



كلية التربية للعلوم الصرفة  
قسم علوم الحياة

تقييم التأثيرات السمية الخلوية والجزئية لمستخلص جذور نبات  
الشواغندا *Withania somnifera* L. المائي و الكحولي و عقار  
السيسبلاتين على التعبير الجيني لجيني *P53* و *PIK3CA* على خط  
خلايا سرطان القولون SW480 خارج الجسم الحي

أطروحة مقدمة الى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة/جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل  
درجة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة – علم الحيوان

كُتبت بواسطة

زينب عبد الامير مزهر احمد

بإشراف

أ.د. لقاء حسون صكبان

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ  
وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ

صَدَقَ اللَّهُ الْعَلِيُّ الْعَظِيمُ

سورة المجادلة: آية 11

# اهداء

الى من علمني الوقوف والشموخ ابي (رحمه الله واسكنه فسيح جناته)

الى امي التي فارقتنا بجسدها ولكنها ماتزال موجودة من خلال افعالها

وكلماتها (رحمها الله)

الى من وهبني الله نعمة وجوده في حياتي .... (زوجي الغالي)

الى سندي وعزي وفرحتي ووسامي اخوتي ... (حسن, عبد الباقي, ذوالفقار)

الى جميع من تلقيت منهم النصح والدعم والمساعدة .... (اهلي أصدقائي)

(اليكم اهدي ثمرة هذا الجهد المتواضع)

زينب

## شكر وتقدير

أحمد الله واشكره سبحانه وتعالى على توفيقه لي لإنجاز هذا العمل وأصلي واسلم على أشرف خلق الله محمد صلى الله عليه وعلى اله الطيبين الطاهرين.

يسرني أن اتقدم ببالغ شكري وتقديري إلى رئاسة جامعة كربلاء و الى السيدة الفاضلة عميد كلية التربية للعلوم الصرفة أ.د. حميدة عيدان سلمان التي كانت منارة للضوء في الاوقات العصيبة وعمادة كلية التربية للعلوم الصرفة ورئاسة قسم علوم الحياة وجميع اساتذة القسم المحترمين.

كما اتقدم بخالص امتناني الى مشرفتي الفاضلة أ.د. لقاء حسون صكبان التي علمتني كيفية الاعتماد على نفسي وكانت مصدر الهام الي بنصائحها وتوجيهاتها القيمة سائلة الله سبحانه و تعالى ان يمدّها بالصحة والعافية وعرفاً بالجميل أتقدم بخالص الشكر والتقدير الى جمع من قدم الدعم و المساعدة لي .

كما يسعني ان ادعو بالرحمة و المغفرة من الله سبحانه و تعالى الى الدكتور حامد ناجي عبيد الذي ساعدني في الجانب العملي .

زينب

## إقرار المشرف على الأطروحة

أشهد أن إعداد هذه الأطروحة الموسومة: (تقييم التأثيرات السمية الخلوية والجزئية لمستخلص جذور نبات الشواغندا *Withania somnifera* L. المائي و الكحولي و عفار السيسبلاتين على التعبير الجيني لجيني *P53* و *PIK3CA* على خط خلايا سرطان القولون SW480 خارج الجسم الحي) للطالبة (زينب عبد الامير مزهر) قد جرى تحت إشرافي في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة / علم الحيوان

التوقيع:

الاسم : د. لقاء حسون صكبان

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء

التاريخ : 2025 / /

## توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة إلى التوصية أعلاه من قبل الأستاذ المشرف، أحيل هذه الأطروحة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .

التوقيع:

الاسم : د. علاء حسين مهدي الصافي


المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان : كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء

التاريخ: 2025 / 9 / 8

## إقرار المقوم اللغوي

أشهد أن هذه الأطروحة الموسومة (تقييم التأثيرات السمية الخلوية والجزيئية لمستخلص جذور نبات الشواغندا *Withania somnifera* L. المائي والكحولي وعقار السيسبلاتين على التعبير الجيني لجيني P53 و PIK3CA على خط خلايا سرطان القولون SW480 خارج الجسم الحي) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الأطروحة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

  
التوقيع: د. خالد عبد السيد عبد الوهاب  
الاسم: د. خالد عبد السيد عبد الوهاب  
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد  
مكان العمل: كلية العلوم، جامعة القاهرة  
التاريخ: 2025 / /

## إقرار المقوم العلمي الأول

أشهد أن هذه الأطروحة الموسومة (تقييم التأثيرات السمية الخلوية والجزيئية لمستخلص جذور نبات الشواغندا *Withania somnifera* L. المائي والكحولي وعقار السييسبلاتين على التعبير الجيني لجيني *P53* و *PIK3CA* على خط خلايا سرطان القولون **SW480** خارج الجسم الحي) ، في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء ، بأنه قد تمت مراجعتها من الناحية العلمية وقومت علمياً بالتقارير المرفقة وبذلك أصبحت مؤهلة للمناقشة.

التوقيع:

الاسم : د. حيدر تركي موسى

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: جامعة القاسم الخضراء - كلية التقانات الاحيائية

التاريخ: 2025/ /

## إقرار المقوم العلمي الثاني

أشهد أن هذه الأطروحة الموسومة (تقييم التأثيرات السمية الخلوية والجزيئية لمستخلص جذور نبات الشواغندا *Withania somnifera* L. المائي والكحولي وعقار السييسبلاتين على التعبير الجيني لجيني *P53* و *PIK3CA* على خط خلايا سرطان القولون **SW480** خارج الجسم الحي) ، في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء ، بأنه قد تمت مراجعتها من الناحية العلمية وقومت علمياً بالتقارير المرفقة وبذلك أصبحت مؤهلة للمناقشة.

التوقيع:

الاسم : د. رضية نجم عبد

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد


العنوان: جامعة كربلاء - كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ: 2025/ /

## إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة الموقعين ادناه نشهد بأننا قد اطلعنا على الأطروحة الموسومة (تقييم التأثيرات السمية الخلوية والجزيئية لمستخلص جذور نبات الشواغندا *Withania somnifera* L. المائي والكحولي و عفار السيسبلاتين على التعبير الجيني لجيني *P53* و *PIK3CA* على خط خلايا سرطان القولون SW480 خارج الجسم الحي) المقدمة من قبل الطالبة (زينب عبد الأمير مزهر احمد) كجزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة / علم الوراثة ، وبعد اجراء المناقشة العلنية وجد انه مستوفية لمتطلبات الشهادة وعليه نوصي بقبول الأطروحة بتقدير (امتياز).

عضو اللجنة

التوقيع:   
الاسم : د. رنا اياد غالب  
المرتبة العلمية: أستاذ  
العنوان: جامعة بابل - كلية الطب  
التاريخ: 2025 / 1 / 1

رئيس لجنة المناقشة

التوقيع:   
الاسم: د. باسم خضر خلف  
المرتبة العلمية: أستاذ  
العنوان: جامعة كربلاء - كلية التربية للعلوم الصرفة  
التاريخ: 2025 / 1 / 1

عضو اللجنة

التوقيع:   
الاسم: د. حيدر علي محمد  
المرتبة العلمية: أستاذ  
العنوان: جامعة كربلاء - كلية الطب البيطري  
التاريخ: 2025 / 1 / 1

عضو اللجنة

التوقيع:   
الاسم: د. مصطفى نهاد جمعة  
المرتبة العلمية: أستاذ  
العنوان: جامعة الأنبار - كلية العلوم  
التاريخ: 2025 / 1 / 1

عضوا ومشرفا

التوقيع:   
الاسم : د.لقاء حسون صكبان  
المرتبة العلمية: أستاذ  
العنوان: جامعة كربلاء - كلية التربية للعلوم الصرفة  
التاريخ: 2025 / 1 / 1

عضو اللجنة

التوقيع:   
الاسم : د.زينب نزار جواد  
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد  
العنوان: جامعة كربلاء - كلية التربية للعلوم الصرفة  
التاريخ: 2025 / 1 / 1

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة  
اصداق على ما جاء في قرار اللجنة اعلاه

التوقيع:   
الاسم: د.حميدة عيدان سلمان  
المرتبة العلمية: أستاذ  
العنوان: جامعة كربلاء - كلية التربية للعلوم الصرفة  
التاريخ: 2025 / 1 / 1

## الخلاصة:

أُجريت هذه الدراسة خلال الفترة من شهر شباط 2024 ولغاية شهر كانون الثاني 2025 في شركة روافد العلوم للتدريب والتطوير البحثي ومختبر UGENE في محافظة بابل ، تم الكشف الكمي عن المجاميع الفعالة لجذور نبات *Withania somnifer* باستخدام تحليل High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ، اظهرت نتائج تحليل (HPLC) وجود المجاميع فعالة في مستخلص جذور نبات الأشواغندا شملت كل من القلويدات والكلايكوسيدات والتربينات والعناصر المعدنية بنسب اقل مقارنة مع المركبات الفينولية والفلافونيدات التي كانت بنسب عالية حيث بلغت نسبتها (198.0) و(114.5) mg / 100 gm على التوالي . وكذلك كانت نتائج تحليل Atomic Absorption Spectroscopy للعناصر الفعالة تشمل ( Fe,Cu, Mg , Zn and Mn ) توجد في النبات .

شملت الدراسة الحالية محورين الأول تضمن تقييم الفعالية السمية الخلوية للمستخلص المائي و الكحولي لجذور نبات الأشواغندا *Withania somnifera* لنمو خلايا خط سرطان القولون البشري (Sw480) ولفترة تعريض 48 ساعة خارج الجسم الحي *In vitro* وبالمقارنة مع تأثير عقار السسيلاتين Cisplatin بواسطة اختبار (MTT) 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (assay) على خلايا سرطان القولون البشري (Sw480) ، كما تم دراسة الفعل المشترك للمستخلصات جذور نبات الأشواغندا المائية والكحولية مع عقار Cisplatin بتركيز (15.6 µg/ ml) على النسبة المئوية لحيوية خلايا (Sw480) ولفترة تعريض 48 ساعة ، المحور الآخر من الدراسة شمل حساب التعبير الجيني لكل من جين *P53* و *PIK3CA* لخلايا سرطان (Sw480) بعد تعريضها للمستخلص المائي والكحولي لجذور نبات الأشواغندا لمدة 48 ساعة ، كذلك تقدير التعبير الجيني لجين *P53* و *PIK3CA* لخلايا سرطان (Sw480) بعد تعريضها لمزيج من المستخلص المائي والكحولي لجذور نبات الأشواغندا وعقار Cisplatin لمدة 48 ساعة .

تم قياس التأثير السمي الخلوي للمستخلص المائي والكحولي الأثيلي (70%) لجذور نبات الأشواغندا باستخدام ستة تراكيز نصفية (1000,500, 250, 125, 62.5, 31.2 µg/ ml)، أوضحت النتائج وجود أعلى نسبة مئوية للحيوية (IR) Inhibition Rate لخلايا سرطان القولون (Sw480) عند تعرضها للمستخلص المائي والتي بلغت 24.61% وبمستوى معنوي ( $P \leq 0.01$ ) قياساً بالسيطرة (الخلايا غير المعاملة بالمستخلص) ( $100.00 \pm 2.15$ ). أما عند معاملة الخلايا بالمستخلص الكحولي الذي كانت أكثر فعالية في تثبيط نمو الخلايا السرطانية ووصلت النسبة المئوية لحيوية الخلايا سرطان القولون (Sw480) الى ( $9.91 \pm 0.39$ )% عند التركيز (1000 µg / ml) أي النسبة المئوية للحيوية بلغت (

(90.09) وبمستوى معنوي عالي (  $P \leq 0.01$  ) عن التراكيز الأخرى المستخدمة ومعاملة السيطرة (100.00  $\pm 2.15$ ).

عند معاملة خلايا (Sw480) بعقار Cisplatin حيث لوحظ أن للعقار تأثير كبير على حيوية الخلايا السرطانية الـ (Sw480) ) ولكافة التراكيز المستعملة وبفترة تعريض 48 ساعة وبفارق معنوي ( $P \leq 0.01$ ) حيث وصلت النسبة المئوية لحيوية الخلايا (Sw480) إلى ( $39.16 \pm 2.50$ ) % عند أعلى تركيز مستعمل 1000  $\mu\text{g/ml}$  في حين بلغت النسبة المئوية لحيوية خلايا (Sw480) ( $18.24 \pm 1.44$ ) % عند أقل التركيز (  $31.25 \mu\text{g/ml}$  ) وهناك اختلاف تدريجي طفيف لحيوية الخلايا ما بين التراكيز الأخرى.

اظهرت نتائج الدراسة الجزيئية التي تضمنت قياس مستوى التعبير الجيني لـ *PIK3CA* لخلايا (Sw480) عند معاملتها بالمستخلص المائي لجذور نبات الأشواغندا لمدة 48 ساعة، إذ ظهرت زيادة معنوية وبلغت قيمة التعبير الجيني ( $363.3 \pm 3.561$ ) % عند أقل التراكيز المستخدمة ( $31.25 \mu\text{g/ml}$ ) مقابل ( $1.000 \pm 0.0$ ) % قيمة التعبير الجيني لجين السيطرة *GAPDH*، أما عند قياس مستوى التعبير الجيني لـ *P53* عند معاملة خلايا سرطان القولون البشري (Sw480) بالمستخلص المائي لجذور نبات الأشواغندا والذي وصلت إلى ( $98.36 \pm 0.9642$ ) % عند التركيز ( $31.25 \mu\text{g/ml}$ ) مقابل ( $1.000 \pm 0.0$ ) % قيمة التعبير الجيني لجين السيطرة *GAPDH* )

اما عند استخدام المستخلص الكحولي فأشارت النتائج ان أعلى نسبة لمستوى التعبير الجيني لـ *PIK3CA* في خلايا (Sw480) بلغ ( $363.3 \pm 3.561$ ) % عند التركيز ( $31.25 \mu\text{g/ml}$ ) وعند مستوى معنوية عالية ( $P \leq 0.0001$ ) ، في حين سجلت أعلى نسبة للتعبير الجيني عند نفس المستخلص للجين *P53* والتي بلغت ( $130.7 \pm 1.281$ ) % عند التركيز ( $1000 \mu\text{g/ml}$ ) عند مستوى معنوية ( $P \leq 0.0001$ ) مقابل ( $1.000 \pm 0.0$ ) % قيمة التعبير الجيني لجين السيطرة *GAPDH*.

بينت نتائج التعبير الجيني لـ *PIK3CA* عند معاملة خلايا سرطان القولون البشري (Sw480) بعقار Cisplatin بتركيز 15.6  $\mu\text{g/ml}$  اذ وصلت كانت اعلى نسبة للتعبير الجيني إلى ( $100.1 \pm 0.9810$ ) % في حين ظهر أعلى مستوى لقيمة التعبير الجيني لجين الـ *P53* عند معاملة الخلايا بعقار Cisplatin كانت ( $299.2 \pm 4.400$ ) % عند التركيز ( $62.5 \mu\text{g/ml}$ ) وعند مستوى معنوية ( $P \leq 0.0001$ ).

كشفت نتائج الفعل المشترك بين المستخلص المائي لجذور نبات الشواغندا مع عقار Cisplatin بتركيز (15.6 µg/ml) أن أعلى نسبة للتعبير الجيني لـ *PIK3CA* بلغت (190.0 ± 0.9313) % عند التركيز (1000 µg/ml) في حين كان الفعل المشترك بين المستخلص المائي وعقار الـ Cisplatin أعطى أعلى نسبة للتعبير الجيني لـ *P53* (200.9 ± 1.969) % عند التركيز (250µg/ml). أما نتائج المستخلص الكحولي مع عقار الـ Cisplatin كانت أعلى نسبة للتعبير الجيني لـ *PIK3CA* (236.4 ± 4.635) % عند التركيز (62.5 µg/ml)، أما جين *P53* فكانت أعلى نسبة للتعبير الجيني هي (319.6±6.265) % عند التركيز (250µg\ ml) عند مستوى معنوية ( $P \leq 0.0001$ ) مقابل (1.000± 0.0) % قيمة التعبير الجيني لجين السيطرة *GAPDH*.

مما تقدم في الدراسة نستنتج أن المركبات الفعالة في جذور نبات الشواغندا *Withania somnifera* للمستخلص المائي والكحولي جعلت من النبات ذو سمية خلوية واضحة وكبيرة على خلايا خط سرطان القولون البشري (Sw480) وعلى النسبة المئوية لمستوى التعبير الجيني لكل من *PIK3CA* و *P53*، بالإضافة الى الفعل المشترك للمستخلصات النبات المائية والكحولية مع عقار Cisplatin والذي كان جعل من العقار يعطي نتائج افضل للسمية اتجاه خلايا (Sw480) بوساطة كل من النسبة المئوية لحيوية الخلايا أو مستوى التعبير الجيني لـ *PIK3CA* و *P53*

## قائمة المحتويات

رقم الصفحة	الموضوع	ت
I	الخلاصة	
IV	قائمة المحتويات	
IX	قائمة الجداول	
X	قائمة الاشكال	
XI	قائمة الصور	
XII	قائمة المختصرات	
3-1	<b>Introduction</b> الفصل الأول المقدمة	
1	Introduction المقدمة	1
3	The aim of study الهدف من الدراسة	1.1
4-34	<b>Literature Review</b> الفصل الثاني استعراض المراجع	
4	Literature Review استعراض المراجع	2
4	السرطان	1.2
6	The Role of Reactive Oxygen دور الجذور الحرة في السرطان Species in Cancer	1.1.2
7	انواع الجينات المرتبطة بالسرطان	2.1.2
9	التعبير الجيني للجينات المصابة في السرطان من الطفرة	3.1.2
10	دور الوراثة في السرطان	4.1.2
10	التعبير الجيني وتأثيره في السرطان	5.1.2
10	التداخل بين التعبير الحيني وآليات إصلاح الـDNA وطرق العلاج	6.1.2
10	أنواع محددة من السرطان	7.1.2
11	سرطان القولون	8.1.2
12	وبائية سرطان القولون	1.8.1.2
13	الأنواع الرئيسية لسرطان الجهاز الهضمي	2.8.1.2
14	The stages of colon cancer مراحل سرطان القولون	3.8.1.2
16	طرق العلاجات لسرطان القولون colon cancer	4.8.1.2
19	الأسس الجزيئية و الوراثة لسرطان القولون	5.8.1.2
19	جين <i>PIK3CA</i>	1.5.8.1.2

20	(TP53) Tumor protein p53 جين	2.5.8.1.2
22	النباتات الطبية	2.2
22	<i>Withania somnifera</i> (الأشواغندا) نبات الودانية	3.2
23	Description of the Plant الوصف العام للنبات	1.3.2
24	Common names and الاسماء الشائعة وتصنيف النبات Taxonomy	2.3.2
25	Chemical Composition of the Plant التركيب الكيميائي للنبات	3.3.2
27	الاستخدامات الطبية	4.3.2
32	Antioxidant Activity الفعالية المضادة للاكسدة	5.3.2
32	دور المستخلصات النباتية في رفع ROS لتفعيل موت الخلايا السرطانية	6.3.2
33	تدخل الأشواغندا ( <i>Withania somnifera</i> ) وآليات تثبيت p53	7.3.2
33	التأثير التآزرية بين العلاجات النباتية نبات الاشواغندا والعقاقير الكيميائية السيبيلاتين	8.3.2
<b>58-35</b>	<b>Materials and Methods الفصل الثالث/ المواد وطرائق العمل</b>	
53	Materials المواد	1.3
53	Biological and Chemicals المواد البيولوجية والكيميائية المستخدمة Materials	1.1.3
36	الأجهزة والمستلزمات المختبرية المستخدمة في الدراسة Laboratory Equipment and Supplies Used in the Study	2.1.3
37	عدة الفحص	3.1.3
38	طرائق العمل	2.3
38	جمع وتصنيف النبات	1.2.3
39	تصميم الدراسة study design	3.3
40	تحضير المحاليل والأوساط الزرع والصبغات	4.3
40	Solvents used for extraction المذيبات المستخدمة في الاستخلاص	1.4.3
40	Stock solutions for tissue المحاليل الخاصة بالزرع النسيجي culture	2.4.3
40	Antibiotics المضادات الحيوية	1.2.4.3
40	Sodium bicarbonate بيكاربونات الصوديوم	2.2.4.3
40	مصل البقر الجنيني	3.2.4.3
40	RPMI- 1640) Rosswell Park Memorial ( الوسيط الزرع Institute	4.2.4.3

41	محلول دارى الفوسفات الملحي ( pH 7.2) Phosphate buffer ) (Saline PBS)	5.2.4.3
41	الفيرسين Versene	6.2.4.3
41	محلول التربسين- فرسين Trypsin - Versene solution	7.2.4.3
41	الوسط الزراعي الخالي من المصل (SFM) Serum Free Media	8.2.4.3
42	تحضير صبغة Methyl Thiazolyl Tetrazolium (MTT )	9.2.4.3
42	محلول صبغة Crystal violet (CV)	10.2.4.3
42	اختبار Crystal Violet (CV)	11.2.4.3
42	تحضير مستخلصات (المائية والكحولية ) جذور نبات الأشواغندا <i>Withania somnifer</i>	5.3
42	تحضير المستخلص المائي لجذور نبات الاشواغندا	1.5.3
43	تحضير المستخلص الكحولي لجذور نبات الأشواغندا	2.5.3
43	الكشف الكيميائي (الكمي) للمركبات الفعالة للمستخلصات جذور نبات الأشواغندا <i>Withania somnifera</i> L	3.5.3
43	استخلاص نبات الشواغندا <i>Withania somnifera</i> L	1.3.5.3
43	كروماتوغرافيا السائل عالية الأداء (HPLC)	2.3.5.3
44	تقدير العناصر في النبات AAS الإمتصاص الذري الطيفي Atomic Absorption Spectroscopy	3.3.5.3
45	قياس مستوى المركبات الفينولية الكلية للنبات	4.3.5.3
46	قياس محتوى الفلافونويد الكلي	5.3.5.3
46	قياس محتوى القلويدات الكلي	6.3.5.3
48	قياس محتوى الجليكوسيدات الكلية	7.3.5.3
49	قياس وتقدير مركبات التربينات	8.3.5.3
50	اختبار السمية الخلوية بواسطة فحص MTT Cytotoxicity test by Assay MTT	6.3
51	الخط الخلوي لسرطان القولون البشري (SW480)	7. 3
53	دراسة تأثير المستخلصات المائية والكحولية لجذور نبات الاشواغندا على خلايا خط سرطان القولون البشري ( SW480 )	8. 3
54	الإدامة والمحافظة على الخطوط الخلوية Maintenance of cell lines	9.3
55	الدراسة الجزيئية	10. 3
55	تخليق الحمض النووي الريبي منقوص الاوكسجين DNA باستخدام مجموعة استخلاص الحمض النووي RNA	.1.10.3
55	تخليق cDNA باستخدام مجموعة AddScript	.2.10.3

