التأثير السمي للمستخلصات الكحولية القلويدية لنبات الحسك *Terbulues terrestris* في الانقسام المايتوزي لخلايا نقي العظم واختزال الورم في الفئران المختبرية

اسراء طارق عاكول[1] ابراهيم هادي محمد[2،5] اسماء عمار حسن[3] زينة طه عبدالحافظ[4]

[1،2،3] مدرس مساعد وأستاذ مساعد ومساعد بايولوجي على التوالي، قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة ديالى، العراق.
[4]مساعد بايولوجي، قسم علوم الحياة، كلية التربية ابن الهيثم، جامعة بغداد، العراق.

[5] المسؤول عن النشر: dribrahahimhadi@sciences.uodiyala.edu.iq

المستخلص

هدفت الدراسة الحالية الى اختبار تأثير المستخلصين الكحولي والقلويدي الخام لثمار الحسك *Terbulues terrestris* في انقسام خلايا نقي العظم للفأر الابيض المغروس بسرطان خلايا الكبد (HepG2). قورنت فعالية المستخلص الكحولي للثمار مع فعالية المستخلص القلويدي الخام للثمار في تثبيط معامل الانقسام الخلوي في نقي العظم عند الجرع 10 و20 و40 و80 و160ملغم كغم$^{-1}$ (وزن الحيوان) وقورن كل منهما مع الكولجسين. حقق المستخلص القلويدي الخام نسب توقف في الطور الاستوائي اعلى مما حققها المستخلص الكحولي في الجرع المنخفضة وفي الجرعة العالية 160 ملغم كغم$^{-1}$، وقد حقق كل منهما نسبة تزيد عن 70% من فعالية الكولجسين، وتضمنت الدراسة أيضا التأثيرات السمية للمستخلص الخام التي شملت الجرعة المميتة الوسطية LD_{50} في الفئران وقد كانت 102 ملغم كغم$^{-1}$ و98 ملغم كغم$^{-1}$ للمستخلصين الكحولي والقلويدي الخام على الترتيب. أعطت نتائج التأثير العلاجي للمستخلصين الخام في الفئران باستعمال ثلاث جرع علاجية هي (0.2 و0.5 و1) ملغم كغم$^{-1}$ للمستخلص الكحولي والجرع (0.2 و0.4 و0.8) ملغم كغم$^{-1}$ للمستخلص القلويدي وذلك عن طريق الحقن داخل الخلب لمدة 30 يوماً بواقع جرعة واحدة كل 48 ساعة، اختزال حجم الورم بشكل يعتمد على الجرعة المستخدمة منها، وكانت الجرعة العلاجية للمستخلص الكحولي 1 ملغم كغم$^{-1}$ هي الأفضل تأثيراً من خلال تثبيطها لحجم الورم اذ بلغت 57.20 ملم^3، بينما كانت الجرعة العلاجية للمستخلص القلويدي 0.8 ملغم كغم $^{-1}$ اذ بلغت 35.12 ملم^3 قياسا بمعامل السيطرة التي كانت 3508.16 ملم^3 و3855.80 ملم^3 على التوالي.

الكلمات المفتاحية: نبات الحسك، النبيبات الدقيقة، الخلايا السرطانية.

المقدمة

زاد الاهتمام بالمكونات الفعالة (مركبات الايض الثانوي) بوصفها علاجاً للسرطان إذ تمتلك تلك المركبات خصائص علاجية تختلف في تأثيراتها في الخلية السرطانية، وقد تكون لهذه المركبات فعالية تثبيطية تؤدي الى قتل الخلية الورمية اوايقاف نموها لما تحتويه، وأشار Toshio وآخرون 2008 إلى أن الأعشاب الطبية نالت اهتماماً كبيراً منذ القدم وذلك لقدرتها الكبيرة على تسكين الألم والشفاء، ولا نزال نعتمد عليها حتى يومنا هذا في صناعة عدد كبير من الادوية، لأن طب الأعشاب يكمل العلاجات التقليدية في الغالب فيوفر أدوية مأمونة على الرغم من ان بعض النباتات قد تنتج أثارا جانبية على وشكلها العديد من الأدوية، لذا فمن الضروري أن لا تؤخذ ويستخدم بعض منها الا بأشراف ممارس، وتتوقف قدرة الدواء العشبي على التأثير في أنظمة الجسم على المكونات الكيميائية التي يحتوي عليها، لذا بدأ الباحثون باستخلاص هذه المواد وعزلها من النباتات في القرن الثامن عشر ومنذ ذلك الوقت ازداد التركيزعلى الاعشاب وتأثيراتها بدلالة المكونات الفعالة التي تحتويها (Schmidt وBastians، 2007). ومن هذه المركبات التي اثبتت فعاليتها المثبطة لتكاثر الخلايا السرطانية القلويدات وهي من أهم وأكثر المركبات

استلام البحث: 2017/5/16
قبول النشر: 2018/2/5

الفعالة الموجودة في المستخلصات النباتية، وتمتاز بسميتها العالية للخلايا نتيجة تأثيرها في الخلية وبعدة آليات ومنها الانقسام الخلوي أو في مرحلة تسبق الانقسام أو تحفيزالخلايا السرطانية للدخول في مرحلة الموت المبرمج Apoptosis وأشار لذلك Mukherjee وآخرون،2001. ومن أهم هذه القلويدات: vincristine vinca alkaloid وvinblastine وcolchicine وmaytansine وtaxanes، paclitaxel وخصوصا docetaxel التي تستخدم بشكل كبير بوصفها مركبات مضادة للانقسام من خلال عملها على ديناميكية نبيبات المغزل (خيوط المغزل) التي لها دور مهم في انفصال الكروموسومات في أثناء الانقسام الخيطي (Jordan 2002)، ونظراً للدور الذي تقوم به النبيبات الدقيقة في انقسام الخلية الامر الذي جعلها الهدف المناسب لتطور ادوية العلاج الكيميائي (Chemotherapeutic drugs) ضد النمو السريع والانقسام غير الطبيعي للخلايا السرطانية، لذا عني الامر بالتوجه للبحث عن انواع أخرى من المركبات منها القلويدات لاستخلاصها ومعرفة تأثيرها في الانقسام، ونظراَ لاحتواء نبات الحسك على مركبات قلويدية لذا تم اختيار موضوع الدراسة. يُطلق على نبات الحسك عدة أسماء في اللغة العربية منها: حماض الاسد والكرمة وحمص الأمير، ويصنف الحسك ضمن العائلة البقولية وأغلب نباتات هذه العائلة سامة (Chakravarty، 1976). والحسك من النباتات الحولية العشبية تزرع على جانبي الحدائق، قد يصل الساق الى 30 سم وله زهور ابطية صفراء وثماره ذات أشواك، ويستخدم غالباَ في تزيين الحدائق والمتنزهات والطرق الخارجية، ويستوطن بلاد الشام والمغرب العربي وكل مناطق اوروبا (Boisio وآخرون، 1993)، لكونه حساساً لدرجات الحرارة المنخفضة، وينتشر النبات في شمال العراق ويزهر في فصل الربيع.

