جامعة الموصل
كلية التربية للعلوم الصرفة

فعالية بعض المركبات الطبيعية المفصولة والمشخصة من بعض النباتات العراقية وتقييمها الجزيئي كمضادات للأكسدة والسرطان

ابتسام ناظم حازم العساف

أطروحة دكتوراه
علوم الحياة

بإشراف

الأستاذ
الدكتور مثنى جاسم محمد الطائي

الأستاذ المساعد
الدكتور فواز فاضل علي

1444هـ
2023 م

الخلاصة

تعد هذه الدراسة استكشافية لفعالية مركبات الأيض الثانوية لثلاث نباتات متواجدة في البيئة العراقية وهي ثمار نبات شوك النار *Pyracantha coccinea* وثمار نبات ضرس العجوز *Tribulus terrestris* وأزهار نبات الآفسنتين *Artemisia absinthium* وشملت الدراسة محورين أساسين المحور الأول

أنجز في مختبر النواتج الطبيعية قسم علوم الحياة كلية التربية جامعة الموصل، وتضمن فصل وتشخيص بعض المركبات الفعالة من النباتات الثلاث المختارة باستخدام جهاز الاستخلاص المستمر soxhlet باتباع نظام المذيبات المتعاقبة الهكسان، خلات الأثيل والإيثانول، ثم ركزت المستخلصات باستخدام جهاز المبخر الدوار للحصول على المستخلص الخام المركز، شخصت الأحماض الدهنية في المستخلص الهكساني باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الغاز المصاحب بمطياف الكتلة Gas (GC-MS) chromatography–mass spectrometry للنبات الثلاث وهي palmitic acid، stearic acid، gamma-Tocopherol ، beta.-Tocopherol ، Hentriacontane ، Tridecanoic acid ، Arachidonic acid، Lauric acid ، cis-Vaccenic acid ، gamma-Sitosterol، جُزئت المستخلصات باستعمال تقنية عمود الفصل الكروماتوغرافي Column chromatography CC، وتم تشخيص عدة مركبات فينولية بتقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (High Performance Liquid Chromatography (HPLC وشخصت المركبات في ثمار نبات شوك النار وهي حامض الكاليك ، حامض السالسيلك ،الكاتيكول ،4–هايدروكسي حامض البنزويك ،حامض الفانيلك ،هيدروكينون فضلاً عن المركبات المذكورة تم تشخيص مركب الكيومارين في ثمار نبات ضرس العجوز ومركب الريسورسينول في أزهار نبات الآفسنتين.

أما المحور الثاني فقد انجز خارج العراق في شركة Atlas Biotechnologies في الجمهورية التركية، وتضمن تقييم الفعالية الحيوية للمركبات التي تم فصلها من النباتات الثلاث ضد الأكسدة والسرطان.

تم تقييم حيوية المستخلصات النباتية للنباتات الثلاثة باستخدام اختبار XTT بالتراكيز 5،10 و20 مايكروغرام /مل على خطي سرطان الثدي MCF7 والقولون HT29 مقارنة مع خط الخلايا السليم WI38 وأظهرت نتائج الاختبار أنَّ المستخلص الإيثانولي للنباتات الثلاثة عند التركيز 20 مايكروغرام /مل أثر على حيوية خط خلايا سرطان الثدي بنسبة 38.72 ، 39.54 و33.26 على التوالي بينما أعطى المستخلص نفسه تأثيراً في حيوية خط خلايا سرطان القولون بنسبة 31.78، 41.01 و30.53 على التوالي بينما لم يظهر تأثير واضح على خط الخلايا السليم.

عند تحضين الخلايا بتراكيز متزايدة من المستخلصات النباتية ، لمدة 24 ساعة ، لوحظت الخلايا التي عانت من الموت المبرمج بشكل كبير. تضمنت التغيرات المورفولوجية الأكثر شيوعًا في المزارع الخلوية لخطوط الخلايا السرطانية MCF7 و HT29 تغيرات خلوية تمثلت في تكاثف الكروماتين ، انفصال الخلايا وتغير شكلها إلى شكل دائري، ووجود فجوات وانكماش السايتوبلازم وانخفاض في اعداد وحيوية الخلايا، وفقدن الشكل الطبيعي للخلايا متبوعا بتفتت النواة إلى أجزاء منفصلة عن طريق تبرعم الخلية ككل لإنتاج أجسام موت الخلايا المبرمج المرتبطة بالغشاء، مما يعني كبح وتثبيط السرطان بالتراكيز المستخدمة، السمة المميزة للخلايا الميتة والمحتضرة هي انهيار الأغشية الخلوية والنووية. بينما لم يظهر تغيرٌ مظهريٌ على خط الخلايا السليمة WI38 وظهر بشكل طبقة أحادية، تحتفظ بشكلها الزاوي أو المضلع الطبيعي. تحتوي معظم الخلايا على نوى حويصلية كبيرة وسليمة.