56	تحضير البادئات primers	3.10.3
57	تفاعل البوليميراز المتسلسل (qRT-PCR)	4.10.3
58	اختبار التعبير الجيني بنظام GoTaq® RT-qPCR	5.10.3
58	التحليل الإحصائي	11.3
<b>58-101</b>	<b>الفصل الرابع/ النتائج والمناقشة</b>	
59	النتائج والمناقشة Results and Discussion	4
59	دراسة المركبات الكيميائية الفعالة لجذور نبات الأشواغندا <i>Withania somnifera</i>	1.4
61	التأثيرات السمية الخلوية لمستخلصات جذور نبات <i>Withania somnifera</i> الأشواغندا في خط سرطان القولون البشري (SW480)	2.4
62	تأثير المستخلص المائي لجذور نبات <i>Withania somnifera</i> لحيوية خلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد فترة التعريض 48 ساعة	1.2.4
65	تأثير المستخلص الكحولي لجذور نبات <i>Withania somnifera</i> على نسبة تثبيط خط خلايا سرطان القولون البشري SW480	2.2.4
68	دراسة مقارنة بين التأثير السمي للمستخلصات المائية والكحولية لجذور نبات الأشواغندا على خط خلايا سرطانية القولون SW480	3.2.4
72	تأثير عقار السيسبلاتين Cisplatin على النسبة المئوية لخلايا خط سرطان القولون البشري SW480 السمية الخلوية	3.4
74	تأثير المستخلص المائي لجذور نبات الشواغندا مع عقار السيسبلاتين Cisplatin بتركيز (15.6 µg/ml) على النسبة المئوية لحيوية خلايا خط سرطان القولون SW480 بعد تعريض 48 ساعة	1.3.4
77	تأثير المستخلص الكحولي لجذور نبات الشواغندا مع تركيز عقار السيسبلاتين Cisplatin (15.6) على النسبة المئوية لحيوية خلايا خط سرطان القولون SW480	2.3.4
79	دراسة مقارنة بين التأثير السمي للمستخلصات المائية والكحولية لجذور نبات الأشواغندا مع عقار السيسبلاتين Cisplatin على خط خلايا سرطان القولون SW480 بعد فترة تعريض 48 ساعة	3.3.4
83	لدراسة الجزيئية Genetic Study	4.4
83	تأثير مستخلصات جذور نبات الأشواغندا على التعبير الجيني لجين <i>P53</i> لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة	1.4.4
83	تأثير المستخلص المائي لجذور نبات الأشواغندا على التعبير الجيني لجين <i>P53</i>	1.1.4.4
84	تأثير المستخلص الكحولي لجذور نبات الأشواغندا على التعبير الجيني ل <i>P53</i> لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة	2.1.4.4

	48 ساعة	
86	تأثير عقار السيسبلاتين Cisplatin على التعبير الجيني لجين P53 لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة	2.4.4
87	تأثير المستخلص المائي لجذور نبات الاشواغندا مع عقار السيسبلاتين Cisplatin على التعبير الجيني لجين P53	1.2.4.4
89	تأثير المستخلص الكحولي لجذور نبات الاشواغندا مع عقار السيسبلاتين Cisplatin على التعبير الجيني لجين P53 في خلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة	2.2.4.4
91	تأثير المستخلصات لجذور نبات الاشواغندا على التعبير الجيني لجين PIK3CA لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة	3.4.4
91	تأثير المستخلص المائي لجذور نبات الأشواغندا على التعبير الجيني لجين PIK3CA	1.3.4.4
93	تأثير المستخلص الكحولي لجذور نبات الأشواغندا على التعبير الجيني لجين PIK3CA لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة	2.3.4.4
95	تأثير عقار السيسبلاتين Cisplatin على التعبير الجيني لجين PIK3CA لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة	.3.3.4.4
97	تأثير المستخلص المائي لجذور نبات الاشواغندا مع عقار السيسبلاتين Cisplatin على التعبير الجيني لجين PIK3CA لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة	4.3.4.4
99	تأثير المستخلص الكحولي لجذور نبات الاشواغندا مع عقار السيسبلاتين Cisplatin على التعبير الجيني لجين PIK3CA لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة	5.3.4.4
	الاستنتاجات والتوصيات	5
102	Conclusions الاستنتاجات	1.5
103	Recommendation التوصيات	.2.5
	المصادر	6
104	المصادر العربية	
105	المصادر الأجنبية	
143	الملحق	
a	الخلاصة باللغة الإنكليزية	

قائمة الجداول

رقم الصفحة	عنوان الجدول	رقم الجدول
31	الاستخدامات الطبية لنبات أشواغندا <i>Withania somnifera</i>	1-2
35	المواد البيولوجية والكيميائية المستخدمة تبعاً لاسم الشركة والمنشأ	1-3
36	الأجهزة المخبرية والأدوات المستخدمة في الدراسة مع الشركة المصنعة والمنشأ	2-3
37	عدة الفحص المستعملة تبعاً لاسم الشركة والمنشأ	3-3
40	مكونات الوسط الزراعي (RPMI- 1640)	4-3
56	المكونات تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR)	5-3
56	الظروف الدورة الحرارية لتصنيع cDNA	6-3
57	Primers المستخدمة في تجربة التعبير الجيني	7-3
57	محتويات عدة تفاعل PCR (Real-Time)	8-3
58	ظروف الحرارة المثلى لمراحل qRT-PCR على حسب نظام GoTaq® (RT-qPCR)	9-3
59	التقدير الكمي للمركبات الفعالة الموجودة في جذور نبات الأشواغندا <i>W. sominifera</i> بواسطة تحليل (HPLC)	A1-4
60	التقدير الكمي للعناصر الموجودة في جذور نبات الأشواغندا <i>W. sominifera</i> بواسطة تحليل (AAS)	B1-4
62	تأثير المستخلص المائي لجذور نبات الأشواغندا على النسبة المئوية على الخط خلايا سرطان القولون البشري بعد فترة التعريض 48 ساعة	2-4
66	تأثير مستخلص الكحولي لجذور نبات الأشواغندا على حيوية خط سرطان القولون ( <i>SW480</i> ) بعد التعريض 48 ساعة	3-4
69	مقارنة بين تأثير المستخلص (المائي والكحولي) على خط خلايا سرطان القولون البشري بعد فترة تعريض 48 ساعة	4-4
72	تأثير عقار سيسبلاتين Cisplatin بتركيز 15.6 على حيوية خط خلايا القولون البشري بعد فترة تعريض 48 ساعة	5-4
75	تأثير المستخلص المائي مع تركيز عقار Cisplatin (15.6) على حيوية خلايا سرطان القولون	6-4
78	تأثير المستخلص الكحولي مع تركيز عقار Cisplatin (15.6) على حيوية خلايا سرطان القولون	7-4
80	تأثير المستخلصات المائية والكحولية لجذور نبات الأشواغندا مع تركيز عقار Cisplatin (15.6) على حيوية خلايا سرطان القولون البشري	8-4

## قائمة الاشكال

رقم الصفحة	عنوان الشكل	رقم الشكل
39	تصميم التجربة	1-3
45	منحني القياسي لمركبات الفينولات	2-3
46	المنحني القياس القياسي لمركبات الفلافونويد - الكلية	3-3
48	المنحني القياسي لمركبات القلويدات الكلي	4-3
49	المنحني القياسي لمركبات الكلايكوسيدات الكلية	5-3
50	المنحني القياسي لمركبات التربينات	6-3
63	تأثير المستخلص المائي لجذور نبات <i>Withania somnifera</i> على النسبة المئوية لحيوية خلايا خط سرطان القولون البشري SW480 بعد فترة التعريض 48 ساعة	1-4
66	تأثير المستخلص الكحولي لجذور نبات <i>Withania somnifera</i> النسبة المئوية لحيوية خلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد فترة تعريض 48 ساعة	2-4
69	مقارنة تأثير المستخلص المائي والكحولي لجذور نبات <i>Withania somnifera</i> على نسبة المئوية لحيوية في خط خلايا سرطان القولون البشري SW480 بعد فترة تعريض 48 ساعة	3-4
73	اختبار تأثير عقار سيسبلاتين Cisplatin بتركيز 15.6 على حيوية النسبة المئوية لحيوية الخلايا الخط سرطان القولون البشري SW480 بعد فترة تعريض 48 ساعة	4-4
75	تأثير مستخلص المائي لجذور نبات الأشواغندا مع عقار السسبلاتين تركيز 15.6 على النسبة المئوية لحيوية خلايا خط سرطان القولون SW480 بعد فترة تعريض 48 ساعة	5-4
78	تأثير مستخلص الكحولي لجذور نبات الأشواغندا مع عقار السسبلاتين تركيز 15.6 على حيوية SW480 بعد فترة تعريض 48 ساعة	6-4
80	مقارنة بين التأثير السمي للمستخلصات المائية والكحولية لجذور نبات الأشواغندا مع عقار السيسبلاتين Cisplatin على خط خلايا سرطانية القولون SW480	7-4
83	التراكيز المستخدمة للمستخلص المائي لجذور النبات الأشواغندا وتأثيرها على قيمة التعبير الجيني لجين P53 ومقارنتها مع الجين السيطرة GAPDH	8-4
85	التراكيز المستخدمة للمستخلص الكحولي لجذور النبات الأشواغندا وتأثيرها على قيمة التعبير الجيني لجين P53 ومقارنتها مع الجين السيطرة (GAPDH)	9-4
86	التراكيز المستخدمة لعقار السيسبلاتين Cisplatin وتأثيرها على قيمة التعبير الجيني لجين P53 ومقارنته مع الجين السيطرة GAPDH	10-4
88	التراكيز المستخدمة للمستخلص المائي لجذور النبات الأشواغندا مع عقار السيسبلاتين Cisplatin وتأثيرها على قيمة التعبير الجيني لجين	11-4

	<b>P53 ومقارنتها مع جين السيطرة GAPDH</b>	
90	التراكيز المستخدمة لمستخلص الكحولي لجذور النبات الأشواغندا مع عقار السيسبلاتين Cisplatin وتأثيرها على قيمة التعبير الجيني لجين P53 ومقارنه مع جين السيطرة GAPDH	12-4
92	التراكيز المستخدمة للمستخلص المائي لجذور النبات الأشواغندا وتأثيرها على قيمة التعبير الجيني لجين PIK3CA ومقارنتها مع الجين السيطرة GAPDH	13-4
94	التراكيز المستخدمة للمستخلص الكحولي لجذور النبات الأشواغندا وتأثيرها على قيمة التعبير الجيني لجين PIK3CA ومقارنتها مع الجين السيطرة GAPDH	14-4
96	تأثير عقار السيسبلاتين Cisplatin على قيمة التعبير الجيني لجين PIK3CA ومقارنتها مع الجين السيطرة GAPDH	15-4
98	يوضح التراكيز المستخدمة للمستخلص المائي لجذور النبات الأشواغندا مع عقار السيسبلاتين Cisplatin وتأثيرها على قيمة التعبير الجيني لجين PIK3CA ومقارنتها مع الجين الكونترول ,	16-4
100	يوضح التراكيز المستخدمة للمستخلص الكحولي لجذور النبات الأشواغندا مع عقار السيسبلاتين Cisplatin وتأثيرها على قيمة التعبير الجيني لجين PIK3CA ومقارنتها مع الجين الكونترول	17-4

#### قائمة الصور

رقم الصفحة	عنوان الصورة	رقم الصورة
24	(A): نبات الأشواغندا <i>Withania somnifera</i> , B الجذور ومطحون الجذر (C) الازهار (D) الاوراق (E) الثمار	1-2
64	مقارنة لشكل خلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بين معاملة السيطرة والخلايا المعاملة بالمستخلص المائي لجذور نبات الأشواغندا عند التركيز (1000) $\mu\text{g/ml}$ بعد فترة التعريض 48 ساعة Crystal Violet,40X	1-4
68	مقارنة لخط سرطان القولون البشري (SW480) بين معاملة السيطرة والخلايا المعاملة بالمستخلص الكحولي لجذور نبات الأشواغندا عند التركيز 1000 $\mu\text{g/ml}$ بعد فترة تعريض 48 ساعة Crystal Violet,40X	2-4
71	مقارنة شكل خلايا خط سرطان القولون البشري SW480 بين معاملة السيطرة والخلايا المعاملة بالمستخلصات لجذور نبات الأشواغندا (المائية والكحولية) عند التركيز (1000) $\mu\text{g/ml}$ بعد مرور 48 ساعة (Crystal Violet,40X)	3-4

قائمة المختصرات

المختصر	المصطلح
μL	Microliter
μmol	micromole
AAS	Atomic Absorption Spectroscopy
AMPK	activated protein kinase
BCG	Bromocresol Green
CAM	Complementary Alternative Medicine
CAT	Catalase
cDNA	complementary-DNA
CV	Crystal Violet
DF	doconasyl ferulate
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylenediamine Tetra Acetic Acid
ELISA	Enzyme Link Immunosorbent Assay
FT-IR	Fourier transform infrared spectrometer
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GC-MS	Gas Chromatography-mass spectrometry
GI	Gastrointestinal Cancer
GPX	Glutathione Peroxidase
HPLC	High-performance liquid chromatography
IR	Inhibitory Rate
kg	Kilogram
L	Liter
mg	Milligram
ml	Millimeter
MTT	Methyl Thiazolyl Tetrazolium
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NGS	Next Generation Sequencing
nm	Nanometer
NSAIDs	nonsteroidal anti-inflammatory drugs
<i>P53</i>	Tumor Protein
PBS	Phosphate buffer Saline
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PD-L1	Programmed death-ligand 1

<i>PI3Ks</i>	Phosphoinositide 3-kinases
<i>PIK3CA</i>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
PPARs	peroxisome proliferator-activated receptors
qPCR	quantitative-PCR
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI- 1640	Rosswell Park Memorial Institute
SBRT	Stereotactic Body Radiotherapy
SFM	Serum Free Media
SOD	Superoxide Dismutase
SW480	human colorectal adenocarcinoma cell line
TP53	Tumor protein p53
U	Unit
WS	<i>Withania somnifera</i>

الفصل الأول

المقدمة

**Introduction**

## 1. المقدمة Introduction

السرطان هو ثاني أكبر سبب للوفاة، بعد أمراض القلب والأوعية الدموية يقتل السرطان حوالي 70% من وفيات السرطان تحدث في البلدان منخفضة ومتوسطة الدخل أي البلدان النامية (Cao *et al.*, 2020). ويمثل السرطان مجموع من الأمراض تصيب جميع أنحاء الجسم ويحدث بسبب الانقسام غير المنتظم ويكون قادر على الانتشار إلى باقي أنحاء الجسم وهذه الأمراض تسمى الأورام وتكون نوعين اما اورام حميدة benign Tumors وتكون موضعية أي لا تنتشر الى اماكن اخرى من الجسم او اورام سرطانية خبيثة Malign ant tumor وتكون قابلة للانتشار والسيطرة الى اماكن بعيدة من موقع الإصابة والتي تسبب تراكم الاضرار في الـ DNA مما يسبب حدوث طفرة Mutation (Preethi *al* ) ( *et.*, 2021 )

اعتبر سرطان القولون في عام 2020 ثالث أكثر الأورام الخبيثة شيوعاً والسبب الرئيسي الثاني للوفاة المرتبطة بالسرطان لدى كلا الجنسين (الذكور والإناث) والوفاة بالسرطان الأكثر في جميع أنحاء العالم كما يعتبر سرطان القولون النوع الأكثر شيوعاً من سرطان الجهاز الهضمي Gastrointestinal Cancer (Ervik *et al.*,2024; Ferlay *et al.*,2023)

لقد عرفت النباتات الطبية على نطاق واسع في جميع أنحاء العالم كمصدر رئيس لاكتشاف أدوية جديدة وتشكل جزءاً هاماً من الثقافي الآسيوية.تمتاز النباتات الطبية التي تنتج مجموعة متنوعة من المواد النشطة بيولوجيا ولها فوائد جمة على صحة الإنسان مما يجعلها مصدراً غنياً لمختلف أنواع الأدوية لتقليل التأثيرات الجانبية التي قد تسببها الادوية الكيمائية (World Health Organization (2023) .

نبات الأشواغندا (WS) (*Withania somnifera*) العائد للعائلة الباذنجانية (Solanaceae) يُعرف بأسم "الكرز الشتوي الهندي" أو "Indian Ginseng" ويزرع في جميع أنحاء المناطق الاستوائية القاحلة في أفريقيا ويمكن أن نجد هذه العشبة في العديد من المناطق الجنوبية والوسطى من العراق في محافظة البصرة (Dar *et al.*.,2015) ,لكونها تزرع في المناطق الجافة و الشبة جافة حيث وجد النبات مزروع في مناطق متعددة من محافظة بغداد ( Aljubory *et al.*,2017 ) .

كما يعد نبات الاشواغندا واحداً من أهم أعشاب الأيورفيدا (النظام التقليدي للطب في الهند) المستخدمة منذ آلاف السنين هذا النظام له تاريخ طويل ومنتشر على نطاق واسع لتحقيق أهدافها العلاجية، تستخدم هذه الطريقة العديد من المواد الطبيعية ومركبات بأشكال مختلفة (Tewari *et al.*,2022) .

يُستخدم جذر نبات الأشواغندا كمقوِّ عام للجسم وهذا يعني أنه يمكن أن يساعد الجسم القيام بفعالياته الاشواغندا المختلفة والمتنوعة بما في ذلك السيطرة على ارتفاع ضغط الدم والسكري والربو وتقوية جهاز المناعة وعلاج الأمراض العصبية وأمراض القلب والأوعية الدموية ( Paul et al., 2021 ) وأيضاً مضادات للأكسدة ومسكنات للألم ومضادات لنمو البكتيريا ومضادات للاورام ( Uthirapathy and Tahir ,2021) ويعد هذا النبات مشهي للطعام حيث يظهر العديد من الخصائص القيمة مثل الحفاظ على التوازن المناعي وتقليل الالتهاب وقمع السيتوكينات المؤيدة للالتهابات والتأثيرات الوقائية ومضادات الإجهاد (Shree et al.,2022).

ان مصادر بعض المركبات الثانوية مثل 12 أو أكثر من القلويدات و 40 withanolides والعديد من sitoindosides. إلى جانب ذلك، يشتمل النبات على عدد من المركبات الثانوية الأخرى، بما في ذلك flavonols glycosides و phenolics، و glycosides ، starch ، reducing sugar ) et (Saleem al.,2020)، ومجموعة متنوعة من الأحماض الأمينية بما في ذلك aspartic acid ,alanine ، tyrosine ، proline ، glycine ، glutamic acid ، cysteine و tryptophan وكمية كبيرة من الحديد كما تعد جذور الاشواغندا *Withania somnifera* أكثر الأجزاء في النبات باحتوائها على المركبات الثانوية لما تمتلكه من دور اساس ونشط كمضاد للأكسدة ومزيل للجذور الحرة ومن المركبات الايضية الثانوية التي توجد في جذور نبات الاشواغندا (Baghalpour et al., 2023).

اظهرت الدراسات القديمة والحديثة فعالية نبات الاشواغندا في تثبيط النشاط المسبب للسرطان وفي منع تطور مختلفة الاورام الخبيثة (Abadi et al .,2022; Ma et al., 2022) . حيث تم تحديد العديد من المواد الكيميائية الفعالة للنبات والمضادة للسرطان ( Banik et al.,2022 )

وقد أثبتت العديد من الدراسات إن مستخلصات أوراق أشواغندا المائية والكحولية كانت ذات خصائص مضادة للسرطان بشكل كبير والنشاط المضاد للانتشار، وموت الخلايا المبرمج في خطوط الخلايا السرطانية المختلفة وأنشطة مضادة للسرطان (Tewari et al.,2022) .

يعد السيسبلاتين Cisplatin من أهم العلاجات الكيميائية والأكثر استخداماً التي يستخدم لعلاج حالات السرطان المختلفة، إذ يعمل على إبطاء وتوقف نمو الخلايا السرطانية. يُستخدم سيسبلاتين في العادة إلى جانب أدوية أخرى وهو من الأدوية العلاج الكيميائي القائمة على البلاتين. ولكن لها آثاراً جانبية سامة ، ويمكن أن تصبح الأورام مقاومة لها.

تلعب الجينات دوراً فعالاً في الحد من انتشار السرطان أو تطوره مثل جين *PIK3CA* , *P53* اذ يعد الجين *P53* (حارس الجينوم) وهو من أهم الجينات الكابحة للورم والمسيطر على توازن الخلية (Shao and Schneider, 2025). في حين الجين *PIK3CA* يعطي الاوامر لصنع بروتين *p110 alpha* (*p110α*) *PIK3CA* وله الوظائف الخلوية، بما في ذلك نمو الخلايا وانتشارها والتمايز والحركة والبقاء والاتجاه داخل الخلايا (Li et al., 2024). ترتبط العديد من هذه الوظائف بقدرة *PI3Ks* على تنشيط بروتين كيناز *B (PKB)* ، المعروف أيضاً باسم (*Akt*) (Cho and Park, 2025). ويعد العلاج الكيميائي المساعد علاج (*5-Fluorouracil; 5-FU*) بمثابة علاج كيميائي رئيس في كل من المعالجات المساعدة لسرطان القولون (Alzahrani et al., 2023). ومع ذلك، فإن اعداداً كبيرة من المرضى وللأسف يفشلون في إظهار استجابة موضوعية في العلاج الكيميائي من الخط الأول، وكذلك يعانون أيضاً من الآثار الجانبية (Giacchetti et al., 2000) , لذا جاءت هذه الدراسة للبحث حول إمكانية استخدام جذور نبات الاشواغندا *Withania somnifera* ومستخلصاتها (المائية والكحولية) في علاج السرطان وخاصة سرطان القولون البشري (*SW480*) من غير التأثيرات الجانبية على الخلايا الطبيعية .