اتجهت أنظار الباحثين في السنوات الأخيرة الى أهمية استخدام بعض الأعشاب الطبية في محاولة لعلاج مرض السرطان منها مادة Sangumarine اذ وجد انها تثبط عدة أنواع من الخطوط الخلوية السرطانية البشرية المقاومة للعقاقير المتعددة من خلال منع بلمرة النبيبات الدقيقة وتثبيطها لتكاثر الخلايا وحثها على الموت المبرمج (Freshney ،2001). يوجد في الطبيعة ما لايقل عن 25000 نوع نباتي، شُخص منها أكثر من ألف نبات بإمتلاكه خواصاً فعّالة مضادة للسرطان، ومنها استخدام مادة Taxol المستخلصة من نبات الطقوس *Taxus brevifolia*، أذ أُستخدمت بشكلٍ فعّالٍ في معالجة أنواع مختلفة من السرطانات منها سرطان الثدي والمبيض، وكذلك استخدام مادة الكولجسين (Colchicine) المستخلصة من نبات *Colchicum autumnale* وهي من المواد الشائعة الاستخدام في إيقاف الانقسام الخلوي، إذ ترتبطُ هذه المواد مع جزيئة التيوبيولين(tubulin) وتمنع بلمرتها وتكوين النبيبات الدقيقة ومن ثم منع تكوين خيوط المغزل وايقاف الانقسام الخلوي في الطور الاستوائي (Todd وآخرون، 1995).

استخدم قلويد Tryptanthrin المستخلص من نبات الحسك اذ وجد انه يثبط عدة أنواع من الخطوط الخلوية السرطانية البشرية المقاومة للعقاقير المتعددة من خلال منع بلمرة النبيبات الدقيقة وتثبيطه لتكاثر الخلايا وحثها على الموت المبرمج حسب ما ذكره Fu وآخرون 2005 . ومن الدراسات العراقية الحديثة التي اهتمت بهذا الجانب ونجحت في استخدام المستخلصات النباتية في تثبيط نمو خطوط السرطانية خارج الجسم الحي وداخله نبات المديد *Convolvulues arvensis* (الربيعي، 2009)، ومازالت البحوث جارية ومنها الدراسة الحالية لاختبار فعالية المستخلصات النباتية سعياً ومحاولة لإيجاد مواد فعالة ضد مرض السرطان لذا اختير هذا النبات في هذه الدراسة.

المواد وطرائق العمل

1- تحضير المستخلصات النباتية: اتبعت طريقة في تحضير المستخلص الكحولي الخام بحسب ما اوردها (Harborne، 1984)، ولغرض إعداد هذا المستخلص تم نقع 25 غم من مسحوق الثمار المجففة في

250 مل من الكحول بنسبة 1:10 وزن/حجم في دورق زجاجي مغلق، وتركت لمدة 24 ساعة بعدها رشح النموذج ثم نقل بعد ذلك الى جهاز الطرد المركزي وبسرعة 3000 دورة/الدقيقة لمدة 10 دقائق، جمع الرائق ووزع في اطباق جافة، وتركت في حاضنة للحصول على مستخلص جاف، بعد ذلك تمت اذابة المستخلص الناتج في حجم معلوم من الكحول وعد هذا محلول الخزين، وحفظ بدرجة 4°م. جرى تحضير المستخلصات القلويدية الخام للنبات باستخدام جهاز السكسوليت Soxhlet وبحسب الطريقة المتبعة التي اوردها Cannell (1998). للحصول على مستخلص قلويدي خام إذ أخذت كمية 20 غم من الثمار ووضعت في Thimble، ثم وضع في جهاز السوكسليت وأضيف إليه الهكسان لإزالة الدهون والكلوروفيل وأجري الاستخلاص لمدة 12 ساعة في درجة حرارة 40-60 °م وهي درجة حرارة تبخر المذيب المستخدم، بعدها نقل المسحوق إلى كحول الميثانول 70% في جهاز reflex ولمدة ثلاث ساعات، ثم رشح المستخلص وبعدها تم تركيز المستخلص الكحولي بالحاضنة ولمدة يوم ثم تمت معاملة المستخلص بحامض الهيدروكلوريك 1% في جهاز reflex ولمدة نصف ساعة، ثم جزئت هذه الطبقة إلى طبقتين باضافة الكلوروفورم لها في قمع الفصل مع الرج، فالطبقة العليا هي الطبقة المائية والطبقة السفلى هي طبقة الكلوروفورم الحاوية على القلويدات، بعد ذلك تم التخلص من الكلوروفورم بتركه في الحاضنة المروحية ليتبخر وعُزلت مجموعة القلويدات بوصفها ناتجاً نهائياً.

2- استخدمت في التجارب خلايا HepG2 Cell line من المركز العراقي لبحوث السرطان من التمريرة 225.

3- احتساب الجرعة القاتلة لنصف العدد LD_{50} اعتمدت طريقة الصعود والنزول التي ذكرها Dixon، 1980، ولتحديد الجرعة المميتة الوسطية للمستخلصين الكحولي والقلويدي الخام للثمار وبجرع معينة وذلك بحقن فأرة واحدة بجرعة معينة ملغم كغم$^{-1}$ بحجم 0.1 مل داخل الخلب (interperitonial) (IP)، وتمت مراقبتها لمدة 24 ساعة، فان هلكت (x) يتم تقليل الجرعة المعطاة وأن بقيت حية (0) تؤخذ فأرة أخرى وتحقن بجرعة أعلى، وهكذا تكرر العملية صعوداً ونزولاً بالجرعة حتى يتم تثبيت آخر جرعة معطاة مع مراعاة زيادة الجرع ونقصانها ذات مقدار ثابت، وحسبت قيمة LD_{50} من المعادلة الاتية:

$$LD_{50} = xF + kd$$

إذ إنّ:

xF : آخر جرعة استخدمت.

d : مقدار الزيادة والنقصان الثابت في الجرعة المعطاة.

k : قيمة جدولية تحسب من الجدول الملحق 1 إذ إن:

o : رمز لبقاء الحيوان حياً بعد 24 ساعة من الحقن.

x : رمز لهلاك الحيوان بعد 24 ساعة من الحقن.

