الترقيم الدولي ٨٦٩٠ - ١٩٩١ ISSN 1991- 8690

Website: http://jsci.utq.edu.iq Email: utjsci@utq.edu.iq

دراسة فعالية قلويدات نبات عين البزون *Catharanthus roseus* (L.) G.Don ضد نوعين من الخطوط الخلوية السرطانية

علي عبود شريف عبد الأمير عبد الله يعقوب ليلى ناصر حرب

قسم علوم الحياة- كلية التربية- جامعة البصرة

الخلاصة

درست الفعالية ضد السرطانية لقلويدات نبات عين البزون *Catharanthus roseus* (L.) G.Don ضد نوعين من الخطوط الخلوية السرطانية وهما الخط Hep-2 لخلايا سرطان الحنجرة البشري, والخط AMN3 لخلايا سرطان الغدة اللبنية ألفأري و بالتراكيز (٢٥و ١٢,٥ و٦,٢٥ و٣,١٢٥) ملغ/مل وبواقع ثلاث مكررات لكل تركيز,وبينت النتائج أن المستخلص القلويدي اظهر فعالية عاليةضد الخط Hep-2 لخلايا سرطان الحنجرة البشري,بينما كانت تلك القلويدات اقل فعالية تجاه الخط ألفأري AMN3 لخلايا سرطان الغدة اللبنية مقارنة بخط السيطرة .

الكلمات المفتاحية : قلويدات عين البزون, الفعالية الضد السرطانية .

المقدمة

ينتمي الجنس *Catharanthus* G.Don إلى عائلة الدفلة Apocynaceae , واصل اسم الجنس هو إغريقي مكون من مقطعين هما(*katharos*) ويعني نقي و(*anthos*) يعني زهرة في إشارة إلى نعومة وجمال ازهارها , والنوع *C.roseus* (L.) G. Don (= *Vinca rosea* L.) يعتقد بأنه ينمو بصورة طبيعية في مدغشقر ثم انتشر بصورة واسعة في المناطق الاستوائية و يزرع بكثرة كنبات زينة في وسط وجنوب العراق.[1]

استخدمت النواتج الطبيعية natural products ولاسيما النباتية منها في معالجة العديد من الأمراض لآلاف السنين في وادي الرافدين ومصر والصين والهند والإغريق, والعديد منها يستعمل كعلاجات في الطب الحديث.يعود أول تسجيل لاستخدام النباتات الطبية من قبل السومريين والاكديين [2] .

استخدم هذا النبات من قبل العشابين الأوربيين لعلاج الصداع و داء السكري , والقلويدات المستخلصة من هذا النبات (عين البزون) والتي يقدر عددها بحوالي ٤٠٠ مركب قلويدي ذات فعالية ضد سرطانية وتعد صنفا جديدا من الأدوية المضادة للسرطان. تمتلك قلويدات عين البزون

فعالية ضد سرطانية العديد من الأمراض السرطانية مثل سرطان الدم وسرطان الثدي والرئة والكبد والعديد من الأورام السرطانية الصلبة [4] و[3] . درست الفعالية الطبية لهذه القلويدات في بداية عام ١٩٦٥ واستخدمت أيضا ضد الأورام السرطانية لأكثر من ثلاثين سنة مضت . تتركب هذه القلويدات من مركبات مزدوجة مكونة من انويه من الاندول ثنائي التميؤ dihydroindole المرتبطة مع الأنظمة الحلقية الأخرى[5] .

المواد وطرائق العمل

أولا:استخلاص القلويدات

استخلصت القلويدات حسب [6] وكالاتي :

أخذ ٢٠ غراما من النبات المجفف والمطحون جيدا , ثم استخلصت القلويدات بإضافة ١٠% من حامض ألخليك في الكحول الاثيلي ٩٦% بمقدار ٢٥٠ مل لمدة ٢٤ ساعة باستخدام جهاز الاستخلاص Soxhlet , ركز المحلول تحت الضغط المخلخل , ثم أضيف محلول هيدروكسيد الامونيوم المركز بشكل قطرات إلى المحلول ألحامضي حتى أصبح الأس الهيدروجيني PH=9 وأضيف أليه 100 مل من الكلوروفورم ورج عدة مرات ثم ترك ليستقر وينفصل الى طبقتين وأخذت الطبقة السفلى (طبقة الكلوروفورم) مذابة فيها القلويدات , ركز المحلول بواسطة جهاز التبخير تحت الضغط المخلخل إلى ١٥ مل , اجري عليه اختبار ماير (Mayer's test) واختبار دراكندروف (Dragndroff 's test) للمحلول المذكور في أعلاه وذلك بإضافة عدة قطرات من أي الكاشفين إلى مل واحد من المستخلص للتأكد من وجود القلويدات وأعطى راسب ابيض او راسب اصفر عند إضافة قطرات كل من كاشف ماير و دراكندروف على التوالي , حضر الكاشفين كالأتي :-

