تأثير مستخلص بذور نبات الحرمل على الخلايا السرطانية

عبد علي ذاكر [*] ، سلمان علي احمد [**] و رشيد محمد رشيد [***]
[*] كلية التربية/ جامعة الأنبار
[**] كلية العلوم/ جامعة النهرين
[***] كلية العلوم/ جامعة الأنبار

الخلاصة

يعد هذا البحث دراسة استكشافية لفعالية محتويات مستخلص بذور الحرمل على نمو الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي وقد تضمن : تحضيرالمستخلص القلويدي لبذور نبات الحرمل واختبار الفعالية السمية على اثنين من الخطوط الخلوية السرطانية . استخدمت اربعة تراكيز من المستخلص هي 62.5 و125 و250 و500 مايكروغرام / مليلتر ولفترتي تعريض 24 و 48 ساعة . كان هناك تاثيرا معنويا على الخلايا السرطانية وفي جميع التراكيز ولفترتي التعريض ووجد ان هذا التأثير قد زداد مع ازدياد التركيز والوقت.

Effect of harmaline extract on cancer cells

A. A. Thakeer [*] , S. A. Ahmed [**] and R. M. Rasheed [***]
[*] College of Education\ University of Al-Anbar
[**] College of Science\ University of Al-Nahryn
[***] College of Science\ University of Al-Anbar

Abstract

This research aims to explore *in vitro* antitumor activity of Alkaloids extracted from harmaline.

Investigation of the cytotoxic effect of Alkaloids extracted from harmaline in four Concentrations: (62.5, 125, 250 and 500 µg/ ml). with different exposure times (24 and 48 hrs). The extract was found to affect the cancer cell lines accordingly to the time of exposure and concentration of extract.

المقدمة

ينتمي نبات الحرمل *Peganum harmale* الى العائلة Rutaceae وتحت العائلة الرطرطية Zygophyllaceae ، وهو نبات عشبي ينتشر بشكل واسع في شمال افريقيا والشرق الاوسط ; كما عُرف نبات الحرمل منذ القدم باهميته الطبية ، فلقد استخدمت بذوره في خفض الحرارة وكدواء تجاري منشط للحيض (1) ، كذلك اشارت العديد من البحوث الى الفعاليات الدوائية المختلفة لهذا النبات ومنها فعاليته المضادة للبكتريا والفطريات وفي علاج المرض الجلدي (2).

البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الأول

تحتوي بذور هذا النبات على العديد من المواد مثل الزيوت الدهنية والالياف وبعض الفلافونات بالاضافة الى اشباه القلويدات والتي تعود اليها الفعالية البايولوجية .والقلويدات هي نواتج ثانوية لعملية البناء الحيوي للبروتينات ، فهي مركبات نتروجينية قاعدية يكون معظمها بلورياً في درجة حرارة الغرفة ، وفي دراسة للسامرائي (3) ذكرت بان العناصر الاساسية الداخلة في تركيب أي مركب قلويدي هي الاوكسجين ، نتروجين ، كاربون وهيدروجين . ومن اهم هذه المركبات القلويدية الموجودة في نبات الحرمل هي الهارملين Harmaline ، الهارمين Harmine ، الهارملول Harmalol والهارمل Harmel .

تعد مركبات الايض الثانوي النباتية واحداً من البدائل العلاجية التي نافست بقوة العلاجات التقليدية في علاج امراض عديدة ومنها مرض السرطان . ولكون مرض السرطان واحداً من الامراض الواسعة الانتشار في العالم عموماً وفي بلدنا خاصة. ولكون نبات الحرمل واحداً من الاعشاب الطبية المتوفرة محلياً مع امتلاكه خواص طبية وعلاجية جيدة تعود الى احتواءه على مركبات ذات تاثير مضاد للخلايا السرطانية (4) ،فقد استخدم المستخلص القلويدي لهذا النبات مساهمة في المحاولات المستمرة لتقصي التاثير على الخلايا السرطانية.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات النباتية

