دراسة تأثير المستخلصات الخام لنبات الصفصاف *Salix acmophylla* في نمو الخطوط الخلوية السرطانية والخلايا اللمفاوية الطبيعية للإنسان خارج الجسم

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية التربية – جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة /علم الحيوان

من قبل

أزهار موسى جعفر الموسوي

ربيع الثاني 1427 هـ

آيار 2006 م

بسم الله الرحمن الرّحيم

وَالأَرضَ مَدَدنَاها وَأَلقَينَا فِيهَا رَوَٰسِيَ وَأَنبَتنَا فِيهَا مِن كُلِّ زَوجِ بَهِيجٍ ﴿٧﴾ تَبصِرَةً وَذِكرَىٰ لِكُلِّ عَبدٍ مُّنِيبٍ ﴿٨﴾ وَنَزَّلنَا مِنَ السَّمَآءِ مَآءً مُّبَارَكًا فَأَنبَتنَا بِهِ جَنَّاتٍ وَحَبَّ الحَصِيدِ ﴿٩﴾

صدق الله العظيم

سورة - ق - الآية (٧-٩)

إقرار المقوّم اللغوي

أشهد أني قد قومت الرسالة الموسومة بـ (**دراسة تأثير المستخلصات الخام لنبات الصفصاف *Salix acmophylla* في نمو الخطوط الخلوية السرطانية والخلايا اللمفاوية الطبيعية للإنسان خارج الجسم**) للطالبة أزهار موسى جعفر الموسوي – قسم علوم الحياة– الدراسات العليا (الماجستير) .

التوقيع :

الاسم : د. مكي محي عيدان الكلابي

العنوان : جامعة كربلاء / كلية التربية

قرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة الموقعين أدناه نشهد بعد أن قرأنا هذه الرسالة واختبرنا الطالبة أزهار موسى جعفر في محتوياتها وفيما له علاقة بها ووجدنا بأنها جديرة بالقبول بدرجة (امتياز) لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم الحيوان .

التوقيع :

الاسم : د. سعد مرزة الاعرجي

الدرجة العلمية : أستاذ مساعد

التاريخ : / / ٢٠٠٦

رئيس اللجنة

التوقيع :

الاسم: د. ستار جاسم حتروش

الدرجة العلمية: أستاذ مساعد

التاريخ: / /٢٠٠٦

عضو

التوقيع :

الاسم :د.عبد الحسين مويّت الفيصل

الدرجة العلمية: أستاذ مساعد

التاريخ: / / 2006

عضو

التوقيع:

الاسم: الدكتور هادي رسول حسن

الدرجة العلمية: أستاذ مساعد

التاريخ: / /٢٠٠٦

عضو(المشرف)

التوقيع:

الاسم: الدكتور ناهي يوسف ياسين

الدرجة العلمية: أستاذ

التاريخ: / / ٢٠٠٦

عضو(المشرف)

مصادقة عمادة كلية التربية

أصادق على ما جاء بقرار اللجنة أعلاه

التوقيع:

الاسم: حسين كاظم القطب

الدرجة العلمية: أستاذ مساعد

التاريخ: / /٢٠٠٦

إقرار المشرفين

نشهد بأن رسالة الماجستير الموسومة " دراسة تأثير المستخلصات الخام لنبات الصفصاف *Salix acmophylla* في نمو الخطوط الخلوية السرطانية والخلايا اللمفاوية الطبيعية للإنسان خارج الجسم " عُدت تحت إشرافنا في جامعة كربلاء و المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم الحيوان.

التوقيع :

المشرف : الدكتورهادي رسول حسن

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : جامعة كربلاء/ كلية التربية

التاريخ : / /٢٠٠٦

التوقيع:

المشرف :الدكتور ناهي يوسف ياسين

المرتبة العلمية : أستاذ

العنوان : المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية / بغداد

التاريخ : / / ٢٠٠٦

توصية رئيس لجنة الدراسات العليا

التوقيع :

الاسم : د. صباح واجد علي

المرتبة العلمية : مدرس

التاريخ : / / ٢٠٠٦

توصية رئيس قسم علوم الحياة

استناداً إلى التوصيات المتوفرة ، أرشح هذه الأطروحة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع :

الاسم : د. ستار جاسم حتروش

الإهداء

إلى من أخلص في إعطائه النصيحة . . .

وغرس في أعماقي حب العلم والحقيقة . . .

إلى من أوقد في نفسي شعلة الفضول والمثابرة . . .

فقادتني أفكاره إلى بر الأمان . . .

إلى روح والدي العزيز . . . أهدي هذا الجهد المتواضع .

أزهار

شكر وتقدير

الحمد لله خالق الخَلق ، مُجري الفُلك ، مُسخّر النِعم ، والصلاة على نبيه الكريم وآله وصحبه الطيبين الطاهرين ، يسعدني وأنا أنهي بحثي هذا أن أتقدم بالشكر والعرفان لكل من أسهم في تقديم يد المساعدة لي ولكل ساعٍ في طلب العلم ، جزاهم الله على ما قدموه وما سيقدمون .

أول شكري أزجيه إلى مشرفي الفاضل الدكتور هادي رسول الذي قدم لي كل ما يرفد العلم ويسهم في تقدمه. وأتقدم بوافر الشكر والاعتزاز لما كان لي بيتاً لسكني ومختبراً لدراستي ومكتبة أنتفع بها مركزي الحبيب (المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية) . وأدخل في رحابه لأشكر العقول المثابرة التي سهرت الليالي في طلب العلم وفي قمتهم مشرفي الأستاذ الدكتور ناهي يوسف ياسين الذي وفر لي كل ما أحتاجه أمد الله في عمره وغمره بالصحة والعافية انه سميع مجيب

كما أتقدم بالشكر الجزيل إلى عمادة كلية التربية ورئاسة قسم علوم الحياة للمتابعة المستمرة . ومن العاملين في مركز بحوث السرطان أشكر الآنسة أسماء عامر أحمد والآنسة توحيد فاضل جابر وأشكر الدكتور أحمد عزام ، والدكتور عبد الله إبراهيم والدكتورة هند حسين .

وأتقدم أيضاً بالشكر الجزيل إلى المصنف النباتي الأستاذ الدكتور علي حسين عيسى الموسوي لتشخيصه النبات المستخدم في البحث والدكتور مكي محي عيدان الكلابي لتحمله عناء التصحيح والضبط اللغوي لتخرج الرسالة بلغة سليمة .

وأحمد الله أن مكنَني أن أشكر من كان معي في أول خطوة من الدرب ، أمي الحنون أدخلها الله فسيح جناته ، كما وأقدم شكري بكل امتنان إلى من شجعني على المواصلة وآزرني في أحنك الظروف زوجي العزيز . وختاماً أقدم ثنائي لكل من ساندني في بحثي هذا.

والله ولي التوفيق

أزهار الموسوي

قائمة المحتويات

الموضوع	الصفحة
الخلاصة	**أ**
قائمة المحتويات	**ج**
قائمة الجداول	**ح**
قائمة الصور	**ح**
قائمة الاشكال	**ي**
قائمة المختصرات	**ك**
المقدمة	**1**
الفصل الأول : أستعراض المراجع	
1-1 **ألأورام Tumors**	**4**
2-1 **عملية التسرطن Carcinogenesis**	**5**
3-1 **عوامل الخطورة للسرطان Risk factors of cancer**	**6**
1-3-1 **العوامل الفيزيائية Physical factors**	**6**
2-3-1 **العوامل الكيميائية Chemical factors**	**7**
3-3-1 **العوامل الحياتية Biological factors**	**8**
4-1 **السرطان والوراثة Cancer and Genetics**	**9**
1- 4-1 **الأورام و المورثات Tumors and Genes**	**11**
1-1-4-1 **المورثات الورمية Oncogenes**	**11**
2-1-4-1 **المورثات الكابحة Suppressor genes**	**12**
3-1-4-1 **مورثات موت الخلية المبرمج Apoptosis genes**	**12**
4-1-4-1 **مورثات إصلاح الـ (DNA) DNA repair genes**	**13**
5-1 **علاج السرطان Cancer therapy**	**13**
1-5-1 **العلاج الجراحي Surgical treatment**	**13**
2-5-1 **العلاج الإشعاعي Radiotherapy**	**14**

3-5-1 العلاج الكيميائي Chemotherapy	14
4-5-1 العلاج الهرموني Hormone therapy	16
5-5-1 العلاج الاحيائي Biotherapy	16
1-5-5-1 العلاج المناعي Immunotherapy	16
2-5-5-1 العلاج الجيني Gene therapy	17
6-1 ألأعشاب والطب Herbs and Medicine	18
1-6-1 الأعشاب وفعاليتها المضادة للسرطان Herbs with Anticancer activity	19
7-1 نبات الصفصاف (willow) *Salix acmophylla*	23
1-7-1 المكونات الكيميائية Chemical composition	23
2-7-1 استعمالاته الطبية Medical Uses	24
الفصل الثاني : المواد وطرائق العمل	
1-2 الأجهزة والمواد	28
1-1-2 الأجهزة والأدوات المستخدمة في الدراسة	28
2-1-2 المواد الكيميائية Chemicals	30
3-1-2 المحاليل المستخدمة في الدراسة	31
1-3-1-2 المذيبات المستخدمة في الاستخلاص Solvents used for extraction	31
2-3-1-2 المواد الخاصة بالكشف الكيميائي التمهيدي عن المركبات الفعالة في المستخلصات النباتية	31
3-3-1-2 المحاليل الخاصة بالزرع النسيجي والزرع الثانوي Stock solutions for tissue culture and subculture	33
4-3-1-2 المحاليل الخاصة بدراسة تأثيرالمستخلصات الخام في نمو الخطوط الخلوية السرطانية Stock solutions for studing the effect of crud extracts on cancer cell line	36

36	5-3-1-2 المحاليل الخاصة بدراسة تأثير المستخلصات الخام في انقسام الخلايا اللمفاوية البشرية خارج الجسم الحي **Stock solution for studing the effect of crud extracts on lymphocyte division(in vitro)**
38	2-2 الخطوط الخلوية **Cell lines**
39	3-2 طرائق العمل
39	1-3-2جمع وتحضير النبات **Collection and Preparation the plant**
40	2-3-2 تحضير المستخلصات الخام لنبات الصفصاف **Preparation of Crude Extracts of *Salix acmophylla***
40	1-2-3-2 تحضير المستخلص المائي الخام لأوراق وقلف نبات الصفصاف
41	2-2-3-2 تحضير المستخلص الكحولي الخام (الأيثانولي) لأوراق وقلف نبات الصفصاف
41	3-3-2 الأدامة والمحافظة على الخطوط الخلوية السرطانية **Maintenance of cancer cell lines**
41	4-3-2 دراسة تأثير المستخلصات الخام لنبات الصفصاف في نمو الخطوط الخلوية السرطانية **Study the effect of crude extracts on cancer cell lines**
41	1-4-3-2 تهيئة الوسط الزرعي وخطوط الخلايا **Preparation of medium and cancer cell lines**
43	2-4-3-2 أختبار سمية المستخلصات الخام لنبات الصفصاف على نمو الخطوط الخلوية السرطانية **Cytotoxic assay of *S. acmophylla* crud extracts on cancer cell line**
45	5-3-2 أختبار تأثير المستخلصات الخام لنبات الصفصاف في أنقسام الخلايا اللمفاوية البشرية خارج الجسم الحي **Effect of *S. acmophylla* crud extracts on lymphocyte division (in vitro)**

1-5-3-2 الزرع Culture	45
2-5-3-2 الحصاد Harvesting	46
3-5-3-2 التثبيت Fixation	46
4-5-3-2 تحضير الشرائح الزجاجية Slide making	46
5-5-3-2 التقطير Dropping	47
6-5-3-2 الصبغ Staining	47
7-5-3-2 الفحص المجهري Microscopical examination	47
6-3-2 قياس فاعلية المستخلصات الخام كبديل لـ (Colchicine)	48
7-3-2 أختبار المستخلصات الخام كمادة مشطرة (Mitogen)	48
8-3-2 الأحصاء Statistics	48
الفصل الثالث : النتائج	
1-3 المستخلصات الخام لنبات الصفصاف *Salix acmophylla*	49
2-3 نتائج الكشف الكيميائي التمهيدي عن المركبات الفعالة	50
3-3التأثير السمي للمستخلصات الخام لنبات الصفصاف في نمو خلايا الخطوط الخلوية السرطانية وخلايا الخط الطبيعي لجنين الجرذ Cytotoxic effect of crude extracts of *S. acmophylla* on Cancer and Rat embryo cell line	51
1-3-3 الخط الخلوي لسرطان HEP-2	51
1-1-3-3 المستخلص المائي لأوراق الصفصاف L1	52
2-1-3-3 المستخلص الأيثانولي لأوراق الصفصاف L2	53
3-1-3-3 المستخلص المائي لقلف الصفصاف B1	54
4-1-3-3 المستخلص الايثانولي لقلف الصفصاف B2	55
2-3-3 الخط الخلوي لسرطان AMN-3	58
1-2-3-3 المستخلص المائي لأوراق نبات الصفصاف L1	59
2-2-3-3 المستخلص الأيثانولي لأوراق نبات الصفصاف L2	60

3-2-3-3 المستخلص المائي لقلف نبات الصفصاف B1	61
4-2-3-3 المستخلص الأيثانولي لقلف نبات الصفصاف B2	62
3-3-3 الخط الخلوي الطبيعي لجنين الجرذ Rat Embryo Fibroblast (REF)	66
4-3 تأثير المستخلصات الخام لنبات الصفصاف في إنقسام الخلايا اللمفاوية البشرية Effect of *S. acmophylla* crude extracts on the Division of human lymphocytes	69
1-4-3 المستخلص المائي لأوراق نبات الصفصاف L1	69
2-4-3 المستخلص الأيثانولي لأوراق نبات الصفصاف L2	70
3-4-3 المستخلص المائي لقلف نبات الصفصاف B1	70
4-4-3 المستخلص الأيثانولي لقلف نبات الصفصاف B2	71
5-3 قياس فاعلية المستخلصات الخام كبديل عن الكولجسين	74
6-3 نتائج قياس نشاط المستخلصات الخام كمادة مشطرة	76
الفصل الرابع : المناقشة	77
الاستنتاجات والتوصيات	
الاستنتاجات	85
التوصيات	86
المصادر	
المصادر العربية	87
المصادر الاجنبية	89
الخلاصة باللغة الانكليزية	A

قائمة الجداول

الجداول	الصفحة
جدول (3–1) النسب المئوية للاستخلاص	49
جدول (3–2) نتائج الكشف الكيميائي التمهيدي للمكونات الكيميائية الفعالة لنبات الصفصاف	50
جدول (3–3) تأثير المستخلصات الخام في معاملات الانقسام الخيطي والتحول الأرومي لخلايا الدم المحيطي للإنسان	72
جدول (3–4) معاملات الانقسام الخيطي للمستخلصات الاربعة المعاملة كبديل عن الكولجسين	75

قائمة الصور

الصورة	الصفحة
الصورة (1) نبات الصفصاف (القلف والأوراق)	27
الصورة (2) الخط الخلوي السرطاني HEP-2 الذي يمثل السيطرة	56
الصورة (3) الخط الخلوي السرطاني HEP-2 المعامل بالمستخلص L1 عند التركيز 1000 مايكرو غرام/ملليتر	56
الصورة (4) الخط الخلوي السرطاني HEP-2 المعامل بالمستخلص L2 عند التركيز 1000 مايكرو غرام/ملليتر	57
الصورة (5) الخط الخلوي السرطاني HEP-2 المعامل بالمستخلص B1 عند التركيز 1000 مايكرو غرام/ملليتر	57
الصورة (6) الخط الخلوي السرطاني HEP-2 المعامل بالمستخلص B2 عند التركيز 1000 مايكرو غرام/ملليتر	58
الصورة (7) الخط الخلوي السرطاني AMN-3 يمثل السيطرة	63

الصورة (8) الخط الخلوي السرطاني AMN-3 المعامل بالمستخلص L1 عند التركيز 1000 مايكرو غرام / ملليلتر	64
الصورة (9) الخط الخلوي السرطاني AMN-3 المعامل بالمستخلص L2 عند التركيز 1000 مايكرو غرام / ملليلتر	64
الصورة (10) الخط الخلوي السرطاني AMN-3 المعامل بالمستخلص B1 عند التركيز 1000 مايكرو غرام / ملليلتر	65
الصورة (11) الخط الخلوي السرطاني AMN-3 المعامل بالمستخلص B2 عند التركيز 1000 مايكرو غرام / ملليلتر	65
الصورة رقم (12) الخط الخلوي الطبيعي REF ويمثل السيطرة	67
الصورة رقم (13) الخط الخلوي الطبيعي REF المعامل بالمستخلص L1 عند التركيز 1000 مايكرو غرام / ملليلتر	67
الصورة (14) الخط الخلوي الطبيعي REF المعامل بالمستخلص L2 عند التركيز 1000 مايكروغرام/مليلتر	68
الصورة (15) الخط الخلوي الطبيعيREFالمعامل بالمستخلص B1 عند التركيز 1000 مايكروغرام/مليلتر	68
الصورة (16) الخط الخلوي الطبيعي REF المعامل بالمستخلص B2 عند التركيز 1000 مايكروغرام/ مليلتر	68
صورة (17) عدم تأثير مستخلص L1 في الهيئة الكروموسومية للخلايا اللمفاوية للدم المحيطي في الانسان عند التركيز 1000 مايكروغرام / مليلتر	73
صورة (18) المستخلص L2 موضحاً الطور الانقسامي ومؤشراً الخلية المتحولة الارومية عند التركيز 1000	73
صورة (19) المستخلص B1 عند التركيز 1000 مايكروغرام / مليلتر	73

قائمة الاشكال

الشكل	الصفحة
الشكل (3–1) تأثير المستخلص L1 في نمو خلايا سرطان الحنجرة البشرية HEP-2 عند مدد التعريض الثلاثة	52
الشكل (3–2) تأثير المستخلص L2 في نمو خلايا سرطان الحنجرة البشرية HEP-2 عند مدد التعريض الثلاثة	53
الشكل (3–3) تأثير المستخلص B1 في الخط السرطاني HEP-2 ولثلاث مدد من التعريض	54
الشكل (3–4) التأثير التثبيطي للمستخلص B2 في الخط السرطاني HEP-2 ولثلاث مدد من التعريض	55
الشكل (3–5) التأثير التثبيطي للمستخلص L1 في الخط الخلوي السرطاني AMN-3 ولثلاث مدد من التعريض	59
الشكل (3–6) التأثير التثبيطي للمستخلص L2 في الخط الخلوي السرطاني AMN-3 ولثلاث مدد من التعريض	60
الشكل (3–7) التأثير التثبيطي للمستخلص B1 في الخط الخلوي السرطاني AMN-3 ولثلاث فترات من التعريض	61
الشكل (3–8) التأثير التثبيطي للمستخلص B2 في الخط الخلوي السرطاني AMN-3 ولثلاث مدد من التعريض	62
الشكل (3–9) تأثير المستخلصات الخام B2,B1,L2,L1 في لمدة التعريض 72 ساعة في الخط الطبيعي لجنين الجرذ REF	66

قائمة المختصرات

AML	Acute Myeloid Leukemia
AMN-3	Ahmed Mohammed – Nahi – 2003
B1	Water extract of *Salix* bark
B2	Ethanol extract of *Salix* bark
BCI	Breast Carcinoma
BI	Blastotic Index
CD8+	Cytotoxic T cell
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
HEP-2	Human Epidermoid Larynx Carcinoma
IBu	Ibuprofen
IL-2	Interleukin-2
L1	Water extract of *Salix* leaves
L2	Ethanol extract of *Salix* leaves
Mc Abs	Monoclonal Antibodies
MI	Mitotic Index
NSAID	Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCD	Programmed Cell Death
PHA	Phytohemoagglutinine
REF	Rat Embryo fibroblast
RAN	Ribonucleic acid

RPMI	Rosswell Park Memorial Institute
SFM	Serum Free Media
S-L80	Sarcomy – L80
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

الخلاصة

يعد هذا البحث دراسة استكشافية لفعالية مركبات الأيض الثانوي في مستخلصات نبات الصفصاف *Salix acmophylla* بشكلها الخام في التأثير في نمو الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي ، إضافة إلى دراسة تأثيرها في الخلايا اللمفاوية البشرية .

وتضمنت الدراسة تحضير مستخلصات جزئين رئيسين من النبات هما القلف والأوراق (Bark and Leaves) باستعمال نوعين من المذيبات (الماء المقطر والايثانول) ، وقد تباينت نسب المذيبات وكانت نسبة المستخلص المائي للاوراق L1 (20%) والمستخلص الايثانولي L2 (16%) ، أما المستخلص المائي للقلف B1 فكانت نسبته (6%) في حين كانت نسبة المستخلص الايثانولي B2 (4%) .

تم الكشف عن المركبات الفعالة للمستخلصات عن طريق استعمال الكواشف التمهيدية وكانت النتيجة احتواء النبات على الكلايكوسيدات ، التانينات ، السابونينات و الفلايفونويدات ولم تظهر مؤشرات لوجود القلويدات والتربين والستيرويد في النبات .

أختبرت فعالية المستخلصات الخام لنبات الصفصاف في الخطوط الخلوية السرطانية (HEP-2 & AMN-3) والخلايا الطبيعية (REF) بسبعة تراكيز مختلفة (1000, 500,250,125 ,62.5,31.25,15.6 مايكروغرام / مليلتر) . وضمن ثلاث مدد من التعريض (24 ،48 ، 72) ساعة ، و72 ساعة فقط عند الخط الخلوي الطبيعي لجنين الجرذ (REF) .

أظهرت النتائج وجود تأثير تثبيطي معنوي واضح للمستخلصات الخام في نمو الخلايا السرطانية لثلاث مدد من التعريض ، ووجد أنَ التأثير التثبيطي للمستخلصات يعتمد على التركيز ومدة التعريض ، في حين لم يكن هناك تأثير واضح وذو معنوية لنفس المستخلصات الخام في نمو الخلايا الطبيعية (REF) .

وكان المستخلص المائي أكفأ المستخلصات الخام تأثيراً في الخط الخلوي السرطاني (HEP-2) أما في الخط الخلوي السرطاني (AMN-3) فقد كان مستخلص الايثانول هو الأكفأ ولم تكن هناك فروق معنوية واضحة عند المقارنة بين مستخلصات القلف ومستخلصات الأوراق .

من ناحية أخرى جرى أختبار الفعالية المثبطة للنمو لكل من مستخلصات قلف وأوراق نبات الصفصاف على الخلايا اللمفاوية الطبيعية للتراكيز السبعة نفسها من خلال حساب نسب معامل الانقسام الخيطي (Mitotic Index) ومعامل التحول الارومي Blastotic (Index) حيث أظهرت المستخلصات L1 , L2 , B1 , B2 تأثيراً لم يصل لدرجة المعنوية في معامل الانقسام الخيطي (MI) ومعامل التحول الارومي (BI) عند التراكيز الواطئة وأظهرت التراكيز العالية فرقاً معنوياً عند المقارنة مع السيطرة .

وأستخدمت التراكيز نفسها لمعرفة إمكانية عمل هذه المستخلصات بوصفها مواد مشطرة أو مواد موقفة للانقسام الخيطي ولم تظهر التجربة أية فروق معنوية في كلتا الحالتين .

الفصل الأول

استعراض المراجع

Literature Review

المقدمة

كان السرطان وما يزال من المشاكل الصحية الرئيسة التي تواجه العالم ومن الأمراض الخطيرة التي تفتك بحياة الآلاف من الأرواح كل عام ، ففي عام 2000 بلغت نسبة الوفيات بسبب السرطان خلال العالم ما يقارب أكثر من 10 مليون حالة وفاة (Greenlee *et al.* , 2001) ، ومن المتوقع أن تكون مجموع النسبة بين عامي 2000 و2020 هي 73% في العالم المتطور و 29% في الدول النامية (World Health Organization , 2005) .