١- كاشف دراكندروف : هذا الكاشف مكون من محلولين وهما :

المحلول A: وزن ٠,٦غم من نترات البزموث Bismuth subnitrate ثم أضيف له ٢ مل من حامض الهيدروكلوريك المركز وخفف بعدها بإضافة ١٠ مل من الماء المقطر .

المحلول B : أذيب ٦غمن ايوديد البوتاسيوم Potassium iodide في ١٠ مل من الماء المقطر

مزج كل من المحلول A وB ثم أضيف ٧ مل من حامض الهيدروكلوريك المركز و ١٥ مل من الماء المقطر , خفف بعدها بإضافة ٤٠٠ مل من الماء المقطر[7].

٢- كاشف ماير: حضر بإذابة ١٣,٥غم من كلوريد الزئبق $HgCl_2$ و ٥٠غم من ايوديد البوتاسيوم في لتر واحد من الماء المقطر [8] .

ثانيا:الفعالية ضد السرطانية:

أ- تهيئة خطوط الخلايا:

تم الحصول على نوعين من الخطوط الخلوية السرطانية وهي الخط Hep-2 تسلم تمريرة٢٥٣ لخلايا سرطان الحنجرة البشري ، والخط AMN3 لخلايا سرطانة الغدة اللبنية فأري٦٠ من المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية/الجامعة المستنصرية.وأجريت الخطوات الخاصة بالزرع النسيجي تحت ظروف معقمة حسب طريقة [9] وكالاتي:

أضيف٢ مل من محلول التربسين- فرسين المحضر الى وعاء الزرع النسيجي حجم ٥٠ سم^3 الحاوي على الخلايا بعد تفريغه من الوسط ألزرعي وغسله بمحلول PBS المعقم ، ثم حرك الوعاء برفق وحضنت الأطباق في الحاضنة بحرارة ٣٧ م^o لمدة ٥-١٠ دقائق لتفكيك الخلايا الملتصقة وكذلك خلخلة التصاقها بجار الوعاء لحصول على خلايا منفردة.

عدت الخلايا الحية على وفق [10] لكل نوع من الخلايا باستخدام صبغة التريبان الزرقاء(Trypan blue) ، إذ تأخذ الخلايا الميتة الصبغة ببضع ثوان مما يجعلها سهلة التمييز من الخلايا الحية ذات اللون البراق، وتم ذلك بمزج ٠,٢ مل من الصبغة مع ١,٦مل من دارئ الفوسفات (PBS) .وأضيف إلى الوعاء الحاوي على الخلايا المفككة نحو ١٠ مل من وسط النمو الجديد RPMI-1640 (ملحق رقم ١) ،وحرك الوعاء جيدا وبعدها أفرغت محتوياته على الوسط الغذائي الجديد مع الخلايا إلى وعاء آخر جديد بحيث يكون مستوى الوسط الزرعي مع الخلايا متساويا بين الوعائيين وبذلك تم الحصول على المزرعة الثانوية .

حضنت الأوعية بحرارة ٣٧ م^{o} بعد أن كتب عليها معلومات كاملة عن نوع الخلايا ورقم المريرة الجديدة New Passage وتاريخ تكوين المزرعة الثانوية، وتمت متابعة أوعية الزرع النسيجي يوميا للتأكد من خلوها من أي تلوث، وان الخلايا بحالة جيدة وذلك بفحصها بواسطة المجهر مقلوب الطور(Inverted Microscope) . وعندماأصبحت الخلايا ذات نمو جيد متمثل بتكوين طبقة أحادية كاملة من الخلايا (Confluent monolayer) تكون الخلايا بذلك جاهزة للاستعمال.

