دراسة تأثيرالمستخلص الميثانولي الخام لجذور نبات الزنجبيل ginger (*Zingibe officinale*) في انواع مختلفة من الخطوط الخلوية السرطانية خارج الجسم الحي

The effect of crude methanolic extract of ginger (*Zingibe officinale)* root in different cell lines *in vitro*

شيماء اسماعيل كاظم ، صفاء الدين احمد شنتر القيسي
قسم علوم الحياة/ كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد

Safaa Al-deen Ahmed Alqysi , Shamaa Ismael Kadhum
Biology Dept./ College of Science for women / Baghdad University

المستخلص :

تم دراسة تأثير المستخلص الميثانولي الخام لجذور نبات الزنجبيل *Zingiber officinale* (Ginger) في انواع مختلفة من الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي اذ اختبرت اربعة انواع من الخلايا السرطانية هي (Hela,L20B,Hep2,AMN3) و نوع واحد من الخلايا ا لطبيعية (REF) ونوع واحد من الخلايا المتحولة (Vero) . حضرت اربعة تراكيز من المستخلص هي (125،250،500،1000) µg /ml على التوالي ، اظهرت النتائج وجود تأثيراً عالي المعنوية في نمو الانواع المختلفة من الخلايا السرطانية كما بين تحليل الانحدار علاقة سالبة معنوية بين تراكيز المستخلص النباتي و الخلايا السرطانية(نمو الخلايا السرطانية يقل بزيادة التركيز) . حيث كان التركيز(1000) µg /ml هو الاكثر تأثيراً في نمو الخطوط الخلوية (Hela و Hep2 و L2OB وVero) في حين ان الخط الخلوي السرطاني (AMN3) لم يتاثر معنويا" باختلاف التراكيز ، كانت العلاقة طردية بين قوة التركيز ومعدل تثبيط الخلايا المدروسة اذ كان تاثر الخلايا الطبيعية اكثر وضوحا مقارنة بالخطوط الخلوية السرطانية قيد الدراسة .

Abstract

This study involved the affectivity of crude methanolic extract of ginger root on different cells line *in vitro*, four cancer cell lines were tested Hela, L20B,Hep2, AMN3 compared with normal cell line (REF)and transformed cell line (Vero). Four extract concentrations were prepared (125,250,500,1000)µ g/ml respectively, the results showed a significant inhibitory effect on the growth of different cell lines under study, also regression showed a significant negative relationship between plant extract and cell lines,1000µ g/ml concentration showed significant effect on cell lines growth (HELA,Hep2,L20B and Vero) on the other hand AMN3 was not affected by the plant extract, there was a direct relationship between concentrations and the rate of inhibition of the cell lines, on the other hand the normal cell line were more effected than cancer cell lines under study.

المقدمة:

تزايد الاهتمام في الاونة الاخيرة بدراسة المستخلصات النباتية ومركباتها الفعالةوتأثير هذه المركبات التي هي عبارة عن مركبات ايض ثانوي secondary metabolism على الامراض المختلفة وعلاجها وخاصة الامراض

المستعصية التي لم يتوصل العلم لأيجاد العلاج الناجع لها ومن امثلتها السرطانات المختلفة [1] ويمكن تعريف السرطان بأنه نمو غير متناسق (عشوائي) (Randoum growth) للخلايا اذ تختلف اختلافاً واضحاً عن مثيلاتها من الخلايا الطبيعية لذلك تنحى الخلية السرطانية منحا اخر يختلف عن الخلية الطبيعية [2] ويعد الزنجبيل (*Zingiber officinale*) او ما يسمى بـGinger واحداً من اكثر التوابل استخداماً ويعود هذا النبات للعائلة الزنجبيلية (Zingiberaceae) ويمتلك هذا النبات تأريخاً طويل في الاستخدامات الطبية ، اذ منذ حوالي 2500 سنة كان يستخدم في الصين والهند لعلاج الكثير من الحالات المرضية مثل الصداع وعلاج البرد والسعال كما يعد مضاداً للقيء ومضاد للالتهابات والروماتيزم وهو خافض للحمى والحرارة ومحرض على التدفق الدموي وقاتل للجراثيم المختلفة [4,3] كما بينت الدراسات الحديثة المختلفة بأن له تأثيراً مثبطاً لنمو الخلايا السرطانية في الجلد والقولون وكذلك المبيض وغيرها من الانواع الاخرى[8,7,6,5] ، ويعود هذا التأثير المثبط لنمو الخلايا السرطانية الى احتواء المستخلصات الكحولية لجذور هذا النبات على الكثير من المركبات الفعالة ولتي من اهمها هو المركب (6-gingerol) فضلاًعن المركبين (Shogaol,Zingeronel) والتي توجد بكميات كبيرة في الجذور المجففة او المستخلصات النباتية لأجزاء اخرى من النبات[3] ,كما يعد المستخلص الكحولي لجذور هذا النبات مضاداً للتأكسد (Antioxidant) حيث يستفاد من هذه الخاصية في علاج بعض الامراض المعقدة مثل تصلب الشرايين ، السكتة الدماغية ، السكري , الزهايمر و السرطان[10,9] .

