمة وفي مرحلة الانقسام بدلالة توقف الخلايا في الطور الاستوائي.
- 3- كانت الجرعة المميّة النصفية للمستخلص المائي الخام للأوراق الطازجة 100 ملغم/كغم/يوم عند حقن الفئران داخل الغشاء البريتوني.
- 4- في المستخلص المائي الخام للأوراق الطازجة حققت الجرعات الأعلى من الجرعة المميّة النصفية  $LD_{50}$  (160 ملغم/كغم) فعالية 71.62% من فعالية الكولجسين في إيقاف الإنقسام الخلوي في الطور الإستوائي في خلايا نقي عظم الفأر، أما الجرعات الأقل من الجرعة  $LD_{50}$  (80 ملغم/كغم) فقد حققت نسبة 67.19% من السيطرة في إيقاف إنقسام تلك الخلايا.
- 5- حقق المستخلص القلويدي الخام عند الجرعة 80 ملغم/كغم فعالية في إيقاف إنقسام خلايا نقي عظم الفأر نسبة 72.96% من السيطرة بينما المستخلص المائي الخام حقق هذه النسبة عند مضاعفة الجرعة إلى 160 ملغم/كغم لذلك عدّ المستخلص القلويدي الخام أكفاً من المستخلص المائي الخام في إيقاف الانقسام عند الجرعات المنخفضة.
- 6- يمتلك كل من المستخلصين المائي الخام والقلويدي الخام لأوراق النبات تأثيراً سميّاً قاتلاً في خطوط الخلايا السرطانية Hep-2 و AMN-3 ، وفي الخط الخلوي الطبيعي Ref لمدة تعرض 48 ساعة.

7- حقق المستخلص القلويدي الخام في التراكيز المنخفضة نسب تثبيط أعلى مما حققها المستخلص المائي الخام في كلا الخطين السرطانيين Hep-2 و AMN-3 ، بينما لم تحقق هذه التراكيز تأثيراً معنوياً في تثبيط الخط الخلوي الطبيعي Ref.

## التوصيات

- 1- تحديد الجرعة المميّنة النصفية للمستخلص القلويدي الخام ومقارنتها مع الجرعة المميّنة النصفية للمستخلص المائي الخام لأوراق النبات.
- 2- تنقية القلويدات وتشخيصها من المستخلص القلويدي الخام بعد توافر المادة القياسية لكل قلويد ودراسة تأثير القلويدات المنقاة على الانقسام الخلوي للخلايا النباتية والخلايا الحيوانية والخلايا السرطانية المستزرعة cancer cell line.
- 3- دراسة تأثير المستخلصين (المائي الخام والقلويدي الخام) على خطوط خلوية سرطانية أخرى وخطوط خلوية طبيعية عند مدة تعريض مختلفة لمعرفة تأثير الوقت في سمية المستخلصين.
- 4- دراسة تأثير المستخلصين (المائي الخام والقلويدي الخام) في خلايا سرطانية في داخل الجسم الحي.
- 5- فصل المكونات الأخرى لنبات المديد واختبار تأثيرها في الانقسام الخلوي.

المصادر

## المصادر العربية

- الجبوري، لقاء حسون صغبان [2006]. دراسة تأثير المستخلصات الخام لنبات عين البزون *Vinca rosea* في نمو بعض الخلايا السرطانية والطبيعية لبعض اللبائن خارج الجسم، رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة كربلاء.
- الحلبي، زيد عبد المنعم علي [2004]. تأثير المستخلصات الخام لعشب السعد *Cyperus rotundus L.* في تثبيط نمو الخطوط الخلوية السرطانية، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بغداد.
- الشحات، نصر أبو زيد [1986]. النباتات الطبية والأعشاب الطبية، دار البحار، بيروت.
- الشماع، علي عبد الحسين [1989]. العقاقير وكيمياء النباتات الطبية، دار البحار، بيروت.
- الشمري، أحمد مجيد حمزة [2003]. دراسة تأثير فايروس النيوكاسل في علاج الأورام السرطانية المغروسة في الفئران. رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري، جامعة بغداد.
- الشيباني، رغد ضياء عبد الجليل [2006]. دراسة تأثير مستخلصات أوراق نبات الدفلة *Nerium oleander* الخام والنقية في الخلايا الطبيعية وخطوط الخلايا السرطانية النامية في الزجاج وفي الفئران البيض، أطروحة دكتوراه، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية.
- العبودي، شيماء ضمد حسن [2005]. دراسة تأثير مستخلص نبات زنباق المطر البضاء *Zephyranthes candida* وبعض مكوناته على الإنقسام الخلوي، رسالة ماجستير، كلية العلوم للنبات، جامعة بغداد.
- العبيدي، شيماء صباح مهدي [2004]. تأثير بعض المستخلصات النباتية الخام على الانقسام الخلوي، رسالة ماجستير، كلية العلوم للنبات، جامعة بغداد.