ب –اختبار السمية الخلوية للمستخلص القلويدي في نمو الخطوط الخلوية السرطانية:

جهز عالق الخلايا عن طريق معاملة وعاء الزرع النسيجي حجم ٥٠ سم^{3} بمحلول التربسين– فرسين، ثم أضيف له ٢٠ مل من الوسط ألزرعي المزود بالمصل ، وقد تم مزج عالق الخلايا جيدا واخذ منه٠,٢ مل بعد كل مزجة إلى كل حفرة من حفر طبق الزرع النسيجي ذي القعر المسطح (96-Microtiter plates) باستعمال ماصة أوتوماتيكية دقيقة، إذ احتوت كل حفرة على (١٠^{5}x1خلية /حفرة)، ثم تمت ملاحظة تغطية سطح الطبق بورق لاصق شفاف معتم وحرك الطبق بلطف ليتجانس توزيع الخلايا في الحفر.

تركت الأطباق في الحاضنة بحرارة ٣٧ م^{o} لمدة تراوحت بين ١٢–١٨ ساعة الى حين التصاق الخلايا في الحفرة، وبعدها تم التخلص من الوسط الزرعي القديم في الحفر، وأضيف٠,٢ مل من التراكيز الأربع المحضرة آنيا من المستخلص القلويدي باستعمال الوسط الخالي من المصل (SFM) وهي (٢٥و 12.5 و.6.25 و3.125) ملغ/مل وبواقع ثلاث مكررات لكل تركيز . كما تم عمل ثلاثة مكررات للسيطرة السالبة والتي أضيف لها٠,٢ مل من الوسط الزرعي الخالي من المصل، حضنت الأطباق بدرجة حرارة ٣٧م^{o}.

بعد مرور مدة التعرض المحددة للحضن وحسب طريقة[11] اخرج الطبق من الحاضنة وأضيف له (٥٠µl) من صبغة البنفسج البلوري لكل حفرة وأعيد الطبق الى الحاضنة ليحضن لمدة ٢٠ دقيقة، اخرج بعدها الطبق وأزيلت محتوياته وغسلت بمحلول (PBS) لحين زوال الصبغة الزائدة وتركت الخلايا لتجف (إذ إن الخلايا الميتة تأخذ الصبغة أما الحية فلا تأخذها)، قرأت النتائج باستخدام جهاز المطياف الضوئي بأطباق المعايرة الدقيقة بطول موجي ٤٩٢ نانوميتر.

تم تحديد معدل تثبيط النمو للخلايا السرطانية على وفق المعادلة المشار إليها في[12] من خلال تحويل قيم التأثير السمي للمستخلص القلويدي لنبات عين البزون في الخطوط الخلوية السرطانية الى نسب مئوية وكالاتي:

Inhibition Rate(IR)%= (A-B/A) x 100

IR : النسبة المئوية لمعدل التثبيط

A : الكثافة الضوئية للسيطرة

B : الكثافة الضوئية لمجموعة الاختبار

كما تم حساب معدل تحفيز النمو وفقا لـ(Chumchalova and Samarda, 2003)

وكالاتي:

Proliferation Rate(PR)%= (B/A)x100

حيث أن:

PR: النسبة المئوية لمعدل التحفيز

A: الكثافة الضوئية للسيطرة

B: الكثافة الضوئية لمجوعة الاختبار

النتائج والمناقشة

ان معالجة العديد من الإمراض يتطلب اهتماما كبيرا في العلاجات الطبية التي تكون مشتقة من النباتات ولاستثنى من ذلك معالجة السرطان . استخلصت العديد من المركبات الطبية الطبيعية natural products المضادة للسرطان من النباتات ايضآ , وخلافا لما هو علية في حالة المنتجات البكترية والفطرية المضادة للسرطان فأن المركبات المعزولة من النباتات كما في القلويدات نبات ال *Vinca* و *Colchicum* وبقيه المركبات الأخرى لاتستهدف الحامض النووي DNA [13] .

