تقييم التاثير السمي لمستخلص الطحلبين *Nostoc* sp. و *Scenedesmus acuminatus* في خط خلايا سرطان الحنجرة البشري Hep-2

غيداء حسين الربيعي* ، احمد ساهي دويش

كلية العلوم– الجامعة المستنصرية–بغداد–العراق

الخلاصة:

تناولت الدراسه عزل وتشخيص نوعين من الطحالب هما الطحلب *Scenedesmus* (Lag.) Chodat *acuminatus* التابع لشعبة الطحالب الخضر و*Nostoc* sp. التابع لشعبة الطحالب الخضر المزرقة من بركة النافوره في الجامعة المستنصرية .أستخدام الوسط االزرعي Chu 10 لتنمية الطحلب في مزرعة مستقرة في ظروف مختبرية ثابتة (25 °م وشدة أضاءة 200 مايكروانشتاين /م^2 /ثا ولمدة 6:18 ساعة اضاءة :ظلام). حصدت المزرعة بعد اربعة عشرة يوما من عمر المزرعة.أستخدم الميثانول 95%لأستخلاص المواد الفعالة الخام من الكتلة الحية الجافة .أختبرت كفاءة فعالية المستخلص تجاه الخط الخلوي Hep–2 في مركز التقنيات الأحيائية في جامعة النهرين وبتراكيز مختلفة (125و 250و500 و1000 و2000 و4000) ميكروغرام /مليلتر، اظهرت الدراسة ان مستخلص الطحلب الأخضر *Scenedesmus acuminatus* أفضل فعالية من مستخلص الطحلب الأخضر المزرق .*Nostoc* sp تجاه الخط االخلوي Hep –2 فقد وجد ان المستخلص له تأثير سمي بجميع التراكيز وكان أعلى تأثير سمي لمستخلص *Senedesmusa cuminatus* عند التركيز 1000مايكروغرام /مليلتر بمقدار 69.19 %،في حين كان اعلى تأثير سمي عند التركيز 4000 مايكروغرام /مليلتر بمقدار 55.4 % لمستخلص الطحلب الأخضر المزرق . *N . sp* ولم يظهر تأثير مثبط عند التراكيز القليلة قيد الدراسة.

كلمات مفتاحية:الطحالب الدقيقة، مستخلصات ،الخطوط السرطانية ، مركبات مثبطة

Evaluation Cytotoxic Effect of *Nostoc sp. and Scenedesmus acuminatus* Extracts on Cell Line Hep -2 *in vitro*

Ghaidaa Husein Al-Rubaiee , Ahmed Sahi Dwaish

College of science-University of Al-Mustansriah, Baghdad-Iraq

Abstract

In this Study, isolate and identification two types of algae *Scenedesmus acuminatus* (Lag.) Chodat belonging to Division of green –algae and *Nostoc sp*. Of the belong to Division of cyanobacteria from fountain pool at the University of Al-Mustansiriya. Use culture medium Chu- 10 for growth of algae on batch culture in the laboratory conditions (25 ˚ c ±2 and light intensity 200 µE/m²/sec the light:dark regime was used 16:8 hrs). Harvested culture after fourteen days of age farm. Use methanol 95% to extract active compound from raw dry biomass, Tested the effectiveness of the efficiency of the cell extract toward the cell line (human larynx cancer) Hep-2 from biotechnology center at the University of Alnahrain university

*Email:ghaidaa_5@yahoo.com

and different concentrations (125, 250, 500, 1000, 2000 and 4000 µg / mL) The study showed that the extract of green algae *Scenedesmus acuminatus* better the effectiveness of the extract blue green alga *Nostoc sp*. toward the cell line Hep -2 found that the extract has a toxic effect of all concentrations had a higher effectHigher toxic effect of the extract at concentration *Senedesmus acuminatus* 1000 µg / mL by 69.19%, while the toxic effect was higher when the concentration 4000 µg / mL by 55.4% to blue-green alga extract *Nostoc* sp. Did not show inhibitory effect at concentrations of a few under study.