### 1.1. الهدف من الدراسة The aim of study

الهدف من هذه الدراسة هو معرفة تأثير المستخلص الكحولي والمائي لجذور نبات الاشواغندا *Withania somnifera* على خط خلايا سرطان القولون البشري (*SW480*) من ماياتي:-

1-الكشف الكيميائي عن المركبات الفعالة لجذور نبات الاشواغندا المستخلصات (المائية والكحولية)

2-دراسة تأثير المستخلص المائي والكحولي لجذور نبات الاشواغندا *Withania somnifera* على تثبيط نمو الخلايا السرطانية للخط الخلوي لسرطان القولون البشري *SW480* مقارنة بتأثير عقار السيسبلاتين وتأثير الفعل المشترك على خط خلايا سرطان القولون البشري *SW480*

3-دراسة تأثير مستخلص جذور نبات الاشواغندا المائية والكحولية على معدل التعبير الجيني للجينين *P53* و *PIKCA* لخلايا سرطان القولون البشري *SW480* .

4- دراسة تأثير الفعل المشترك للمستخلصات المائية والكحولية لجذور نبات الاشواغندا مع عقار *Cisplatin* في تثبيط نمو خلايا سرطان القولون البشري (*SW480*) ومعدل تعبيرها الجينية .

الفصل الثاني

استعراض المراجع

**Literature Review**

## 2. استعراض المراجع Literature Review :

## 1.2. السرطان

السرطان هو ثاني أكبر سبب للوفاة، بعد أمراض القلب والأوعية الدموية يقتل السرطان حوالي 70% من وفيات السرطان تحدث في البلدان منخفضة ومتوسطة الدخل أي البلدان النامية; (Cao et al., 2020). (World Health Organization, 2025) ، حيث يمثل السرطان مشكلة تواجه العالم اذ تسبب في القضاء على حوالي 10 ملايين شخص سنويا وهذا يرتبط بالعمر والخدمات الصحية والبيئة والموقع الجغرافي فسجلت الاصابات في قارة اسيا حوالي 50 % (Deo et al., 2022) احتل العراق المركز السابع في حالات الإصابة لمرض السرطان، يُعد السرطان السبب الثاني للوفاة عالميًا بعد أمراض القلب والأوعية الدموية، حيث أدت إليه حوالي 10 ملايين وفاة في عام 2020، مع أن نحو 70 % من هذه الوفيات وقعت في الدول المنخفضة والمتوسطة الدخل (American Cancer Society, 2024; World Health Organization, 2025). فيما يتعلق بالوراثة، فإن نسبة الإصابة المرتبطة بعوامل جينية واضحة تُقدّر بنحو 5-6%. وتتداخل عوامل العمر، والوضع الصحي والخدمات المتاحة، والبيئة، والموقع الجغرافي لتشكّل عبئًا متفاوتًا من السرطان، إذ تُسجّل آسيا وحدها حوالي نصف حالات الإصابة عالميًا (Deo et al., 2022).

يُعدّ ارتفاع معدل الإصابة بالسرطان في العراق قضيةً مثيرةً للقلق. وقد يُسهم ارتفاع متوسط العمر المتوقع، والتغيّر في عوامل الخطر السلوكية، وآثار النزاعات المسلحة في هذا الارتفاع. ازداد معدل الإصابة بالسرطان بشكل عام مع مرور الوقت (خط اتجاه تصاعدي في معدل الإصابة بالسرطان على مر السنين). يشير معدل R2 إلى وجود تباين معقول في معدل الإصابة بالسرطان. بلغ معدل الإصابة بالسرطان المعياري حسب العمر في عام 2022 158.94 لكل 100000 نسمة. وكانت معدلات الإصابة أكثر وضوحًا في النجف والسليمانية وأربيل وكربلاء (123.74، 121.4، 119.9، 111.8) لكل 100,000 نسمة، على التوالي. إن معالجة قضية السرطان في العراق تتطلب نهجًا متعدد الأوجه يشمل تحسين الظروف البيئية وتعزيز الخدمات الصحية وزيادة الوعي حول الوقاية من السرطان والكشف المبكر عنه (Salih et al., 2024).

الخلية السرطانية تتميز بخصائص رئيسية: منها التحفيز الذاتي لإشارات النمو، ومقاومة موت الخلية، وانقسامها غير منتظم، وعدم الاستجابة تثبيط النمو، وقدرتها على التكاثّر غير المحدودة (غير المنتظم)،

والغزو والنقائل. وبالإضافة إلى ذلك اتضح أن الخلية السرطانية وحدها ليست هي التي تساهم في الخصائص المميزة للسرطان، انما أيضاً البيئة المحيطة بالورم (Gonzalez et al.,2018) .

ويمثل السرطان مجموع من الأمراض تصيب جميع أنحاء الجسم ويحدث بسبب الانقسام غير المنتظم ويكون قادر على الانتشار إلى باقي أنحاء الجسم وهذه الأمراض تسمى الأورام وتكون نوعين اما اورام الحميدة benign Tumors وتكون موضوعية أي لا تنتشر الى اماكن اخرى من الجسم او اورام سرطانية خبيثة Malignant tumor وتكون قابلة للانتشار والسيطرة الى اماكن بعيدة من موقع الاصابة والتي تسبب تراكم الاضرار في الـ DNA مما يسبب حدوث طفرة Mutation (Patel, 2020); الورمية Oncogene بمساعدة الخلايا السرطانية بعد توقف عمل الجينات الكابحة للورم tumor Suppressors gene وبالتالي ينسخ المادة الوراثية (DNA) المتضررة وتنشأ خلايا مشوهة وغير طبيعية تحمل زوائد تشبه الأذرع لتحتل العضو الموجودة فيه وتسيطر عليه وتنتقل اجزاء من الحامض النووي التالف بالنواقل عبر الدم واللمف الى اعضاء اخرى من الجسم; (Habbane et al., 2024; Radzak et al., 2022)

هناك عوامل عديدة التي تسبب الطفرة منها التدخين المسبب الاساس لسرطان الرئة وسرطان الفم وسرطان المرئ وكذلك سرطان الكبد والبنكرياس والمعدة والقولون والجلد والثدي وغيرها. اما العوامل الاخرى هي عوامل وراثية وتشمل نوعين : عوامل جينية التي تعمل على تغيير تسلسلات الحامض النووي وقد تؤثر على الجين وظيفياً مثل الطفرات النقطية Point mutations, الحذف Deletions او الادخال Insertions, اعادة الترتيب الكروموسومي Chromosomal rearrangements وهذه التغييرات تسبب تنشيط الجينات الورمية (Oncogenes) وتعطيل الجينات الكابحة (Tumor suppressor genes), والنوع Epigenetic التي تعمل على اعاده هيكلية DNA دون ان تغير تسلسل القواعد النيتروجينية ولكن تؤثر على التعبير الجيني وذلك بوساطة ارتباط الـ DNA بالهستونات مثل الأستلة (Acetylation) والفسفرة Phosphorylation, إذ إن هذه التعديلات تؤثر على درجة النفاذ الـDNA حول الهستونات، وبالتالي على إمكانية وصول عوامل النسخ إلى الجينات (Davalos and Esteller, 2023; Hart et al., 2020; Danylova and Komisarenko, 2020)

على الرغم من أن الطرق العلاجية التقليدية مثل العلاج الكيميائي قد أثبتت فعاليتها في تحسين صحة المرضى ومعدلات بقاءهم على قيد الحياة، إلا أنها غالباً ما ترتبط بآثار جانبية كبيرة على المدى القصير

والطويل. كما ويُعد العلاج الكيميائي من أكثر العلاجات استخداماً في علاج الأورام، إذ يعتمد على استخدام عقار أو مجموعة من العقاقير المضادة للسرطان لغرض تثبيط نمو الخلايا الخبيثة أو تقليصها، إلا أن طبيعته غير الانتقائية تؤدي إلى التأثير على الخلايا السليمة أيضاً، مما يسبب في ظهور مضاعفات صحية متعددة. (Pandey et al.,2021). وبالإضافة إلى ذلك، يمكن أن يضع العلاج الكيميائي المرضى تحت ضغط كبير ويزيد من الضرر بصحتهم. غالباً ما يكون العلاج الكيميائي وهو الخيار الأساس لعلاج السرطان، مع عدد من الآثار الجانبية، بما في ذلك فقدان الشهية والغثيان والأرق والقلق (Soumya et al.,2021).

### 1.1.2 دور الجذور الحرة في السرطان The Role of Reactive Oxygen Species in Cancer

الجذور الحرة Free radicals هي ذرات تحتوي على إلكترونات غير مرتبطة بالغلاف الخارجي تمتاز هذه الإلكترونات بحركتها النشطة لأجل البحث على جزيء أو ذرة لغرض الارتباط بها والاستقرار داخل الخلية في المايوتوكندريا. (Venditti and Di Meo ,2020).

أو قد تنشأ بسبب عوامل أجهاد خارجي مثل التلوث، والاشعاع. كما ان للأوكسجين التفاعلي Reactive Oxygen Species (ROS) دوراً رئيساً في نقل الاشارات بين الخلايا بداية بتكوين السرطان وانتشاره اي تكوين الاوعية الدموية للسرطان الى استعماره للعضو، ان وجود الاوكسجين التفاعلي بنسب عالية يسبب تلف الحامض النووي DNA مما يسبب حدوث الطفرة، كما تشير الدراسات الحديثة إلى أن الإجهاد التأكسدي يؤثر بشكل كبير على وظيفة البروتين الورمي p53، مما يؤدي إلى فقدانه لوظيفته التنظيمية داخل الخلية. يُعد p53 منظماً رئيسياً للعديد من الجينات ويلعب دوراً مهماً في تنظيم دورة الخلية. (Liu et al.,2020).

حيث يُعد الجلوتاثيون (GSH) أحد مضادات الأكسدة الرئيسية في الخلايا، إذ يساهم في تنظيم مستويات الإجهاد التأكسدي. تشير الدراسات إلى أن التفاعل بين الجلوتاثيون و p53 يلعب دوراً حاسماً في الحفاظ على التوازن الخلوي ومنع التلف الناتج عن الإجهاد التأكسدي (Sahu et al.,2023).

يحدث تأثير الإجهاد التأكسدي على البروتين ومنها البروتين الورم P53 الذي ينضم عمل الجينات بالإضافة إلى تنظيم دوره الخلية ومن ثم تغيير دورة الكاسح ضد السرطان، ويمكن ان تحدث تغير في هيكلية P53 مما يجعله يعمل على تشفير بروتينات معينه داعمة لانتشار الورم وهذا ما يسمى بطفرة

اكتساب الوظيفة mutation Gain of function من جهة أخرى، تعمل الخلايا السرطانية على رفع مستويات أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS)، غير أن هذا الارتفاع يؤدي بدوره إلى زيادة الإجهاد التأكسدي، مما يحفز إعادة تفعيل بروتين p53. يقوم p53 بتنشيط بروتينات محفزة للاستموات مثل PUMA و NOXA، والتي تتداخل وظيفياً مع البروتينات المضادة للموت الخلوي، مثل BCL-2 الذي يُعدّ بمثابة "حارس" يمنع خروج Cytochrome c من الميتوكوندريا. وعندما يُنَبِّط عمل BCL-2، يزداد نفاذ الغشاء الميتوكوندري وتتكون فيه ثقوب، مما يسمح بانطلاق Cytochrome c إلى السيتوبلازم، حيث يتفاعل مع Apaf-1 لتشكيل معقد يُفَعِّل الكاسبازات. تؤدي هذه الكاسبازات بدورها إلى تنشيط إنزيم Nuclease الذي يُجزئ شريط الـ DNA، لتُزال الخلايا المبرمجة للموت لاحقاً بواسطة الخلايا البلعمية (Phagocytes) (Villalpando-Rodriguez and Gibson, 2021).

الموت المبرمج Apoptosis هو أكثر الأنواع شيوعاً للموت الخلوي، إذ يتم التخلص من الخلايا التالفة وبقائها ليس ضروري وهذا يعتمد على مجموعة انزيمات الـ Caspase وان الية Apoptosis تعمل على تجزئة الحامض النووي وانكماش السيتوبلازم وزيادة في كثافة الكروماتين وتلف الغشاء البلازمي وهذه العملية غير رجعية ونهائية ومن هذه العوامل التي تسبب ضرر للحامض النووي ويصبح غير قابلة للإصلاح. قد تكون خارجية للخلية كالإشعاعات المختلفة او عوامل داخلية قد تؤدي الى ضرر للحامض النووي مثل الاجهاد التأكسدي وغيرها (Jezek et al., 2021).

كما أن مضادات الاكسدة هي مواد تقاوم الجذور الحرة Free radicals داخل الكائن الحي وتعمل على توقف او تبطئ من عملية تحطيم الخلايا التي تسببها الجذور الحرة (Turrens, 2023).

تُعدّ التغيرات الجينية والوراثية من أبرز العوامل المسببة للسرطان، إذ تؤثر الطفرات أو الخلل في التعبير الجيني على دورة الخلية، تكاثرها، وموتها المبرمج. دراسة هذه الجينات وفهم آلياتها يفتح آفاقاً مهمة في التشخيص المبكر، التنبؤ بسير المرض، وتطوير استراتيجيات علاجية موجهة.

### 2.1.2. انواع الجينات المرتبطة بالسرطان

إن فهم التنوع الجيني المرتبط بالسرطان يعدّ محورياً أساسياً في أبحاث الأورام الحديثة. لقد ساهم تحديد الجينات الكابحة للأورام، الجينات المسرطنة، وجينات إصلاح الـ DNA في تطوير العلاجات الموجهة والطب الشخصي، مما يُحسّن فرص الكشف المبكر والاستجابة العلاجية. (Brown et al., 2024).

**1. الجينات الكابحة للأورام (Tumor Suppressor Genes)**

الجينات الكابحة للأورام تعمل على ضبط نمو الخلايا وانقسامها، كما تساهم في إصلاح الحمض النووي التالف. عندما تتعطل وظيفتها بفعل الطفرات، تصبح الخلايا أكثر عرضة للتحول السرطاني. مثلاً TP53. يُلقب بـ "حارس الجينوم"، وتؤدي طفراته إلى فقدان السيطرة على دورة الخلية. RB1 والموت المبرمج ومسؤول عن تنظيم الانتقال من الطور G1 إلى S، وتُعد طفراته سبباً رئيسياً لسرطان الشبكية. BRCA1 ترتبط سرطانات الثدي والمبيض بطفرات هذه الجينات المسؤولة عن إصلاح الـDNA. (Li *et al.*, 2023)

**2. الجينات المسرطنة (Oncogenes)**

تتولد الجينات المسرطنة نتيجة طفرات أو تضاعف غير طبيعي في الجينات الطبيعية-Proto (oncogenes)، مما يمنح الخلية قدرة على النمو والانقسام غير المحدود. مثلاً: KRAS طفراته شائعة في سرطانات القولون والبنكرياس والرئة: HER2 (ERBB2). تضخمه يرتبط بسرطان الثدي العدوانى، ويُستخدم كهدف علاجي للأجسام المضادة مثل MYC: يؤدي تفعيله إلى زيادة معدل الانقسام الخلوي ويُعدّ شائعاً في الأورام اللمفاوية: MYC. يؤدي تفعيله إلى زيادة معدل الانقسام الخلوي ويُعدّ شائعاً في الأورام اللمفاوية Trastuzumab (Singh *et al.*, 2024).

**3. جينات إصلاح الحمض النووي (DNA Repair Genes)**

تعمل هذه الجينات على المحافظة على استقرار الجينوم عبر إصلاح الأضرار الجزيئية. عند فقدانها أو تعطلها، تتراكم الطفرات بسرعة وتزداد احتمالية التحول السرطاني. مثلاً MSH2 و MLH1 مسؤولان عن نظام إصلاح أخطاء تضاعف الـDNA (Mismatch Repair)، وتعطلهما يؤدي إلى سرطان القولون غير البوليبيوسي الوراثي. ATM و ATR تنشطان استجابة التلف الجيني، وتغيرتهما ترتبط بسرطانات الدم والثدي (Wang *et al.*, 2023)

**4. جينات الموت الخلوي المبرمج (Apoptosis Genes)**

تلعب هذه الجينات دوراً في التخلص من الخلايا غير الطبيعية. الطفرات التي تقلل من فعاليتها تمنح الخلية بقاءً غير طبيعي. مثلاً BCL-2 يمنع الموت المبرمج وتضخمه شائع في الأورام اللمفاوية. CASPASES تمثل سلسلة إنزيمية تنفذ الموت الخلوي، وتعطلها يرتبط بعدة أنواع من السرطانات (Hosen *et al.*, 2023)

## 3.1.2. التعبير الجيني للجينات المصابة في السرطان من الطفرة

تلعب الطفرات الجينية، سواء في الجينات المسرطنة (oncogenes) أو الجينات الكابحة للأورام (tumor suppressor genes)، دورًا محوريًا في تعديل أنماط التعبير الجيني (في مرحلة النسخ mRNA أو بعدها). هذه التغييرات لا تقود فقط إلى توليد بروتينات متغيرة وظيفيًا، بل تفضي أيضاً إلى تغييرات أوسع في الإطار الجزيئي والديناميكي للخلية السرطانية (Mahsa Saliyani *et al.*,2022)

## 1. طفرات في عوامل النسخ: (Transcription Factors)

طفرات في جينات مثل TP53 وغيرها من عوامل النسخ تؤدي إلى تغيير الموقع أو الفاعلية، مما يعيد تشكيل التعبير الجيني للمئات من الجينات الهدف. أدوات النمذجة الهيكلية الحديثة تسمح بتنبؤات دقيقة بمدى تأثير الطفرة على الربط بـDNA، وبالتالي فهم أي التغييرات الجينية تُفعل أو تُثبّت. (Cao *et al.*,2024)

## 2. طفرات في NFE2L2 وPIK3R1:

كشفت دراسة ارتباط طفرات محددة ضمن مناطق وظيفية في NFE2L2 عامل نسخ مضاد للأكسدة و PIK3R1 مُنظّم مسار PI3K عن زيادة التعبير الجيني لهذه الجينات في أنواع سرطانية مثل LUSC ، BLCA وBRCA، مما يشير إلى أن الطفرة قد تمنع التحلل البروتيني أو تنشط مسارات نمو وبقاء الخلايا السرطانية (Peng *et al.*,2025)

تعتبر الطفرات الجينية من العوامل الأساسية في نشوء السرطان، إذ تؤدي إلى اختلال التوازن بين الجينات المنشطة للانقسام (oncogenes) والجينات الكابحة للأورام (tumor suppressor genes). تعمل الأونكوجينات مثل KRAS و MYC على تسريع نمو الخلايا بشكل غير طبيعي، بما يُشبه الوقود اللازم لانطلاق السيارة التي لا يمكن إيقافها أما الجينات الكابحة للأورام مثل TP53 وBRCA1/2، فتعمل كالفراكل، حيث تحافظ على التوازن من خلال تحفيز موت الخلايا المعيبة أو إصلاح الحمض النووي، ويُعرف TP53 بـ«حارس الجينوم»، إذ تُظهر أكثر من نصف الأورام البشرية اختلالاً في وظيفته ، بينما تسهم طفرات BRCA1/2 في سرطان الثدي والمبيض عبر إضعاف آليات إصلاح الكسور المزدوجة في الحمض النووي إن فهم آليات هذه الجينات لا يُسهم فقط في تفسير تطور (Dai *et al.*,2024)

## 4.1.2. الدور الوراثي في السرطان

يُعرف السرطان الوراثي بأنه ذلك الناتج عن تغيّر جيني موروث من أحد الوالدين، ويشكل حوالي 5-10% من الحالات المسجلة سنويًا.