درس [14] الثبات الكيميائي لقلويدات نبات عين البزون في ثلاثة مذيبات شائعة بدرجتي حرارة ٤ و ٢٥ مْ وسجل بأن هذه القلويدات لاتتفكك بدرجة ٤ مْ لثلاثة أسابيع , بينما كانت نسبة الثبات لتلك القلويدات ٩٥ % بدرجة حرارة ٢٥ مْ لنفس الفترة وهذه الميزة تعطيها أهمية كبرى من الناحية التطبيقية , تم في الدراسة الحالية أختبارالفعالية ضد السرطانية للقلويدات المستخلصة من نبات عين البزون *C.roseus* تجاه نوعين من الخطوط الخلوية السرطانية وهما الخط البشري Hep-2 و ألفأري AMN3 وذلك بحساب النسبة المئوية لمعدل تثبيط وتحفيز الخلايا السرطانية (IR %) و (PR%) على التوالي , وتبين بأن جميع التراكيز المدروسة (٢٥و 12.5 و 6.25و3.125) ملغ/مل ثبطت بنسب مئوية عالية الخط الخلوي السرطاني البشري Hep-2 وذلك من خلال ملاحظة الفرق بين الامتصاصية Optical Density (OD) لخلايا السيطرة و المعاملة (جدول رقم ١) وهذا يتفق مع ما سجله [15] باستخدامه قلويدات عين البزون *Vinca* alkaloid اذ أنها ثبطت بصورة قليلة الخلايا السرطانية للمثانة J82 cell line

وسجل ايضآ بأن هناك تباينا قويا في قيم الكثافة الضوئية (OD) عند معاملة الخلايا السرطانية بالقلويدات .

عند تعريض الخلايا والأنسجة لقلويدات نبات عين البزون تحدث العديد من التأثيرات الكيميائية وهي تمزيق النبيبات الدقيقة Micro tubules وتثبيط تصنيع البروتينات والأحماض الامينية , وتزيد من تركيز الكلوتاثايون المؤكسد وتغير ايض ومكونات الدهون المكونة للأغشية الخلوية وزيادة الادينوسين الحلقي أحادي الفوسفات cAMP , وتثبيط Calicum- Calmodulin- regulated, AMP phosphodiestrase [16] و[17] .

قلويدات عين البزون هي جزئيات كارهة للماء جزئيا لذلك سوف تقحم في طبقتي الدهون في حالة الدهون غير المشحونة مغيرة بذلك تركيب و وظيفة الأغشية الخلوية [18] و[19], ونظرا للتأثيرات المختلفة لهذه القلويدات هنالك توثيق لفعلها في تمزيق النبيبات الدقيقة و الناتج من الارتباط العكسي بالتيوبيولين وهو الوحدة الثانوية للنبيبات الدقيقة وباستعمال الجرع الصيدلانية فأن معظم التأثيرات الكيميائية المرتبطة بلقلويدات عين البزون يحتمل أن تحطم النبيبات الدقيقة , وعلىالرغم من ذلك فأن هذه المركبات تحفز التغيرات في طبقة الدهون الثنائية و التي سوف تغير بعض من العمليات في تلك الطبقة . أما في حالة استعمال التراكيز العالية لهذه القلويدات فأنها سوف تحفز على تكوين تجمعات كبيرة من بلورات مكونه من التيبويولين و القلويد [20]و[21] .بينما يؤكد كل من [22]و[23] على أن هذه القلويدات لها القابلية على تحطيم النيبات الدقيقة مسببة ذوبان ألياف المغزل موقفة الخلية عن الانقسام في الطور البيني . أما على مستوى

دورة الخلية فأن القلويدات تثبط الانقسام الخلوي والتي يكون الموقع الابتدائي لفعلها هو الطور M في دورة الخلية .وتقترح أخر الدراسات إلى أن تحطيم دورة الخلية قد يؤدي إلى موت الخلية خلال مسار ايضي وتدعى هذه الخلايا ب apoptosis. ووجد أيضا بأن هذه القلويدات تعمل على تحفيز الخلايا السرطانية أن تكون بالطور الاستوائي وهذا يحدث بعد ١٥ ساعة من الحضن بوجود القلويدات [24] .عند الرجوع إلى الجدول ٢ نلاحظ أن الخلايا السرطانية الفأرية AMN3 لم تستجب لمعظم التراكيز المستخدمة وكانت الاستجابة قليلة جدا وهذا يؤيد ما جاء به[25] حيث وجد أن الخلايا السرطانية للابيضاض الدم ألفأري P388 كانت مقاومة لأحد قلويدات عين البزون وعزى ذلك إلى إن مقاومة الخلايا السرطانية لتلك القلويدات و العديد من المركبات الطبيعية الأخرى المضادة للسرطان ناتج عن العديد من آليات المقاومة منها أن خلايا الخطوط السرطانية تغير مواقع أرتباط تلك القلويدات بالتيوبيولين خلال آلية مبهمة[26] .

