مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة . المجلد السابع ، العدد الثاني لسنة 2013
خاص بوقائع المؤتمر العلمي الثاني للعلوم الصرفة – جامعة الانبار 20-2012/11/22

ISSN: 1991-8941

تأثير المستخلصات الخام لنوى تمر الزهدي في تثبيط نمو بعض خطوط الخلايا السرطانية في الزجاج وتأثيرها في خلايا الدم المحيطي البشري وفي علاج سرطان الغدة اللبنية المغروس في الفئران البيض

ياسر حسين الجريصي* ناهي يوسف ياسين ** بدري عويد العاني***
*الجامعة المستنصرية- كلية العلوم
** الجامعة المستنصرية - المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية
***جامعة بغداد - كلية العلوم

الخلاصة

تم تقييم تأثير المستخلصات الخام (المائي، الايثانولي والهكساني) لنوى نخيل التمر صنف الزهدي *Phoenix dactylifera* L. cv. Zahdi كدراسة أولية في اثنين من الخطوط الخلوية السرطانية ، هما خط خلايا سرطان الحنجرة البشري (Hep-2) وخط خلايا سرطان الغدة اللبنية الفأري (AMN3) ، وكذلك في الخط الخلوي الطبيعي لجنين الجرذ (REF)، وتقييم تأثير هذه المستخلصات في مزارع خلايا الدم المحيطي البشري في الزجاج (*in vitro*) بوساطة حساب معامل التحول الأرومي Blast index (BI%) ، ومعامل الانقسام الخيطي Mitotic index (MI%) ، ودراسة حالات الزيغ الكروموسومي Chromosomal aberration (CA) . كما تضمنت دراسة الفعالية العلاجية لأحد هذه المستخلصات في الفئران المختبرية الحاملة لسرطان الغدة اللبنية Mammary adenocarcinoma .كان التأثير السّمي للمستخلصات الخام في كلا خطي الخلايا السرطانية Hep-2 و AMN3 في الزجاج (*in vitro*) معتمداً على التركيز المستخدم منها ومدة التعرض لها ، وكان التأثير المعنوي الأعلى لتلك المستخلصات بعد 72 ساعة من تعريضها على الخلايا بالتركيز 10000 مايكروغرام/مل ، فقد بلغت نسبة التثبيط الأعلى للمستخلص الايثانولي 89.4% و 93.4 % في خلايا Hep-2 و خلايا AMN3 على الترتيب . وقد أبدت المستخلصات جميعها تأثيرات تثبيطية طفيفة في خط الخلايا الطبيعية (REF) ، حيث وصلت أعلى نسبة تثبيط في هذه الخلايا 17.7% عند التركيز 10000 مايكروغرام/مل للمستخلص الايثانولي بيّنت دراسة تأثير المستخلصات الخام لنوى التمر في إنقسام الخلايا اللمفاوية للدم المحيطي البشري إنخفاضاً معنوياً في معدلات معامل التحول الأرومي (BI%) ومعامل الإنقسام الخيطي (MI%) بشكل يعتمد على التركيز المستخدم من تلك المستخلصات ، ولم تُحدث هذه المستخلصات أي تغيرات تركيبية أو عددية في كروموسومات تلك الخلايا . إن التراكيز المستعملة جميعها من هذه المستخلصات لم تعمل كعوامل موقفة لإنقسام الخلايا اللمفاوية في الطور الإستوائي Metaphase عندما إستعملت بديلاً عن الكولسمايد Colcemid ، فضلاً عن إنها لم تنجح بالعمل كعوامل مشطّرة بديلاً عن المادة المشطّرة Phytohemagglutinin (PHA).تم تحديد الجرع العلاجية من المستخلص الايثانولي للنوى إعتماداً على قيمة الجرعة المميتة النصفية (LD50) . وأثبتت التجارب العلاجية فعالية عالية لهذا المستخلص في إختزال حجم الورم بشكل يعتمد على الجرعة المستخدمة منه ومدة التجريع . وكانت الجرعة العلاجية الأعلى له (1غم/كغم من وزن الفأرة) هي الأفضل تأثيراً من خلال إختزالها لحجم الورم في الفئران بنسبة 83.8%.تشير نتائج هذه الدراسة إلى الفعالية السميّة العالية للمستخلص الايثانولي للنوى في الخطوط الخلوية السرطانية Hep-2 و AMN3 بشكل متخصص دون إحداث تأثير سمي في الخلايا الطبيعية المتمثلة بخلايا REF ، والمدى الواسع لسلامة استخدام هذا المستخلص في الفئران ، والفعالية العالية ضد الورمية له عند استعماله في علاج سرطان الغدد اللبنية في الفئران.

كلمات مفتاحية: نوى تمر الزهدي ، سرطان الدم ، الفئران ، تثبيط الخلايا السرطانية

المقدمة

يُعَد السرطان واحداً من المخاطر الأساس التي تهدد حياة الإنسان في مختلف بلدان العالم ، لكون هذا المرض لا يقف عند عضو معين فهو ينتشر إلى كثير من أعضاء الجسم الأخرى ليفتك بها ، وهو أحد ألأسباب الرئيسة للوفاة في العالم ، إذ يأتي بالمرتبة الثانية بعد أمراض القلب والشرايين (2،1)، وفي العراق بشكل خاص يعّد السرطان مشكلة متنامية تجلب الموت للآلاف من ألأشخاص خلال العام الواحد (3) .

إن العلاجات التقليدية لهذا المرض مبنية على أساس العلاج الجراحي ، والعلاج الإشعاعي والعلاج الكيميائي أو الجميع معاً ، وبشكل عام فإن العلاجين الجراحي والإشعاعي يُستعملان في حالات الأورام الموضعية ، أما العلاج الكيميائي فيُستعمل عند إنتشار الخلايا السرطانية في الجسم (5،4). على الرغم من فوائد هذه العلاجات إلا أنها تمتلك تأثيرات جانبية تعود سلباً على صحة المريض لاسيما العلاجات الكيميائية والإشعاعية التي تتسبب بسُميَّتها للأنسجة الطبيعية في الجسم أو بإحداث الطفرات الوراثية لخلاياه أو إضعاف الجهاز المناعي فيه (7،6).

لقد لجأ مرضى السرطان فضلاً عن كثير من الأطباء إلى المنتجات الطبيعية في علاج الأمراض التي تواجههم لكونها تُبعد أعراض المرض وتُحسِّن من صحة الإنسان ، فضلاً عن أنها قليلة الكلفة (8). إن إستعمال المنتجات الطبيعية لا سيما النباتية منها لم يكن بالشئ الجديد فقد إستعملها الإنسان منذ القدم وكان الإستطباب بالأعشاب من الأمور المعروفة جيداً لدى العرب والإغريق والصينيين في العالم القديم ، وعند الهنود الحمر في العالم الحديث (9).