يعتبر السرطان واحد من اهم لامراض التي تقضي على حياة الانسان بعد امراض القلب والشرايين [11] ، لذا هدفت هذه الدراسة الى معرفة تأثير المستخلص الميثانولي الخام لجذور نبات الزنجبيل في نمو خطوط مختلفة من الخلايا السرطانية دون الرجوع الى العلاجات الطبية المصنعة كيميائياً ذات التأثيرات الجانبية .

المواد و طرائق العمل:-

نفذت تجربة مختبرية في العام 2008 في المركز العراقي لبحوث السرطان و الوراثة الطبية / التابع للجامعة المستنصرية .

1.الخطوط الخلوية :- تم الحصول على خطوط الخلايا السرطانية من المركز اعلاه

1- AMN-3(Ahmed-Mahmad-Nahi-2003) .
2 Hep2-(Human eipoermoid larynx carcinoma)
3-Hela-(Cancer cells from human female cervix)
4-L20B (Fibroblast muscle cell)
5-Vero-(African green monkey kidney transfer cell)
6- REF (Rabbit Embryo Fibroblast) فضلاً عن خط الخلايا الطبيعي

2.المستخلص النباتي:-

حضر المستخلص الكحولي الخام لجذور نبات الزنجبيل(*Zingiber officinale*) وفق ما جاء في [12]و كالاتي:-

وزن (50 غم) من مسحوق جذور نبات الزنجبيل ووضعت في وعاء اسطواني الشكل مصنوع من مادة ورقية يسمى Thimble .

وضع Thimble في المكان المخصص له في جهازالاستخلاص المستمر Soxhlet واضيف 250 مل من الميثانول وتركت العينة لمدة 24 في الميثانول لكي يتشرب المسحوق بالمذيب .

اجريت بعد ذلك عملية الاستخلاص في جهاز Soxhlet ولمدة 20 ساعة لحين الحصول على راشح عديم اللون ، وبعدها رشح المستخلص بورق ترشيح(1) Whatman No..

جفف الراشح باستعمال المبخر االدوار Rotary evaporator ثم وزنت الخلاصة الناتجة من عملية الاستخلاص .

3.تحضير الوسط الزرعي لزرع خطوط الخلايا المختلفة :-

حضر الوسط الزرعي (RPMI-1640)Rosswell Park Memorial Institute وفقا لما جاء في [13]اذ يتكون الوسط الزرعي من:-

RPMI-1460 with hepes buffer ,L-glutamin 10.4 gm
Crystaline penicillin 0.5ml
Streptomycin 0.5 ml
Bovine calf serum 10%
Sodium bicarbonate 4.4%

اذ خلطت مكوناته مع بعضها البعض لتحضير لتر واحد ، ومن ثم عقم باستعمال مرشح ذو ثقوب بقطر 0.22 مايكرون لضمان تعقيمه ، وزرع الوسط الزرعي في قناني زجاجية ذات غطاء محكم سعة 200 مليلتر و حفظت القناني بدرجة 2 م لحين الاستعمال .

اضيف 2 مليلتر من محلول التربسين/ فرسين الى قنينة الزرع النسيجي حجم 25سم^3 الحاوية على الخلايا (الانواع الستة)بعد تفريغها من الوسط الزرعي و غسلها بمحلول(PBS) ، ثم حركت القنينة برفق و حضنت في حاضنة بدرجة 37م لمدة 15 دقيقة لتفكيك الخلايا الملتصقة و كذلك خلخلت التصاقها بجدار القنينية للحصول قدر الامكان على خلايا احادية مفردة .