الأمر الذي دفع الباحثين للاهتمام بهذا المرض ومحاولة إيجاد العلاج له ، موجهين اهتمامهم إلى الطب البديل واستخدام الأعشاب الطبية نظراً لما تتركه بعض العلاجات المصنعة كيميائياً من تأثيرات جانبية قد تعود سلباً على صحة المريض (Sid , 2002) فدأبوا يبحثون عن حلول لمواجهة هذا المرض بأقل قدر ممكن من الأعراض الجانبية . إذ لم تستطع العلاجات التقليدية المتوفرة من وضع حد لسطوة مرض السرطان ولم تعطِ القناعة التامة بجدواه للطبيب أو المريض على حد سواء لذلك كان التوجه لاستخدام مستخلصات الأعشاب لاحتواء النبات على مواد طبيعية قد تؤدي إلى الخلاص من المرض (Leslie , 2000) .

استخدمت الأعشاب بوصفها غذاءً ودواءً منذ بدء الخليقة وتركزت الدراسات حول الأعشاب التي لها خاصية تخفيض الدهون أو منع التخثر أو إنها تعمل كمضادات للسرطان أو محفزات للجهاز المناعي (Craig , 1997) والتي قد تكون مهمة بوصفها مساعدات لتقليل خطر الإصابة بإمراض القلب والأوعية الدموية والسرطانات (Liu , 2000) . افتتح معهد الصحة الوطني في أمريكا مكتبة الطب البديل سنة 1993 ليوفر الدعم لتقييم الباحثين الراغبين بالدراسة المنتظمة للعلاجات غير المتداولة وكانت النتائج طبقا لدراسة أجريت عام 1993 (Eisenberg *et al.*, 1993) أنَ حوالي واحد من ثلاثة على الأقل في أمريكا يستخدمون هذا النوع من العلاجات خلال سنة ، ومعظم هؤلاء يستخدم العلاج للأمراض المزمنة .

ولكون السرطان من الأمراض الأكثر خطورة على الإنسان لذلك فان البحث في إيجاد علاج له كان له الأولوية لدى الباحثين في معهد السرطان الوطني الأمريكي (NCI) National Cancer Institute (Gragg *et al.* , 1993) من خلال إيجاد أدوية جديدة من مواد كيميائية فعالة مشتقة من النباتات كدواء Vinblastine المستخلص من نبات عين البزون *Catharanthus roseus* المستخدم في علاج عدة أشكال من ابيضاض الدم Leukemia إذ وصلت نسبة نجاحه في علاج مرض ابيضاض الدم عند الأطفال إلى 80 % وكذلك دواء الـ Vinecristine المضاد لابيضاض الدم أيضا (Kong *et al.* , 2003) .

وكان عدد من النباتات يعطي دوائين قلويديين مهمين هما الـ Topotecan المستخدم في علاج سرطان المبايض وسرطان الرئة Ovarian and Small cell lung cancers والدواء Irinotecan المستخدم في علاج سرطان القولون Colorectal cancer ومن الشجرة ذاتها *Camptotheca acuminate* في الصين (2000 , Leslie) . ولوضع لبنة أخرى في استخدام النباتات كمصدر للمواد الفعالة ضد السرطان كان للأبحاث الجارية في العراق نصيبٌ من هذه الاكتشافات حيث أُثبت الأثر التثبيطي للمستخلصات المائية لبوليفينولات وتربينات الشاي الأخضر والأسود في عدد من الخطوط الخلوية السرطانية (Sa'eed , 2004) . والمستخلص المائي والكحولي لعشب السعد *Cyperus rotundus* والأثر السمي لتلك الخلايا (الحلي ، 2004) . وتعدى ذلك إلى استخدام المستخلصات في تثبيط الأثر السمي الوراثي لبعض العقاقير (حسن ، 2002) ، إضافة إلى تثبيط مستخلص نبات السالفيا *Salvia triloba* لعدد من الخطوط الخلوية السرطانية ، ويعد هذا النبات شراباً معروفاً لدى الكثير من البلدان العربية (Ibrahim , 2005) أما بذور ثمار الهيل *Eletteria cardamom* فقد درس أثرها التثبيطي لخط سرطان الحنجرة Human larynx carcinoma وسرطان العضلة البشرية Human rhabdomyosarcoma باستخدام مستخلصها الايثانولي والهكساني (اليعقوبي ، 2004) .

ولقد أشتمل تاريخ الطب على آلاف من أنواع النباتات التي يعد (الصفصاف) عنصراً مهماً فيها والذي من المحتمل انه استخدم أو وصف أكثر من أي دواء آخر (Chrubasik , 2000) . ويعد الصفصاف المصدر الأصلي للأسبرين حتى اليوم ، رغم وفرة بدائل الأسبرين (Patrono , 1994) .

يعتبر ***Salix acmophylla*** احد النباتات الطبية التي تمتلك العديد من الاستطبابات كونه مقوٍ عام ويستخدم لعلاج الروماتزم والأمراض الجلدية وخاصة الفطرية والأمراض الفايروسية ، وخافض للحرارة وضغط الدم المرتفع ، ومنشط لعمل الكلى ، (Bown , 1995) . إضافة إلى ما أثبتته الدراسات الحديثة في علاج احد أنواعه لأنواع من السرطانات ومنها دراسة في استخدام المستخلص المائي لأوراقه في علاج ابيضاض الدم النخاعيني الحاد (AML) acute myeloid leukemia (EL-Shemy *et al* ., 2003) .

ومن اجل تلك الخواص وأهميتها وضعت البرامج والاستراتيجيات لإجراء مسح أولي لفعالية المركبات الموجودة في النباتات والأعشاب الطبية ضد الخلايا السرطانية عن طريق تحضير مستخلصات خام لتلك النباتات والأعشاب ودراسة التأثير التثبيطي أو السمي لتلك المستخلصات (Sid , 2002). وانتخب مستخلص نبات الصفصاف في الدراسة الحالية وتأثيره في نمو الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي والخلايا اللمفاوية للدم المحيطي في الإنسان للكشف عن فاعليته ضد الخلايا السرطانية لذلك هدفت هذه الدراسة إلى:-

1- الحصول على المستخلص الخام من أوراق و قلف نبات الصفصاف باستخدام نوعين من المذيبات (المائي والايثانولي) .

2- دراسة تأثير هذه المستخلصات في نمو الخلايا السرطانية للخطوط **HEP-2** و **AMN-3** والخط الطبيعي **REF** .

3- دراسة تأثير المستخلصات في الخلايا اللمفاوية للدم المحيطي في الإنسان .

الفصل الثاني

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

المواد وطرائق العمل

صورة (1) نبات الصفصاف (القلف والأوراق)

2-1 الأجهزة والمواد

2-1-1 الأجهزة والأدوات المستخدمة في الدراسة

استخدمت الأجهزة والأدوات كما موضح في الجدول(2-1)

جدول (2-1) الأجهزة والأدوات المستخدمة في الدراسة :

اسم الجهاز	الشركة المجهزة	المنشأ
سوكسليت Soxhlet	Quick fit	U.K
المبخر الدوار Rotary evaporator	Orem Scientific Ltd	Swiss
الألايزا ELISA	Organon techniqa	Germany
حمام مائي Water bath	Precisterm	Germany
ميزان حساس Sensitive balance	Precisa	Switzerland
حاضنة مبردة Cooled incubator	Gallenkamp	U.K
كابينة معقمة Laminar air flow hood	Gelaire class 100 gelman instrument	U.K
جهازالطردالمركزي Centrifuge	Universal 16A	Germany
فرن Oven	Gallenkamp	U.K
مجهر ضوئي مقلوب Inverted microscope	Opton	Germany
مجهر ضوئي Light microscope	Olympus	Japan
مازج Mixer	Retsch	Germany
المحراك المغناطيسي مع صفيحة ساخنة Magnetic stirrer with hot plat	Gallenkamp	U.K
جهاز تعقيم(موصدة) Autoclave	Arnold & Sories	England

المنشأ	الشركة المجهزة	اسم الجهاز
Germany	Kottermann	جهاز تقطير Distiller
U.K	Gallenkamp	مقياس الرقم الهيدروجيني PH-meter
Denmark	Nunc	أنابيب بلاستيكية نبيذة حجم(10مليلتر) Disp. Centrifuge tube
Denmark	Nunc	ماصات نبيذة مختلفة الأحجام Disp. Pipette
Denmark	Nunc	فلتر تعقيم 0.22 µ
Denmark	Nunc	فلتر تعقيم 0.4 µ
U.K	Flow lab., Irvine	أطباق الزرع النسيجي متعدد الحفر ذو 96 حفرة مسطحة Microtiter plate for tissue culture with 96 flat bottom wells
U.S.A	Falcon	قناني بلاستيكية للزرع النسيجي حجم 25 سم2 Plastic bottles for tissue culture 25 cm
Germany	Gold star	شرائح زجاجية Slides
England	Volac	زجاجيات مختلفة Pyrex

2-1-2 المواد الكيميائية Chemicals

أستعملت المواد الكيميائية في هذه الدراسة بدرجة عالية من النقاوة كما هو موضح في الجدول (2–2) .

جدول (2–2) المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة

المادة الكيميائية	الشركة المجهزة	المنشأ
بيكاربونات الصوديوم Sodium bicarbonate	BDH	England
التربسين Trypsin	Sigma	USA
حامض الخليك الثلجي Glacial acetic acid	Sigma	USA
حامض الخليك اللامائي Acetic anhydride	BDH	England
حامض الكبريتيك المركز Sulfuric acid	BDH	England
حامض الكروميك Chromic acid	Sigma	USA
حامض الهيدروكلوريك Hydrochloric acid	BDH	England
صبغة البنفسج البلوري Crystal violet	Sigma	USA
صبغة كمزا Giemsa stain	BDH	England
الفرسين Versine	BDH	England
فوسفات البوتاسيوم الهيدروجينية KH_2PO_4	BDH	England
فوسفات الصوديوم الهيدروجينية Na_2HPO_4	BDH	England
كبريتات النحاس Copper sulfate	Fluka	Switzerland
فورمالديهايد Formaldehyde	Fluka	Switzerland
كحول اثيلي مطلق Absolute ethanol	BDH	England
كحول مثيلي مطلق Absolute methanol	BDH	England
كلوروفورم Chloroform	BDH	England
كلوريد البوتاسيوم Potassium chloride	BDH	England
كلوريد الحديديك Ferric chloride	BDH	England
كلوريد الزئبقيك Mercuric chloride	BDH	England
كلوريد الصوديوم Sodium chloride	BDH	England
كولجسين Colchicine	Eipico	Egypt
ملح روشيل Roshail	Serva	Germany
ملزن دموي نباتي Phytohemoagglutinine PHA	Iraq center for cancer and genetic research	Iraq
مصل العجل البقري Bovine calf serum	Iraq center for cancer and genetic research	Iraq
المضاد الحيوي Benzyl Penicillin	Samara factory	Iraq
المضاد الحيوي Streptomycyin	Samara factory	Iraq
نترات البزموث Bismuth nitrate	BDH	England
الهيبارين Heparin	Leo	England
هيدروكسيد البوتاسيوم Potassium hydroxide	Fluka	Switzerland
هيدروكسيد الصوديوم Sodium hydroxide	BDH	England
الوسط الزرعي RPMI -1640 Rosswell Park Memorial Institute -1640	Sigma	USA
يوديد البوتاسيوم Potassium iodide	BDH	England

2-1-3 المحاليل المستخدمة في الدراسة

2-1-3-1 المذيبات المستخدمة في الاستخلاص Solvents used in extraction

- ماء مقطر distilled water
- كحول ايثانول 80 % ethanol

2-1-3-2 المواد الخاصة بالكشف الكيميائي التمهيدي عن المركبات الفعالة في المستخلصات النباتية

تستعمل الكواشف التمهيدية والترسيبية لتحديد نوعية المركبات الثانوية في المستخلصات المائية والكحولية :-

1- كشف التانينات Test of Tannins

وهو عبارة عن محلول كلوريد الحديديك بتركيز 1% ، حضر هذا المحلول بإذابة 1غرام من $Fecl_2$ في 100 مليلترمن الماء المقطر واستدل على ايجابية الفحص بإعطاء هذا الكاشف لونا اخضر مزرقاً عند مزجه مع كمية متساوية من المستخلص النباتي . يستعمل للكشف عن وجود التانينات والفينولات (Harborn , 1984) .

2- الكشف عن الكلايكوسيدات Test for Glycosides

اتبعت طريقة(Shihata , 1951) إذ مزج جزءان متساويان من كاشف فهلنك والمستخلص النباتي ، ثم ترك في حمام مائي مغلي لمدة (10) دقائق ، واستدل على ايجابية الفحص من خلال ظهور اللون الأحمر. أما كاشف فهلنك فقد حضر من محلول (أ) بإذابة (35 غرام) من كبريتات النحاس في(100مليلتر) ماء مقطر ، وخفف المحلول الناتج بالماء المقطر لغاية (500 مليلتر) ، أما محلول (ب) الذي حضر بإذابة (7 غرام) من هيدروكسيد الصوديوم و (175 غرام) من ملح روشيل في (100 مليلتر) من الماء المقطر ، وأكمل الحجم إلى (500 مليلتر) بالماء المقطر . وعند الاستعمال يتم مزج حجوم متساوية من المحلولين (أ و ب).

3- الكشف عن السابونينات Test for Saponins

a- كاشف الرغوة

رجت قنينة محكمة الغلق تحوي مستخلصا مائياً أو كحولياً للنبات ، وعند ظهور رغوة كثيفة فوق سطح المستخلص يكون ذلك إشارة إلى نتيجة موجبة (Harborne , 1984) .

b- كاشف كلوريد الزئبقيك Mercuric chloride

يستدل في هذا الكاشف على وجود السابونينات . إذ أضيف 1-2 مليلتر من 1% كلوريد الزئبقيك (الذي حضر بإذابة 1 غرام من كلوريد الزئبقيك في 100 مليلتر من الماء المقطر) في 5 مليلتر من المستخلص المائي وظهور راسب ابيض عد دليل على وجود السابونينات (Harborne , 1973) .

4- الكشف عن الفلافونويدات Test for Flavonoid

حضر بإضافة 4 مليلتر من الايثانول 95 % الى 1 مليلتر من المستخلص ثم ترك في حمام مائي بدرجة الغليان لمدة 25-30 دقيقة . ثم بعد ذلك أضيف إلى 5 مليلتر من النموذج قطرات من (50%) من هيدروكسيد البوتاسيوم Potassium hydroxid . وظهور اللون الأصفر دلالة على وجود الفلافونويدات (الشحات ، 1986) .

5- الكشف عن القلويدات Test for Alkaloids

a- كاشف دراكندروف Dragendroff`'s reagent

حضر هذا الكاشف باستخدام المحلولين 1 و 2 :-

1- تم إذابة (0.6) غرام من نترات البزموث (Bismuth nitrate) وأضيف إلى (2) مليلتر من حامض الهيدروكلوريك المركز و(10) مليلتر من الماء المقطر .

2- اخذ (6) غرام من ايوديد البوتاسيوم Potassium iodide وأضيف إلى (10) مليلتر من الماء المقطر .

مزج المحلولان 1 و2 وأضيف اليهما (7) مليلتر من حامض الهيدروكلوريك المركز و(15) مليلتر من الماء المقطر ثم أكمل المحلول النهائي بإضافة الماء المقطر ليصبح حجمه (400) مليلتر ، يعطي هذا الاختبار لونا برتقاليا عند مزجه مع كمية متساوية من المستخلص الحاوي على القلويدات (Harborne , 1973) .

b- كاشف ماير Mayer's reagent للقلويدات

حضر هذا الكاشف باستخدام المحلولين 1 و2 :-

1- تم إذابة (1.36) غرام من كلوريد الزئبقيك $HgCl_2$ في (60) مليلتر ماء مقطر .

2- إذابة 5 غرام من ايوديد البوتاسيوم KI في 10 مليلتر ماء مقطر .

مزج المحلولان 1 و2 ثم أُكمل الحجم إلى 100 مليلتر بالماء المقطر ، يستعمل للكشف عن القلويدات بمزجه مع كمية مساوية له من المستخلص (Sousek *et al.*, 1999) .

6- **الكشف عن التربين Terpenes والستيرويد Steroids**

أذيب 1 غرام من المستخلص الايثانولي في قليل من الكلوروفورم ويضاف إليه قطرة من حامض الخليك اللامائي Acetic anhydride ، ثم تضاف قطرة من حامض الكبريتيك المركز ، يتكون لون بني دليل على احتواء المستخلص على التربين واذا تكون بعد فترة لون أزرق داكن فذلك يعني احتواء المستخلص على الستيرويد (AL-Abid , 1985).

2-1-3-3 **المحاليل الخاصة بالزرع النسيجي الأساسي والزرع الثانوي**

Stock solutions used for tissue culture and subculture

- **الوسط الزرعي (RPMI-1640) Rosswell Park Memorial Institute**

RPMI-1640 with hepes buffer, L-glutamin	10.4 غرام
Sodium bicarbonat (4.4%)	15 مليلتر
بيكاربونات الصوديوم لتعديل الأس الهيدروجيني إلى 7.2	
Crystalline penicillin	0.5 مليلتر
Streptomycin	0.5 مليلتر
Bovin calf serum	100 مليلتر

اكمـل المحلـول إلى لتر بإضافة الماء المقطر ، ثم عقم بمرشح ذو ثقوب بقطر (0.22) مايكرون .

• **المضادات الحيوية Antibiotics**

أ- محلول البنسلين penicillin solution الحاوية على 1 غرام بنسلين في 5 مليلتر من الماء المقطر ، ثم اخذ منه 0.5 مليلتر ، وأضيف إلى لتر واحد من الوسط الزرعي وحفظ الباقي منه في درجة حرارة -20مه.

b- محلـــول الستريبتومايســـين streptomycin solution الحـــاوي علـــى 1 غـــرام ستريبتومايسين في 5 مليلتر من الماء المقطر ليكون التركيز النهائي 200 ملغم / مليلتر، ثم اخذ منه 0.5 مليلتر وأضيف إلى لتر واحد من الوسط الزرعي وحفظ الباقي منه في درجة حرارة -20 مه .

• **محلول بيكاربونات الصوديوم Sodium bicarbonate**

حضر محلول بيكاربونات الصوديوم الخزين بإذابة 4.4 غرام من بيكاربونات الصوديوم في 100 مليلتر من الماء المقطر المعقم ليكون التركيز النهائي 44 ملغم / مليلتر عقم بالموصـــدة بدرجة حرارة 121 مه لمدة 15 دقيقة ، ثم حفظ في درجة حرارة 4 مه لحين الاستعمال.

• **محلول دارئ الفوسفات الملحي (PBS) phosphate buffer saline saline**

NaCL	8 غرام
KCL	0.20 غرام
Na_2HPO_4	0.92 غرام
KH_2PO_4	0.20 غرام
D.W.	100 مليلتر

عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 مه لمدة 15 دقيقة ، ثم حفظ في درجة حرارة 4 مه لحين الاستعمال .

• **صبغة البنفسج البلوري Crystal Violet**

أذيب 5 غرام من الصبغة في 200 مليلتر من كحول الميثانول المطلق ثم تم ترشيحه بورق واتمان رقم 1 ، ثم اضيف للراشح 50 مليلتراً من الفورمالديهايد ذي تركيز 37% وأُكمل الحجم بالماء المقطر الى 1 لتر (Mather and Roberts , 1998) .

• **محلول التربسين – فرسين Trypsin-Versene solution**

وحضر بمزج :-

Trypsin solution	20 مليلتر
Versene solution	10 مليلتر
PBS	370 مليلتر

مزج قبل الاستعمال في ظروف معقمة (الكابينة المعقمة) وحفظ في 4 مه .

a- **محلول التربسين Trypsin**

حضر بإذابة 1 غرام من مسحوق التربسين في 100 مليلتر من PBS ويمزج جيدا بالمازج المغناطيسي في درجة حرارة الغرفة . ثم يعقم بالترشيح باستعمال نالجين فلتر 0.22 مايكرون وحفظ بدرجة حرارة –20 مه لحين الاستعمال .

b- **الفرسين Versene**

أضيف 1 غرام من مسحوق Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid (EDTA) إلى 100 مليلير من الماء المقطر وأذيب جيدا ثم عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 مه لمدة 10 دقائق وحفظ في درجة حرارة 4 مه لحين الاستعمال .

• **المصل Serum**

مصل العجل البقري Bovine Calf serum المحضر في المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية والمثبط في درجة حرارة 56 مه لمدة 30 دقيقة .

4-3-1-2 المحاليل الخاصة بدراسة تأثير المستخلصات الخام في نمو الخطوط الخلوية السرطانية

Stock solutions used for studing the effect of crud extracts on cancer cell line

• **الوسط الزرعي RPMI-1640**

المحضر في الفقرة (2-1-3-3) ولكن بدون إضافة مصل عجل البقر ويسمى هذا **الوسط الخالي من المصل** (SFM) Serum Free Media .

• **صبغة البنفسج البلوري Crystal Violet**

كما محضرة في الفقرة (2-1-3-3) .

-1-2

5-3 المحاليل الخاصة بدراسة تأثير المستخلصات الخام في انقسام الخلايا اللمفاوية البشرية خارج الجسم الحي

Stock solutions for studing the effect of crud extracts on lymphocyte divition (in vitro)

• **الوسط الزرعي RPMI-1640**

المحضر في الفقرة (2-1-3-4) Serum free media

• **بلازما الدم البشري Human Plasma**

أستخدم بلازما الدم البشري Human Plasma من مجموعة +AB بعد إجراء عملية تثبيط للعامل المتمم Complement factor بوضعها في حمام مائي بدرجة (56) مه ولمدة نصف ساعة . وقد أخذ من أشخاص متبرعين .

• **المادة المحفزة للانقسام (PHA) Phytohemoagglutinine**

تم توفيره من المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية .

• **الكولجسين Colchicine**

المحضر بإذابة 4.5 غرام من مسحوق الكولجسين في 10 مليلتر من الماء المقطر وحفظ في درجة −20مه .

• **محلول كلوريد الصوديوم واطئ التوتر Potssuim Chloride (0.075 M) KCL Hypotonic Solution**

حضر محلول واطئ التوتر لكلوريد الصوديوم بإذابة 1.1175 غرام من KCL في 200 مليلتر من الماء المقطر ، وحفظ بدرجة حرارة 4 مه لحين الاستعمال على أن لاتزيد مدة حفظه على أربعة أيام . استعمل بحالة دافئة بدرجة حرارة 37مه .

• **المثبت Fixative**

أستخدم هذا المحلول طازجاً وحضر بالمزج الآني للميثانول المطلق مع حامض الخليك الثلجي (Glacial acetic acid) بنسبة 1:3 (حجم / حجم) .

• **دارئ سورنسن Sorenson 's buffer**

تم تحضير هذا المحلول بإذابة 7.08 غرام من مادة Na_2HPO_4 مع 6.74 غرام من KH_2PO_4 في لتر من الماء المقطر وحفظ في درجة حرارة 4 مه لحين الاستعمال .

• **صبغة كمزا Giemsa stain**

حضر المحلول الخزين (stock solution) بإذابة 2 غرام من مسحوق **صبغة كمزا** في 100 مليلتر من كحول الميثانول ، يمزج جيدا بجهاز الخلط المغناطيسي magnetic stirrer في درجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين . يرشح بورق ترشيح Watman ويحفظ في قنينة محكمة الغلق ومعتمة ، وعند صبغ الشرائح الزجاجية أخذ 1 مليلتر من المحلول الخزين وأضيف إليه 4 مليلتر من محلول دارئ سورنسن واستعمل آنياً .

2-2 الخطوط الخلوية Cell lines :

a- الخط الخلوي السرطاني (Hep-2)

Human epidermoid larynx carcinoma

أستعمل هذا الخط عند التمريرة (218)، وهو خلايا سرطان الحنجرة لرجل يبلغ من العمر 57 سنة (Toolan , 1954 ; Moore *et al.* , 1955) ، وهذا الخط تم تطبيعه للنمو على وسط RPMI-1640 المجهز بـ 10% مصل العجل البقري في المركز العراقية لبحوث السرطان والوراثة الطبية ، وعند تكون الطبقة الأحادية الكاملة (Confluent monolayer) ، تـم معاملـة الخلايـا بمحلـول التربسـين / فرسـين وذلـك لتهيئـة المزرعـة الثانويـة (subculture) .

b- الخط الخلوي السرطاني (AMN)

Ahmed-Mohammed-Nahi-2003

تم تسلم هذا الخط عند التمريرة رقم (46) ، وهو سرطان الغدة اللبنية Mammary adenocarcinoma) (لإناث فئران نوع Balb/c المصابة بسرطان الغدة اللبنية التلقائي (In-vivo.Spontaneous mammary adenocarcinoma).