يوجد في الطبيعة ما لا يقل عن 250000 نوع نباتي ، شُخص منها أكثر من ألف نبات بإمتلاكه خواصاً فّعالة مضادة للسرطان (10). وقد استُعملت النباتات لعهود طويلة في علاج السرطان ، وكان هناك الكثير من المواد الفعالة المستخرجة من النباتات استُعملت في الوقاية من مرض السرطان وفي علاج مراحل متقدمة من الأورام الخبيثة (11).

أما في العراق فقد دأب المركز العراقي لبحوث السرطان و الوراثة الطبية وضمن خطة بحثية شاملة ومنذ سنوات عديدة على دراسة تأثير مستخلصات أنواع محتلفة من النباتات المتوافرة في البيئة العراقية في الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي وداخله وشملت مستخلصات نبات سم الفراخ ، واليقطين والزنجبيل والحرمل ، والشاي الأخضر والأسود ، والسِدِر ، والهيل ، والشيح ، والتين ، والميرامية ، ونبات عين البزون، والعليق الصيني ونباتي الراوند والزعتر البري ونباتات أخرى (12)، إذ توصلت هذه الدراسات إلى أن لمستخلصات تلك النباتات تأثيرات سّمية في مختلف أنواع خطوط الخلايا السرطانية ، وما زالت البحوث جارية لإختبار فعالية مستخلصات نباتات أخرى ، سعياً ومحاولةً لإيجاد العلاج المناسب للسرطان .

يعّد نخيل التمر أكثر أشجار الفاكهة أهمية في البلدان العربية بشكل عام ، ودول الخليج بشكل خاص (13) ، وتعتبر نوى التمر أحد المصادر النباتية المهمة اقتصادياً، ففي بعض الدول يُحضر منها شراباً حاراً بديلاً عن القهوة بعد تحميصها (14) ، وتعّد الزيوت المستخلصة منها مصدراً متجدداً جيداً يزيد من القيمة الغذائية لكثير من المنتجات النباتية الخاصة بالاستهلاك البشري (15). ووجد أن هذه الزيوت تحد من الاصابات الجلدية في الانسان الناجمة عن الفعالية المؤكسدة للجذور الحرة (16، 17) .كما تستعمل نوى التمر كغذاء حيواني جيد ، فهي تقّدم للدجاج Chickens ، والخراف Sheeps والأسماك Fishes (18، 19، 20) ، كما تعد غذاءً ممتازاً للجِمال خلال رحلاتها الطويلة في الصحراء لكونها مصدراً غذائياً يحرر الطاقة ببطء (21).

ومن الناحية التجريبية فإن سكر Glucomannan المعزول من نوى التمر يساعد في تنظيم نسبة السكر في دم الإنسان ويقلل الضغط على البنكرياس فيُزيح حالات الخلل في نسبة السكر بالدم . كما يعد واقياً ضد بعض ألأمراض المزمنة (23)، وعامل سيطرة على الوزن (24).

إن دور نوى التمر في الخلايا السرطانية سواء في المختبر أو داخل أجسام الحيوانات لم يُدرس حتى الآن ، وبما أن العراق هو من أكبر مصادر التمر في العالم ولما يُشكل التمر من مصدر غذائي مهم (25)، لذا تم اقتراح هذه الدراسة لمعرفة التأثير التثبيطي لنوى التمر في خطوط الخلايا السرطانية في المختبر و داخل أجسام الفئران.

طرائق العمل

تحضير المستخلصات الخام لنوى التمر

المستخلص المائي: حُضر المستخلص المائي حسب الطريقة المتّبعة من قبل Harborne وجماعته (26) ، حيث وُضع مسحوق نوى التمر مع الماء المقطر بنسبة 5:1 في دورق محكم الغلق ، ثم وضع الدورق على جهاز المحرك الدوار Magnetic stirrer ليُخلط جيداً لمدة 72 ساعة بدرجة حرارة الغرفة. وُرشح المزيج بورق الترشيح. وتم تركيز المستخلص المُحضر باستخدام جهاز المبخر الدوار Rotary evaporator لحين الحصول على مسحوق جاف منه. حينها تم وزنه وحساب النسبة المئوية للإستخلاص.

المستخلص الايثانولي: وتم تحضير المستخلص الإيثانولي بنفس طريقة تحضير المستخلص المائي لكن باستعمال الكحول الأثيلي بتركيز 70 % بدلاً من الماء المقطر .

المستخلص الزيتي : وُضع 50 غرام من مسحوق نوى التمر مع 250مل من الهكسان وتُرك المزيج لمدة 24 ساعة في جهاز السوكسليت Soxhlet لكي يتشرب المسحوق بالمُذيب. أُجريت بعد ذلك عملية الإستخلاص ولمدة تقارب 20 ساعة لحين الحصول على راشح عديم اللون (27)، وبعدها رُشح المستخلص بورق ترشيح واتمان رقم 1 . جُفف الراشح بإستعمال جهاز المبخر الدوار تحت درجة حرارة لا تتجاوز 40 °م ، ثم وُزنت الخلاصة الزيتية المستحصلة .

تهيئة الوسط الزرعي وخطوط الخلايا

تمت تهيئة الوسط الزرعي RPMI-1640 اعتماداً على (28) ، ثم عُقم الوسط الزرعي بإستعمال مرشح دقيق ، ووُزِّع في قنانٍ زجاجية حفظت بدرجة حرارة (-20)°م لحين الاستعمال ، وتم الحصول على الخطوط الخلوية السرطانية (AMN3, Hep-2) والخط الخلوي لجنين الجرذ (REF) من المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية (ICCMGR) . وتم إجراء الخطوات الخاصة بالزرع النسيجي كما جاء في (29) التي تتضمن توزيع الخلايا في قناني زرع جديدة وحضنها بدرجة حرارة 37 °م حتى تكوّن طبقة أحادية متكاملة من الخلايا ، وتسمى هذه العملية بالزرع الثانوي Subculturing process .

اختبار سُمية المستخلصات الخام لنوى التمر في نمو الخطوط الخلوية

حُضرت المستخلصات اعتماداً على (30) و (31) بإذابة مسحوق المستخلص قيد الدراسة في محلول دارئ الفوسفات ، وحضرت منه ثمانية تراكيز بإستعمال الوسط الخالي من المصل تحت ظروف معقمة. واستخدمت جميع التراكيز المحضرة مباشرة بعد إكمال عملية التحضير.