اضيف الى القنينة الحاوية على الخلايا المفككة حوالي (15) مليلترمن وسط نمو جديد(RPMI-1640) وتم تحريك القنينة جيدا و بعدها افرغت محتويات القنينة الحاوية على الوسط الغذائي الجديد مع الخلايا الى قنينة اخرى جديدة بحيث يكون مستوى الوسط الزرعي مع الخلايا متساوي بين القنينتين و تسمى هذه العملية بالمزرعة الثانوية (Subculture).

حضنت القناني بدرجة حرارة 37م ووفقا" للطبيعة اللوغارتمية لنمو الخلايا ، عدت الخلاياوفق [15] لكل نوع من الخلايا باستعمال صبغة التريبان الزرقاء(Trypan blue) ، اذ تاخذ الخلايا الميتة الصبغة ببضع ثواني مما يجعلها سهلة التمييز عن الخلايا الحية ، ثم تم حساب الخلايا باستعمال شريحة العد التفريقي Improved double Neubauer ruling.

4.اختبار سمية المستخلصات الخام في نمو الخطوط الخلوية السرطانية والخط الطبيعي :-

حضر المستخلص الميثانولي وفقا" [15,14] عن طريق اذابة 0.02 غم من المستخلص الخام المركز في 10 ملليلتر من المذيب (Dimethyl Sulf Oxide (DMSO المطلق + SFM) serum free media) وهو الوسط الزرعي RPMI-1640 مضافاً اليه البلازما البشرية نوع +AB بدلا من مصل عجل البقر . ثم عقم باستخدام مرشح ذو ثقوب بقطر 0.22 مايكرون و حضرت منه اربعة تراكيز مخففة (125،250،500،1000) مايكروغرام / مليتر و تحت ظروف معقمة ، استخدمت جميع التراكيز المحضرة مباشرة بعد اكمال عملية التحضير .

جهز عالق الخلايا عن طريق معاملة قنينة الزرع حجم 25سم^2 بمحلول التربسين/ فرسين المحضر وفقا [13] ، ثم اضيف له 20 مليلتر من الوسط الزرعي الخالي من المصل (SFM) ، ثم مزج عالق الخلايا جيدا و تم نقل 0.2 مليلتر بعد كل مزجة جيدة الى حفرطبق معايرة الزرع النسيجي ذو القعر المسطح باستعمال ماصة اوتوماتيكية دقيقة ، بحيث احتوت كل حفرة على عدد معلوم من الخلايا الحية (1×10^5خلية /حفرة) ، بعد ان تم عد الخلايا الحية من الميتة بواسطة صبغة (Trypan blue), [13] .

ترك الطبق في الحاضنة بدرجة 37م لمدة تتراوح بين 12-18 ساعة الى حين التصاق الخلايا في الحفرة و بعدها تم التخلص من الوسط الزرعي القديم في الحفر و تم اضافة 0.2 مليلتر من التراكيز المحضرة للمستخلص الميثانولي و بواقع ثلاث مكررات لكل تركيز مع عمل ثلاث مكررات للسيطرة (خلايا سرطانية غير معاملة) ، و حضنت الاطباق بدرجة 37 م^o في حاضنة مزودة ب 5% من غاز CO_2 لمدة(72) ساعة.

بعد مرور مدة التعريض Exposure time المحددة للحضن اخرج الطبق من الحاضنة و اضيف اليه 50 مايكروليتر من محلول صبغة الاحمر المتعادل و اعيد الطبق مرة اخرى الى الحاضنة ليحضن ساعتين بعدها اخرج الطبق و ازيلت محتوياته و غسلت الخلايا بمحلول(PBS) لحين زوال الصبغة الزائدة اذ ثم قرات النتائج باستخدام جهاز الاليزا Eliza reader بطول موجي 492 نانوميتر ،اجريت الخطوات السابقة على كل من الخطوط الخلوية (Hep-2,L20B,REF ، AMN-3، Hela،Vero) باستعمال التراكيز المختلفة للمستخلص الخام .

التحليل الاحصائي:

اخذت البيانات لتاثير التراكيز المختلفة للمستخلص النباتي على كل من الخطوط السرطانية ، واستخرجت متوسطات المكررات الثلاثة لكل منها ، واجري تحليل الانحدار [15] على اساس ان تراكيز المستخلص النباتي يمثل العامل المستقل و مقدار التثبيط المتوقع يمثل العامل التابع ، كما حُللت البيانات احصائيا" وفق تصميم تام التعشية بثلاث مكررات ، واستعمل اختبار دنكن متعدد الحدود بمستوى 0.05 لمقارنة المتوسطات الحسابية [15] .

