Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics

تاثير الفلافونيدات علـــى الخطوط الخلوية الســـرطانية والطبيعية خارج الجسم الحي

أسراء صكر سلمان*، ناهي يوسف ياسين**، ايسر عايد احمد**، مائدة حسين**، زهراء رافع طه*، هبة كريم شاكر**، ايمن علي حسن**

* كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد
** المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية / الجامعة المستنصرية

الخلاصة:

تهدف هذه الدراســة الى معرفة التأثير التثبيطي لحبوب نبات الكلغان Silybum marianum في اثنين من الخطوط الخلوية الســرطانية ، هما خلايا سرطان الدماغ (AMGM) وخط سرطان عنق الرحم البشري (Hela) ، وفي خط طبيعي واحد لجنين الفئران (MEF) ، حيث استخدمت خمسة تراكيز من المستخلص الفلافونويدي وهي (62.5 , 125 , 250 , 500 , 1000) مايكروغرام / مليليتر وبواقع مدتين تعريض هي (48,24) ساعة للخطوط السرطانية ومدة تعريض واحدة (48) ساعة للخط الخلوي الطبيعي .

بينت النتائج ان للمســتخلص الفلافونويدي تأثير تثبيطي في الخطوط الخلوية الســرطانية (AMGM , Hela) وبفرق معنوي عند مســتوى احتمالية ($P\leq0.05$) في التركيز العالي (1000) مايكروغرام / مليليتر ، فقد كان معدل الكثافة الخلوية (امتصاصية الخلايا) للخط AMGM 0.052)) اي بنســب تثبيط (39%) و مقارنة مع الســيطرة لمدة تعريض 24 ســاعة في حين كان معدل الكثافة الخلوية عند مدة التعريض 48 ساعة (0.051) اي بنسبة تثبي 94% مقارنة مع السيطرة.

اما للخط الخلوي السرطاني Hela فقد كان معدل الكثافة الخلوية 0.059 و 0.06 اي بنسبة تثبيط 85.7% و86% عند مدتي التعريض 24و 48 ساعة على التوالي مقارنة بالسيطرة .

لم يظهر تأثير معنوي واضح للتراكيز المستخدمة سابقاً في الخط الخلوي الطبيعي عدا التركيز العالي ، حيث بلغت معدل كثافة خلايا للخط MEF (0.23) اي بنسب تثبيط (34%) .

تشــير نتائج هذه الدراســة الى الفعالية التثبيطية العالية للمســتخلص الفلافونويدي لنبات الكلغان على معدل الكثافة الخلوية للخلايا السرطانية AMGM و Hela .

المقدمة:

الفلافونويــدات Flavonoids هــي مجموعــة المركبــات الفعالة المعزولــة مــن حبــوب نبــات الكلغــان (Silybum marianum L. Gaertn) (1) .

تحوي الفلافونويدات على انواع كثيره من اهمها الـ Flavolignan او مــا يســمى بالســليمارين Silymarin الذي يعد مــن اهم مركبات الفلافونويدية من الناحية الطبيعية (2).

وفــي اختبار الــHPLC الذي اجراه كل من (Hasanloo and Radjabian) ان الســيمارين يحوي علــى 4 ايزوميرات مهمة وهي الــ Silybin بنســبة 50 – 60 % والــ Isosilybin بنســبة 5% و Silychristin بنســبة 20% وأخيراً الـ Silydianin بنسبة 10% ، وكذلك يحيوي الفلافونويد على مركبات اخرى وهي الـ Taxifolin و الـ quercetin و Apigemin و 5) (Kaempferol .

تلعــب الفلافونويــدات دور كبير في المجال الطبي فقد اســتخدمت في علاج الاورام الســرطانية وكذلك في علاج الكبد وازالة الســموم (6و 7) .

كذلك كمضاد للأكسدة Antioxidant وفي تثبيط الخطوط الخلوية الســرطانية مثل الخط الخلوي السرطاني لسرطان الثدي ABCG-2 وسرطان الرئة 8) (NCL – H460 .

ومــن اهــم المركبات الفلافونويدية الاخــرى الموجودة في النبات وهــي Apigenin و quercetin و Kaempferol و Genistein فقد تلعب دور مهم في تثبيط الخطوط الســرطانية خارج الجســم الحي مثل ســرطان الرئة PMC42 من خلال تثبيط وتوقف انقســام الخلايا (Antiproliferatio 9) .

وكذلك تعمل هذه المركبات على تثبيط الخطوط الخلوية السرطانية البروســتات LNCaP وســرطان الرئــة MB-231 من خلال دخول الخلايا نحو الموت المبرمج (Apoptosis 10) .

ومــن المركبــات المهمة والاخــرى للفلافونويدات هي مركبات الـ Taxifolin الــذي تعمل على تثبيط الخلايا الســرطانية خارج الجســم الحي لسرطان القولون الشرجي للأنسان (Caco – 2 cell line 11).