- القيسي، بيداء عامر احمد [2006]. تأثير مستخلصات المديد *Convolvulus arvensis* L. في تثبيط الانقسام الخلوي، رسالة ماجستير، كلية العلوم للنبات، جامعة بغداد.
- الموسوي، أزهار موسى جعفر [2006]. دراسة تأثير المستخلصات الخام لنبات الصفصاف *Salix acmophylla* في نمو الخطوط الخلوية السرطانية والخلايا اللمفاوية الطبيعية للإنسان، رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة كربلاء.
- الموسوي، أشرف نزار سعد [2007]. دراسة وراثية خلوية لتأثير المستخلصات الخام لبذور الكتان في بعض الخطوط الخلوية السرطانية، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بغداد.
- شامي، سامي أغا [1982]. دراسة بعض الصفات الدوائية والسمية لإزهار القيصوم. رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري، جامعة بغداد.
- قطب، فوزي طه [1979]. النباتات الطبية زراعتها ومكوناتها، الدار العربية للكتاب، ليبيا.
- هيكل، محمد السيد و عمر، عبد الله عبد الرزاق [1993]. النباتات الطبية والعطرية، الطبعة الثانية، منشأة المعارف بالإسكندرية.
- يعقوب، سمارة نزار [2007]. دراسة التأثيرات الوراثية لبعض النباتات الطبية العراقية في نماذج حيوانية ونباتية، رسالة ماجستير، كلية العلوم للنبات، جامعة بغداد.

*References*

- Adhami, V.M.; Ahmed, N. and Mukhtar, H. [2003]. Molecular target for green tea in prostate cancer prevention, *J. Nutr.*, **133**: 2417-2424.
- Agbagwa, I.O.; Onofeghara, F.A. and Mensah, S.I.[2003]. Stimulation of growth and development of *celosia argentea* L. by crude extracts of *senna alata*(L.) Roxb, *J. Appl. Sci. Envirom. Mgt.*, **7** (1): 9-13.
- Aleshinskaya, E.E. [1971]. Pharmacological evaluation of a series of alkaloids from *Catharanthus roseus* (Periwinkle), *Tr. Vses. Nauch. Inst. Lek. Rast.* **14**: 7-11.
- Alexandrova, R.; Varadinova, T.; Velcheva, M.; Genova, P. and Sainova, I.[2000]. Cytotoxic effect of isoquinoline alkaloids on tumor cell lines, *Experimental pathology and parasitology*, **4**: 8-14.
- Allen, J.W.; Schuler, C.F.; Mendes, R.W. and Latt, S.A. [1977]. A simplified technique for in vivo analysis of sister chromatid exchange using 5- bromodeoxy uridine tablets, *Cytogenetics*, **18**: 231-237.
- Al-Maisry, M. [1999]. Effect of oil and alcoholic extract of *Azadirachta indica* on some pathogenic fungi of plant, M.SC. Thesis, Science College, Al-Mustansria University.
- Al-Rawi, A. [1988]. Poisonous plants of Iraq, 3<sup>rd</sup> ed., Ministry of Agriculture and Irrigation, Iraq.
- Al-Rawi, A. and Chakravarty, H.I. [1988]. Medicinal plants of Iraq, 2<sup>ed</sup> Ed. Ministry of Agriculture and Irrigation, Iraq.
- Atherder, L.M. [1969]. Bentter and drivers textbook of pharmaceutical chemistry, Oxford. Univ., Press, London.