جمعت بذور الحرمل من منطقة صحراوية قرب عامرية الفلوجة والتي تبعد حوالي (40) كم غرب بغداد، ثم طحنت باستخدام مطحنة كهربائية ، بعدها حفظت النماذج المجهزة في اكياس نايلون بدرجة حرارة المختبر لحين الاستعمال . تم تشخيص العينات من قبل المعشب الوطني العراقي – الهيئة العامة لفحص وتصديق البذور – وزارة الزراعة العراقية

استخلاص اشباه القلويدات من بذور نبات الحرمل

اتبعت طريقة السامرائي (3) في الاستخلاص ، حيث تم اخذ (50) غم من بذور نبات الحرمل ووضعت في حاوية الاستخلاص وادخلت في جهاز الاستخلاص ثم اضيف لها (1) لتر من الكحول الاثيلي بتركيز 99.5% وجرى الاستخلاص تحت درجة حرارة (40) ْم لمدة 24 ساعة ، وبعد الانتهاء من عملية الاستخلاص تم تجفيف المستخلص بواسطة المبخر الدوار ثم اذيبت المادة الجافة الناتجة في 250 مللتر من الكحول الاثيلي بعدها اضيف الى المستخلص الكحولي (30) مللتر من حامض الكبريتيك 2% . تم استخدام المبخر الدوار للتخلص من الكحول الاثيلي ليتخلف المحلول الحامضي فقط والذي عدل الى pH=9 باضافة هيدروكسيد الامونيوم 10% ، بعد ذلك وضع المحلول في قمع فصل واعيد استخلاصه ثلاث مرات بالكلوروفورم وفي كل مرة يتم جمع الطبقة السفلى المذابة فيها القلويدات ثم وضع في جهاز المبخر الدوار ليتبخر الكلوروفورم ويتبقى راسب بني غامق يمثل مزيج اشباه القلويدات .

تشخيص مزيج اشباه القلويدات

1- تقنية الكواشف الترسيبية (الاستدلالية)

غليت (10) غرام من المستخلص مع (50) سم^3 ماء مقطر مستحمض بـ (4)% حامض HCl ثم ترك المحلول ليبرد وبعدها رشح بورق الترشيح وحفظ الراشح لاجراء الكشوفات .

أ- كاشف ماير

1- يذاب (1.36) غرام من كلوريد الزئبقيك في (60) مل من الماء المقطر .

2- تذاب (5) غرام من ايوديد البوتاسيوم في (10) مل من الماء المقطر .

3- يمزج المحلول الاول مع المحلول الثاني ويخفف المحلول الناتج الى حجم 100 مل باستخدام الماء المقطر فيمثل المحلول الناتج كاشف ماير بعدها تم مزج كميات متساوية من الكاشف والراشح . ان ظهور الراسب الابيض يشير الى وجود القلويدات .

ب- كاشف دراجندورف

1- يذاب (0.6) غرام من Bismoth subnitrate في (2) مل من حامض HCl المركز ويضاف الى المحلول (10) مل ماء مقطر .

2- يذاب (6) غرام من ايوديد البوتاسيوم KI في (10) مل ماء مقطر .

3- يمزج المحلول الاول مع الثاني ثم يضاف للمزيج (7) مل من حامض HCl المركز ، ثم يخفف المزيج لغاية 400 مل ماء مقطر ويمثل المحلول الناتج كاشف دراجندورف .

ومن ثم مزجت كميات متساوية من الكاشف والراشح ، ان ظهور اللون البرتقالي يشير الى وجود القلويدات .