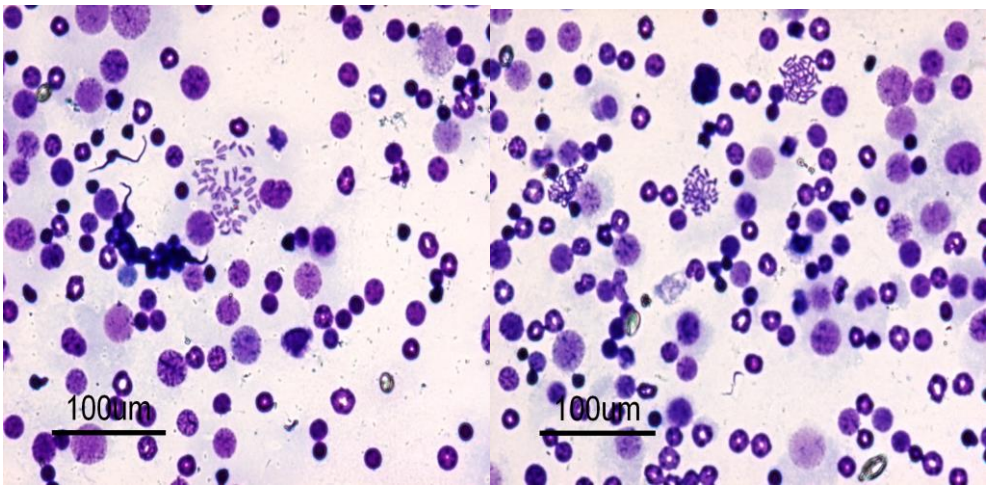
4- حقنت الحيوانات بـ 0.25 مل من الماء المقطر الحاوي على 0.25 و0.5 و1 و1.5 ملغم من المستخلص الكحولي الخام للثمار المحضر سابقا والذي يمثل 10 و25 و50 و75 ملغم كغم$^{-1}$ من وزن الجسم. تم الحقن عن طريق غشاء الخلب Intraperitoneal injection، أما حيوانات السيطرة فحقنت بـ 0.25 ملغم من مادة الكولجسين وذلك للمقارنة بين تأثير المستخلص ومادة الكولجسين، وبواقع ثلاثة مكررات لكل جرعة من المستخلص الكحولي الخام. وللسيطرة بعد مرور ساعتين تم التضحية بالحيوانات المحقونة بطريقة فصل النخاع الشوكي من العنق وشرحت مباشرة للحصول على كروموسومات الخلايا الجسمية (خلايا نقي العظم) وكما يأتي: ثُبت الحيوان على جهته الظهرية وقص الجلد فوق منطقة الفخذ

وأزيلت العضلات حول العظم ثم قطع ارتباطه بمفصلي الحوض والركبة ونزعت الاقراص المرتبطة بالمفصلين ثم نظف العظم خارج جسم الحيوان من بقايا العضلات ومسك بشكل عمودي على فوهة انبوبة اختبار وبوساطة محقنة نبيذة معقمة حجم 5 مل تحتوي على محلول دارئ الفوسفات الفسلجي (PBS) وتم غسل العظم وأنزل كل النقي حتى اصبح العظم أبيض لخلوه من محتواه الخلوي، ثم نبذت الخلايا مركزياً بسرعة 2000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق، وبعد أن أهمل الراشح علق الراسب بمحلول واطئ التوتر من كلوريد البوتاسيوم، ثم حضن المزيج لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 37 °م واتبعت لهذا الغرض طريقة Ge وآخرون (2003). قيس دليل الانقسام الخيطي (MI) لخلايا نقي العظم في الفئران الحاملة للورم وغير الحاملة له. تنتهي التجربة بموت آخر فأرة من مجموعة السيطرة، أعطيت الجرعات بحسب الباحثين Jone و Janardhanan (2002). في أثناء مدة التجربة تم قياس حجم الورم مرتين في الاسبوع، واستخرج الحجم بالاعتماد على الطريقة التي اشار اليها Meng وآخرون (2002)، إذ تم اختبار نشاط المستخلصين في ايقاف انقسام خلايا نقي العظم في الفئران بعد موت الحيوان واستخراج نقي العظم.

النتائج والمناقشة

اعطت طريقة تحضير المستخلص الكحولي وزنا قدره 5 غم من 70 غم من الاوراق الطرية اي نسبة استخلاص 7.13% وكان قوام المستخلص الناتج كثيفا مع لزوجة قليلة ولون بني داكن مائل الى السواد وتم الحصول على المستخلص القلويدي الخام بوزن قدره 4 غم من مسحوق النبات اي بنسبة استخلاص 10% وكان المستخلص الناتج ذا قوام كثيف مائل الى اللزوجة ذي لون بني مصفر. يحتوي نبات الحسك على المركبات القلويدية وهذا ما أكده Okamura وآخرون (1998). بينت النتائج ان المستخلص الكحولي لثمار نبات الحسك ادى الى ايقاف انقسام الخلايا وبنسب مختلفة كما في الجدول 1 وازدادت النسبة مع ازدياد التركيز وكان الفرق معنويا بين نسب الخلايا المتوقفة في جميع الجرع والسيطرة ولم يكن الفرق معنويا بين الجرعتين 20 و40 و40 و80 وبين 80 و160 ملغم كغم$^{-1}$ عند المعاملة بالجرع 10 ملغم كغم$^{-1}$ إذ بلغت نسبة الخلايا المتوقفة 38.6% من السيطرة، وازدادت الى 71.5% عند الجرعة 160ملغم كغم$^{-1}$، ولاختبار فعالية المستخلص القلويدي في انقسام الخلايا ومقارنة تأثيره بالكولجسين ابتداء بالجرعة التي تعطي 10 ملغم كغم$^{-1}$، اذ حقن 21 فأراً عن طريق غشاء الخلب من المستخلص وبواقع ثلاثة مكررات لكل جرعة بينما حقنت بـ10ملغم كغم$^{-1}$ من الكولجسين وعدت سيطرة قتلت الفئران بعد ساعتين من الحقن. بينت النتائج ان المستخلص القلويدي أدى الى ايقاف انقسام خلايا نقي العظم كما في الجدول 1 وازدادت النسبة مع ازدياد التركيز. وكان الفرق معنويا بين نسب الخلايا المتوقفة في جميع الجرع والسيطرة ما عدا الجرعة الاخيرة التي لم يكن الفرق معنويا بينها وبين السيطرة ولم يكن الفرق معنويا بين الجرعتين 10 و20 وبين 20 و40 وبين 40 و80 و160ملغم كغم$^{-1}$ وكانت نسبة التوقف 54.2% من السيطرة عند الجرعة 20 ملغم كغم$^{-1}$، وازدادت الى 77.8% عند الجرعة 160 ملغم كغم$^{-1}$. حقق المستخلص القلويدي نسبة توقف الخلايا في الطور الاستوائي تصل 72.9% من السيطرة عند الجرعة 80 ملغم كغم$^{-1}$ بينما حقق المستخلص الكحولي الخام هذه النسبة عند مضاعفة الجرعة الى 160 ملغم كغم$^{-1}$ ويعزى هذا الاختلاف الى احتمال تاثير المضاد لبعض المواد الحاوية عليها المستخلص لفعالية القلويدات، أو ان وزن المستخلص الخام يمثل وزن القلويد ووزن مواد اخرى فمثلا *Anitireha putminosa* تفقد 50% من القلويدات بعد شهرين من الخزن (Okamura وآخرون، 1998)، وبين Pathake وآخرون (2000) ان المستخلص الخام والقلويدي لنبات الحسك *Terbulues terrestris* يمتلك نشاطا مضادا للسرطان في داخل الجسم وخارجه، اما القلويد المعزول