- Atta, A.H. and Mounceir, S.M. [2004]. Anti-diarrhoeal activity of some Egyptians medicinal plant extracts, *J. Ethnopharmacol.*, 92: 303-309.
- Backer, G.; Beckers, T. Emig, P.; Klenner, T. and Kutscher, B. [2001]. New small- molecule tubulin inhibitors, *Pure. Appl. Chem.* 73: 1459-1464.
- Badr, A. Ghareeb,A. and El-din, H.M. [1992]. Cytotoxicity of some pesticides in mitosis cells of *Vicia faba* roots, *Egypt. J. Appl. Sci.* 7: 457-468.
- Becker, W.M.; Kleinsmith, L.J. and Hardin, J. [2003]. The world of the cell. 5<sup>th</sup> ed., Benjamin Cummings Publishing company, Inc., New York.
- Belijanski, M. [2000]. The anticancer agent PB-100 selectivity active malignant cell lines, even multidrug resistant, *Genet. Mol. Biol.*, 23: 224-235.
- Biljana , M., Stanimiroric , Z. and Djelic , N. [2004]. Evaluation of the genotoxic effects of tiamulin S- in vivo, *Acta veterinaria* , 54 (2-3) :239 -246.
- Biswas, S.J.; Khuda-Bukhsh, A. R. [2002]. Effect of a homeopathic drug. *Chelidonium*, inamelioration of P-DAB induced hepatocarcinogenesis in mice, *BMC Complementary and alternative medicine*; 2(4):
- Bonham, M.; Arnold, H.; Montgomery, B. and Nelson, P.S. [2002]. Molecular effects of the herbal compound PC-SPES: Identification of activity pathways in prostate carcinoma, *Canc. Res.*, 62; 3920-3924.
- Bonjean, K.; Depanw Gillet, M.C.; DeFresne, M.P.; Colson, P.; Houssier, C.; Dassonneville, L.; Bailly, C.; Greimers, R.; Wright, C.; Quetinledercq, J.; Tits, M. and Angelot, L. [1998]. The DNA

- intercalating alkaloid cryptolepine interferes with topoisomerase II and inhibit primarily DNA synthesis in B16 melanoma cells, *Biochem.*, 37: 5136-5146.
- Bose, C.K. [2007]. Possible role of *Moringa oleifera* Lam. Root in epithelial ovarian cancer, *J. Med GenMed.*, 9(1): 26-36.
  - Bowers, W.S.; Sener, B.; Evans, P.H.; Bingol, F. and Erdogan, I. [1995]. Activity of Turkish medicinal plants against mosquitoes *ades aegypti* and *Anopheles gambiae*, *Insect Sci. Appl.*, 16: 339-342.
  - Caceres-Cortes, J.R.; Cantu-Graza, F.A.; Mendoza-Mata, M.T.; Charez-Gonzales, M.A.; Ramos-Mandujano, G. and Zambrano-Ramires, I.R. [2001]. Cytotoxic activity of *Justica spicigera* is inhibited by Bcl2 Proto-oncogene and induces apoptosis in a cell cycle dependent fashion, *Phytother. Res.*, 15: 691-697.
  - Cai, J.; Lin, M.; Wang, Z. and Ju, Y. [2002]. Apoptosis induced by dioscin in Hela cells, *Bio. Phar. Bulletin*, 25: 193-196.
  - Calabrese, E.J. and Baldwin, L. A. [1998]. Hormesis as a biological hypothesis, *Enviro. Health prespective supplements*, 106: 11-15.
  - Calabrese, E.J. and Baldwin, L.A. [2002]. Defining hormesis, *Hum. Exp. Toxicol.*, 21: 91-97.
  - Calabrese, E.J. and Baldwin, L.A. [2003]. Chemotherapeutics and hormesis, *Crit. Rev. Toxicol.*, 33: 305-353.
  - Calvino, N. [2002]. Anti-Angiogenesis properties of a common weed, *Convolvulus arvensis*, *J. Chiroprac. Med.*, 1: 115.
  - Camparoto, M.L.; Teixeira, R.D.O.; Mantovani, M.S. and Vicentini, V.E.P.[2002]. Effects of *maytenus ilicifolia* mart. And *bauhinia candicans* benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells, 25(1): 85-89.

- Cannell, R.J.P. [1998]. Natural product isolation, Humana Press, New Jersey, U.K.
- Chakravarty, H.L. [1976]. Plant wealth of Iraq (A dictionary of economic plants), 1, Botany Directorate, Ministry of Agriculture and Agrarian reform, Baghdad, Iraq.
- Chang, J.-Y.; Chang, C.-Y.; Kuo, C.-C.; Chen, L.T.; Wein, Y.-S. and Kuo, Y.-H. [2004]. Salvinal, a novel microtubule inhibitor isolated from *salvia miltiorrhizae bunge* (Danshen), with antimetabolic activity in multidrug-sensitive and-resistant human tumor cells, *Mol. Pharmacol.*, 65: 77-84.
- Chen, R.D.; Wu, M.; Wang, H.E.; Hwang, J.J.; Hong, C.Y.; Huang, Y.T.; Yen, S.H. and Ou, X.H. [2001]. Sensitization of tumor but not normal tissue, to the cytotoxic effect of ionizing radiation using *Panax noto ginseng* extract, *Am. J. Chin. Med.*, 16: 234-242.
- Cogo, E. and Kevinlai, N.D. [2003]. Should ginseng be considered for cancer prevention?. *Compl. and Alter. Med.* 80: 153-155.
- Cooper, G.M. [2000]. The cell a Molecular Approach, 2<sup>nd</sup> ed., NIH Bookshelf,
- Cooper, G.M. and Hausman, R.E. [2004]. The cell, ASMpress, Sinauer Associates, Inc., Washington, U.S.A.
- Correia, J. J. and Lobert, S. [2001]. Physicochemical aspects of tubulin-interacting antimetabolic drugs, *Curr. Pharma. Design*, 7: 1213-1228.
- Dahllof, B.; Billström, A.; Cabral, F. and Hartley-Asp, B. [1993] Estramustine depolymerizes microtubules by binding to tubulin *Canc. Res.*, 53: 4573-4581.
- Dhonukshe, P. and Gadella, W.J. [2003]. Alteration of microtubule dynamic instability during prophase band formation revealed