Keywords:microalgae ,extracts ,cell line, *active compound*

المقدمة

تعد الطحالب الدقيقة من النباتاتت الواطئة ذاتية التغذية Autotrophic ،اما بدائية االنواة او حقيقية النواة وتحول الطاقة الشمسية الى طاقة كيميائية بعملية البناء الضوئي Photosynthesis وتكون بسيطة التركيبلا تتميز الى ساق وأوراق وجذور حقيقية وتحتوي على الكلوروفيل ولها تراكيب تكاثرية بسيطة ولاتحاط بالغلاف العقيم[1].

أجريت خلال العقود الاخيرة عدد من الدراسات حول الكثير من المركبات التي يمكن أن تستخدم في تجارب على المركبات التي لها تأثير سمي في الخلايا السرطانية ، ومن جانب أخر كان لبعض منها تأثيرات سمية جانبية كبيرة على الخلايا السليمة ولذلك كان لابد من اختيار المركبات الأقل سمية في العلاج وتعد الأحياء المجهرية مصدراً فريداً للمركبات الأيضية الفعالة حيويا والمهمة طبيا ، لذا فقد تم أختبار مجاميع من الأحياء المجهرية ومنها الطحالب الدقيقة لهذا الغرض[2,3] . اذ تنتشر الطحالب الدقيقة في بيئات مختلفة لتحملها الواسع للظروف البيئية المتغيرة من درجة الحرارة والملوحة والمغذيات والجفاف والأشعة فوق البنفسجية لذا يجب أن تكيف بمثل هذه الظروف مما يجعلها تمتلك خصائص فسيولوجية فريدة من نوعها لذا تعد من المصادر الطبيعية لأنتاج المركبات الفعالة Natural products التي يمكن الأستفادة منها لعلاج كثير من الأمراض[4].

تنتج الطحالب الدقيقة مثل *Anabeana sp.* و *Nostoc sp.* و *Oscillatoria sp.* و *Chlorella sp.* و *Scenedesmus sp.* مركبات فعالة ناتجة من الأيض الثانوي *Secondary metabolism* ذات وظيفة سمية للخلايا [1,5] ومن اهم هذه المركبات هي الأحماض الدهنية غير المشبعة، الكاروتينات B-carotein، فيكوسيانين، وفيكوارثين وتراكيز عالية من الفيتامينات B6, B1,B2 B12, فضلا عن فيتامين D,k و الأنزيمات . وأن كل هذه المركبات الفعالة تعد مضادات الأكسدة الطبيعية و مضادة للالتهابات وسامة للخلايا [4].ويكون مسار تصنيع المركبات الحيوية في خارج وداخل الجسم الحي بنظام غاية الدقة ، فقد لوحظ أن مستوى أنتاج المركبات الحيوية تتأثر بمسار الأنزيمات الذي يسيطر عليها بمستوى التعبير الجيني [6]. Level gene expression عزلت كثير من المركبات المستخلصة من الطحالب ومن اهمها Cryptophycine وacetogenin وBromophenol و10 Olastatin و Curacin A و(NRPS) nonribosomal peptide synthetase وMicrocyclomide وCylinrospermopsin وNostocine التي تتميز بفعاليتها ضد الأورام السرطانية أذ أثبتت هذه المستخلصات الخام والمنقاة جزئياً أنها تسبب الموت المبرمج apoptosis للخلايا الكبدية واللمفاوية والطلائية فضلا عن سرطان الجلد fibroplast وخلايا الأمعاء والخلايا النخامية وخلايا سرطان الحنجرة البشري [7,4,1] ، اذ أظهرت هذه االمستخلصات تأثيرا تثبيطيا للأورام السرطانية داخل الجسم *in vivo* وخارج الجسم *in vitro* وكان بعض هذه الأورام مقاومة للمعالجة الكيميائية [8].ركزت هذه الدراسه على الطحالب الدقيقة لقلة الدراسات حول فعالية مستخلصاتها ضد الأمراض السرطانية ، ولتوافر هذه الطحالب في البيئة المحلية فقد هدفت الدراسة إلى:عزل وتشخيص أنوع من الطحالب المحلية ثم دراسة التأثير التثبيطي لمستخلص الطحلب *Nostoc* sp. و*Scenedesmus acuminatus* في الخط الخلوي (سرطان الحنجرة البشري)Hep-2.