من نبات الحسك فيعمل على ازالة البلمرة وبالتالي ايقاف الانقسام الخلوي الخيطي في مرحلة الانتقال بين الطور الاستوائي والانفصالي الذي يصاحبه عدم انتظام اصطفاف الكروموسومات في خط الاستواء المغزل كما موضحة بالشكل 1.



B **A**

الشكل 1. A توضح خلايا متوقفة في الطور الاستوائي لنقي العظم للفئران المختبرية معامل بالمستخلص الكحولي الخام لثمار الحسك التركيز بالجرعة 80 ملغم كغم$^{-1}$. B خلايا متوقفة في الطور الاستوائي لنقي العظم للفئران المختبرية معامل بالمستخلص القلويدي الخام لثمارالحسك التركيز بالجرعة 80 ملغم كغم$^{-1}$. حددت الجرعة المميتة النصفية LD_{50} للمستخلصين الخام لثمار نبات الحسك

الجدول 1. نسبة خلايا نقي عظم الفئران في الطور الإستوائي عند حقنها بالمستخلص الكحولي الخام والمستخلص القلويدي الخام لثمار نبات الحسك والنسبة المئوية من السيطرة (المعاملة بالكولجسين)

الجرع ملغم كغم$^{-1}$	المستخلص الكحولي الخام لثمار النبات	النسبة المئوية من السيطرة	المستخلص القلويدي لثمار النبات	النسبة المئوية من السيطرة
	نسبة الخلايا في الطور الإستوائي		نسبة الخلايا في الطور الإستوائي	
السيطرة*	0.16±3.78 a	48.74	0.27±4.61 A	46.42
*10	0.11±1.46 e	38.62	0.11±1.97 F	42.27
*20	0.20±1.71 de	45.23	0.13±2.58 Ef	54.29
*40	0.50±2.21 cd	58.46	0.049±3.15 Ef	67.59
*80	0.13±2.54 cd	67.19	0.01±3.44 Cd	72.96
160	0.14±2.71 be	71.69	0.44±3.63 Bcd	77.89

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

ويلاحظ من الجدول 2 ان الجرعة المميتة النصفية للمستخلص الكحولي للوراق بلغت 102 ملغم كغم$^{-1}$ من وزن الحيوان وهي اعلى من الجرعة المميتة النصفية للمستخلص القلويدي التي بلغت 98 ملغم كغم$^{-1}$ من وزن الحيوان.

الجدول 2. تحديد الجرعة المميتة النصفية LD_{50} للمستخلص الكحولي والقلويدي الخام لثمار نبات الحسك في الفئران المختبرية بطريقة الصعود والنزول

نوع المستخلص	مقدار الزيادة او النقصان في الجرعة (d)	موت الحيوان او بقاؤه حيا بعد 24 ساعة	قيمة K الجدولية	الجرعة المميتة النصفية LD_{50}
المستخلص الكحولي	25 ملغم كغم$^{-1}$	Xoxo	0.741	102 ملغم كغم$^{-1}$
المستخلص القلويدي	25 ملغم كغم$^{-1}$	Xoxx	0.181	98 ملغم كغم$^{-1}$

علامة (O) تعني بقاء الحيوان على قيد الحياة خلال 24 ساعة من المعاملة بالمستخلص.
علامة (X) تعني موت الحيوان خلال 24 ساعة بعد المعاملة بالمستخلص.

أظهر حقن الفئران المصابة بالورم بالمستخلص الكحولي الخام بالجرعة 0.25 ملغم كغم$^{-1}$ فروقا معنوية في حجم الورم عند مستوى احتمالية ($P\leq0.05$) بالمقارنة مع السيطرة، فقد بينت النتائج ان معدلات حجم الورم للمجموعة المعاملة استمرت بالزيادة الحجمية البطيئة بمرور الوقت ولكنها كانت أقل من الزيادة الحجمية لمجموعة السيطرة التي استمر نمو الورم فيها من دون توقف حتى موت الحيوان الصورة 5، ففي الأيام 24 و27 و30 بعد الغرس كانت معدلات الحجم 607.83 و730.47 و713.47 ملم^3 على التوالي بالمقارنة مع السيطرة (1234.19 و2530.84 و3508.16) ملم^3 على التوالي (الجدول 3).

