# تأثير مستخلصات نبات الدفلة *Nerium oleander* على النبيبات الدقيقة لخلايا السرطانية H22(Hepatic cell) والموت الخلوي المبرمج في الورم للفئران المختبرية .

**إبراهيم هادي محمد**
**قسم علوم الحياة والاحياء الجمهرية- كلية العلوم -جامعة ديالى**

## الخلاصة

اجريت تجربة لدراسة تأثير المستخلص المائي والكحولي لأوراق نبات الدفلة على النبيبات الدقيقة لخلايا H22 cell السرطانية لدراسة تأثيرها على وقف الانقسام الخلوي في الطور الاستوائي, وأظهرت نتائج المعاملة الاولى بالمستخلص المائي لنبات الدفلة بالتراكيز 0.01 مكغم /مل الى10 مكغم /مل لمدة 60 دقيقة عدم قدرة المستخلص على وقف الانقسام الخلوي في الطور الاستوائي وكذلك التاثير على النبيبات الدقيقة في حين أظهرت المعاملة الثانية بالمستخلص الكحولي بالتراكيز ذاتها لمدة60 دقيقة القدرة على وقف الانقسام الخلوي في الطور الاستوائي لخلايا الكبد الفاري 1 مكغم /مل وكذلك التاثير على وقف النبيبات الدقيقة وذلك باستخدام مجهر immunofluroresence وتم تحديد الجرع العلاجية من المستخلصين الكحولي والمائي للاوراق إعتماداً على قيمة الجرعة المميتة النصفية. وأثبتت التجارب العلاجية فعالية عالية لهذين المستخلصين في إختزال حجم الورم بشكل يعتمد على الجرعة المستخدمة منها ومدة التجريع . وكانت الجرعة العلاجية الأعلى لكل من المستخلصين (16.5، 20 غم/كغم من وزن الفأرة على الترتيب) هي الأفضل تأثيراً من خلال إختزالها لحجم الورم في الفئران بنسبة 84.09% ، 86.7% على الترتيب. ومن ثم موت الخلوي المبرمج للخلايا السرطانية.

## المقدمة

نالت الأعشاب الطبية اهتماماً كبيراً منذ القدم وذلك لقدرتها الكبيرة على تسكين الألم والشفاء، ولا نزال نعتمد عليها حتى يومنا هذا في صناعة عدد كبير من الادوية لأن طب الأعشاب يكمل العلاجات التقليدية في الغالب فيوفرأدوية مأمونة على الرغم من ان بعض النباتات قد تنتج آثاراً جانبية على غرار كل الأدوية، لذا فمن الضروري ألا تؤخذ وتستخدم في بعض منها الا باشراف ممارس.

تتوقف قدرة الدواء العشبي على التأثير في أنظمة الجسم على المكونات الكيميائية التي يحتوي عليها لذا بدأ الباحثون باستخلاص وعزل هذه المواد من النباتات في القرن الثامن عشر ومنذ ذلك الوقت أعتدنا النظر الى الاعشاب وتأثيراتها بدلالة المكونات الفعالة التي تحتويهاكما اشار Toshioوآخرون (2008). زاد الاهتمام بالمكونات الفعالة (مركبات الايض الثانوي) بوصفها علاجاً للسرطان إذ تمتلك تلك المركبات خصائص علاجية تختلف في تأثيراتها في الخلية السرطانية اذ قد تكون لهذه المركبات فعالية تثبيطية تؤدي إلى قتل الخلية الورمية أو إيقاف نموها Schmidt وBastians (2007)،ومن هذه المركبات التي أثبتت فعاليتها المثبطة لتكاثر الخلايا السرطانية هي القلويدات وتعد من أهم وأكثر المركبات الفعالة الموجودة في المستخلصات النباتية، إذ تمتاز بسميتها العالية للخلايا نتيجة تأثيرها في عدة آليات في الخلية ومنها الانقسام الخلوي أو في مرحلة تسبق الانقسام أو تحفيز الخلايا السرطانية للدخول في مرحلة الموت المبرمج Apoptosis كما أشار Mukherjee وآخرون (2001).

---

تاريخ استلام البحث 20 / 10 / 2010 .
تاريخ قبول النشر 9 / 1 / 2011 .

و من أهم هذه القلويـدات colchicine (vinblastine ، vincristine) vinca alkaloid و maytansine و(paclitaxel ، taxanes) وخاصة docetaxel التي تستخدم بشكل كبير بوصـفها مركبات مضادة للانقسام من خلال عملها على ديناميكية نبيبات المغزل (خيوط المغزل ) التي لها دور مهم في انفصال الكروموسومات خلال الانقسام الخيطـي كمـا اوضـح الباحثـان Lopus وpanda (2006) ونظراً للدور الذي تقوم به النبيبات الدقيقة في انقسام الخلية الامرالذي جعلها الهدف المناسب لتطور ادوية العلاج الكيميائي Chemotherapeutic drugs ضد النمو السريع والتوالد غير الطبيعي للخلايا السرطانية، لذا صار التوجه للبحث عن انواع اخرى مـن المركبـات منهـا الكلايوسـيدات لاستخلاصها ومعرفة تاثيرها في الانقسام. ونظراً لاحتواء نبات الدفلة على مركبات الكلايوسيدات لذا تم اختيار النبات.