2- بواسطة تقنية كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة (T.L.C)

استخدمت عملية عزل اشباه القلويدات طريقة التنقية بواسطة الصفائح الرقيقة (5) . حيث استخدمت صفائح زجاجية (20 × 5) سم مطلية بهلام السيلكا Silica Gel FG 245 بسمك (0.25) ملم . وقد تم تنشيط هذه الصفائح بوضعها في فرن بدرجة حرارة 100° م لمدة ساعة واحدة ، وكان الطور الناقل المستخدم لعملية الفصل هو (1 : 9) (Chloroform:MeOH) بعد تحميلها (10) مايكروليتر لكل بقعة Spot واستغرقت عملية الفصل بحدود (60) دقيقة ، بعدها جففت الصفيحة من المذيب بواسطة المجفف Dryer وتم تشخيص القلويدات بواسطة رش الصفائح بكاشف دراجندورف Dragendorff Reagent والتي تكون بلون برتقالي دلالة على وجود القلويدات ، وحددت قيم الانتشار النسبي Relative flow (Rf) للبقع المفصولة وفق المعادلة التالية :

$$\text{قيمة التحرك النسبي Rf} = \frac{\text{المسافة التي قطعها المركب}}{\text{المسافة التي قطعها المذيب}}$$

الزرع النسيجي والوسط الزرعي

تم تحضيره وفقا لطريقة Freshney (6) الخاصة بالزرع النسيجي . **اما الوسط الزرعي** (RPMI-1640) Rosswell Pork Momeral Institute فقد احتوى المواد الاتية :

RPMI-1640 with hopes buffer, L-glutamin	10.4 غرام
Crystaline Penecillin	0.5 مليلتر = i.µ.100000
Streptomycin	0.5 مليلتر = 0.1 غرام
Bovine Calf Serum	%10
Sodium bicarbonate (%4.4)	دليل الاس الهيدروجيني (7.2)

اكمل الحجم الى لتر باضافة الماء المقطر مزدوج التقطير ، ثم عقم بمرشح ذو ثقوب بقطر (0.22) مايكرون .

المضادات الحيوية

اذيبت مكونات عبوة Benzyl Pencillin بسعة i.µ1000000 في 5 مليلتر من الماء المقطر ، ثم اخذ منه 0.5 مليلتر (i.µ.100000) ، واضيف الى لتر واحد من الوسط الزرعي وحفظ في درجة حرارة – 20 م.

اذيبت عبوة واحدة من الـ Streptomycin سعة 1 غم في 5 مليلتر من الماء المقطر ، ثم اخذ منه 0.5 مليلتر، واضيف الى لتر واحد من الوسط الزرعي وحفظ في درجة حرارة – 20 م .

الخطوط الخلوية Cell Lines

1- الخط الخلوي السرطاني (Human epidermoid Larynx Carcinoma (HeP-2

وهو خلايا سرطان الحنجرة لرجل يبلغ من العمر 57 سنة ، وهذا الخط تم تطبيعهُ للنمو على وسط RPMI-1640 المجهز بـ 10% مصل العجل البقري في المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية.

2- الخط الخلوي السرطاني (Ahmed-Mohammed-Nahi-(AMN-3

وهو سرطان الغدة اللبنية (Mammary adenocarcinoma) لاناث فئران نوع Balb/c المصابة بسرطان الغدة اللبنية التلقائي (*In vivo* Spontaneous mammary adenocarcinoma) من المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية .

اختبار سمية المواد الكيميائية والمستخلص النباتي على نمو الخطوط الخلوية السرطانية

تم تحضير المحاليل وفقا لطريقة Abdul-Majeed (7) الخاصة باختبار التاثير السمي لنبات الحرمل .

حضرت كل من المركبات المستعملة عن طريق اذابة 0.02 غرام من المركب او المستخلص المركز في 10 مللتر من المذيب {الوسط Dimethyl sulf oxide (DMSO) + SFM} ثم عقم باستعمال مرشح ذو ثقوب بقطر 0.22 مايكرون وحضرت منه اربعة تراكيز مختلفة هي (62.5،125،250،500) مايكروغرام/ مليلتر وتحت ظروف معقمة . استخدمت جميع التراكيز المحضرة مباشرة بعد اكمال عملية التحضير .