تشمل الجينات الوراثية الشائعة المرتبطة بزيادة خطر الإصابة بالسرطان BRCA1، BRCA2، PALB2، PTEN، TP53، CDH1، MSH1/MSH2/MSH6/MLH1/PMS2 وغيرها. تتيح الاستشارات أو الفحص الجيني الكشف المبكر وتقويم الخطر بشكل فعّال، مما يدعم اتخاذ قرارات وقائية مثل الفحص المبكر أو الإجراءات الجراحية الوقائية. (Tiwari et al., 2025)

## 5.1.2. التعبير الجيني وتأثيره في السرطان

التغيرات تشير إلى تعديلات في التعبير الجيني دون تغيير تسلسل الـDNA، مثل مثيلة الحمض النووي، تعديل الهيستونات، التعبير عن microRNAs، ومواقع النيوكليوزومات في سرطانات القولون، يُلاحظ إسكات جينات عدة (600-800) عبر مثيلة جزر CpG في مناطق المحفزات، وهو أكثر شيوعًا من الطفرات الجينية هذه العمليات تؤثر على جينات إصلاح الحمض النووي، دورة الخلية، موت الخلايا المبرمج، والالتصاق الخلوي، بما في ذلك جينات مثل hMLH1 و DAPK و CDH1 و Rico- (Méndez et al., 2025)

## 6.1.2. التداخل بين التعبير الجيني وآليات إصلاح الـDNA وطرق العلاج

التغيرات يمكن أن تعرقل عملية التعرف على تلف الحمض النووي وإصلاحه (مثل HR، NHEJ، BER، عن طريق إسكات الجينات المسؤولة أو تعطيل مركبات تعديل الكروماتين مثل SWI/SNF، CHD، ISWI وفي العديد من أنواع السرطان، يُعزى فقدان التعبير عن جينات الإصلاح (مثل MLH1 و MSH2 غالبًا إلى مثيلة المحفزات وليس إلى طفرات الميزة التغيرات قابلة للعكس، ما يجعلها هدفًا واعدًا للعلاج، ويشكل أساسًا لتطوير أدوية مثبطة للإنزيمات (Helderman et al., 2024)

## 7.1.2. أنواع محددة من السرطان

## 1. سرطان الثدي

تلعب التعديلات الإبيجينية (مثيلة الـDNA وتعديلات الهيستونات و microRNAs) دورًا واضحًا في بدء سرطان الثدي وتطوره، وتؤثر في مسارات المناعة والميكروبيئة الورمية. فرط مثيلة محزّات جينات مُنظّات الورم وتعطيل منظمات الكروماتين يرتبطان بأنماط تحتية مختلفة وسلوك سريري متباين في

السرطان ثلاثي السلبية (TNBC) أظهرت دراسات على نطاق الجينوم أن المشهد المثيلي والمعززات الموسومة بتعديلات هيستونية يضبطان شبكات التعبير الجيني والدوافع الورمية، ما يفتح الباب لمؤشرات حيوية علاجية. كما أن مثيلة مروج (BRCA1/2) قد تخفّض البروتين بطريقة تُحاكي الطفرات الموروثة، وتنعكس على حساسية العلاجات المعتمدة على إصلاح الـ DNA مثل البلاتين و (PARP inhibitors). ( تُستكشف بصمات مثيلة الـ DNA كأدوات للتصنيف والتنبؤ بالبقاء وخطر النكس، وقد ظهرت ألواح مثيلية واعدة للاستخدام السريري المبكر . (Aine et al., 2025)

## 2. سرطان القولون والمستقيم (CRC)

يتميز جزء مهم من أورام القولون بنمط CIMP الظاهرة واسعة الطيف لفرط مثيلة جزر (CpG) مع إسكات جينات إصلاح الـ DNA. فرط مثيلة مروج MLH1 يؤدي إلى عوز إصلاح عدم التطابق (dMMR) وظهور عدم استقرار ميكروساتلايت (MSI)، وغالبًا ما يتداخل (لكن ليس بالكامل) مع طفرات BRAF. هذه السمات تُوجّه قرارات الفحص العلاجي والمناعي .

### 8.1.2. سرطان القولون

يُعد القولون (Colon) الجزء الأخير من الأمعاء الغليظة، حيث تتم فيه عملية امتصاص السوائل من الغذاء بعد الهضم، قبل انتقال الفضلات إلى المستقيم ثم طرحها عبر فتحة الشرج (Omole et al., 2025). يُعتبر سرطان القولون في عام 2020 ثالث أكثر أنواع الأورام الخبيثة شيوعًا عالميًا، كما يُعد السبب الثاني للوفاة المرتبطة بالسرطان لدى كلا الجنسين (Rogers et al., 2021) وتشير الإحصاءات إلى أن الوفيات الناتجة عن السرطان بوجه عام تمثل العبء الأكبر على مستوى العالم (Ervik et al., 2024; Bence et al., 2022; Ferlay et al., 2020).

ويُصنف سرطان القولون باعتباره النوع الأكثر شيوعًا بين سرطانات الجهاز الهضمي (Macharia et al., 2022). كما أن هناك فروقًا بين الجنسين إذ يميل الذكور بشكل أكبر إلى الإصابة بسرطان القولون النقيلي، في حين تكون الإناث أكثر عرضة للإصابة بسرطان المستقيم النقيلي مع تقدم العمر (Li et al., 2024). وتشير التوقعات إلى أنه بحلول عام 2030 سيرتفع معدل الإصابة بسرطان القولون بنسبة تصل إلى 60%، ليبلغ نحو 2.2 مليون حالة جديدة سنويًا (Macharia et al., 2022 A) بالإضافة إلى ذلك، يميل الذكور بشكل أكبر إلى الإصابة بسرطان القولون النقيلي بينما تكون الإناث أكثر عرضة للإصابة بسرطان المستقيم النقيلي مع تقدمهن في العمر (Li et al., 2024) ومعدل الإصابة بسرطان القولون أعلى

لدى النساء مئة عند الرجال. ومن المتوقع بحلول عام 2030، أن يزيد معدل الإصابة بسرطان القولون بنسبة 60٪، إلى 2.2 مليون حالة جديدة و 1.1 مليون حالة وفاة سنوياً، وقد يصل عدد المرضى المصابين بهذا الورم إلى 3.2 مليون (بزيادة قدرها 63%) و 1.6 مليون حالة وفاة سنوياً بزيادة قدرها 37% (Wele et al.,2022; Xi et al.,2021) وقد وجد أن حوالي 50% من السرطانات داخل القولون تحدث في الجانب الأيسر و25% في الجانب الأيمن (Pitchumoni et al.,2020) ، وتعود الزيادة للأصابة لعدة أسباب، بما في ذلك العادات الغذائية غير الصحية مثل تناول بشكل كبير للحوم الحمراء المصنعة وقلة تناول الخضروات أو الألياف، الوجبات الغذائية عالية الدهون ، وانخفاض النشاط البدني، وانتشار السمنة (Zhang et al., 2024). تعتمد العلاجات الحالية لسرطان القولون على مرحلة المرض مثلاً في مرحلة المرض المبكرة يكون الإزالة بالمنظار للأورام الخبيثة أمراً شائعاً، مع تسكين الورم ومعدل البقاء لمدة 5 سنوات بنسبة 91٪، بينما في مراحل المرض الأكثر تقدماً، يلزم الاستئصال الجراحي للورم والعلاج الكيميائي (Xie et al.,2020).

إن الحد وتقليل الأصابة بسرطان القولون هناك العديد من وسائل منها زيادة عوامل الحماية (على سبيل المثال، النشاط البدني وتناول أدوية معينة مثل الأسبرين والنظام الغذائي الصحي)(Siege et al.,2020; Siegel et al.,2023). على الرغم من أن فسيولوجية المرضية لسرطان القولون غير واضحة ومعقدة، إلا أن الارتباط بين عوامل الخطر يبدو ضرورياً لظهور المرض وتطوره. لقد تم تحديد العديد من الآليات الجزيئية في تطور سرطان القولون (Malki et al.,2020) ترتبط إحدى هذه الآليات بأصل المرض وتقدمه ونقائله، وترتبط بمستقبلات التكاثر البيروكسيسومي المنشطة — peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) هذه المستقبلات هي عوامل نسخ قابلة للتحريض وتتميز بالتعديل النسخي للجينات المرتبطة في عمليات مثل التمثيل الغذائي للطاقة (Hong et al.,2019).

### 1.8.1.2. وبائية سرطان القولون

يعد سرطان القولون هو ثالث أكثر أنواع السرطان معدل الإصابة الأعلى حسب تقرير محلي وفقاً لمقال عام 2025، بلغ المعدل المعياري للإصابة 158.94 لكل 100,000 في بعض المناطق العراقية، لا سيما محافظات مثل النجف، السليمانية، وأربيل انتشار سرطان الثدي والمبيض لدى النساء العراقيات لخصت دراسة حديثة إلى أن معدلات الإصابة بسرطان الثدي وسرطان المبيض في ارتفاع بين النساء العراقيات، وقد يكون لانخفاض معدلات الخصوبة دور في هذا الاتجاه.

الرجال أكثر عرضة للإصابة بسرطان القولون بنسبة (53%) وفي سن أصغر من النساء وكان معدل الإصابة أعلى لدى الذكور 23.4 والإناث 16.2 (Sung et al.,2020)، بعض الدراسات اشارت إلى أن النسبة متزايدة من حالات السرطان التي تم تشخيصها حديثاً لدى الأفراد الذين تقل أعمارهم عن 55 عامًا (Siegel et al.,2023). كما وتشارك الفوارق العرقية والاقتصادية والاجتماعية بشكل واسع في معدل الإصابة والتشخيص، إذ تم تسجيل أعلى المعدلات بين سكان الأمريكيين وألاسكا الأكثر تقدراً يمكن تحديد مراحل سرطان القولون بناءً على أربعة عوامل محددة تشمل حجم الورم، وجود السرطان في الغدد اللمفاوية القريبة، وانتشاره إلى الأنسجة المحيطة وشكل الخلايا السرطانية تحت المجهر (Birch et al.,2022).

### 2.8.1.2. الأنواع الرئيسية لسرطان الجهاز الهضمي

**1- الأورام السرطانية للجهاز الهضمي (Gastrointestinal Tumors):** توجد هذه الأورام في الخلايا الصماء العصبية التي تشكل بطانة الجهاز الهضمي. تنمو هذه الأورام ببطء نسبياً. (Centers for Disease Control and Prevention,2024).

**2- الأورام السدىية للجهاز الهضمي: (Gastrointestinal Stromal Tumor)** تتطور هذه الأورام في الخلايا الخالية، التي تعد جزءاً من الجهاز العصبي اللاإرادي وتعمل كمنظم ضربات القلب للعضلات في الأمعاء وتكون هذه الاورام في الغالب اورام حميدة (غير سرطانية) وغير قادرة على الانتشار.

**3- الأورام اللمفاوية الأولية للقولون (Primary Colorectal Lymphoma)** :تتطور هذه الأورام في الخلايا اللمفاوية، أو خلايا الجهاز المناعي. تكون الأورام نادرة الحدوث نسبياً ولا تمثل سوى جزء صغير من جميع أنواع سرطانات القولون.

**4- سرطان الخلايا الحرشفية (Squamous Cell Carcinoma)** – يوجد هذا النوع في الأوعية الدموية أو خلايا العضلات الملساء في القولون. وتوجد أنواع فرعية مختلفة من السرطان، بما في ذلك الساركوما العضلية الملساء (Leiomyosarcoma) والساركوما الوعائية (Angiosarcoma). وهي تعتبر من أقل أنواع سرطان القولون تشخيصاً.

### 3.8.1.2 مراحل سرطان القولون The stages of colon cancer

إن تطور المرض يعتمد على الموقع التشريحي للورم، إذ تُظهر الأورام الموجودة في الجزء الأيمن واليسر من القولون سمات جزيئية ونسجية مختلفة إذ وجد أن المرضى المصابين بأورام في الجانب الأيسر علامات تشخيصية أفضل من المرضى المصابين بأورام في الجانب الأيمن (Hanna et al., 2020). أشارت الدراسات إلى وجود فروق بايولوجية وجينية بين الأورام السرطانية التي تنشأ في الجانب الأيمن من القولون وتلك التي تنشأ في الجانب الأيسر. إذ وُجد أن أورام القولون في (الجانب الأيسر) مثل المستقيم والقولون السيني Sigmoid colon تظهر بشكل أوضح لدى الذكور، وغالبًا ما تكون مرتبطة بطفرات في الجين *TP53*، وهو جين مسؤول عن تنظيم انقسام الخلايا ومنع تكوّن الأورام. عند حدوث خلل في هذا الجين، يزداد خطر تطوّر الورم ليصبح سرطانًا ينتشر إلى الكبد (سرطان الكبد النقلي Metastatic liver cancer)، بينما سرطانات القولون التي تنشأ في (الجانب الأيمن) مثل الأعور والقولون الصاعد تكون غالبًا مرتبطة بطفرات في جين *BRAF*، وهو جين يؤثر في نمو الخلايا. وتتميز هذه الأورام بأنها أكبر حجمًا عند التشخيص، وتميل إلى أن تكون أكثر عدوانية، وغالبًا ما تصيب النساء وكبار السن بشكل أكبر (Ciepiela et al., 2024).

يعتمد تصنيف مراحل سرطان القولون على نظام (Tumor, Nodes, Metastasis) يشير إلى حجم الورم الأصلي ومدى انتشاره داخل العضو المصاب (Nodes) يشير إلى وجود السرطان في العقد الليمفاوية القريبة من الورم (Metastasis) يشير إلى وجود انتشار بعيد للسرطان إلى أعضاء أو أنسجة أخرى في الجسم.

#### 1-سرطان القولون في المرحلة 0 Stage 0 colon cancer

ويسمى بسرطان موضعي أو سرطان داخل المخاطية (Intramucosal cancer)، ويتمثل بالخلايا السرطانية التي تقتصر على الطبقة الداخلية من بطانة القولون (الغشاء المخاطي) ولم ينتشر إلى الطبقات العميقة من جدار القولون أو إلى العقد الليمفاوية القريبة والأعضاء بعيدة ويتم العلاج بواسطة الإزالة الجراحية للأنسجة السرطانية. (Menon, 2025).

#### 2-سرطان القولون في المرحلة الأولى Stage 1 colon cancer

تُعدّ المرحلة الأولى من سرطان القولون مرحلة مبكرة، حيث تكون الخلايا السرطانية قد غزت الطبقات الداخلية من جدار القولون، لكنها لم تنتشر بعد إلى خارج الجدار، أو إلى العقد الليمفاوية القريبة، أو إلى

الأعضاء البعيدة. يكون الورم في هذه المرحلة صغيراً وموضعيًا، ويُعد الاستئصال الجراحي للورم مع جزء صغير من الأنسجة السليمة المحيطة به هو العلاج الرئيسي في هذه المرحلة (Wargo and Grothey 2024).

### 3-سرطان القولون في المرحلة الثانية Stage 2 colon cancer

تتميز هذه المرحلة من سرطان القولون بانتشار الخلايا السرطانية إلى ما هو أبعد من الطبقات الداخلية لجدار القولون إلى الأنسجة المجاورة دون التأثير بالعقد الليمفاوية القريبة أو الأعضاء البعيدة. يتضمن علاج سرطان القولون في هذه المرحلة الإزالة الجراحية للورم وبعض الأنسجة السليمة المحيطة، وقد يكون ذلك علاجاً شافياً. واعتماداً على نوع الورم وقد يتم اخذ العلاج الكيميائي لتقليل خطر تكرار الإصابة (Tie *et al.*,2022).

### 4-سرطان القولون في المرحلة الثالثة Stage 3 colon cancer

تميز المرحلة الثالثة من سرطان القولون بانتشار الخلايا السرطانية خارج جدار القولون إلى العقد الليمفاوية القريبة ولكنها لم تنتشر إلى أعضاء بعيدة. في هذه المرحلة، يعد السرطان متقدماً محلياً. يختلف النهج الدقيق للعلاج في حالة سرطان القولون في هذه المرحلة اعتماداً على حجم الورم ومدى إصابة العقد الليمفاوية وعوامل أخرى. ويكون العلاج الاستئصال الجراحي للورم وبعض العقد الليمفاوية المجاورة، ثم العلاج الكيميائي لاستهداف أي خلايا سرطانية متبقية من تكرار الإصابة بالمرض (Benson *et al.*,2024).

### 5-سرطان القولون في المرحلة الرابعة Stage 4 colon cancer

والذي يُعرف أيضاً بأسم السرطان النقيلي (Metastatic Cancer)، هو الحالة التي تنتشر فيها الخلايا السرطانية من القولون إلى أعضاء أو أنسجة بعيدة مثل الكبد، الرئتين، والصفاق. في هذه المرحلة المتقدمة، يهدف العلاج إلى السيطرة على انتشار السرطان، وتحسين الحالة الصحية، وإطالة العمر على قيد الحياة، ويتضمن نهجاً متعددة التخصصات وتشمل العلاج الجراحي، العلاج الكيميائي، العلاج الموجه، لعلاج المناعي، العلاج الإشعاعي ويجدر بالذكر أن العلاج المناعي يختلف عن العلاج الكيميائي من حيث آلية العمل والآثار الجانبية، حيث يعمل العلاج المناعي على تعزيز الاستجابة المناعية الذاتية للجسم ضد الخلايا السرطانية، بينما يستهدف العلاج الكيميائي الخلايا التي تنقسم بسرعة، سواء كانت سرطانية أو سليمة، مما

يؤدي إلى آثار جانبية واسعة النطاق (American Cancer Society, (2024); Cancer Research Institute. (2025).

#### 4.8.1.2 طرق العلاجات لسرطان القولون colon cancer

سرطان القولون مرض قابل للعلاج بدرجة عالية، وغالباً ما يكون قابلاً للشفاء عند عدم انتشاره في الأمعاء. لا تظهر لسرطان القولون أي أعراض ملحوظة. وعند إجراء الكشف المبكر للأمعاء عن العلامات المبكرة لسرطان الأمعاء، زادت فرص نجاح العلاج (Benson et al., 2024).

**1- تنظير القولون (Colonoscopy)** يعد أفضل أنواع العلاجات حيث يتم فحص طول الأمعاء الغليظة (Bretthauer et al., 2022). ان من خلال استخدام تنظير القولون، أصبح من الممكن اكتشاف معظم حالات سرطان القولون قبل ظهور الأعراض. تعتمد ظهور الأعراض وشدها على موقع الورم وحجمه. ومن هذه الأعراض التي يجب إجراء التنظير قولون التشخيصي هي ألم البطن (34%)، وفقر الدم (23%)، والنزيف المستقيمي (37%) وان ظهور فقر الدم يكون مصاحب مع الأورام الموجودة على الجانب الأيمن، وقد تسبب الأورام الموجودة على الجانب الأيسر صعوبة أثناء التغوط. وتظهر الأعراض المتقدمة للمرض، اعتماداً على العضو الذي انتشر إليه. وقد يعاني المريض من حالات حادة تتطلب تدخلاً جراحياً أحياناً، وقد تكون بسبب انسداد أو ثقب أو نزيف مرتبط بالورم (Qu et al., 2023).

**2-العلاج الإشعاعي Radiation Therapy:** يستخدم هذا العلاج قبل الجراحة لعلاج سرطان القولون المتقدم ويمكن استخدام مع العلاج الكيميائي لتقليل عدد وحجم الخلايا السرطانية الذين يعانون من سرطان المستقيم المتكرر (Wo et al., 2021).

**A- العلاج الإشعاعي بوساطة الجسيمات النانوية Nano-enhanced radiotherapy :** تستخدم هذه التقنية الجسيمات النانوية لتوصيل الإشعاع مباشرة إلى الورم. تُغلف الجسيمات النانوية بأجسام مضادة تستهدف خلايا الورم، مما يسمح بتوصيل الإشعاع بشكل محدد إلى الورم وتقليل الجرعة إلى الأنسجة السليمة المحيطة. يستخدم هذا النوع في المراحل المبكرة من التطوير لعلاج سرطان القولون (Haque et al., 2023).

**B-العلاج الإشعاعي التجسيمي Stereotactic Body Radiotherapy (SBRT):** وهي طريقة علاجية إشعاعية مبتكرة ودقيقة للغاية، حيث تمتاز بدقتها المذهلة في توصيل جرعات عالية من الإشعاع إلى

موضع الورم مع التقليل من نسبة التعرض للأنسجة السليمة القريبة وتتمثل هذه الدقة من خلال تطوير الانظمة وتوجيهها بالصور ثلاثية الابعاد مما يسمح بتحديد موقع الورم بدقة عالية (Wo et al.,2021).

**3-العلاج الجراحي Surgery**: إن العلاج الرئيس لسرطان القولون المبكر هو استئصال القولون ويعتبر الأكثر شيوعاً للسرطان الذي يبدأ في القولون. سواءً كان حجم استئصال القولون كلياً أو جزئياً. إن العلاج بالجراحة هو العلاج الأساسي، وتؤدي إلى شفاء حوالي 50% من المرضى. ومع ذلك، فإن إعادة الإصابة بالمرض بعد الجراحة يمثل مشكلة كبيرة، وغالباً ما يكون السبب الرئيس للوفاة (Mitra et al.,2023).

**4-العلاج المناعي Immunotherapy**: يعد علاجاً واعداً لسرطان القولون. وهذا العلاج يعزز جهاز المناعة لدى المريض لمهاجمة الخلايا السرطانية دون أي آثار سامة على الخلايا (Zhang et al.,2020) كما وأظهرت الدراسات ان العلاج المناعي يعزز الجهاز المناعي على استهداف الخلايا السرطانية وتدميرها عن طريق حجب المسارات المثبطة. وقد رُبطت طفرات جين *PIK3CA* بزيادة التعبير عن للعوامل المضادة (PD-L1) (Programmed death-ligand 1) (Nikolouzakis et al.,2024) مما قد يعزز فعالية مثبطات نقاط التفتيش المناعية، وهذا ما أثبتته دراسة Peng (Peng et al., 2024). يشير هذا الارتباط إلى أن العلاج المناعي قد يكون فعالاً بشكل خاص في السرطانات التي تحمل طفرات جين *PIK3CA*، ومن الممكن تقسيم هذا النوع من العلاج إلى فئتين اعتماداً على آلية عمله، وهما: العلاج المناعي الذي لا يعتمد على المسار الجزيئي Non-specific immunotherapy باستخدام الخلايا الليمفاوية المنتقلة إلى الورم والعلاج المناعي الذي يعتمد على المسار الجزيئي Immune checkpoint inhibitor therapy وذلك باستخدام العلاج الجيني لمستقبلات الخلايا التائية (Mitra et al.,2023).

**5-العلاج الكيميائي Chemotherapy**: يأتي هذا العلاج بعد العلاج الجراحي سرطان القولون. إن الهدف من هذا العلاج هو تقليل خطر عودة الإصابة بالسرطان مرة أخرى ويتم باستخدام مجموعة ادوية وعقاقير السرطان مره اخرى.

إعادة استخدام الأدوية: أدويةً خضعت لتجارب سريرية ناجحة قبل استخدامها ، إذ بينت فعاليتها وسلامتها في علاج سرطان القولون بعض هذه المواد (Zhang et al.,2024):

**1-Sildenafil سيلدينافيل**: لها استخدامات متعددة، مثل علاج ارتفاع ضغط الدم ،ومجال الأمراض السرطانية ويُعدّ هذا المثبط لإنزيم فوسفوديستيراز 5 phosphodiesterase type كدواءً كيميائياً قوياً

حيث يُظهر تأثيرات مختلفة حسب نوع الدواء المُستخدم معه. عند استخدام الإكسيسوليند (Exisulindac sulfone)، وهو مشتق من مضادات الالتهاب غير الستيرويدية (nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)، يُمكنه تحفيز موت الخلايا المبرمج (Thompson, 2000).