yellow fluorescent protein- CLIP 170 Microtubule plus – end labeling, *The plant cell*, 15 : 597 -611.

- Dhonukshe, P.; Vischer, N. and Gadella Jr., T.W.J. [2006]. Contribution of microtubule growth polarity and flux to spindle assembly and functioning in plant cells, *J.cell sci.*, 119: 3193-3205.
- Dockstader, S. [2005]. Copimng with field bindweed without using herbicides, *J. Pest. Reform*, 25: 6-7.
- Drykova, D.; Cenklova, V.; Solimenko, V.; Volc, J.; Draber, P. and Binarova, P. [2003]. Plant  $\gamma$ - Tubulin interacts with  $\alpha\beta$  – Tubulin dimers and forms membrane – associated complexes, *The Plant Cell*, 15: 465- 480.
- Duflos, A.; Krucznski, A. and Barret, J.M. [2002]. Noval aspects of natural and modified vinca alkaloid, *Curr. Med. Chem. Anticanc. Agents*, 2: 55-70.
- Duke, J. [1993]. Lupinus perennis: hypotensive wildflower under hypertensine wires, *Coltsfoot*, 14(6): 4-5.
- Duncan, R.C.; Kanpp, R.G.; & Miller, M.C. [1983]. Introductory baiostatstics for the health sciences,. Awileg medical publication. John Wiley & sons. pp. 161-179.
- Duran, N.; Allahverdiyev, A.M. and Cetiner, S.[2001]. Flow cytometric analysis of the effects of methotrexate and vepesid on the HEP-2 cell cycle, *Turk J. Med. Sci.*, 31: 187-192.
- Elangovan, V.; Ramamrthy, N.; Balasubramabian, S.; Sekar, N. and Govidsany [1994]. Studies on the antiproliferative effect of some naturally occurring bioflavonoidal compounds against human carcinoma of larynx and Sarcoma-180 cell lines, *India J. Pharm.*, 26: 266-269.
- Elias, R.; De-meo, M.; Vidal-Ollivier, E.; Laget, M.; Balansard, G. and Dumenil, G. [1990]. Antimutagenic activity of some

- saponine isolated from *Calendula officinalis* L., *C. arvensis* L. and *Hedera helix* L., *Mutag.*, 5: 327-31.
- Evans, W.C. [1999]. Trease and Evan's pharmacognosy, 14<sup>th</sup> ed., W.B. Saunders Company Ltd. U.K.
  - Fang, S.H.; Rao, Y.K. and Tzeng, Y.M. [2004]. Cytotoxic effect of trans-cinnamaldehyde from cinnamomum osmophloeum leaves on human cancer cell lines, *Int. J. Appl. Sci. and Engin.*, 2: 136-147.
  - Forkmann, G. and Martens, S. [2001]. Metabolic engineering and application of flavonoids, *Curr. Opinion Biotech.*, 12: 155-160.
  - Francis, G.; Kerem, Z.; Makkar, H.P.S. and Backer, K. [2002]. The biological action of sponins in animal systems: a review, *British Journal of nutrition*, 88: 587-605.
  - Frederich, M.; Bentires-Alj, M.; Tits, M.; Angenot, L.; Greimers, R.; Gielen, J.; Bours, V. and Merville, M.-P. [2003]. Isostrychnopentamine, an indolomonoterpenic alkaloid from *strychnos usambarensis*, induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells, *Journal of pharmacology and experimental therapeutics fast forward*, 304 (3): 1103-1110.
  - Freshney, R.I. [2000]. Culture of animal cell: A manual for basic technique 4<sup>th</sup> ed., Wiley, A John Wiley and Sons, Inc., publication, New York.
  - Gardea-Torresdey, J.L.; Peralta-Videa, J.R.; Montes, M.; DelaRosa, G. and Corral-Diaz, B. [2004]. Bioaccumulation of cadmium chromium and copper by *Convolvulus arvensis* L : impact on plant growth and uptake of nutritional elements, *J. Biores. Technol.*, 92: 229-235.
  - Gilman, G.A.; Goodman, L.S.; Rall, T.W. and Murad, F. [1980]. The pharmacological basis of therapeutics. 6<sup>th</sup> ed. Macmillan Publishing Co. New York, pp: 25-27.