جدول رقم (١)فعالية القلويدات المستخلصة من نبات عين البزون ضد الخط الخلوي السرطاني البشري Hep-2.

الكثافة الضوئية (OD) / التركيز (mg/ml)	المعاملة (المعدل)	السيطرة (المعدل)	النسبة المئوية للتثبيط IR%	النسبة المئوية للتحفيز PR%
25	0.053	0.43	87.7	12.3
12.5	0.0476	0.43	88.9	11.1
6.25	0.05	0.43	88.4	11.6
3.125	0.0466	0.43	89.2	10.8

جدول رقم (٢)فعالية القلويدات المستخلصة من نبات عين البزون ضد الخلايا السرطانية الفأرية AMN٣.

الكثافة الضوئية (OD) / التركيز (mg/ml)	المعاملة (المعدل)	السيطرة (المعدل)	النسبة المئوية للتثبيط IR%	النسبة المئوية للتحفيز PR%
25	0.063	0.06	-5	105
12.5	0.047	0.06	21.67	78.33
6.25	0.053	0.06	11.67	88.33
3.125	0.06	0.06	0	100

ملحق رقم (١) الوسط الغذائيRPMI-1640

الأحماض الامينية	التركيز (غرام /لتر)	الفيتامينات	التركيز (غرام /لتر)
L-Arginine	0.2	P-Aminobenzoic acid	0.001
L-Aspartic Acid	0.o2	D-Biotin	0.0001
L-Aspargagine	0.05	Choline Chloride	0.003
L-Cystine.2HCl	0.0625	B12	0.000005
L-Glutamic Acid	0.02	Folic Acid	0.001
L-Glutamine	0.3	Myo-Inositol	0.035
Glysine	0.01	Niacinamide	0.001
L-Histidine	0.015	D-Pantothenic Acid.Ca	0.00025
Hydroxy-L-proline	0.02	Pyridoxine.HCl	0.001
L-Isoleucine	0.05	Riboflavin	0.0002
L-Leucine	0.05	Thiamine .HCl	0.001
L-Lysine.HCl	0.04	مواد أخرى	التركيز (غرام /لتر)
L-Methionine	0.015	D-Glucose	2.0
L-phenylalaline	0.015	Glutothione	0.001
L-Proline	0.02	HEPES	5.96
L-Serine	0.03	Phenol Red,Sodium	0.0053
L-Threonine	0.02		
L-Tryptophane	0.005		
L-Tyrosine.2Na.2H20	0.02883		
L-Valine	0.02		

المصادر

1-Critopoulos,P.(1980). Apocynaceae PP.526-542.In: C.C.Townsed and E.Guest (eds)Flora of Iraq vol.4.Robert Maclehose and Co.UK.

2-M.Shoeb,Bang. (2006).Anticancer agent from medicinal plants. Bangladesh J. Pharmocol. ,1:35-41.

3- AL-Rawi, A.,and Chakravarty, H.L. (1988).medicinal plants of Iraq. Ministry of agriculture and irrigation state board for agricultural and water resources research, National Herbarium of Iraq. PP.97.

4-Nayak, .(2006). Influence of ethanol extract of *Vinca rosea* on wound in diabetic rats .On line.J.Biol.Sci.,6:40-44.

5-Pearce, H.L. (1990).Medicinal chemistry of bisindole alkaloids from *Catharanthus*. In: A.B.Orlando(ed.).The alkaloids,vlo, ,37. Academic press.

6-J.B.Harborne, Phytochemical methods, 287,(1973).

7-J.B.Harborne, Phytochemical methods, 287,(1973).

8-J.B.Harborne,Phytochemical methods,287, (1973).

9-Freshney, R.I. (1994).Culture of animal cells. manual of basic teqnique, pp 440.

10-Freshney, R.I. (2000). Culture of animal cells. manual of basic teqnique PP.566 .