المواد وطرائق العمل

1-تحضيرمجفف الخلايا

تم عزل الطحلب *Scenedesmus acuminatus* بأتباع طريقة Serial dilution methods [9] و الطحلب *Nostoc sp.* بأتباع طريقة Streak Plating[10] من بركة النافورة في الجامعة االمستنصرية.تم تشخيص الطحلب *Scenedesmus acuminatus* التابع لشعبة الطحالب الخضر Chlorophyta والطحلب *Nostoc* sp. التابع لشعبة الطحالب الخضر المزرقة

Cyanophyta بأستخدام المجهر الضوئي المركب Olympus وبأعتماد مصدر التشخيص[12,11] على الترتيب ، إذ أستزرع الطحلب في الوسط الزرعي Ch-10 [10] وبأستعمال المزارع المستقرة وفي ظروف مختبرية ثابتة (درجة حرارة 25مْ وشدة إضاءة 200 مايكرو أنشتاين /م^2/ثا ولمدة 6:18 ساعة إضاءة : ظلام) ثم تم ترسيب المزارع بعد اربعة عشر يوما وذلك بالنبذ المركزي عند سرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة . جمع بعدها الراسب وجفف عند درجة حرارة 40مْ ولمدة 48 ساعة [8] .

2- أستخلاص المواد الفعالة

تم أستخلاص المركبات المنتجة الخام بأستعمال جهاز الأستخلاص Soxhelat، إذ تم وزن غرام 1 من الطحلب المجفف وأضيف له 250 مليمترا من الميثانول بتركيز 95% وتركت العينة 2 ساعة لكي يتشبع المسحوق بالمذيب ثم أجري الأستخلاص ولمدة 4 ساعة و جفف الراشح بأستعمال جهاز المبخر الدوار عند درجة حرارة 40 مْ ووزن الناتج من عملية الأستخلاص [8] .

3-دراسة التأثير السمي لمستخلص الطحالب:-

أ- الخط الخلوي (سرطان الحنجرة البشري Hep-2)

أختير خط الخلايا (سرطان الحنجرة البشري) وأستعمل هذا الخط عند التمريره 20 .تم الحصول على الخط الخلوي السرطاني من مركز بحوث التقانة الإحيائية / جامعة النهرين .تمت تنمية الخط السرطاني في الزجاج في أطباق الزراعة النسيجية (Falcon 25cm^3) وبدرجة حرارة 37 °م وبشكل أفقي بأستعمال الوسط الزرعي (RPMI-1640) Roswell Park Memorial Institute المجهز بـ 10% من مصل جنين البقر Fetal calf Serum،وعند الحصول على طبقة أحادية كاملة Confluent monolayer عوملت الخلايا بمحلول التربسين –فرسين لتقسمها إلى مزرعة ثانوية أخرى Subculture [13] .

ب-تهيئة الخط الخلوي Hep-2

تم تفريغ وعاء الزرع النسيجي الذي يحتوي على الخلايا السرطانية من الوسط الزرعي القديم ،ثم أضيفت له كمية قليلة من محلول التربسين –فرسين 2-3 مليلتر ووضع في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 2-5 دقيقة .وبعد ذلك أضيف الوسط الزرعي الذي يحتوي على نسبة 10% من مصل الجنين البقري إلى الوعاء وبمقدار 20 مليلتر مع إحداث حركة دورا نية بسيطة لأجل إزالة أكبر كمية من الخلايا الموجودة في الوعاء وسكبت بعدها محتوياته في وعاء معقم .

ج-التأثير السمي

تم أجراء اختبار السمية الخلوية للمستخلصين بعدة تراكيز في نمو الخط الخلوي Hep- 2 بحسب طريقة [13]وهي كالأتي :

- **زرع الخلايا Cell Seeding**

استعملت أطباق الزرع النسيجي متعددة الحفر Micro liter Plates 96 ذات القعر المسطح Flat bottom لزرع الخلايا السرطانية المستحصل عليها بعد تكون الطبقة الأحادية الكاملةوأزالتها من سطوح الأوعية وتفكيكها بمحلول التربسين /الفرسين.

