Department of Zoology
Faculty of Science
Ain Shams University

The Use of Hepatocellular Carcinoma Cell Line and Brine Shrimp Larvae for Detection of Antitumor Activities and Toxicity of Selected Egyptian plants.

Thesis Advisors
University Member:

Prof. Dr. Nefissa Hussein Abd El-Rheem Meky
Professor of physiology,
Zoology Deparment,
Faculty of Science,
Ain Shams University

Member Of Researsh Center :

Prof. Dr. Bassem M.S. El-Menshawi
professor of pharmacognosy,
pharmacognosy Deparment,
National Research Center

Approval Sheet

Thesis title

The Use of Hepatocellular Carcinoma Cell Line and Brine Shrimp Larvae for Detection of Antitumor Activities and Toxicity of Selected Egyptian plants.

By

Ahmed Abd El-Fattah Ibrahim Soliman

Prof. Dr. Azza I. Othman
Professor of physiology,
Vice Dean for graduat Studies and Research
Faculty of Science,
Mansoura University

Prof. Dr. Helen N. Saada
Prof. and Head of Division Radiobiology -
Atomic Energy Authority

Prof. Dr. Nefissa Hussein Abd El-Rheem Meky
Professor of physiology,
Zoology Deparment,
Faculty of Science,
Ain Shams University

Prof. Dr.

ACKNOWLEDGEMENT

Before all, limitless gratitude to ALLAH Who blessed my effort and showed me the way.

I would like to express my gratitude to Professor Dr. Nefissa Hussein Abd El-Rheem Meky Professor of Animal physiology, Zoology Deparment, Faculty of Science, Ain Shams University for supervising and guiding this work.

My sincere appreciation is also due to Professor Dr. Bassem M. S. El-Menshawi, Professor of Pharmacognosy, National Research Center, for supervising this study, suggesting the research point and approach. I would like also to express my gratitude for his daily guidance.

Thanks are also due to prof. Dr. Gamila Wassel, Professor of Pharmacognosy, National Research Center, for guidance and advices throughout accomplishment of this thesis.

I would like to express my deep thanks and gratitude to Dr. Khaled Mahmoud Hanafy Researcher, Pharmacognosy department, for his sincere guidance.

I would like also to thank Dr. Salwa El-Haloty and Dr. May Aly Hassan El-manawat Researchers, Pharmacognosy department, NRC, for their help and support.

A special Thank you is due to all my colleagues at the in vitro Bioassay- cell Culture lab and pharmacognosy Research laboratory-NRC for their help and sincere support throughout the years.

Many thanks to the staff members and Head of Zoology Department, Faculty of science, Ain Shams University for their help in this work.

Special deep appreciation is given to my father, my mother, my wife, my brothers and sisters. Also I feel deeply grateful to my dear country Egypt.

دراسات كيميائية حيوية علي المركبات الطبيعية كمضادات للأكسدة والسرطان

يعتبر السرطان من الامراض الخطيرة التي تتزايد خطورتة يوما بعد ولما كان العلاج المستخدم في علاج هذا المرض بانواعة متمثلا في العلاج الكيماوي و العلاج بالاشعاع له اثارة الجانبية كان الاتجاه لاستخدام المصادر الطبيعية كبديل للعلاج الكيماوي والعلاج بالاشعاع لهذا المرض . لذا تم دراسة مدي فاعلية العديد من المستخلصات النباتية لبعض النباتات التي تنمو في البيئة المصرية (مستخلص مائي بارد ، مستخلص مائي ساخن ، مستخلص ايثانولي ومستخلص ثلاثي كلورو ميثان : ميثانول (١:١) لكلا من ورق اللوف ، الحرجل ، السنامكي ، الريحان ، القلقاس ، بنجر المائدة واخيرا ثمرة الفلفل الاحمر الحار)علي ثلاثة انواع من الخلايا السرطانية احدهما من حيوانات التجارب EACC والاخران من الانسان AML, ALL في الانبوب *in-vitro* وعلي الحيوان *in-vivo* حيث وجد ان بعض هذة المستخلصات تقتل هذة الخلايا بنسبة تصل الي ٩٢% موت كما تميزت هذه الدراسة بدراسة هذه المستخلصات علي الخلايا الطبيعة التي تم الحصول عليها من المعهد القومي للاورام وايضا تأثير هذه المستخلصات كمضادات للاكسدة وعلاقه هذا بفعلها كمضادات للسرطانت وعلاقة تركيبها بفعلها واخيرا تم دراسة ميكانيكة عمل هذة المستخلصات علي المستوي الجزيئي.

يمكن تلخيص النتائج المتحصل عليها فى النقاط التالية :-

أولا : دراسة محتوي هذه المستخلصات من الفينولات والفلافونات.