Corresponding Address:
Maeda H. Mohammad
Iraqi Center for Cancer and Medical Genetics Research/ AL-Mustansiriya University
Email: maida_1979@yahoo.com

وكذلك يعمل الـ Silbinin من اهم الايزوميرات الموجود في مركبات السليمارين و يعمل على تثبيط الخطوط الخلوية السرطانية لسرطان البروستات PC-3 خارج الجسم الحي (12) .

المواد وطرائق العمل:

- **جمع النباتات وتحضير المستخلص النباتي :**

جمعت حبوب نبات الكلغان من حدائق جامعت بغداد / الجادرية في شهر اذار و نيسان 2009 ، جففت الحبوب وطحنت بواسطة جهاز الطحن . جرى تحضير المستخلص الفلافونويدي بأستخدام طريقة (13) (بوزن 20 غم من المسحوق النباتي واضيف له 300 ملتر من البتروليم ايثر ووضعا في جهاز السكسوليت لمدة 14 ساعة بدرجة حرارة 60 درجة مؤية ، بعدها يتم فصل الزيت عن المستخلص المراد استخلاصه . وما تبقى من المستخلص يوضع في جهاز السيكسوليت ويضاف له 300 ملتر ميثانول ويترك لمدة 18 ساعة بدرجة حرارة 80 م للحصول على الفلافونويد بتخفيف المستخلص والتخلص من المذيب بدرجة 50 م .

تم اختبار TLC في مختبر النباتات الطبية / قسم علوم الحياة / كلية العلوم للبنات للمستخلص مع الفلافونويدي القياسي Stander كما هو موضح في الصورة 1 .

اذيب 0.01 غم من المستخلص الجاف في 0.2 مل من المركب Dimethyl ether sulphoxid ويكمل الى 10 مل من الوسط الزرعي RPMI-1640 الخالي من المصل Sorum free media ، وخففا بأستحدام المحلول نفسه وعقم من خلال ترشيحه بورق الترشيح واطمان 1 ، ثم اعيد ترشيخه بورق ترشيح Nalgen filter ذات الثقوب السبعة 0.22um

- **تأثيرالمستخلصالفلانويدي *Flavonoids* لحبوب نبات الكلغان *silubum marianum* في نمو الخطوط الخلوية السرطانية والطبيعية في المختبر .**
- **تهيئة الخطوط الخلوية :**

لقد تم الحصول على ثلاث خطوط خلوية وهي : الخط الخلوي السرطاني لسرطان الدماغ AMGM (التمريره 33) والخط الخلوي السرطاني لسرطان عنق الرحم Hella cell (التمريره 232) ، والخط الخلوي الطبيعي لجنين الفأر MEF (التمريره 2) من المركز العراقي لبحوث السرطان .

الوراثة الطبيعية / الجامعة المستنصرية . ثم عمل المزراع الثانوية لكل حط خلوي وتحت ظروف معقمة وحسب طريقة (14)

وتم متابعة الخطوط الخلوية يومياً للتأكد من خلوها من اي تلوث ، وان الخلايا بحالة جيدة وذلك بفحصها بوساطة مجهر مقلوب الطور Phase inbverted contrast microscob .

وكانت الخلايا جاهزة للأستعمال عندما تتكون عدة طبقات من الخلايا Over growth .

- **أختبار سمية المستخلص الفلافوتيدي لحبوب نبات الكلغان *Silybum malianum* في نمو الخطوط الخلوية السرطانية والطبيعية .**

حضرت خمسة تراكيز مخففه وفقاً) من المستخلص وكالاتي : 1000 ,500 ، 125،250، 62.5 ،ml /mg واستخدمت انياً . جهز عالق الخلايا عن طريق معاملة وعاء الزرع النسيجي حجم 25 سم بمحلول التربسين /تربسين المعقم (20 مل من محلول التربسين ml100BPS: 10ml محلول الفرسين).

ثم مزج عالق الخلايا جيداً وتم نقل 0.2 الى صفر طبق معايرة الزرع النسيجي ذو القعر المسطح بأستعمال ماصة اوتوماتيكية دقيقة ، تركت الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م لمدة الى حيث التصاق الخلايا في الحفرة . تم التخلص من الوسط القديم في الحفرة ، واضيف 0.2ml من التراكيز المحضرة سابقاً من المستخلص وبواقع 3 مكررات لكل تركيز ، فضلاً عن مكررات السيطرة (وسط زرعي فقط) .

حضنت الاطباق بدرجة جرارة 37 م . بعد مرور مدة التعريض المحدد للحضن (24 ، 48) ساعة للخطين السرطانيه Hela , AMGM و48 ساعة للخط الخلوي الطبيعي MEF اخرج الطبق من الحاضنة وأزيل الوسط الزرعي اضيف له محلول صبغة البنفسج البلوري (200 D.W 1: formalin 50 ml : methanol ml) للحفر الخلوية على الخلايا جميعاً وبحجم 0.2 مايكروليتر وغسلت الخلايا بالماء المقطر لحين زوال الصبغة ، ثم تجفف الاطباق لتهيئتها للقراءة بواسطة جهاز الاليزا بطول موجي 492 نانوميتر .