نبات الدفلة الاسم الشائع: *Nerium oleander* .يطلق على هذا النبات عدة أسماء فـي اللغـة العربية منها:سم الحمار يصنف الدفلة ضمن عائلة الدفليات Apocyuaceae وأغلب نباتات هذه العائلة سامة وهي تابعة لرتبة Gentianales صـنف Nangaliposida مـن شـعبة Magnoliophiyta Chakravarty (1976) . الدفلة من نباتات الزينة دائمة الخضرة والمزهرة طيلة أيام السنة ، غالبا مايستخدم في تزيين الحدائق والمتنزهات والطرق الخارجية. ويستوطن حوض البحر الأبيض المتوسط وجنوب وشرق أسيا ، وقلما نجده في وسط وغرب أوربا لكونه حساساً لدرجات الحرارة المنخفضـة وينتشر النبات في أغلب مناطق العراق ، وينمو بريا في المناطق الشمالية ، كما نجده منتشرا في أكثر شوارع بغداد كما اشارالباحث Boisio وآخرون (1993) .اتجهت أنظـار البـاحثين فـي السـنوات الأخيرة الى أهمية استخدام بعض الأعشاب الطبية في محاولة لعلاج مرض السـرطان منهـا مـادة Sangumarine اذ وجد انه يثبط عدة أنواع من الخطوط الخلوية السرطانية البشرية المقاومة للعقاقير المتعددة من خلال منع بلمرة النبيبات الدقيقة وتثبيطه لتكاثر الخلايا وحثها على الموت المبرمج كمـا اشار الباحث Jordan (2002). ومن الدراسات العراقية الحديثة التي اهتمت بهذا الجانب ونجحـت في استخدام المستخلصات النباتية في تثبيط نمو خطوط الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي وداخلـه وشملت نبات المريـر*Sonchus oleraceus* زغيـر (2009), ونبـات المديـد *Convolvulues arvensis* الربيعي (2009) إذ توصلت هذه الدراسات إلى ان لهذه المستخلصات تأثيرات سمية فـي مختلف أنواع خطوط الخلايا السرطانية، ومازالت البحوث جارية ومنها الدراسة الحالية لاختبار فعالية المستخلصات النباتية سعياً ومحاولة لإيجاد مواد فعالة ضد مرض السرطان.

## المواد وطرائق البحث

1- تحضير المستخلصات النباتية وأتبعت طريقة في تحضير المستخلص المائي الخام حسـب ما اوردها Harborne (1984). جرى تحضير المستخلصات الكحولية الخام للنبات بأستخدام جهاز السكسوليت Soxhlet ، وحسب الطريقة المتبعة من قبل Cannell (1998 ) .

2-احتساب الجرعة القاتلة لنصف العدد $LD_{50}$ واعتمدت طريقة الصعود والنزول التي ذكرهـا Dixon (1980) لتحديد الجرعة المميتة الوسطية.

3- تهيئة الحيوانات المختبرية الحاملة للورم.تم تجهيز فأرة مصابة بسرطان الخلايا الكبدي Hepatic cell(H22) من في جامعة خواكون (الصين ) اذ استخلص الورم ووزع على (24) فأرة سليمة في منطقة الساق بحسب Freshney (2001 ) ، تنتهي التجربة بموت آخـر فـأرة مـن مجموعة السيطرة ، أعطيت الجرعات بحسب الباحثان Jone و Janardhanan (2002 ) . خـلال مدة التجربة تم قياس حجم الورم مرتين في الاسبوع باستعمال آلة القيـاس وأخـذ قياسـا (الطـول والعرض) ، واستخرج الحجم بالاعتماد على طريقة Ge وآخرون (2003 ) .

4- الخط الخلوي السرطاني المعلم GFP tubulin(H22 cell)

تم استلام هذا الخط من مستشفى تونجي في جامعة خواكون ( الصين) ، وهو سرطان الكبد الفاري.وتهيئة خط الخلايا السرطانية حيث اجريت الخطوات الخاصة بالزرع النسيجي تحت ظروف معقمة و استعمل الوسط الزرعي (RPMI-1640 في زراعة خطوط الخلايا السرطانية وتنميتها ويدعى بوسط النمو الكامل Complete Growth كما أشارToddوآخرون (1995).