النتائج و المناقشة :

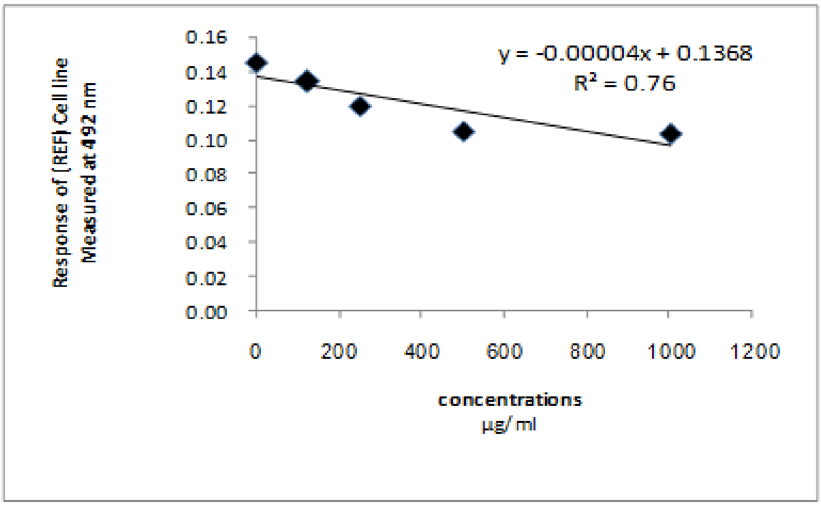
اظهرت نتائج معاملة الخطوط الخلوية السرطانية قيد الدراسة بالمقارنة مع الخط الخلوي الطبيعي(REF)وجود تاثير سمي واضح وبفروق معنوية عند مستوى احتمالية ($P\leq0.005$)وكان هذا التاثيرمتباين بين انواع الخلايا المختلفة وبين التراكيز المختلفة وكما يأتي:-

1.خط الخلايا الطبيعي REF :-

عومل هذا الخط من الخلايا الطبيعية بالمستخلص الكحولي لجذور نبات الزنجبيل ليتسنى لنا معرفة تأثير هذا المستخلص على الخلايا الطبيعية ومقارنتها مع الخلايا السرطانية .اذ اظهرت نتائج المعاملة وجود تأثير معنوي عالي على الخلايا الطبيعية عند التراكيز العالية من المستخلص وبالنسبة للتركيز 125 مايكروغ /مل فكان التأثير معنوي مقارنة بمعاملة السيطرة جدول (1) .

بين تحليل الإنحدار وجود علاقة سالبة معنوية بين التراكيز المستخدمة وبين الخط الخلوي الطبيعي (REF) شكل (1) ، حيث توضح معادلة الخط المستقيم للخط الخلوي الطبيعي (REF) ان كل زيادة في التركيز بمقدار 1% تؤدي الى تثبيط في معدل نمو الخط الخلوي الطبيعي بمقدار0.76% شكل(2) . فحسب معادلة التوقع التي يوضحها شكل (1) .

$$\hat{y} = -0.001x + 0.1368$$



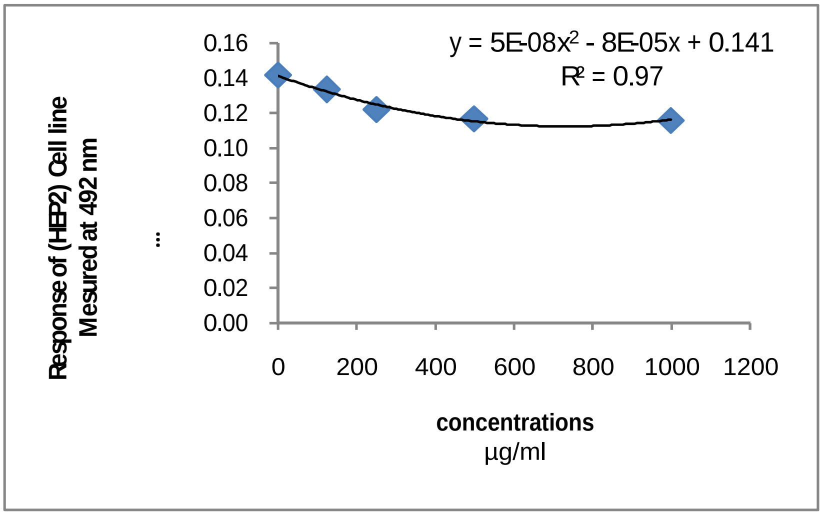
شكل(1) علاقة الانحدار بين تراكيز المستخلص النباتي و الخط الخلوي الطبيعي REF