**2- Celecoxib سيليكوكسيب:** وهي مجموعة عقار non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) تستعمل لتسكين الألم والالتهابات الناتجة من السرطان، ويُعتقد أنه يُقلل من حدوث أورام القولون (Nowak and Meyerhardt, 2025).

**3- مُركّبات Ruthenium-cyclopentadienyl complexes** الروثينيوم-سيكلوبنتاديينيل: اختبار أدوية جديدة لتأكيد تأثيرها العلاجي الفعلي على مرض السرطان، مثل مُركّب الروثينيوم-سيكلوبنتاديينيل. يظهر هذا الدواء المعدني بدرجة عالية من الانتقائية اتجاه الخلايا السرطانية، وقد تبين أنه يُعزز إيقاف دورة الخلية ويُقلل من قدرة الخلايا على التكاثر. كما اثبتت بعض الأدوية المُستحثة مثل (PM79 و LCR220 و LCR134) لها خصائص قاتلة للخلايا وتثبيطاً لحركتها وذلك عبر حدوث الخلل في الميتوكوندريا بإنتاج أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS). بالإضافة الى ذلك، تمتلك خصائص مثل إحداث تغييرات في الهيكل الخلوي عوامل مهمة في علاج سرطان القولون والمستقيم. ان الغاية من العلاجات الجديدة هو التخلص من الخلايا السرطانية فقط. وان مركبات الروثينيوم (التي تحتوي على عنصر معدني انتقالي يُسمى الروثينيوم)، على عكس السيسبلاتين المُستخدم في الأنظمة العلاجية الحالية، التي تستهدف الميتوكوندريا وليس الحمض النووي، وتقضي على الخلايا السرطانية دون أي تأثير على الخلايا الطبيعية (Brás et al., 2023).

**4- Chloroquine كلوروكين :-** هو (FU - 5) Fluorouracil/Leucovorin - دواء مضاد للملاريا أُعيد استخدامه لعلاج سرطان القولون حيث اشارت بعض الدراسات أن مقاومة علاج وهو علاج مهم لسرطان القولون في المرحلة الثالثة وتظهر تحسناً ملحوظاً لحاله المريض عند المعالجة باستخدام الكلوروكين، عن طريق تثبيط الالتهام الذاتي، مما يعزز الحساسية للأدوية الأخرى ويوفر سيطرة أفضل على الورم (Anselmino et al., 2023).

**5- Cisplatin السيسبلاتين:** هو عقار كيميائي معدني (بلاتين) ويكون بشكل مسحوق بلوري أبيض أو أصفر غامق إلى أصفر برتقالي في درجة حراره الغرفة - كلورو بلاتين أمين Chloroplatinum

amine . وهو ثنائي أمين وثنائي ميثيل فورماميد Dimethylformamide قليل الذوبان في الماء حالته مستقرة في درجات حرارة الغرفة والضغط الاعتيادي كما يستخدم كعلاج للسرطان. وقد ارتبطت طريقة عمله بقدرته على الارتباط المتبادل مع قواعد البيورين في الحمض النووي مما يتداخل مع آليات إصلاح الحمض النووي ال DNA ويسبب تلفه, وبالتالي يسبب موت الخلايا المبرمج للخلايا السرطانية، ويستخدم لعلاج السرطانات بما في ذلك القولون و الثدي والخصية والمبيض وعنق الرحم والبروستات والرأس، الرقبة، المثانة، الرئة، الأورام اللمفاوية، الساركوما، البنكرياس وبسبب الآثار الجانبية غير المرغوب فيها للعقار مثل مشاكل الكلى الشديدة، وردود الفعل التحسسية، وانخفاض المناعة ضد العدوى، واضطرابات الجهاز الهضمي، والنزيف، وفقدان السمع خاصة في المرضى الأصغر سناً، فقد تم أيضاً استخدام أدوية نباتية أخرى أمنة مضادة للسرطان (Morris et al., 2023).

### 5.8.1.2. الأسس الجزيئية و الوراثة لسرطان القولون

ان للوراثة الجزيئية دوراً مهماً في أبحاث سرطان القولون ( Xie et al., 2024 )، وذلك بتحليل الاختلافات الجينية الخلوية، والتغيرات فوق الجينية، والطفرات الجينية، وتنظيم التعبير الجيني (Budinská et al., 2022) ، مما يظهر صعوبة ايجاد المسببات الرئيسة لسرطان القولون. كما يساعد هذا في تحديد الجينات المسببة للأمراض المحتملة، ومسارات الإشارات المرتبطة بالسرطان، والطفرات المحفزة، مما يعزز الأدلة المهمة للعلاج وتطوير الأدوية المطلوبة (Ciardiello et al., 2022) .

### 1.5.8.1.2 جين PIK3CA

قد اكتشف الباحثون العديد من الجينات المرتبطة بحدوث سرطان القولون والمستقيم وتطوره بواسطة الدراسات الجينومية، بما في ذلك على سبيل المثال جينات *KRAS* ، *APC* ، *PIK3CA* (2020) وان جين *SMAD4* ، (Cen et al., 2021; Prior et al., 2021) و *BRAF* (Lan et al., 2021) وان جين *PIK3CA* حظي باهتمام واسع النطاق. حيث يلعب دوراً رئيساً في مسار إشارات الخلية، وترتبط طفراته ارتباطاً وثيقاً بحدوث سرطان القولون والمستقيم وتطوره (Zhuang et al., 2021).

يُشفر جين *PIK3CA* الوحدة الفرعية المحفزة Phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks) والموقع الجيني (3q26.32) الكروموسوم 3 :الذراع الطويلة: (q) من الكروموسوم (Wu et al., 2014) وهو أحد أكثر الجينات شيوعاً في سرطان القولون والمستقيم وله دور كبير في نمو الخلايا، والإشارات داخل الخلية. ، حيث يُمثل ما يقارب 15%-20% (Rosty et al., 2013). يمكن أن تؤدي

الطفرات في جين *PIK3CA* إلى تنشيط مستدام لمسار إشارات Phosphoinositide 3-kinases (*PI3K*) / بروتين كيناز (*AKT*) (Chen et al., 2021)، مما يعزز تكاثر الخلايا السرطانية وبقائها وهجرتها وغزوها وتكوين الأوعية الدموية ومقاومة الأدوية لها (Stefani et al., 2021). لا تؤثر طفرات جين *PIK3CA* على مسببات سرطان القولون والمستقيم فحسب، بل ترتبط أيضًا بالخصائص السريرية وتوقعات المرض واستجابته للعلاج (Heczko et al., 2023 ; Voutsadakis, 2023). لذلك، تساعد بعض الدراسات لفهم دور وآلية طفرات جين *PIK3CA* في سرطان القولون على الكشف عن الأساس المرضي الجزيئي لسرطان القولون، وتوفر أساساً وإرشادات للتشخيص المبكر والتصنيف الجزيئي وتقييم المخاطر والعلاج الموجه والعلاج المناعي لسرطان القولون والمستقيم (Salem et al., 2020; Ye et al., 2020).

### 2.5.8.1.2. جين *p53* (TP53) Tumor protein

جين مثبط للأورام والوقاية من السرطان ويطلق عليه ب(حارس الجينوم) يقوم بإعطاء الأوامر للخلايا المريضة والتالفة على قتل نفسها بعملية الموت المبرمج الخلايا (Marei et al., 2021) وتم اكتشافه عام 1979 من قبل العالم David Lean وتحدث الطفرات فيه نسبة 55% من الأمراض السرطانية التي تصيب الإنسان حيث يعمل على تشفير البروتين Tumor protein P53 ويسمى بالبروتين الكابح للورم الذي يتكون من 393 حمض أميني. ويتكون *P53* من 10 انترون و11 اكسون (Chen et al., 2022).

يقع الجين *P53* على الكروموسوم 17 الذراع القصير P arm الموقع الدقيق 17p13.1 .

كما يلعب الجين *P53* دوراً مهماً كمنظم لتحديد مصير الخلية إذ يقلل من انقسام الخلية. وأن آلية الاشارات التي يتلقاها الجين لازالت غير واضحة إذ يعتقد ان قطع من DNA تقوم بتحفيزه حيث ان نسبة الدم داخل الورم الخبيث تكون منخفضة، لذا تعمل الخلية المسرطنة وبشكل سريع بأرسال اشارات لتكوين اوعية دموية جديدة مما يحفز جين *P53* على معالجة الامر والقضاء على الخلايا السرطانية قبل تكوين الاوعية الدموية (Harakeh et al., 2023).

يتواجد جين *P53* في مركز النواه والسيتوبلازم حيث يعمل كمنظم لعمل الخلايا للسيطرة على انقسام الخلية لوجوده في نقاط التفريش الخلية مما يساعد على تباطؤ عملية الانقسام تصحيح الضرر. وهذا الضرر يكون نوعين اما يحدث داخل الخلية مثل اخطاء التي الناتجة من تضاعف DNA او الاجهاد التأكسدي

أو أضرار خارجية مثل التعرض للأشعة فوق البنفسجية أو المواد الكيميائية أو السموم وهذه الأخطاء قد تسبب تكسر قطع الحمض النووي مما يؤدي إلى تنشيط بروتينات الكيناز الذي يعمل على تحفيز وزيادة مستويات البروتين الورم فيوقف دورة الخلية عند الطور G1.phase الذي يتم فيه نمو الخلية ويوقف انتقالها إلى الطور S. phase التي يتم فيه تضاعف DNA إذ يعمل على ربط بروتين P21 مع الكيناز المنشط لدوره الخلية ويثبطها , وفي حالة عدم اصلاح الضرر يعمل P53 بتوجيهه إلى الخلايا بقتل نفسها لتوقف نسخ DNA المتضرر بعملية (الموت المبرمج) تشمل عملية الموت الخلوي المبرمج (Apoptosis) مجموعة من التغيرات البيولوجية المنظمة داخل الخلية، وتُفَعَّل من خلال جينات وإنزيمات محددة مثل الكاسبيزات (Caspases) التي تعمل على تنفيذ عملية تفكيك الخلية وظيفياً (Gomzikova *et al.*, 2021). تُحَفِّز المسارات الداخلية للاستماتة عبر الميتوكوندريا، حيث تلعب بروتينات مثل Bax و Bak – المنتميتين إلى عائلة – Bcl-2 دوراً محورياً في تنظيم نفاذية الغشاء الميتوكوندريا، مما يؤدي إلى تحرر Cytochrome c وتنشيط كاسبيزات كما يتم تنشيط جينات محفزة للموت الخلوي مثل Noxa وPUMA، والتي تساهم في تعزيز وظيفة Bax و Bak في هذا المسار (Abuetabh *et al.*, 2022).

يعمل P53 تثبيط مسار Intrinsic Apoptosis وتأثير المركبات الفعالة للنبات الاشواغندا في استقرار p53 ومنع تحللة عبر تثبيط mdm2 لمسار الداخلي يبدأ من الميتوكوندريا عبر خلخلة توازن عائلة BCL-2 ، وتشكّل ثقب Bax/Bak في الغشاء الخارجي للميتوكوندريا، ثم إطلاق السيتركروم c وتفعيل كاسباس-9 ثم كاسباس-3. يفعّل p53 هذا المسار بطريقتين أساسيتين:

1. معتمد على النسخ: رفع تعبير BAX, PUMA, NOXA وخفض الجينات المضادة للاستماتة، ما يدفع نحو نفاذية الميتوكوندريا

2. غير معتمد على النسخ (ميتوكوندري مباشر ارتباط p53 ببروتينات مضادة للاستماتة BCL-2, (BCL-1), MCL-1 وتعطيلها، أو تنشيط BAK مباشرة، فيُسْرَع نفاذية الميتوكوندريا

محصلة ذلك عندما يتجاوز الضرر حدّ الإصلاح، يُرَجَّح p53 كفة الموت الخلوي المبرمج لحماية الكائن الحي من التحوّل الخبيث (Huang *et al.*, 2025).

## 2.2. النباتات الطبية

نشأت طرق علاجية جديدة في السنوات الأخيرة، إذ برز العلاج بالنباتات أو العلاج الطبيعي كواحد من أهم الخيارات الواعدة، إذ يمتاز العلاج بالنباتات باستخدام المستخلصات النباتية التي تحتوي على مزيج من مركبات الثانوية، والتي يمكن توجيهها نحو أهداف علاجية مختلفة، وبالتالي فإن تقييم التأثيرات المضادة للأورام للعلاجات النباتية والتعرف على الآليات الجزيئية الأساسية المسؤولة عن قدرتها المضادة للأورام سيوفر دليلاً علمياً لخيارات العلاج البديلة عادةً ما يُسبب العلاج الكيميائي لسرطان القولون آثاراً جانبية. حيث تعتمد شدة وأنواع الآثار الجانبية التي قد تُعاني منها على طبيعة العلاج الذي يتناوله المريض، وقد تختلف من شخص لآخر أحياناً تكون الآثار الجانبية مؤقتة، ويمكن الوقاية منها أو تثبيطها أو السيطرة عليها. تم استعمال أنظمة الطب التقليدي في جميع أنحاء العالم لسنين طويلة لما لها خصائص طبية، مما يوفر فرصة للباحثين لتقييم فعاليتها ضد الأمراض مثل السرطان (Mendonça et al., 2020)، كانت النباتات مصدراً قيماً للمنتجات الطبيعية للحفاظ على صحة الإنسان والحيوان. سيكون العلاج بالمواد النباتية أكثر فعالية من حيث أقل كلفة وصدى للبيئة مع عدم وجود آثار جانبية وذات تأثير قليل على صحة الإنسان. وفقاً لمنظمة الصحة العالمية فإن النباتات الطبية ستكون أفضل مصدر للحصول على مجموعة من الأدوية كما تلعب النباتات دوراً مهماً في اكتشاف أدوية جديدة وتستخدم في الطب التقليدي (Ekor,2014;Rahman et al.,2022; Esmaealzadeh et al., 2022)

3.2. نبات الودانية (الأشواغندا) *Withania somnifera*

يعد نبات أشواغندا *Withania somnifera* من النباتات الطبية والاقتصادية يعود إلى العائلة الباذنجانية (Solanaceae) ويعرف باسم "الكرز الشتوي الهندي" أو "Indian Ginseng"، ينمو النبات عادة في المناطق الجافة في الدول الآسيوية مثل الهند وباكستان وأفغانستان وكذلك جنوب أفريقيا وغيرها (Paul et al.,2021) وأحياناً يسمى في شبة الجزيرة العربية بالععبب (Jamalludin and Manshoor, 2022). مثل أفغانستان، جزر الكناري، الصين، الكونغو، مصر، الأردن، المغرب، نيبال، باكستان، جنوب وشرق أفريقيا، إسبانيا، سريلانكا، السودان، واليمن (Rajeswara Rao et al.,2012) كما يعد الأشواغندا واحد من أهم أعشاب الأيورفيدا، لذلك سمي النبات باسم ملكة الأيورفيدا النظام التقليدي للطب (طب الصحة العامة) (Singh et al., 2021) Ayurvedic practitioners لما تحققه من أهداف علاجية وخصائص طبية استثنائية (Gaurav et al.,2023)، غالباً ما يحدد نظام الأيورفيدا آلاف النباتات المفيدة في الوقاية من الأمراض والحفاظ على الصحة، بما في ذلك نبات

*Withania somnifera* لأنها تحتوي على العديد من المركبات الفعالة مما جعلها ذات قدرات علاجية مختلفة (Sadiq Laylani and Saleh, 2018).

يعد نبات *Withania somnifera* (أشواغاندا) واحداً من أنواع النباتات المعمرة القيمة ذات التطبيقات العلاجية الواسعة في نظام الطب التقليدي والحديث (Datta et al., 2011) وكما تبين ان النبات مصدر غني بالمواد العديدة التي تم تقييمها واكتشافها من قبل الطب الصيني التقليدي (Chauhan et al., 2022). تمتاز الأوراق وجذور النبات باحتوائه على مركبات عديدة من Withanolides, Steroidal lactones حيث اعطى هذا النوع من الستيرويد كثير من العناية لدى الباحثين ليس بسبب التركيب المعقد فيها بل بسبب انشطتها الحيوية المتعددة وامكانيات البحث والتطوير في مجال الادوية (Chen et al., 2011) بالإضافة الى الفلافونيدات والتانينات والقلويدات ، والتي تعد أهم المركبات الفعالة في النبات (Ha et al., 2022).

وتعزى أهمية هذه المركبات إلى دورها الاساس في صناعة الأدوية وخاصة المتعلقة بأمراض القلب والسرطان والرئة والتوتر العصبي والنفسي وتنشيط الذاكرة وتقوية المناعة (Gaurav et al., 2023). وقد أظهرت المستخلصات العشبية *Withania somnifera* نشاط كبير مضاد للسرطان يعمل بواسطه مجموعة متنوعة من الآليات. علاوة على ذلك، كشفت الدراسات اختبار السمية للنبات وتحديد الجرعات المناسبة من *Withania somnifera* غير السامة والأمنة للانسان (Wadhwa et al., 2013).

### 1.3.2 الوصف العام للنبات Description of the Plant

يعد (Ashwagandha) (*Withania somnifera*) أحد الأنواع النباتية المعمرة والمهمة ذات التطبيقات العلاجية الواسعة في نظام الطب التقليدي والحديث (Mikulska et al., 2023) كما ويعتبر نبات الاشواغاندا من النباتات العشبية دائمة الخضرة يبلغ طوله حوالي (60-120) سم (Durda and Khairy, 2023), يزرع المحصول بشكل عام في موسم الخريف, أما من الناحية الشكلية, تعتبر نبتة الاشواغاندا منتصبه, وسميكة, و يحمل جذعها الأساس أوراقاً بسيطة ذات لون أخضر باهت ذات شعيرات رفيعة وبيضاء على سطحها العلوي , عارية, لامعة , وإهليلجية, أوراق كاملة, متقابلة, تمتد حتى طول 10 سم, الفروع منتصبه, والازهار على شكل جرس يبلغ طولها حوالي 1سم تنمو على اطراف الاغصان الجانبية بشكل عناقيد. وبعد انتهاء التزهير تتكون ثمارها الصغيرة بحجم 6 ملم على شكل أخضر التوت وتتحول إلى اللون البرتقالي والأحمر عند النضج محاطة بأوراق كأسية لحمايتها, البذور صفراء ويبلغ قطرها حوالي 2.5 ملم (Dontha et al., 2015). نوع الجذر في النبات هو اصفر شاحب اللون يصل

طولة حوالي 15-25 سم (Macharia et al., 2023A). والجذر يتطلب ظروف مناخية جافة لتطوير جودته فتكون لحمية ويتغير لتصبح اسطوانية الشكل عند تجفيفها ويكون شكلها مائل إلى السمرة عند طحنه وتحويله الى مسحوق (Atta and Al-Ani, 2015). الساق والأوراق والكأس، مغطى بشكل متفرق بغطاء مشعر ناعم. (Shehata et al., 2024).



الصورة (1-2): نبات الاشواغندا *Withania somnifera* (A) , الجذور ومطحون الجذر (B) الصورة (C) الأزهار (D) الاوراق (E) الثمار (Sengupta et al., 2018)

### 2.3.2. الاسماء الشائعة وتصنيف النبات Common names and Taxonomy

تعددت اسماء النبات حسب اللغة واماكن تواجده حيث يسمى باللغة السنسكريتية الاشواغندا Ashwagandha كلمة "أشوى" تعني الحصان و"غاندا" تعني العطر ويذهب الآخرون إلى أن لها رائحة تشبه رائحة الحصان، أما باللغة الانكليزية يسمى كرز الشتاء Winter cherry وباللغة الهندية يسمى *Withania* "الجينسنغ الهندي" باعتباره مادة مُتكيفة أو منشطاً في الطب التقليدي الهندي القديم أما في اللغة العربية يسمى بجوز المرج أو العيبب المنوم ,حب الكاكنج ويعرف بالتسمية المحلية سم الفراخ وهذه التسمية تعطيه صفة السمية وبالاخص لصغار الحيوانات كفراخ الدواجن (Ahmed et al., 2012; Paul et al., 2021).

يعود نبات الاشواغندا إلى العائلة الباذنجانية Solanaceae والاسم العلمي للنبات *Withania somnifera*

Domain: Eukaryotic

Kingdom: Plantae (Plants)

Sub kingdom: Tracheaobionta (Vascular Plant)

Super division: Spermatophyta (Seed Plants)

Division: Magnoliophyta (Flowering Plants)

Class: Magnoliopsida (Dicotyledonous)

Sub class: Asteridae

Order: Solanales

Family: Solanaceae

Genus: *Withania*

Species: *Somnifera*

Binomial name: *Withania somnifera* (L.)

(Atta and Al-Ani, 2015)

### 3.3.2. التركيب الكيميائي للنبات Chemical Composition of the Plant

أجريت العديد من الدراسات لمعرفة التركيب الكيميائي لنبات *Withania somnifera* كيميائياً على نطاق واسع، مما أدى إلى عزل وتوصيف عدة مجموعات من المكونات الكيميائية، والتي لها أهمية بيولوجية ودوائية كبيرة. تعد الأجزاء الهوائية والجذور والثمار لهذا النوع مهمة جداً كما ان مصادر بعض المركبات الثانوية مثل 12 أو أكثر من القلويدات و 40 withanolides والعديد من sitoindosides. إلى جانب ذلك، يشتمل النبات على عدد من المركبات الثانوية الأخرى، بما في ذلك flavonols glycosides و phenolics، و reducing sugar ، starch ، glycosides (Saleem et al., 2020)، ومجموعة متنوعة من الأحماض الأمينية بما في ذلك aspartic acid , proline ، tyrosine ، alanine ، glycine ، glutamic acid ، cysteine و tryptophan وكمية كبيرة من الحديد (Baghalpour et al., 2023 ; Aljubory et al., 2017).