جُهز عالق الخلايا ووُضع في حفر طبق معايرة الزرع النسيجي ذي القعر المسطح وحُضنت لحين التصاق الخلايا في الحفرة ، بعدها عوملت بالتراكيز المحضرة ، وبعد مرور مدة التعريض المحددة للحضن ، صُبغت الأطباق بصبغة البنفسج البلوري Crystal violet stain ، ثم قُرئت النتائج باستخدام جهاز الإليزا عند طول موجي 492 نانومتر . تم حساب النسبة المئوية لتثبيط نمو الخلايا لكل تركيز من تراكيز المستخلصات النباتية بحسب ما جاء في (32) عن طريق المعادلة الآتية:

نسبة التثبيط % = [(قراءة السيطرة – قراءة المعاملة لكل تركيز) / قراءة السيطرة] X 100%

دراسة تأثير المستخلصات الخام لنوى التمر في الخلايا اللمفاوية البشرية

دراسة تأثير المستخلصات الخام لنوى التمر في إنقسام الخلايا اللمفاوية البشرية: جُهزت المحاليل وأجريت طرائق العمل تبعاً لطريقة (33) و (34) ، إذ تتضمن العملية زرع الدم المحيطي (المأخوذ من متطوعين أصحاء) في أنابيب الزرع الحاوية على الوسط الزرعي RPMI-1640 الخالي من المصل ، ثم تُضاف إليها التراكيز المستخدمة للمستخلصات قيد الدراسة ،وتُحضن لحين بدء مرحلة الحصاد التي حينها تُعامل بالكولسيمايد لمدة نصف ساعة ، ثم تُعامل بعدها بمحلول KCl المُدفأ في حمام المائي بدرجة 37 °م ، ثم عُزل الراسب ويُضاف له المثبت البارد (المحضر آنياً من الميثانول المطلق وحامض الخليك الثلجي وبنسبة مزج 3 : 1) تدريجياً مع الرج المستمر ، ثم توضع الأنابيب في الثلاجة مدة 30 دقيقة ،تُكرر عملية إضافة المثبت البارد ثلاث أو أربع مرات حتى الحصول على عالق خلايا ضبابي أبيض اللون ، لتُقطر هذه الخلايا على شرائح زجاجية باردة ، ثمتُصبغ بصبغة كمزا Giemsa stain وتُفحص تحت المجهر الضوئي بقوة تكبير (X 100) ليتم حساب معامل التحول الأرومي ومعامل الانقسام الخلوي وفق طريقة (35) و (36) تبعاً للمعادلات الآتية:

معامل التحول الأرومي = (عدد الخلايا الأرومية / العدد الكلي للخلايا) X 100%

معامل الانقسام الخيطي = (عدد الخلايا المنقسمة / عدد الخلايا المنقسمة وغير المنقسمة) X 100%

ولغرض الحصول على الكروموسومات بشكل G-Banding ، جُففت الشرائح المقطرة ووضعت في فرن كهربائي (65 °م) لساعة واحدة . عوملت بعدها بالتربسين المُدفأ لمدة 10 ثوانٍ، ثم غُسلت وصُبغت بصبغة كمزا ، فُحصت الشرائح بالمجهر الضوئي لتقييم خلايا الطور الاستوائي وتحديد التغيرات الكروموسومية غير الطبيعية فيها حسب (37).

دراسة استعمال المستخلصات الخام لنوى التمر بديلاً عن الكولسيمايد في إيقاف انقسام الخلايا اللمفاوية: تعاد خطوات الدراسة السابقة ذاتها (دراسة تأثير المستخلصات في إنقسام الخلايا اللمفاوية) غير أن إضافة المستخلصات بتراكيزها المختلفة تتم في مرحلة الحصاد وبالتحديد عند الساعة 71.5 من مدة الحضن بدلاً من الكولسيمايد ، تم حساب معامل الانقسام الخيطي تبعاً للمعادلة المذكورة أعلاه .

دراسة إستعمال المستخلصات الخام لنوى التمر بوصفها مواد مُشطِّرة للخلايا اللمفاوية: أُتبعت الخطوات ذاتها المذكورة في دراسة تأثير المستخلصات في إنقسام الخلايا اللمفاوية لكن دون إضافة المادة المشطرة (PHA) ويضاف بدلها المستخلصات بتراكيزها المختلفة ، وحُسب معامل الإنقسام الخيطي تبعاً للمعادلة المذكورة أعلاه .

تحديد الجرعة المميتة النصفية LD50 للمستخلص الايثانولي في الفئران

إعتمدت طريقة الصعود والنزول Up & down method التي ذكرها Dixon (38) لتحديد الجرعة المميتة النصفية للفئران

البيضاء في هذه الطريقة تُجرع الفأرة عن طريق الفم بالمستخلص النباتي وتؤخذ النتيجة النهائية لهذه المعاملة (وهي إما هلاك الفأرة أو بقاؤها على قيد الحياة) خلال 24 ساعة من التجريع ، فإذا بقيت الفأرة على قيد الحياة تؤخذ فأرة أخرى وتُجرّع بتركيز أعلى ، أما إذا هلكت الفأرة فيجب أخذ فأرة أخرى وتجريعها بتركيز أقل ، ثم تتابع حالة الفأرة الثانية وهكذا تستمر العملية صعوداً أو نزولاً بالتركيز المستعمل عند كل فأرة إعتماداً على النتيجة النهائية للتجريع، وحسب عدد الفأرات المستعمل في هذه التجربة يتم تثبيت آخر جرعة إستعملت لتُطبق المعادلة الآتية:

$$LD50 = xf + kd$$

- xf : آخر جرعة إستعملت
- d : مقدار الزيادة والنقصان الثابت في الجرعة المعطاة
- k : القيمة الجدولية ، حيث أن : (O) هو رمز لبقاء الحيوان حياً خلال 24 ساعة من التجريع

(X) هو رمز لهلاك الحيوان خلال 24 ساعة من التجريع

دراسة التأثير العلاجي للمستخلص الايثانولي في سرطان الغدة اللبنية في الفئران المختبرية

تم البدء بالتجارب العلاجية حال وصول حجم الورم إلى ما لايقل عن 100 ملم3 في الأناث المغروسة بالورم (39)، وتم أخذ 24فأرة منها، قُسمت الى أربع مجاميع، تضمنت كل مجموعة ست فارات، أحد تلك المجاميع استعملت كعينة سيطرة (تم تجريعها بدارئ الفوسفات)، أما المجاميع الثلاث الأخرى فتم تجريع كل منها باحد تراكيز المستخلص الايثانولي المستخدمة في دراسة التأثير العلاجي.