يتم تحويل قيم التأثير السمي للمستخلص لنبات الكلغان في الخوط الخلوية الى النسب المؤية ووفق الشكل الاتي :

النسبة المؤية لحيوية الخلايا = قراءة امتصاصية الخلايا المعاملة لكل تركيز / خلايا السيطرة * 1000

- **التحليل الاحصائي :**

اجري تحليل البيانات بأستعمال جدول تحليل ANova table وطريقة one way classification وجري اختبار المتوسطات بأستعمال اختبار LSD h, lhdsln hojfhv T-test البرنامج الاحصائي SAS لتحليل البيانات (17).

صورة *(1)* توضح اختبار *TLC* للمستخلص الفلافونويدي لحبوب الكلغان ومقارنته مع المركب القياسي

النتائج:

تأثير الفلافونويدي على الخطوط الخلوية السرطانية (*Hela , AMGM*) خلال مدتي التعريض *24* و *48* ساعة

ظهر التأثير السمي للمستخلص الفلافونويدي في الخط الخلوي السرطاني AMGM لجمع التراكيز المستخدمة من التركيز 1000µg - 62.5 - وبينت النتائج اعلى التراكيز العالية كانت اكثر سمياً وتثبيطاً في التراكيز العالية لمدتي التعريض 24 و 48 ساعة وبفرق معنوي بمستوى احتمالية P≤0.05 بالمقارنة مع السيطرة.

ولم يظهر تباين في التأثير السمي فيما بين التراكيز المستخدمة ومدة التعريض وبدلالة معنوية بمستوى احتمالية P≤0.05 الجدول 1 وهذه الحالة تسمى بظاهرة Dose and Time dependant اي كلما زاد التركيز ومدة التعريض تزداد نسبة تثبيط الخلايا.

جدول *(1)* التأثير السمي لتراكيز مختلفة من المستخلص الفلافونويدي لحبوب نبات الكلغان في خط خلايا سرطان الدماغ *AMGM* لمدتي التعريض *24* و *48* ساعة

التراكيز µg/ml	امتصاصية الخلايا للخط الخلوي السرطاني AMGM (المتوسطات ± الخطأ القياسي)	
	24 ساعة	48 ساعة
0	0.008±0.086 ab A	0.01±0.85 aA
1000	0.002±0.052 CA	0.003±0.051 bA
500	0.003±0.062 abc A	0.002±0.055 bA
250	0.001±0.081 bcA	0.002±0.058 bB
125	0.083±0.002 bcA	0.060±0.002 dB
62.5	0.006±0.79 aA	0.01±0.065 dA

الحروف الكبيرة المختلفة افقياً تشير الى وجود اختلافات بين فترات بمستوى احتمال *P≤0.01* اما الحروف الصغيره المختلفة تشير الى وجود اختلافات بين المعاملات والسيطره بمستوى احتمالية *P≤0.01*

اما بالنسبة الى الخط الخلوي السرطاني Hela ايضاً اعتمد التأثير السمي على زيادة مدة التعريض ، كلما زادت مدة التعريض زادت نسبة التثبيط كذلك بينت النتائج ان التراكيز الواطئة 62.5 µg ml كانت اكثر نسبة تثبيط للخلايا من التراكز العالية المستخدمة /1000µg ml لمدتي التعريض 24, 48 ساعة وبفرق معنوي بمستوى احتمالية P≤0.05 بالمقارنة مع السيطرة (الجدول2).

جدول *(2)* التأثير السمي لتراكيز مختلفة من المستخلص الفلافونويدي لحبوب نبات الكلغان في خط خلايا سرطان عنق الرحم *Hala cell* لمدتي التعريض *24* و *48* ساعة

التراكيز µg/ml	امتصاصية الخلايا للخط الخلوي السرطاني Hela (المتوسطات ± الخطأ القياسي)	
	24 ساعة	48 ساعة
0	0.007±0.479 aA	0.02±0.41 aA
1000	0.009±0.15 bA	0.01±0.23 bA
500	0.03±0.27 bA	0.02±0.31 bA
250	0.01±0.24 aA	0.01±0.32 bA
125	0.169±0.02 aA	0.139±0.01 bB
62.5	0.24±0.059 aA	0.003±0.06 Ab A

الحروف الكبيرة المختلفة افقياً تشير الى وجود اختلافات بين فترات بمستوى احتمال *P≤0.01* اما الحروف الصغيره المختلفة تشير الى وجود اختلافات بين المعاملات والسيطره بمستوى احتمالية *P≤0.01*

التأثير السمي لتراكيز مختلفة من المستخلص الفلافونويدي في الخط الخلوي الطبيعي *MEF*

لم يظهر اي تأثير سمي عالي للمستخلص في الخط الخلوي الطبيعي عدا التركيز العالي المستخدم 1000mg/ml ، فقد وصلت اعلى نسبة تثبيط لها 43%و بنسبة حيوية الخلايا 66% اما بقية التراكيز المستخدمة فقد كانت نسبة التثبيط واطئة جداً ، كما لم يظهر تباين في التراكيز السمي فيما بينت التراكيز المستخدمة والسيطرة عدا التراكيز العالي 1000µg/ml وبدلالة معنوية بمستوى احتمالية P≤0.05 .