لقد تم استحداث هذا الخط الخلوي السرطاني من قبل (الشمري ، 2003) في المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية ، نُمّي هذا الخط على وسط RPMI-1640 مجهز بـ 10% مصل العجل البقري ، وعند تكوين الطبقة الأحادية الكاملة (Confluent Monolayer) ، عوملت الخلايا بمحلول التربسين / فرسين لتقسيمها إلى مزرعة ثانوية أخرى (subculture) .

c- الخط الخلوي الطبيعي لجنين الجرذ (REF)
Rat Embryo fibroblast cell line

تعد المزرعة الطبيعية لجنين الجرذ من المصادر الأساسية والمهمة التي تقدم مزرعة من الخلايا الطبيعية غير المتمايزة (Undifferentiated fibroblastic culture) .

استعملت خلايا (REF) عند التمريرة رقم (18) المأخوذة من المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية ، إذ جرى استحداث هذا الخط الخلوي خارج الجسم الحي بعد إخراج أجنة الفار من رحم ألام الحامل ومن ثم التخلص من محتويات بطن كل جنين تحت ظروف معقمة ، هرست الأجنة بعد ذلك باستخدام إنزيم التربسين وفي النهاية نقلت الخلايا إلى قناني الزرع النسيجي المعقمة بعد إضافة الوسط الغذائي لها والذي يبلغ تركيز مصل عجل البقر فيه 20% ، وعند تكون الطبقة الأحادية الكاملة (Confluent Monolayer) ، عوملت الخلايا بمحلول التربسين / فرسين لتقسيمها إلى مزرعة ثانوية اخرى (subculture) .

3-2 طرائق العمل

1-3-2 جمع وتحضير النبات Plant Collection and Preparation

تم جمع نبات الصفصاف *Salix acmophylla* Boiss في منطقة عون التابعة لمحافظة كربلاء ، حيث تم جمع العينات مع بدء فصل الربيع وتحديدا بين شهر نيسان وأواخر آيار ، صّنف النبات من قبل أستاذ علم التصنيف الدكتور علي حسين عيسى الموسوي في قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة بغداد الذي أكد إن جنس النبات ونوعه هو *Salix acmophylla* Boiss . فصلت الأوراق من الأفرع والقلف (leaves and bark)عن باقي أجزاء النبات ونظفت وغسلت ثم جففت في الظل بعيدا عن أشعة الشمس بدرجة حرارة الغرفة مع التقليب المستمر لمنع تعفنها وبعدها طحنت النماذج النباتية الجافة طحنا خشنا بواسطة مطحنة كهربائية ، ثم حفظت الأجزاء المطحونة في

قناني بلاستيكية نظيفة ذات غطاء محكم بعيدا عن الضوء والحرارة والرطوبة لحين الاستعمال ودّون عليها اسم النبات والجزء النباتي المستخدم .

2-3-2 تحضير المستخلصات الخام لنبات الصفصاف
Preparation of Crude Extracts of *Salix acmophylla*

2-3-2-1 تحضير المستخلص المائي الخام لأوراق وقلف نبات الصفصاف

لغرض الحصول على مستخلص الماء البارد الخام لأوراق وقلف الصفصاف تم اتباع طريقة Abu-Ghdeib and Shtayeh (1999) مع إجراء بعض التحويرات وعلى النحو التالي :-

- وضع 50 غرام من مسحوق أوراق الصفصاف في دورق حجمي سعة لتر .
- أضيف إليه 500 مليلتر من الماء المقطر وأغلقت الفتحة بواسطة parafilm .
- وضع الدورق على سخان صفيحي مغناطيسي Magnetic stirrer وترك ليمتزج جيدا بواسطة مازج مغناطيسي وبدرجة حرارة الغرفة .
- بعد 72 ساعة رشح المحلول باستعمال الشاش الطبي أولا ثم بورق الترشيح Wattman رقم 1 .
- وزع الراشح في أنابيب النبذ المركزي بسرعة (300 دورة / دقيقة) لمدة 10 دقائق
- أهمل الراسب وأخذ الرائق إلى جهاز المبخر الدوار Rotary evaporator لغرض تركيزه ومن ثم وزن المستخلص الخام الناتج .
- أعيدت التجربة باستبدال مسحوق أوراق الصفصاف بدلاً من قلف الصفصاف للحصول على مستخلصه المائي الخام وبذات الآلية .

2-2-3-2 تحضير المستخلص الكحولي الخام (الايثانولي) لاوراق وقلف الصفصاف

أتبعت خطوات تحضير المستخلص الخام في الفقرة (2-3-2-1) للحصول على مستخلص نباتي جاف ، وقد استخدم الكحول الاثيلي بتركيز 80% بدلا من الماء المقطر ولكل من الأوراق والقلف (Anessiny and Perez , 1993) .

2-3-3 الإدامة والمحافظة على الخطوط الخلوية السرطانية

Maintenance of cancer cell lines

تمت إدامة الخطوط الخلوية السرطانية بملاحظة هذه الخلايا وعند تكوينها لطبقة أحادية كاملة (Confluent monolayer) تم إجراء المزرعة الثانوية (Subculture) ابتداءً بالتخلص من وسط النمو القديم ، ثم أضيف 2 مليلتر من محلول التربسين – فرسين المحضر في الفقرة (2-1-3-3) إلى القنينة الحاوية على الخلايا السرطانية مع تحريك القنينة برفق ، بعدها تم التخلص من التربسين ، ثم حضنت الخلايا في درجة 37 مه لمدة 15 دقيقة لحين انفصال الخلايا الملتصقة من القنينة ، ثم أضيف إلى القنينة الحاوية على الخلايا المفككة حوالي 15 مليلتر من وسط النمو الجديد المحضر في الفقرة (2-1-3-3) وأعيد توزيعها في قنينة زرع أخرى جديدة بحيث يكون مستوى الوسط الزرعي مع الخلايا متساوياً بين القنينتين وحفظت في درجة حرارة 37 مه .

2-3-4 دراسة تأثير المستخلصات الخام لنبات الصفصاف في نمو الخطوط الخلوية السرطانية Study the effect of crude extract on cancer cell lines

2-3-4-1 تهيئة الوسط الزرعي وخطوط الخلايا

Preparation of medium and cancer cell lines

تم تهيئة الوسط الزرعي وفقا لـ , Freshney (2000) بخلط مكوناته مع بعضها البعض لتحضير لتر منه (2-1-3-3) ، ومن ثم عقمت باستعمال مرشح ذي ثقوب بقطر

0.4 مايكرون ثم بقطر 0.22 مايكرون لضمان تعقيمه ، وزع الوسط الزرعي في قناني زجاجية ذات غطاء محكم سعة 200 مليلتر وحفظت القناني بدرجة −20 مه لحين الاستعمال .

a- تمت تنمية الخطوط الخلوية السرطانية (AMN-3 , Hep-2) والخط الخلوي لجنين الجرذ (REF) في قناني الزرع النسيجي بسعة 25 سم٢ وذلك بعمل كل ما تحتاجه تنمية الخطوط من عمل مزارع ثانوية كما في الفقرة (2−3−3) ، أو تغيير الوسط (change media) عندما تستهلك الخلايا الوسط الذي نُميت فيه ويتم ذلك بالتخلص من الوسط القديم عندما يلاحظ تغير لون الوسط ثم إضافة الوسط الجديد بحوالي 5 مليلتر .

b- أضيف 2 مليلتر من محلول التربسين / فرسين المحضر في الفقرة (2−1−3−3) إلى قنينة الزرع النسيجي حجم 25 سم2 الحاوية على الخلايا (الأنواع الثلاثة) بعد تفريغها من الوسط الزرعي القديم ، ثم حركت القنينة برفق بعدها تم التخلص من التربسين وحضنت في حاضنة بدرجة حرارة 37 مه لمدة 15 دقيقة لتفكيك الخلايا الملتصقة وكذلك خلخلة التصاقها بجدار القنينة للحصول قدر الامكان على خلايا أحادية مفردة .

c- أضيف إلى القنينة الحاوية على الخلايا المفككة حوالي 15 مليلتر من وسط النمو الجديد (RPMI-1640) المحضر في الفقرة (2−1−3−3) وتم تحريك القنينة جيدا وبعدها أفرغت محتويات القنينة الحاوية على الوسط الغذائي الجديد مع الخلايا إلى قنينة أخرى جديدة بحيث يكون مستوى الوسط الزرعي مع الخلايا متساوياً بين القنينتين أي كل قنينة وضع فيها نفس الحجم تقريبا من الوسط الزرعي مع الخلايا ، وتسمى هذه العملية بالمزرعة الثانوية (Subculture) .

d- حضنت القناني بدرجة حرارة 37 مه لمدة يومين بالنسبة للـ Hep-2 وخمسة أيام للـ AMN-3 (الطبيعة اللوغارتمية لنمو الخلايا) (فريق عمل المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية) ، بعد إن كتب عليها معلومات كاملة عن نوع الخلايا ورقم التمريرة الجديدة (New Passage) وتاريخ إجراء المزرعة الثانوية (Subculture) ، وتم متابعة القناني يوميا للتأكد من خلوها من أي تلوث وان الخلايا

بحالة جيدة وذلك بفحصها بواسطة المجهر المقلوب Inverted microscope . وعندما يصبح النمو داخل القنينة جيداً فأن الخلايا تكون بذلك جاهزة للاستعمال .

2-4-3-2 اختبار سمية المستخلصات الخام لنبات الصفصاف على نمو الخطوط الخلوية السرطانية

Cytotoxic assay of *S. acmophylla* crud extracts on cancer cell line

حضر على وفق طريقة Abdul- Majeed (2000) ; Mahony (1989) كل من المستخلص المائي والايثانولي عن طريق إذابة 0.2 غرام من المستخلص الخام في 10مليلتر من المذيب (PBS) المحضر في الفقرة (2-1-3-3) الذي عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 مه لمدة 15 دقيقة في ظروف معقمة .

تم الحصول على أربعة من المستخلصات (المائي والايثانولي) لجزئين من النبات (القلف والاوراق) L_1 , L_2 , B_1 , B_2 . عقمت المستخلصات الأربعة باستعمال مرشح ذي ثقوب بقطر 0.4 ثم بقطر 0.22 مايكرون وحضرت من كل مستخلص سبعة تراكيز بشكل ثنائي وهي 15.62 , 31.25 , 62.5 , 125 , 250 , 500 , 1000 مايكروغرام /مليلتر وتحت ظروف معقمة . استخدمت جميع التراكيز المحضرة مباشرة بعد إكمال عملية التحضير .

a- جهز عالق الخلايا عن طريق معاملة قنينة الزرع النسيجي حجم 25 سم^2 بمحلول التربسين / فرسين بعد تفريغ الوسط الزرعي القديم وتحريك القنينة برفق ثم حضنت في الحاضنة 37 مْ لمدة 15 دقيقة ثم أضيف إليه 20 مليلتر من الوسط الزرعي الخالي من المصل (SFM) المحضر في الفقرة (2-1-3-4) . تم مزج عالق الخلايا جيدا وتم نقل 0.2 مليلتر بعد كل مزجة جيدة إلى حفر طبق معايرة الزرع النسيجي ذي القعر المسطح Microtiter plate for tissue culture باستعمال ماصة أوتوماتيكية دقيقة .

b- ترك الطبق في الحاضنة بدرجة حرارة 37 مه لمدة 24 ساعة إلى حين التصاق الخلايا في الحفرة وبعدها تم التخلص من الوسط الزرعي القديم في الحفر وتم إضافة 0.2 مليلتر من التراكيز المحضرة سابقا لكل من المستخلص (المائي والايثانولي) وبواقع

ثلاثة مكررات لكل تركيز . إضافة إلى انه تم عمل مكررين للسيطرة (خلايا فقط) وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 مه في حاضنة مزودة بـ 5% من غاز ثاني اوكسيد الكاربون .

c- بعد مرور مدة التعريض (Exposure time) المحددة للحضن ، اخرج الطبق من الحاضنة وأضيف إليه محلول صبغة البنفسج البلوري لجميع الحفر الحاوية على الخلايا بمقدار 0.2 مايكرون لكل حفرة .

d- أعيد الطبق مرة ثانية إلى الحاضنة ليحضن لمدة ساعتين . بعدها أخرج الطبق وأزيلت محتوياته وغسلت الخلايا بمحلول (PBS) المحضر في الفقرة (2-1-3-3) لحين زوال الصبغة الزائدة ،إذ إن الخلايا الحية تأخذ الصبغة أما الميتة فلا تأخذها .

e- قرأت النتائج باستخدام جهاز الالايزا بطول موجي 492 نانوميتر .

f- أجريت الخطوات السابقة على كل من الخطوط الخلوية السرطانية Hep-2 و AMN-3 باستعمال المستخلصين الخام (المائي ، الايثانولي) بثلاث مدد تعريض وهي على التوالي 24 , 48 , 72 ساعة ، أما المزرعة الطبيعية REF فقد استعملت نفس المستخلصات الخام السابقة ولكن بوقت تعريض واحد وهو 72 ساعة .

g- طبقت التجربة أعلاه باستخدام الجزء النباتي (الاوراق L) وأعيدت خطواتها مرة ثانية باستخدام الجزء النباتي الاخر (القلف B) .

h- تم تحويل قيم التأثير التثبيطي للمستخلصات الخام لنبات الصفصاف في الخطوط الخلوية إلى نسب مئوية :

قراءة المعاملة لكل تركيز / قراءة السيطرة × 100

(Betancr *et al.* , 1999) .

2-3-5 اختبار تأثير المستخلصات الخام لنبات الصفصاف في انقسام الخلايا اللمفاوية البشرية خارج الجسم الحي

Effect of *S. acmophylla* crud extracts on lymphocyte divition (in vitro)

اعتمدت الطريقة المتبعة في المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية في التحليل الكروموسومي Chromosomal analysis وتم تقدير نشاط المستخلص B , L (المائي والايثانولي) في خلايا الدم المحيطي وكانت الخطوات كالآتي :-

2-3-5-1 الزرع

1- سحب 5 مليلتر من الدم الوريدي بواسطة محقنة معقمة تحتوي على مادة الهيبارين ثم مزج جيدا لمنع تخثره وأستعمل مباشرة في نفس اليوم .

2- أضيف حجم معين من المستخلص إلى 5 مليلتر من الوسط الزرعي (RPMI / 1640 + بلازما) الموجود في أنابيب معقمة ومجهزة للزراعة بعدد سبعة أنابيب لكل تجربة مضافا لها أنبوبة السيطرة . وكل حسب تركيزه ، وهي على التوالي :-

15.62 , 31.25 , 62.5 , 125 , 250 , 500 , 1000 مايكروغرام / مليلتر . ولكل تركيز ثلاث مكررات . وتخلط مع محتويات الوسط الزرعي جيدا .

3- أضيف لكل أنبوبة 0.3 مليلتر من المادة PHA (Pytohemagglutinin) المجهزة بقنينة وهي عبارة عن مادة مشطرة (Mitogen) تساعد الخلايا اللمفاوية على الانقسام إلى كل انبوبـــــة زرع .

4- أضيف إلى كل أنبوبة 0.3 مليلتر أو ما يعادل 7-9 قطرات من الدم ثم حضنت في 37 مه لمدة 71.40 ساعة (ويفضل رج الأنبوبة مرة أو مرتين كل 24 ساعة) .

2-5-3-2 الحصاد Harvesting

1- بعد انتهاء مدة الحضن للأنابيب ، أضيفت مادة الكولجسين بمقدار 0.1 مليلتر للأنبوبة الواحدة مع الرج الجيد وأعيدت إلى الحاضنة لإكمال مدة الحضن 72 ساعة .

2- نبذت مركزيا بسرعة 1500 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق .

3- أزيل الرائق وترك منه مقدار 0.5 مليلتر فوق الخلايا المترسبة ومزجت جيدا .

4- تم تعليق الأنبوبة مع الرج المستمر بمحلول واطئ التوتر من KCL 0.075 مولاري ووضعت في الحاضنة بدرجة 37 مْ لمدة 20 دقيقة بعدها نقلت الأنبوبة إلى جهاز الطرد المركزي بسرعة 1500 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق .

2-5-3-3 التثبيت Fixation

أهمل الرائق المتكون وأضيف إلى الراسب الخلوي المحلول المثبت والمحضر آنيا (ايثانول المطلق وحامض الخليك الثلجي بنسبة 1:3) قطرة قطرة مع الرج المستمر إلى حد 5 مليلتر . بعدها ترك العالق الخلوي لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة . ثم أعيدت عملية النبذ المركزي على سرعة 1500 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق مرتين أو ثلاث مرات إلى أن يصبح المحلول رائقا ، وفي المرة الأخيرة أعيد تعليق الخلايا مع 3 مليلتر من المثبت وخزن في درجة حرارة –20 مه على الأقل لمدة ساعتين قبل تحضير الشريحة الزجاجية .

2-5-3-4 تحضير الشرائح الزجاجية Slides preparation

حضرت الشرائح الزجاجية الجديدة (المغطاة بمادة زيتية حافظة من التخديش) بغمرها بمحلول حامض الكرومك (Chromic acid) لمدة ثلاثة أيام ، بعدها غسلت تلك الشرائح جيدا بالماء الفاتر ومن ثم بالماء المقطر ، ووضعت في وعاء زجاجي حاوي على الماء المقطر في الثلاجة بدرجة حرارة 4 مه لحين استعمال الشرائح في اليوم نفسه .

2-3-5-5 التقطير Dropping

أستعملت ماصة باستور (Pasteur pipette) لتقطير 2-3 قطرات من عالق الخلايا على الشريحة الزجاجية الرطبة وعلى مسافة مناسبة تقريباً 30 سنتيمتر وتركت لتجف في الهواء .

2-3-5-6 الصبغ Staining

صبغت الشريحة المحضرة بالخطوات السابقة بواسطة صبغة كمزا (Giemsa stain) المحضرة في الفقرة (2–1–3–5) إذ غطت الشريحة بالصبغة لمدة دقيقتين ثم غسلت بمحلول سورنسن المحضر في الفقرة (2–1–3–5) وتركت لتجف في الهواء .

2-3-5-7 الفحص المجهري Microscopical examination

فحصت الشريحة جيدا بواسطة المجهر الضوئي باستعمال العدسة الزيتية ×100 ، لغرض فحص الكروموسومات وتقدير نشاط المستخلص عن طريق دليل الانقسام

Mitotic Index وذلك بحساب النسبة المئوية للخلايا اللمفاوية المنقسمة على وفق المعادلة الاتية :-

دليل الانقسام (MI) = عدد الخلايا المنقسمة / عدد الخلايا المنقسمة وغير المنقسمة (1000) خلية × 100

وكذلك دليل التحول الارومي (BI) = عدد الخلايا الارومية / العدد الكلي للخلايا (1000) خلية × 100

أعيدت التجربة أعلاه بكاملها لكل من المستخلصات الاربعة L_1 , L_2 , B_1 , B_2 وبسبعة تراكيز أيضا .

6-3-2 قياس فاعلية المستخلصات الخام كبديل للـ Colchicine

أضيفت التراكيز بدلا عن الكولجسين إلى أنابيب الزرع التي حضنت مسبقا مع الدم والمادة المشطرة PHA وبثلاث مكررات لكل أنبوبة بوجود السيطرة (المستخدم فيها مادة الكولجسين) لاختبار فاعليتها في إيقاف الخلايا اللمفاوية في مرحلة الطور الاستوائي .

7-3-2 اختبار المستخلصات الخام كمادة مشطرة (Mitogen)

أخذت التراكيز السبعة المحضرة لكل مستخلص من المستخلصات الاربع واضيفت الى انابيب حاوية على الوسط الزرعي المذكور اعلاه ثم اضيفت قطرات الدم 7–9 قطرة دون اضافة المادة المشطرة PHA مع وجود السيطرة الحاوية على الـ PHA وبواقع ثلاثة مكررات لكل انبوبة وذلك لمعرفة قدرة المستخلصات على التحفيز على الانقسام .

8-3-2 الإحصاء Statistics

أخضعت نتائج الدراسة إلى التحليل الإحصائي لغرض معرفة الفروق المعنوية بين معدلات تراكيز المستخلصات الخام وتأثيرها في خلايا الخطوط الخلوية السرطانية والخلايا الطبيعية مقارنة بالسيطرة الخاصة بكل تجربة ، وعدت الفروق مهمة إحصائيا وعالية المعنوية على مستوى 5% لاحتمال الخطأ ، وأجري اختبار التصميم العشوائي الكامل The completely Randomized Design ، واختبار الفرق المعنوي الأصغر Least Significant Difference (LSD) باستعمال برنامج SPSS 10.0 الإحصائي من شركة Microsoft .

الفصل الثالث

النتائج

Results

النتائج

3-1 المستخلصات الخام لنبات الصفصاف *Salix acmophylla*

أخذت أوراق وقلف نبات الصفصاف *S. acmophylla* بعد أن تم التأكد من جنسه ونوعه ، واستُخلص باستخدام نوعين من المذيبات لأجل الحصول على نوعين من المستخلصات الخام لذلك النبات . بلغت نسبة المستخلص المائي لأوراق نبات الصفصاف L1 (20%) وكان قوامه لزجاً وذا لون بني ، في حين كانت نسبة الاستخلاص المائي لقلف هذا النبات B1 (6%) على شكل بلورات بنية محمرة ، أما المستخلص الايثانولي لأوراق الصفصاف L2 فكانت نسبته (16 %) وكان قوامه لزجاً وذا لون أخضر غامق ، في حين كانت نسبة المستخلص الايثانولي للقلف B2 (4%) على هيئة بلورات حمراء اللون كما موضح في جدول (3-1) .

جدول (3-1) النسب المئوية للاستخلاص

نوع المستخلص	النسبة المئوية للاستخلاص	مواصفات المستخلص
المستخلص المائي للأوراق L1	%20	لزج القوام بني اللون
المستخلص الايثانولي للأوراق L2	%16	لزج القوام اخضر غامق
المستخلص المائي للقلف B1	%6	بلورات بنية محمرة
المستخلص الايثانولي للقلف B2	%4	بلورات حمراء اللون

3-2 نتائج الكشف الكيميائي التمهيدي عن المركبات الفعالة

أظهرت نتائج الكشف الكيميائي للمستخلصات النباتية باستعمال الكواشف والمحاليل التي سبق ذكرها وجود المركبات الموضحة في الجدول (3-2) لكل من الأوراق والقلف.

جدول (3-2) نتائج الكشف الكيميائي التمهيدي للمكونات الكيميائية الفعالة لنبات الصفصاف .

المكونات الكيميائية	القلف المائي	الأوراق المائي	القلف الايثانولي	الأوراق الايثانولي
التانينات	+	+	+	+
الكلايكوسيدات	+	+	+	+
السابونينات	+	+	+	+
الفلافونويدات	+	+	+	+
القلويدات a-كاشف دراكندروف	–	–	–	–
b- كاشف ماير	–	–	–	–
التربين	–	–	–	–
الستيرويد	–	–	–	–

علامة (+) تدل على ايجابية الكشف

علامة (–) تدل على سلبية الكشف

3-3 التأثير السمي للمستخلصات الخام لنبات الصفصاف في نمو خلايا الخطوط الخلوية السرطانية وخلايا الخط الطبيعي لجنين الجرذ Cytotoxic effect of crude extracts of *S. acmophylla* on (HEP-2,AMN-3)Cancer and Rat embryo cell lines

عوملت جميع خطوط الخلايا السرطانية والطبيعية بسبعة تراكيز محضرة بشكل ثنائي للمستخلصات الخام (المائي والايثانولي) لكل من قلف وأوراق نبات الصفصاف وبثلاث مدد من التعريض 24 ، 48 ، 72 ساعة ، وباستخدام تراكيز مختلفة تراوحت بين (15.62 – 1000) مايكروغرام/مليلتر بتخافيف ثنائية متسلسلة .