- Goldmann, A.; Message, B.; Tepfer, D.; Molyneux, R.J. and Elbein, A.D. [1996]. Biological activities of the nortropane alkaloid, Calystegine B<sub>2</sub>, and analogs: structure- Function relationships, *J. Nat. Prod.*, **59**: 1137-1142.
- Goldstein, A. L.; Aronow, L. and Kalkan, S.M. [1974]. Principles of drug action, 2<sup>nd</sup> ed., Wiley Biomedical Health Publication, pp: 376-381.
- 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 permeability by cavtratin blocks tumor progression in mice, *Canc. Cell*, **4**: 1-39.
- Hamel, E. [1992]. Natural products which interact with tubulin in the *vinca* domain: maytansine, rhizoxin, phomopsin A, dolastatins 10 and 15 halichondrin B, *Pharmacol. Ther.*, **55**: 31-51.
- Hanausek, M.; Ganesh, P.; Walaszek, Z.; Arntzen, C.J.; Slaga, T.J. and Gutterman, J.U. [2001]. Avicins, a family of triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Bentham), suppress H-ras mutations and aneuploidy in a murine skin carcinogenesis model, *Pro. Nat. Acad. Sci. USA*, **98**: 11557-11562.
- Harborn, J. B. [1984]. Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis 2<sup>ed</sup> ed. Chapman and Hall, New York.
- Harborn, V.B. [1973]. Phytochemical methods. A guide to modern technique of plant analysis. London.
- Hastie, S.B. [1991]. Interactions of Colchicine with tubulin, *pharmacol; Ther.*, **512**: 377-401.

- Himes, R.H. [1991]. *Pharmacol. Ther.*, 51: 257-267 cyted in Zhou, J. and Giannakakou, P. [2005]. Targeting microtubules for cancer chemotherapy, *Curr. Med. Chem. –Anticanc. Agents*, 5: 65-71.
- Ho, C.K. and Chen, C.C. [2003]. Moscatilin from the orchid *Dendrobium ioddigesii* is a potential anticancer agents, *Cancer Invests.*, 21: 729-736.
- Hotha, S.; Yarrow, J.C.; Yang, J.G.; Garrett, S.; Renduchintala, K.V.; Mayer, T.U. and Kapoor, T.M.[2003]. HR 22C16 : a potent small- molecule probe for the dynamics of cell division, *Angrew Chem. Int. Ed.*, 42: 2379- 2382.
- Huang, D.M.; Jih, H.G.; Yao, T.H.; Shih, C.C.; Hui, P., Che, M.T. [2002]. Cardiac glycosides induce resistance to tubulin-dependant drag in androgen-independent human prostate cancer, *J.Biomed. Sci.*, 9: 443-452.
- Huang, K. C. [1999]. The pharmacology of chinese herbs, 2<sup>nd</sup> ed., CRC Press LLC.p.25
- Hung, D.T.; Chen, J. and Schreiber, S.L. [1996]. Discodermolide binds to microtubules in stoichiometric ratio to tubulin dimers, blocks taxol binding and results in mitotic arrest, *Chena. Biol.*, 3: 287-293.
- Jaffer, H. J.; Mohmod, M.J.; Jawad, A.M.; Naj, A. and Alnaib, A. [1983]. Phytochemical and biological screening of some Iraqi plant, *Fitoterapia Lix* 299.
- Jimenez- Barbero, J.; Amal-Guerri, F. and Snyder, J.P. [2002]. The Solid state. Solution and tubulin-bound conformations of agents that promote microtubule stabilization, *Curr-Med. Chem. Anti-Canc. Agents*, 2: 91-122.
- Jordan, M. A.; Toso, R.J.; Thrower, D. and Wilson, L. [1993]. Mechanism of mitotic Block and inhibition of cell proliferation by