جدول *(3)* التأثير السمي لتراكيز مختلفة من المستخلص الفلافونويدي لحبوب نبات الكلغان في الخط الخلوي الطبيعي *MEF* لمدة التعريض *48* ساعة

امتصاصية الخلايا للخط الخلوي الطبيعي MEF(المتوسطات ± الخطأ الفياسي) التراكيزµg/ml					
62.5	125	250	500	1000	0
0.97±0.01 a	0.099±0.006 a	0.88±0.003 Ab	0.086±0.003 Ab	0.06±0.003 B	0.11±0.005 A

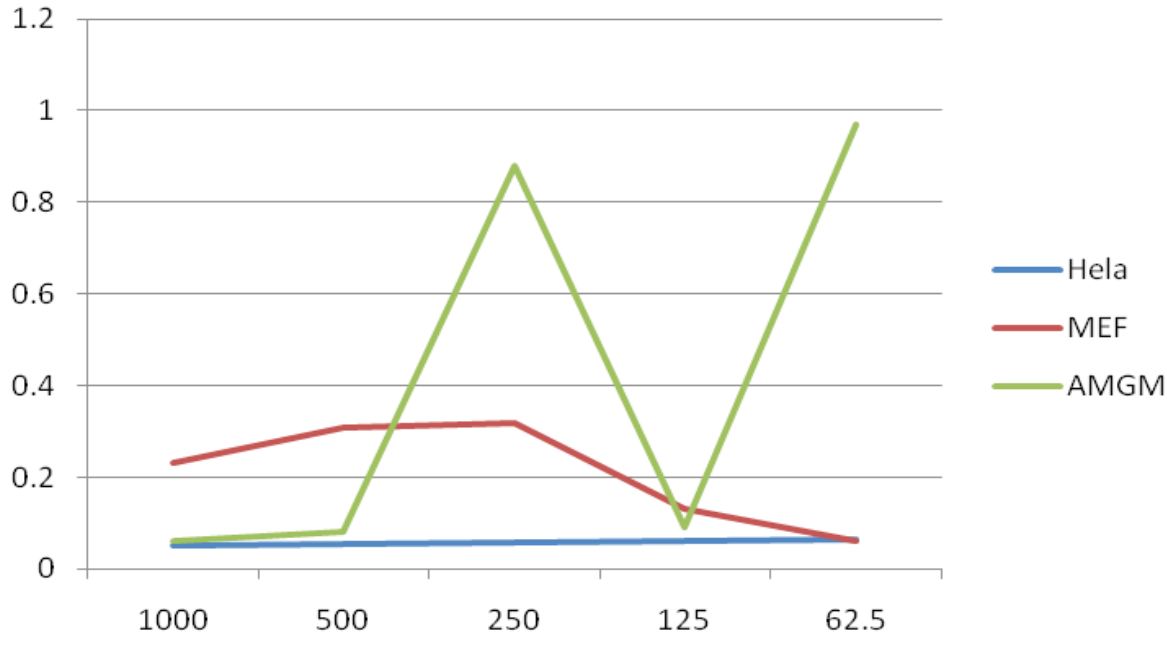
الحروف المختلفة تشير الى وجود اختلافات بين المعاملات والسيطره بمستوى احتمالية *P≤0.01*

المقارنة بين الخطوط الخلوية السرطانية *(Hela , AMGM)* والخط الخلوي الطبيعي *(MEF)* لمدة التعريض *48* ساعة

اظهرت النتائج وجود فروق معنوية بمستوى احتمالية P≤0.05 للمستخلص في نمو الخطوط الخلوية السرطانية AMGM وHela والخط االخلوي الطبيعي MEF خلال مدة التعريض 48 ساعة.

عند المقارنة بين الخطوط الخلوية الثلاثة (, MEF , Hela AMGM) اظهرت النتائج وجود فروق معنوية بين الخطوط الخلوية في حين شدة التأثير السمي ، فكان التأثير واضح على الخط الخلوي االسرطاني AMGM عند التراكيز المستخدمة جميعاً وخاصة التراكيز العالية اما الخط الخلوي السرطاني Hela فقد اظهرت النتائج وجود فروق معنوية عالية عند التراكيز الواطئة 62.5 – 125 µg/ml فقد كانت نسبة التثبيط تتراوح بين 66-93% .