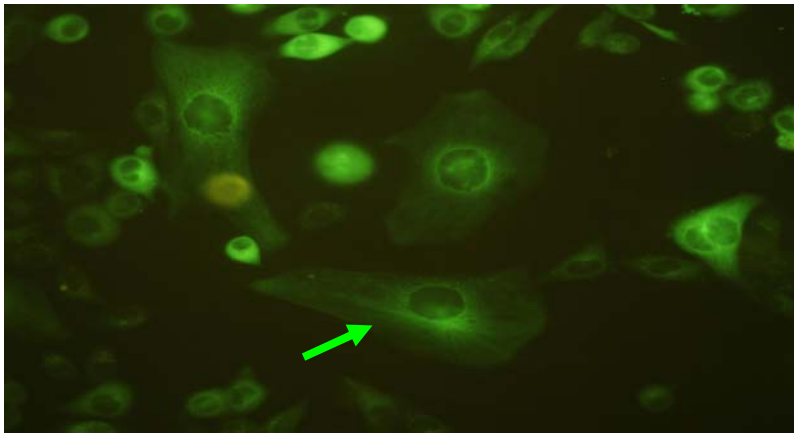
5-اختبار السمية الخلوية للمستخلصين الخام في وقف النبيبات الدقيقة للخط الخلوي السرطاني

جهز عالق الخلايا عن طريق أضافة محاليل كما أشار Todd وآخرون (1995). وأضيف (0.2) مل من التراكيز المحضرة آنياً لكل من المستخلص الكحولي والمائي باستعمال الوسط الزرعي الخالي من المصل Serum Free Media (SFM) وهي(0.01,0.1,1, 10,100,1,100) مكغم/مل، وبواقع اربعة مكررات لكل تركيز. كما تم عمل اربعة مكررات للسيطرة بدون اي مستخلصات بعد مرور مدة التعريض (Exposure time) ساعة و كما أشار Toddوآخرون (1995) أخرج الطبق من الحاضنة وتمت ملاحظة النتائج من خلال مجهر Immunofluroresence .

## النتائج والمناقشة

بأستخدام جهاز السوكسليت المجهز بالماء كأحد المذيبات المستخدمة في أستخلاص أوراق النبات تمّ الحصول على مستخلص خام جاف بوزن 4.58غم ، وكان قوام المستخلصات صلباً وبلون بني مصفر لمستخلصي الأوراق ، أعطت طريقة تحضير المستخلصات الكحولية الخام بأستخدام جهاز السوكسليت المجهز بالميثانول كأحد المذيبات المستخدمة في أستخلاص وأوراق النبات مستخلص خام بوزن 1.445غم وكان جميع المستخلصات الناتجة ذات قوام صلب وبلون بني داكن .تم استخدام المستخلصات لغرض تعريض الخلايا لها.

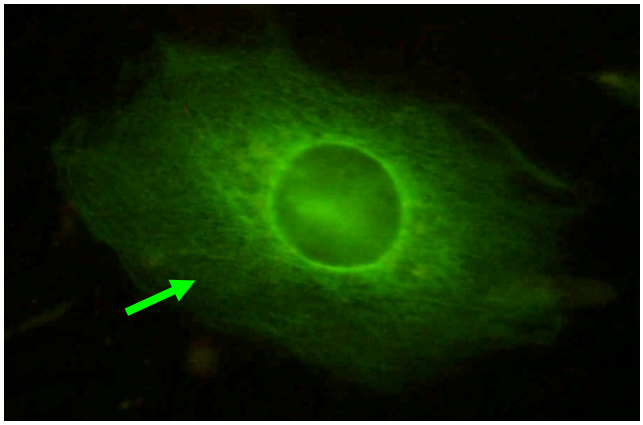
أوضحت النتائج من خلال الصورة (1) الخلايا السرطانية H22 cell غير المعاملة بالمستخلص الخام لنبات الدفلة حيث يلاحظ شكل النبيبات الدقيقة المنتظمة والموزعة على طول محتوى الخلية السرطانية



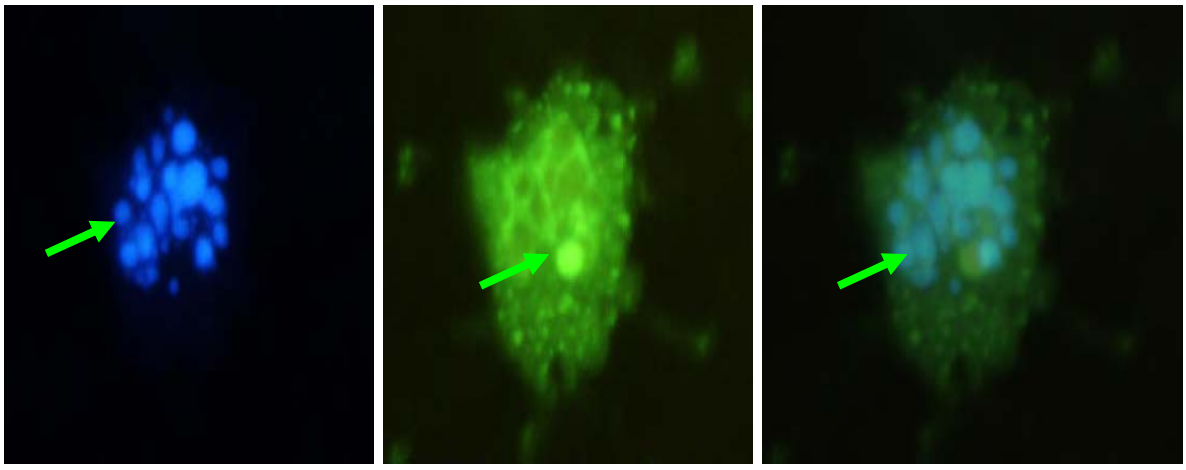
**صورة 1. النبيبات الدقيقة المعلمة GFP-tubulin لخلايا H22 غير المعاملة بالمستخلص يلاحظ عدم تأثر النبيبات الدقيقة وترتيبها بشكل منتظم**