تم التجريع عن طريق الفم Orally administration ، وأستُعملت ثلاثة تراكيز من المستخلص الايثانولي إعتماداً على نتائج تجربة الجرعة المميتة النصفية LD50 ، وذلك بإختيار 0.1 ، 0.05 ، 0.025 من الجرعة المميتة النصفية لكل مستخلص ، فكانت التراكيز هي (0.25 ، 0.5 ، 1) غم/كغم . إستمر تجريع الفئران يومياً ولمدة 25 يوماً متتالية، مع تسجيل حجم الورم في فئران المعاملة والسيطرة في الأيام (صفر ، 5 ، 10 ، 15 ، 20 ، 25) من بداية المعاملة. تم قياس حجم الورم بإستعمال آلة قياس Vernia calipers وأخذت قياسات الطول والعرض مع تطبيق المعادلة الآتية (40) :

$$\text{Tumor volume} = (a)(b)^2 / 2$$

حيث أن : a = الطول b = العرض

وتم حساب النسبة المئوية لتثبيط نمو الورم من خلال المعادلة الآتية (41):

النسبة المئوية لتثبيط نمو الورم = [(حجم الورم في مجموعة السيطرة – حجم الورم في المجموعة المعالجة) / حجم الورم في مجموعة السيطرة] X 100%

وتم حساب حجم الورم النسبي من خلال المعادلة الآتية (42):

حجم الورم النسبي (لليوم س) = [حجم الورم (باليوم س) / حجم الورم (باليوم صفر)] X 100%

التحليل الإحصائي: أُخضعت نتائج الدراسة إلى التحليل الإحصائي وفق تحليل التباين أحادي الاتجاه (ANOVA) ، وعدت الفروق مهمة إحصائياً وعالية المعنوية على مستوى ($P \leq 0.001$) لإحتمال الخطأ ، وأجريت الاختبارات باستعمال برنامج SPSS version/10 الإحصائي من شركة Microsoft .

النتائج والمناقشة

الأستخلاص: أعطى الاستخلاص المائي لنوى التمر بعد التجفيف مسحوقاً بلون بني فاتح وبنسبة استخلاص 7.4 % . وبعد تجفيف المستخلص الإيثانولي للنوى كان المسحوق الناتج ذا لون بني داكن وبنسبة إنتاجية 13.6 % . ونتج عن الاستخلاص بالهكسان زيتاً ذا لون أخضر مصفر باهت ذو نكهة طيبة ، وكانت نسبة الناتج عندها 4.1 مل/100 غم من مسحوق النوى .

سُمية المستخلصات الخام لنوى التمر في نمو الخطوط الخلوية

أظهرت المستخلصات الخام لنوى التمر بشكل عام تأثيرات تثبيطية في خلايا Hep-2 وخلايا AMN3 ، وهذا التأثير التثبيطي كان يعتمد على التركيز المستعمل منها وعلى مدة التعريض Dose- and time-dependent effect ، إذ يلاحظ جلياً في الجدولين (1) و (2) إرتفاع الفعالية التثبيطية لهذه المستخلصات مع زيادة التركيز المستعمل ومدة التعريض ، على الرغم من تفاوت الفعالية لهذه المستخلصات الثلاث، إذ كانت الفعالية الأعلى للمستخلص الايثانولي عند مدد التعريض الثلاث.

قد ترجع الفعالية التثبيطية لهذه المستخلصات إلى احتوائها على مركبات تؤثر في الحالة الفسلجية لهذه الخلايا ومن ثم تسبب هلاكها ، أو احتوائها على مركبات تعمل على إيقاف دورة الخلايا السرطانية Arrest cell cycle عند طور معين وتمنعها من التكاثر، أو احتوائها على مركبات تحفز الخلايا السرطانية على الموت المبرمج Apoptosis.

لقد إستعملت خلايا REF في هذه الدراسة لغرض تقييم التأثير السّمي لهذه المستخلصات في الخلايا الطبيعية ، وقد عُوّضت هذه الخلايا لأطول مدة تعريض استعملت في الخلايا السرطانية (72 ساعة) ، وذلك للتأكد من تأثير هذه المستخلصات في الخلايا الطبيعية لمدة التعريض الطويلة ، أما مدد التعريض الأقل (24 ،

48) ساعة فهي غير مجدية في هذا الغرض. لقد أظهرت هذه المستخلصات فعالية تثبيطية واطئة جداً في حيوية هذه الخلايا بعد ثلاثة أيام من تعريضها مقارنةً بما أظهرته هذه المستخلصات في الخلايا السرطانية (Hep-2 و AMN3) ، وكما يظهر في الجدول (3) ، وهذا ما يشير إلى أن هذه المستخلصات غير مؤذية للخلايا الطبيعية ، وأن فعاليتها التثبيطية كانت إنتخابية على الخلايا السرطانية Selectively affecting . قد يكون السبب في ذلك أن آلية تأثير المستخلص النباتي لها علاقة بالمستقبلات Receptors الموجودة على أسطح الخلايا، ومن المعلوم أن للخلايا السرطانية مستقبلات تختلف عن تلك التي تمتلكها الخلايا الطبيعية.

جدول (1) النسبة المئوية لتثبيط حيوية خلايا Hep-2 بالمستخلصات الخام لنوى التمر بعد مدد التعريض الثلاث

التراكيز المستعملة (مايكروغرام/مل)	النسبة المئوية للتثبيط (%)								
	بعد 24 ساعة			بعد 48 ساعة			بعد 72 ساعة		
	المائي	الإيثانولي	الهكساني	المائي	الإيثانولي	الهكساني	المائي	الإيثانولي	الهكساني
78.125	* -	1.2	0.9	-	2.6	1.1	4.1	3.7	2.4
156.25	* -	2.2	2.1	-	4.6	2.2	6.3	5.9	2.5
312.5	-	* 4.2	2.4	-	8.7	2	8.8	* 12.0	4.3
625	2.7	* 15.8	3	4.7	* 11.1	3.6	* 12.3	* 34.8	6.9
1250	* 12.5	* 22.6	* 7.3	* 9.2	* 23	5.3	* 24.6	* 51.3	* 18.4
2500	* 25	* 31.9	* 18.1	* 15.8	* 22.4	* 9.4	* 39.1	* 56.7	* 22.5
5000	* 41.4	* 52.3	* 17.9	* 41.2	* 54.9	* 32.6	* 51.6	* 73.1	* 21.2
10000	* 42.6	* 65.2	* 28.7	* 46.7	* 72.6	* 31.4	* 54.0	* 89.4	* 42.9

علامة (-) تشير إلى عدم وجود تثبيط ، علامة (*) تعني أن الفرق معنوي مقارنة بعينة السيطرة عند مستوى إحتمالية ($P \leq 0.001$)