الجدول 3. تأثير جرع مختلفة من المستخلص الكحولي الخام لثمار الحسك على حجم الورم ملم^3 في الفئران االحاملة لسرطان الكبد

الجرعة / اليوم	السيطرة	0.25 ملغم كغم$^{-1}$	0.5 ملغم كغم$^{-1}$	1ملغم كغم$^{-1}$
	المعدل ± الخطأ القياسي	المعدل ± الخطأ القياسي	المعدل ± الخطأ القياسي	المعدل ± الخطأ القياسي
0	^{gA}1.15±222.36	^{dA}1.18± 222.32	^{bA}1.07±220.28	^{aA}0.49 ±221.28
9	^{gA}2.87±235.29	^{dA}5.77 ± 220.23	^{bA}5.96 ± 220.26	^{aA}5.76± 220.34
12	^{fA}2.84± 475.21	^{dB}3.44 ±223.16	^{bC}5.77 ± 220.14	^{bC}0.64 ± 210.40
15	^{efA}5.89± 650.88	^{dB}5.18 ±226.14	^{aC}17.35 ±250.19	^{cC} 1.79± 193.26
18	^{edA}23.10±840.54	^{dB}20.30± 276.83	^{bC}0.69 ±220.33	^{dC}0.11 ±183.33
21	^{dA}10.95±921.80	^{cB}2.31±344.11	^{cC}1.69 ± 193.69	^{eD}14.44±144.48
24	^{Ac}8.99± 1234.19	^{Bb}2.27±607.83	^{dC}1.73 ±163.32	^{fD}5.76 ±120.25
27	^{aA}17.38± 2530.84	^{aB}17.36± 730.47	^{eC}2.94 ±125.18	^{gD}2.84± 80.47
30	^{aA}14.38± 3508.16	^{aB}17.26± 713.47	^{eC}2.34 ±96.26	^{gD}2.81± 57.20

الأحرف الصغيرة المختلفة ضمن العمود تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية ($P\leq0.05$).
الأحرف الكبيرة المختلفة ضمن الصف تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية ($P\leq0.05$).

أما بالنسبة للجرعة 0.5^{-1} فقد أظهرت النتائج وجود فروق معنوية في حجم الورم باحتمالية ($P\leq0.05$) فقد كانت هناك زيادة بطيئة أيضاً في حجم الورم بشكل واضح بالمقارنة مع السيطرة وظهرت أعلى زيادة في معدلات الحجم في الأيام 24 و27 و30 وهي 163.322و125.18 و96.26 ملم^3 على التوالي الجدول 3. اما المجموعة الثالثة المعاملة بالجرعة 1ملغم كغم $^{-1}$ فكان الانخفاض واضحاً في معدلات حجم الورم منذ اليوم 21 وحتى اليوم 30, ففي اليوم الاخير كان معدل حجم الورم 57.20 ملم^3 فقد أوضحت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية ($P\leq0.05$) بين المجموعة المعالجة والسيطرة. تشير النتائج الى وجود فروق معنوية بين معدلات حجم الورم للمجاميع المعاملة بالجرع الثلاث بالمقارنة مع السيطرة باحتمالية ($P\leq0.05$)، وكانت أفضل جرعة التي سببت انخفاضاً ملحوظاً في معدلات الحجم هي 1 ملغم كغم $^{-1}$ فقد كان معدل حجم الورم في اليوم الأخير 57.20 ملم^3 بالمقارنة مع الجرعتين الأولى

والثانية فقد كانت 713.47 و96.26 ملم^3 على التوالي بالمقارنة مع السيطرة 35008.16 ملم^3. وعند حساب حجم الورم النسبي باستخدام المستخلص الكحولي الخام وجد انه يزداد تدريجياً بالرغم من المعاملة مع تقدم المدة الزمنية ولكن هذه الزيادة أقل بكثير مما في مجموعة السيطرة التي ازداد فيها الحجم النسبي بشكل كبير وبصورة مستمرة حتى موت الحيوان (الجدول 4).

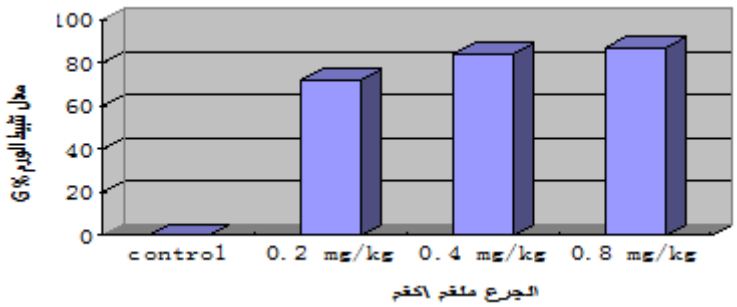
الجدول 4. تأثير حجم الورم النسبي (RTV %) في المجاميع المجرّعة بالمستخلص الكحولي لثمار الحسك والمجموعة المجرّعة DMSO (مجموعة السيطرة)

الجرعة / اليوم	السيطرة	0.25 ملغم كغم$^{-1}$	0.5 ملغم كغم$^{-1}$	1 ملغم كغم$^{-1}$
	المعدل ± الخطأ القياسي	المعدل ± الخطأ القياسي	المعدل ± الخطأ القياسي	المعدل ± الخطأ القياسي
0	^{aA}0.00± 100	^{eA}0.00± 100	^{aA}0.00± 100	^{aA}0.00 ±100
9	^{hA}2.88± 105.81	^{eB}0.00± 99.05	^{bB}0.57± 99.90	^{aB}2.68± 99.57
12	^{gA}7.50±213.70	^{eB}2.12± 100.37	^{bB}7.50±99.95	^{aB}1.54 ±95.08
15	^{fA}1.15±292.71	^{eB}0.50±101.71	^{bB}2.88±113.58	^{bB}1.15 ± 82.32
18	^{eA}5.77± 378.00	^{dB}2.30±124.50	^{bB}1.73±100.02	^{bB}1.15 ± 87.32
21	^{dA}8.08± 419.55	^{cB}5.77± 145.78	^{cB}0.08± 87.93	^{cD}2.88 ±65.29
24	^{bA}2.88±555.02	^{bB}5.77±271.16	^{dB}3.46±74.14	^{dD}2.30 ±54.34
27	^{aA}8.81± 1179.83	^{aB}16.30±328.56	^{eB}1.73±56.82	^{eD7}.30 ± 36.36
30	^{aA}8.11± 1577.55	^{aB}16.31±321.15	^{eB}1.23±43.69	^{fC}1.73 ±25.84

الأحرف الصغيرة المختلفة ضمن العمود تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية ($P\leq0.05$).
الأحرف الكبيرة المختلفة ضمن الصف تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية $P\leq0.05$).