11-Mckeehan, W.L., McKeehan, K.A. , Hammond, S.L.and Ham, R.G.(1994).Improved medium for clonal growth of human diploid cells at low concentrations of serum protein, in vitro,3,399.

12-S.Gao,B.Yu,Y.Li,W.Dong,and H.Luo,World J.Gastroeutrol. , 9,2362, (2003).

13-Beck, W.T., Cass, C.E.and Houghton, P.J.(2000).Microtubule-targeting anticancer drugs derived from plants and microbes .*Vinca* alkaloids ,taxanos and epothilones.

14-Beijnen, J.H., Vendrig, D.E.and Underberg, W.J. (1989).Stability of vinca alkaloids anticancer drugs in three commonly used infusion fluids . Sci., Technol.,43:84-87.

15-Pauwels, O, Kis, R., Pasteel, L.and Atassi, G. (1995). Cytotoxic ,cell kinetics and motphonuclear-induced effects of *Vinca* alkaloids anticancer agents .J.Pharm-pharmacol., 47: 870-875 .

16-Beck, W.T., Cass, C.E.and Houghton, P.J.(2000).Microtubule-targeting anticancer drugs derived from plants and microbes .*Vinca* alkaloids ,taxanos and epothilones.

17-Wilson, L.(1975) . Microtubules as drug receptors: pharmacological properties of microtubule protein *Ann N Y Acad. Sci*.,253: 213.

18-Kremmer, T. and Holczinger, L.(1980). Investigation of *Vinca* alkaloid-plasma membrane interactions by detergent gel alkaloid, which participates in P-glycoprotein (Pgp)-mediated multidrug resistance in vivo and in vitro Invest. New Drugs ,16: 3.

chromatography *J Chromatogr* ., 191: 287.

19-Ter-Minassian-Saraga, L. and Madelmont ,G.(1983). Enhanced hydration of ipalmitoylphosphatidylcholine multibilayer by vinblastine sulphate *Biochim Biophys Acta* ., 728: 394.

20-Bryan, J.(1972). Vinblastine and microtubules: II. Characterization of two protein subunits from the isolated crystals *J. Mol. Biol* ., 66: 157.

21-Bensch, K.G. and Malawista, S.E.(1969). Microtubular crystals in mammalian cells J. Cel.l Biol. , 40: 95.

22-Ter-Minassian-Saraga, L. and Madelmont G.(1983). Enhanced hydration of ipalmitoylphosphatidylcholine multibilayer by vinblastine sulphate Biochim. Biophys. Acta., 728: 394.

23-Bruchovsky, N., Owen, A.A. , Becker, A.J. and Till, J.E.(1965). Effects of vinblastine on the proliferative capacity of L cells and their progress through the division cycle. Cancer Res., 25: 1232.

24-Bruchovsky, N., Owen, A.A. , Becker, A.J. and Till, J.E.(1965). Effects of vinblastine on the proliferative capacity of L cells and their progress through the division cycle. Cancer Res., 25: 1232.

25-Adams, D.J. and Knick, V.C.(1993). MDR and non-MDR forms of cellular resistance to 59-nor-anhydrovinblastine (Navelbine). Proc Am Assoc Cancer Res.,33:462. HE. Taxol as a radiation sensitizer: a flow cytometric study Gynecol. Oncol ., 50: 89.

26-Etievant, C., Barret, J.M. , Kruczynski, A., Perrin, D. and Hill, B.T.(1998). Vinflunine (20', 20'-difluoro-3' 4'-dihydrovinorelbine), a novel *Vinca*

Anticancer activityof alkaloids of Madagascar Periwinkle *Catharanthus roseus* (L.)G.Don against two cancer cell line

A.A.Shareef A. A.Y.Al-Mussawi L. N. Harb

Biology Dept. - Education College - Basrah University

Abstract

In the present study , Madagascar Periwinkle *Catharanthus roseus* (L.)G.Don alkaloids were evaluated against two cancer cell lines :larynx human cancer cell line Hep-2,and mouse breast cancer cell line AMN3 , by using four concentrations for each cell line (25,12.5,6,25,3.125)mg/ml(in triplicate).and it has been found that alkaloids showed highest activity against larynx human cancer cell line Hep-2 ,while exhibited weak activity against mouse breast cancer cell line AMN3 compared with control treatment.

Key words: *Catharanthus roseus* alkaloids, anticancer activity