اما الخط الخلوي الطبيعي ،فلم يظهر تأثير سمي واضح على التراكيز المستخدمة عدا التركيز العالي فقط 1000 mg/ml فقد وصلت فيه نسبة التثبيط 34% بينما التراكيز الاخرى فقد كانت نسبة التثبيط واطئة مقارنة مع الخطوط الخلوية السرطانية الاخرى بمستوى احتمالية P≤0.05 ،الشكل (1) من خلال المقارنة مابين الخطوط الخلوية الثلاثة ، ان اكثر الخطوط سمياً وتثبيطاً هو الخط الخلوي السرطاني Hela يليه الخط الخلوي السرطاني AMGM وأقلهم تثبيطاً وتأثيراً هو الخط الخلوي الطبيعي MEF .



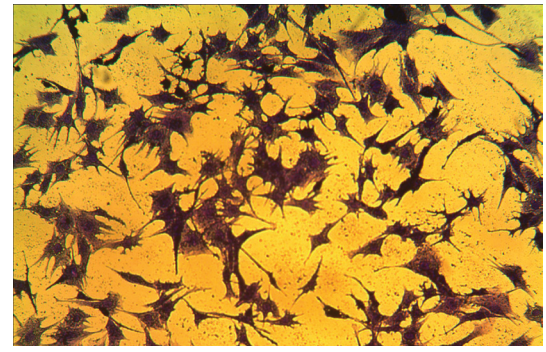
شكل *(1)* التأثير السمي للمستخلص الفلافونويدي في الخطوط الخلوية السرطانية والطبيعية لمدة تعريض *48* ساعة

الفحص الخلوي *Cytological examination* :

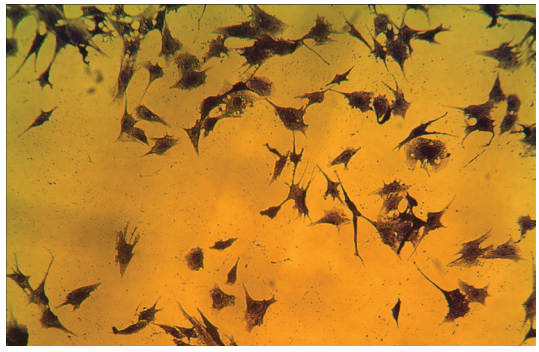
اظهرت خلايا السيطرة السرطانية والطبيعية غير المعرضة محافظة على شكلها الخلوي المتغاير Cellular pleomorphsim يسود الشكل الطلائي متعدد الاضلاع فيها epithelial polygonal cell للخط الخلوي السرطاني Hela و الشكل النجمي للخط الخلوي السرطاني AMGM والشكل المغزلي الشبيه بمولد الالياف Fibroblast للخط الخلوي الطبيعيMEF(الصورة 2 و 4 و 6).

عند حضن المستخلص لمدة 48 ساعة لوحظ تفجي السايتوبلازم وحدوث تنخر في الخلايا Necrosis وقلة في عدد الخلايا بظهور فراغات واسعة بين طبقة الخلايا الاحادية لكلا الخطين السرطانيين (الصورة 3 و5).

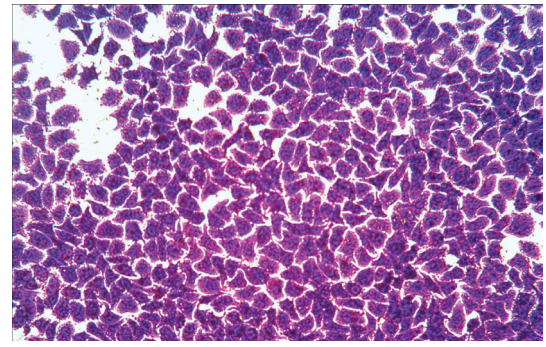
بينما عند حضن الخلايا الطبيعية MEF بالمستخلص لوحظ تاثر الخلايا بشكل بسيط بظهور قلة في عدد الخلايا(الصورة 7).



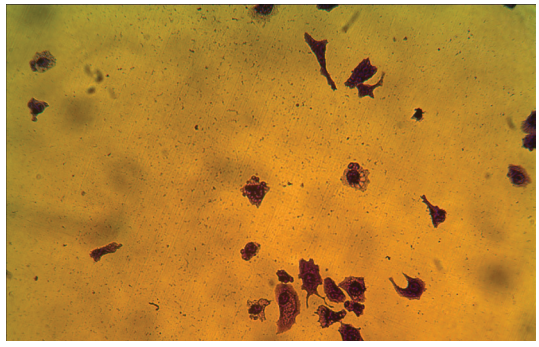
صورة (2) الطبقة الاحادية الكاملة لخط خلايا سرطان الدماغ غير المعرضة للمستخلص (السيطرة) *(Crystal violate 100x)*