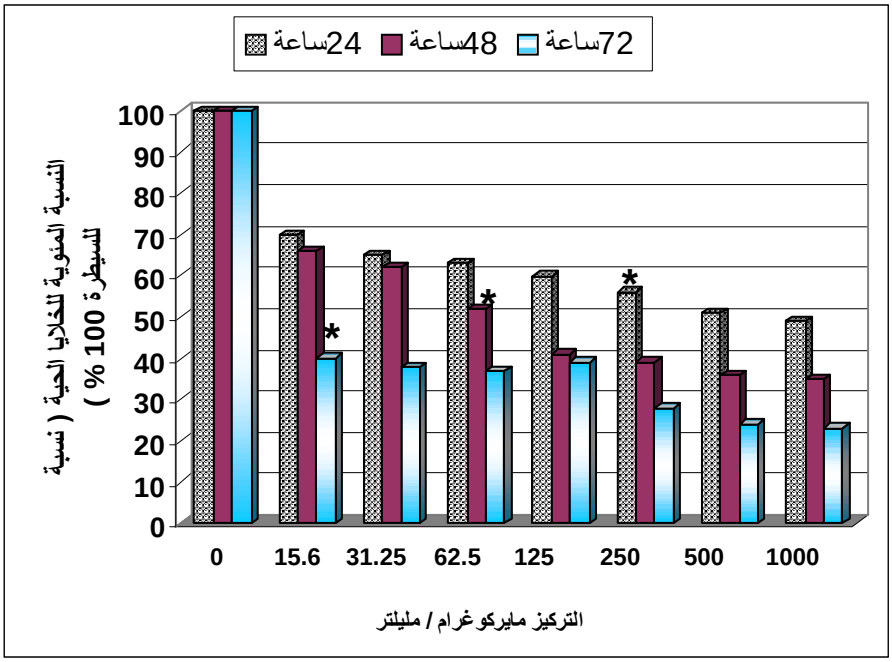
اعتمدت دراسة التأثير التثبيطي على استخراج النسبة المئوية لمعدل الخلايا الحية المتبقية (Cell viability) بعد التعريض مقارنة بمجموعة السيطرة التي يعد معدل نموها (100%) بعد صبغ الخلايا الحية بصبغة Crystal violet ، ثم قياس الكثافة الضوئية عند طول موجي 492 نانوميتر ، إذ تعد شدة اللون تعبيراً عن عدد تلك الخلايا.

3-3-1 الخط الخلوي لسرطان HEP-2

تمت معاملة الخط السرطاني HEP-2 عند التمريرة (218) بتراكيز مختلفة للمستخلصين المائي والايثانولي لكل من القلف والأوراق وضمن مدد التعريض الثلاث ، فكانت النتائج الإحصائية تشير إلى وجود تأثير تثبيطي ملحوظ في تراكيز تلك المستخلصات الخام في نمو الخط السرطاني ابتداءً من التراكيز الواطئة ويستمر باتجاه التراكيز العالية ، ودلت النتائج أيضاً على وجود تباين في التأثير التثبيطي لتلك المستخلصات الخام فيما بينها من جهة وفيما بين المستخلص الواحد نفسه أو الجزء النباتي نفسه من جهة أخرى .

3-3-1-1 المستخلص المائي لأوراق الصفصاف (L1)

يبين الشكل (3–1) أن لهذا المستخلص تأثيراً تثبيطياً في نمو الخط الخلوي السرطاني HEP-2 بدءً بالتركيز 250 مايكروغرام / مليلتر للمدة الأولى من التعريض (24) ساعة وبفرق معنوي ($P<0.05$) باتجاه التراكيز العالية حيث بلغت نسبة حيوية الخلايا (56%) أي بنسبة تثبيط (44%) صعوداً إلى التركيز 1000 مايكروغرام / مليلتر الذي بلغت نسبة التثبيط عنده (51%) بمعنى أن نسبة الحيوية كانت (49%) . أما في الفترة (48) ساعة من التعريض فقد ابتدأ الفرق المعنوي عند التركيز 62.5 مايكروغرام / مليلتر وباتجاه التراكيز العالية ، إذ بلغت نسبة الحيوية فيه (52 %) أي بنسبة تثبيط مقدارها (48%) أما التركيز 1000 مايكروغرام / مليلتر كانت نسبة الحيوية فيه (35%) بمعنى أن نسبة التثبيط فيه (65 %) . كما لوحظ إن التراكيز الواطئة بدأ تأثيرها المعنوي واضحاً في المدة الثالثة من التعريض (72) ساعة حيث كانت النسبة المئوية للتثبيط لأوطأ تركيز 15.6 مايكروغرام / مليلتر (60 %) صعوداً إلى أعلى التراكيز الذي بلغت عنده نسبة التثبيط (77 %) أي أن نسبة الخلايا الحية كانت (40–23%) على التوالي.صورة(3)



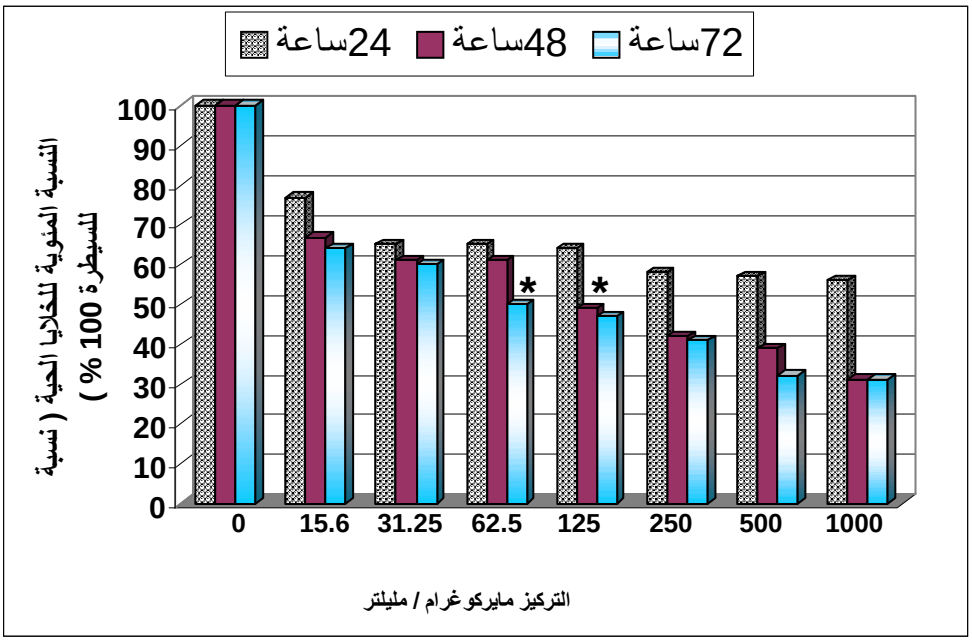
شكل (3–1) تأثير مستخلص L1 في نمو خلايا سرطان الحنجرة البشرية HEP-2 عند مدد التعريض الثلاثة

العلامة * تشير إلى بدء الفرق المعنوي

3–1–3–2 المستخلص الايثانولي لأوراق نبات الصفصاف (L2)

يبين الشكل (3-2) عدم وجود فرق معنوي (P>0.05) عند تعريض المستخلص الايثانولي للأوراق للخط السرطاني HEP-2 عند مدة التعريض (24) ساعة ، أما في الفترة (48) ساعة فقد ابتدأ التأثير المعنوي (P<0.05) عند التركيز 125 مايكروغرام / مليلتر إذ بلغت نسبة الخلايا الحية فيه (49%) أي نسبة التثبيط له (51%) صعوداً الى التراكيز العالية التي بلغت عندها نسبة الحيوية (31%) للتركيز 1000 مايكروغرام / مليلتر أي أنه حقق تثبيطاً مقداره (69%) .

أما عند الفترة (72) ساعة فقد ابتدأ التأثير المعنوي عند التركيز 62.5 مايكروغرام / مليلتر ، وكانت نسبة الحيوية للخلايا عنده (50%) أي أنّ المستخلص ثبط الخلايا بنسبة (50%) صعوداً إلى التراكيز العالية التي بلغت نسبة التثبيط فيها عند التركيز 1000 مايكروغرام / مليلتر (69%) أي الحيوية كانت(31%) .صورة (4)



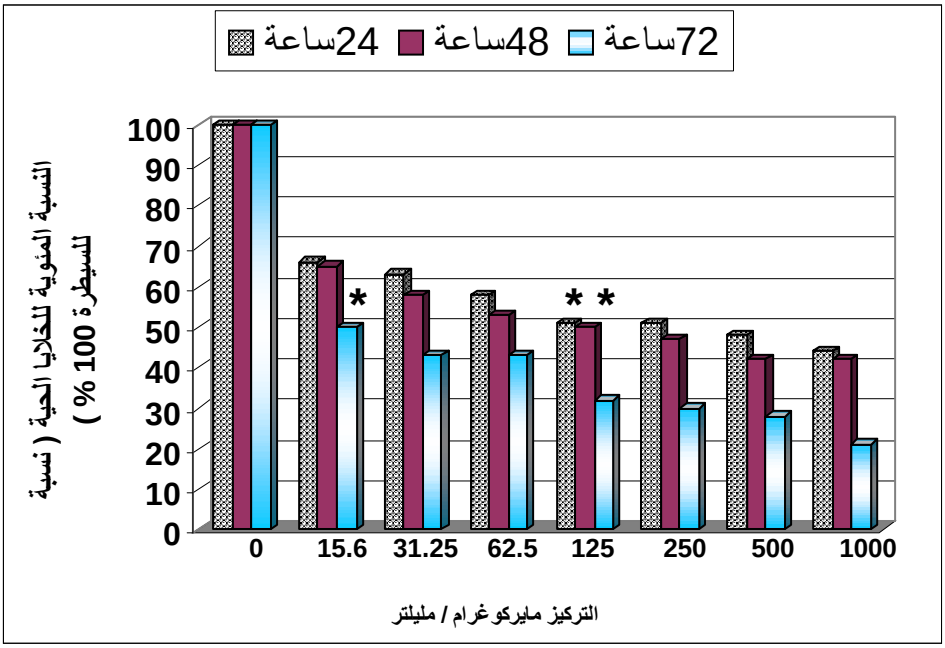
شكل (3-2) تأثير المستخلص L2 في نمو خلايا سرطان الحنجرة البشرية HEP-2 عند مدد التعريض الثلاثة

العلامة * تشير إلى بدء الفرق المعنوي

3-1-3-3 المستخلص المائي لقلف نبات الصفصاف (B1)

يبين الشكل (3-3) بدء التأثير التثبيطي للمستخلص المائي للقلف بفروق معنوية ($P<0.05$) عند التركيز 125 مايكروغرام / مليلتر للمدة الأولى من التعريض (24) ساعة حيث كان مقدار نسبة الحيوية للخط HEP-2 (51%) أي أن نسبة تثبيط الخلايا (49%) وتزداد هذه النسبة المئوية بزيادة التراكيز لتبلغ عند التركيز 1000 مايكروغرام/مليلتر (56%) بنسبة حيوية (44%) .

لم يظهر في مدة التعريض (48) ساعة فرق معنوي($P<0.05$) إلا عند التركيز 125 مايكروغرام/مليلتر الذي كانت نسبة حيوية الخلايا له (50%) أي أن تثبيط الخلايا لهذا التركيز (50%) ويزداد التثبيط باتجاه التراكيز العالية ليصل عند التركيز 1000 مايكروغرام/مليلتر إلى (58%) عند مستوى معنوية ($P<0.05$) أي حيوية (42%) . أما عند مدة التعريض 72 ساعة فقد بدا التأثير المعنوي واضحاً عند أوطأ التراكيز ليستمر باتجاه العالية منها ، وتراوحت حيوية الخلايا للتراكيز بين (50-21%) أي كانت له نسبة تثبيط مئوية قدرها (50-79%) . صورة (5)



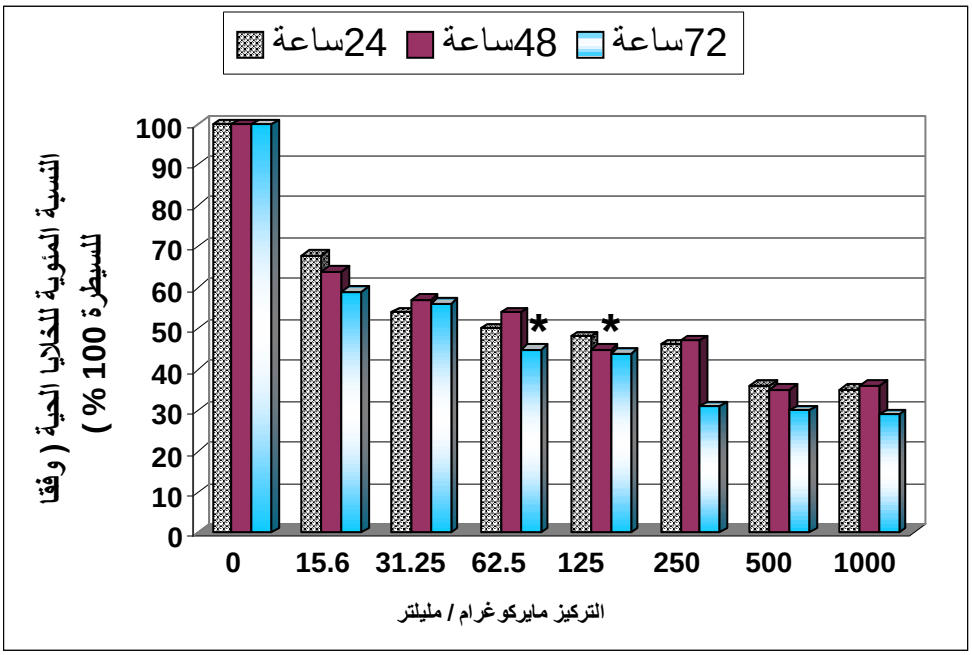
شكل (3-3) تأثير المستخلص B1 في الخط الخلوي السرطاني HEP-2 ولثلاث مدد من التعريض

العلامة * تشير إلى بدء الفرق المعنوي

3-3-1-4 المستخلص الايثانولي لقلف نبات الصفصاف B2

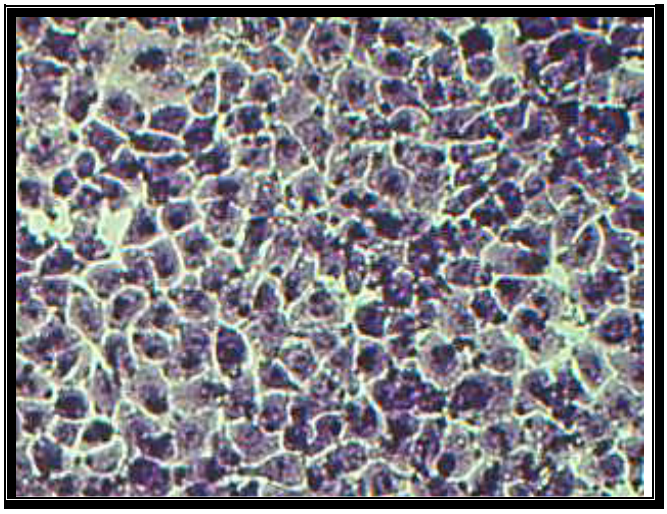
بينت النتائج الإحصائية للشكل (3-4) عند تعريض المستخلص الايثانولي للقلف لمدة التعريض (24) ساعة عدم وجود فروق معنوية ($P>0.05$) ، في حين أنها كانت واضحة عند التعريض (48) وبمعنوية ($P<0.05$) مبتدئاً بالتركيز 125 مايكروغرام/مليلتر الذي كانت نسبة الحيوية له (45%) أي نسبة تثبيط الخلايا (55%) صعوداً إلى التراكيز العالية إذ بلغت نسبة الحيوية عند التركيز 1000 مايكروغرام/مليلتر (36%) الذي كانت نسبة تثبيط الخلايا فيه (64%) .

أما عند 72 ساعة فقد سُجل الفرق المعنوي عند التركيز 62.5 مايكروغرام/ مليلتر باتجاه التراكيز العالية أيضاً و بلغت نسبة الحيوية بين التركيز 62.5 والتركيز 1000 مايكروغرام/مليلتر (45-29%) أي نسبة التثبيط كانت (55-71%) عند مستوى معنوية ($P<0.05$) . صورة (6)

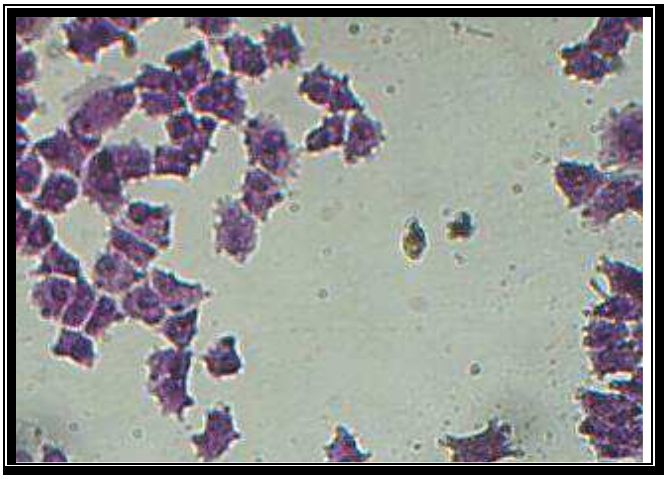


الشكل(3-4) يوضح التأثير التثبيطي للمستخلص B2 في الخط السرطاني HEP-2 لثلاث مدد من التعريض

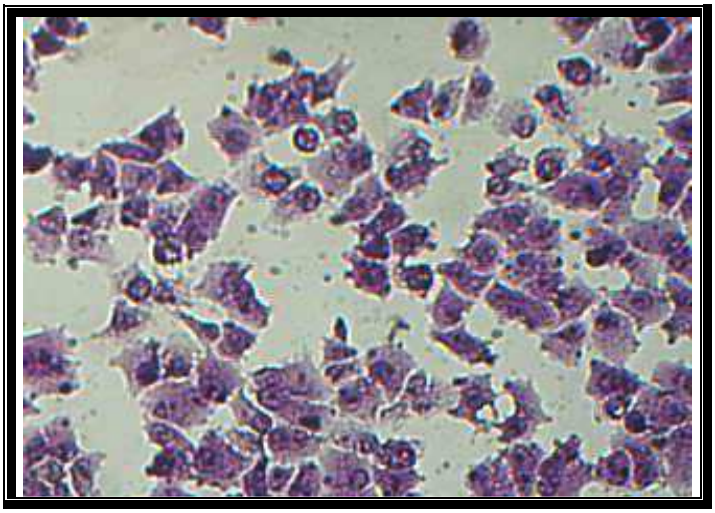
العلامة * تشير إلى بدء الفرق المعنوي



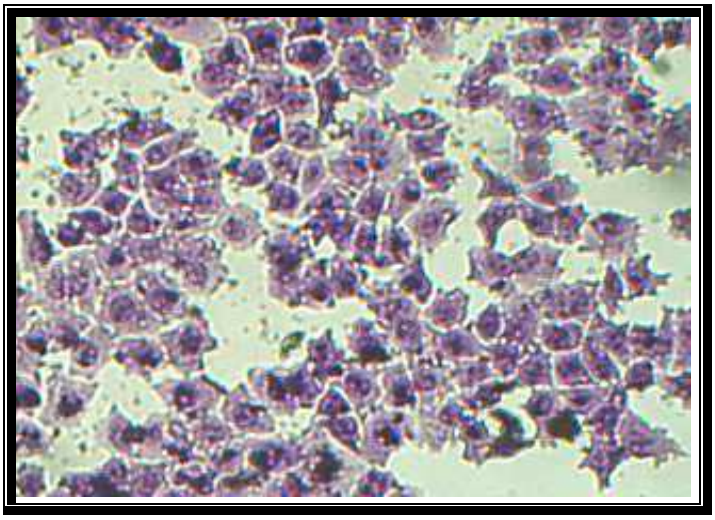
صورة (2) الخط الخلوي السرطاني HEP-2 الذي يمثل السيطرة ،(200X).



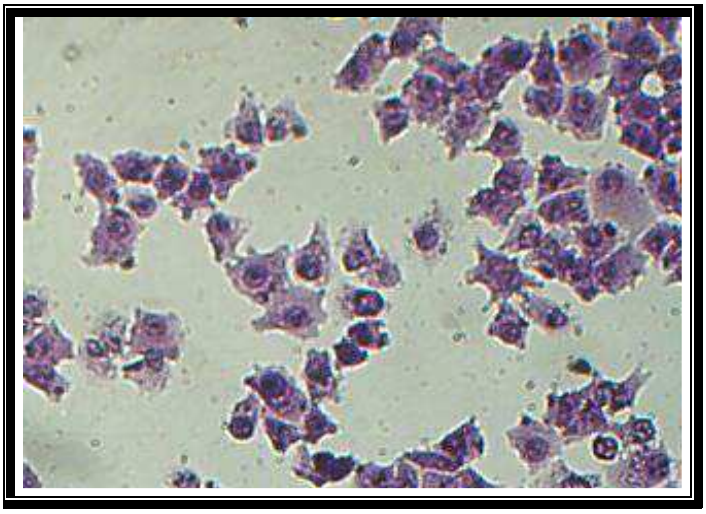
صورة (3) الخط الخلوي السرطاني HEP-2 المعامل بالمستخلص L1 عند التركيز 1000 مايكروغرام / مليلتر ،(400X).



صورة (4) الخط الخلوي السرطاني HEP-2 المعامل بالمستخلص L2 عند التركيز 1000 مايكروغرام / مليلتر، (400X) .



صورة (5) الخط الخلوي السرطاني HEP-2 المعامل بالمستخلص B1 عند التركيز 1000 مايكروغرام / مليلتر ، (400X) .



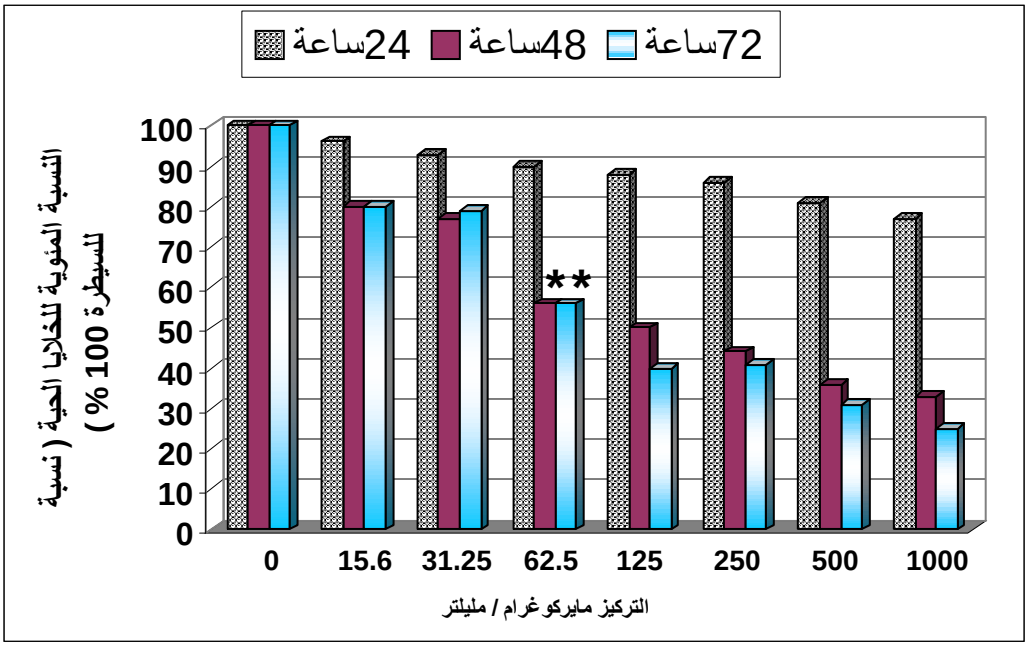
صورة (6) الخط الخلوي السرطاني HEP-2 المعامل بالمستخلص B2 عند التركيز 1000 مايكروغرام / مليلتر ، (400X) .

3-3-2 الخط الخلوي لسرطان AMN-3

تمت معاملة الخط الخلوي لسرطان AMN-3 عند التمريرة (46) بالتراكيز السبعة المحضرة للمستخلصين الخام (المائي والايثانولي) لكل من الجزئين النباتيين (القلف والأوراق) ، وخلال ثلاث مدد من التعريض (24 ، 48 ، 72 ساعة) على التوالي ، فكانت النتائج الإحصائية تشير إلى وجود تأثير تثبيطي ملحوظ لتراكيز تلك المستخلصات (ولاسيما التراكيز العالية منها) في نمو هذا الخط السرطاني ، ووجد أيضا أن هناك اختلافاً في التأثير التثبيطي للمستخلصات الخام في ما بينها من جهة وفي ما بين المستخلص الواحد نفسه من جهة أخرى عند مدد التعريض المختلفة .

