تأثير العشب الطبي الشبت (أنيثم جرافولينز) على نمو خلايا سرطان الكبد البشرية

فرقان احمد .محمد

المستخلص

تبدأ الخلايا الجديدة بالنشوء في الكبد من خلال الطفرات الجينية وكلما تتقدم الحالة تتكاثر الخلايا السرطانية مما يتسبب عنه الهجرة والانتشار، علاوة على أن سرطان الكبد كمرض يتطور بسرعة في المرضى الذين يعانون من تليف الكبد المزمن أو التهاب الكبد حيث تتعاضد الأورام الصلبة في وجود الإلتهاب. إن العلاجات المستخدمة لمرضى سرطان الكبد متعددة ومختلفة ولها آثار جانبية على المرضى وفِي نفس الوقت باهظة الثمن؛ لذلك فإن أحد الاتجاهات الحديثة في العلاج هو البحث في تركيبات النباتات الطبية عبر الأعشاب الطبية حيث يمكن توفر بدائل محتملة للعلاج للسرطان، ومن تلك النباتات نبتة (dill) *Anethum graveolens*حيث هي من أكثر النباتات محلا للدراسة والاستخدام في العالم؛ وذلك لأن في تركيباتها مضادات للسرطان، وأظهرت الدراسات الحديثة أن لهذه النبتة قدرة على العلاج واعدة ويمكن استخدام بذورها كدواء تقليدي لبعض السرطانات.

وقد أوضحت دراستنا هذه أن النشاط المضاد للتكاثر والمضاد للانتشار من خلال استخدام استات اثيل من بذور الشبث(EAFD) على الخلايا السرطانية الكبدية HepG2 وذلك على مستوى زراعة الطبقة الخلوية الواحدة. ولقد تم استخدام اختبار MTT لمعرفة التكاثر الخلوي ودرست التغيرات الشكلية للخلايا باستخدام صبغات مجهر الفلورسنت التي جاء ذكرها في فصل الطرق والمواد المستخدمة في الرسالة. وهي متعددة منها : توجست ٣٣٤٢، والبرتقالي اكريدين، وصبغة جي سي. وبناءعلى ذلك، تم تحدي نشاط الموت المبرمج وتحاليل دورة الخلية. ولكون التجربة تم عملها على Hepatospheres ويطلق على هذه الخلايا السرطانية الكبدية باسم واستخدمت اختبارات خاصة بمضادات الانتشار 0.8 ،0.6، 0.4، 0.2، 0.1تركيزات مختلفة للمادة وهي والهجرة، لقد قللت المادة المستخدمة من نبات الشبث من عملية التكاثر للخلايا السرطانية وفقا لزيادة الجرعة المستخدمة. كما أظهر المجهر الفورسنتي أن غشاء الخلايا عانى من تغيرات مثل الانكماش، وكذلك تأثرت النواة وأغشية الميتوكندريا في داخل الخلايا السرطانية مقارنة بالخلايا الطبيعية مما تسبب عنه الموت الموضعي كما تسببت المادة في تثبيط الانتشار والهجرة للخلايا السرطان.

Effect of the Medicinal Herb *Anethum Graveolens* (dill) on the growth of Human *Liver Cancer Cells*

By

Furkhan Ahmed Mohammed

Abstract

In the current study, we have analyzed the antiproliferative activity and anti-metastasis by xenografting method (mice) effect of ethyl acetate fraction of dill seeds (EAFD) on the hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line and Tumorsphere formation derived from adherent monolayer HepG2 cells called as "Hepatospheres". Cell viability and proliferation were observed by MTT assay; Morphological changes were studied using fluorescent stains like Hoechst 33342, acridine orange/ethidium bromide and JC-1 dye. Further, the pro-apoptotic activity was demonstrated through Annexin-V-FITC/ PI assay and cell cycle analysis. Different concentrations (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mg/ml) of EAFD were studied. Further, confirming the other anti-metastatic method viz, wound healing assay, migration and invasion assay, toluidine blue exclusion assay and chemoresistance assay. In addition, Culture of HepG2 cells are derived from tumorspheres formation (hepatospheres) and Xenografting *in-vivo* method (mice) were studied. The EAFD markedly suppressed the proliferation of HepG2 cells in a dose and time-dependent manner. The phase contrast and fluorescence microscopy revealed the morphological alterations like disruption, shrinkage, detachment and blebbing of cell membrane accompanied by nuclear condensation after exposure to EAFD. Radical scavenging activity was evidenced by measurement of ROS levels post-treatment. Modulation of mitochondrial membrane potential was exhibited leading to the activation of caspases 3/7 and 9 which is a committed step towards apoptosis. Annexin V-FITC/ PI assay and cell cycle, later confirmed the apoptosis and cell cycle arrest in 'G2/M' phase through flow cytometric analysis. Interestingly, EAFD effectively inhibited the migration potential of treated cells, in a dose- and time-dependent manner. EAFD treated HepG2 cells exhibited a significant decrease in the number of migrated and invasion of cells. EAFD treatment inhibited growth of hepatospheres with increasing the concentration in dose dependent manner. Toluidine blue stain indicate that there was increase of toluidine blue pale subpopulation of adherent monolayer HepG2 cells and decrease in dark cell subpopulation in HepG2 hepatospheres cells. EAFD induces anti-metastasis through HepG2 cells in xenograft mice model to study anti-metastasis activity. In conclusion, a significant apoptogenic effect was exhibited by EAFD against HepG2 cells in inducing apoptosis and cell cycle arrest. Further, confirming xenografting mice model to investigate anti-metastasis activity. Our findings indicate that the medicinal herb-*Anethum graveolens*, holds potential in treating hepatocellular carcinoma effectively.