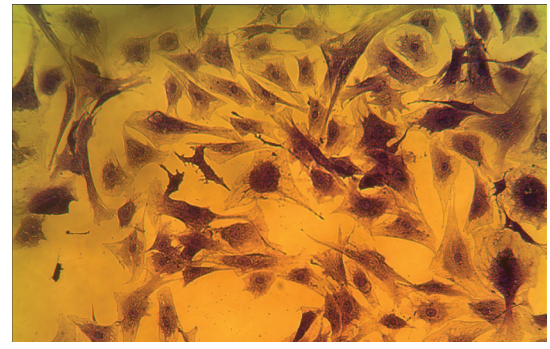
صورة (3) تمثل الطبقة غير الاحادية لخط خلايا سرطان الدماغ تتميز بتنخر الخلايا وفقدان التصاق الخلايا وقلة في عددها لمدة 48 ساعة *(Crystal violate 100x)*



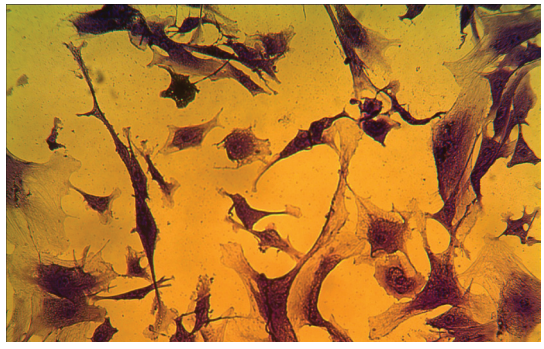
صورة (4) الطبقة الاحادية الكاملة لخط خلايا *Hela* غير المعرضة للمستخلص (السيطرة) *(Crystal violate 100x)*



صورة (5) تمثل الطبقة غير الاحادية لخط خلايا *Hela* تتميز بتفجي السايتوبلازم وفقدان (قلة كبيرة في عدد الخلايا لمدة 48 ساعة) *(Crystal violate 100x)*



صورة (6) الطبقة الاحادية الكاملة لخط خلايا *MEF* غير المعرضة للمستخلص (السيطرة) *(Crystal violate 100x)*



صورة (7) تمثل الطبقة غير الاحادية لخط خلايا *MEF* تتميز فقط في قلة بسيطة في عدد الخلايا لمدة 48 ساعة) *(Crystal violate 100x)*

المناقشة :

اوضحت النتائج ظهور تأثيرات سمية عالية ولجميع التراكيز المستخدمة ولكلا فترتي الحضن (24،48) ساعة. للخطين Hela AMGM , عند استخدام التراكيز العالية بالنسبة للخط الخلوي السرطاني لسرطان الدماغ فقد اعتمد التاثير التثبيطي على عامل الوقت والجرعة, اي كلما زاد التركيز والوقت زادت نسبو تثبيط الخلايا هذة الظاهرة سميت بظاهرة الاعتماد على الجرعة والوقت Dose and Time dependant phenomenon وهذه الحالة تؤكد لما جاء به(Katiyar) فقد وجد ان مركب السليمارين احد المركبات الفلافونويدية له تاثير واضح في الخط الخلوي السرطاني Lymphoma 4-939 فقد اعتمد التاثير على عامل الوقت والتركيز(18). بينما عند الخط الخلوي السرطاني Hela فقد اعتمد التاثير السمي على عامل الوقت فقط, اي بزيادة مدة التعريض يزداد التاثير السمي كما لوحظ عند هذا الخط ان التراكيز الواطئة اكثر سميتا من التراكيز العالية, قد يعود السبب الى تحرر مركبات معينة عند تخفيف التراكيز قد يكون لها تاثير تثبيطي عالي(19).

كما فسر (19) ان المستخلص الزيتي لحبوب الكلغان في الخطوط الخلوية السرطانية لسرطان الحنجرة hep-2 والغدة اللبنية AMN-3وسرطان العظلو البشري RD ان الجرعات الواطئة كانت لها تأثير سمي واضح أضافة الى ذلك عامل الوقت الذي كان له تأثير واضح حيث يلاحظ عند زيارة وقت تعريض الخلايا للمستخلص تزداد نسبة التثبيط كما وجد(20) في دراستهم للتأثير التثبيطي لمركب الـ Silymarin المعزوله من حبوب نبات الكلغان في الخط الخلوي السرطاني (Preneoplastic epidermal cell line (JB694 اعتمد التأثير السمي على مدة التعريض Time exposure وربما تعزى الفعالية السامة للمستخلص الفلافونويدي لنبات الكلغان في الخطين المستخدمين في التجربة الى احتواء النبات على عدد مركبات فلافونويدي ومنها Silymarin والـ Silibinin و qnercetin و Kaempferol و Apvgeni و genestin وغيرها من المركبات الفلافونويدي التي اثبتت عدة ابحاث فعاليتها المضادة للأورام وللألتهابات والاكسدة (5) .