3-2-3-1 المستخلص المائي لاوراق نبات الصفصاف (L1)

يبين الشكل (3-5) ان للمستخلص المائي للأوراق تأثيرا تثبيطيا في خلايا AMN-3 السرطانية يزداد بزيادة التركيز للمدة الأولى من الحضن 24 ساعة بفرق غير معنوي عند مستوى معنوية (P>0.05) ، ولكن عند مدة التعريض 48 ساعة بدا التأثير لهذا المستخلص واضحا عند التركيز 62.5 مايكروغرام/مليلتر وبفرق معنوي (P<0.05) ، واحتسبت النسبة المئوية لحيوية الخلايا لهذا التركيز وكانت (56%) أي تثبيط الخلايا كان (44%) وباتجاه التراكيز العالية حيث بلغت الحيوية عند التركيز 1000 مايكروغرام/مليلتر (33%) أي التثبيط (67%) ، أما عند مدة التعريض 72 ساعة فقد كانت النتائج الإحصائية تشير إلى فرق معنوي (P<0.05) يبدأ عند التركيز 62.5 مايكروغرام/مليلتر باتجاه التراكيز العالية أيضاً ، بلغت النسبة المئوية للخلايا الحية بين التركيز 62.5 و 1000 مايكروغرام/مليلتر (56-25%) أي بنسبة تثبيط (44-75%) على التوالي . صورة (8)

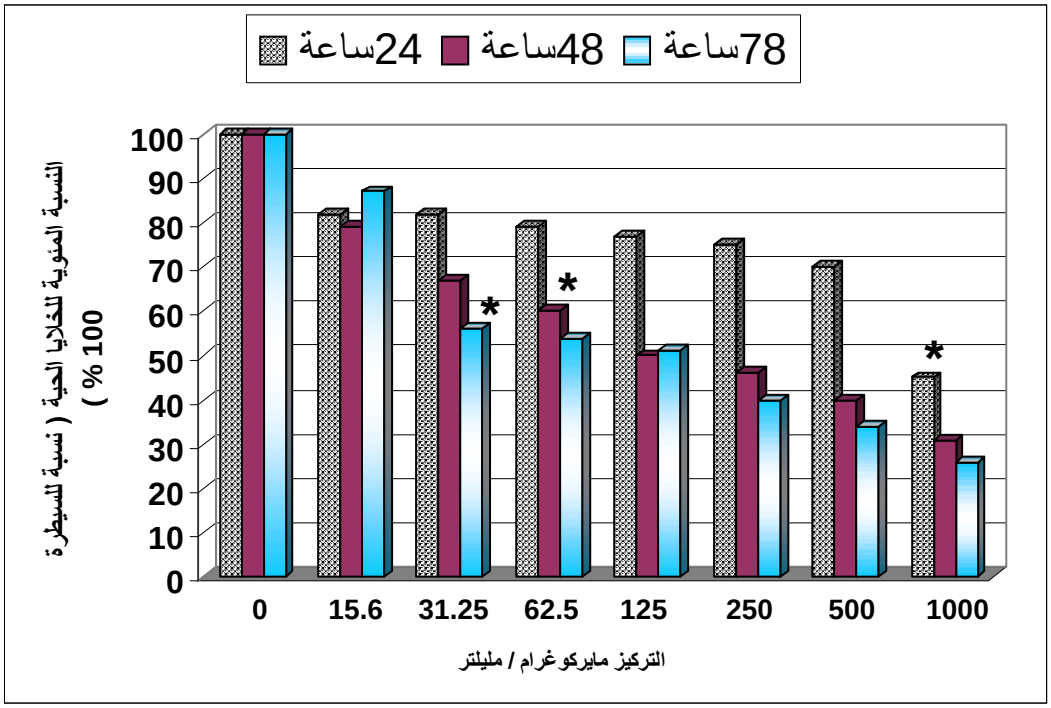


الشكل(3-5) التأثير التثبيطي للمستخلص L1 في الخط الخلوي السرطاني AMN-3 ولثلاث مدد من التعريض

العلامة * تشير إلى بدء الفرق المعنوي

3-2-3-2 المستخلص الايثانولي لأوراق الصفصاف (L2)

في الشكل (3-6) تم تعريض الخط السرطاني AMN-3 للمستخلص الايثانولي للأوراق وبثلاث مدد من التعريض وأظهرت النتائج الإحصائية أن للمستخلص تأثيراً تثبيطياً في نمو هذا الخط يزداد مع زيادة التراكيز بالمقارنة مع مجموعة السيطرة إذ بدأ الفرق المعنوي ($P<0.05$) في المدة الأولى (24) ساعة عند التركيز 1000 مايكروغرام/مليلتر حيث بلغت فيه النسبة الحيوية للخلايا (45%) أي بنسبة تثبيط (55%) أما في المدة الثانية من التعريض فقد ابتدأ الفرق المعنوي عند التركيز 62.5 مايكروغرام/مليلتر بنسبة حيوية (60%) أي بنسبة تثبيط (40%) وكانت نسبة الحيوية عند التركيز 1000 (31%) أي نسبة التثبيط (69%) ، أما عند مدة التعريض (72) ساعة فقد كان الفرق المعنوي ($P<0.05$) يبدأ عند التركيز 31.25 مايكروغرام/مليلتر صعوداً إلى التراكيز العالية فقد كانت نسبة الحيوية بين التركيزين (31.25-1000) مايكروغرام/مليلتر (56-26%) أي نسبة التثبيط (44-74%) .صورة (9)

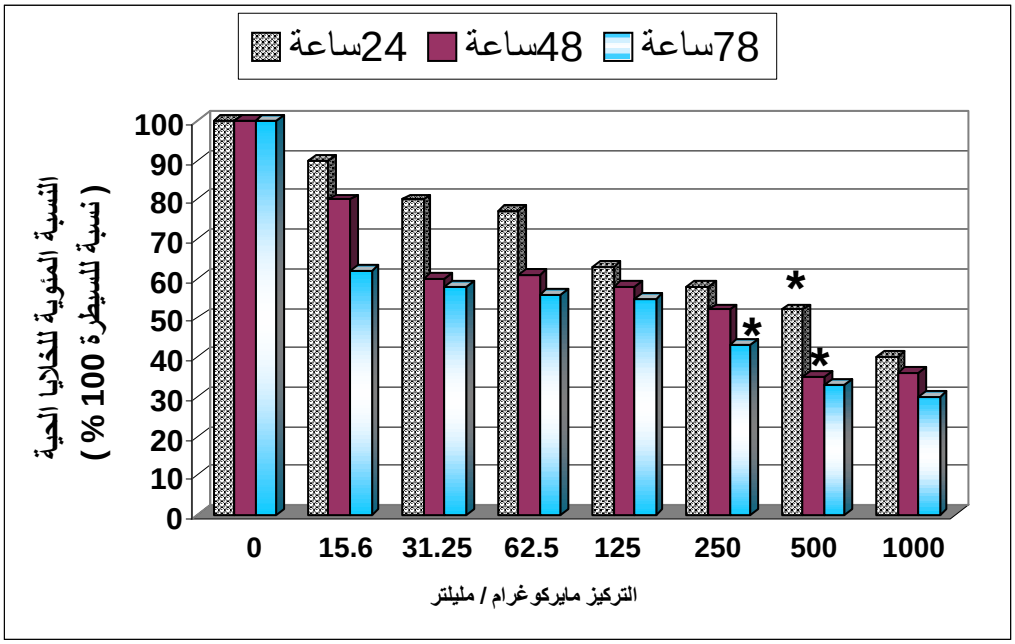


شكل (3-6) يوضح التأثير التثبيطي للمستخلص L2 في الخط الخلوي السرطاني AMN-3 لثلاث مدد من التعريض

العلامة * تشير إلى بدء الفرق المعنوي

3-2-3-3 المستخلص المائي لقلف الصفصاف (B1)

يظهر من خلال الشكل (3-7) أن للمستخلص المائي للقلف تأثيرا مثبطا أيضا يزداد بازدياد التراكيز منذ المدة الأولى من الحضن مقارنة بالسيطرة وكانت بفارق معنوي عند مستوى معنوية ($P<0.05$) للمدد الثلاثة من الحضن على التوالي ، إذ ابتدأ التأثير المعنوي ($P<0.05$) للمدة (24) ساعة عند التركيز 500 مايكروغرام/مليلتر صعوداً إلى التركيز 1000 مايكروغرام/مليلتر حيث كانت النسبة المئوية لحيوية الخلايا عند التركيزين (52-40%) أي نسبة تثبيط (48-60%) على التوالي ، أما للمدة (48) ساعة فقد ابتدأ التأثير المعنوي ($P<0.05$) عند التركيز 500 مايكروغرام/مليلتر أيضا وكانت نسبة الحيوية (35-36%) للتركيزين (500-1000) أي بنسبة تثبيط (65-64%)على التوالي ، وأما للمدة (72) ساعة كان الفرق المعنوي واضحاً عند التركيز 250 إلى التركيز 1000 مايكروغرام/مليلتر بنسبة حيوية (43-30%) أي نسبة التثبيط (57-70%). صورة (10)

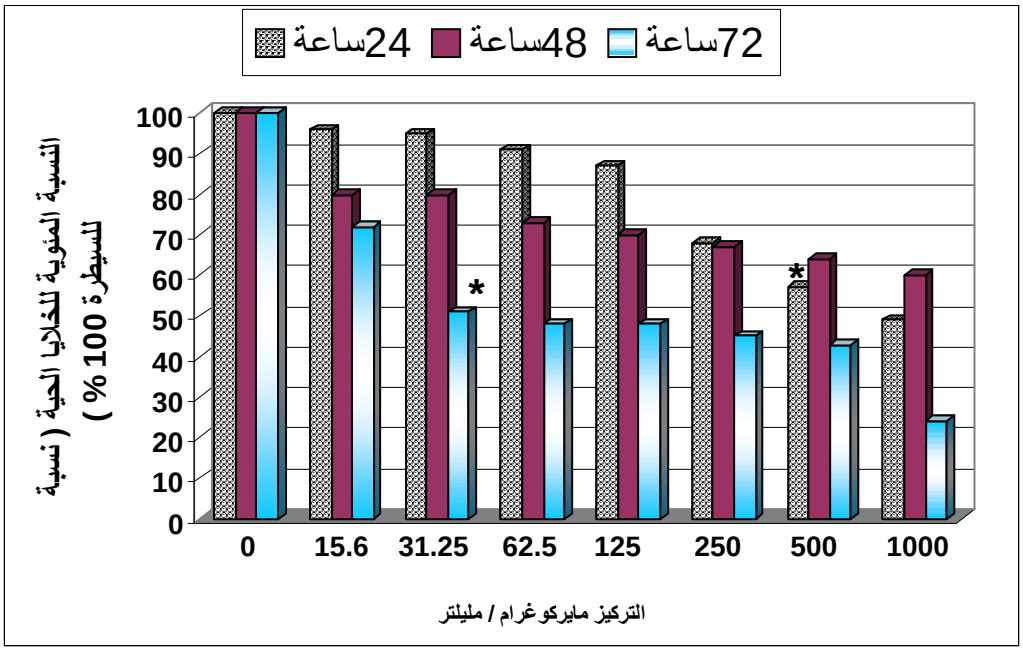


الشكل (3-7) يوضح التأثير التثبيطي للمستخلص B1 في الخط الخلوي السرطاني AMN-3 عند ثلاث مدد من التعريض

العلامة * تشير إلى بدء الفرق المعنوي

3-3-2-4 المستخلص الايثانولي لقلف الصفصاف (B2)

يبين الشكل (3-8) وجود فرق معنوي بمستوى معنوية (P<0.05) عند تعريض الخلايا السرطانية AMN-3 إلى المستخلص الايثانولي لقلف نبات الصفصاف للمدة الأولى من التعريض عند التركيز 500 مايكروغرام/مليلتر الذي بلغت نسبة الحيوية عنده (57%) بنسبة التثبيط (43%) صعوداً الى التركيز 1000 مايكروغرام/مليلتر والذي عنده نسبة الحيوية (49%) بنسبة تثبيط (51%) ، وانخفضت حيوية الخلايا باتجاه التراكيز العالية ولكن بفرق غير معنوي (P>0.05) عند (48) ساعة من الحضن ، أما عند المدة (72) ساعة فقد بدأ الفرق المعنوي بمستوى دلالة (P<0.05) عند التركيز 31.25 مايكروغرام/مليلتر صعوداً إلى التركيز 1000 مايكروغرام / مليلتر وبنسبة حيوية (51-24%) أي بنسبة التثبيط (49-76%) . صورة (11)

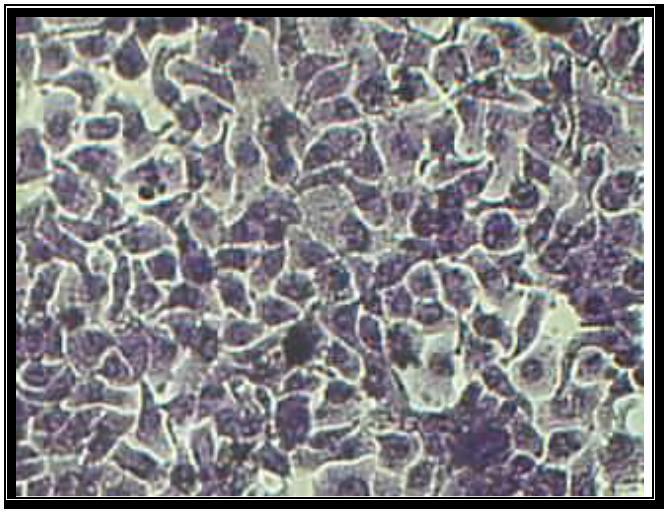


الشكل (3-8) يوضح التأثير التثبيطي للمستخلص B2 في الخط الخلوي السرطاني AMN-3 لثلاث مدد من التعريض

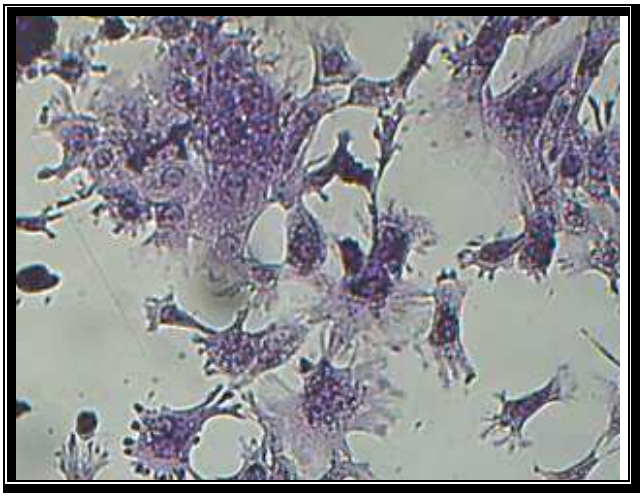
العلامة * تشير إلى بدء الفرق المعنوي

عند المقارنة بين كل من جزئي النبات (القلف والأوراق) والأثر التثبيطي لكل منهما أظهرت النتائج الإحصائية وجود فروقات طفيفة غير معنوية بين الجزأين سواءً عند المستخلص المائي أم الايثانولي . وتجدر الإشارة أيضاً إلى أن أشد الفروقات المعنوية للمستخلصين الخام (المائي والايثانولي) وللجزأين القلف والاوراق كانت تقع في مدة التعريض 72 ساعة لذلك أظهرت المقارنات الإحصائية عند المقارنة بين المستخلصين المائي والايثانولي لمدة التعريض 72 ساعة أن المستخلص المائي للأوراق L1 أظهر فرقاً معنوياً مقارنة مع الايثانولي L2 ($P<0.05$) ، وعند مقارنة المستخلصين للقلف أظهر المستخلص المائي B1 فرقاً معنوياً عالياً أيضاً عند المقارنة مع الايثانولي B2 ($P<0.05$) للخط الخلوي HEP-2 .

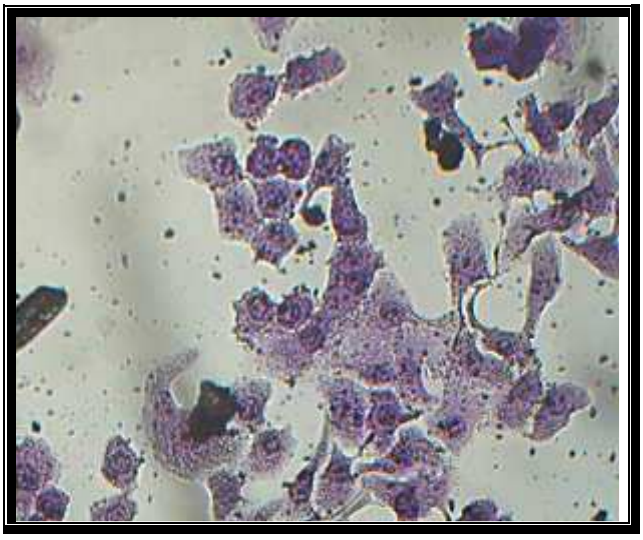
أما عند إجراء المقارنة بين المستخلصين عند الخط السرطاني AMN-3 فقد أظهرت أنَ المستخلص الايثانولي الخام ذو فرق معنوي عالٍ مقارنة مع المستخلص المائي للأوراق ($P<0.05$) ، وكذلك كان المستخلص الايثانولي للقلف ($P<0.05$).



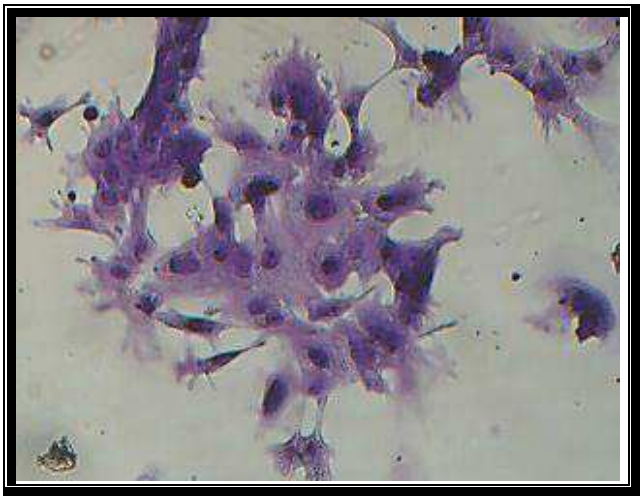
صورة (7) الخط الخلوي السرطاني AMN-3 يمثل السيطرة ،(200X) .



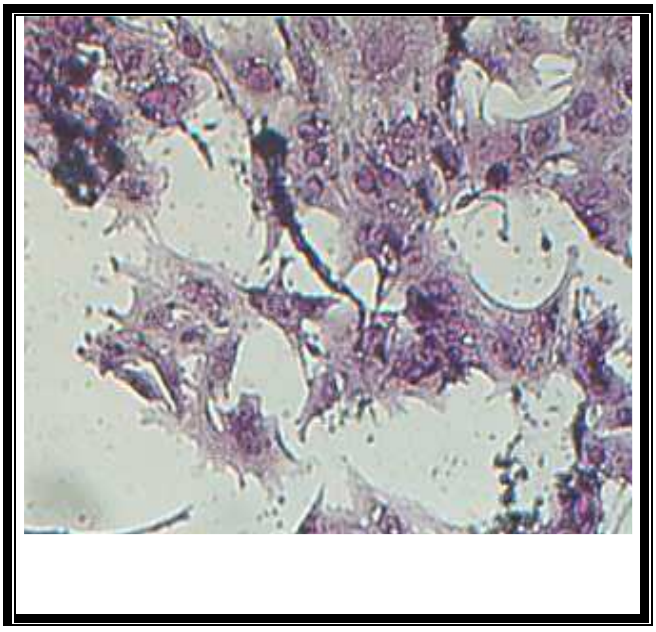
صورة (8) الخط الخلوي السرطاني AMN-3 المعامل بالمستخلص L1 عند التركيز 1000 مايكروغرام / مليلتر ، (400X) .



صورة (9) الخط الخلوي السرطاني AMN-3 المعامل بالمستخلص L2 عند التركيز 1000 مايكروغرام / مليلتر ، (400X) .



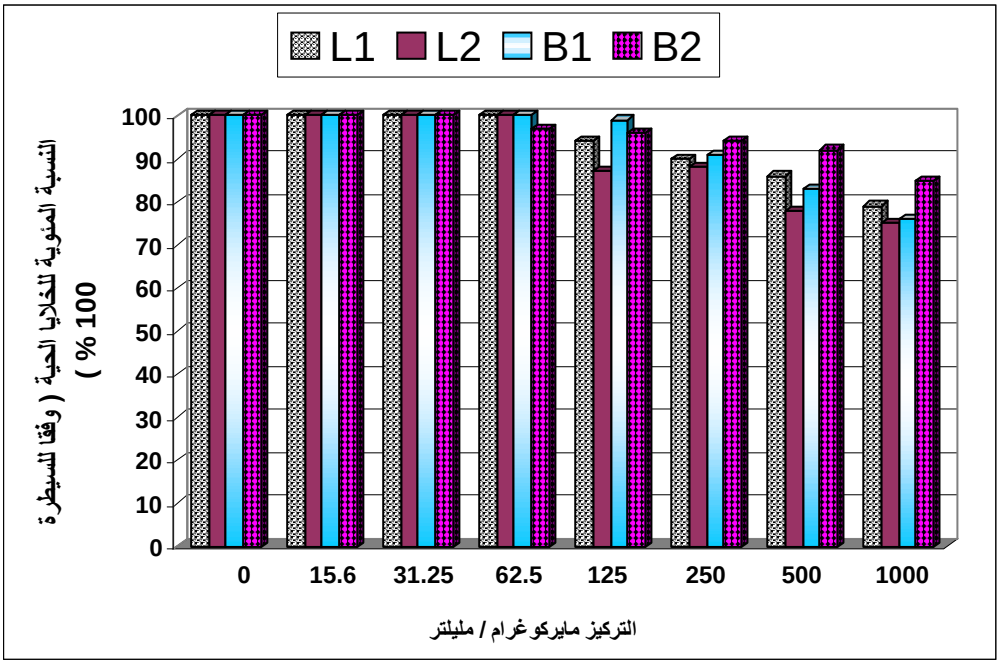
صورة (10) الخط الخلوي السرطاني AMN-3 المعامل بالمسنخلص B1 عند التركيز 1000 مايكروغرام / مليلتر ،(400X) .



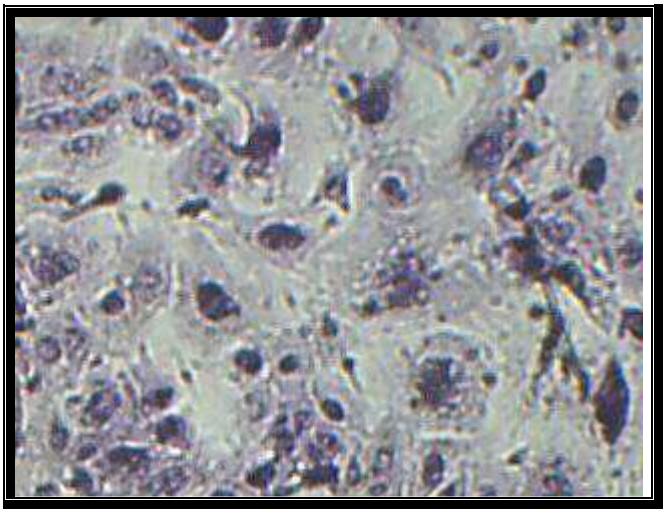
صورة (11) الخط الخلوي السرطاني AMN-3 المعامل بالمستخلص B2 عند التركيز 1000 مايكروغرام / مليلتر ، (400X) .