جدول (2) النسبة المئوية لتثبيط حيوية خلايا AMN3 بالمستخلصات الخام لنوى التمر بعد مدد التعريض الثلاث

التراكيز المستعملة (مايكروغرام/مل)	النسبة المئوية للتثبيط (%)								
	بعد 24 ساعة			بعد 48 ساعة			بعد 72 ساعة		
	المائي	الإيثانولي	الهكساني	المائي	الإيثانولي	الهكساني	المائي	الإيثانولي	الهكساني
78.125	1.5	* 21.4	2	2.1	* 17.3	2.6	2.7	* 20.3	3.4
156.25	2.8	* 40.3	4.3	3.6	* 48.4	5.9	2.9	* 52.5	8.1
312.5	5.2	* 20.2	6.7	7.2	* 22.5	9.3	6.6	* 18.7	* 17.6
625	5.3	* 22.4	* 17.0	* 12.1	* 24.2	* 15.2	* 19.3	* 32.3	* 21.8
1250	9.3	* 58.3	* 22.4	* 19.6	* 31.6	* 18.3	* 26.4	* 48.6	* 21.3
2500	* 21.4	* 61.2	* 32.6	* 27.3	* 54.3	* 26.7	* 31.9	* 55.2	* 26.7
5000	* 21.6	* 70.3	* 36.4	* 40.1	* 69.5	* 32.4	* 46.5	* 73.1	* 31.0
10000	* 33.3	* 71.5	* 35.6	* 46.2	* 81.9	* 41.3	* 51.4	* 93.4	* 47.2

علامة (*) تعني أن الفرق معنوي مقارنة بعينة السيطرة عند مستوى إحتمالية ($P \leq 0.001$)

جدول (3) النسبة المئوية لتثبيط حيوية خلايا REF بالمستخلصات الخام لنوى التمر بعد مرور 72 ساعة من التعريض

التراكيز المستعملة (مايكروغرام/مل)	النسبة المئوية للتثبيط (%)		
	المائي	الإيثانولي	الهكساني
78.125	-	1.4	0.2
156.25	0.9	2.3	-
312.5	-	2.1	0.6
625	0.8	4.9	1.4
1250	2.6	6.1	3.5
2500	3.4	8.3	9.5
5000	6.7	* 12.3	10.2
10000	* 10.8	* 17.7	*15.4

علامة (-) تشير إلى عدم وجود تثبيط ، علامة (*) تعني أن الفرق معنوي مقارنة بعينة السيطرة عند مستوى إحتمالية ($P \leq 0.001$).

دراسة تأثير المستخلصات الخام لنوى التمر في إنقسام الخلايا اللمفاوية البشرية

تم إجراء بعض التجارب الخاصة بالسمية الخلوية لهذه المستخلصات في مزارع الخلايا اللمفاوية ، وتمت دراسة أكثر الإختبارات حساسية لتقييم التأثير المحتمل للعوامل المطفرة Mutagenic أو المسرطنة Carcinogenic و هي المقاييس الوراثية الخلوية Cytogenetic parameters كحساب معامل التحول الأرومي (BI %) ، ومعامل الانقسام الخيطي (MI %) ودراسة الزيغ الكروموسومي Chromosomal aberration (43) .بينت النتائج أن هذه المستخلصات قد خفَّضت بشكل معنوي عدد الخلايا في الطور الأرومي، كما خفَّضت عدد الخلايا في الطور الخيطي (لاحظ جدول 4)، كما تبيَّن أن معاملة الخلايا اللمفاوية بمختلف التراكيز المستعملة من المستخلصات المدروسة لم تُحدث أي تغيرات مظهرية أو عددية في كروموسومات تلك الخلايا.

جدول (4) معدل قيم معامل التحول الارومي (BI%) ومعامل الانقسام الخيطي (MI%) للخلايا اللمفاوية البشرية الطبيعية بعد معاملتها بالمستخلصات الخام لنوى التمر

التراكيز المستعملة (مايكروغرام/مل)	معامل التحول الارومي (%)			معامل الانقسام الخيطي (%)		
	المائي	الإيثانولي	الهكساني	المائي	الإيثانولي	الهكساني
0	36.65	36.71	42.52	3.26	4.32	3.65
78.125	37.27	35.19	35.91	3.61	4.27	3.54
156.25	35.36	30.43	* 27.32	3.22	4.18	3.23
312.5	35.29	* 22.94	* 22.56	3.17	4.11	2.98
625	34.59	* 21.55	* 22.52	2.84	3.97	2.74
1250	31.65	* 20.63	* 18.77	2.74	3.30	2.61
2500	* 29.47	* 18.40	* 17.34	2.23	3.27	* 2.15
5000	* 28.39	* 16.33	* 12.58	* 1.87	* 2.87	* 1.64
10000	* 25.77	* 15.21	* 10.33	* 1.69	* 2.62	* 1.71

علامة (*) تعني أن الفرق معنوي مقارنة بالتركيز صفر (عينة السيطرة) عند مستوى إحتمالية ($P \leq 0.001$)

إن انخفاض أعداد الخلايا في الطورين الأرومي والخيطي بفعل هذه المستخلصات قد يرجع إلى أنها قد أحدثت تداخلاً في العلاقة بين الخلايا اللمفاوية والمادة المشطرة (PHA) التي تحثها على الإنقسام .

استعمال المستخلصات الخام لنوى التمر بديلاً عن الكولسيمايد في إيقاف انقسام الخلايا اللمفاوية

إن المستخلصات بجميع التراكيز المستعملة منها لم توقف انقسام الخلايا في الطور الاستوائي ، حيث لم تشاهد أي خلية تمرّ في هذا الطور في شرائح المعاملة ، وهذا ما يؤكد أن هذه المستخلصات لا تمتلك الفعالية التي يمتلكها الكولسمايد تجاه الخلايا .

إستعمال المستخلصات الخام لنوى التمر بوصفها مواد مُشطِّرة للخلايا اللمفاوية

لم تعمل المستخلصات بتراكيزها المختلفة عمل المادة المشطرة Phytohemagglutinin (PHA) في تحفيز خلايا الدم المحيطي على الانقسام ، وقد يكون السبب في ذلك هو إختلاف الطبيعة الكيميائية للمواد الفعالة الموجودة في هذه المستخلصات عن تلك التي تمتلكها المادة المشطرة المستخدمة بشكل روتيني في الدراسات الوراثية. إن المادة المشطرة المستخدمة في الدراسات الوراثية هي عبارة عن مادة مستخلصة من نبات الفاصوليا *Phaseolus vulgaris* ، تعمل على تحفيز انقسام خلايا مزارع الدم المحيطي لتجعل الدراسة الكروموسومية في تلك المزارع أمراً مُيسراً وسريعاً (44).