- taxol at low concentrations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90: 9552-9556.
- Jordan, M.A. [2002]. Mechanism of action of anti tumor drugs that interact with microtubules and tubulin, *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents*, 2: 1-17.
  - Jordan, M.A. and Wilson, L. [2004]. Microtubules as target for anticancer drugs, *Nature Reviews*, 4: 253-266.
  - Jordan, M.A.; Margolis, R.L.; Himes, R.H.; Wilson, L. [1986]. *J. Mol-Biol.*, 187, 61-73 cited in Zhou, J. and Giannakakou, P. [2005]. Targeting microtubules for cancer chemotherapy; *Curr. Med. Chem.-Anti Cancer agents*, 5: 65-71.
  - Kabarity, A. and Malallah, G. [1980]. Mito depressive effect of Khat extract in the meristematic region of *Allium cepa* root tips, *Cytologia*, 45-733-738.
  - Karajala, G.; Chan, Q.; Manzo, E; Anderson, R.J. and Roberge, M. [2005]. Ceratamines, structurally simple microtubule-stabilizing antimetabolic agents with unusual cellular effects, *Canc. Res.*, 65:30-40-3043.
  - Kartal, M.; Kurucu, S.; Choudary, M.I. [2001]. Antifungal activities of different extracts and echimidine-N-oxide from *Symphytum sylvaticum* Boiss. Subsp. Sepulcrale (Boiss and Bal.) greuter and burdet var sepulcrale; *Turk J. Med. Sci.*, 31: 487-492.
  - Kayralidiz, A.; Basri, H. and Cakmak, T. [2001]. The cytogenetic effects of sodium metabisulfite, a food preservation in root tip cells of *Allium cepa*, *Turk. J. Bio.*, 25: 361-370.
  - Klein, R. [1996]. Toxicology and herbs: An Introduction, *Australian Journal of Medical Herbalism*, Vol. 8.

- Kleinzeller, A.; Springer, G.F. and Withmann, H.G. [1968]. Molecular biology biochemistry and biophysics, 3<sup>th</sup> ed., Springer-Verlag, New York, Inc.
- Kondoh, M.; Usui, T.; Nishikiori, T.; Mayumi, T.; Osada, H. [1999]. Apoptosis induction via microtubule disassembly by an anti tumor compound pironetin, *Biochem.*, 340: 411-416.
- Kostova, I.[2005]. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents, *Curr. Med. Chem.-Anti.-Cancer Agents*, 5: 29-46.
- Li, M.; Ciu, J.R.; Ye, Y.; Zhang, L.H.; Wang, K.; Gyes, G.; Crose, J.; Wright, M. and Tack, J.I. [2002]. Anti tumor activity of ajoene, a natural compound purified from garlic: antimitotic and microtubule interaction properties, *Carcinogenesis*, 23: 573-579.
- Liang, L. Y.; Jiang, W.; Yu, F. ; Cao, R.; Ma , Q.; Dia, X.; Jiang, J.; Wang, Y.; Si, S. [2007]. DH 334, a beta- carboline Anti-cancer drug, inhibits the CDK Activity of budding yeast, *Cancer Biol. Ther.* 4(8): 6-10.
- Lin, J.-P.; Yang, J.-S.; Lee J.-H.; Hsieh W.-T. and Chung, J.-G.[2006]. Berberine induces cell cycle arrest and apoptosis in human gastric carcinoma SNU-5 cell line, *World J. Of Gastroenterology*, 12 (1): 21-28.
- Lobert, S.; Ingram, J.W. and Correia, J.J. [1999]. Additivity of dilantin and vinblastine inhibitory effects on microtubule assembly, *Canc. Res.*,59(1): 4816-4822.
- Lopez- Lazaro, M.; Galvor, M.; Martin-Lorder, C. and Ayuso, M.J. [2001]. Cytotoxicity of flavonoids on cancer cell lines: Structure-activity-relationships, *Curr. Med. Chem.*, 1: 691-714.
- Lopus, M.; panda, D. [2006].the enzophenanthridine alkaloid sanguinarine perturbs microtubule assembly dynamic through