جهز عالق الخلايا عن طريق معاملة قنينة الزرع النسيجي حجم 25 سم^2 بمحلول التربسين / فرسين ثم اضيف له 20 مليلتر من الوسط الزرعي الجديد من المصل (SFM). ثم مزج عالق الخلايا جيدا وتم نقل 0.2 مليلتر بعد كل مزجة جيدة الى حفر طبق معايرة الزرع النسيجي ذو القعر المسطح باستعمال ماصة اوتوماتيكية ، بحيث احتوت كل حفرة على عدد معلوم من الخلايا الحية (1×10^5 خلية/حفرة) . بعد ان تم عد الخلايا الحية من الميتة بواسطة صبغة (Trypan blue). ترك الطبق في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م لمدة تتراوح بين 12-18 ساعة الى حين التصاق الخلايا في الحفرة وبعدها تم التخلص من الوسط الزرعي القديم في الحفر وتم اضافة 0.2 مليلتر من التراكيز المحضرة سابقا وبواقع ثلاث مكررات لكل تركيز كما تم عمل ثلاث مكررات للسيطرة . وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م في حاضنة مزودة بـ 5% من غاز ثاني اوكسيد الكربون .

بعد مرور مدة التعريض المحددة للحضن . اخرج الطبق من الحاضنة واضيف اليه 50 مايكروليتر من محلول صبغة الاحمر المتعادل واعيد الطبق مرة ثانية الى الحاضنة ليحضن ساعتين بعدها اخرج الطبق وازيلت محتوياته وغسلت الخلايا بمحلول (PBS) لحين زوال الصبغة الزائدة ، اذ ان الخلايا الحية تاخذ الصبغة اما الميتة فلا تاخذها . بعد ذلك اضيف لكل حفرة 50 مايكروليتر من محلول دارئ الفوسفات الملحي المحمض بالايثانول المطلق بنسبة (1:1) (محلول استخلاص الصبغة) ، اذ يقوم هذا المحلول باستخراج الصبغة من الخلايا الحية التي كانت قد اخذت الصبغة وقرأت النتائج باستخدام جهاز الاليزا بطول موجي 492 نانومتر .

تم اجراء التحليل الاحصائي بايجاد قيمة اقل فرق معنوي عند مستوى احتمالية 5% للمقارنة ما بين المتوسطات لعاملي التركيز والوقت.

النتائج

اجريت اختبارات الكشوفات الترسيبية (الاستدلالية) للمستخلص المحضر وقد اعطت نتائج ايجابية بالنسبة الى وجود القلويدات جدول رقم (1) . وشخصت مركبات الهارملين باستخدام تقنية الصفائح الرقيقة (شكل رقم 1)، وقد تمت مقارنة النتائج بنتائج السامرائي (3) يسبب تعذر الحصول على المركبات القياسية (جدول رقم 2) .

جدول رقم (1) نتائج الكشوفات الترسيبية (الاستدلالية) لنبات الحرمل

نوع الكاشف	النتيجة
1. كشف ماير	+
2. كشف دراجندروف	+

جدول رقم (2) يوضح تشخيص المركبين هارمين وهارملين بواسطة تقنية T.L.C

Compound	RF	Standard
harmaline	0.06	0.06
harmine	0.32	0.32

تم عزل اشباه القلويدات من المستخلص بواسطة تقنية الصفائح الرقيقة ، حيث عزل المركب الهارملين Harmline بنقاوة عالية وكذلك الهارمين Harmine شكل رقم (1) .

وقد تم مقارنة النتائج مع المراجع بسبب تعذر الحصول على المركبات القياسية وقد ظهر تطابق في النتائج جدول رقم (2) .

التاثير السمي للمستخلص القلويدي لبذور نبات الحرمل في تثبيط نمو الخطوط الخلوية السرطانية

1- الخط الخلوي السرطاني Hep – 2

يتبين من النتائج الموضحة في الجدول رقم (3) ان للمستخلص القلويدي المحضر من بذور نبات الحرمل تاثيراً مثبطاً لنمو خلايا الخط الخلوي السرطاني Hep – 2 .