بينت النتائج إن المستخلص المائي الخام لنبات الدفلة ليس له تأثير مثبط في وقف النبيبات الدقيقة للخط الخلوي السرطانيH22 cell عند كافة التراكيز المستخدمة ولمدة 60 دقيقة من

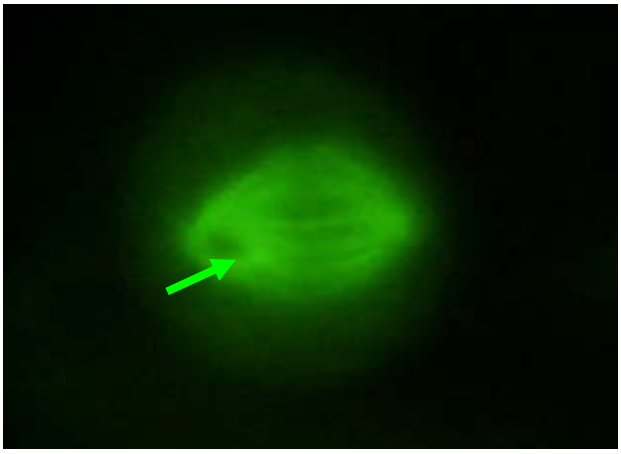
التعريض. اما عند استخدام المستخلص الكحولي لنبات الدفلة لوحظ تثبيط النبيبات الدقيقة عند التركيز 1 مكغم /مل وعند ازدياد التركيز حيث يلاحظ زيادة في تثبيط النبيبات الدقيقة للخلايا وتصبح بشكل غير منتظم ويبدا ظهور الضرر عليها كلما زدات مدة التعريض وتركيز المستخلص فعند التركيز 10 ملغم /مل تظهر على الخلية الموت الخلوي حيث تبدا النبيبات الدقيقة بالتقصر والاضمحلال وتصبح الخلية بشكل كرات صغيرة سرعان ما تختفي, كما موضح بالشكل في الشرائح المحضرة كما هو مبين بالصورة(2) و(3) ويمكن ان نحصل على خلية متوقفة في الطور الاستوائي كما هو مبين بالصورة (4).



**صورة 2. تأثير المستخلص الكحولي على خلايا H22 المعلمة GFP-tubulin بالتركيز 0.1مكغم/مل لمدة 60 دقيقة حيث يلاحظ تقصر النبيبات الدقيقة واضمحلالها.**



**صورة 3.خلايا H22 السرطانية المعاملة بالمستخلص الكحولي لنبات الدفلة بالتركيز 100مكغم/مل لمدة 60 دقيقة يلاحظ دخول الخلايا بالموت الخلوي**



**صورة 4. خلايا H22 السرطانية المعاملة بالمستخلص الكحولي لنبات الدفلة بالتركيز 100مكغم/مل لمدة 60 دقيقة يلاحظ وقف الخلايا في الطور الاستوائي .**

إن نبات الدفلة يحتوي على المركبات الكلايكوسيدية والسكريات والفلافونات وهذا ما أكدهChakravarty (1976 ) . وتحتوي المستخلصات الخام على خليط من المركبات الفعالة والتي يؤدي أستخدام التراكيز العالية الى تعطيل نفاذية الخلية من خلال تعطيل الفعالية المحفزة لأنزيم NaKATPase مما يعطل من عمل مضخة صوديوم بوتاسيوم الأمر الذي يؤدي الى فقدان نفاذية الغشاء البلازمي وهذا ما تفعله أغلب الكلايكوسيدات القلبية كالـ oleandrin, digitoxigenin, gitoxin الأمر الذي يؤدي الى السماح للمركبات الأخرى ومنها مركب الأولندرين ( الذي ثبت أحتواء المستخلصات الخام عليه ) الى داخل الخلية والعمل على أحداث التشوهات في تسلسل القواعد النايتروجينية مما يحدث زيادة في معدل Sister chromatid exchange(SCE).