عدت جذور الاشواغندا *Withania somnifera* أكثر الأجزاء في النبات باحتوائها على المركبات الثانوية لما تمتلكه من دور اساس ونشط كمضاد للأكسدة ومزيل للجذور الحرة ومن المركبات الايضية الثانوية التي توجد في جذور نبات الاشواغندا مثل :

1-القلويدات (Alkaloids) تشمل Withananine ، Somniferine ، Somninine ، Somniferinine ، pseudotropin ، pseudowitanin ، kuskohigrin ، choline ، anaferin,isopeletierin ( كما تمتلك المركبات دورا مهم في تخفيف من آثار التوتر العصبي والقلق , وتوفير حماية مضادة للاكسدة(Das et al.,2021) ).

2- الفلافونويدات Flavosnoid : عبارة عن نواتج أيضية ثانوية نباتية متنوعة ذات أنشطة بيولوجية مختلفة. يتم تصنيعها من الفينيل الأنين أو التيروزين عبر مسار الفينيل بروبانويد في *Withania somnifera* توجد الفلافونويدات في جميع أجزاء النبات، بما في ذلك الثمار، التوت، الأوراق، الجذور .  
3--O *Withania somnifera* ( Ezez et al.,2023;EL-Hefny et al.,2020) التي تشمل 3--O glycosidic، rutinoid، 6,8-dihydroxycemferol، كيرسيتي quercetin ومشتقه 3--O glucoside-rutinoid ( Kyathanahalli et al., 2014).

3-اللاكتونات الستيرويدية Steroidal lactones يحتوي علي الويثانوليدات witanolides وهي مجموعة من الاكتونات الستيرويدية التي تتكون من C-28 يكون تركيبها الأساس هو الإرغوستان Ergostane،الذي يمثل نوعاً من الأنواع الستيرويدية مع أكسدة C-22 وC-26 لتكوين حلقة لاكتون سداسية الاعضاء(Girme et al.,2020). يمتلك ويثانوليدات Withanolides الأنشطة البيولوجية الرئيسة للنبات ومستخلص النبات وقد تم توضيح آليات مختلفة لهذه الأنشطة الدوائية، كما اتضح أن أنشطة مضادات الأكسدة والتخلص من الجذور الحرة للنبات ترجع إلى وجود ويثانوليدات withanolide، وتشمل ويثانوليدات A-Y withanolide ، وويتادومنيفيرين A witaomniferin ، وويتاسومنيفيرول A-C witasomniferols (Modi et al.,2022)، تعتبر ويثافيرينات withaferin مجموعة من المركبات الفعالة في النبات، وتشمل ويثانون Withanone ويثافيرين أ Withaferin-A (Girme et al.,2020).

4-الاملاح والعناصر المعدنية :وعبر التجارب ظهر عدد من المركبات الكيميائية والمعدلة رجنية التي تعزز الصحة وهي : التربينويدات Terpenoids ، Anaferine ، Cuscohygrine ، Tropine ، Anahygrine وكذلك المعادن مثل السيلينيوم Se والمغنيز Mn والحديد Fe والزنك Zn والنحاس Cu والنيكل Ni (De et al., 2022; Singh et al., 2021).

5-الستيرويدات النباتيةPhy tosterol : توجد في نبات الاشواغندا مركبات تشبه الكولسترول تسمى الفيتوستيروولات التي لها دور مهم في التخلص من الكولسترول الضار وله اهميه في تحسين صحة القلب بالاضافة الى البيتا سيتوستيرول الذي يتمثل بدوره كمضاد للالتهابات ومضاد للأكسدة وهناك مركبات اخرى تتكون من Withanolides توجد في السيقان والاوراق والجذور (Girme et al., 2020) مثل ستيغماستيرول ، Stigmasterol ، بيتا-ستيرول- B- sitosterol ، ستيغماستادين ، Stigmastadien ، والسيتويندوسيدات Sitoindosides ،بالإضافة الى مركبات السيتويندوسيدات (Saleem et al.,2020)(VII, VIII, IX, and X) Sitoindosides.

### 4.3.2. الاستخدامات الطبية

*Withania somnifera* هو نبات طبي أيورفيدي Ayurveda تم استخدام مستخلصات جذوره لخصائصه المضادة للأكسدة وكذلك للحد من نمو السرطان كما ظهر عند استخدام مغلي الجذور لنزلات البرد والقشعريرة، ولزيادة قوة الرحم بعد الإجهاض أو الولادة تم استخدام منقوع لحاء الجذر لعلاج الربو، كما وتُعزى الخصائص العلاجية للأوراق والجذور إلى Withaferin A وبالإضافة إلى ذلك، فإن النشاط المضاد للسرطان يعود إلى وجود مكوناته الرئيسية وهي ويزافيرين-أ وويتانوليد-د، التي تثبط بروتين كيناز المعتمد على الحمض النووي الرايبوي، مما يؤدي إلى زيادة موت الخلايا السرطانية ( Ahmad et al.,2024). يبدو أن ويزافيرين أ withaferin A هو مكون واعد يعالج الكثير من الحالات المرضية منها الزهايمر حيث يعمل عن طريق تقليل تراكم  $\beta$ -أميلويد وتثبيط تراكم بروتين تي-T. كما ثبت أن أشواغندا تحيد التأثيرات السامة (A $\beta$  (Amyloid beta) ، وهو ما يؤثر على ضعف الإدراك العصبي أثناء الإصابة بفيروس نقص المناعة البشرية ( Dubey et al.,2021) ) لا يعمل ويزافيرين أعلى تقليل تراكم  $\beta$ -أميلويد فقط يمنع تنشيط الجينات التي تُسبب الالتهاب داخل الجهاز العصبي، وهذه الجينات عادةً يتم تحفيزها أو تشغيلها بواسطة بروتين يُسمى NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor- kappa B) (Bhargava et . al.,2019).

كما تمتلك الأوراق خصائص مضادة وواقية للكبد ومضادة للبكتيريا و مدرة للبول. (Baghalpour et al., 2023; Paul et al., 2021).

وفي دراسات أخرى تم طحن الجذور المجففة لنبات *Withania somnifera* وصنعها على شكل أقراص بوزن 0.5 غم لكل منها وتم إعطاؤها بجرعة 2 قرص 3 مرات يوميًا مع الحليب لمتطوعين أصحاء لمدة عام واحد أظهرت النتائج زيادة معنوية في الهيموجلوبين، كرات الدم الحمراء، وميلانين الشعر (Gaurav and Naveen,2015).

لوحظ أن جذور نبات أشواغندا *Withania somnifera* على شكل مسحوق أدى إلى تحسين فعالية الجهاز التكاثري بشكل كبير حيث كان هناك زيادة في عدد الحيوانات المنوية وتحسن في شكل الحيوانات المنوية وزيادة في حركتها (Alsuhaime et al.,2024 ; Fiala et al.,2021) مع زيادة هرمون التستوستيرون الذي ينظم الكثير من الوظائف الهامة للإنسان (et al.,2024) كذلك يعمل على زيادة احتمالية الحمل لدى النساء كما لوحظ تحسن في المستوى الهرموني وزيادة في إنزيمات مضادات الأكسدة وفيتامينات A و C و E في بلازما السائل المنوي (Nasimi et al .,2018). أظهرت عدد من الدراسات تأثيراً مفيداً على مستوى الدهون في الدم، في دراسة أجريت على الفئران البيضاء المصابة بفرط كوليسترول الدم، لوحظ انخفاض في مستويات الكوليسترول *Withania somnifera* (Poddar et al.,2020).

كما وأن مستخلصات الأشواغندا تساعد في تقليل التوتر حيث حددت عدد من الدراسات أجريت عام 2021 تبحت في استخدام أشواغندا لعلاج التوتر والقلق (Lopresti et al.,2021). حيث أظهرت النتائج لبعض التجارب السريرية إلى أن مستخلصات أشواغندا تساعد على النوم (Baker et al.,2022) كذلك يعمل النبات على تحسين اضطراب النوم (Cheah et al.,2021).

وقد تم تحديد المكون المسؤول عن تأثير القلق مؤخراً هو فيرولات دوكوناسيل (DF) Doconasyl ferulate وهو إستر طويل السلسلة مكون من حمض الفيروليك Ferulic acid مضاد للاكسدة يوجد في النبات يعدل نشاط مستقبلات معينة في الجهاز العصبي تنظم هذه المستقبلات الحالة النفسية والعاطفية مثال مستقبلات GABA أو مستقبلات NMD (Maccioni et al.,2021).

تشير بعض الدراسات الطبية إلى أن نبات الأشواغندا قد يكون له أيضاً تطبيقات في علاج كوفيد-19 لامتلاكها العديد من الخصائص القيمة مثل الحفاظ على التوازن المناعي وتنظيم الالتهاب وقمع السيتوكينات المؤيدة للالتهابات والتأثيرات الوقائية على العديد من الأعضاء ومضادات الإجهاد ومضادات ارتفاع ضغط الدم ومضادات السكري، وبالتالي قد تكون علاجاً إضافياً قيماً لمرضى كوفيد-19 (Shree et al.,2022) تشير الدراسات إلى أن وبتانوسيد Withanoside الذي يكون بانواع متعددة (I, II, IV, V) المعزول من الأشواغندا، قد يكون مثبط Protease الرئيس لفيروس SARS- / CoV-2 (Upendra et al.,2021 ; Khana e t al.,2020) بالإضافة إلى ذلك، يظهر أن Withanolides المعزولة من أشواغندا تمتلك نشاطاً مضاداً للفيروسات في علاج كوفيد-19 (Balkrishna et al.,2021).

كما أظهرت دراسة Kushwaha (2019) الدور المهم للمستخلص الكحولي للاشواغندا في حماية الكلى والكبد من التأثيرات الجانبية التي تسببه بعض العقاقير مثل Cisplatin و Gentamycin لاحتوائه على المركبات الفعالة (Philips et al.,2023 ; Azab et al.,2022; Ireland et al.,2021).

للنبات دور مهم في انخفاض مستوى الكورتيزون وهو هرمون الستيرويد المكون من 21 ذره كاربون يفرز من الغدة الكظرية كاستجابة للاجهاد (PubMed et al.,2024) ويحسن من وظيفة الجهاز التنفسي ويسهم في استرخاء العضلات الملساء مما يعزز من كفاءة التنفس ويُقلل من التقلصات العضلية في المسالك الهوائية (González et al.,2023). قد تقلل أشواغندا من ارتفاع نيتروجين اليوريا في الدم وحمض اللاكتيك والكورتيكوستيرون الذي يحدث أثناء التوتر عدم ممارسة الرياضة (Mishra et al.,2000) بالإضافة إلى ذلك، اقترح الباحثون أن اشواغندا يمكن أن تكون مفيداً لأولئك الذين يعانون من الأمراض المرتبطة بالإجهاد التأكسدي (Bucci et al.,2000). حيث يحتوي على مستويات عالية من مركبات الفلافونويد والمركبات الفينولية والمركبات المضادة للأكسدة. والعمل على إصلاح الضرر التأكسدي في الخلايا وبيروكسيد الدهون (Kanjiyal et al.,2021).

ويعد نبات الاشواغندا واحدة من النباتات الطبية المثيرة للاهتمام بشكل كبير مع التطبيقات الصيدلانية. و يعد عامل مضاد لكثير من الالتهابات مثل التهابات الرئة والتهابات السعال والالتهابات المسالك التنفسية وضد مشاكل الطمث (Tandon and Yadav, 2020), وقد استخدمت ثمار نبات الاشواغندا كعلاج لتقرحات الجلد (Baghalpour et al., 2023).

تعد مستخلصات أوراق وجذور *Withania somnifera* الميثانولية إلى أنها مصدر للمواد الكيميائية النباتية الجديدة التي يمكن أن تمنع حدوث السرطان. (jayaprakasam et al.,2003) علاوة على ذلك، ضد MDA-MB-231 ( srivastava et al.,2020 )، IMR-32، و MCF-7 الثديي (Alfaifi et al.,2016) HCT-15 والقولون (Parhar and Yadar et al.,2010 ; Bullar,2022).

أوراق نبات الاشواغندا لها خصائص مضادة للسرطان، لاحتواء النبات على العديد المركبات الثانوية التي تحفز الخلايا السرطانية على الموت الخلايا المبرمج. (Saleem et al.,2020) تم ملاحظة العديد من التغيرات المورفولوجية النسبية التي لوحظت في خلايا HepG2 عند التعرض لتركيزات متزايدة من المستخلصات النبات الكحولية للأوراق وساق وجذر نبات *Withania somnifera* ، والتي أظهرت

فعاليتها في تثبيط تكاثر خلايا Hep-G2 المعتمد على الجرعة وما يرتبط بها من تغيرات مورفولوجية اخرى (Kaplan et al.,2022) .

علاوة على ذلك، فقد أظهرت عدد من الدراسات أن الجذر والساق والأوراق الأشواغندا لها زيادة الحساسية الإشعاعية لتدمير الخلايا السرطانية (Palliyaguru et al.,2016) بوجود العلاج الإشعاعي او بالاشتراك مع انواع العلاج الكيميائي الاخرى (Mehta et al.,2021) ،أذ تظهر خصائص مضادة للسرطان.اذ ان يتانوليدات هي قلويدات موجودة في النبات تظهر إمكانات كبيرة لمكافحة السرطان. وهي أيضًا المركبات الأكثر واعدة التي تُظهر هذا التأثير، حيث تلعب دورًا رئيسيًا في تحفيز موت الخلايا المبرمج، حيث ان أشواغندا *Withania somnifera* فعالة ضد أنواع السرطان مثل سرطان الثدي والقولون والرئة والبروستات وسرطان الدم، حيث يعمل كعامل علاج كيميائي ضد العديد من أنواع سرطان الثدي المختلفة (Vashi et al.,2021) وسرطان الميلانين (Nagy et al.,2020).

وقد أثبتت العديد من الدراسات إن مستخلصات أوراق أشواغندا المائية والكحولية كانت ذات خصائص مضادة للسرطان بشكل كبير حيث تم تعيين العامل الرئيس والمركب الأول في قتل الخلايا السرطانية الانتقالية إلى أحد مكونات نبات الاشواغندا هو (*Withanone*) ، والذي يُسمى أيضًا عامل تثبيط الورم اما ويثافيرين أ هو مركب طبيعي من مركبات نبات الاشواغندا ايضاً تم استخدامه على نطاق واسع لخصائصه المضادة للأورام ضد نماذج السرطان المختلفة لتعزيز توقف دورة الخلية، وتوليد الأوعية الدموية ، والنشاط المضاد للانتشار وموت الخلايا المبرمج في خطوط الخلايا السرطانية المختلفة وأنشطة مضادة للسرطان (Tewari et al.,2022) .

وكما لوحظ أن استعمال *Withaferin A* (الفلافونويدات/الستيرويدات) كعلاج ذي امكانية عالية في محاربة السرطان .إذ يعمل على تثبيط نمو الورم وجعل العضو المصاب بالسرطان خالي من الورم بطريقة تعتمد على الجرعة ويقلل أيضًا من نمو سرطان الثدي والرئة والجهاز العصبي المركزي والقولون في المختبر (Tewari et al.,2022) وفي دراسة أخرى لـ (Kumar,2023) تم التحقق ، من الخاصية المضادة للسرطان لمستخلص جذور نبات أشواغندا عبر تقييم التأثيرات على تكاثر الخلايا وموت الخلايا ودورة الخلية لسلسلة الخلايا السرطانية بالإضافة إلى الأوراق والجذور، و أيضًا تم استعمال أجزاء أخرى من نبات أشواغندا، بما في ذلك البراعم والبذور وقد تمت دراسة أجزاء مختلفة من نبات *Withania somnifera* للتأثيرات العلاجية في أنواع السرطان ذات الأصول المختلفة. وقد تم تحديد التأثيرات المضادة للسرطان للنبات في الدراسة التي أجراها (Khazal et al., 2014) وفي دراسة أخرى، تم

استخدام مستخلصات جذر *Withania somnifera* لعلاج خلايا بطانة الوريد السري البشري (HUVEC) وهي خلايا تُستخدم كنموذج شائع لدراسة التغيرات الوعائية والتكاثر الخلوي وفي الدراسة نفسها تم تحديد Withaferin A باعتباره المركب النشط الذي يثبط تكاثر الخلايا نتيجة تأثيره على المسارات الجزيئية المنظمة لدورة الخلية، مما يمنع الخلايا من الانتقال بين مراحل الانقسام الخلوي، وقد يرتبط أيضًا بتفعيل مسارات تؤدي إلى موت الخلايا المبرمج (Apoptosis) (Atteeq, 2022).

أظهرت دراسات سابقة عند إجراء التجارب السريرية لمستخلص المائي لجذور نبات الأشواغندا على مرض السكري من النوع 2، يؤدي إلى خفض نسبة السكر في الدم ونقص الكوليسترول شحيمات الدم الدهون الثلاثية، HDL و VLDL و LDL (Surya et al., 2023 ; PubMed et al., 2024) أذ مركبات الأشواغندا مع أدوية السكري وخافضات ضغط الدم ومثبطات المناعة والمهدئات (Rana and Juneja, 2022).

### جدول (1-2): الاستخدامات الطبية لنبات أشواغندا *Withania somnifera*

المصادر	التأثيرات الطبية	المركبات/الأجزاء الفعالة	الاستخدام الطبي
Kanjilal et al., 2021; Khazal et al., 2014; Kumar, 2023; Vashi et al., 2021	تنشيط بروتين كيناز المعتمد على RNA ، تحفيز الموت المبرمج للخلايا السرطانية (Apoptosis) ، زيادة الحساسية للعلاج الإشعاعي والكيميائي، فعال ضد سرطانات الثدي، القولون، الكبد، الرئة، البروستات، الميلانين وسرطان الدم.	Withaferin A, Withanolide D, Withanolides, Withanosides	مضاد للأكسدة والسرطان
Dubey et al., 2021	يقلل تراكم $\beta$ -أميلويد، يمنع تنشيط NF- $\kappa$ B ، يحمي الخلايا العصبية، يحسن الإدراك العصبي، يخفف من تأثيرات $A\beta$ السامة.	Withaferin A	الأعصاب والزهايمر
Alsuhami et al., 2024; Vaidya et al., 2024	تحسين عدد وحركة وشكل الحيوانات المنوية، زيادة الخصوبة، تحسين الرغبة الجنسية، تحسين وظيفة المبايض، زيادة احتمالية الحمل.	مسحوق الجذور، Withaferin A، رفع التستوستيرون	الصحة الإنجابية
Lopresti et al., 2021; Baker et al., 2022	تقليل التوتر والقلق، تحسين النوم، علاج الأرق، رفع مستويات مضادات الأكسدة في البلازما.	Doconasyl ferulate (مستقبلات GABA/NMD)، مستخلصات الجذور	التوتر والقلق واضطرابات النوم
Philips et al., 2023 ; Azab et al., 2022	حماية الكبد والكلية من سمية أدوية (Cisplatin, Gentamycin)، إصلاح الضرر التأكسدي، تقليل بيروكسيد الدهون.	المستخلص الكحولي للجذور، المركبات الفينولية والفلافونويدات	الكبد والكلية
PubMed et	خفض سكر الدم، تقليل الدهون الثلاثية والكوليسترول	المستخلص المائي	الصحة الأيضية

al.,2024; Surya et al.,2023	(LDL, VLDL, H DL)، تحسين التوازن الأيضي.	للجذور، Withanolides	(السكري والدهون)
Tandon and Yadav, 2020	مضاد للالتهابات (الرئة، السعال، المسالك التنفسية، مشاكل الطمث)، تعزيز التوازن المناعي.	Withanolides، المركبات الفينولية	المناعة والالتهابات
Shree et al.,2022	تثبيط Protease الرئيسي لفيروس SARS-CoV-2، نشاط مضاد للفيروسات، تقليل السيتوكينات المؤيدة للالتهاب.	Withanosides (I, II, IV, V) Withanolides	مضاد للفيروسات (COVID-19)
Baghalpour et al., 2023; Paul et al., 2021	علاج نزلات البرد والربو، مقوي للرحم بعد الولادة/الإجهاض، مدر للبول، بديل المنفعة لتخثير الحليب في صناعة الجبن، علاج تقرحات الجلد.	مغلي الجذور، لحاء الجذور، ثمار و بذور النبات	استخدامات تقليدية أخرى

### 5.3.2. الفعالية المضادة للأكسدة Antioxidant Activity

يلعب الاشواغندا دوراً أساسياً كمضاد للأكسدة باحتوائه على المركبات الكيميائية النشطة التي تعمل على مكافحة الجذور الحرة وتقلل من التأثيرات الضارة للأكسدة بما في ذلك المركبات الفعالة مثل الفلافونويدات و Withaferin A و Withanolide و Sitoinosides VII-X والمعادن. حيث تعمل هذه المركبات على زياده نشاط وفاعلية الاشواغندا كمضاد للأكسدة حيث تعمل على تنشيط انزيم Superoxide, Dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GPX), Catalase (CAT) وفي دراسة اخرى عند عزل المركبات الفعالة Withanolides التي تعمل على تثبيط انزيم الاكسدة الحلقية (COX) Cyclooxygenases ومنع اكسدة الدهون (Nile et al., 2022) كما واطهرت الدراسات باحتواء المستخلص الكحولي لجذور نبات *Withania somnifera* على مركبات متعددة و فعالة لها دور مهم في النشاط المضاد للأكسدة حيث تمنع من تراكم الجذور الحرة في الخلايا والانسجة اذ تعمل على تقليل من التلف الناتج من الاجهاد التأكسدي وكما لها دور هذه المركبات في الحفاظ على الخلايا المنوية عند التخصيب داخل الرحم او التخصيب في المختبر ضد تأثيرات الجذور الحرة (Munir et al., 2022).