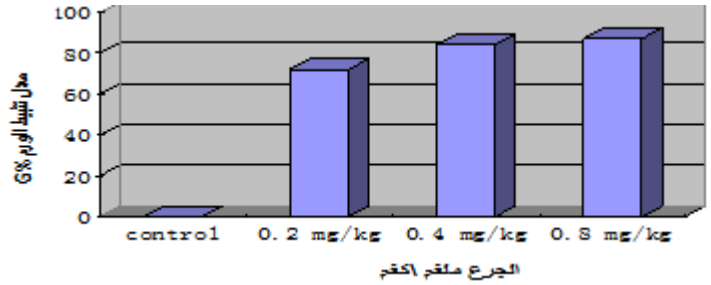
إن استخدام المستخلص بجرعة1ملغم كغم$^{-1}$ أظهر نقصاناً معنوياً باحتمالية ($P\leq0.05$) في حجم الورم النسبي وكان هذا واضحاً في اليوم 30 بعد الغرس حتى نهاية التجربة أي بعد اعطاء الحيوانات احدى عشرة جرعة حيث كان المعدل في اليوم الأخير 25.84 ملم^3 بالمقارنة مع السيطرة 1577.69 ملم^3. أما الجرعتان 0.5 و 0.25 ملغم كغم$^{-1}$ فقد أخذ المعدل يزداد ببطء حتى يوم 27 بعد الغرس. أما معدل الحجم النسبي لليومين الأخيرين للجرعتين فهو 321.15 و43.69 ملم^3 على التوالي.

تشير النتائج أيضاً والموضحة في الشكل 2 الى أن المعاملة بالمستخلص الكحولي الخام قد ادت الى تثبيط نمو الورم لكل الجرع المستخدمة بمستوى احتمالية ($P\leq0.05$) طيلة مدة التجربة اذ ازدادت نسبة التثبيط بمرور الوقت واستمرار المعاملة. وقد كانت أفضل جرعة للمستخلص الكحولي الذي أظهرت أعلى نسبة تثبيط لنموالورم هي 1ملغم كغم$^{-1}$ بنسبة بلغت 86.09% لليوم الأخير من التجربة ثم الجرعتان0.25 و0.5 ملغم كغم$^{-1}$ اللتان اعطتا نسبة تثبيط هي 79.54 و75.98% على التوالي.



الشكل 2. تأثير جرع مختلفة من المستخلص الكحولي الخام لثمار الحسك في معدل تثبيط الورم (GI)% للفئران الحاملة لسرطان الكبد في نهاية التجربة

أظهر حقن الفئران الحاملة للورم بالمستخلص القلويدي الخام وبالجرعة 0.2 ملغم كغم $^{-1}$ وجود فروق معنوية باحتمالية ($P\leq0.05$) عند مقارنة معدلات حجم الورم للمجموعة المعاملة مع السيطرة، وكان تأثير المعاملة في حجم الورم واضحاً منذ البدء وحتى اليوم الأخير بالرغم من الزيادة في الحجم مع تقدم المدة الزمنية للمعاملة ولكنها زيادة قليلة بالمقارنة مع الزيادة الحاصلة في مجموعة السيطرة، ففي الأيام 24 و 27 و 30 بعد الغرس كانت معدلات الحجم 250.25 و243.21 و240.15 ملم^3 على التوالي، في حين كانت السيطرة 1250.34 و2551.70 و3855.80 ملم^3 على التوالي التي ازداد معدل حجم الورم فيها بصورة كبيرة كما موضح في الشكل 3.



الشكل 3. تأثير جرع مختلفة من المستخلص القلويدي الخام لثمار الحسك في معدل تثبيط الورم GI% للفئران الحملة لسرطان الكبد في نهاية التجربة

وتشيرنتائج التحليل الاحصائي الى إن المعاملة بالجرعة 0.4 ملغم كغم$^{-1}$ أدت الى تقليل حجم الورم باحتمالية ($P\leq0.05$)، وكان معدل حجم الورم للأيام 24 و 27 و 30 في المجموعة المعاملة 156.23 و125.27 و91.24 ملم^3 على التوالي بالمقارنة مع السيطرة. أما الحقن بالمستخلص القلويدي بجرعة 0.8 ملغم كغم$^{-1}$ فقد أدى الى نقصان حجم الورم في الفئران طيلة مدة المعاملة نقصاناً معنوياً وباحتمالية ($P\leq0.05$) بالمقارنة مع السيطرة، ففي الأيام 24 و27 و30 كانت معدلات حجم الورم 92.89 و51.87 و35.12 ملم^3 على التوالي بالمقارنة مع السيطرة، اما الاختلاف بين معدلات حجم الورم للمجاميع المعاملة بالجرع الثلاث فقد بينت النتائج وجود فروق معنوية باحتمالية ($P\leq0.05$) لكل الأيام بالمقارنة مع السيطرة، وكانت الجرعة الأكثر تأثيراً في معدل حجم الورم للأيام الأخيرة بخاصة هو 0.8 ملغم كغم$^{-1}$ فقد كان الحجم في اليوم الأخير 35.12 ملم^3 في حين كان المعدل للجرعتين الثانية والثالثة 240.15 و91.24 ملم^3 على التوالي، مقارنة بالسيطرة التي أعطت معدل 3855.80 ملم^3. وأظهر حقن الفئران الحاملة للورم بالمستخلص القلويدي الخام أيضاً فأن حجم الورم النسبي يزداد تدريجياً مع تقدم المدة الزمنية للمعاملة ولكنها زيادة أقل بكثير مما في مجموعة السيطرة (الشكل 3). ان استخدام المستخلص القلويدي بالجرعتين 0.25 و 0.4 ملغم كغم$^{-1}$ أدى الى زيادة معدل حجم الورم النسبي ولكنها زيادة بطيئة حتى اليوم 27 بعد الغرس، فقد انخفض معدله انخفاضاً واضحاً حتى نهاية التجربة أي بعد اعطاء عشر جرع، فقد كان المعدل لليوم الأخير من التجربة هو 109.00 و41.34 على التوالي بالمقارنة مع السيطرة 1234.73 التي استمر نمو الورم فيها من دون توقف حتى موت الحيوان. أما الجرعة 0.8 ملغم كغم$^{-1}$ فقد ادى الى نمو الورم ببطء في البداية ولكن بعد27 يوما من الغرس أي بعد إعطاء عشر جرع فقد قل حجم الورم النسبي زيادة واضحة فقد كان المعدل15.88 ولكنها أقل بكثير من الزيادة الحاصلة في مجموعة السيطرة، وقد بينت نتائج التحليل الاحصائي لمقارنة معدلات الحجم النسبي للورم وجود فروق معنوية باحتمالية ($P\leq0.05$) بين الجرع الثلاثة وبالمقارنة مع السيطرة. وبين الجدول 6 ان تقدير تثبيط نمو الورم تم بحساب نسبة التثبيط GI%، إذ تزداد نسبة تثبيط نمو الورم معنوياً باحتمالية ($P\leq0.05$) بمرور الوقت لكل الجرع المستخدمة، فقد كانت القيمة الأعلى لتثبيط نمو الورم بعد المعاملة بالجرعتين 0.8 و0.4 ملغم كغم$^{-1}$ بنسبة تثبيط مقدارها 87.06

و83.91% على التوالي لليوم الأخير من التجربة، أما الجرعة 0.2 ملغم كغم$^{-1}$ فقد كانت النسبة المئوية لتثبيطها هي 71.91 % (الجدول 7).