- **الحضن Incubation**

وضع الطبق في الحاضنة بدرجة 37 م° مزودة بـ 5% من غاز ثنائي أوكسيد الكاربون إلى اليوم الثاني للسماح بالتصاق الخلايا Cell attachment .

- **المعاملة Treatment**

فحصت الأطباق التي تحتوي على الخلايا السرطانية Hep -2 تحت المجهر المقلوب inverted microscope للتأكد من نمو الخلايا بشكل جيد في الحفر أعقبها أجراء الخطوات الأتية:-

1- حُضر[14] كل من المستخلص الميثانولي للكلوريلا بوساطة إذابة 0.01 غرام من المستخلص الخام المركز في 1مليلتر من المذيب الوسط (DMSO) Dimethyl Sulf Oxide ثم عُقّم بأستعمال مرشح ذي ثقوب بقطر 0.22 مايكروميتروحُضّرت منه ستة تراكيز مخففة وهي (125و250و500و1000و2000و4000) مايكروغرام/مليلتر وفي ظروف معقمة .استخدمت جميع التراكيز المحضرة مباشرة بعد أكمال عملية التحضير .

2- سكب الوسط الزرعي من الحفر في أطباق الزرع النسيجي بعد رفع اللاصق ، ثم أضيف 0.2 مليلتر /حفرة من كل تركيز سابق وبواقع 3حفر لكل تركيز مع زراعة حفر آخرى محتوية على الوسط الزرعي الخالي من مصل الجنين البقري فقط التي تعد السيطرة السالبة وحفر أخرى تحوي DMSO بتركيز 0.1% مع الوسط الزرعي الخالي من المصل بوصفه سيطرة موجبة .

بعد مرور مدة التعريض Exposure time وهي 48 ساعة ،أخرج الطبق من الحاضنة وأضيف إليه 50 مايكروليتر من محلول صبغة الأحمر المتعادل وأُعيد الطبق مرة ثانية إلى الحاضنة لمدة ساعتين . أُخرج بعدها الطبق وأزيلت محتوياته وغسلت الخلايا بمحلول دارئ الفوسفات الملحي(PBS) الى حين زوال الصبغة الزائدة ، أضيف بعد ذلك لكل حفرة 50 مايكرولتراً من محلول دارئ الفوسفات الملحي المحمض بالأيثانول المطلق 1:1 (محلول استخلاص الصبغة). وسجلت النتائج بأستخدام جهاز الاليزا بطول موجي 492 نانومتر . اعتمدت أختبار سمية الخلوية cytotoxicity assay لتقويم تأثير تراكيز المستخلص في نمو الخلايا بدلالة النسبة المؤية لمعدل التثبيط IR%، حسبت النسبة المؤية للتثبيط الخلايا (IR%) حسب المعادلة الاتية[15]:

$$IR\% = \frac{A-B}{A} \times 100$$ حيث A تعني السيطرة ،B تعني معدل القراءات Test

النتائج والمناقشة

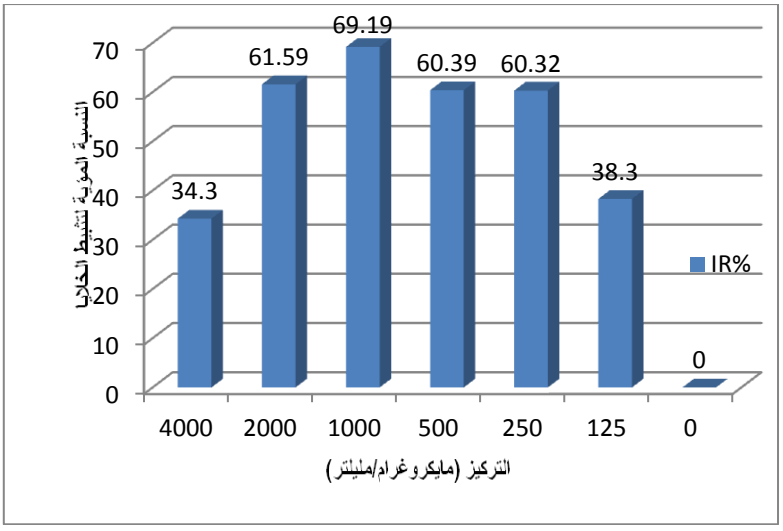
1-تأثير المستخلص *Scenedesmu sacuminatus* على الخط الخلوي Hep -2