### 6.3.2. دور المستخلصات النباتية في رفع ROS لتفعيل موت الخلايا السرطانية

تُظهر العديد من المستخلصات النباتية دورًا محوريًا في تنظيم موت الخلايا السرطانية عبر التأثير على مستويات أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS). إذ تعمل المركبات الفعالة حيويًا، مثل الفلافونويدات، الألكالويدات، والترينويدات، على زيادة تراكم ROS داخل الخلية بما يتجاوز العتبة التي تستطيع الأنظمة المضادة للأكسدة الذاتية التحكم بها. هذا الارتفاع في ROS يؤدي إلى إحداث إجهاد تأكسدي يتسبب في تلف الميتوكوندريا وزيادة نفاذية غشائها، مما يحقّق انطلاق Cytochrome c وتفعيل المسار الداخلي

للموت المبرمج. (Intrinsic Apoptosis) إضافة إلى ذلك، يُسهم تراكم ROS في إعادة تنشيط بروتين p53 وتعزيز التعبير عن بروتينات مؤيدة للاستموات مثل PUMA و NOXA، مع تثبيط البروتينات المضادة للموت الخلوي مثل BCL-2. وبهذا، فإن المستخلصات النباتية لا تُعدّ فقط عوامل مضادة للأورام عبر خاصيتها المضادة للأكسدة، بل أيضاً عبر قدرتها على استغلال ارتفاع ROS كآلية علاجية لإعادة برمجة الخلايا السرطانية نحو مسار الموت الخلوي المبرمج (Villalpando-Rodriguez, and Gibson, 2021; Chen, 2025).

### 7.3.2. تدخل الأشواغندا (*Withania somnifera*) وآليات تثبيط p53

تحتوي الأشواغندا على وِثانوليدات أبرزها وِثافيرين (WFA) و وِثانول (Wi-N). تشير الدراسات إلى عدة مسارات يمكن أن تُفَعِّل p53 أو تُيسِّر الموت المبرمج عبر

**1- تعطيل بروتينات تُقَيِّد: (p53 (mortalin/HSPA9)** : أظهر وِثانول قدرةً على تعطيل مركب mortalin-p53؛ إذ إن mortalin يحتجز p53 في السيتوبلازم ويُعطل نشاطه النووي. فكّ هذا الارتباط يسمح بإعادة توطين p53 نووياً واستعادة نشاطه النسخي المحفز للموت المبرمج.

**2- دفع الميتوكوندريا نحو الموت المبرمج عبر إجهاد الميتوكوندريا و ROS** : يُحدث WFA/Wi-N إجهاداً تأكسدياً وتغيرات في جهد غشاء الميتوكوندريا وشكلها، بما يفضّل نفاذية الميتوكوندريا وتفعيل محور Bax/Bak كاسباسا وهو سياق يتقاطع وظيفياً مع تنشيط p53

**3- تثبيط تفاعل p53-MDM2** : ظهرت دراسات تُشير إلى قابلية بعض قلويدات/ وِثانوليدات الأشواغندا للارتباط بجيب MDM2 الماسك لببتيد p53، ما قد يعيق الارتباط ويُثبّت p53. هذه أدلة احصائية تحتاج تحقيقاً حيوياً وتجريبياً مُحكماً قبل الجزم. (Di Grazia et al., 2025).

### 8.3.2. التأثير التآزيرية بين العلاجات النباتية نبات الأشواغندا والعقاقير الكيميائية السيسبلاتين

أظهرت الدراسات الحديثة أنّ الجمع بين مركب وِثافيرين (Withaferin A) ، المستخلص النشط من نبات الأشواغندا، والسيسبلاتين يُحدث تأثيراً تآزيراً في قمع نمو الخلايا السرطانية. في النموذج السرطاني المبيضّي (A2780) وخط المقاومة (A2780/CP70) ، أعطى الجمع بين وِثافيرين A والسيسبلاتين بجرعة منخفضة (تأثيراً تراكمياً قوياً أدى إلى زيادة موت الخلايا عبر توليد أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) وتسبب في تلف الحمض النووي (DNA) ، ما مكّن من تقليل جرعة cisplatin

الضرورية لتحقيق النتيجة العلاجية المنشودة , علاوة على ذلك، تبين أنه عند استخدام مستخلص جذور الأشواغاندا كمهيئ (priming) قبل إعطاء السيسبلاتين في خلايا سرطان القولون HT-29 ، زادت فاعلية العلاج عبر تعزيز اختلال وظائف الميتوكوندريا ورفع مستويات ROS، مما أدى إلى موت خلية انتقائي للخلايا السرطانية دون إحداث أضرار ملحوظة في خلايا غير سرطانية تلك النتائج تُشير إلى أن الجمع بين المستخلص النباتي وثافيرين A أو مستخلص الجذر مع Cisplatin يمكن أن يُحقّق تأثيرًا علاجيًا أقوى، مع إمكانية تقليل الجرعة السامة للسيسبلاتين، مما قد يُقلل من الآثار الجانبية السلبية المرتبطة بالعلاج الكيميائي (Kakar et al.,2021).

# الفصل الثالث

## المواد وطرائق العمل

## **Materials and Methods**

## 3. المواد وطرائق العمل

## 1.3. المواد Materials

## 1.1.3. المواد البيولوجية والكيميائية المستخدمة Biological and Chemicals Materials

جدول (1-3) المواد الكيميائية المستعملة تبعاً لاسم الشركة والمنشأ

الشركة المجهزة والمنشأ	أسم المادة المستخدمة	
Pfizer (USA)	Penicillin	البنسلين
US biological/ USA	Trypsin	التريبسين
Qiagen (USA)	Rneasy Mini Kit (Cat. No. 74104)	عدة استخلاص RNA
Applied Bio systems (USA)	7900 HT fast system	عدة التسريع الخاصة بأختبار qRT-PCR
Qiagen (USA)	Primers	البادئات
Invitrogen (USA)	Synthetic DNA Kit Cat. No. 18064-071	عدة استخلاص متمم cDNA
Invitrogen (USA)	Superscript II reverse transcriptase	انزيم النسخ العكسي
United States – Michigan State University	Cisplatin	عقار السيسبلاتين
Capricorn (Germany)	Fetal bovine serum	مصل البقر الجنيني
Capricorn (Germany)	Roswell Park Memorial 1640-	الوسط الزرعي RPM-1640
BDH industries Ltd (Germany)	Phosphate buffered saline	محلول دارى الفوسفات الملحي
TROGE (Germany)	Streptomycin	ستربتومايسين
BDH industries Ltd (England)	Sodium Hydroxide	هيدروكسيد الصوديوم
BDH industries Ltd (England)	Ethanol	ايثانول
Fluka (Switzerland)	Crystel violet	صبغة Crystal Violet
LONZA (Switzerland)	Serum Free Media	الوسط الخالي من المصل

	(SFM)	
Biotek (USA)	Polymerase Chain Reaction	جهاز الـ PCR
Pasteur Institute of Iran (Tehran)	SW480	خط خلايا سرطان القولون البشري
SDFCL/ India	(DMSO)	Di-methyl sulfoxide

### 2.1.3: الأجهزة والمستلزمات المختبرية المستخدمة في الدراسة Laboratory Equipment and Supplies Used in the Study

جدول (2-3) الأجهزة المختبرية والأدوات المستخدمة في الدراسة مع الشركة المصنعة والمنشأ

الشركة المصنعة والمنشأ	اسم الاداة	
Sykam/Germany	كروماتوغرافيا السائل عالية الأداء	HPLC
LABOAO (China)	Graduated Cylinder	أسطوانة مدرجة
SPL/ Korea	Microtiter plates with 96-flat bottom well	أطباق الزرع النسيجي ذات 96 حفرة مسطحة القعر
Qrenier ( Germany)	Eppendorfs tubs	أنابيب إبندروف أحجام مختلفة
Biofil/Australia	Eppendorf tubes	انابيب ايبندروف
Nunc (Denmark)	Cryotubes	أنابيب تجميد خاصة معقمة
Afco-dispo (Japan)	Test Tube	انبوبة اختبار
Neuation/ India	Centrifuge	جهاز الطرد المركزي
Binder ( Germany)	Incubator	حاضنة
Memmert/ Germany	CO2 incubator	حاضنة مجهزة بثنائي أكسيد الكربون CO <sub>2</sub>
Afco – dispo (Japan)	Stand	حامل
Memmert/Germany	Water bath	حمام مائي
Jiassco (India)	Flasks	دورق
LABOAO (China)	Rubber Stoppers	سدادات مطاطية
Meheco (china )	Slides and coverslips	شرائح زجاجية
OZ BIOSCIENCES (France)	MTT assay kit	عدة فحص MTT
Gallen Kamp (U.K)	Oven	فرن
BD falcon (USA)	Microtiter reader	قارئ الصفائح الدقيقة
LABOAO (China)	Stirring Rod	قضيب التحريك الزجاجي

LABOAO (China)	Funnel	قمع
Falcon (USA)	Plastic bottles for tissue culture 25 cm <sup>2</sup>	قناني بلاستيكية للزراعة النسيجية حجم 25 cm <sup>2</sup>
K & K Scientific Supplier (Korea)	Laminar flow hood	الكابينة المعقمة
Sony (Japan)	Digital Camera	كاميرا رقمية
Quality Lab. System/ England	Vortex	مازج
Cypress Diagnostics (Belgium)	Micropipette of different sizes	ماصات مختلفة الأحجام
Genex/USA	Inverted microscope	المجهر المقلوب
OLYMPUS (Japan )	Microscope	مجهر ضوئي
Promega/USA	Fourier transform infrared	مطياف الأشعة تحت الحمراء
Sartorius/Germany	Electric sensitive Balance	ميزان الكتروني حساس
Biofil/Australia	Filter paper	ورق ترشيح

### 3.1.3. عدة الفحص

جدول (3-3) عدة الفحص المستعملة تبعا لاسم الشركة والمنشأ

المنشأ Origin	الشركة Company	الادوات Tools	ت
USA	Promega	GoTaq/1-Step-RT-qPCR system	1
USA	Promega	"Quanti-Fluor" RNA-System	2
USA	Elabscience	TRAIL ligand- ELISA Kit	3
Korea	Intron	Easy-spin™ (DNA free) total RNA extraction Kit	4

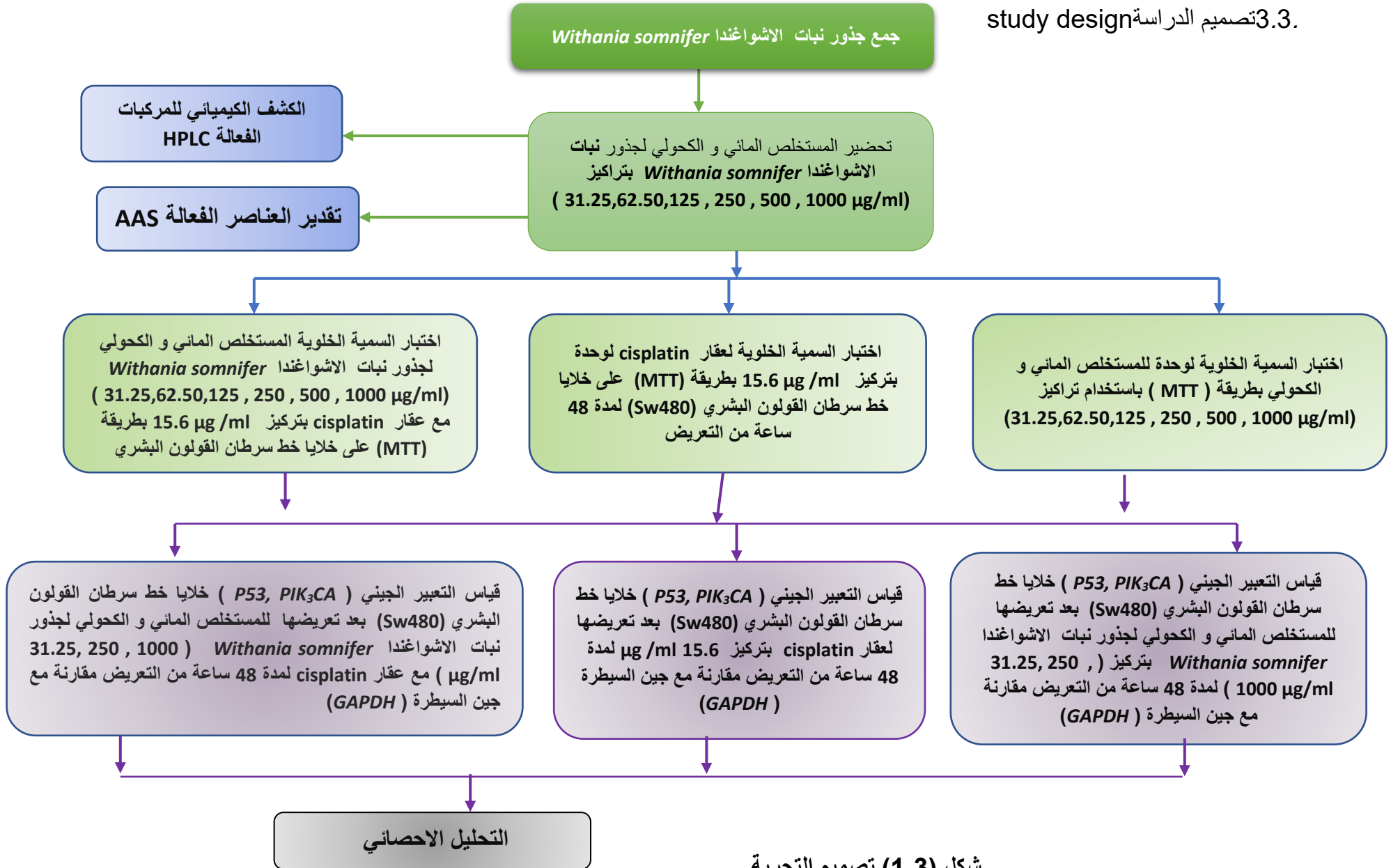
**2.3. طرائق العمل**

تم إنجاز جميع متطلبات وخطوات الجزء العملي في شركة روافد العلوم للتدريب والتطوير البحثي ومختبر UGENE باستثناء الجزء الخاص بجمع وتجفيف وتصنيف النبات. في محافظة بابل خلال الفترة من شهر شباط 2024 ولغاية شهر كانون الثاني 2025

**1.2.3. جمع وتصنيف النبات**

تم الحصول على جذور نبات الاشواغندا *Withania somnifer* من العشابين في محافظة (كربلاء – والنجف) وصنف النبات من قبل الدكتور جواد كاظم علي / جامعة القاسم الخضراء/ كلية الزراعة / قسم المحاصيل الحقلية , وتم تجفيفها في درجة حرارة الغرفة ضمن محيط جاف جيد التهوية، وطحنة بواسطة مطحنة كهربائية وتم حفظ المسحوق في قنية معقمة ومعتمة لحين الاستعمال. ثم حفظ المسحوق الجذور في حاويات بلاستيكية نظيفة بعيداً عن الضوء والحرارة والرطوبة لحين الاستعمال، وقد دُوّنت عليها المعلومات الخاصة بالنبات كتأريخ الجمع وموقع الجمع وكمية العينة.

3.3. تصميم الدراسة study design



شكل (1-3) تصميم التجربة

### 4.3.4 تحضير المحاليل والأوساط الزرعية والصبغات

#### 1.4.3.1 المذيبات المستخدمة في الاستخلاص Solvents used for extraction

ماء مقطر مزدوج التقطير (Double distilled water) .  
كحول أثيلي 70% Ethanol .

#### 2.4.3.2 المحاليل الخاصة بالزرع النسيجي Stock solutions for tissue culture

تم تحضير المحاليل وفقا لطريقة (Freshney, 2000) الخاصة بالزرع النسيجي .

#### 1.2.4.3 المضادات الحيوية Antibiotics

أذيت محتويات عبوة Benzyl Penicillin سعة 1000000 IU في 5 مل من الماء المقطر،  
ثم أخذ منه 0.5 مل، وأضيف إلى لتر واحد من الوسط الزرع وحفظ في درجة حرارة (-20) °م.  
أما عبوة streptomycin اخذ 1غم منه فتم إذابته في 5 مل من الماء المقطر ، ثم أخذ منه 0.5 مل  
وأضيف إلى لتر واحد من الوسط الزرع وحفظ في درجة حرارة (-20) °م.

#### 2.2.4.3 بيكاربونات الصوديوم Sodium bicarbonate

• 4.4 غم (Analar) NaHCO<sub>3</sub>

ماء مقطر 100 مل

عقم بالموصدة بدرجة حرارة 121°م لمدة 15 دقيقة ، ثم حفظ في درجة حرارة 4 °م .

#### 3.2.4.3 مصل البقر الجنيني Fetal bovine Serum

تم الحصول على المصل جاهز الاستعمال وتم حفظه بظروف معقمة لتجنب التلوث وتحت حرارة  
(20 - 0 م) لحين الاستخدام.

#### 4.2.4.3 Roswell Park Memorial Institute (RPMI- 1640) الوسط الزرع

يتكون هذا الوسط من المكونات التالية :

#### جدول (3-4) مكونات الوسط الزرع (RPMI- 1640)

الكمية/ الحجم	المادة
10.4 غم/لتر	الوسط الزرع RPMI-1640 with hepes buffer and L- glutamin
14 مل/لتر	بيكاربونات الصوديوم (NaHCO <sub>3</sub> ) 4.4 %
0.5 مل/لتر	المضاد الحيوي البنسلين Penicillin
0.5 مل/لتر	المضاد الحيوي الستربتومايسين Streptomycin
100 مل/لتر	مصل الدم البقري الجنيني Fetal Bovine Serum

والذي يتكون من :

يذاب 10.4 غم من مسحوق الوسط الزراعي RPMI-1640 في (800) مللتر من الماء الخالي من الأيونات Deionized Water , بعدها أضيفت مادة بيكاربونات الصوديوم ومحاليل المضادات الحيوية المحضرة , يعدل الأس الهيدروجيني الـ (pH الى 7.2), ثم أضيف مصل الدم البقري الجنيني , أكمل الحجم إلى لتر بأضافة الماء المقطر ومن ثم عقم باستعمال مرشح ذي ثقب (0.22 µm) للتخلص من البكتيريا ووزع على قناني زجاجية نظيفة ومعقمة ووضعت في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م لمدة ثلاثة أيام للتأكد من عدم تلوثها , وبعدها حفظت في درجة حرارة (4) °م لحين الاستخدام

#### 5.2.4.3. محلول دارى الفوسفات الملحي (PBS) Phosphate buffer Saline (pH 7.2)

حُضِر بإذابة 8 غم من كلوريد الصوديوم و 0.2 غم كلوريد البوتاسيوم و 1.15 غم فوسفات الصوديوم في 1000 مل ماء مقطر، عدل الاس الهيدروجيني إلى 7.4 عُقم بالموصدة بدرجة حرارة 121°م لمدة 15 دقيقة ، ثم حفظ في درجة حرارة 4°م لحين الاستعمال

#### 6.2.4.3. الفرسين Versene

أضيف 1 غم من مسحوق الفرسين (Ethylenediamine Tetra Acetic Acid (EDTA إلى 100 مل من الماء المقطر معاد التقطير، أذيب جيدا ثم عقم بالموصدة بدرجة حرارة 121°م لمدة 10 دقائق ، وحفظ في درجة حرارة 4°م .

#### 7.2.4.3. محلول التربسين- فرسين Trypsin - Versene solution

20 مل Trypsin solution

10 مل Versin solution

370 مل PBS

تمزج قبل الاستعمال في ظروف معقمة وحفظ في 4°م .

#### 8.2.4.3. الوسط الزراعي الخالي من المصل Serum Free Media (SFM)

حضر بالطريقة نفسها المذكورة في الفقرة (3-3-2-4) ولكن بدون إضافة المصل ويسمى هذا الوسط بالوسط الخالي من المصل Serum Free Media (SFM) .

**9.2.4.3. تحضير صبغة Methyl Thiazolyl Tetrazolium (MTT)**

حضرت صبغة MTT بحسب طريقة (Betancur-Galvis *et al.*, 2002) وذلك بأذابة 0.005 غم من مسحوق صبغة MTT في 1 مل من المحلول الدائري PBS في دورق زجاجي ، وضع الدورق على صفيحة مغناطيسية هزازة ثم رشح المزيج بمرشح ( 0.22  $\mu\text{m}$ ) لإزالة البلورات الزرقاء المتشكلة عنها ، حضرت الصبغة آنيا عند الأستعمال وحفظت في ظروف معقمة وفي مكان مظلم لتجنب تأكسدها في الضوء

**10.2.4.3. محلول صبغة (CV) Crystal violet:**

أذيب نصف غرام من مسحوق Crystal violet في (80 ml) من الماء، وأضيف إليه (20 ml) من الميثانول، ثم حُفظ في وعاء مظلم بدرجة حرارة الغرفة (Feoktistova *et al.*, 2016).

**11.2.4.3. اختبار Crystal Violet (CV)**

**المبدأ:**

عند موت الخلايا الملتصقة، تنفصل عن السطح السفلي للصفحة الدقيقة للحفر. يمكن تطبيق هذه الخاصية لقياس التغير في التكاثر بعد تحريض الموت بواسطة عوامل محددة. ونتيجةً لذلك، يُعد اختبار الكريستال البنفسجي طريقةً مبسطةً للكشف عن الخلايا الملتصقة عبر قدرة صبغة الكريستال البنفسجي على الارتباط بالبروتينات والحمض النووي للخلايا الملتصقة، ما يُشير إلى حيوية الخلايا. في حين أن الخلايا الميتة ستُفقد بالفعل أثناء خطوات غسل بروتوكول اختبار CV. (Feoktistova *et al.*, 2016)

**5.3. تحضير المستخلصات (المائية والكحولية) لجذور نبات الاشواغندا *Withania somnifer*****1. 5.3. تحضير المستخلص المائي لجذور نبات الاشواغندا**

تم تحضير المستخلص المائي الخام بأخذ 50 غم من مسحوق جذور الشواغندا ووضعها في قنينة زجاجية سعة 1 لتر واطيف له 140 مل من الماء بنسبة 1:7 (وزن-حجم) يترك الخليط لمدة 24 ساعة على المازج المغناطيس ، ثم رشح المزيج بواسطة الشاش ثم تم ترشيحه تحت ضغط مخلخل باستخدام قمع بخنر وجمع الرائق منة وركز باستخدام جهاز المبخر الدوار تحت الضغط المخلخل في درجة حرارية 45 م ° حتى بلغ الحجم 10 مليلتر ووضع في انبوبة اختبار لغرض استخدامه لاحقا ( Das *et al.*, 2001) .