تحديد الجرعة المميتة النصفية LD50 للمستخلص الايثانولي لنوى التمر

إن القيمة العالية للجرعة المميتة النصفية (LD50) للمستخلص الايثانولي لنوى التمر اللتي بلغت 10.07 غم/كغم من وزن الحيوان (لاحظ جدول 5)، تعكس حقيقة أن هذا المستخلص هو أمين وغير سآم للأجهزة الحيوية عند استعماله داخل جسم الكائن الحي (*in vivo*) .

جدول (5) تحديد الجرعة المميتة النصفية LD50 للمستخلص الايثانولي للنوى في الفئران المختبرية بطريقة الصعود والنزول

مقدار الزيادة أوالنقصان في الجرعة (d)	موت الحيوان أو بقاؤه حياً بعد 24 ساعة	قيمة K الجدولية	آخر جرعة إستعملت (xf)	الجرعة المميتة النصفية (LD50)
0.5 غم/كغم	OOXOOX	- 0.861	10.5 غم/كغم	10.07غم/كغم

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

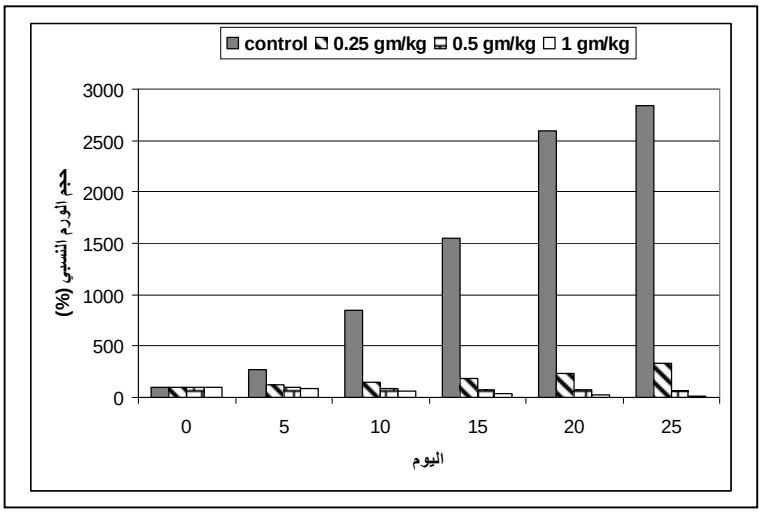
دراسة التأثير العلاجي للمستخلص الايثانولي للنوى في سرطان الغدة اللبنية في الفئران المختبرية

إن سبب تجريع الفئران المختبرية بالمستخلص الايثانولي عن طريق الفم ، هو أن هذا الجزء من نخيل التمر يعدّ مصدراً غذائياً لكثير من الحيوانات ، لذا فإن إستعماله عن طريق الفم في الدراسات التجريبية يحاكي طبيعة تناوله .

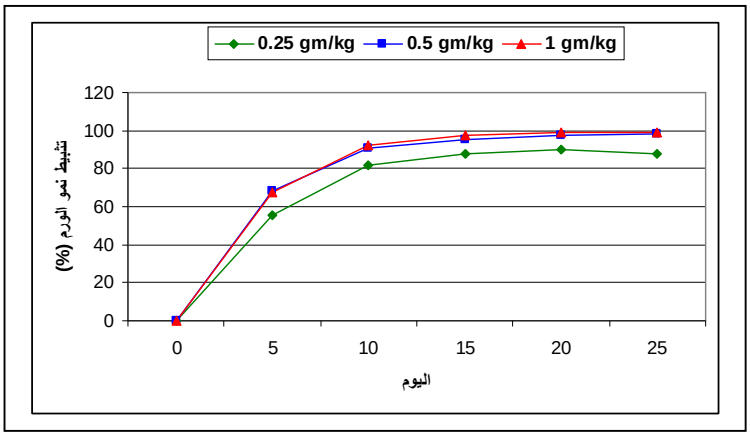
تم إستعمال إثنين من المقاييس لتقييم التغير بحجم الورم في مجاميع الفئران المجرّعة بالمستخلص والمجموعة المجرعة بدارئ الفوسفات (مجموعة السيطرة) ، وهما معدل تثبيط النمو Growth inhibition(GI %) وحجم الورم النسبي Relative tumor volume(RTV) ، وهذان المقياسان كانا جيدين لمتابعة تقدم حجم الورم مع استمرار مدة التجريع بالمستخلص . ثم أُجريت المقارنة أولاً بين الفئران غير المعاملة (السيطرة) والمجاميع المعاملة بالمستخلص عند كل وقت من أوقات تسجيل حجم الورم (5 ، 10 ، 15 ، 20 ، 25) يوم ، ومقارنة أخرى أُجريت لتحديد حجم الورم النسبي لكل يوم من أيام التسجيل مقارنةً باليوم (صفر) لكل مجموعة ، بيّنت النتائج التأثير التثبيطي الواضح للمستخلص في حجم الورم بشكل يعتمد على الجرعة المستخدمة ومدة التجريع Dose- and time-dependent manner .

لقد أعطى المستخلص الايثانولي للنوى نسبة تثبيط عالية تجاه نمو الورم بجميع الجرع المستخدمة منه، وكانت الجرعة العلاجية الأفضل له هي 1 غم/كغم ، أما الجرع الأخرى فكانت أقل تأثيراً (لاحظ الشكلين 1 و 2) .

تعد نوى التمر مصدراً غنياً بالمركبات الفينولية Phenols (45). وتمتلك هذه المركبات فعالية مضادة للأكسدة Antioxidant effectوقد يكون لها دوراً هاماً في تثبيط عمليات الأكسدة المرتبطة بعملية تكّون الورم Tumorigenesis (46،45) . كما تعود الخواص المضادة لتكّون الأوعية الدموية الصغيرة في الورم Antiangiogenic properties التي تُظهرها بعض المستخلصات النباتية إلى احتوائها على هذه المركبات (47)، إذ أن المستخلصات النباتية الغنية بها تثبط إستحثاث عامل النمو Vascular endothelial growth factor بواسطة بيروكسيد الهيدروجين Hydrogen peroxide والعامل Tumor necrosis factor (TNF-α) وبالنتيجة التسبب بخفض حجم الورم (48).