بينت نتائج اختبار TUNEL عند استخدام المستخلصات النباتية الثلاث بالتركيز 20 مايكروغرام/مل وبفترة تحضين 24 ساعة ظهور سمات موت الخلايا المبرمج، ونشاطاً مضاداً للتكاثر الخلوي للمستخلصات الثلاثة، وكانت أعلى نسبة لموت الخلايا المبرمج للمستخلص الايثانولي للنباتات الثلاث بينما أظهر مستخلص خلات الأثيل نسبة أقل لموت الخلايا المبرمج والذي ظهر في خطي خلايا سرطان الثدي MCF7 وخلايا سرطان القولون HT29 ، وتم تمييز الخلايا التي عانت من

الموت المبرمج بكثافة فلورية عالية بصبغة Andy Fluor 488 والتألق باللون الأخضر ، ولتحديد الخلايا التي لم تعاني من الموت المبرمج استخدمت الصبغة المضادة Hoechst 33342 والتي تألقت بلون أزرق تحت المجهر الفلورسيني.

تم قياس التعبير عن الجين المؤيد للموت المبرمج BAX و TP53 بعداستخدام المستخلصات النباتية ، أظهر تحليل التعبير الجيني باستخدام RT-qPCR، زيادة ملحوظة في نشاط التعبير الجيني للـ BAX و TP53 في خلايا سرطان الثدي والقولون مقارنة بالخلايا السليمة عند التركيز 20 مايكروغرام/مل وأعطى المستخلص الإيثانولي زيادة في التعبير للخلايا المعاملة بينما أعطى مستخلص خلات الأثيل لثمار نبات شوك النار أقل مقدار مقارنة بالسيطرة.

أظهرت نتائج التعبير الجيني لـ NRF2 المضاد للأكسدة في سايتوبلازم الخلية عند استخدام المستخلصات النباتية للنباتات الثلاثة على خط خلايا سرطان الثدي والقولون بعد 24 ساعة من التحضين زيادة في مقدار التعبير الجيني للمستخلص الإيثانولي لنبات أزهار نبات الآفسنتين بينما انخفض مقدار التعبير الجيني للمستخلصين الهكساني وخلات الأثيل لأزهار نبات الآفسنتين و ثمار نبات ضرس العجوز مقارنة بخلايا السيطرة وهذا يدل قابلية المستخلصات على كسح الجذور الحرة.

تم قياس التعبير عن الجينات المنظمة لدورة الخلية CDK6 ،BRCA1 و KRAS بعداستخدام المستخلصات النباتية ، أظهر تحليل التعبير الجيني باستخدام RT-qPCR، انخفاض ملحوظ في نشاط التعبير الجيني لهما في خلايا سرطان الثدي والقولون مقارنة بالخلايا السليمة عند التركيز 20 مايكروغرام/مل للمستخلص الايثانولي مقارنة بالسيطرة.

Summary

This study investigates the effectiveness of secondary metabolite compounds of three plants present in the Iraqi environment, namely the fruits of the fire thistle plant (*Pyracantha coccinea*), the fruits of the puncture vine (*Tribulus terrestris*), and the flowers of the wormwood (*Artemisia absinthium*). The study included two main axes:

The first axis was completed in the Natural Products Laboratory, Department of Biology, College of Education for Pure Science, University of Mosul, Iraq, These experiments included the separation and identification of some active compounds from the three selected plants using the continuous extraction device soxhlet by following the successive solvent system hexane, ethyl acetate, and ethanol, then the extracts were concentrated using a rotary evaporator device to obtain the concentrated crude extract The fatty acids in the hexane extract were identified using Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS) for the three plants, palmitic acid, stearic acid, Tridecanoic acid, and Hentriacontane, beta-Tocopherol, gamma-tocopherol, Arachidonic acid, Lauric acid, cis-Vaccenic acid, gamma-Sitosterol, the extracts were fractionated using CC Column Chromatography, and several phenolic compounds were identified using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and the compounds in the fruits of the thistle plant, which are gallic acid, salicylic acid, catechol, 4-hydroxy benzoic acid, vanillic acid, and hydroquinone, in addition to the mentioned compounds, coumarin was detected and identified in the fruits of the elderberry plant, and the compound resorcinol in the flowers of the wormwood plant.