يتضح من الدراسة وجود أن التأثير سمي للطحلب *Scenedesmus acuminatus* اكثر فعالية من الطحلب الأخضر المزرق *Nostic* sp. ،حيث بينت النتائج أن التراكيز المختلفة لمستخلص الميثانولي للطحلب الأخضر *Scenedesmus acuminatus* تأثيرا في نمو الخلايا Hep -2 الجدول-1. وأظهرت نتائج التحليل الأحصائي لايوجود فرق معنوي ($P<0.05$) بين التراكيزالمستعملة (2000و1000و500و250).فقد تبين أن لمستخلص الميثانول الخام تأثيراً سمياً واضحاً في جميع التراكيز ،إذ سجل أعلى تأثير مثبط 69.19% عند تركيز 1000 مايكروغرام/مليلتر (الشكل 1) .ويعود السبب في ذلك إلى نشاط الأحماض الدهنية التي تسبب عملية امتزاز على سطح الخلية وتغير في نفإذية أغشية الخلية [16] . تشير الدراسات أيضاً إلى إن الأحماض الدهنية المشبعة وغير المشبعة لها نشاطاً مضاداً للأورام السرطانية ،وجد ان نسبة الدهون في *Scenedesmus* sp. 14-22 % من الوزن الجاف [17, 18].وتعمل الأحماض الدهنية بوصفها عوامل غير مزدوجة Uncoupling Agents مما يجعل الأغشية نفإذة للبروتينات فيحدث تثبيط في بناء ATP وأن الأحماض الدهنية غير المشبعة أقوى فعالية من الأحماض الدهنية المشبعة ويكون لموقع الأصرة المزدوجة ونوعها وطول السلسلة ودورها في تحديد مدى فعالية هذه الأحماض [16]. وقد يرجع السبب الأخر لسمية الخلايا إلى أن الصبغات الكاروتينية التي لها دور في تثبيط نمو الخلايا السرطانية داخل الجسم *in vivo* وخارج الجسم *in vitro* ويعتقد أن هذه الصبغات تقوم بكبح الجين المسؤول عن تحول الخلايا من الطور G0 إلى الطور G1 في دورة الخلايا cell cycle [17].

الجدول 1- معدل نسبة التثبيط (IR%)للمستخلص الميثانولي للطحلب *Scenedesmus acuminatus* في الخط الخلوي السرطاني Hep -2

التركيز (مايكروغرام /مليلتر)	النسبة المئوية للتثبيط (IR%)
4000	**34.3±4.46b**
2000	**61.59±4.68a**
1000	**60.19±6.12a**
500	**60.39±1.64a**
250	**60.32±0.78a**
125	**38.3±2.42b**
control	**0±0.00**

الحروف االمختلفة في الأعمدة تعني وجود فرق معنوي عند مستوى ($P<0.05$).



الشكل1– التأثير التثبيطي المستخلص للطحلب *Scenedesmus acuminatus* في الخط الخلوي2- Hep

2–تأثير المستخلص .*Nostoc* sp على الخط الخلوي 2- Hep.