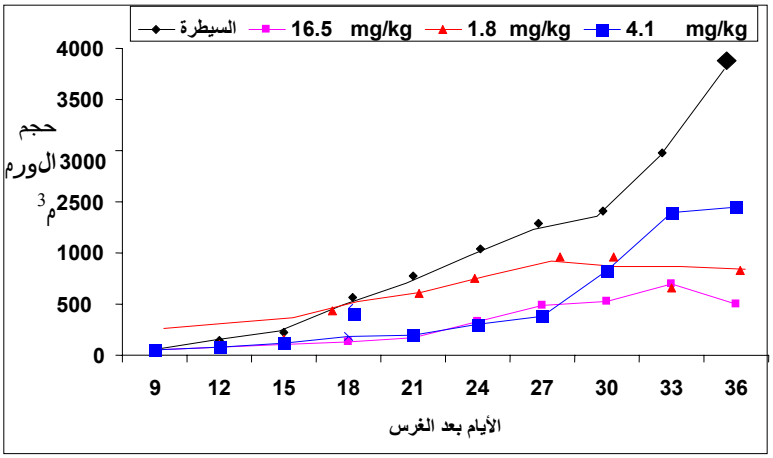
وقد ذكرFu واخرون (2005) أن كلا من المستخلص المائي الخام لأوراق الدفلة ومركب الأولندرين تؤدي الى فقدان للتيلومير telomere في الـ DNA وأنخفاض في مستويات عامل TRF2 مما يحفز على موت الخلايا المبرمج . ،كما أنهما يؤديان الى تثبيط دورة الخلية عند الطور G2/M ومنعها من التقدم وهذا ما اكدته دراسة رغد (2006).

تم تحديد الجرعة المميتة النصفية (LD50) للمستخلصين الخام لاوراق نبات الدفلة أن الجرعة المميتة النصفية للمستخلص المائي للاوراق بلغت 165 ملغم/كغم من وزن الحيوان ، وهي أوطأ من الجرعة المميتة النصفية للمستخلص الكحولي التي بلغت 201 ملغم/كغم من وزن الحيوان .

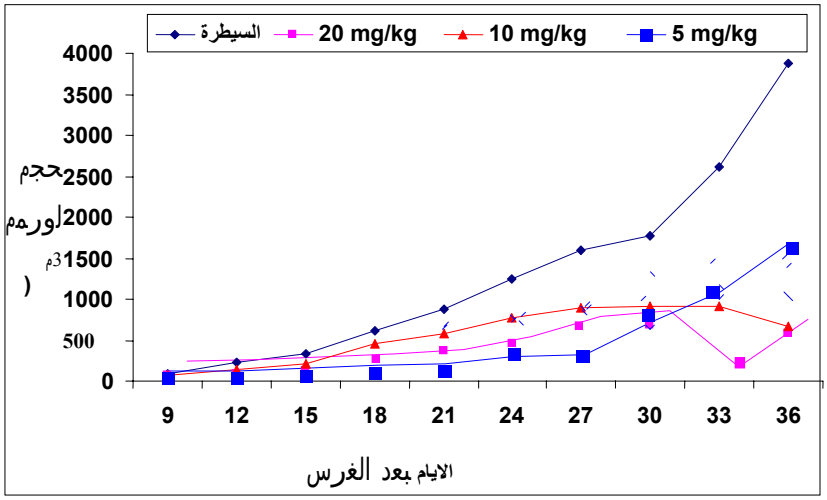
أظهر حقن الفئران المصابة بالورم بالمستخلص المائي الخام بالجرع 16.5و8.2 و 4.1ملغم /كغم فروقا معنوية في حجم الورم عند مستوى احتمالية (P<0.01) بالمقارنة مع السيطرة وكانت أفضل جرعة التي سببت انخفاضاً في معدلات الحجم هي 16.5ملغم /كغم فقد كان معدل اليوم الأخير 36 هو860 ملم3 بالمقارنة مع الجرعتين الأولى والثانية فقد كانت (145.57 و 2059.26) ملم3 على التوالي بالمقارنة مع السيطرة 4033.05 ملم3.

أظهر حقن الفئران الحاملة للورم بالمستخلص الكحولي الخام وبالجرع 20 و10 و5 ملغم /كغم وجود فروق معنوية باحتمالية (P<0.01) عند مقارنة معدلات حجم الورم للمجموعة المعاملة مع السيطرة ، بالرغم من الزيادة في الحجم مع تقدم الفترة الزمنية للمعاملة ولكنها زيادة قليلة بالمقارنة مع