الجدول 6. تأثير جرع مختلفة من المستخلص القلويدي لثمار نبات الحسك على حجم الورم ملم^3 للفئران الحاملة لسرطان الكبد

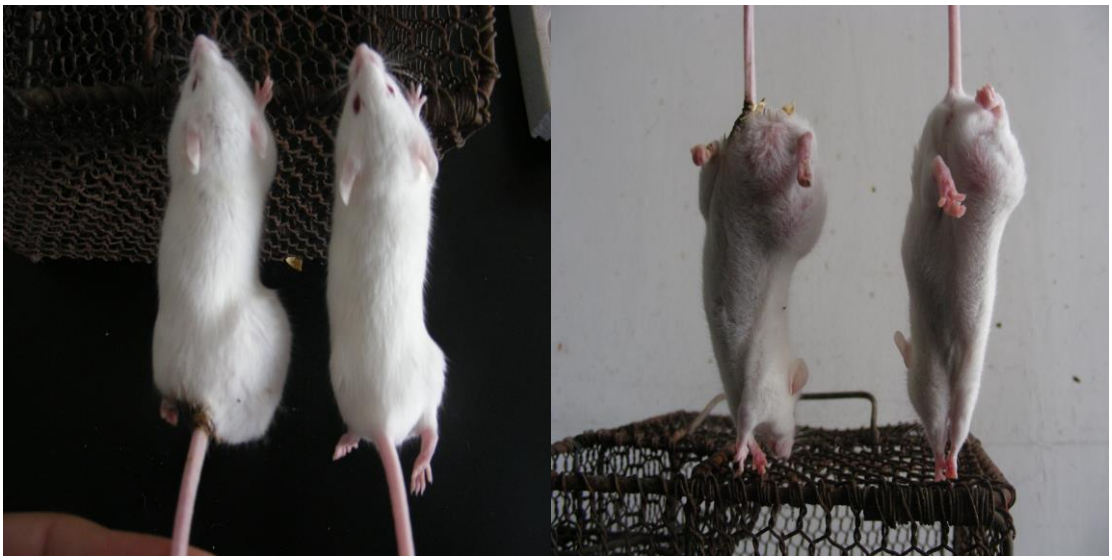
الجرعة / اليوم	السيطرة	0.2 ملغم كغم$^{-1}$	0.4 ملغم كغم$^{-1}$	0.8 ملغم كغم$^{-1}$
	المعدل ± الخطأ القياسي	المعدل ± الخطأ القياسي	المعدل ± الخطأ القياسي	المعدل ± الخطأ القياسي
0	^{gA}1.44± 220.88	^{bA}2.28± 220.06	^{aA}5.81± 220.38	^{aA}2.37 ±221.12
9	^{gA}4.33± 237.65	^{bB}5.79± 220.12	^{aA}5.81± 220.16	^{aB}1.03± 222.33
12	^{fA}31.87±477.86	^{bA}22.82± 210.11	^{aB}5.81± 210.02	^{bB}0.06± 211.34
15	^{eA}1.00± 682.15	^{aB}2.54± 295.23	^{abB}5.84±191.13	^{cC}0.01± 184.33
18	^{dA}0.65± 963.81	^{aB}5.95±291.93	^{bC}8.52± 186.22	^{dD} 2.30±144.15
21	^{dA}11.41±981.53	^{bB}5.75± 250.96	^{cC}2.32± 174.82	^{eD}3.18 ±114.45
24	^{cA}28.86± 1250.34	^{Bb}28.81±250.25	^{dcC}2.78± 156.23	^{fC}1.86 ± 92.89
27	^{bA}28.92± 2550.70	^{Bb}0.05±243.21	^{dC}0.03±125.27	$^{f D}$0.92± 51.87
30	^{bA}28.92± 3855.80	^{Bb}0.05±240.15	^{eC}17.35±91.24	$^{f D}$0.92± 35.12

الأحرف الصغيرة المختلفة ضمن العمود تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية (P≤0.05).
الأحرف الكبيرة المختلفة ضمن الصف تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية (P≤0.05).

الجدول7. تأثير حجم الورم النسبي (RTV %) في المجاميع المجرّعة بالمستخلص القلويدي الخام لثمار النبات والمجموعة المجرّعة DMSO (مجموعة السيطرة)

الجرعة / اليوم	السيطرة	0.2 ملغم كغم$^{-1}$	0.4 ملغم كغم$^{-1}$	0.8 ملغم كغم$^{-1}$
	المعدل ± الخطأ القياسي	المعدل ± الخطأ القياسي	المعدل ± الخطأ القياسي	المعدل ± الخطأ القياسي
0	^{gA}1.15± 100	^{cA}0.00± 100	^{aA}0.00± 100	^{aA}0.00 ±100
9	^{gA}4.04± 107.59	^{cAB}0.00±99.96	^{aB}2.30± 99.96	^{aB}1.45±100.00
12	^{fA}5.77±222.40	^{cB}7.44± 95.44	^{aB}1.15±95.16	^{aB}1.15 ±97.31
15	^{eA}4.61±280.00	^{aC}5.00±134.09	^{bC}2.88±86.60	^{bC}1.73 ± 83.38
18	^{dA}5.77±436.00	^{aC}2.30±29.85	^{bC}1.15±84.38	^{cD}2.88 ±65.29
21	^{dA}2.30±444.39	^{bC}1.73± 113.47	^{cC}2.88± 79.21	^{dD}0.75 ±51.77
24	^{cA}2.30±566.09	^{bC}1.73±113.65	^{dC}2.30±70.79	^{eD}1.15 ± 42.47
27	^{bA}2.88± 1155.34	^{bC}1.15±110.45	^{eC}0.5±56.76	^{fD}1.73 ±23.45
30	^{bA}2.7 8± 1734	^{bC}1.16±109.00	^{eC}0.4±41.34	^{fD}1.53 ±15.88

الأحرف الصغيرة المختلفة ضمن العمود تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية (P≤0.05).
الأحرف الكبيرة المختلفة ضمن الصف تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية P≤0.05).