- tubulin binding .A possible mechanism for its antiproliferative activity. *J. FEBS*. 273 (10): 2139-50.
- Losada, A. ; Hirano , T. [2001]. Shaping the metaphase chromosome: coordination of cohesion and condensation ,*BioEssays*, 23: 924-935.
  - Losso, J.N. [2002]. Preventing degenerative diseases by Anti-Angiogenic functional foods, *Food Technol.*, 56: 78-89.
  - Madari, H.; Panda, D.; Wilson, L. and Jacobs, R.S.[2003]. Dicoumarol : a unique microtubule stabilizing natural product that is synergistic with taxol, *Biochemistry and Biophysics*,. 63: 1214-1220.
  - Majewska, A.;Wolska, E; Sliwinska, E.; Furmanowa, M.; Urbanska, N.; Pietrosiok, A.; Zobel, A. and Kuras, M.[2003]. TITOLO: Antimitotic effect, G2/M accumulation, chromosomal and *Allium cepa* L. root tips treated with the extract from *Rhodiola rosea* roots, *Caryology*, 56 (3): 337-351.
  - Mather, J.P. and Roberts, P. [1998]. Introduction to cell and tissue culture theory and technique, Plenum Press, New York and London, pp: 175-194.
  - Meng, X.L.; Riordan, N.H.; Casciari, J.J.; Zhu, Y.; Zhong, J.; Gonzalez, M.J.; Miranda-Massari, J.R. and Riordan, H.D. [2002]. Effect of a high molecular Mass *Convolvulus arvensis* extract on tumor growth and angiogenesis, *PRHS. J.*; 21: 323-328.
  - Mercykutty, V.C. and Stephan, J. [1980]. Adrimycin induce genetic toxicity as demonstrated by the *Allium cepa* test, *Cytologia*., 45: 769-777.
  - Mi, Q.; Cui, B.; Silva, G.L.; Lantvit, D.; Lim, E.; Chai, H.; You ,M.; Hollingshead , M.G.; Mayo, J.G.; Kinghorn, A.G. and Pezzuto, J.M. [2001]. Pervilleine A, a novel tropane alkaloid that

- Salmon, S.E. and Sartorelli, A.C. [1992]. Cancer chemotherapy in: Basic and clinical pharmacology. 2<sup>nd</sup> ed. B. G. Katzung, Prentice Hall, London etc.
- Sartippour, M.R.; Liu, C.; Shao, Z.M.; Go, V.L.; Heber, D. and Nguyen, M. [2001]. *Livistona* extract inhibits angiogenesis and cancer growth, *Oncol. Rep.* 8: 1355-1357.
- Schultheiss, P.C.; Knight, A.P.; Traub-Daragatz, J.L.; Todd, F.G. and Stermitz, F.R. [1995]. Toxicity of field bindweed (*Convolvulus arvensis*) to mice, *Vet. Hum. Toxicol.*, 37: 452-4.
- Sener, B.; Bingo, F.; Erdoganl, I.; Bowers, W.S. and Evans, P.H. [1998]. Biological activities of some Turkish medicinal plants, *Pure and Appl. Chem.*, 70: 403-406.
- Sharma, A.K. and Sharma, A. [1980]. Chromosome techniques theory and practice; 3<sup>rd</sup> ed., Butter Worth's Company, London, Boston.
- Sharma, [1983]. Plant meristems as monitors of genetic toxicity of environmental chemicals, *Curr. Sci.*, 52: 1000-1002.
- Sharp, D.J.; Rogers, G.C.; and Scholey, J.M. [2000]. Microtubule motors in mitosis, *J.Nature*, 407: 41-47.
- Shehab, A.S. [1980]. Cytological effect of Medicinal plants in Qatar II. Mitotic effect of water extract of *teucrium pilosum* on *Allium cepa*, *Cytologia*, 45: 57-64.
- Shoieb, A.M.; Elgayyar, M.; Dudrick, P.; Bell, E.; Titnof, P.K. [2003]. Inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thimoquinol, *Int. Oncology*, 22: 107-113.
- Singh, M.R. [1982]. Effect of All with maleic hydrazid and Colchicine on root tip mitosis, *Cytologia.*, 47: 419-426.
- Skeel, R.T. [1999]. Handbook of chemotherapy, 5<sup>th</sup> ed., Lippincott, Williams and Wilkins, Baltimore.

- Wagner, S.; Shad, R.A. and Share, M.A. [1983]. Correlation of soil macro-nutrients with weed flora of wheat under medium rainfall condition; of fourth all Pakistan Weed Science Conference. March 26-27, 1994. Faisalabad (Pakistan)-Uaf. 1995 232 p.p. 51-62.
- Welman, W.G. [2000]. *Convolvulus arvensis*. In seed plants of Southern Africa, *Strelitzia*, 10: 231-234.
- Westra, P.; Chapman, P.; Stahlman, P.W.; Miller, S.D. and Fay, P.K. [1992]. Field bind weed (*Convolvulus arvensis*) control with varies herbicide combination, *Weed Technol.*, 6: 949-955.
- Wilken, D. and Hannah, L. [1998]. *Convolvulus arvensis* L. (Convolvulaceae) orchard morning- glory, *Weed Sci.* 45: 658-663.
- Yeong, F. M.; [2004]. Anaphase-promoting complex in caenorhabditis elegans, *Molecular and Cellular Biology*, 24 (6): 2215-2225.
- Yoshimatsu, K.; Yamaguchi, A.; Yoshino, H.; Koyanagi, N. and Kitoh, K [1997]. Mechanism of action of E7010, an orally active sulfonamide antitumor agent: inhibition of mitosis by binding to the colchicine site of tubulin, *Cancer Res.*, 57(15):3208-13.
- You, M.; Wickramaratne, D.B.M.; Silva, G.L.; Chai, H.; Chagwedera, T.E.; Fransworth, N.R.; Cordell, G.A.; Kinghorn, A.D.; Pezzuto, J.M. [1995]. Roemerine, an aporphine alkaloid from *Annona senegalensis* that reverse the multidrug-resistance phenotype with cultured cells, *J. Nat. Prod. (Lloydia)*, 58: 598-604.
- Zheng, T.; Holford, T.R.; Mayne, S. T.; Ward, B.; Carter, D.; Owens, P.H. [1999]. DDE and DDT in breast adipose tissue and risk of female breast cancer, *Am J. Epidemiol.*, 150: 453-8.
- Zhou, J. and Giannakakou, P. [2005]. Targeting microtubules for cancer chemotherapy, *Curr. Med. Chem.-Anti.-Cancer Agents*, 5: 65-71.