ان بداية التاثير المعنوي لهذا المستخلص كانت عند المعاملة 62.5 مايكروغرام / مليلتر خلال مدتي التعريض . وان افضل تاثير معنوي تحقق عند المعاملة 500 مايكروغرام / مليلتر خلال المدة 48 ساعة فيما كانت اقل التاثيرات معنوياً عند المعاملة 62.5 مايكروغرام / مليلتر خلال مدة التعريض 24 ساعة .

توضح نتائج التحليل الاحصائي ان جميع الفروق كانت معنوية ما بين جميع المعاملات خلال مدتي التعريض. وتشير نتائج التحليل الى ان التاثيرات السمية لهذا المستخلص كانت افضل معنوياً خلال مدة التعريض 48 ساعة بالمقارنة مع المدة 24 ساعة . وفيما يخص التراكيز المستخدمة نجد انها كانت ذات تاثير معنوي متزايد مع ازدياد التركيز ، وان افضل هذه التاثيرات معنوياً تحققت عند المعاملة 500 مايكروغرام / مليلتر بالمقارنة مع قيم السيطرة

جدول رقم (3) قيم المتوسطات للخط الخلوي السرطاني Hep – 2 بعد المعاملة بتراكيز مختلفة من المستخلص القلويدي لبذور نبات الحرمل خلال مدتي التعريض 24 و 48 ساعة

تراكيز المستخلص القلويدي لبذور نبات الحرمل مايكرو غرام/ مليلتر	متوسطات الكثافة الخلوية		
	24	48	$\overline{X}_C$
0	0.545	0.516	0.530
62.5	0.513	0.328	0.420
125	0.480	0.204	0.342
250	0.421	0.147	0.284
500	0.391	0.050	0.220
$\overline{X}_t$	0.470	0.249	

2- الخط الخلوي السرطاني Amn3

يبين الجدول رقم (4) نتائج التراكيز المختلفة من المستخلص القلويدي لبذور نبات الحرمل خلال مدتي التعريض في تثبيط نمو خلايا الخط الخلوي السرطاني Amn3 . وتشير النتائج الى ان التاثير المعنوي لهذا المستخلص بدأ من المعاملة الاولى 62.5 مايكروغرام / مليلتر خلال مدتي التعريض ، وان افضل تاثير معنوي تحقق خلال مدة التعريض الثانية عند المعاملتين 250 و 500 مايكروغرام / مليلتر . اما اقل تاثير معنوي فكان عند المعاملة 62.5 مايكروغرام / مليلتر في مدة التعريض الاولى 24 ساعة . ويظهر من النتائج ان التاثير كان معنوياً في مدة التعريض الاولى وانه ازداد تدريجياً مع ازدياد التركيز اما في مدة التعريض الثانية فانه ازداد لغاية المعاملة 250 مايكروغرام / مليلتر . ان المقارنة ما بين مدتي التعريض تشير الى ان الخلايا كانت اكثر تاثراً بالتراكيز المستعملة في مدة التعريض الثانية 48 ساعة وان الفرق بينهما كان معنوياً . واظهرت التراكيز المستعملة تأثيراً معنوياً متزايداً مع ازدياد التركيز . اذ كان افضل تاثير معنوي عند المعاملة 500 مايكروغرام / مليلتر .