3-3-3 الخط الخلوي الطبيعي لجنين الجرذ
Rat Embryo Fibroblast (REF)

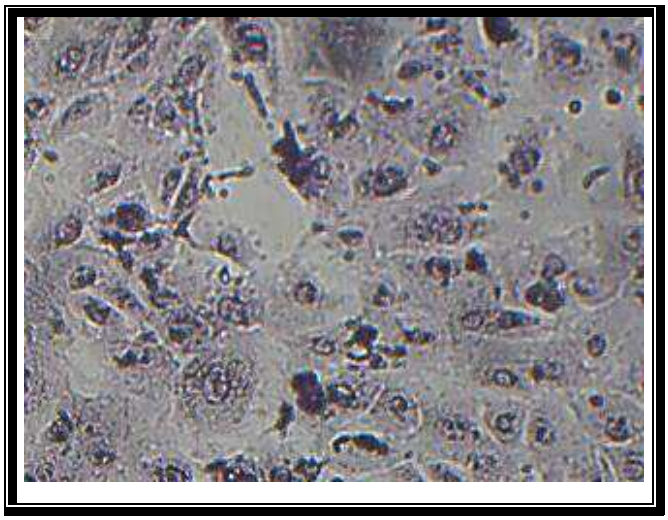
يبين الشكل (3-9) نتائج تأثير المستخلصات على الخط الطبيعي (REF) لكل من المستخلص المائي والايثانولي للقلف والأوراق عند التمريرة (18) وكانت جميعها تقع في مدة تعريض واحدة 72 ساعة ، وتشير إلى عدم وجود فروقات معنوية ($P>0.05$) عند المقارنة مع السيطرة . أي ليس هناك تأثير تثبيطي واضح لتراكيز المستخلصات الخام في ذلك الخط الطبيعي لجنين الجرذ . صورة (16,15,14,13)



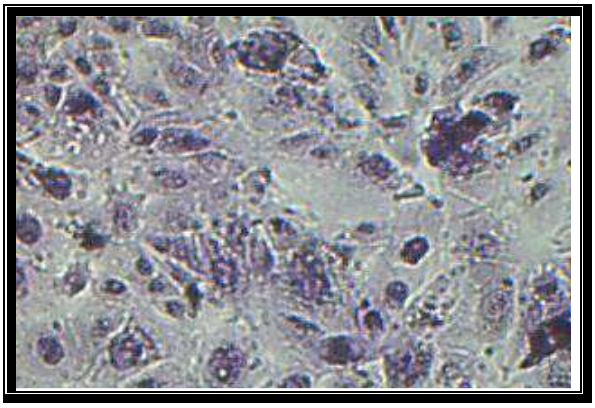
شكل (3-9) يوضح تأثير المستخلصات الخام (L1 , L2 , B1 , B2) لمدة التعريض 72 ساعة في الخط الطبيعي لجنين الجرذ



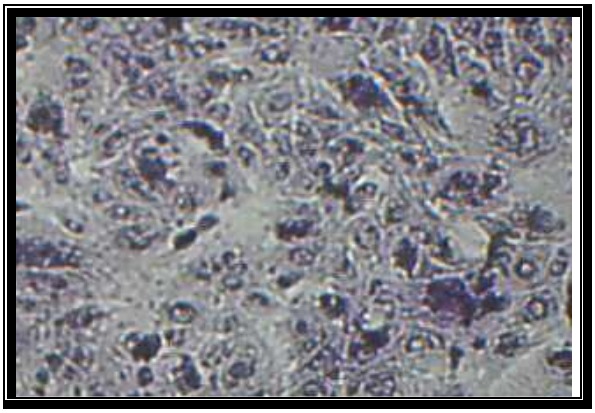
صورة (12) الخط الخلوي الطبيعي REF ويمثل السيطرة ، (200X) .



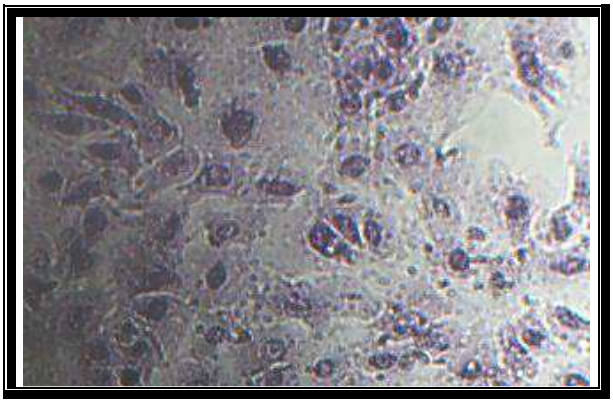
صورة (13) الخط الخلوي الطبيعي REF المعامل بالمستخلص L1 عند التركيز 1000 مايكروغرام / مليلتر ، (200X) .



صورة (14) الخط الخلوي الطبيعي REF المعامل بالمستخلص L2 عند التركيز 1000 مايكروغرام / مليلتر ، (200X) .



صورة (15) الخط الخلوي الطبيعي REF المعامل بالمستخلص B1 عند التركيز 1000 مايكروغرام / مليلتر ، (200X) .



صورة (16) الخط الخلوي الطبيعي REF المعامل بالمستخلص B2 عند التركيز 1000 مايكروغرام / مليلتر ، (200X) .

3-4 تأثير المستخلصات الخام لنبات الصفصاف في انقسام الخلايا اللمفاوية البشرية Effect of *S. acmophylla* crude extracts on the Division of human lymphocytes

عوملت الخلايا اللمفاوية البشرية بسبعة تراكيز محضرة بشكل ثنائي لكل من المستخلصين المائي والايثانولي وللجزئين النباتيين القلف والأوراق ضمن مدة تعريض 72 ساعة وهذه التراكيز هي 15.62 , 31.25 , 62.5 , 125 , 250 , 500 , 1000 مايكروغرام /مليلتر على التوالي وبواقع ثلاث مكررات لكل تركيز .

سعت هذه الدراسة إلى إيجاد الفروق المعنوية لكل تركيز من خلال حساب معامل الانقسام الخيطي Mitotic Index ومعامل التحول الارومي Blastotic Index أي معرفة التراكيز التي تؤثر في انقسام الخلايا الطبيعية التي أثرت تأثيرا تثبيطيا في نمو الخلايا السرطانية .

3-4-1 المستخلص المائي لأوراق نبات الصفصاف L1

أشارت النتائج المبينة في الجدول (3-3) إلى أن المستخلص L1 أدى إلى تثبيط أعداد الخلايا المنقسمة عند التراكيز العالية منها مقارنة بمجموعة السيطرة (2.9%) وبفرق معنوي ($P<0.05$) عند التركيز 1000 مايكروغرام/مليلتر الذي كان معامل الانقسام له (0.3%) ، في حين لم تشر التراكيز الواطئة إلى فرق معنوي ($P>0.05$) عند مقارنة معامل انقسام الخلايا فيها مع معامل السيطرة ، أي أن أعداد الخلايا المنقسمة تقترب من مجموعة السيطرة ، أما بالنسبة لقياس قدرة الخلايا على التحول إلى ارومات فقد أنخفض معامل التحول الارومي انخفاضاً غير معنوي ($P>0.05$) مع زيادة التراكيز إلى أن يصل إلى التركيز 1000 مايكروغرام/مليلتر الذي كان التأثير عنده معنوياً ($P<0.05$) حيث كان الـ BI له (1%) مقارنة بمجموعة السيطرة (5.7%) .

3-4-2 المستخلص الايثانولي لأوراق نبات الصفصاف L2

كان للمستخلص الايثانولي للأوراق تأثير تثبيطي لمعامل انقسام الخلايا اللمفاوية جدول (3-3) إذ يزداد الانخفاض بازدياد التركيز وصولاً إلى التركيز 500 مايكروغرام / مليلتر الذي كان الانخفاض فيه معنوياً ($P<0.05$) مقارنة بمجموعة السيطرة حيث كان فيه معامل الانقسام الخيطي (0.5%) في مقابل نسبة (2.3%) لمجموعة السيطرة صعوداً إلى التركيز 1000 مايكروغرام / مليلتر الذي المعامل كان عنده (0.3%) .

وثّبط المستخلص أيضاً قدرة الخلايا اللمفاوية على التحول إلى اورمات بفرق معنوي عند التركيز 1000 مايكروغرام / مليلتر فقط (1.1%) بينما لم تكن التراكيز الواطئة ذات فرق معنوي بمستوى دلالة ($P<0.05$) .

3-4-3 المستخلص المائي لقلف نبات الصفصاف B1

يبين الجدول (3-3) معاملات الانقسام الخيطي والتحول الارومي للتراكيز السبعة التي أظهرت انخفاضاً في انقسام الخلايا وفي تحولها إلى اورمات إذ يزداد الانخفاض بزيادة التراكيز ولكن لم تشر النتائج الإحصائية إلى وجود فرق معنوي ($p>0.05$) مقارنة مع مجموعة السيطرة . حيث كانت معاملات الانقسام تتراوح بين (2.7-1.8%) والتحول الارومي(6-4%) مقارنة مع مجموعة السيطرة التي كانت (3%) للـ MI و(6.8%) للـ BI على التوالي .

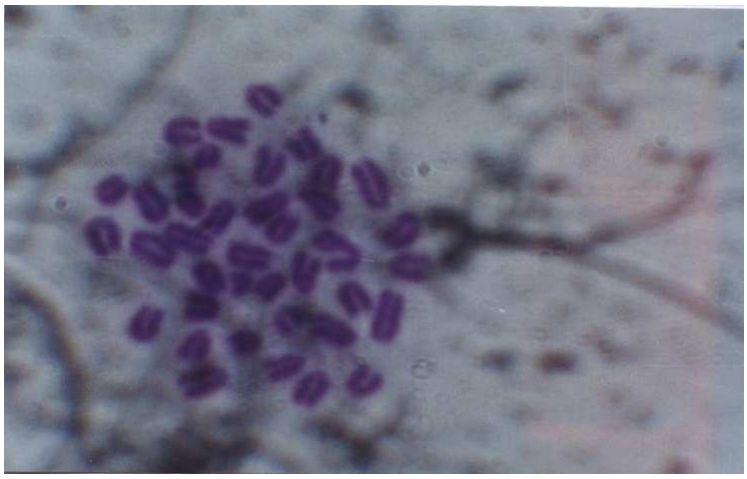
3-4-4 المستخلص الايثانولي لقلف نبات الصفصاف B2

أظهر المستخلص الايثانولي لقلف الصفصاف جدول (3-3) تأثيراً ملحوظاً في انخفاض أعداد الخلايا المنقسمة وأعداد الخلايا المتحولة إلى اورمات مقارنة بمجموعة السيطرة إذ يزداد هذا الانخفاض مع ازدياد التركيز ، وقد بدأ التأثير المعنوي ($P<0.05$) في الانخفاض عند التركيز 250 مايكروغرام/مليلتر وباتجاه أعلى تركيز حيث كان عنده الـ MI (0.7%) مقارنة بمجموعة السيطرة (3.4%) ، بينما لم تظهر التراكيز الأدنى فرقاً معنوياً بمستوى دلالة ($P>0.05$) ، امابالنسبة للـ BI فقد كان الفرق المعنوي واضحاً ($P<0.05$) عند التركيز 250 مايكروغرام/مليلتر (2%) إذ يزداد الانخفاض بزيادة التركيز بالمقارنة مع مجموعة السيطرة (7.1%) .

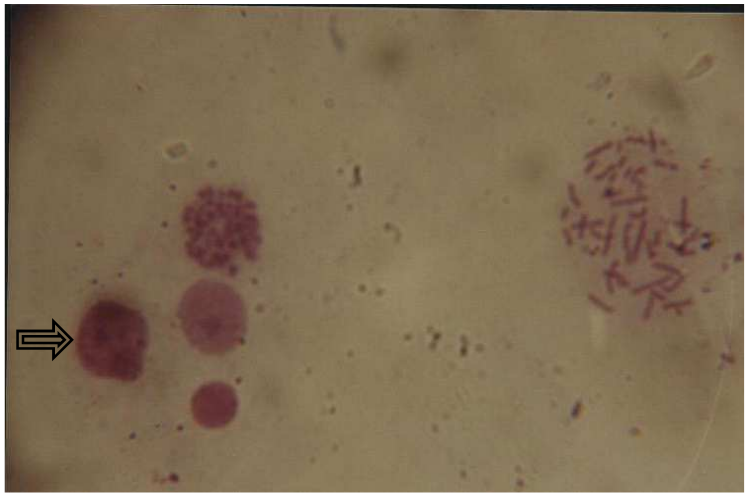
جدول(3-3) تأثير المستخلصات الخام في معاملات الانقسام الخيطي والتحول الارومي لخلايا الدم المحيطي للإنسان

المستخلص	التركيز µg / ml	معامل الانقسام الخيطي MI	معامل التحول الارومي BI
المستخلص المائي للاوراق L1	السيطرة	2.9	5.7
	15.6	2.5	5.1
	31.25	2	5
	62.5	1.9	4.6
	125	1.7	4
	250	1.5	3.9
	500	1.2	3
	1000	0.3	1
المستخلص الايثانولي للأوراقL2	السيطرة	2.3	5.2
	15.6	2.1	5
	31.25	2	4.9
	62.5	1.9	4.3
	125	1.7	4.1
	250	1.5	3.6
	500	0.5	3.1
	1000	0.3	1.1
المستخلص المائي للقلف B1	السيطرة	3	6.8
	15.6	2.7	6
	31.25	2.5	5.9
	62.5	2.2	5.3
	125	2.1	5.1
	250	2	4.9
	500	1.9	4.5
	1000	1.8	4
المستخلص الايثانولي للقلف B2	السيطرة	3.4	7.1
	15.6	3.1	6.6
	31.25	3	6.1
	62.5	2.8	5.4
	125	2.1	4.1
	250	0.7	2
	500	0.5	1.9
	1000	0.4	1.7

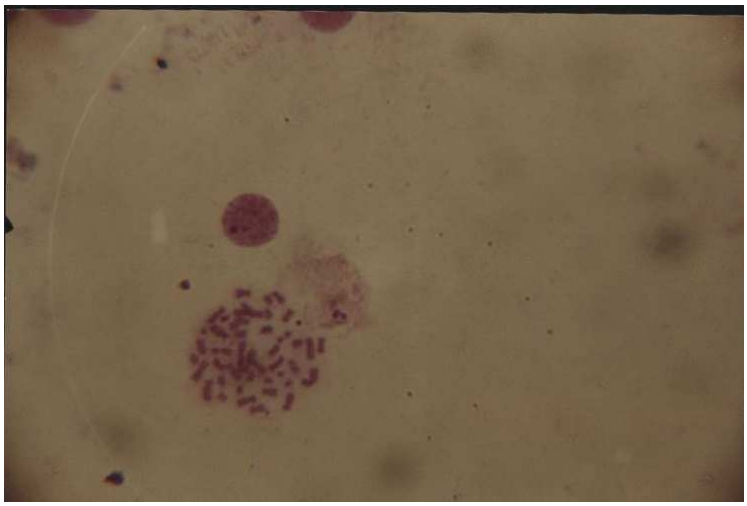
- الجزء المظلل يشير إلى وجود الفرق المعنوي



صورة (17) عدم تأثير مستخلص L1 في الهيئة الكروموسومية للخلايا اللمفاوية للدم المحيطي في الانسان عند التركيز 1000 مايكروغرام / مليلتر . (1000X)



صورة (18) المستخلص L2 موضحاً الطور الانقسامي ومؤشراً الخلية المتحولة الارومية عند التركيز 1000 . (400X)



صورة (19) المستخلص B1 عند التركيز 1000 مايكروغرام / مليلتر .(400X)

3-5 قياس فاعلية المستخلصات الخام كبديل عن الكولجسين

أُخذت التراكيز بعشرة تخافيف ثنائية (15.6- 1000 مايكروغرام/مليلتر) على التوالي ، وذلك لمعرفة إمكانية استخدام المستخلصات الخام المحضرة بوصفها بديلاً عن المادة الموقفة للانقسام (الكولجسين) التي تعمل على إيقاف انقسام الخلايا في مرحلة الـ metaphase وذلك بقطع خيوط المغزل ، مع وجود مجموعة السيطرة التي تمت فيها إضافة الكولجسين في مرحلة الحصاد .

وكانت النتائج في الجدول(3-4) تشير إلى أن أعداد الخلايا اللمفاوية التي كانت عند طور الـ Metaphase منخفضة جداً مقارنة بمجموعة السيطرة عند إضافة المستخلص L1 لها وبفرق معنوي ($P<0.05$) باتجاه الانخفاض ، حيث كانت معاملات الانقسام للتراكيز (15.6-1000) مايكروغرام /مليلتر (0.3-1.2 %) مقارنة بمجموعة السيطرة (4.8%) .

أما عند بقية المستخلصات فقد كانت النتيجة متقاربة أي بوجود فرق معنوي ($P<0.05$) باتجاه الانخفاض بلغ عنده معامل الانقسام للمستخلص الايثانولي للأوراق L2 (0.1-0.5 %) وللمستخلص المائي لقلف الصفصاف B1 (0.1-1.1 %) مقارنة بمجموعة السيطرة (3.8 %) ، أما المستخلص الايثانولي للقلف B2 فكان معامل الانقسام الخيطي للتراكيز (15.6- 1000) مايكروغرام /مليلتر هو (0.2-0.9%) مقارنة بمجموعة السيطرة (4.4%) ، وقد كان للمستخلص B2 أعلى فرق معنوي مقارنة ببقية المستخلصات .

جدول رقم(3-4) معاملات الانقسام الخيطي للمستخلصات الأربعة المعاملة كبديل عن الكولجسين

المستخلص	التركيز µg / ml	معامل الانقسام الخيطي MI
المستخلص المائي للاوراق L1	السيطرة	4.8
	15.6	0.3
	31.25	0.6
	62.5	0.6
	125	0.8
	250	0.9
	500	1
	1000	1.2
المستخلص الايثانولي للأوراق L2	السيطرة	3.5
	15.6	0.1
	31.25	0.1
	62.5	0.2
	125	0.2
	250	0.3
	500	0.4
	1000	0.5
المستخلص المائي للقلف B1	السيطرة	3.8
	15.6	0.1
	31.25	0.2
	62.5	0.4
	125	0.6
	250	0.9
	500	0.7
	1000	1.1
المستخلص الايثانولي للقلف B2	السيطرة	4.4
	15.6	0.2
	31.25	0.2
	62.5	0.3
	125	0.5
	250	0.6
	500	0.7
	1000	0.9

3-6 نتائج قياس نشاط المستخلصات الخام كمادة مشطرة

أستعملت التراكيز السبعة المحضرة لكل مستخلص من المستخلصات الخام (B2, B1 , L2 , L1) على التوالي وحضنت مع الدم مع عدم وجود المادة المشطّرة (PHA) لمعرفة أمكانية كون هذه المستخلصات محفزة لانقسام الخلايا ، وكانت نتيجة الحصاد واضحة بعدم وجود خلايا أرومية أو خلايا منقسمة مقارنة بمجموعة السيطرة التي كانت تتميز بوجود المادة المشطرة PHA وعدم وجود فرق معنوي بدلالة ($P<0.05$) .

الفصل الرابع

المناقشة

Discussion

المناقشة

اختير نبات الصفصاف *Salix acmophylla* بسبب كونه واحداً من النباتات الطبية المتوفرة ، ويمتلك خواصاً طبية وعلاجية متعددة ، فضلا عن احتوائه على عدد من المكونات التي لها تأثيراً مضاداً للخلايا السرطانية (Lee , 2005) . وقد تم أخذ نوعين من المذيبات لإجراء الاستخلاص وهما (الماء والايثانول) وذلك لبيان الفرق في تأثيرهما في الخلايا السرطانية والخلايا الطبيعية ، حيث أوضح Edenharder *et al.* , (2002) بأن فعالية المستخلصات النباتية تختلف باختلاف المذيب .

ومن خلال استخلاص النبات باستخدام الكحول الاثيلي كانت المستخلصات ذات لون اخضر داكن يعود إلى صبغة الكلوروفيل الموجودة في النبات (Harborne,1973) وكانت مستخلصات أوراق نبات الصفصاف جميعها ذات قوام لزج ، قد يعود السبب فيه إلى ما تحويه هذه الأوراق من مواد هلامية واصماغ وشمع على العكس من جميع مستخلصات قلف النبات التي كانت على شكل بلورات يعود السبب فيها إلى خلوها من المواد الهلامية والاصماغ والشمع (AL-Rawi & Chakravarty , 1988) .

تم الكشف في هذه الدراسة عن المكونات الفعالة التي تحويها المستخلصات الخام لنبات الصفصاف كالكلايكوسيدات ، التانينات ، السابونينات ، الفلافونويدات ، القلويدات ، الستيرويدات والتربينات ، وأعطى النبات نتيجة ايجابية للمركبات الأربعة الأولى وسلبية للقلويدات والتربينات والستيرويدات ، فقد ذكر O'Hara *et al.*, (1998) أن المستخلصات النباتية تحتوي على العديد من المركبات الفعالة ، مما جعل من الاختبارات المتعلقة باستعمال الكواشف الكيميائية للتحري عن المركبات ونسبتها أمراً ضرورياً لدراسة النبات قبل تقدير فعاليته العلاجية . وقد جاءت النتيجة مطابقة لما توصل إليه Meier *et al.* , (1988) بأن نبات الصفصاف يحتوي على التانينات والكلايكوسيدات الفينولية والفلافونويدات .

أتضح من خلال دراسة تأثير التراكيز المختلفة للمستخلصات الخام (المائي والايثانولي) أن لمستخلصات قلف وأوراق نبات الصفصاف تأثيراً تثبيطياً واضحاً ذا فرق معنوي في نمو كل من سرطان الحنجرة البشري (HEP-2) وسرطان الغدد اللبنية الفأري (AMN-3) خارج الجسم الحي لثلاث مدد مختلفة (24 ، 48 ، 72 ساعة على التوالي) ، ويتوقف هذا التأثير على التركيز المستخدم ومدة التعريض ، حيث انخفضت النسبة المئوية لحيوية الخلايا عند التراكيز العالية مقارنة مع السيطرة بنسب متفاوتة اعتماداً على نوع الخلايا ونوع المستخلص والجزء النباتي ، وكان التأثير واضحاً لكلا النوعين من المستخلصات (المائي والايثانولي) . أما الخلايا الطبيعية لجنين الجرذ (REF) فلم يلاحظ أي فرق معنوي في تثبيط المستخلصات الأربعة لكلا الجزئين النباتيين (القلف والأوراق) .

يعزى الدور التثبيطي في نمو الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي إلى دور المركبات الفعالة التي تحويها تلك المستخلصات فقد يرجع الدور إلى الكلايكوسيدات الفينولية الموجودة في المستخلصات وخاصة مركب astylsalicin المشتق من الـ Salicin الموجود في جميع أنواع الصفصاف والذي قد يتحلل إلى حامض الـ Salicylic acid حيث وجد Drew *et al.* , (2005) أن المركب يعمل على تعديل عملية الأكسدة في خلايا سرطان القولون عند الفأر من خلال قيامه بتعديل ظهور العديد من الانزيمات التي تعمل بشكل مضاد للأكسدة antioxidant activity ومنها إنزيم glutathione peroxidase . ووجد أن الـ Salicylic acid يقلل من صناعة البروستوكلاندينات السرطانية والالتهابية Pro-inflammatory and potentially neo-plastic prostaglandins من خلال تثبيط عمل النظام الإنزيمي COX الذي يتضمن اثنين من الـ iso-enzymes هما COX-I و COX-II ومن ثم منع عملية تكوين الأوعية الدموية المغذية للخلايا السرطانية Angiogenesis مما يؤدي إلى تثبيط نمو الخلايا و تحفيز عملية الموت المبرمج لها Apoptosis (Ashktorab *et al* ., 2005) .

ويمتلك المركب أيضاً فعالية تثبيطية خارج الجسم الحي (*in vitro*) في قتل الخلايا المتحولة الاورمية لابيض الدم النخاعيني (AML) وبنسبة (73.8%) (EL-Shemy *et al.* , 2003) .

يحتوي نبات الصفصاف أيضا على مركبات الفلافونويدات (Flavonoids) التي تعمل بوصفها مركبات ضد عملية الأكسدة (Antioxidant) في تأثيرها على الخلايا السرطانية (Lopez - Lazaro *et al.* ,2001) ، وقد أوضح Elangovan *et al.* , (1994) أن لمركبات الفلافونويد تأثيراً تثبيطياً شديداً في نمو خلايا الخط السرطاني HEP-2 وكذلك الخط السرطاني Sarcomy-L80 (S-L80) وذلك عن طريق إيقاف عملية تضاعف الـ DNA عند مرحلة S-phase خلال دورة حياة الخلية (Elangovan *et al* ., 1994) .