Republic of Iraq  
Ministry of higher education and scientific Research  
University of Baghdad  
College of science for women



# **Effect of crude alkaloid extracted from leaves of field bindweed plant (*Convolvulus arvensis* L.) on cell division**

A thesis

Submitted to the College of Science for woman University of Baghdad

In partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in  
Biology

By

**Namarik Hadi Mansour AL-Saadi**

B.Sc.Biology – College of Science for woman, University of Baghdad

Supervision

**Dr. Nada abed Al-majeed Al-Ansari**

**August 2008**

**Shaaban 1429**

## ABSTRACT

This study aimed to investigate the effects of the crude alkaloids extracted from *Convolvulus arvensis* on mitosis in tap roots of *Allium cepa* and in *Mus musculus* bone marrow and on the proliferation of two cancer cell lines (Hep-2, ANM-3) and a normal cell line (Ref.).

Chemical components of *C. arvensis* leaves extract were investigated, and it was found that this plant contains most of the chemical compounds such as Alkaloids, Saponins, Glycosides, Flavonoids, Resins, Steroids and Terpenes. Alkaloidal compound were extracted from this plant by one of the conventional method to obtain 30mg of crude alkaloidal extract from 50 mg of dry leaves. The percentage of extraction is 0.06% which is higher than that was recorded in previous studies for the same plant.

Tap roots of *Allium cepa* were treated with the concentrations: 1, 2, 4, 8, 12, and 24 mg/ml of the alkaloidal extract for four hours. Mitotic index decreased in all the concentrations it was 50% of the control at the highest concentration used. All the treatments lead to cell pause in metaphase with different rates and up to 91.81% at the highest concentration. Chromosomal aberrations such as bridges, lagging chromosome and sticky metaphase were observed.

The half lethal dose (LD<sub>50</sub>) of the crude aqueous extract of fresh leaves was determined on lab mice and it was 100mg/kg/day.

The alkaloidal extract was compared with the aqueous extract of the fresh leaves at the doses: 10,20,40,80,160,320, and 640 mg/kg for their antimetabolic activity in *Mus musculus* bone marrow and each of them was compared with the Colchicine. In the low doses, the crude alkaloidal extract achieved C.metaphase higher than the aqueous extract, while in the highest dose (640mg/kg); each of them cause C.metaphase in percentage was more than 90% of the Colchicine.

The cytotoxicity of the aqueous extract and crude alkaloidal extract was investigated on the cancer cells line, Hep-2 and ANM-3 and normal cell line

Ref. Toxic effect for both extracts was indicated by rate of proliferation inhibition . The alkaloidal extract showed the inhibition of Hep-2 cell line at percentage 20.35%-72.66% more than the aqueous extract (18.68%-48.26%) at concentrations: 62.5-2000  $\mu\text{g/ml}$ . The rate inhibition of alkaloidal extract for AMN-3 cell line (39.45% - 90.98%) was higher than that of the aqueous extract (7.46%-81.03%) at the concentrations: 125 and 8000 $\mu\text{g/ml}$ . Both extracts (alkaloidal extract and aqueous extract) showed almost the same effect at the concentration 8000 $\mu\text{g/ml}$ .

At low concentrations of both extracts no inhibition effect was observed on normal cells line Ref. The significant inhibition was recorded at the concentration 4000 $\mu\text{g/ml}$  of the aqueous extract and at 250 $\mu\text{g/ml}$  of the alkaloidal extract.

The conclusion was made that the *C. arvensis* is a promising plant in treatment of cancer through its antimitotic activity in both plant and animal cells and its inhibition of the proliferation of cancer cells.