شكل (1) حجم الورم النسبي (RTV %) عند تجريع الفئران بجرع مختلفة من المستخلص الإيثانولي للنوى



شكل (2) معامل تثبيط نمو الورم (GI %) عند تجريع الفئران بجرع مختلفة من المستخلص المائي للثمار

المصادر

1- Greenlee, R.T. ; Hill-Hamon, M.B. ; Murray, T. and Thun, M. (2001). Cancer statistics 2001. *CA. Cancer J. Clin*., 51:15-36.

2- Jemal, A. ; Siegel, R. ; Ward, E. ; Murray, T. ; Xu, J. and Thun, M.J. (2007). Cancer Statistics, 2007. *CA Cancer J. Clin*., 57:43-66.

3- Ministry of Health. (2003). Results of Iraqi Cancer Registry 1999-2001, Iraqi Cancer Board, Baghdad, Iraq.

4- Hellman, S. (1997). Principles of cancer management: Radiation therapy . In: V.T. DeVita ; S. Hellman and S.A. Rosenberg (Eds.), Cancer: principles and practice of oncology, (5th ed.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp.307-332.

5- Lopez-Lazaro, M. (2002). Flavonoids as anticancer agents: structure-activity relationship study. *Curr. Med. Chem.-Anti-Cancer Agents*, 2:691714.

6- DeVita, V.T. (1997). Principles of cancer management : chemotherapy. In:V.T. DeVita ; S. Hellman ; S.A. Rosenberg and L.H. Raven (ed.). Cancer principles and practice of oncology (5th ed.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp.333-348.

7- Kirn, D.H. (2000). Replication-selective microbiological agents : Fighting cancer with targeted germ warfare. *J. Clinc. Invest*., 105:837-839.

8- Katz, A.E. (2002). Flavonoid and botanical approaches to prostate health. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 8:813-821.

9- Azaizeh, H. ; Saad, B. ; Khalil, K. and Said, O. (2006). The state of the art of traditional arab herbal medicine in the eastern region of the mediterranean: A review. *eCAM*, 3:229-235.

10- Mukherjee, A.K. ; Basu, S. ; Sarkar, N. and Ghosha, A.C. (2001). Advances in cancer therapy with plant based natural products. *Current Medicinal Chemistry*, 8:1467-1486.

11- Jiménez-Medina, E. ; Garcia-Lora, A. ; Paco, L. ; Algarra, I. ; Collado, A. and Garrido, F. (2006). A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual *in vitro* effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BMC Cancer*, 6:119-132.

12- Yaseen, N.Y.; Hussein, S.M.; Saleh, F.S. and Mohammad, M.H. (2008). Plant and biological extracts in cancer therapy. Iraqi Center for Cancer and Medical Genetics Research(ICCMGR), Baghdad, Iraq.

13- Ahmed, I.A. ; Ahmed, A.W.K. and Robinson, R.K. (1995). Chemical composition of date varieties as influenced by the stage of ripening. *Food Chemistry*, 54:305-309.

14- Al-Qarawi, A.A. ; Ali, B.H. ; Al-Mougy, S.A. and Mousa, H.M. (2003). Gastrointestinal transit in mice treated with various extracts of date (*Phoenix dactylifera* L.). *Food and Chemistry Technology*, 41: 37-39 .

15- Besbes, S. ; Blecker, C. ; Deroanne, C. ; Lognay, G. ; Drira, N.E. and Attia, H. (2004). Quality characteristics and oxidative stability of date seed oil during storage. *Food Science and Technology International*, 10: 333-338.

16- Dammak, I.; Abdallah, F.B.; Boudaya, S.; Besbes, S.; Keskes, L.; El Gaied, A.; Turki, H.; Attia, H. and Hentati, B. (2007). Date seed oil limit oxidative injuries induced by hydrogen peroxide in human skin organ culture. *Biofactors*, 29(2-3):137-45.

17- Ines, D.; Sonia, B.; Fatma, B.A.; Souhail, B.; Hamadi, A.; Hamida, T. and Basma, H. (2010). Date seed oil inhibits hydrogen

29- Freshney, R.I. (1994). Culture of animal cells: A manual for basic technique (3th ed.). Wiley-liss, A John Wiley & Sons Inc. publication, New York.
30- Mahony, D.E. ; Gilliat, T. ; Dawson, S. ; Stockdale, E. and Lee, S.H. (1989). Vero cell assay for rapid detection of *Clostridium perfringens* enterotoxins. *Applied and Environmental Microbiology*. Pp:2141-2143.
31- 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, Baghdad.
32- Betancur-Galvis, L.A. ; Saez, J. ; Granades, H. ; Salazer, A. and Ossa, J.E. (1999). Antitumor and antiviral activity of Colombian medicinal plant extracts. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94: 531-535.
33- Yaseen, N.Y. ; Tawfiq, M.S. ; Hamadi, A.A. and Estivan, A.G. (1998). Cytogenetic studies on patient with chronic mylocytic leukemia. *Med. J. Tikrit University*, 4:5-9.
34- Yaseen, N.Y. (1990). Cytogenetic study on human colorectal cancer cell. Ph.D. Thesis, University of Sheffield.
35- Stites, D. (1979). Laboratory methods of detection cellular immune function. In: Fundberg, H.H. ; Stites, D. and Coldwell, J. (ed). Basic and clinical immunuology, LAGE, Medical Publication, California, pp. 318-322.
36- Shubber, E.K. and Al-Allak, B.M. (1986). Spontaneous chromosomal aberration and SCE in human lymphocytes : Effects of culture conditions. *Nucleus*, 22: 92-98.
37- ISCN. (1995). An international system for human cytogenetic nomenclature (1995). Mitelman, F.(ed.), S. Karger Publishers, Inc., Basel, Switzerland.
38- Dixon, W.J. (1980). Efficient analysis of experimental observations. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol*., 20: 441-462.
39- Shibata, T. ; Giaccia, A.J. and Brown, M. (2002). Hypoxia-inducible regulation of a prodrug-activating enzyme for tumor-specific gene therapy. *Neoplasia*, 4:40-8.
40- Grote, D. ; Russell, S.J. ; Cornu, T.I. ; Cattaneo, R. ; Vile, R. ; Poland, G.A. and Fielding, A.K. (2001). Live attenuated measles virus induces regression of human lymphoma xenografts in immunodeficient mice. Blood, 97(12):3746-3754.
41- Blumenthal, R.M. ; Sharkey, R.M. ; Natale, A.M. ; Kashi, R. ; Wong, G. and Goldenberg, D.M. (1994). Comparison of equitoxic radio-immunotherapy and chemotherapy in treatment of human colonic cancer xenografts. *Cancer Res*., 54: 142-151.
42- Phuangsab, A. ; Lorence, R.M. ; Reichard, K.W. Peeples, M.E. and Walter, R.J. (2001). peroxide-induced oxidative stress in human epidermal keratinocytes. *Int. J. Dermatol*., 49(3):262-8.
18- Kamel, B.S. ; Diab, M.F. ; Ilian, M.A. and Salman, A.J. (1981). Nutritional value of whole dates and date pits in broiler rations. *Poultry Science*, 60: 1005-1111 .
19- Elgasim, E.A. ; Alyousef, Y.A. and Humeida A. M. (1995). Possible hormonal activity of date pits and flesh fed to meat animals. *Food Chemistry*, 52: 149-152 .
20- Yousif, O.M. ; Osman, M.F. and Alhadrami, G.A. (1996). Evaluation of dates and date pits as dietary ingredients in Tilapia (*Oreochromis aureus*) diets differing in protein sources. *Bioscience and Technology*, 57: 81-85 .
21- Barreveld, W.H. (1993). Date palm products. FAO Agricultural Services Bulletin No. 101. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
22- Hozumi, T. ; Yoshida, M. ; Ishida, Y. ; Mimoto, H. ; Sawa, J. ; Doi, K. and Kazumi, T.(1995). Long-term effects of dietary fiber supplementation on serum glucose and lipoprotein levels in diabetic rats fed a high cholesterol diet. *Endocr. J*., 42:187-192 .
23- Vuksan, V. ; Jenkins, D. ; Spadafora, P. ; Sievenpiper, J.L. ; Owen, R. ; Vidgen, E.; Brighenti, F. ; Josse, R. ; Leiter, L.A. and Bruce-Thompson, C.(1999). Konjac-mannan (glucamannan) improves glycemia and other associated risk factors for coronary heart diseases in type 2 diabetes. A randomized controlled metabolic trial. *Diabetes Care*, 22:913-919 .
24- Walsh, D.E. ; Yaghoubian, V. and Behforooz, A. (1984). Effect of glucomannan on obese patients: a clinical study. *Int. J. Obes*., 8: 289-293.
25- Erskine, W.; Moustafa, A.T.; Osman, A.E.; Lashine, Z.; Nejatian, A.; Tamer Badawi, T. and Ragy, S.M.. Date Palm in the GCC countries of the Arabian Peninsula. Available at: {http://www.icarda.org/aprp/Datepalm/introduction/intro-body.htm}.
26- Harborne, J.B. ; Marbay, T.J. and Mabray, H. (1975). Physiology and function of flavonoids. Academic Press, New York, pp.970.
27- Simandi, B. ; Kery, A. ; Kristo, S.T. ; Andras, C. ; Prechi, A. and Fekete, J. (2001). Supercritical fluid extraction of non-volatile terpenoids from medicinal plants. *Acta. Pharm. Hung*.,71: 318-324.
28- Freshney, R.I. (2000). Culture of animal cells: A manual for basic technique (4th ed.). Wiley-liss, A John Wiley & Sons Inc. publication, New York.