جدول رقم (4) قيم المتوسطات للخط الخلوي السرطاني Amn_3 بعد المعاملة بتراكيز مختلفة من المستخلص القلويدي لبذور نبات الحرمل خلال مدتي التعريض 24 و 48 ساعة

تراكيز المستخلص القلويدي لبذور نبات الحرمل مايكرو غرام/ مليلتر	متوسطات الكثافة الخلوية		
	24	48	$\overline{X}_C$
0	0.179	0.176	0.177
62.5	0.163	0.145	0.154
125	0.149	0.102	0.125
250	0.109	0.041	0.075
500	0.053	0.041	0.047
$\overline{X}_t$	0.130	0.101	

شكل (1) اشباه القلويدات المعزولة من بذور نبات الحرمل *Peganum harmale*

المناقشة

اوضحت النتائج في هذه الدراسة ان التاثير السمي للمستخلص القلويدي لبذور نبات الحرمل كان واضحاً في نمو الخلايا السرطانية خلال مدتي التعريض 24 و 48 ساعة وذلك من خلال التحليل الاحصائي الذي اخضعت له النتائج . لقد اشارت العديد من الدراسات الى ان لمستخلص بذور نبات الحرمل تاثيراً خلوياً ساماً بسبب احتوائها على مركبات الـ $\beta-Carbo\ lins$ والتي تمتلك فعاليات مضادة للاورام (8) ومن هذه المركبات القلويدية مركب harmeline و harmala والتي تشكل اكثر من 60% من قلويدات مستخلص نبات الحرمل (2) ، اذ تمتلك هذه المركبات القدرة على تثبيط فاعلية انزيمات Topo Isomerase والتي تلعب دوراً مهماً في عمليات تضاعف واستنساخ الحامض النووي الدنا DNA (9) مما جعل من هذه الانزيمات هدفاً جذاباً للعديد من الادوية المضادة للسرطان وخاصة الانزيم Topo Isomerase I وذلك لان فاعليته لا تتغير مع مراحل دورة حياة الخلية (10) . تمتلك مركبات $\beta-Carbo\ lins$ القدرة على اقتحام جزيئة الحامض النووي وهو احد اسباب التسمم الخلوي (11) .

ان لمركب الـ Harmine القدرة على تثبيط انزيمات Topo Isomerase بفعالية اكبر من المركبات القلويدية الاخرى لمستخلص بذور نبات الحرمل ويعزى السبب في ذلك الى نظام الحلقة المستوية فيه Planer ring والذي يغيب في القلويدات الاخرى مثل harmaline مما يسمح له باقتحام جزيئة الحمض النووي وتثبيط فاعلية الانزيم Topo I (12) . ان هذا الاقتحام والارتباط مع الاخدود الرئيسي للحمض النووي DNA groove او شطر المعقد DNA – TopoIsomerase Complex هي من بين الاليات التي يمكن ان تستخدم من قبل سموم ومثبطات الـ DNA Topo Isomerase كميكانيكيات تثبيط لنمو الخلايا (13) اذ ان شريط الـ DNA في الخلايا السرطانية يكون منبسطاً (Relaxant) والجزيئية ككل تكون غير مستقرة بسبب تباعد الاواصر الهيدروجينية (H-bonds) التي تربط شريط الـ DNA الامر الذي يسهل ارتباط المركبات بسلسلتي الـ DNA وبالتالي احداث التاثيرات السمية فيها (14) .

ان الاستشهادات السابقة تشير الى ان المركبات القلويدية في بذور نبات الحرمل تمتلك فعالية سمية ضد الخلايا السرطانية وهو ما ظهر في هذه الدراسة حيث كانت جميع الفروقات معنوية خلال مدتي التعريض الاولى والثانية بالمقارنة مع قيم السيطرة ، وان التاثير السمي لهذا المستخلص كان اكثر وضوحاً في مدة التعريض الثانية 48 ساعة بالنسبة لكلا الخطين الخلويين Hep – 2 و Amn3 وهي الظاهرة المسماة الجرعة او التركيز مع عامل الوقت وبشكل عام كان التاثير السمي واضحاً في مدتي التعريض وان شدة السمية ازدادت مع ازدياد التركيز ومدة التعريض أي ان مدة التعريض 48 ساعة اعطت اعلى شدة قتل من الناحية الاحصائية لنوعي الخطوط الخلوية السرطانية Hep – 2 و Amn3 مما يعني ان شدة التاثير السمي لهذا المستخلص في الخطين الخلويين تعتمد على التركيز والوقت .