حيث اوضحت النتائج المتحصل عليها ان محتوي المستخلصات انحص ما بين ٦,٢٥ الي ٣٣,١٠ مليجرام لكل جرام وزن جاف وكانت اعلي النتائج في المستخلص الايثانولي للورق الريحان واقلها في المتخلص المائي الساخن لورق اللوف.

ثانيا: دراسة تأثير هذه المستخلصات كمضادات للأكسدة.

حيث تم دراسة تأثير هذه المستخلصات علي التخلص من DPPH كشق حر صناعي واعطت نتائج ايضا مشابهه حيث اعطي المستخلص الايثانولي للورق الريحان اعلي نشاط يصل الي ٩٢% كما اعطي اقل تركيز يعطي ٥٠% نشاط. مقارن بباقي المستخلصات.

ثالثا: دراسة هذه المستخلصات علي الخلايا السرطانية.

حيث اعطت نتائج مخالفة لما سبق حيث اعطيت مستخلصات نبات الحرجل اعلي نتائج تضل الي (موت%٨٢،٩٢،٧٩) لمستخلصات مائي علي البارد والساخن والايثانولي علي التوالي ثم نبات القلقاس بنسبة تصل الي ٨١% موت في المستخلص المائي علي الساخن

رابعا: دراسة تاثير هذه المستخلصات علي الحيوان *in-vivo*.

حيث تم دراسة تأثيرها المستخلصات التي اعطت نتائج مميزة في الدراسة داخل الانبوب علي نشاط انزيمات الادلة كمضادات للأكسدة وكذلك انزيمات الادلة كمضادات للسرطانات حيث اعطت نتائج اكدتها الدراسة داخل الانبوب .

خامسا: دراسة ميكانيكية فعل هذه المستخلصات.

ايضا تم دراسة ميكانيكية موت هذة الخلايا بالمعاملة بهذه المستخلصات من خلال احداث موتا مبرمجا للخلية Apoptosis حيث اظهرت تكسير الحامض النووي الريبوزي لهذه الخلايا .

اسم الطالب: عمرو عبد المتجلي نصرالله **الدرجة:** الماجستير

عنوان الرسالة: دراسات كيميائية حيوية علي المركبات الطبيعية كمضادات للأكسدة والسرطان

المشرفون : الأستاذ الدكتور : أحمد أبو العينين
الأستاذ الدكتور : هاني عبد العزيز الشيمي
قسم: الكيمياء الحيوية **فرع:** الكيمياء الحيوية **تاريخ منح الدرجة:** / /

المستخلص العربي

الهدف الرئيسي لهذا البحث هو عمل مسح لبعض النباتات المصرية ومستخلاتها وكذلك ما تحتوية من مركبات كمضادات للعوامل المؤكسدة والمسرطنة علي السواء.
حيث اوضحت النتائج المتحصل عليها ان المستخلص المائي الساخن لورق نبات الحرجل استطاع تقليل نمو الورم داخل حيوانات التجارب المعاملة كما انة اخر موت الحيوانات ٢٩ يوم اكثر عندما قورنت بالحيوانات المعاملة بـ EACC فقط باستخدام تركيز ٢٠٠مليجرام / فأر/ يوم.

ايضا ادت هذه المستخلصات الي موت الخلايا السرطانية عند دراستها in-vitro بمعدل يصل الي (من ٦٦ الي ٩٠% موت) وكان اكثر المستخلصات تأثيرا ايضا المستخلص المائي الساخن لورق نبات الحرجل.

ايضا تم دراسة ميكانيكية موت هذة الخلايا بالمعاملة بهذه المستخلصات من خلال احداث موتا مبرمجا للخلية Apoptosis حيث اظهرت تكسير الحامض النووي الريبوزي لهذه الخلايا .

ايضا اظهرت النتائج مقدرة المستخلصات علي التخلص من الشقوق الحرة وفعلها كمضادات للاكسدة تصل الي ٩٢%.

أستخدام خط الخلايا السرطانية الكبدية ويرقات الارتيميا للكشف عن الفاعليات المضادة للاورام والسمية لبض النباتات المصرية

بحث مقدم من الطالب

احمد عبدالفتاح ابراهيم سليمان
بكالوريوس علوم – قسم علم الحيوان – جامعة الازهر

للحصول على درجة

الماجستير فى علم الحيوان

(فسيولوجيا)

كلية العلوم

جامعة عين شمس

م٢٠١٠

دراسات كيميائية حيوية علي المركبات الطبيعية لمضادات للاكسده والسرطانات

رسالة ماجستير
فيالعلوم الزراعية
(كيمياء حيوية)

مقدمة من

عمرو عبد المتجلي نصرالله

بكالوريوس في العلوم الزراعية (تكنولوجيا حيوية)- كلية الزراعة - جامعة القاهرة ٢٠٠٣

لجنة إجازة الرسالة:

د. احمد محمود مصطفي ابو العينين

.....