كذلك تؤثر هذه المركبات على الآلية السرطانية من خلال تثبيط فعالية الجين Bcl-2 ونتيجة للخلل الحاصل في هذا الجين تدخل الخلية السرطانية مرحلة الموت المبرمج Apoptosis ومثلما هو في العديد من الخطوط الخلوية لسرطان الدم البشري (Human Leukemic cell lines) (Caceres-Cortes *et al.* , 2001& Pellechia & Reed, 2004) . ووجد أن لهذه المركبات أيضاً القدرة على التأثير السمي على سرطان البروستات (Prostate cancer) من خلال تثبيط العامل (VEGF) Vascular Endothelial Growth Factor المسؤول عن عملية أساسية وضرورية لنمو وانتشار الخلية السرطانية وهي عملية تكوين الأوعية الدموية الجديدة Angiogenesis . (Adhami *et al.* , 2003)

تؤثر المركبات الفينولية المتعددة أيضاً وخاصة منها المركبات الفينولية المضادة لعملية الأكسدة Antioxidant في نمو الخلايا السرطانية بشكل كبير بسبب امتلاكها القابلية على كسح (Scavenging) الجذور الحرة المتولدة عند تحول الخلايا الطبيعية إلى خلايا سرطانية ، إذ تحتوي هذه المركبات على مجموعة هيدروكسيل (3-hydroxyl group) التي من شأنها أن تزيد من قابليتها على كسح الجذور الحرة المتولدة في الخلايا السرطانية ومن ثم توجه الخلية للدخول في مرحلة الموت المبرمج ، ومن بين الخطوط التي تثبطها تلك المركبات هي : (HEP-2) و Breast carcinoma (BC1) و Human colon cancer (CASK1) و Human (DV145) و prostate carcinoma (Forkmann and Martens , 2001; Lopez –Lazaro , 2002) .

أظهرت النتائج أن التأثير التثبيطي كان أكثر وضوحاً عند مدة التعريض 72 ساعة للمستخلصات الخام (المائي والايثانولي) في الخطوط الخلوية السرطانية بالمقارنة مع مدد التعريض الأخرى (24 ، 48) ساعة . ويعد التركيز مع عامل الوقت عوامل مؤثرة أساسية في شدة التأثير التثبيطي للمستخلصات الخام لنبات الصفصاف في الخطوط الخلوية السرطانية وتسمى هذه الظاهرة بـ Dose and time dependant phenomenon ، وهذه النتيجة جاءت متطابقة مع ما أشار إليه الباحث , Huang *et al.* (2004) الذي درس التأثير التثبيطي للمستخلص المائي الخام لعشب *Phylanthus urinaria* عند الخط السرطاني لسرطان الدم HL-60 ، بشكل عام كان التأثير التثبيطي واضحاً منذ مدة تعريض 24 ساعة والى 72 ساعة مع ازدياد في شدة السمية كلما زاد التركيز ومدة التعريض ، أي إن مدة التعريض 72 ساعة أعطت أعلى شدة قتل من الناحية الإحصائية .

وتطابقت النتائج أيضاً مع نتائج العديد من الباحثين في دراسات محلية حول امتلاك المستخلصات النباتية مركبات الايض الثانوي ذات الفعالية المضادة للخلايا السرطانية التي أعتمد تأثيرها على التركيز ومدة التعريض ، فقد توصل العتابي (2001) إلى أن

مستخلص نبات سم الفراخ *Withania somnifera* يمتلك تأثيراً مثبطاً لنمو سرطان الخلية البلازمية SU-99 إذ يعزى ذلك التأثير لمركبات الوذا فرين المثبطة لانقسام الخلايا في طورها الاستوائي . وأكدت الباحثتان اليعقوبي (2004) و قدوري (2004) في دراستين منفصلتين امتلاك مستخلصات نبات الهيل والحرمل على الترتيب فعالية مثبطة لنمو سرطان الحنجرة البشري (HEP-2) وخلايا سرطان العضلات البشري RD .

وجاءت أيضاً دراسة الحلي (2004) لتؤكد دور المركبات الفينولية المتعددة Polyphenol ومن ضمنها الفلافونويدات Flavonoids لعشب السعد في عملها المضاد للأكسدة Antioxidant على الخلايا السرطانية HEP-2 و RD و AMN-3 معتمداً أيضاً على التركيز ونوع المستخلص ، في حين لم يكن لها تأثير واضح في الخلايا الطبيعية، ووجد Sa'eed (2004) أن لبوليفينولات الشاي الاخضر تأثيراً تثبيطياً يفوق تأثير الشاي الأسود . وأنجزت دراسة للباحثة الجنابي (2004) وجدت أن مزيج مستخلصي نبات الثوم والحبة السوداء يمتلك فعالية كبيرة في قتل وتثبيط وانقسام الخلايا السرطانية لمرضى ابيضاض الدم النخاعيني المزمن (CML) ، فضلاً عن كون هذه المستخلصات تمتلك فعالية مضادة للتطفير ، إذ تقلل من السمية الوراثية الخلوية لعقار Methotrexate .

وتجدر الإشارة إلى أن هنالك تبايناً بين تأثير المستخلصات الخام في ما بينها ، والسبب في ذلك يعود إلى طبيعة المركبات الموجودة في كل مستخلص خام وتفاعلها مع الطبيعة الايضية لكل نوع من الخطوط الخلوية السرطانية (Shoieb *et al.* , 2003) لذلك تم تشخيص المستخلصات الخام الفضلى لنبات الصفصاف من ناحية ابتداء التأثير التثبيطي بالمعنوية العالية عند الخطوط الخلوية السرطانية المختلفة .

تتميز بعض مركبات الايض الثانوي النباتية ببعض الانتقائية (Selectivity) في التأثير في الخلايا السرطانية ، لذلك تمت دراسة سمية المستخلصات الخام في الخلايا الطبيعية لجنين الجرذ Rat Embryo Fibroblast (REF) لمعرفة تأثيرها على الخلايا الطبيعية، ومن خلال النتائج لم يكن هنالك تأثير ذو فرق معنوي في خلايا (REF) ، وقد يرجع سبب ذلك إلى عدد من الخواص الايضية التي تمتلكها الخلايا السرطانية وغير الموجودة في الخلايا الطبيعية ، مثل الطبيعة الايضية لتكوين الأوعية الدموية الجديدة وكذلك شكل وطبيعة المستقبلات الموجودة على سطح الخلية السرطانية وإمكانية ارتباطها بالمركبات المختلفة (Folkman , 2000 ; Moteki *et al.* , 2002) .

كما أن هناك أيضاً بعض الجينات أو البروتينات الموجودة في الخلايا السرطانية بشكل مختلف عما موجود في الخلية الطبيعية يمكن ملاحظتها من خلال السلوك الايضي للخلايا السرطانية المتمثل في قابليتها على الغزو والانتشار ، لذلك يمكن أن تكون هذه البروتينات هدفاً لمركبات الايض الثانوي فقد تعمل مركبات نبات الصفصاف في تأثيرها من خلال إيقاف عمل إنزيم أكسدة الدهون (Lipoxygenase) عن طريق تثبيط عمل الجين 5-lipoxygenase mRNA المعبر عنه بشكل عال (Over expressed) في الخلايا السرطانية ، الذي يؤدي بدوره إلى تثبيط إنزيم Topoisomerase المسؤول عن إعادة ارتباط الـ DNA واستمرار نمو الخلية (Cell proliferation) وعند ذلك يتوقف نمو الخلية السرطانية لتدخل مرحلة الموت المبرمج (Hoernlein *et al.* , 1999) .

قد تكون بعض العوامل النشطة في الخلايا السرطانية هدفاً لمركبات الايض الثانوي ، مثل العامل (NF-B) Nuclear transcription factor الذي يلعب دوراً مهماً واساسياً في تنظيم دورة حياة الخلية ونموها من خلال التشفير عن السايتوكينات (Cytokines) وعوامل النمو ، لذلك فأن تثبيطه سوف يؤدي إلى حدوث خلل في دورة الحياة وبالتالي تدخل الخلية مرحلة الموت المبرمج (Ahmed *et al.* , 2000) .

إن من أهم الأسباب التي تؤثر فيها المستخلصات الخام لنبات الصفصاف على الخلايا السرطانية هو نفاذية جدران الخلايا السرطانية (Permeability) ، إذ قد يكون هناك خلل واضح في نفاذية جدران الخلايا السرطانية وهو من الأمور التي تتغير نتيجة تحول الخلايا الطبيعية إلى خلايا سرطانية مما يسهل دخول المركبات إلى داخل الخلية وبشكل عشوائي وغير منتظم فيؤثر سلباً على الخلية السرطانية ، في حين يكون هناك نظام مسيطر عليه لدخول وخروج المواد من والى داخل الخلية الطبيعية (Belijanski , 2000 ; Gratton *et al.* , 2003) .

قد تمتلك مركبات الايض الثانوي النباتية تأثيرا تثبيطياً في نمو الخلايا السرطانية المختلفة لكن في الوقت نفسه قد يكون لها تأثير تحفيزي أو تثبيطي في انقسام بعض خلايا الجهاز المناعي مثل الخلايا اللمفاوية (Lymphocytes) أو الخلايا البلعمية (Macrophage) وغيرها ، وتحتوي النباتات أو الأعشاب الطبية على العديد من المركبات التي من شأنها أن تثبط نمو خلايا معينة وكذلك أن تحفز على انقسام خلايا أخرى (Selgman *et al.* , 2003) .

لذلك تمت دراسة التأثير الذي من الممكن أن تحدثه المستخلصات الخام لنبات الصفصاف في خلايا الدم المحيطي للإنسان ومعرفة التغيرات التي تحدث وخاصة عند التراكيز العالية حيث أظهرت نتائج دراسة معامل التحول الارومي Blastotic Index ومعامل الانقسام الخيطي Mitotic Index حدوث انخفاض في الـ MI و BI لكل من المستخلصات الأربعة (L1, L2 , B1, B2) على التوالي ولكن بدون أن يكون لهذا التأثير فرق معنوي

واضح سوى في بعض التراكيز العالية للمستخلصات كالمستخلص المائي والايثانولي للأوراق والمستخلص الايثانولي للقلف ولم يكن هناك فرق معنوي للمستخلص المائي للقلف في كل من BI و MI . كما هو موضح في الجدول رقم (3-3) وقد يعود السبب في التثبيط إلى طبيعة المواد الايضية الموجودة نسبتها في كل مستخلص ، وجاءت هذه النتيجة مطابقة لنتيجة الباحث Wilasrumee *et al.* , (2002) الذي أختبر تأثير المستخلصات الخام لنبات *Sylibum mariaum* في انقسام الخلايا اللمفاوية بوجود وغياب العامل المشطر .

لم تظهر الدراسة للمستخلصين (المائي والايثانولي) لكل من القلف والأوراق دوراً مشابها لعمل الكولجسين المستعمل في إيقاف انقسام للخلايا اللمفاوية الطبيعية ، حيث تم تأشير فرق معنوي باتجاه الانخفاض في معدل الخلايا التي توقفت في مرحلة الـ metaphase جدول (3-4) ، وقد يرجع السبب في ذلك إلى أن عمل الكولجسين يقوم على أساس تقطيع خيوط المغزل في هذه المرحلة مما يمنع الخلايا من أكمال دورة حياتها ، وقد يكون لمستخلصات نبات الصفصاف دور في تثبيط الخلايا في مرحلة قبل الـ metaphase كأن تكون في مرحلة G1 أو مرحلة تصنيع الـ DNA (S phase) . لذلك يقل عدد الخلايا المنقسمة أو التي تصل إلى طور الـ metaphase .

ولم يثبت أيضاً دور المستخلصات الخام للنبات في تحفيز الخلايا على التحول الارومي أو الانقسام بغياب المادة المشطرة PHA وقد يعود السبب إلى إن المواد الداخلة في هذه المستخلصات لا تعمل على تحفيز الخلايا على الانقسام .

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

الاستنتاجات

خرجت الدراسة بجملة من الاستنتاجات هي :-

1- إن للمستخلصين الخام (المائي والايثانولي) لأوراق وقلف نبات الصفصاف تأثيراً تثبيطياً في نمو خلايا الخطوط الخلوية السرطانية (AMN-3 , HEP-2) خارج الجسم الحي بحسب التركيز والوقت .

2- إن المستخلص المائي أفضل المستخلصات الخام في تأثيره التثبيطي في الخط الخلوي السرطاني HEP-2 ، وان المستخلص الايثانولي الخام هو الأفضل في التأثير في الخط الخلوي السرطاني AMN-3 .

3- إن المستخلصات الخام لأوراق وقلف نبات الصفصاف ليس لها تأثير تثبيطي بفرق معنوي ملحوظ على الخط الطبيعي REF .

4- على الرغم من تأثير المستخلصات الخام تأثيراً معنوياً في خطوط الخلايا السرطانية ، إلا إن لها تأثيراً غير معنوي في الخلايا اللمفاوية للدم المحيطي للإنسان .

5- لا تمتلك المستخلصات الخام لأوراق وقلف نبات الصفصاف مواصفات المادة المشطرة فضلاً عن انها لاتمتلك كفاءة الكولجسين في إيقاف انقسام الخلايا اللمفاوية الطبيعية في مرحلة الـ metaphase .

التوصيات

1- إجراء دراسة لمعرفة تأثير المستخلصات الخام لنبات الصفصاف في الحيوانات المختبرية (*in vivo*) .

2- عزل وتنقية المركبات الفعّالة الموجودة في نبات الصفصاف ومعرفة تأثير كل منها في نمو الخلايا السرطانية .

3- دراسة التأثير الجيني و الآلية المسببة للتأثير التثبيطي للمركبات الفعالة في نبات الصفصاف على خطوط خلوية سرطانية اخرى خارج الجسم الحي

4- دراسة التأثير التثبيطي لمعامل الانقسام الخيطي لخلايا غير طبيعية كأن تكون من المرضى المصابين بأمراض اللوكيميا او اللمفوما Lymphoma .

5- دراسة نشاط المستخلصات الخام في الجهاز المناعي خارج الجسم من خلال عملية البلعمة وتأثير المستخلصات في نشاط خلايا Macrophage و Neutrophil .

المصادر

References

المصادر العربية

• الجنابي ، أزهار محمود حليم (2004) . دراسة تأثير بعض المستخلصات النباتية في الخلايا اللمفاوية لمرضى ابيضاض الدم النخاعيني المزمن . أطروحة دكتوراه، كلية العلوم – الجامعة المستنصرية.

• الحلي ، زيد عبد المنعم (2004) . تأثير المستخلصات الخام لعشب السعد *Cyperus rotundus L.* في خطوط الخلايا السرطانية . رسالة ماجستير ، كلية العلوم – جامعة بغداد .

• الخفاجي ، باسمة ربيع أحمد (2000) . تأثير مستخلصات نبات سم الفراخ والميرمية والصفصاف في بعض أنواع الفطريات الجلدية . رسالة ماجستير ، كلية العلوم – الجامعة المستنصرية .

•الشحات ، نصير أبو زيد (1986) . النباتات والأعشاب الطبية ، المركز القومي للبحوث/ القاهرة ، 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 الاورام السرطانية المغروسة في الفئران . رسالة ماجستير ، كلية الطب البيطري – جامعة بغداد .

• العتابي ، شلال مراد (2001) . تأثير المستخلص الكحولي الخام لاوراق نبات سم الفراخ *Withania somnifera Dun* في نمو الخلايا السرطانية في الزجاج وفي بعض المعايير الفسلجية في الفئران . أطروحة دكتوراه ، الطب البيطري – جامعة بغداد .

• اليعقوبي ، كفاح جبار شاكر (2004) . دراسة تأثير الكحول الاثيلي والهكسان لثمار نبات الهيل *Elettaria cardamom* في خطوط الخلايا السرطانية والخلايا اللمفاوية للدم المحيطي للانسان خارج الجسم . رسالة ماجستير ، كلية العلوم – جامعة الكوفة .

• حسن ، مفيد قائد أحمد (2002) . أستخدام بعض المستخلصات النباتية لتثبيط الاثر السمي الوراثي لبعض العقاقير المضادة للسرطان في الفأر . أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم – جامعة بابل .

• قدوري ، جيهان فاضل أشرف (2004) . تأثير بعض المستخلصات النباتية المحلية على الخلايا الطبيعية والسرطانية (خارج الجسم) . رسالة ماجستير ، كلية العلوم – جامعة النهرين .

المصادر الاجنبية

Abdul-Majeed,M.R. (2000) . Induction and characterization of Su.99 plasmacytoma cell line and its effect on mice immune response . Ph D thesis ,Nahrain University Iraq .

Aberanthy E.(2000).Principles of biotherapy and gene therapy.In: Nevidjon BM and Fowers KW(eds.).A nurse's guide to cancer care.Lippincott, philadelphia,pp:241-256.

Abu Ghdeib,S.I. and Shtayeh, M.S.A.(1999).Anti Fungal activity of plant extracts against dermophytes . Mycoses,42:665-672.

Adhami,V.M. ; Ahmed,N. and Mukhtar,H.(2003).Molecular target for green tea inprostate cancer prevention .J.Nutr.,133:2417-2424.

Ahmed,N. ; Gupta,S. ; Husain,M.M.; Heiskanen,K.M. and Muktar,H.(2000).Differential antiprolifrative and apoptotic response of sang uinarine for cancer cells versus normal cells . Clin.Cancer.Res.,6:1524-1528.

AL-Abid,M.R. (1985).ZurZusammemsetrung der Absuchlu B memtrame in *Phoenix dactilyfra* Wurzburg Univ . Wurzburg F.R. of Germany ,cited by AL-Maistry,M.(1999) .Effect of oil and alcoholic extract of *Azadirchta indica* on some pathogenic fungi of plant . Msc. Thesis college of science. AL-Mustansriya University.

AL-Rawi,A. and Charkravarty,H.L.(1988). Medicinal plants of Iraq. 2ed .Ed.,Ministry of Agric.,Baghdad.

Ames,B.; Gold,L.; and Willett,W.C.(1995).The casues and prevention of cancer. Proceding of the National Academy of Sciences, 92: 525-5265.

Anessiny,C and Perez,C.(1993).Screeieng of plants used in Argentine Folk medicine for anti microbial activity .J.Ethnopharmacology . 39 :119-128.

References

Antonadou,D.; Pepelassii,M.; Synodinou,M.; Puglisi,M. and Throuvalas, N.(2002).Propholatic use of amifostine to prevent Radiochemotherapy-induced mucositis and xerostomia in Head and neck cancer patients .Int.J.Radiat Oncol.Biol.phys, 52:739-747.

Ashis, K.M.;Sourav, B.; Nabanita,S. and Anil,C.G.(2001). Advances in Cancer therapy with plant based natural products.Chemobio Research International, Salt lake, Calcutta,India 8:1467-1486.

Ashktorab,H.;Dawkins,F.W. ; Mohamed,R. ; Larbi,D. and Smoot,D.T.(2005).Apoptosis induced by aspirin and 5-fluorouracil in human colonic adenocarcinoma cell .Depatment of Medicine, Division of Hematology /Oncology,Howard University Cancer Center,Howard University , Washington,50 : 1025-32.

Axelrod, R.S.; Havas, H.; Murasko, D.M.; Bushnell, B. and Guan, C.F. (1988). Effect of the mixed bacterial vaccine on the immune response of patients with non-small cell lung cancer and refractory malignancies. Cancer, 61:2219-2230.

Barclay,M.M.(2000).Cancer surgery,In:Neridjon,B.M. and Sower, K.W.(ed.).Anurse's guide to cancer care.Lippincot, Philadelphia: 92: 331-344.

Baron,R., And Borgen,P.(1997).Genetic susceptibility for breast Nursing form,24: 461-468.

Bast,R.C.; Zalutsky,M.R.; Kreitman,R.J.; Sausville,E.A.; and Frankel, A.G.(2000). Principles of biotherputics. Monoclonal Serotheropy. In: Bast,R.C.; Kufe,D.W.; Pollock,R.F.; Weichselboum, R.R.; Holland,J.F.; Ferri III, E. And Ganster, T.E.(eds.) Cancer medicine (5th ed.).Bc. Decker Inc.Canada.

Beek, W.T.; Cass, C.E. and Houghton,P.J.(2000).Microtubule targeting anticancer druges derived from plants and microbes *Vinca* alkaliods, Taxanes and Epothilons. In: Bast,R.C.; kufe, D.W.; Pollock, R.F.; weichselboum,R.R.; Holland,J.F.; Ferri III, E. And Ganster, T.E.(eds.).Cancer medicine(5th ed.). BC. Decker In. Canada .

References

Belijanski,M.(2000). The anticancer agent PB-100 selectivity active malignant cell inhibits multiplication of sixteen malignant cell lines,even multidrug resistant . Genet.Mol.Biol.,23:224-235.

Beniston,R.G.; Morgan,I.M.; O'Brienv,Campo M.S.and Quercetion,E p.53 in papilloma virus oncogenic cell transformation. Carcinogenesis (2001). 22 :1069-76.Department of Veterinary pathology,Glasgow University,Garscube Estate, Glasgow G.611 QH.UK.

Betancur-Galvis,L.A. ; Saez,J. ; Granades ,H.. ; Salazer,A. and Ossa,J.E.(1999).Antitumer and antiviral activity of Colombian medicinal plant extracts .Mem.Inst. Oswaldo Cruz,94:531-535.

Boege, F.; Strub,T.; Kehr,A.; Boesenbrg,C.; Christiansen, K.; Andersen, A.;Jakob, F. And Kohrle,J.(1996).Selected novel Flavon inhibited the DNA binding or of the DNA religation Step of Eukaryotic Topoisomerase I.J.Bio.Chem., 271:2262-227.

Bown, D.(1995). Encyclopaedia of Herbs and their Uses. Dorling Kindersley , London .ISBN . 0-7513 -020-31.

Brakenhielm,R. Cao,Y. Coa,(2001). Suppression of angiogenesis, Tumor growth and wound healing by resweratol,a natural Compound in red wine and grapes,Fed, Am.Soc. Exp.Biol. 8:1798-1800.

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.

Cantley,L.C.,Auger,K.R. Carpenter,C.; Duck worth,B.;Grazian A.;Kapeller,R., and Soltoff,S.(1991).Oncogenes and signal Transdruction.Cell 64:281-302.

Carins,J.(1975).Mutation selection and the natural history of cancer. Nature,255:197-201.

References

Caudell,K. ;Cuaron,L. ; and Gallucci,B. (1996). Cancer biology : Molecular and cellular aspects .In R. McCorkle,M. Grant,M. Frank-Stromborg , and S. Baird (eds.) ,Cancer nursing:Acomprebensive textbook (2nd ed.,) Philadelphia:pp:150-170.

Chabner,B.A. ; Allegra,C.J. ; Curt,G.A. and Calabresi,P.(1996). Antineoplastic agents .In Goodman and Gilman`s .The pharmacological basis of therputics . (9th ed).New York.pp:1233-1290.

Chrubasik , S.(2000). Pain therapy using herbal medicines .Gynakologe , 33 :59-64.

Cragg,GM. Newman,DJ. Snader, KM.(1997) Natural products in drug discovery and development. Jnat prod;60:52-60.

Craig,W.J.(1997).Phytochemicals:guardians of our health.J.Am. Diet.Assoc.10:199-204.

Craig,W.J. (1999).Health – promotin properties of common herbs. Am.J.Clin.Nut.,70:4915-4995.

Cross,M. and Dexter,T.M.(1991).Groth factors. An development, transformation,and tumorigenesis.Cell 64:271-280.

Culkier,Daniel,M.D. and McCullough,V.(1993).Coping with Radiation Therapy:Aray of Hope.Lawell House.

Dahanukar,S.A.; Kutkarni, R.A.; and Regen, N.N.(2000). Pharmacology of medicinal plants and natural products.India J.pharm., 23:81-118.

Donehower, R.C. ; Abeloff, M.D. and Perry, M.C. (1994). Chemotherapy. In : Abeloff, M.D. ; Armitage, J. ok Lichter, A.S. and Niederhuber, J.E.(eds.) clinical oncolojy Churchill Livingstone, pp: 201-216.

Drew, J.E. ;Arthur, J.R.;Farquharson, A.J. ;Russell,W.R.; Morrice,P.C.and Duthie,g.g.(2005) .Salicylic acid modulates oxidative stress and glutathione peroxidase activity in the rat colon.70 (6) ; 888-93 .