pits in a model meat system. *International Food Research Journal*, 19(1): 223-227

46- Neto, C.C. (2007). Cranberry and its phytochemicals: A review of *in vitro* anticancer studies. *J. Nutr.*, 137: 186S-193S.

47- Bagchi, D. ; Sen, C.K. ; Bagchi, M. and Atalay, M. (2004). Anti-angiogenic, antioxidant and anticarcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biochemistry (Mosc)*, 69: 75-80.

48- Atalay, M. ; Gordillo, G. ; Roy, S. ; Rovin, B. ; Bagchi, D. ; Bagchi, M. and Sen, C.K. (2003). Anti-angiogenic property of edible berry in a model of hemangioma. *FEBS Lett.*, 544: 252-257.

Newcastle disease virus therapy of human tumor xenografts : antitumor effects of local or systemic administration. *Cancer Letters*, 172: 27-36.

43 - Shubber, E.K. ; Amin, N.S. and El-Adhami, B.H. (1998). Cytogenetic effects of copper-containing intrauterine contraceptive device (IUCD) on blood lymphocytes. *Mutat. Res.*, 417: 57-63.

44- Miller, O.J. and Therman, E. (2001). Human chromosome, (4th ed.), Springer-Verlag Inc., New York, pp.4.

45- Amany, M. M. B.; Shaker, M. A. and Abeer, A. K. (2012). Antioxidant activities of date

EFFECT OF CRUDE EXTRACTS OF DATE PITS (PHOENIX DACTYLIFERA L. CV. ZAHDI) ON SOME CANCER CELL LINES IN VITRO AND THEIR EFFECT ON HUMAN LYMPHOCYTES AND TREATMENT OF TRANSPLANTED MAMMARY ADENOCARCINOMA IN MICE

YASIR H. AL-JURAISY NAHI Y. YASEEN BADRY AL-ANI
E.mail: yasir.aljuraisy@yahoo.com

ABSTRACT

The present investigation represents a preliminary study of the effect of crude extracts (aqueous, ethanolic and hexanic) of date pits (*Phoenix dactylifera* L. cv. Zahdi) on two malignant cell lines (human laryngeal carcinoma-Hep2 and murine mammary adenocarcinoma-AMN3) and one normal cell line (rat embryo fibroblast-REF). The study also includes evaluation of the effect of these extracts on several cytogenetic parameters such as mitotic index (MI%), blast index (BI%) and chromosomal aberrations (CA) after *in vitro* culture of peripheral blood lymphocytes. This work also includes a study of the therapeutic potential of one of these extracts in the treatment of transplanted murine mammary adenocarcinoma in mice.The *in vitro* cell growth assay showed that there was time- and concentration-dependent cytotoxic effects of crude extracts of date pits on Hep2 and AMN3 cell lines. The highest significant effect of these extracts was achieved after 72 hrs of exposure with the highest concentration (10000 µg/ml). Ethanolic extract of pits (EP) caused growth inhibition percentage 89.4% , 93.4% for Hep2 and AMN3 respectively. However, 72 hrs exposure to EP at concentration of 10000 µg/ml caused slight inhibitory effect on REF cell line, reaching 17.7%.On the other hand, the crude extracts of pits caused significant reduction in the mitotic index and blast index of peripheral human lymphocytes, but without any structural or numerical chromosomal aberrations. Also these extracts neither replaced phytohemagglutinin (PHA) as mitogenic agent, nor colcemide as mitotic arresting agent at metaphase.The therapeutic doses of EP were determined according to LD_{50} in mice. The results indicated high effectiveness of this extract in a dose- and time-dependent manner. The highest therapeutic doses of EP (1 gm/kg B.wt.) showed the best therapeutic effect by reducing the tumor volume in mice to about 83.8%.The comparison of relative tumor volumes of different groups revealed highly significant differences among all treated groups and those of untreated (control) group.