فأن حصولنا على تركيز مناسب يؤدي الى تثبيط في نمو الخط الطبيعي يصل الى (1000مايكروغرام/مليلتر) و استجابة الخط الطبيعي للتراكيز المستخدمة محسوب من (0-1.2)على اساس الامتصاصية (492nm) ، وهكذا ضمن الحدود المسموح بها في هذه المعادلة فعند اختيار اي قيمة لـ X يجب ان تقع بين أقل وأعلى قيمة لنسبة التراكيز المستخدمة قيد الدراسة ، اي تتراوح بين (0-1000مايكرولتر) % . كما تشير قيمة معامل التحديد اي قيمة R^2 الشكل (1) إلى مقدار تغاير القراءات و يساوي (0.76%) و الذي يتاثر با ختلاف التراكيز المستخدمة في الدراسة ، أما المتبقي من التغاير فيسمى معامل عدم التحديد والذي لايمكن تفسيره كونه يخضع إلى عوامل أخرى لم يتم أخضاعها في الدراسة المعنية (الخطأ التجريبي) .

2.الخط الخلوي السرطاني Hep2 :-

بينت النتائج ان التركيز(1000) مايكروغرام/مل هو الاكثر سمية والاكثر تثبيطاً لهذا الخط الخلوي السرطاني مقارنة بمعاملة السيطرة اذ كان تاثيره عالي المعنوية مقارنة مع بقية التراكيز جدول (1)،مما يؤكد هذه النتيجة العلاقة المعنوية السالبة للانحدار شكل (2) ، التي تبينها معادلة الخط المستقيم من الدرجة الثانية للخط السرطاني (Hep2) شكل (2) .

ŷ=5E-08X2-8E-05X+0.141 ،وقيمة معامل التحديد قيمة R^2 = 0.97%

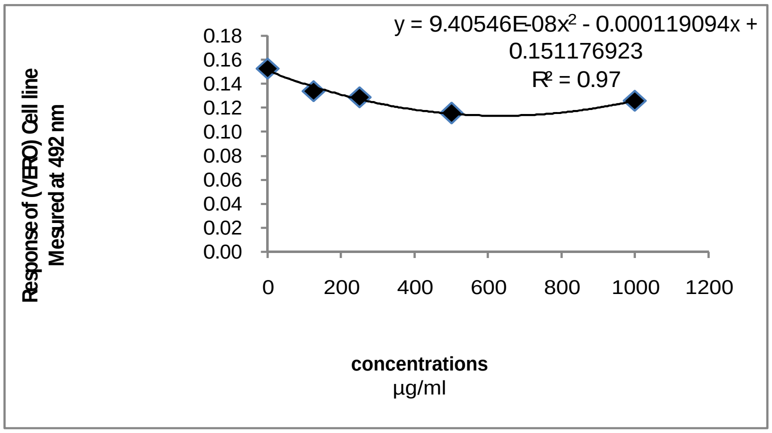


شكل(2) علاقة الانحدار بين تراكيز المستخلص النباتي والخط الخلوي السرطاني HEP2

3.الخط الخلوي المتحول Vero :-

بينت النتائج عدم وجود فرق معنوي بين التراكيز الاربعة المستخدمة في الدراسة في حين لوحظ وجود فروق معنوي بين التراكيز ومعاملة السيطرة اي ان جميع التراكيز اظهرت تأثير سمي مثبط على هذا الخط من الخلايا السرطانية جدول (1) . و يؤكد هذه النتيجة العلاقة المعنوية السالبة للانحدار شكل (3) ، و التي توضحها معادلة الخط المستقيم للخط السرطاني (Vero) شكل (3) .

ŷ=9.40546E-08X2-0.000119094X+0.151176923 ، وقيمة معامل التحديد R^2= (%0.97) .



