

تأثير الأعشاب الطبية ، *Foeniculum vulgare* (fennel) على نمو خلايا سرطان الثدي البشرية

فريد الدين قردي سيد

تحت إشراف

د. أيمن إبراهيم القاضي

المستخلص باللغة العربية

سرطان الثدي هو أكثر أنواع السرطان شيوعاً فضلاً عن كونه يمثل أعلى معدل للوفيات في العالم لدى الإناث. أن العشب الطبي *Foeniculum vulgare* L. (الشمر) يعتبر أحد الأعشاب الأكثر شيوعاً المستخدمة في الأدوية البديلة لأحتوائه على مركبات متنوعة ذات فاعلية حيوية. و كان الهدف من هذه الدراسة هو اختبار تأثير مستخلص عشبة الشمر على تثبيط قدرة خلايا سرطان الثدي الأدمية (MCF-7) على التكاثر و تكوين مستعمرات سرطانية و أحداث موت مبرمج في تلك الخلايا. و قد تم قياس قدرة مستخلصات العشب المضادة لنمو الخلايا السرطانية (MCF-7) بواسطة تقنية MTT و كذلك بواسطة إيقاف نمو المستعمرات السرطانية. و قد استخدمت صبغات جيمسا و هوكست و الأكريدين البرتقالي بالأزدواج مع الإيثيديوم بروميد لمتابعة التغيرات المورفولوجية المختلفة لموت الخلايا المبرمج. و تم قياس مدى موت الخلايا المبرمج ودورة الخلية بواسطة مقياس التدفق الخلوي. و قياس مستويات ROS وحيوية غشاء الميتوكوندريا بواسطة DCFH-DA و JC-1 على التوالي. تم قياس نشاط أنزيمات الكازيباس بواسطة جهاز المطياف الضوئي و تجزئة الحمض النووي بواسطة تقنية المذنب. و قد فصلت خلايا سرطان الثدي الجذعية و تم تحديد خصائص تلك الخلايا بواسطة تكوين الكريات الورمية و صبغة الطولويدين. و أجريت أيضاً دراسة قدرة المستخلص على إيقاف قدرة الخلايا السرطانية على تكوين مستعمرات مهاجرة بواسطة تقنيات اختبار الجروح و هجرة الخلايا و غزو طبقات الماتريجيل. و استخدم تقنية نموذج الفئران لدراسة تأثير المستخلص في الحيوان الكامل. و أخيراً استخدمت تقنيات التحليل الكيميائي (LC-QToF-MS/MS) للكشف عن المركبات الفعالة للمستخلص. أكدت النتائج أن المستخلص ظهر كمثبط جيد للنمو ضد MCF-7 بمنوال مطرد اعتماداً على الوقت والجرعة المستخدمة. كل التغيرات المورفولوجية في موت الخلايا المبرمج كانت واضحة في مجموعات العلاج. حيث أن اختبار التدفق الخلوي أثبت أن ٤٩% من الخلايا أظهر موت مبرمج عندما عملت الخلايا بجرعة 0.5mg/ml من المستخلص و كذلك أظهرت صبغة PI حدوث توقف دورة الخلايا في المرحلة G1. و عمل المستخلص على زيادة مستوى جزيئات الأوكسجين النشطة داخل الخلايا السرطانية مما أدى إلى اضطراب غشاء الميتوكوندريا و زيادة نشاط أنزيمي كازيباس-٣ و ٩- و تجزئة الحمض النووي في خلايا MCF-7 المعالجة. أظهر CFF أيضاً تأثير تثبيط نمو خلايا سرطان الثدي الجذعية. و أثبت المستخلص أيضاً قدرة الخلايا السرطانية على الهجرة و الغزو. أظهر تحليل LC-QToF-MS/MS وجود ثمانية مركبات بما في ذلك ٦,٦ - Dihydrouridine والتي لديها أهمية في سرطان علاج السرطان. تشير هذه النتائج إلى أن مستخلص عشب الشمر لديها القدرة على منع نمو خلايا MCF-7 و إبطاء دورة الخلية و تثبيط قدرة الخلايا على تكوين مستعمرات مهاجرة و هذا قد يوفر أساساً مفيداً لدراسة وتطوير عوامل العلاج الكيميائي الجديدة لعلاج سرطان الثدي

Effect of medicinal herb, *Foeniculum vulgare* (fennel) on the growth of human breast cancer cells

Fareeduddin Quadri Syed

**Supervised by
Dr. Ayman Ibrahim Elkady**

Abstract

Breast cancer is the most common cancer in females with the highest mortality rate worldwide. *Foeniculum vulgare* L. (fennel) is one of the most common herbs used in alternative medicines for its varied range of bioactivity. The objective of our work was to examine the antiproliferative, apoptotic effect, anti-metastatic effects of fennel extract on breast cancer cell line, MCF-7. Anti-proliferative assay (MTT assay) of various fractions was done using MCF-7. Colony formation assay was performed to study the growth inhibitory effect of fennel. Various morphological changes of apoptosis were observed using Giemsa, Hoechst and Acridine orange/ ethidium bromide stains in MCF-7 cells. The extent of apoptosis and cell cycle arrest was measured by flow cytometer. Levels of ROS and mitochondrial membrane potential was measured by DCFH-DA and JC-1 respectively. Caspases activity was measured by luminescence and DNA fragmentation by comet assay. Tumorsphere formation assay and toluidine blue exclusion assay was performed to characterize cancer stem cells. Wound healing assay, agarose bead cell assay, cell migration assay, matrigel invasion assay and xenograft in mouse was performed to study the anti-metastatic effect. LC-QToF-MS/MS analysis was done to identify the compounds. Chloroform fraction of fennel (CFF) presented the best activity on MCF-7 cells with the least toxic effect to normal cells, thereby, was selected for further mechanistic studies. CFF appeared as a good inhibitor of growth against MCF-7 in time and dose-dependent manners. All the morphological changes of apoptosis were evident in treatment groups. Annexin V/PI-assay of apoptosis gave around 49% of apoptotic cells upon treatment of 0.5mg/ml of CFF and PI-stained cells showed the G1 phase cell cycle arrest. Elevated levels of ROS, disrupted mitochondrial membrane, increased levels of caspase-9 & caspase-3 and DNA fragmentation was noted in treated MCF-7 cells. CFF showed growth inhibition effect of CSCs and anti-metastatic activity by inhibiting the migration and invasion of MCF-7 cells. Anti-angiogenesis effect of CFF was established using *in-vivo* xenograft mice model. Eight compounds including 5,6-Dihydrouridine, which has the importance in tumors growth inhibition were identified using LC-QToF-MS/MS. Collectively, these findings indicate that CFF has a potential to inhibit proliferation, to induce cell cycle arrest and to decrease metastatic potential of MCF-7 cells. These findings may provide a useful foundation for studying and developing novel chemotherapeutic agents for the treatment of breast cancer.