كذلك وجدت فعالية مضادة للسرطان ومضاد للاكسدة لمركب السيمارين Silymarin المعزولة وحبوب الكلغان وايزوميرات (Silibinin , Silyshristn, Silydiam , isosilybin) وبالتحديد الخطوط السرطانية لسرطان البروستات Dulus, LNCap وسرطان الثدي MCF وسرطان الرئة A5u9 وسرطان الدم Leukemia KS62 وسرطان الكبد (hepatoma HuH7 cells 21) .

كما وجدت فعالية مضادة للسرطان من خلال حث الخلايا نحو الموت المبرمج وتوقف دورة الخلية بمرحلة G1وتوقف وتثبيط نمو للخطين الخلوي السرطانين لسرطان البروستات & LNCaP 22RV1 cells ايزوميرات المركب الفلافونويدي Silymarin وهي Isosilybin B & A وذلك عند استخدام التراكيز 10-9µm ولمدة تعريض 48,24 ساعة ، حيث اعتمد التأثير السمي على الجرعة والوقت في التثبيط اي بزيادة مدة التعريض وشدة التركيز تزداد نسبة تثبي الخلايا المعاملة(22). كما يعمل مركب ال Silibinin على حث خلايا سرطان الكبد Hepatocellular وسرطان الثدي Abcg2 , Bcrp نحو الموت المبرمج وتثبيط الاوعية الدموية الجديدة Angiogenesis التي تغذي الاورام السرطانية وذلك عند استحدام التراكيز 180-10 مايكرومولاري 23) Micromalar) .

كما تعمل بعض انواع الفلافونويدات الاخرى مثل quercetin , Kaempferol على حث خلايا سرطان البروستات LNCap cells نحو الموت المبرمج وتثبيط نحو الخلايا وذلك عند استخدام المستخلص بتراكيز مختلفة واكثرها تثبيطاً التركيز 10) SOmM) .

كما ان فعالية مركب الـ qnercetin الذي يعمل كمضاد للسرطان للخطين االخلويين السرطانيين Two- human breast (Mcf-7) ZR-72-1 adenocarcinome cell lines وذلك عند استخدام بتركيز 50µm ولمدة تعريض 2و4و6و8 ساعة (24). وكذلك في دراسة السمية الخلوية لمركب Taxifolin احد مركبات الفلافونويد في الخط الخلوي السرطاني لسرطان القولون Caco-2 لمدة 48 ساعة وبتراكيز تتراوح بين 200-1000um اذ يعمل هذا المركب في تثبي نمو وتكاثر الخط الخلوي السرطاني(11).

المصادر:

1. Wanger , H. ; Seligman , O. ; Horhammer , L. and Munster , R. 1968. the chemistry of silymarin (silybin) , the active principle of the fruit of silybum marianum (L.) Gaertn . (Carduns marianus) (L.) Arzneimitteforsch. 18 , 688-696.
2. Wanger , H. ; Diesel , P. and Seitz , M. 1974. chemistry and Analysis of silymarin from silynm marianum (L.) Gaertn. Arzneimittel forsch . 24 , 466-471.
3. Hasanloo, T.and Kharari – Nejab , A.R. 2005.Analysis of flavonolignans in dried fruits of silybum marianum (L.) geatn from Iran . Journal of biological sciences , 8 (12) : 1778-1782.
4. Radjabian , T. Rezaaadeh , SH . and Huseini , F. 2008. Analysis of silymarin components in the seed extracts of some milk thistle ecotypes from Iran by HPLC. Iranian Journal of science and technology , 32 (2) :141-146.
5. Tumova , J. ; Rimakova , J. and Dusek , J. 2006 . Silybum marianum *in vitro* – Flavonolignan production . plant soil environ , 52(10) :454-458 .
6. Birt , D. F. ; Hendrich , S. and Wang , W. 2001 . Dietary agents in cancer prevention : Flavonoid and isoflavonoids . J. pharmacology and therapeutics , 90 . 157 – 177.
7. Hadaruga , D. I. and Hadaruga , N. G. 2009 . Antioxidat activity of hepatoprotective Silymarin and Silybum marianum L. Extract. Chem. . Bull . 54 (68) , 2 :104 – 107.
8. Zhang, S. ; Yang , X. and Morris , M. E. 2004. Flavonoids are inhibitors of breast concer resistance protin (ABCG2) – Mediated transport . Mol pharmacol . 65(5) :1208 – 1216.
9. Ackland , ML. ; Vande , W.S. and Jones , R. 2005 . Synergisties antiproliferative of the flavonols qnercetin and kaempferol cultured human cancer cell lines .PMID . 19 (1) :69 – 76.
10. Brusselman , K. ; Vorlix , R. ; Verhoeven , G. and Swinnen , J. V. 2005 . Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity . Journal of Biological chemistry , 250 (7) . pp 5636 – 5645.
11. Wang , X. ; Meng , M. Gao ; L. ; Liu , T. and Zeng , Q.X. 2009. permeation of estibin and Taxifolin in CaCo-2 cell and ther effects on the P-gP Journal of pharmaceutics 378(1):8.
12. Moktari , MJ. ; Motamed , N. and Shokrogzar , MA. 2008. Evaluation of Silibinin on the viability , Migration of Adhesion of the human prostate adeno carcinoma (Pc-3) cell line , cell Biol . Int . 32 (8) : 888-892.
13. Omidbaigi , R. and Nobakht , A. 2001. Nitrogen fertilizer affecting growth , seed yield and active substances of milk Tuistle (Silybum marianum) Journal of biological sciences 4 (11) : 1345 – 1349 . eitted by Varma . 1980.