شكل(3) علاقة الانحدار بين تراكيز المستخلص النباتي والخط الخلوي المتحول VERO

جدول (1)يبين تأثير تراكيز مستخلص نبات الزنجبيل في انواع خطوط الخلايا السرطانية قيد الدراسة

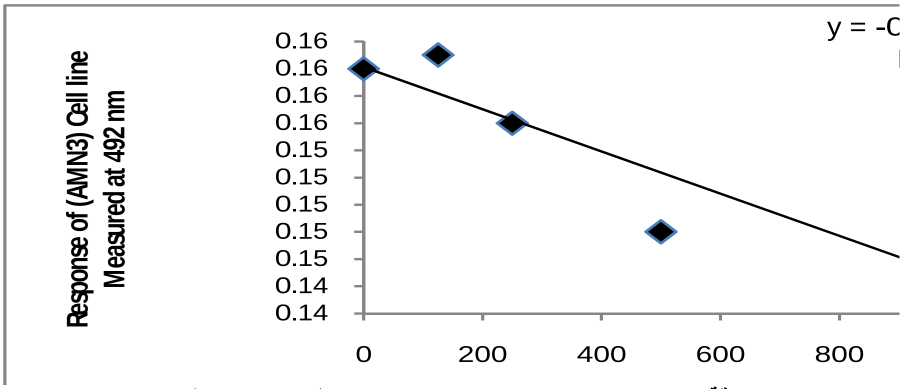
التراكيز مايكروغرام/مليلتر	HEP2	AMN3	HELA	VERO	L20B	REF
	قراءات الخطوط السرطانية					
0	0.142 [a]	0.161 [a]	0.1515 [a]	0.153 [a]	0.142 [a]	0.145 [a]
125	0.133 [b]	0.160 [a]	0.1350 [b]	0.134 [b]	0.133 [b]	0.134 [b]
250	0.122 [c]	0.156 [a]	0.128 [b]	0.129 [b]	0.122 [c]	0.120 [c]
500	0.117 [c]	0.148 [a]	0.115 [c]	0.126 [b]	0.117 [c]	0105 [d]
1000	0.116 [c]	0.146 [a]	0.104 [d]	0.115 [b]	0.116 [c]	0.104 [d]

***ملاحظة الارقام المتباينة عمودياً تعني وجود فرق معنوي**

4. خط الخلايا السرطانية AMN3 :

بينت نتائج معاملة هذا الخط السرطاني بالمستخلص الكحولي لجذور نبات الزنجبيل عدم وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية($P\leq0.005$) بجميع التراكيز مقارنة بمعاملة السيطرة وكان هذا الخط هو اقل الخطوط الخلوية السرطانية تأثراً بالمستخلص و لجميع التراكيز جدول (1) ، و مايؤكد هذه النتيجة العلاقة المعنوية السالبة للانحدار شكل (4) ، اذ توضح معادلة الخط المستقيم للخط السرطاني (AMN3) ان كل زيادة في التركيز بمقدار 1% تؤدي الى تثبيط في معدل نمو الخط السرطاني بمقدار0.83% شكل (4) ، وحسب معادلة التوقع للخط السرطاني شكل(2) .

$\hat{y} = -0.000x + 0.160$ ، وقيمة معامل التحديد R^2 = (%0.83) .

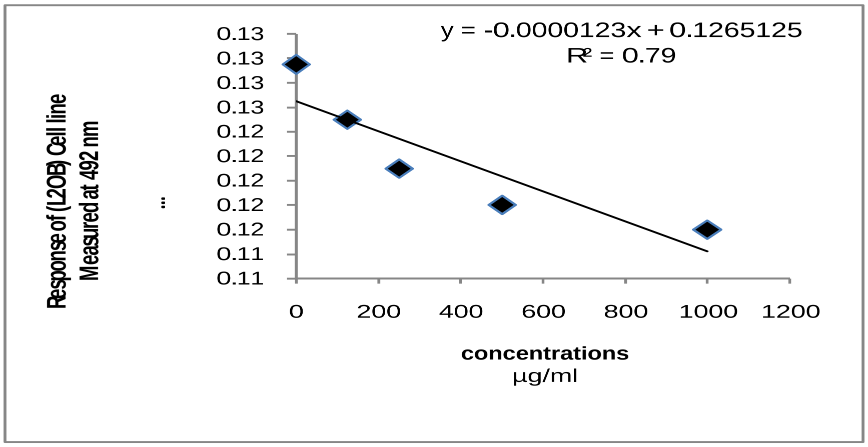


شكل(4) علاقة الانحدار بين تراكيز المستخلص النباتي وخط الخلايا السرطاني AMN3

5. الخط الخلوي السرطاني L20B:-

اظهرت النتائج عدم وجود فرق معنوي بين التراكيز(250،500،1000) مايكروغرام/ مل ووجود فرق معنوي بين التراكيزالمذكورة اعلاه والتركيز (125) مايكروليتر/مل وكذلك وجود فرق معنوي بين التراكيز الاربعة ومعاملة السيطرة جدول (1) . و يؤكد هــــذه النتيجة العلاقـــــــة المعنوية السالبة للانحدار شكل (5) ، اذ توضح معادلة الخط المستقيم للخط السرطاني (L2OB) شكـــل (5) .