References

Edenharder,R.;Sager,J.W.;Glatt,H.;Muckel,E. and Platt , K.L (2002). Protection by beverages ,fruits , vegetables, herbs, and Flavonoids against genotoxicitiy of 2-acetylaminoflurorine and amino-1-methyl-6-phenylimidazol (4,5-b) pyridine (PHIP) in metabolically competent V79 cell.Mutat.Res.23 :57-72 .

Eisenberg.D.M; Kessler,R.C.; Foster,C.; Norlock , F.E.; Calkins, D.R.and Delbanco,TL (1993) .Unconventional medicine in the United States .Preference, costs and patterns of use .N Engl J Med .328: 246-52.

Elangovan,V. ; Ramamrthy,N. ; Balasubramabian,S. ; Sekar,N.and Govidsany .(1994). Studies on the antiprolifrative effect of some naturally occurring bioflavonoidal compounds against human carcinoma of larynx and Sarcoma-180 cell lines . India J.Pharm.,26:266-269.

EL-Shemy, HA. ; Aboul-Enein AM. ; Aboul-Eneien MI. ;Issa SI. ;Fujita K .(2003) .The effect of willow leaf extracts on human leukemic cells in vitro,36(4) : 387-9 .

Folkman,J.(2000).Tumor Angiogenesis .In Bast,R.C. ; Kufe,D.W. ; Pollock,R.F. ; Weichselboum,R.R.; Holland,J.F. ; Ferri III ,E. and Ganster,T.E.(eds).Cancer Medicine (5^{th} ed.) . BC.Decker Inc.Canada.

Forastiere,AA, Goepfert H.Maor M.et al.(2003) .Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer.N. Engl J. Med 349:2091-8.

Forkmann,G.and Martens,S.(2001).Metabolic engineering and application of flavonoids .Curr.Opinion Biotech.,12:155-160.

Frank M., Heusinkveld,K., and Rohan,K.(1996). Evaluting cancer risks and preventive oncology. In R..McCorkle,M.Grant,M Fran-Stromborgy and S.Baird(eds.), Cancer mursing : A Comperbensive textbook (2^{nd} ed.,pp. 213-264).Philadelphia: W.B. Saunders.

References

Freshney ,R.I.(2000).Culture of animal cell :Amanual for basic technique (4th ed).Wileyliss,A John Wiley and sons.Inc.publicatioNew york.

Gaynor,E.R. and Fisher,R.I.(1994).Biological therapy.In: Abeloff, M.D.; Armitage,J.D.;Lichter, and A.S. and Niederhuber, J.E.(eds.). Clinical Oncology. Churchill Livingstone.

Gough, M.J.; Meleher, A.A.; Ahmed, A.; Critlendfn, M.R.; Riddle, D.S.; Linardakis, E.; Ruchatz, A.N.; Emiliusen, L.M. and Vile, R.G. (2001). Macrophages or chestrate the immune response to tumor cell death. Cancer Res., 61:7240.

Gragg, G. M. ; Schepartz, S. A.; Suffness, M. ; Grever, M.R.(1993) . The taxol Supply crisis . New NCI policies for handling The larg-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents, 56 :1657-68 .

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 . Cancer Cell,4:1-39.

Greenlee, R.T. ; Hill –Hamon, M.B.; Murray, T.;Thun, M. (2001) . Cancer Statistics .Cancer J Clin . 51 : 15-36 .

Hainaut,P. And Pfeirfer,G.P.(2001).Pattern of p.53 G-T. Transversions in lung cancers reflect the primary mutagenic Signature of DNA-damage by tobacco smoke. Carcinogenesis,22:367-374.

Harborn,J.B.(1973).Pytochemical methods .Science paper backs , Chapman and Hall ,London,pp:110.

Harborn,J.B.(1984).Pytochemical methods 2nd ed chapman and Hall.p:288.

Hoernlein,R.F. ; Orlikowsky,T. ; Niethammers,O. ; Sailer,E.R. ; Simmer,T. ; Danneeker,G.E. and Ammon,H.P.T.(1999).Acetyl-H-Keto-β-Boswellie Acid induces Apoptosis in HL-60 and CCRF-CEM cells and inhibits topisomerase 1.Pharmacology: 288:613-619.

References

Hoffmann,D.(2000) .Therapeuti Herbalism.Santa Cruz, Calif : Terapeutic Herbalism Press.

Hoglund,M.;Sall,T.;Mitelman,F.; Mandahl, N.Elmula,I,F.(2001). Identification of cytogentic subgroups and karyotypic Pathways in transitional cell carcinoma.Cancer Res., 61:8246-8246.

Hoglund,M.;Gisselsson,D.;Hansen,G.B.;Sall, T. And Mitelman,F . (2002) .Multivariate analysis of chromosomal hnbalances in breast cancer delineates cytogenetic pathways and reveals complex relationships among inbalances.Cancer Res., 62:2675-2680

Hung,S.T. ; Yang,R.C. ; Chen,M.Y. and Pang,J.H.(2004).Phyllanthus urinaria induces the Fas receptor/ lig and expression and ceramide mediated apoptosis in HL-60 Cell : Life Sei.,75:339-451.

Hunter,T..(1991).Cooperation between oncogenes-cell 64,249-270.

Ibrahim, A.I.S. (2005). Effect of Crude Extracts of *Salivia triloba* L. on Malignant Cell Lines and Normal Cell Lines.Ph.D.Thesis, College of Science, University of Bagdad ,Baghdad, Iraq .

Iro,H.; Waldfahrer, F.; Altendorf-Hofmann,A.; Weidenbecher,M. ; Sauer, R.; and Steiner,W.(1998)Transoral laser surgery of supraglottic Cancer:follow-up of 141 patients.Arch Otolaryngol Head Neck Surg,124:1245-50.

Isaiah J.(2000).Fidler Regulation of Neoplastic Angiogenesis,J. Of the National Cancer In st. Monographs.28: 10-13.

Jones,S.B. and Luchsinger,A.E.(1987) .Plant Systematics,(2ed.) New York.

Kamsteeg,M.; Rutherford, T.; Sapl, E.;Hanczaruk,B.; Shahabi, S.; Flick,M.; Brown,D. And Mor, G.(2003). Phonoxodiol An isoflovone analog induces apoptpsis in chemo resistant Ovarian cancer cells.Oncogene,22:11-2620.

References

Kaneko ,M.; Morimurra,K.;Nishikawa, T.; Wanibuchi, H.; Takada, N.;Osugi, H.; Ktnoshita, H. and Fukushima, S.(2002). Different genetic alterations in rat forstmach Tumors Induced by genotoxic and non-genotoxic carcinogens. Carcinogensis.23:1729-17335.

Kluge, W.S. and Cumming, M.R. (2000). Concepts study of retinoblastoma. Prentice Hall , Upper Soddle River, New Jersswy . pp:12,23,635.

Kong,J.M.; Gohn.K.; Chia,L.S.and Chia,T.F.(2003).Recent advanced in traditional plant drugs and orchids.National Institute of Education ,Nanyang Technological University,I.Nangang Walk,Singapore(1):7-21.

Krauss, RM. Editorial,(2002)."Individualized Hormon Replacement Therapy" N.Engl J. Med.346:1017-1018.

Kufe,D.W.; Advani, S. And Weichselboum,R.R.(2000). Cancer gene therapy.In: Bast,R.C.;Kufe,D.W.; Pollock,R.F.;Weichselboum, R.R.; Holland,J.F.; Ferri III, E. And Ganster, T.E.;(eds.) Cancer Medicine (5th ed).BC. Decker Inc. Canada.

Kuhn,M.A. and Winston,D.(2001) . Herbal therapy and Supplements Philadelphia,Pa: Lippincott.

Kumar V,Cotran RS. and Robbins SL.(2003).Robbins Basic pathology (7th ed.).Saunders,Pennsylvania,U.S.A.

Kundson,A.C.(1971).Mutation and Cancer:statistical study of retinoblastoma. Pro. Nathl.Acad. Sci.,68:820-823.

Kundson,A.C.(1986).Genetic of human cancer.Ann. Rev. Genet.,20:231-251.
pp:165-210.

Lee, C.O.(2005) .Communicaing facts and knowledge in cancer complementary and alternative medicine .Semin Oncol Nurs ,21 (3) : 201-14 .

Leslie,T.(2000).Plant based Drugs and Medicines Raintree Nutrition,Inc.pp.1-7.

References

Li, M.; Ciu,J.R.; Ye.Y.; Zhang,L.H.; Wang, K,; Gares, G.; Crose,J.; Wright, M and Tack, J.I.(2002).Antitumor activity of Zajoene, anatural compound purified from Garic: Antimitotic and microtubule interaction properties. Carcinogenesis,23:573-579.

Lieberman MW and Lebovitz RM(1996).Neoplasia.In: Kissane JM, Anderson Pathology (9th ed.).Ms by Company, Baltimore, Pp:513-547.

Liotta,L.(1992).Cancer cell invassion and metastasis.American Scientific,266: 54-62.

Liu, J. K. (2000). Natural drug expectation from the analysis of the 20 most highly ranked transnational pharmaceutical corporations Chin Tradit Herb Drugs , 31: 481-7 .

Liu,Z.Q.; Ma,Lp, Zhou, B.;Yang Land Lin,Z.L.(2000). Antioxidative effects of green tea polyphenols on free radical initiated and photosensitized peroxidation of human low density lipoprptein.Chemistry and Physics of Lipids,106:53-63.

Locker, G.Y. (1995). Pharmacology of chemotherapeutic agents. : Straus, D.J. (ed) Educational Review manual in oncology . Journal puplishing Group , New York, U.S.A. pp: 3-6.

Lopez-Lazaro,M. ; Galvor,M. ; Martin-Lorder,C.and Ayuso,M.J.(2001).Cytotoxicity of flavonoids on cancer cell lines .Structure –activity relation-ship.Curr.Med.Chem.,1:82-114.

Lopez-Lazaro,M.(2002).Flavonoids as anticancer agents : Structure – activity relationship study . Curr. Med.Chem.,2:691-714.

Maggiorella,L.;Frascogna,V.;Poullain, M.G.;Berlion,M.;Lucas,C.; Razy, S.D.; Eschwege, F. And Bourhis, J.(2001).The Olivacine S16020 enhances the anhances the antitumor Effect of ionizing relation without increasing radio-induced Mucosities.Clinical cancer Res.,7:2091-2095.

Malterud, K.E. ; Bremnes,T. ; Faegri, A. ; Moe, T. and Herriksen, L.M.(1985) . Flavonoids from the wood of *Salix caorea* as inhibitors of wood destroying fungi. J. Nat. Prod . 48:559-563.

References

Mather,J.P. and Roberts,P.E.(1998).Introduction to cell and tissue culture theory and technique. Plenum press,New York and London ,pp:175-194.

Mahony,D.E. ; Gilliatt,E. ; Dawson,S. ; Stockdal,E. And Lee,S.H.S.(1989).Vero cell assay for rapid detection of Clostridium Perfringins enterotoxin. Appl. Environ.Microbiol.,55:2141-43.

Mckenzie, I.(2003).Immuntherapy of cancer from 24th Congress of the International Association for breast cancer Research 5 :53-62.

McLeod,H.L;Evans,W.E.(2001).Pharmacogenomics: Unlocking the human genome for better drug therapy,Annu Rev pharmacool Toxical 41:101-121.

Meier , B.; Sticher,O. ;Julcunen , T.R.(1988).Pharmaceutical aspects of the use of Willows in herbal Remedies .Plant media , 54:559-560.

Mettlin,C.,and Michalek,A.(1996).The causes of cancer.In R. McCorkle,M.Grant,M.Frank-Stromborg,and S.Baird (eds), Cancer nursing :A comprebensiv text (2nd ed.,pp. 138-149).Philadelphia :W.B. Saunders.

Moore,A.E. ; Sabachewesky, L. and Toolen,H.W.(1955).Culture characteris of four permanent lines of human cancer cells. Cancer Res.15:598-605.

Morrow,C.S. and Cowan,K,H.(2000).Drug resistance and Its Clinical circumvention In: Bast,R.C. ;Kufe,D.W. ;Pollock,R.E.; Weichselbouum,R.R. ; Holland,J.F. Frei III ,E.and Ganster,T.S.(eds.) Cancer Medidine .(5th ed).BCDecker Inc. Canada.

Moteki,H. ; Hibasmai,H. ; Yamada,Y. ; Katsuzaki,H. ; Imai,K. and Komiya,T.(2002). Specific induction of apoptosis 1,8-cineole in two human leukemia cell line, but not in a human stomach cancer cell lines. Oncology Reports, 9:757-760.

References

Murray RK.(1996).Cancer ,Cancer Genes and Groth factors. In: Murray RK, Granner DK, Mays PA, Rodwell VW (eds.),Harpers Biochemistry (24th ed.).Appleton and Lange, pp.757-778.

Nevidjon, B.M. and Sowers,K.W.(2000). A Nurse's guide to cancer care. Lippincott Company,philadelphia.

Newall,C.A.; Anderson,L.A. ;Phillipson,J.D.(1996) Herbal Medicines : A Guide for Health-care Professionals. London, England : The Pharmaceutical Press ; :268-270.

O'Hara, M.; Kiefer, D.; Farrell,K.; Kemper,K.(1998) .Areview of 12 commonly used Medicinal herbs .JAMA ,7: 523-540 .

Olsen, S. And Frank-Strombory,M.(1996). Cancer screening and early detection.In R.McCorkle,M.Grant,M. Frank-Strombory, and S.Baird(eds.),cancer nursing:Acomprebenshve textbook (2nd ed.,pp.265-297).Philadelphia:W.B. Sannders.

Patrono, C. (1994) .Aspirin as antiplatelet drug .N. Engl. J. Med .330 : 127-94

Pellechia,M. and Reed,J.C.(2004).Inhibition of anti-apoptotic Bcl-2 family Proteins by cancer chemoprevention and chemotherapy . Curr. Pharm.DES.,10:1387-1398.

Pharoah,P.D.P. abd Caldas,(1999).Molecular genetics and the assessmentt of human cancers.Expert reviews in molecular medicine.11:1462-3994.

Pignon,J.P.;Bourhis,J. Domenge,C. Designe,L.(2000).Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck sqyamous-cell carcinoma:three mete-analyses of updated individual data,Lancet;355:949-55.

Pollock,R.E. and Morton,D.L.(2000).Principles of Surgical Oncology. In:Bast,R.C., Rufe,D.W.; pollock,R.F.;Weichselboum, R.R.; Holland,J.F.; F.;Ferri IH.E. and Gsnster,T.E.(eds.). Cancer Medicine (5th ed).BC.Dcker Inc.Canada.

References

Ray,A.; Benerjee, B.D. and Sen,P.(1996).Modulation of huemeral and Cell-Mediated immune responses by Azadirachta Indiea (Neena) in Nice. Indian Exp. Biol.,34:698-701.

Reed,J.C.(1997).Bcl-2 Family proteins:role in Dysregulation of Apoptosis and Chemoresistance in Cancer.In:Martin, S.J.(ed.).Apoptosis and cancer.Kargen landes systems, Basel.Switzerland.pp.64-97.

Ridley,A.(2000).Cancer: Molecular switches in metastasis. Nature, 406: 466-467.

Rubin Pand Williams,JP.(2001).Principles of Radiation Oncology and Cancer Radiotherapy,In:Rubin P.(ed.)Clinical Oncology(8th ed).W.B.Sanders company,pp.99-125.

Russell,p.j.(1998).Genetics.(5th ed).The Benlamin Cummings Bublishing Company,Inc. Menlopank,USA.pp585-614

Sa'eed ,O.F.(2004). The Effect of Green and Black Tea Extracts on Different Cell Lines in vitro . Athesis of Master in Clinical pharmacy . University of Mosul .

Salmon,D.J.Leyland-Jones,B.Shak,S. Et al(2001).Use of chemotherapy plus amonoclonal antibody aginst HER2 for metastatic breast cancer that over express HER2,N. Engl.J.Med. 344:783-792.

Sandberg ,A.A.(1994).Cancer cytogenetics for clinicians.Cancer J. For clinicians,44:136-159.

Sartippour,M.R.; Liu,C.; Shao,Z.M.; Go, V.L.; Heber,D. And Nguyen M.C.(2001).Livistona exact inhibits angiogenesis and cancer Growth. Oncology Reports,8:1355-1387.

Schmid ,B. and Heide,L.(1995).The use of Salicis cortex in rheumatic disease : Phytotherapie with known mode of action .In : PM 61(Abstracts of 43 rd) Ann Congr : 94.

Seamus,J.Martin, San Diego,Calif,(1997).Apoptpsis and Cancer.

References

Seligman,I.C. ; Lim,P.O.L. ; Plimio,C.S. ; Khayat,A.S. ; Bahia,M.O. ; Buchi,D.F. ; Cabral,I.R. and Burbano,R.R. (2003). The anticancer homeopathic composite " Canova method" is not genotoxic fof human Lymphocyts in vitro . Genet.Mol,Res,1:223-228.

Shao,Y.; Lahloub,M.F. ; Meier,B. ; Sticher,O.(1989).Isolation of phenolic compounds from the bark of *Salix*. Planta medica,55:617-618.

She,Q.B.; Bode,A.M.; Mawy,Chen,N.Y.and Dong,Z.(2001).Resveratrol induced activation of p.53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p.38 kinase,Cancer Res. Feb.15;16(4):1604-10.

Shihata,I.M. (1951) . Apharmacological study of *Anagallis arvensis* .M.D.Vet. Thesis Cairo University.

Shoieb,A.M. ; Elgayyar,M. ; Dudrick,P. ; Bell,E. and Titnof , P.K. (2003).Inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by Thimoquinol . Int.Oncology,22:107-113.

Sid Katz.(2002).Beneficial uses of plant phthologens: anticancer and drug agents derived from plant pathogens, University of British Columbia, Vancouver,Canada 24:10-13.

Sjostrom,J. And Bergh,J.(2001). How apoptosis is regulated and what goes wrong in Cancer,B.M.J.,322:1538-1539.

Skeel,R.T.(1999) .Basis of cancer chemotherapy .In:Skeel,R.T. Hand book of cancer chemotherapy .(5th ed.) .Lippincott Williams and Wilkins , Philadelphia, USA.pp:3-7.

Sousek,J. ; Guedon,D. ; Adam,T. ; Bochorakova,H. ; Taborska,E. ; Valka,I and Simanek,V.(1999).Alkaliode and organic acid content of eight *Fumaria* species . Phytochemical Analysis,10:6-11.

Spitalink,P.F. and Di Santagnese PA(2001).The pathology of cancer. In: Rubin P.(ed) Clinical Oncology (8th ed.)Sanders Company ,philadelphia pp:47-61.

References

Sporn,M.B. and Lippman,S.M.(2000).Chemoprevention of cancer, In:Bast,R.C.; Kufe,D.W.;Pollock,R.F.; Weichselboum, R.R.; Holland,J.F.; Ferri III ,E. And Ganster,T.E.,(eds.). Cancer Medicine(5th ed.).BC.Decker Inc.Canada.

Steen, H.B.(2000).The origin of oncogenic mulations: where is the primary damage .Carcinogenesis,21:1773-1776.

Stevens,A. And Lowe,J.(2000).Pathology,(2nd ed.).Mosby, London.pp :79-104.

Sun,W.E.;Yu,Q.; Shen,H.; Ou,X.L.; Cao,D.Z.; Yu,T.;Qian,C.; Zhu,F.; Fu,Y.L.; and Su,H.(2004).Role of Helicobacter Pylori and cyclooxy genase-2 expression in gastric Carcinognesis.Word J. Gastroentrol.,10:2809-2813.

Surh,Y.J.(2003).Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals Nat.Rev.Cancer 3 :768-780.

Tallberge,Th.(2001)."Cancer immunotherapy .A short review of acentury-old pursuit". Dtsch Zschr onkol.33:127-132.

Tang,W.; Hemm, I. And Bertram, B.(2003).Recent Development of Antitumor agents from Chinese Herbal Medicines, Part 1.Low Molecular compounds.Plant Med.,69:97-108.

Trichopoulos,D.,Li,F., and Hunter,D.(1996). What causes cancer. Scientific American,275: 80-87.

Toft,N.J. and Arends,M.J.(1997).A poptosis and Necrosis in Tumors, Martin, S,J.(ed.).Apoptosis and Cancer.Karger Lands System Basel,Switzerland,pp:25-44.

Toolan,H.W.(1954).Transplantable human neoplasms maintained in cortisone treated laboratory animals :H.S-1,hep-1,Hep-3 Cancer Res., 14:660-666.

Townsend ,C.C.; Guest,E.; Omar,S.A.(1980).Flora of Iraq.V.4 PART 1. Univ.press Glasgow.

References

Wang,W. ; Heideman,L. ; Chung,C.S. ; Pelling,J.C. ; Koehler,K.J. and Birt,D.F.(2000).Cell Cycle Arrest at G2/M and Growth inhibition by Apigenin in Human Colon Carcinoma cell line .Carcinogenesis ,28:102-110.

Weinberg,R.(1994).Oncogenes and Tumor suppressor genes.CA: A cancer Journal for Clinicians,44: 160-170 .

Wilasrusmee.C. ; Kittur,S. ; Siddiqui,J ; Bruch,D. ; Wilasrusmee,S. and Kittur,D.S.(2002) . Immunostimulatory effects of *Silybum mariaum* (milk thistte)extracts . Mwd.Sci. Monit.,8:439-443.

World Health Oragnization.(2005) . Press .Release – Steps to Beat Cancer Naturally … Cancer Prevention ,95-101 .

Yaseen,N.Y.; Potter, C.W.;Potter, A.M.; Watmore, A.E. and Rees,R.C. (1990).Chromosome studies in eleven colorectal tumors. Cancer Genet Cytogenet .44:83-97.

Yaseen , N.Y.(1999).Cytogenetics study of human colorectal cancer cell.ph.D.Thesis , Univ. Sheffield .

Zhang,Y. ; Coogan,P.F. ; Palmar,J.R. ; Strom,B.L. and Rosenberg, L.(2005) .Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of breast cancer : the Case – Control Survellance study revisited .

References

Summary

This project was explorer to study the activity of secondary metabolites in *Salix acmophylla* crude extracts on the malignant cells growth (*in vitro*) and study its effect on human lymphocytes .

This study included the preparation of fresh extracts for two main parts of this plant (**Bark** and **Leaves**) by using two types of solvents , distilled water and absolute ethanol . The results from leaves was 20% for L1 and 16% for L2 and from bark is 6% for B1 and 4% for B2 . The active compounds of the extracts was assessed by using the chemical tests and the result showed that acompound contains Glycosides , Tannins , Saponines and Flavonoides , but there is no Alkaloids , Terpenes and Steroids.

The action of these crude extracts of *S. acmophylla* was assessed on cancer cell lines (HEP-2 AND AMN-3) and on normal cells of (REF) using seven concentrations (1000 , 500 , 250 , 125 , 62.5 , 31.25 , 15.6 µg / ml) through three examination period (24 , 48 , and 72 hrs) for cancer cell lines and 72 hrs only for normal cell line of rat embryo (REF) with three exposure time.

The result is aclear cytotoxic activity of these crude extracts with high significances in a tow cancer cell lines during the three exposure time , suggesting that the cytotoxic effect of those crude extracts is a dose and time dependent , but in (REF) cell lines , there is no significant effect of those crude extracts reported.

The water extract was found to be the most effective especially on the cell lines (HEP-2) while on (AMN-3) cell lines the ethanol extract was more effective. It was non- significant differences were defected when comparing the action of the leaves and the bark on these cell lines .

On the other hand the inhibition action of these *Salix* extracts were examined on normal lymphocyte using the same seven concentration by counting the percentage of mitotic index and blastotic index in which L1,L2,B1,B2 show non significant effect on MI and BI in low concentration ,but show significant effect on high concentration comparing with the control group.

Two experiments were conducted also to know if these extract have a mitogine , or have anti-mitogenic effects , thes extracts have no significant effect in both cases .

Study of the effect of crude extracts from *Salix acmophylla* on cancer cell lines and Human Normal Lymphocyte *in vitro*

A Thesis

Submitted To The College Of Education University Of Karbalaa In Partial Fulfillment Of The Requirements For The Degree Of Master Science In Biology-Zoology

By

Azhaar Mousa Jaffer Al-mousawi

May 2006