B A

الشكل 4. تمثل(A) فأرة حاملة لسرطان الكبد الفاري لمجموعة السيطرة (غيرمعالجة) مع فارة معالجة بالمستخلص القلويدي (B) مقارنة فارة حاملة لسرطان الكبد الفاري مع فارة (غيرمعاملة) معاملة بالمستخلص الكحولي

المصادر

الربيعي، إبراهيم هادي محمد. 2009. تأثير المستخلص المائي والقلويدي الخام للمديد *Convolvulus arvensis* L. في تثبيط الخلايا السرطانية داخل وخارج الجسم، اطروحة دكتوراه، كلية العلوم للبنات، جامعة بغداد.

Allen, J., C. Shuler and S. A. Latt. 1977. A simplified Technique for *In vivo* analysis of SCE using 5- Brdu tablets. *Cyto. Cell. Genet.*, 18: 231-234.

Boisio, M. L., M. Esposito and F. Merlo. 1993. Separation and identifying features of the cardiac aglycones and glycosides of *Nerium oleander* L. flowers by thin-layer chromatography. *Miner. Mid.*, 84: 627-632.

Cannell, R. J. P. 1998. Natural Product Isolation. Humana Press, New Jersey, USA.

Chakravarty, H., L. 1976**.** Plant Wealth of Iraq (A dictionary of economic plants). Botany Directorate, Ministry of Agriculture and Agrarian Reform, Baghdad, Iraq.

Dixon, W. J. 1980. Efficient analysis of experimental observations. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol*., 20: 441-62.

Freshney, R. I. 2001. Application of cell culture to toxicology. *Cell Biology and Toxicology*, 17: 213-230.

Zhang, Fu. L. S. and N. Li and M. Ando. 2005. Three new triterpenes from *Nerium oleander* and biological activity of the isolated compounds. *J. Nat. Prod*., 68: 198-206.

Ge, N., L. Ye, R. Zheng, L. Y. Sun and Z. Tang. 2003. Prevention of hepatocellular carcinoma in mice by IL-2 137-1 genes co-transfected liver cancer cell vaccines. *World J. Gastroenterol*, 9(10): 2182-2185.

Gupta, S., D. Yi. Zhang and J. Shao. 2004. Anticancer activities of *Oldenlandia diffusa*. *J. Herbal Pharmacotherapy*, 4: 21-33.

Harborne, J. B. 1984. Phytochemical Methods. (2nd ed.), Chapman & Hall, London, P.5.

Jone, S. and K. K. Janardhanan. 2000. Antioxidant and Antitumor activity of *Ganoderma lucidum* (Curtifr.) P. Karstreishi (Apyllophoromycetideae) from south India. *Int. J. Med. Mushr*., 2: 195-200.

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.

Lopus, M. and D. Panda. 2006. The enzophenanthridine alkaloid sanguinarine perturbs microtubule assembly dynamic through tubulin bindin. A possible mechanism for its antiproliferative activity. *J. FEBS*. 273(10): 2139-50.

Meng, X. L., N. H. Riordan, J. J. Casciari, Y. Zhu, J. Zhong, M. J. González, J. R. Miranda-Massari, and H. D. Riordan. 2002. Effect of a high molecular Mass *Convolvulus arvensis* extract on tumor growth and angiogenesis. *PR Health Sci. J*. 21: 323-328.

Mukherjee, A., B. Sourar, S. Nabainta, and R. A. Anil. 2001. Advance in canser therapy with plant based natural product. *Curent Medicinal Chem*., 8(12): 1467-1486.

Okamura, H., S. Kashiwamura, and K. Nakanishi. 1998. Regulation of interferon-γ production by IL-12 and IL-18. *Curr. Opin. Immunol*., 10: 259-264.

Pathake, S., A. S. Multani, S. Narayan, V. Kumar and R. A. Newman. 2000. Anvirzel ™, an extract of *Nerium oleander*, induces cell death in human but not murine cancer cells. *Anticancer drags*, 11(6): 455-463.

Todd, F. G., F. R. Stermitz, P. Schultheis, A. P. Knight, and T. Dargatz. 1995. Tropane alkaloids and toxicity of *Convolvulus arvensis. phytochem*., 39(2): 301-3.

Toshio, N., K. Akiko, M. Yuasa, and O. David. 2008. Mechanism of growth of inhibitory effect of *blume*. *Biochem.* 772(5): 1183-1189.

Schmidt, M. and H. Bastians. 2007. Mitotic drug target and development of novel anti-mitotic anticancer drugs. *Drug Resistance Updates*. 10: 162-181.

TOXIC EFFECT OF ALCOHOLIC AND ALKALINE EXTRACT OF *Terbulues terrestris* PLANT ON MITOCHONDIRAL DIVISIONS OF BONE MARROW CELLS AND TUMOR SIZE REDUCTION IN LABORATORY MICE

Israa T. AAkool [1] Ibrahim H. Muhammed[2,5] Asma A. Hasan[3] Zina Abdul Hafaz[4]

[1,2,3] Dept. of Biology, College of Science, Univ. of Diyala; [4]Dept. of Biology, College of Education, Univ. of Baghdad, Iraq.

[5] Corresponding author: dribrahahimhadi@ sciences uodiyala.edu.iq

ABSTRACT

This study was aimed to evaluate the effect of *Terbulues terrestris* fruit extraction on mitotic index and tumor HepG2 cell line (Hepatic cell line) inhibition in mice in different doses of alcoholic and alkaloids extraction (10, 20, 40, 80, 160) mg kg^{1-} compared with colchicines methods by used injection methods. The results showed that alcohol and alkaloids relatively that a significant inhibition in mitotic index was recorded at dose (160 mg ml^{-1}) which was the best in alkaloids extraction and in alcoholic extraction, increased 70% with colchicines and acute toxic effect in mice in respect to Lethal dose LD_{50} in mice (102 mg kg^{-1} and 98 mg kg^{-1}), respectively in alcoholic and alkaloids extraction. The results of dose in alcoholic extraction (0.2, 0.4, 0.8 mg ml^{-1}) which was injection intra peritoneum in 30 day, one dose every 48 hours in mice reduced the tumor 57.20 m^3 in 1 mg ml^{-1} dose, but the alkaloids reduced the tumor 35.12 m^3 in 0.8 mg ml^{1-} compared with control 3508.16 m^3 and 3855.80 m^3, respectively. However the chronic toxicity of water extract at three different concentration and alkaloids reduced the tumor depend the time and concentration.

Key words: *Terbulues terrestris* plant, Microtubules, Tumor.