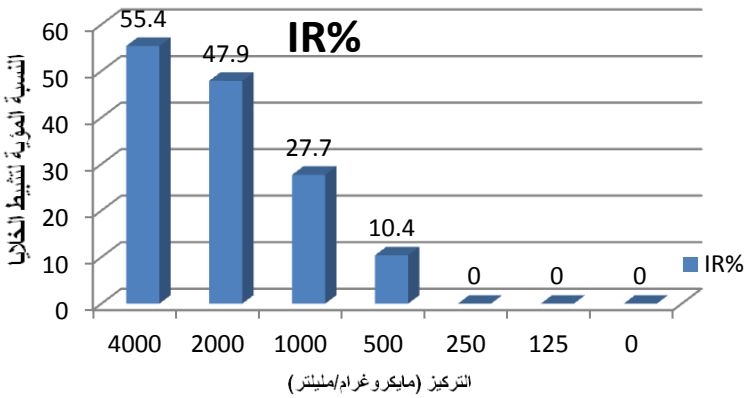
يتضح من النتائج أن للتراكيز المختلفة للمستخلص الميثانولي للطحلب .*Nostoc* sp تأثيراً في نمو الخلايا 2–Hep الجدول–2. وأظهرت نتائج التحليل الأحصائي وجود فرق معنوي($P<0.05$) بين التراكيزالمستعملة .فقد تبين أن لمستخلص الميثانول الخام تأثيراً سمياً واضحاً في التراكيز العالية حسب الدراسة عدا التركيز125 و250مايكروغرام/مليلتر الذي لم يظهر أي تأثير مثبط لنمو الخلايا ،فقد سجل أعلى تأثير مثبط 55.4–% عند تركيز 4000 مايكروغرام/مليلتر. وأقل تأثير سمي على الخلايا عند التركيز 500 مايكروغرام/مليلتر يبلغ 10.4% (الشكل 2).

إن أكثر التفسيرات قبولاً للتأثيرات المثبطة التي تُبديها مستخلصات الطحالب ضد الخلايا السرطانية هو قدرتها على التحفيز على الموت المبرمج للخلايا [20,19].وربما يعود في ذلك إلى سلوك الخلية [21]. أثبت أن بعض الطحالب الخضرالمزرقة مثل.*Oscillatoria* sp و*Chroococcus* sp. و*Nostoc* sp. تنتج المركباتmicrosystinsوnodularins والتي تثبط الأنزيم protein-phosphatase لخلايا الخط الخلوي للبائن ،ومن ثم يقود هذا إلى نخر وموت الخلايا،وأن المركبmicrocystins يعمل أويحث على بدأ الموت المبرمج ، ومحاولتها إيقاف تكاثر تلك الخلايا وتعد عملية الموت المبرمج من الأليات المهمة والدقيقة في خلايا اللبائن وتحدث غالباً عندما تعاني من أي خلل وظيفي ، لذا فهي تؤدي دوراً مهماً في عملية التسرطن[22].

الجدول 2- التثبيط (IR%)المستخلص الميثانولي للطحلب .*Nostoc* sp في الخط الخلوي Hep-2

التركيز(مايكروغرام /مليلتر)	النسبة المئوية للتثبيط (IR%)
4000	**55.4±4.66b**
2000	**47.9 ± 4.68b**
1000	**27.7 ±5.13a**
500	**10.4± 3.28a**
250	**0.00**
125	**0.00**
control	**0.00**

الحروف االمختلفة في الأعمدة تعني وجود فرق معنوي عند مستوى ($P<0.05$)