أستاذ الكيمياء الحيوية – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

د. جمال سيد علي الباروطي

.....

أستاذ الكيمياء الحيوية – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

د. سامي احمد عبد العزيز.....

أستاذ الكيمياء الحيوية – كلية الطب البيطري – جامعة القاهرة

د. هاني عبد العزيز الشيمي .....

أستاذ الكيمياء الحيوية – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

دراسات كيميائية حيوية علي المركبات الطبيعية لمضادات للاكسده والسرطانات

رسالة مقدمة من

عمرو عبد المتجلي نصرالله

بكالوريوس في العلوم الزراعية (تكنولوجيا حيوية)- كلية الزراعة - جامعة القاهرة ٢٠٠٣

للحصول على

درجة الماحستير

في

العلوم الزراعية
(كيمياء حيوية)

قســـــم الكيمياء الحيوية
كليـــــة الزراعـــة
جـامعــة القــاهرة
مصـــــــر

٢٠٠٧

ABSTRACT

Ibrahim, Ahmed Abdelfatah.

The Use of Hepatocellular Carcinoma Cell Line and Brine Shrimp Larvae for Detection of Antitumor Activities and Toxicity of Selected Egyptian plants.

M. Sc., Fac. Sci. Ain Shams Univ., Cairo, 2010

Key words Egyptian plants, extraction, Cytotoxic effect, Antitumor, *in vitro* bioassay, fractionation, human tumor cell lines, Hep G-2, Brine Shrimp Lethality.

The objective of this thesis is to evaluate the cytotoxic / anti-tumor effect of some plant extracts on brine shrimp nauplii and hepatocellular carcinoma cell line.

Thus, one hundred and twenty plant species , were collected randomly from different areas in Egypt. The plant Extracts were then screened through two in-vitro bioassays (brine shrimp lethality and hepatocellular human cell line (HepG2) for investigating their cytotoxic and antitumor activities.

The five most active methanol plant extracts on brine shrimp lethality bioassay were chosen as promising bioactive materials and their LC_{50} and LC_{90} values were calculated and then subjected to an initial fractionation scheme. These Plants were *Citrus maxima, Dovyalis caffra, Tephrosia purpurea, Agave Lophantha, Phlomis aurea*.

The Six most active methanol plant extracts on hepatocellular human cell line (HepG2) bioassay were chosen as promising bioactive materials and their LC_{50} and LC_{90} values were calculated and then subjected to an initial fractionation scheme. These Plants were *Solanum elaeagnifolium, Dovyalis caffra, Tephrosia purpurea, Agave Lophantha, Herniaria fontanesii, Ononis vaginalis*.

INTRODUCTION

Tumors can either be benign or malignant. Although benign tumors grow uncontrolled, they do not break off and spread beyond where they started and do not invade surrounding tissues. Malignant tumors, however, will invade and damage other tissues around them. They can also gain the ability to break off from where they started and spread to other parts of the body (metastasize), usually through the blood stream or through the lymphatic system where the lymph nodes are located. Over time, the cells of a malignant tumor become more abnormal and appear less like normal cells. This change in the appearance of cancer cells is called the tumor grade, and cancer cells are described as being well-differentiated, moderately-differentiated, poorly-differentiated or undifferentiated.

Normally, cells in the body will grow and divide to replace old or damaged cells. This growth is highly regulated, and once enough cells are produced to replace the old ones, normal cells will stop dividing. Tumors occur when there is an error in this regulation and cells continue to grow uncontrolled. Tumors of the liver occur when there is an error in the regulation growth of any liver cells.

Liver cancer rapidly reduces quality of life and typically causes death 6 months-1 year from diagnosis **(Bosch *et al.*, 2005)**. Globally, it is the fifth leading cause of cancer and the third leading cause of cancer death **(Bosch *et al.*, 2005 and Yu *et al.*, 2000).** This cancer varies widely in incidence throughout the world, with rising incidence in Egypt. The primary risk factors for hepatocellular carcinoma (HCC) are hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), dietary aflatoxin exposure and chronic alcohol consumption. **(Bosch e*t al.*, 2005 and Yu *et al.*, 2000**). Prior to the introduction of the HBV vaccine, chronic infection with HBV was generally high, with developing countries sharing the greatest burden **(Beasley, 1988).** Consequently, HBV was the dominant etiologic factor in the development of HCC. This is largely still true in Egypt, because vaccination programs were not started until the 1980s. More recently, HCV has begun to eclipse HBV in incidence in many countries throughout North America, Europe and the Middle East. (**Shepard *et al.*, 2005).** The rates of HCV in Egypt are among the highest in the world, with a prevalence rate of up to 20%. **(Arafa *et al.*, 2005 and El-Gafaary *at el.*, 2005).** Although a HBV vaccine program has been successfully implemented, with childhood coverage estimated at 95%-100%, most people born 20 years ago or earlier in Egypt