الزيادة الحاصلة في مجموعة السيطرة، ففي اليوم36 بعد الغرس كانت معدلات الحجم (1188.2,1432.74,2276.36) ملم3 ، في حين كانت السيطرة ( 4047.54) ملم3 التي أزداد معدل حجم الورم فيها بصورة كبيرة .وكانت الجرعة الأكثر تأثيراً في معدل حجم الورم للأيام الأخيرة خاصة هو 20 ملغم /كغم فقد كان الحجم في اليوم الأخير 1188.28 ملم3 في حين كان المعدل للجرعتين الثانية والثالثة (1432.74 و 2276.63) ملم3 على التوالي، مقارنة بالسيطرة التي أعطت معدل 5547.45 ملم3. تم استعمال مقياس لتقييم التغيير بحجم الورم في مجاميع الفئران المجرّعة بالمستخلصين والمجموعة المجرعة PBS (مجموعة السيطرة)، بينت النتائج التأثير التثبيطي الواضح لكلا المستخلصين في حجم الورم بشكل يعتمد على الجرعة المستخدمة ومدة التجريع. كما أشارت النتائج الى أن افضل جرعة للمستخلص المائي الخام المستخدم في علاج سرطان H22 الفأري هو 16.5 ملغم/كغم وذلك لأنه أظهر تثبيطا لنمو الورم بنسبة بلغت (84.09)%أما بالنسبة للمستخلص الكحولي الخام فقد أظهرت نتائج الدراسة أن أفضل نسبة لتثبيط نمو الورم كانت في الجرعة 20 ملغم/كغم حيث بلغت (86.07 )% , لقد بينت نتائج هذه الدراسة قابلية المستخلصات الخام للدفلة في اعطاء فعل مضاد للورم بدلالة الاختزال الحاصل في حجم الورم في الفئران المغروسة بالورم فقد يكون السبب في هذا التأثير مباشرا من خلال امتلاك هذه المستخلصات بعض المركبات الفعالة القادره على حث الية الموت الخلوي المبرمج في الخلايا الورمية كما اشار Meng وآخرون (2002) تقترح هذه الدراسة تأثيرا مباشر اخر لهذه المستخلصات في قدرتها على اختزال حجم الورم بسبب احتوائها على المركبات القادرة على اظهار فعل مضاد لتخليق الاوعية الدموية كما اشار Okamura وآخرون (1998).




**شكل 1. متابعة حجم الورم في الفئران الحاملة لورم سرطانة الكبد الفأري المعاملة بجرع مختلفة من المستخلص المائي الخام طيلة فترة التجربة.**

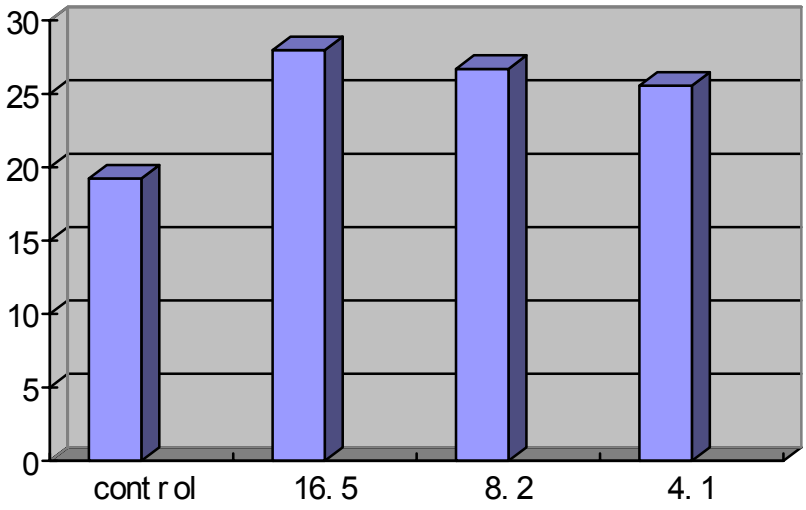



**شكل 2. متابعة حجم الورم في الفئران الحاملة لورم سرطانة الكبد الفأري المعاملة بجرع مختلفة من المستخلص القلويدي الخام طيلة فترة التجربة.**

**تأثير جرع مختلفة من المستخلصين الخام للدفلة في الموت الخلوي المبرمج في الحي.**

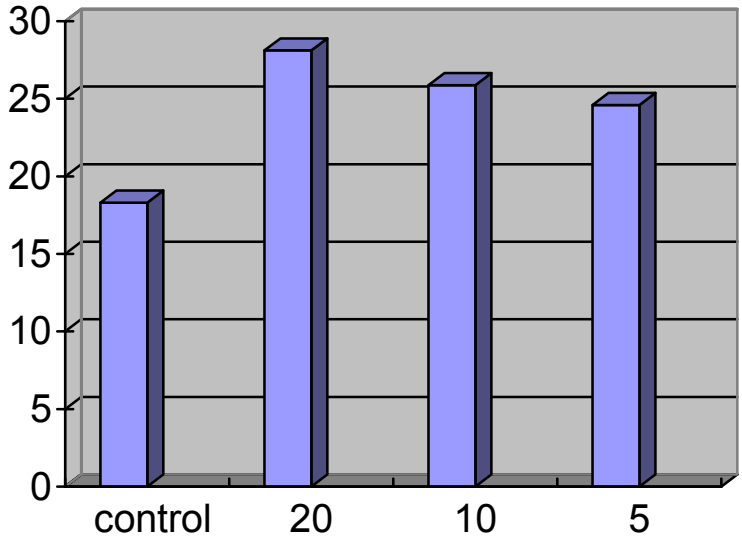
تشير النتائج الموضحة في الشكل (1) الى وجود زيادة معنوية في معدل الخلايا التي عانت موتاً خلوياً مبرمجاً عند مستوى احتمالية (P < 005) مع السيطرة بالنسبة للمستخلص المائي، فقد كانت معدلات الخلايا متقاربة للجرع الثلاث ( 16.5, 8.2 ,4.1) ملغم \كغم وهي (27.21 ، 26.70 ، 25.34)% على التوالي ولكنها أعلى من معدل الخلايا لمجموعة السيطرة 19.32% (الصورة 4).