$\hat{y} = -0.0000123x + 0.1265126$ ، وقيمة معامل التحديد R^2 = (%0.79) .

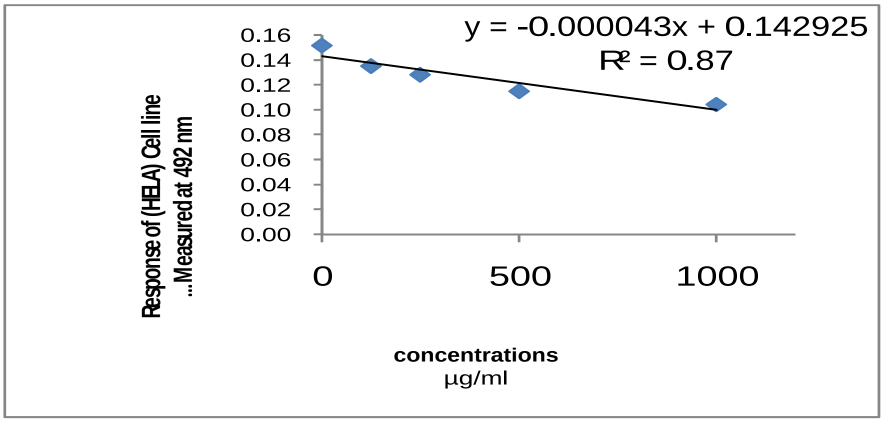


شكل(5) علاقة الانحدار بين تراكيز المستخلص النباتي والخط الخلوي السرطاني L20B

6. الخط الخلوي السرطاني Hela :

اوضحت النتائج وجود تأثير سمي ومثبط عالي عند التركيز(1000) مايكروليتر/مل حيث كان الفرق معنوي عالي بالمقارنة مع معاملة السيطرة ووجود فروق معنوية بين التراكيز الاخرى(500،250،125) مايكروغرامر/مل ومعاملة السيطرة وعدم وجود فرق معنوي بين التركيزين(250،125) مايكروغرام/مل جدول (1) و يؤكد هذه النتيجة العلاقة المعنوية السالبة للانحدار شكل (6) ، اذ توضح معادلة الخط المستقيم للخط السرطاني (Hela) شكل (6) .

$\hat{y} = -0.000043x + 0.142925$ ، وقيمة معامل التحديد R^2 (الشكل 3) = (%0.87) .



شكل(6)علاقة الانحدار بين تراكيز المسنخلص النباتي والخط السرطاني HELA

ان هذا التأثير المثبط والسمي للخلايا السرطانية المعاملة بالمستخلص الكحولي الخام لجذور الزنجبيل يعود الى وجود الكثير من المواد الفعالة في هذا المستخلص واهم هذه المركبات هو Gingerol-[6] الذي اثبتت الدراسات الحديثة ان لهذا المركب تأثير مثبط لخلايا الجلد السرطانية في الفئران . ان مركب Cyclooxygenase-2(Cox-2) هو الانزيم المفتاحي في عملية البناء الحيوي للبروستوكلاندين(Prostaglandin) وهو الهدف الجزيئي لعوامل العلاج الكيميائي او مضادات الالتهاب ، ان المركبGingerol-[6] يعمل على تثبيط الـ13– myristate 12 phorobol) acetate)والتي تعمل على تحفيز انطلاق (Cox-2)، كما انه يمنع ارتباط احد اهم عوامل الترجمة المسؤلة عن حث الـ (Cox-2) با الـDNA وهو (NF-kB) . فضلاً عن ان المركب gingerol-[6] يثبط فسفرة النايتوجين P38 الذي يحفز البروتين كاينيز والذي ربما يكون المسؤول عن عدم فعالية(NF-kB) و منع انطلاق الـ(Cox-2) [7,6,5] . كما بين[5] في دراسته بأن للمستخلص الكحولي لجذور نبات الزنجبيل تأثيرً مثبطاً لخلايا المبيض السرطانية وهذا التأثير