14. Freshney , R . I. 2000 . Culture of animal cells : A manual for basic technique (4th ed) . Wiley – lasso A John wiley and sons , Inc . publication , New york , PP. 566.
15. Abdul – Majeed , M. R. 2000. Induction and characterization of SU – gy Plasmacytoma cell lines and its effect on mice immune response , Ph. D. Tn – Nahrain . University .
16. Betancur , G.L. A. ; Saez , J. ; Granados , H. ; Salazar , A . and Ossa , J. E. 1999 . Antitumor and antiviral activity of colombiam medicinal plant extract . Men . Inst . Oswaldo erez , 94 :531 – 535.
17. SAS , Statistical Analysis system , Users Guide . Statistical version 7th ed SAS . Inst . Inc . Carj . N. C. USA , 2004 .
18. Katiyar, S. K. Anshu, M. R. and Manjeshwar, S. B. 2005 Silymarin induces apoptosis primarily through a P53- dependent pathway involving Bcl-2/, cytochrome C release caspase activation. Mol cancer. 4:207-216.
19. سلمان ، اسراء صكر .2008. تأثير المستخلصات الخام لحبوب الكلغان Silybum marianum كلية ، رسالة ماجستير . على الخطوط الخلوية السرطانية والطبيعية
العلوم للبنات ، جامعة بغداد ، العراق .
20. Katiyar , S. k. 2005 . Silymarin and skin cancer preventation anti – inflammatory , antioxidant and immunodautory effect > Inc . J . Oncol , 26 : 169 – 176.
21. Rammasamy , K. and Agarwal , R. 2008 . Multitargeted tlerapy of cancer by silymarim . cancer letters 269 . 352-362.
22. Deep , G. ; Oberlies , N. H. ; Kroll , D. J. and Agarwal , R. 2007 . Isosilybin B and isosilybin A inhibit growth , induce G1 arrest and cause apoptosis in human prostate cancer LNCaP and 22Rvl cells. Carcinogenesis 28.7. 1533-1542.
23. Lah , J. J. ; Cui, W. and Hu , K- Q . 2007 . Effect and mechanisms of silibinin on human hepatoma cell lines . J. Gastrentat , 28 , 13 (40) : 5299 – 5305 .
24. Soria , E. A. ; Eynard , A. R. ; Quiroga , P. L. and Bongivanni G. A. 2007 . Differential effects of qurrcetin and Silymarin on arsenite – induced cytotoxicity in two human breast adenocarcinoma cell lines . life sciences . inc . 81 . 1397 – 1402 .

The Effect of Flavonoids on Cancer and Normal Cell Lines *invitro*

Isra'a S. Salmman*, Nahi Y. Yaseen, Aesar A. Ahmed**, Maeda H. Mohammad**, Zahraa R. Taha*, Hiba K. Shaker**, Ayman A. Hassan****

**College of Science for woman / Baghdad University*

***Iraqi Center for Cancer and Medical Genetics Research/ AL-Mustansiriya University*

Abstract :

This study was aimed to know the inhibitory effect of the flavonoid extract of Silybum marianum seeds on two of the cancer cell lines , human brain cancinoma(AMGM), human cervix uteri epitheloid carcinoma (Hela) and one normal cell line , Mouse embryonic fibroblast cell line (MEF). The concentration was (1000,500,250,125,62.5) µg/ml respectively with two exposure time (24 & 48) hours for the cancer cell lines and one exposure time (48) hr. for the normal one .

The results showed that flavonoids extract has obvious inhibitory effect on (human brain carcinoma & Hela) with ($P<0.05$) significantly in high concentration (1000) µg/ml the cellular density (obsorption) of human brain carcinoma was (0.052) with inhibitory ratio (39%) compared with control , At 48 hours exposure the density was (0.051) with inhibitory ratio (94%) compared with control , whereas the density in Hela was (0.059, 0.06) with inhibitory ratio85.7% and 86% respectively at 24 and 48 hr. exposure .

While the normal cell line showed no signification effect ($P<0.05$) for all brevious concentration except the high one (1000) µg/ml , whereas the density of MEF was (0.23), with inhibitory effect (34%) .

The result of this study has indicated ahighest inhibitory activity of the cancer cell lines for both AMGM & Hela .