بينت النتائج الموضحة في الشكل (2) وجود تأثير ايجابي للمستخلص الكحولي الخام في معدل الخلايا التي عانت موتاً مبرمجاً لجميع الجرع المستخدمة بشكل معنوي (P < 005) عن السيطرة, كانت الجرع (20, 10 ,5 ) ملغم \كغم وكانت نسبة الخلايا التي عانت موت الخلوي المبرمج (28.16 ، 25.06 ، 24.53)% على التوالي بالمقارنة مع السيطرة 18.30% (صورة 4) .



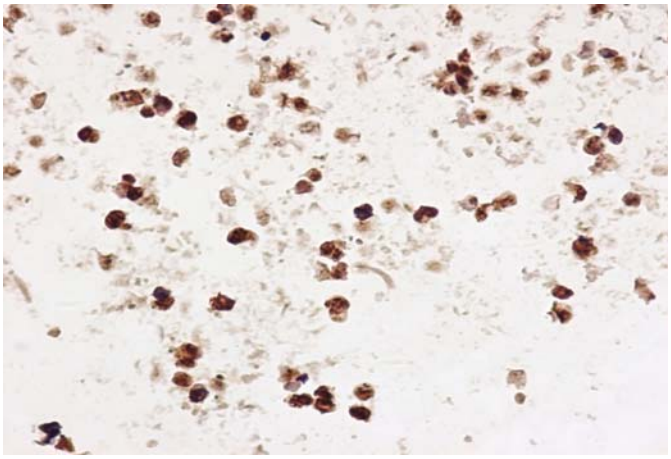

الجرع ملغم/كغم

**شكل 3-أ تأثير جرع مختلفة من المستخلص المائي الخام للدفلة في معدل الموت الخلوي المبـرمج (%) للفئران الحاملة لسرطانة الكبد الفأري.**

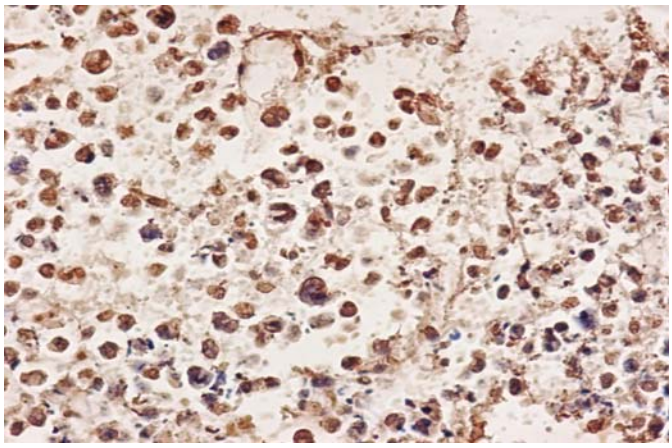



الجرع ملغم /كغم

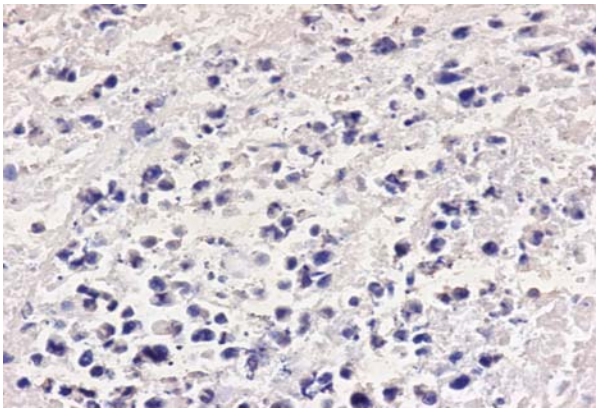
**شكل 3-ب أثير جرع مختلفة من المستخلص الكحولي الخام للدفلة في معدل الموت الخلوي المبرمج (%) للفئران الحاملة لسرطانة الكبد الفأري**



**1**



**2**



**3**

**صورة 4. مقطع نسيجي لسرطانة الكبد الفأري تظهر فيه الخلايا التي عانت من الموت الخلوي المبرمج في الفئران المعالجة: (1) بالمستخلص المائي الخام مصطبغة باللون البني(2) بالمستخلص الكحولي الخام مصطبغة باللون البني (DAB Chromogen 400X) بالمقارنة مع السيطرة (3) .**