ان الاختلافات التي لوحظت في شدة التاثير السمي ما بين الخطين السرطانيين ربما تعود الى ان لكل خط خلوي سرطاني سلوكاً ايضياً مختلفاً عن الاخر فضلاً عن تباين المستقبلات الموجودة على سطح الخلايا من نوع لاخر مما يؤدي الى تباين من ناحية الاستجابة للمؤثرات الخارجية (المستخلص القلويدي) وهو ما لوحظ في العديد من الدراسات التي اجريت على خطوط خلوية سرطانية ومستخلصات نباتية مختلفة (15) .

المصادر

1- Hamid, R.M., Ali, G. and Mohammad, A. (2003). Antinociceptive effects of *Peganum harmala* L. alkaloid extract on Mouse formaline test. J Pharm Pharmaceut Sci.7(1): 65 – 69.

2- Saad. E. l. and Rifaie, M. (1980). *Peganum harmala* : its use in Certain dermatosis. Int J Dermatol; 19 : 221 – 222.

3- السامرائي ، خلود وهيب عبود . 1983 . توزيع القلويدات واهميتها التصنيفية في بعض الانواع البرية من العائلة الباذنجانية Salanaceae في العراق . رسالة ماجستير . كلية العلوم / جامعة بغداد .

4- Adams, S.M. (1983). The antineoplastic effects of prunsar-meniaca and *Peganum harmala* ; Diss Abstr Int (Sci) ; 44: 421-426.

5- Harborne, T.B. (1984). Phytochemical methods. Aguid to modern techniques of plants analysis. Chapman & Hall, 2nd Ed. NewYork. PP. 288

6- Freshney, R.I. (2000). Culture of animal cells : A manual for basic technique (4th ed.). wiley – Liss, A John Wiley & Sons, Inc. Publication, NewYork

7- Abdul–Majeed, M.R. (2000). Introduction and Charact-erization of Su. 99 Plasmacytoma Cell line and its effect on mice Immune response. PhD thesis, Nahrain University.

8- Xue–rui, H., Qi, C., Ri-hui, C., Wen-Lie, P. and An-Long, X. (2004). A Comparative molecular field analysis of cytotoxic beta – Carboline analogs. Acta Pharm. 25 (7) : 959 – 965.
9- Liu, L.F. (1989). Topoisomerase Poisons as antitumor drugs . Annu Rev Biochem. 58: 351 – 375.
10- Sinha, B.K. (1995). Topoisomerase inhibitors . A review of their therapeutic potential in Cancer . Drugs 49 : 11 – 19.
11- Taira, Z., Kanzawa, S., Dohara, C., Ishida, S., Matsumoto, M. and Sakiya, Y.(1997).Intercalation of six b-carboline deriva-tive into DNA. Jap J Toxical Environ Health.43: 83 – 91.
12- Armin, M., Sultan – Ahmad, E. and Massoud, M. (2002). An *In Vitro* Evaluation of Human DNA Topoisomerase I inhibition by *Peganum harmala* L. Seeds Extract and its β- Carboline Alkaloids . J Pharm Pharmaceut Sci. 5(1):19–23.
13- Capranico, C., Binaschi, M., Borgnetto, M.E., Zunino, F. and Palumbo, M. (1997). A Protein – Mediated mechanism for the DNA Sequence – Specific action of Topoisomerase II Poisons . Trends Pharmacol Sci. 18 : 323 – 329.
14- 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.
15- Chen, F.D., Wu, M., Wang, H.E., Hwang, J.J., Hong, C.Y., Huang, Y.T., Yen, S.H. and Ou, Y.H. (2001). Sensiti-zation of tumor but not normal tissue, to the cytotoxic effect of Ionizing radiation Using *Panax notoginseng* extract**.**