الشكل 2–التأثير التثبيطي المستخلص الطحلب *Nostoc* sp. في الخط الخلوي Hep-2

المصادر

1. PriyadarshaniC.andRath B. **2012**، Bioactive compounds from microalgae and cyanobacteria:utilty and applications ,*International. Pharmaceutical Sciences and research.* 3(11):pp 4123-4130
2. Okuzumi,J,;Nishino,H.;Murakoshi,M.;Iwashima,A.;Tanaka,Y.;Yamane,T.;Fujita,Y.and Takahashi,T. **1990**، Inhibitory effects of fucoxanthin ,a natural caroteniod,onN,myc expression and cell cycle progression in human malignant tumor cell. *Cancer Letters*.55;75-81:pp34-35
3. siyamakE.;Fatimah M.;Noorijahan B. Mehdi R.;and Yeap S. **2013** ،Cytotoxic Effect of Ethanol Extract of Microalgae ,Chaetoceroscalcitrans,and its Mechanisms in inducing Apoptosis in Human Breast Cancer cell Line. *BioMed Research International* ; 2(9):8-15:67-68
4. Burja AM, Banaigs EB, Abou-Mansour, Burgess JG, and Wright PC: **2001**، Marine cyanobacteria-a prolific source of natural products. *Tetrahedron*; 57: 9347–9377.
5. Tan LT **2007**، Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. *Phytochemistry*; 68(7):954–979.
6. Olav M.Skulberg **2000**، Microalgae as a source of bioactive molecules-experience from cyanophyta research. *Applied Phycology*, 12:341-348.
7. Welker M, von Dohren H: **2006**، Cyanobacterial peptides—Nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*; 30(4):530–563.
8. Zorica, S.; Dragana, C.;Jelica, S.;Maja, K.; Dejan, S. **2008**، Antibacterial ,antifungal and cytotoxic activity of terrestrial cyanobacterial strains from Serbia. *Science in China Series* 51 (10):941-947.
9. Stein ,J. **1973**، *Handbook of phycologicalmethods.Culture methods and growth measurements* .Cambridge University Press.pp:448.
10. Rippka ,R.J; Deruelles ,J.; Waterbury, Herdman, M. and Anier,R. **1979**، Generic assiments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria .*J. Gen .Microbiol*.111:1-61
11. Prescott,G.W. **1982**، *Algae of the western lakes area* .Brown ,W.M.C.Com. Publisher, Dubuque .Iowa.16th printing.1-123
12. Desikachary, T.V. **1959**، *Cyanophyta* .Indian Council of Agricultural Research. New Delhi.
13. Freshney, R.I. **1994**، *Culture of animal cells: A manual for basic technique* 3rd ed.. Wiley-liss, A John Wiley & Sons Inc. publication, New York.pp540
14. الحلي ، زيد عبد المنعم علي **2004** ، تأثير المستخلصات الخام لعشب السعد .*Cyperusrotundus* L في تثبيط نمو الخطوط الخلوية السرطانية . رسالة ماجستير /كلية العلوم /جامعة بغداد 78–98
15. Freshney,R.I. **2000** *Culture of animal cell:Amanual for basic technique* 4thed. John wiley and Sons, Inc. Publication, New Yorkpp1-89.
16. Jiunn-Tzong, W.; Yin-Ru ,C.; Wen-Ya,H. and Wann-Neng, J. **2006**، Cytotoxic effects of free fatty acids on phytoplankton algae and cyanobacteria .*Aquatic Toxicology* ,80 (4) :338-345.

17. يوسف،سامرة يونس وقاسم،ثائر أبراهيم والكبيسي،حارث كامل **2003** ،التأثير المضاد للأورام السرطانية في المستخلص الخام لطحلب *Nitzschiapalea* (Kutez).W.sm العصوي.*مجلة أبحاث التقانة الحيوية* 5(1):34-41.

18. Tüney,I.;Cadirci,B.h.;Unal,D. and Sukatar,A.M**. 2007**، In antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (izmir,Turkey). *Fres.Environ,Bull*,16:428-434.

19. Pavel ,H.;Jiri,K. and Blahosla ,M**. 2005** Cytotoxic effect of soil cyanobacterial extracts to mammal cell lines YAC-1 and WEHI.*Czech phycology* ,5,79-90.

20. Al-Hilli,Z.A**. 2009.**A study of cytotoxic ,antioxidant ,inhibition of angiogenic factors and induction of apoptosis of *Cyperusrotundus*L.extracts on several cancer cell lines. Ph.D. thesis. Genetic Engineering and Biotechnology, University. of Baghdad, Iraq.pp75-76

21. Mohammed ,Z.Y. and Al-Jumaily,E.F**. 2008**، Study the effect of the polyphenolic compound extracted from Grape Skin Fruit *Vitisvinifera* on some Cell lines (*in vitro*).M.Sc. thesis Genetic Engineering and Biotechnology,Univ. of Baghdad, Iraq.pp43

22. Ludmila ,V.; Jiri , K.; Tatiana, S.; Alla, P.; Nina ,T. and Pavel, H.; Valentina, D**. 2008**، Toxins and other bioactive compound produced by cyanobacteria Lake Ladoga .*Estonian J.of Ecology*,57(2):100-110.