وقد بينت النتائج أن أفضل المستخلصين المستخدمة في علاج سرطان الكبد الفأري هو المستخلص الكحولي الخام وذلك لأنه أظهر تثبيطا للورم بنسبة تثبيط بلغت 86.7% عند أستخدام الجرعة العالية .وربما يرجع السبب في الفعالية التثبيطية العالية للمستخلصات الخام الى أحتواء المستخلصات الخام لأوراق نبات الدفلة على عدد كبير من المركبات الفعالة الأخرى وأغلبها من الكلايكوسيدات القلبية ومن هذه المركبات الموجودة في أوراق نبات الدفلة هي , ursolic acid Oleanolic acid والتي ثبت أن لها فعالية مضادة لعدة أنواع من الخلايا السرطانية Okamura واخرون(1998) . وليس بالضرورة أن تعمل هذه المركبات كمضادات للورم فقط وأنما قد تؤثر على أداء الجهاز المناعي فتنشطه وبذلك تعمل كمنشطات مناعية ، ومن الأمور التي يجب أن تؤخذ بنظر الاعتبار بجانب الفعالية الحالة للسرطان ، ظاهرة الموت المبرمج التي قد تستحثها المستخلصات الخام حيث تحصل إزالة سريعة للخلايا المعانية من الموت المبرمج . وقد ذكرت دراسات أخرى والمستخلص المائي الخام لأوراق نبات الدفلة لهما تأثير كابح على عدد من العوامل التي أدت الى تثبيط عاملي NFκB وAP-1 والتي تنظم التعبير الجيني gene expression لعدد من الجينات التي تلعب دورا مهما في الموت المبرمج للخلايا apoptosis كما اشار Pathake واخرون (2000) .

## المصادر


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

رغد، الشيباني .2006. دراسة تاثير مستخلصات أوراق نبات الدفلة *Nerium oleander* الخام والنقية في الخلايا الطبيعية وخطوط الخلايا السرطانية النامية في الزجاج وفي الفئران البيضاء . الجامعة المستنصرية . اطروحة دكتوراة.

زغير، زينب رزاق .2009. دراسة دراسة تاثير مستخلصات الخام لنبات المري*onchus olevaceu*. اطروحة دكتوراه، كلية الطب البيطري، جامعة بغداد.

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

Boisio, M.L., M. Esposito, F. Merlo. 1993. Separation and identifying features of the cardiac aglycones and glycosides of *Nerium oleander* L. flowers by thin-layer chromatography. Minera Mid., 84: 627-32.

Cannell, R.J.P. 1998. Natural product isolation, Humana Press, New Jersey, U.K.

Chakravarty, H.L. 1976.Plant wealth of Iraq (A dictionary of economic plants), 1, Botany Directorate, Ministry of Agriculture and Agrarian reform, Baghdad, Iraq.

Dixon, W.J. 1980. Efficient Analysis of Experimental Observations. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 20: 441-62.

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

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

Ge, N.L., S. Ye, N. R .Zheng,.Sun, L. Y. and Z. Tang. 2003. Prevention of hepatocellular carcinoma in mice by IL-2 137-1 genes co-transfected liver cancer cell vaccines. *World J. Gastroenterol*, 9 2182-5.

Gupta, S., D. Zhang, J. Yi, Shao, J. 2004. Anticancer activities of *Oldenlandia diffusa*. J. Herbal Pharmacotherapy, 4: 21-33. Harborne, J.B. 1984. Phytochemical Methods. (2nd ed.), Chapman & Hall, London, P.5 .

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

Jordan, M.A. 2002. Mechanism of action of anti tumor drugs that interact with microtubules and tubulin, *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents*, 2: 1-17.

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

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

Mukherjee ,A. B .Sourar,. Nabainta,S. and C.Anil, 2001.Advance in canser therapy with plant based natural product.curent medicinal chem..1467-1486.

Okamura , H. S. Kashiwamura, Tsutsui, H. T. Yoshimoto, and K. Nakanishi 1998. Regulation of interferon-γ production by IL-12 and IL-18. *Curr. Opin. Immunol*., 10: 259-64.

Pathake, S., A.S. Multani, S. Narayan, V.Kumar, R.A. Newman.2000. Anvirzel ™, an extract of *Nerium oleander*, induced cell death in human and mouse cancer cells. Anticancer drag, 11: 455-463.

Todd, F. G., F. F . Stermitz, P. Schultheis , A. P. Knight, and T. Dargatz. 1995. Tropane alkaloids a nd toxicity of *Convolvulus arvensis; phytochem*., 39: 301-3.

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

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

# WATERY EXTRACT AND METHONOLIC EXTRACTION OF *NERIUM OLEANDER* EFFECT ON MICROTUBULES OFH22 CELL AND PROGRAMMED CELL DEATH .

**Ibrahim hade Muhamed**
**Dept. of Biology - College of Science - Diyala Univ.**

## ABSTRACT

The study evaluated the effect of selected Oleandrin and methonolic extraction of *Nerium oleande*r on the microtubule network of H22 cells line (hepatic cell) GFP tubulin labeled .

Cells were treated with watery extract and methonolic extraction at various concentration from 0.01 µ/ml to 10m/ml for 60 min , , microtubules were detected by mean of indirect immunfluorescence. the damage was examined in afluorescnce microscope .

Therapeutic effect of both extracts was studied in tumor-bearing mice after (I.P) administration of watery extract at concentrations of methonolic (16.5 , 8.1, 4.1mg/kg) and methonoloic extract at concentrations (20, 10, 5 mg/kg) for 30 days alternatively. The results revealed significant reduction in the tumor volume weather in those treated

with watery extract 84.09%, or those treated with alcoholic extract 86.07%, particularly at the concentration of 16.5 mg/kg and 20 mg/kg respectively .