المثبط نـاتج عن وجـود المركبـات الفعالـة فـي هذا المسـتخلص والتـي مـن اهمهـا [6]-gingerol و 6-Shagool والتـي تعمل على تثبيط (NF-kB) والذي يؤدي بالنهاية الى تثبيط نمو الخلايا السرطـانية . اتفقت الدراسة الحالية مع الدراسـات الحديثة [16،17،3،4،9،10] التي بينـت ان للمستخلصـات الكحوليـة والمائيـة و الزيـت الطيـار لجذور او ازهـار نبـات الزنجبيل تأثير مثبطاً لنمو الخلايا السرطانية المأخذوة من اماكن مختلفة ومن كائنات حية مختلفة وكمـا انـه يعتبـر مضـاداً جيداً للتأكسد مما يعزى اليه التأثير الفعال ضد الكثير من الامراض الخطيرة والسرطانات .

المصادر:

1. Dev,S.(1996).Ancient modern con accordance in ayurvediac plants: Some examples Environ health Prospect, 107:783-789.
2. Guest, E.C.C.Townsen.(1974).Flora of Iraq. Vol. Three. Ministry of Agriculture and Agrarian Reform. Republic of Iraq.
3. Chang CP,Chang JY,Wang FY,Chang JG.(1995).The Effect of Chinase medicinal herb Zingiberis rhizome extract on cytokine secrtion by human peripheral blood mononuclear cells.j.Ethnopharmnaco; 48;13-19.
4. Govindarajan VS. (1982). Ginger-chemistry, technology, and quality evaluation: part 2.Crit.Rev Food Sci Nutr; 17:189-258
5. Kim OS,Chun K,Kundu,KJ,Young-joon,S.(2004).Inhibitory effects of [6]-gingerol on PAM-induced COX-2 Expression and activation of NF-?B and p38 MAPK in mouse Skin.BioFactors;21(1):27-31.
6. Rhode,J,Fogoros,S,Zick,S,Wahl,G,Huang,J,Lui,R.(2007).Ginger inhibits csll growth and modulates anginogenic factors in ovarin cancer cells.BMCComplementar and Alternative Medicine;7(44):1-9.
7. Katiyar,K.S,Agrawal,R,Mukhtar,H,.(1996).Inhibition of Tumor Promotion in SENCAR Mouse Skin by Ethanol Extract of Zingiber officinale Rhizome.Cancer esearch;56:1023-1030.
8. Kim,J,Lee,S,Park,W,H,Yang,H,J,Shin,T,Kim,Y,Baek,N,Kim,S,Choi, S,Kown, eem,K, Jung, M,Kim,D. (2008) .Cytotoxic Compound from the Dried Rhizomes of Zingiber officinale Roscoe.Arch Pharm Res;31(4):415-418.
9. Kalaf,A.,N,Shakya,K.,A,Al-Othman,A,El-Agbar,Z,Farah,H,.(2008).Antioxdant activity of some common plants. Turk J Biol; 32:51-55.
10. Asnani,V,Verma,J,R,.(2006).Aqueous ginger extract Ameliorates paraben induced cytotoxicity.Acta Poloniae Pharmaaceutica-Durg Research ;63(2):117-119.
11. Kazimi,M.;Malik,A.,;Hameed.S.; Akhtar, N. A. and Samina,N.(1994). Ananthraquinon derivative from Cassia italic.Phytochemistry (36)761-763. Simandi,B.;Kery,A.;Kristo, S.T.; Andras, C.; Prechi,A.and Fekete,J.(2001).Supercritical luid extraction of non-volitile terenoids from medicinal plant.Acta.pharma hung.,71:318-324.
12. Freshney, R. I. (2001). Application of cell culture to toxicology, Cell boil. Toxicol., 17:213-230.
13. Abdul-Majeed, M.R.(2000).Induction and characterization of SU.99 plasmacytoma cell line and its effect on mice immune response.*PHD Thesis,Nahrain University.*
14. الساهوكي ، مدحت وكريمة محمد وهيب. 1990. تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة بغداد. مطبعة دار الحكمة للطباعة والنشر. الموصل. ع ص. 488.
15. Habib,H,S,Makpol,S,AbdulHamid,A,N,Das,S,Ngah,W,Yousf,M,A,Y.(2008). Ginger extract (*Zingiber officinale*) has anti cancer and anti- inflamentary effect on ethionine-induced hepatoma rats.Clinics;63(6).
16. Anderson ,N.and Lokich, J.J.(1994).Cancer chemotherapy and infusional scheduking. Oncology8(5): 99- 111.