The second axis, it was carried out outside Iraq at Atlas Biotechnologies Company in the Republic of Turkey, and it included evaluating the biological effectiveness of the separated compounds from the three plants against oxidative stress and cancer.

The viability of treated cancer cells and cells control (breast cancer lines MCF7 and colon cancer HT29 compared with the healthy cell line WI38) with the plant extracts of the three plants was evaluated using the XTT test at concentrations of 10, 5, and 20 µg/ml. The treated breast cancer showed a significant reduction in cells viability compared with cell control with a ratio of 38.72, 39.54, and 33.26, respectively, while the same extract also affected the vitality of the colon cancer cell line with at a ratio of 31.78, 41.01, and 30.53, respectively with no significant effect on the healthy cell line. The effect of plant extracts was increased by increasing the extract concentrations for 24 hours of incubation. Furthermore, cells that experienced programmed death were significantly observed. The most common morphological changes in cell cultures of MCF7 and HT29 cancer cell lines included cellular changes represented by chromatin condensation, cell detachment and a change in shape to a circular shape, the presence of vacuoles, shrinkage of the cytoplasm, a decrease in the cells number and cells vitality, loss of the normal shape of the cells followed by the fragmentation of the nucleus into separate parts by budding. The cell, as a whole, produces membrane-bound apoptotic bodies, which means suppressing and inhibiting cancer with the concentrations used. The hallmark of dead and dying cells is the breakdown of cellular and nuclear membranes. However, no obvious changes were observed in the healthy cell line WI38.

The results of the TUNEL test when using the three plant extracts at a concentration of 20 µg / ml and an incubation period of 24 hours showed the appearance of apoptosis features and antiproliferative activity of the three extracts. MCF7 breast cancer cell lines and HT29 colon cancer cell lines were determined cells that suffered from apoptosis stained with high fluorescent intensity by Andy Fluor 488 dye and fluoresced in green. The anti-Hoechst 33342 dye was used to identify cells that did not suffer from programmed death, which fluoresced in blue under a fluorescent microscope. The expression of the pro-apoptotic gene BAX and TP53 was measured after using the plant extracts. Gene expression analysis using RT-qPCR showed a significant increase in the gene expression activity of BAX and TP53 in breast and colon cancer cells compared to healthy cells at a concentration of 20 µg/ml of ethanolic extract. While the ethyl acetate extract of the fruits of the fire thistle plant gave the least amount compared to the control. The results of the gene expression of the antioxidant NRF2 in the cell cytoplasm when the plant extracts of the three plants were used on the breast and colon cancer cell line after 24 hours of incubation showed an increase in the amount of gene expression of the ethanolic extract of the plants of wormwood flowers, while the amount of gene expression of the two hexane and ethyl acetate extracts of the flowers of the plant decreased. Absinthe and elderberry fruits were also compared to control cells, and this indicates the ability of extracts to scavenge free radicals. The expression of CDK6 BRCA1and KRAS cell cycle regulator genes was measured after using the plant extracts. Gene expression analysis using RT-qPCR showed a significant decrease in their gene expression activity in breast and colon cancer cells compared to healthy cells at a concentration of 20 µg/ml of the ethanolic extract compared to control.

University of Mosul

College of Education

for Pure Science

Efficacy of Some Isolated and Diagnosed Natural Compound From Some Iraqi Plants and Their Molecular Evaluation As Antioxidant and Anticancer

Ibtisam Nadhim Hazim AL-Assaf

Ph.D. Thesis
Biology

Supervised by

Prof. **Assist. Prof.**

Dr. Muthana Jasim AL-Taee **Dr. Fawaz Fadhil Ali**

2023A.D. 1444 A.H.