**2.5.3. تحضير المستخلص الكحولي لجذور نبات الاشواغندا**

وحضر المستخلص الكحولي (70 %) بأخذ 20 غم من مسحوق جذر الشواغندا ووضع في دورق زجاجي سعة 1 لتر واضيف 140 مل كحول اثيلي بنسبة ( 7:1 وزن :حجم ) ثم تركة لمدة 24 ساعة على المزاج المغناطيسي, ورشح المستخلص بورق الترشيح واتمان رقم 1 في قمع بخنر مع التفريغ ركز الراشح باستعمال جهاز المبخر الدوار تحت الضغط المخلخل عند درجة الحرارة 40-45 م للتخلص من المذيب الكحولي اذ تم الحصول على مستخلص خام ووضع في انبوبة اختبار معقمة في الثلاجة لحين الاستعمال (Nadir ,1986)

**3.5.3. الكشف الكيمائي (الكمي) للمركبات الفعالة للمستخلصات جذور نبات الاشواغندا *Withania somnifera L*****1.3.5.3. استخلاص نبات الشواغندا *Withania somnifera L* :**

تم خلط 20 غرامات من جذور نبات الشواغندا *Withania somnifera L* ، مطحونة ناعماً، مع 100 مل من مزيج (الماء/ الإيثانولي) بنسبة (60/40) لمدة 24 ساعة. رُشِحَ الخليط، ورُكِّزَ المرشَّح تحت تفريغ (40 درجة مئوية) إلى حجم 5 مل. حُلِّلَ هذا المحلول بالماء باستخدام 5 مل من هيدروكسيد الصوديوم 2N لمدة 30 دقيقة. عُدِّلَ الرقم الهيدروجيني للخليط إلى 7 باستخدام حمض الهيدروكلوريك 2N، واستُخْرِجَت الأحماض الفينولية عن طريق الاستخلاص السائل/السائل باستخدام أسيتات الإيثيل (20 مللتر × 3). ثم جُمِعَت المستخلصات، وأزيل أسيتات الإيثيل تحت ضغط مُخَفَّض. أُذِيبَت البقايا في 7 مل من الميثانول، وحُلِّلَ 10 ميكرو لتر منها بواسطة كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء-High performance liquid chromatography (HPLC) (Raina-Fulton & Mohamad, 2018)

**2.3.5.3. كروماتوغرافيا السائل عالية الأداء (HPLC)**

أجري تحليل كروماتوغرافيا السائل عالية الأداء (HPLC) على نظام SYKAM HPLC (ألمانيا) المجهز بعمود C18-ODS (250 × 4.6 مم، 5 ميكرومتر). حُقنت عينات (100 ميكرو لتر) في النظام. تكوّن الطور المتحرك من 95% أسيتونتريل + 0.01% حمض ثلاثي فلورو أسيتيك (المذيب أ) و5% أسيتونتريل + 0.01% حمض ثلاثي فلورو أسيتيك (المذيب ب) بمعدل 1 مل/دقيقة. كان برنامج التدرج كما يلي: 10% أ من 0 إلى 5 دقائق؛ 25% من 5 إلى 7 دقائق؛ 40% أ من 7 إلى 13 دقيقة؛ ثم العودة إلى الظروف الأولية. تم الكشف عن المركبات الفينولية باستخدام كاشف الأشعة فوق البنفسجية المرئية عند

طول موجة 278 نانومتر (Ngamsuk et al., 2019). و كذلك تم تحليل الطيف الذري AAS للعناصر الفعالة

### 3.3.5.3 تقدير العناصر في النبات AAS الإمتصاص الذري الطيفي ( Atomic Absorption Spectroscopy )

قدرت العناصر في العينات النباتية (التي تم جمعها وتجفيفها وطحنها)، حيث تم هضم المسحوق النباتي بطريقة الهضم بالحامض أو الهضم الرطب (wet washing) حسب طريقة (APHA, 2017)، حيث تم وضع (3 غم) من مسحوق العينة النباتية المراد هضمها بداخل كأس (Griffin beaker) ذو حجم (25 مل)، ثم أضيف إليه (3 مل) من محلول حامض البيروكلوريك المركز وغطي الكأس باستخدام زجاجة الساعة (watch glass)، وتم التسخين بشكل هادئ وعلى صفيحة ساخنة كهربائية (hot plate)، وقمنا برفع درجة الحرارة بصورة تدريجية، وذلك لإتمام عملية الهضم وعند وصول المخلوط إلى مرحلة الجفاف نترك الكأس لكي يبرد، ونضيف مرة أخرى (3 مل) من محلول حامض النتريك المركز، ونغطي الكأس ونستمر في التسخين إلى أن تنتهي عملية الهضم، حيث نحصل على مخلوط يتكون بشكل رائق وملون بلون خفيف يسمى (light colored digestate)، وقمنا بعملية التبخير إلى أن تقترب من مرحلة الجفاف، وتم إضافة (5 مل) من محلول حامض الهيدروكلوريك المخفف مع الماء بنسبة (1:1)، ثم نقوم بعملية التدفئة، وذلك لإذابة العينة المتبقية بعد عملية الهضم، ومن ثم نضيف الماء المقطر، وتم عملية الترشيح وذلك للتخلص من المواد المتبقية وغير ذائبة، وتم ضبط حجم المحلول بحسب التركيز المتوقع في العينات إلى حجم (50 مل)، إذ تصبح العينة جاهزة للتحليل تم قياس إمتصاصية هذه العينات المهضومة باستخدام جهاز الإمتصاص الذري ( Atomic Absorption ) من نوع (SHEMADZU AA 7000 )

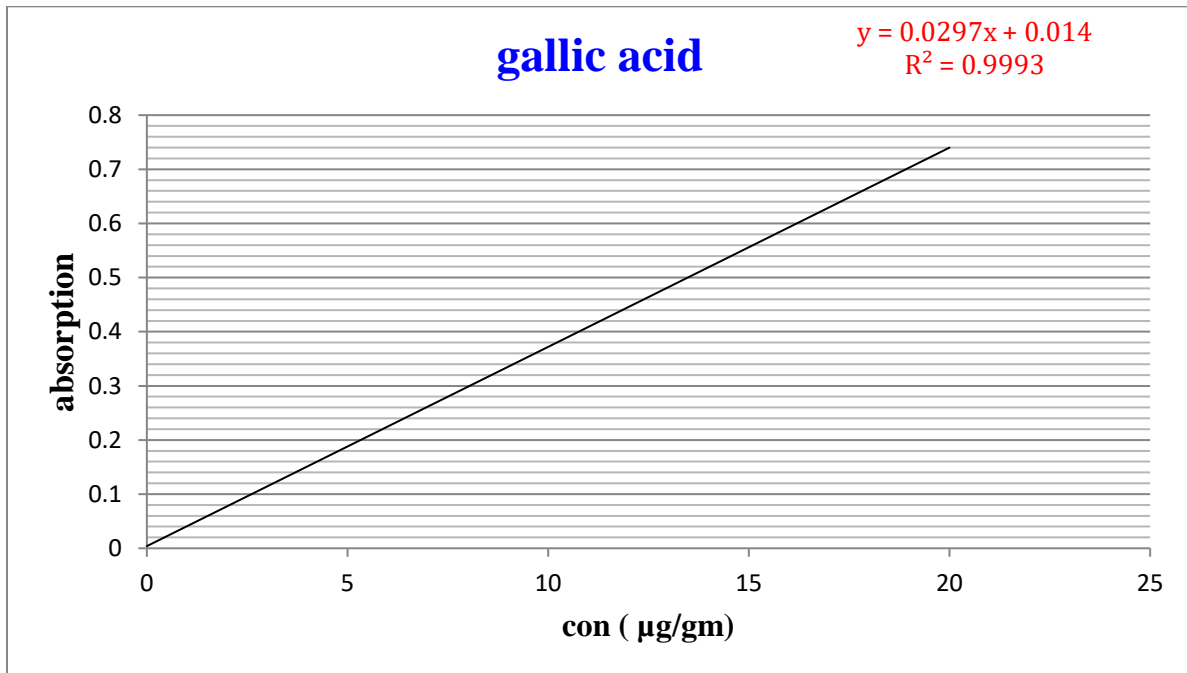
#### تهيئة المنحني القياسي:-

1. يتم تحضير محاليل قياسية عدد (4) من المحلول القياسي الرئيسي والذي عادة يكون بتركيز (1000 ppm).
2. باستخدام قانون التخفيف العام ( $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ ) يتم اجراء التخفيف اللازمة لتحضير المحاليل القياسية الاربعة بالتركيز
3. يتم تحضير محلول البلانك وعادة ما يكون ماء خالي من الايونات.

4. بعد تضييب الجهاز واختيار كل معطيات العنصر المراد تحليله يتم قراءة امتصاصية المحاليل القياسية الاربعة واستحصال منحنى المعايرة.
5. قراءة النماذج المجهولة لاستحصال التراكيز.

### 4.3.5.3. قياس المركبات الفينولية الكلية للنبات :

تم تحديد الكمية الكلية للمركبات الفينولية في المستخلص الإيثانولي باستخدام كاشف Folin - Ciocalteu القياسي. احتوى خليط التفاعل على 100 ميكرو لتر من المستخلص، و500 ميكرو لتر من كاشف Folin - Ciocalteu (ألمانيا) و1.5 مل من كربونات الصوديوم 20%. تم بعد ذلك خلط العينة في خلاط دوامي وخفت بالماء المقطر حتى الحجم النهائي البالغ 10 مل. بعد ساعتين من التفاعل، تم تحديد الامتصاصية عند 765 نانومتر واستخدامها لتقدير المحتوى الفينولي باستخدام منحنى المعايرة من حمض الغاليك (سيغما ألدريتش، ألمانيا). تم التعبير عن الكمية الكلية للمركبات الفينولية Gallic Acid Equivalents (GAE)



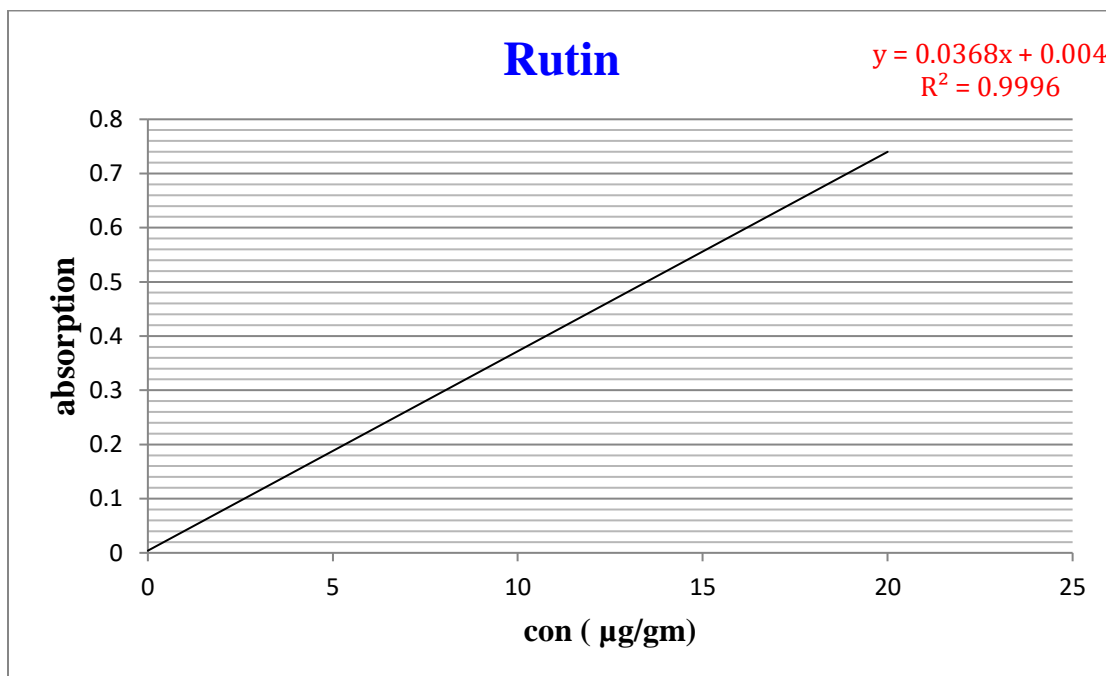
شكل (2-3) منحنى القياسي لمركبات الفينولات

(Absorbance)= y

(Coefficient of Determination)=R

## 5.3.5.3 قياس مركبات الفلافونويد الكلية للنبات

حُدّد محتوى الفلافونويد الكلي للمستخلص الخام باستخدام طريقة كلوريد الألومنيوم اللونية ، تم تحضير 50 ميكرو لترًا من المستخلص الخام (1 ملغم/مل من الإيثانول) حتى 1 مل من الميثانول، وخطها مع 4 مل من الماء المقطر، ثم إضافة 0.3 مل من محلول  $\text{NaNO}_2$  بتركيز 5%؛ وبعد 5 دقائق من الحضانة، أُضيف 0.3 مل من محلول  $\text{AlCl}_3$  بتركيز 10%، وترك الخليط لمدة 6 دقائق. بعد ذلك، أُضيف 2 مل من محلول  $\text{NaOH}$  بتركيز 1 مول/لتر، ووصل الحجم النهائي للخليط إلى 10 مل باستخدام الماء المقطر مرتين. ترك الخليط لمدة 15 دقيقة، وقُيس الامتصاص عند طول موجي 510 نانومتر. حُسب محتوى الفلافونويد الكلي من منحنى المعايرة. (Habibatni et al., 2017)



شكل (3-3) المنحني القياس القياسي لمركبات الفلافونويد - الكلية

(Absorbance)= y

(Coefficient of Determination)=R

## 6.3.5.3 قياس وتقدير مركبات القلويدات الكلية للنبات:

تم طحن 20 غم من كل مادة نباتية، ثم استُخلصت باستخدام كحول الميثانول (70) لمدة 24 ساعة في جهاز الاستخلاص (Soxhlet). ثم رشح المستخلص، ووضع المستخلص الميثانول في جهاز المبخرة الدوار تحت التفريغ عند درجة حرارة  $45^\circ\text{C}$  للحصول على مسحوق جاف تم الكشف عن وجود مركبات

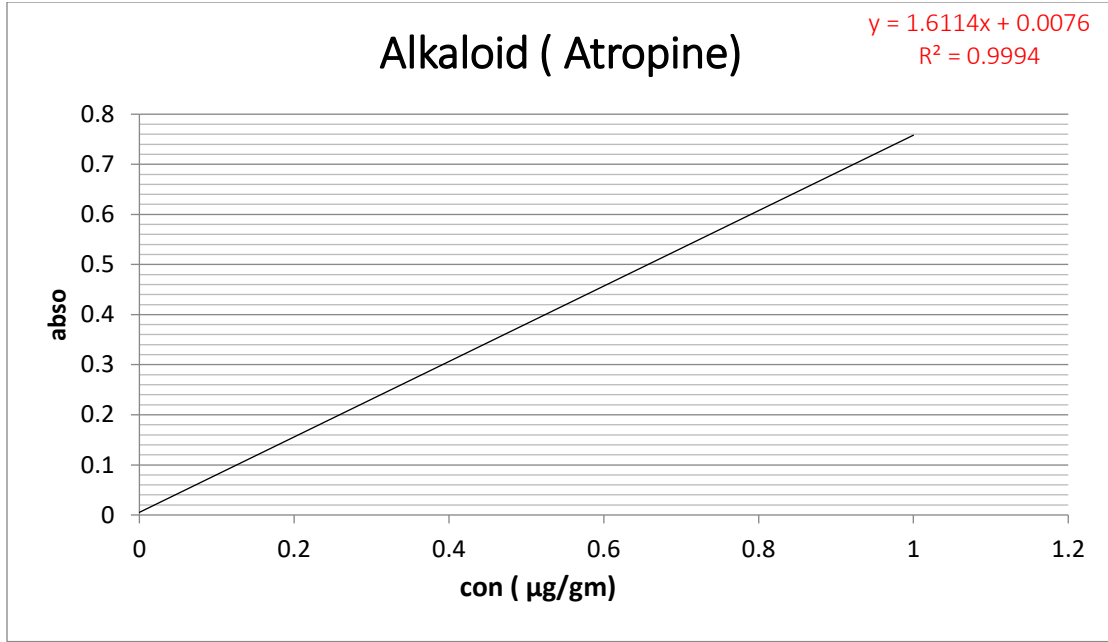
القلويدات باستخدام طريقة Dragendorff's reagent Dragendorff's. بأدابة جزء من المستخلص في محلول حمض الهيدروكلوريك المخفف، وأضيفت قطرتان من Dragon drop's ، ويشير راسب بلوري إلى وجود القلويدات. ثم خضعت العينة التي أظهرت وجود القلويدات الموجبة لمزيد من التقييم الكمي (Trease and Evans, 2002).

#### فصل القلويد:

أذيب جزء من بقايا المستخلص في حمض الهيدروكلوريك N2، ثم رُشِح. ونُقِل 1 مل من هذا المحلول إلى قمع تحضيرى وغُسل بـ 10 مل من الكلوروفورم. عُدِّل الرقم الهيدروجيني لهذا المحلول إلمتعادلباستخدام 0.1 NaOH مل. ثم أُضيف 5 مل من محلول Bromocresol Green (BCG) بروموكيسول و 5 مل من محلول الفوسفات المنظم إلى هذا المحلول.

#### المنحنى القياسي:

نُقلت أجزاء صغيرة (0.4, 0.6, 0.8, 1) من محلول الأتروبين القياسي مُقاسة بدقة إلى قمع تحضيرى مختلف. ثم أخذ 5 مل من محلول الفوسفات المنظم بدرجة حموضة 4.7 و 5 مل من محلول BCG ، و رُجَّ الخليط مع المستخلص مع 1, 2, 3, 4 مل من الكلوروفورم. جُمعت المستخلصات بعد ذلك في قارورة حجمية سعة 10 مل، ثم حُفِّت لتعديل المحلول باستخدام الكلوروفورم. قُيس امتصاص المركب في الكلوروفورم عند طيف 300-400 نانومتر باستخدام مطياف الأشعة فوق البنفسجية (SHIMADZU UV-1800) على العينة الخام المُجهزة كما هو موضح أعلاه، ولكن بدون الأتروبين (Ajanal et al., 2010).

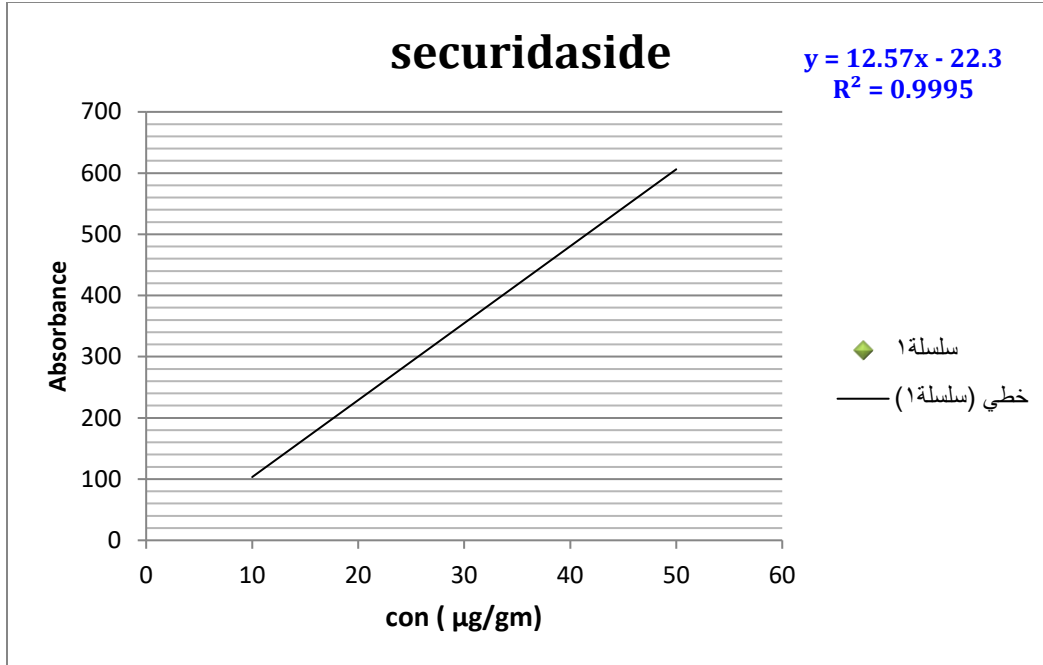


شكل (3-4) المنحني القياسي لمركبات القلويدات الكلي

(Coefficient of Determination)=R (Absorbance)= y

**7.3.5.3 قياس الجليكوسيدات الكلية:**

حُضِرَ مسحوق البذور المجففة من العينة (10غم) باستخدام 80% ميثانول في درجة حرارة الغرفة، واستُبدِل المذيب كل 48 ساعة (3 × 8 لتر). رُكِّز المستخلص الكلي. لتحديد الجليكوسيدات، حُطَّ مستخلص 10% من كل جيل مع المستخلص الكلي للبذور مع 10 مل من كاشف gate detector المُحضَّر أنيا ( 95 مل من حمض البكريك 1% + 5 مل من هيدروكسيد الصوديوم 10%). حامض بكريك(2,4,6-Trinitrophenol) بعد ساعة، حُفِّف الخليط بـ 20 مل من الماء المقطر، وقيست الامتصاصية عند طول موجي 495 نانومتر باستخدام مطياف Shimadzu UV/VIS ، لإعداد المنحني القياسي، حُضِرَ 10 مل من سيكيوريداسيد بتركيزات مختلفة ( 100-12.5ملغم/لتر. عُزِل سيكيوريداسيد من مستخلص العينة. تم التعبير عن إجمالي الجليكوسيدات من التكرارات الثلاثية على أنها ملغرام من سيكيوريداسيد لكل غرام من المستخلصات المجففة. (Tofighi, 2013; Tofighi et al., 2016)



شكل (3 - 5) المنحني القياسي لمركبات الكلايكوسيدات الكلية

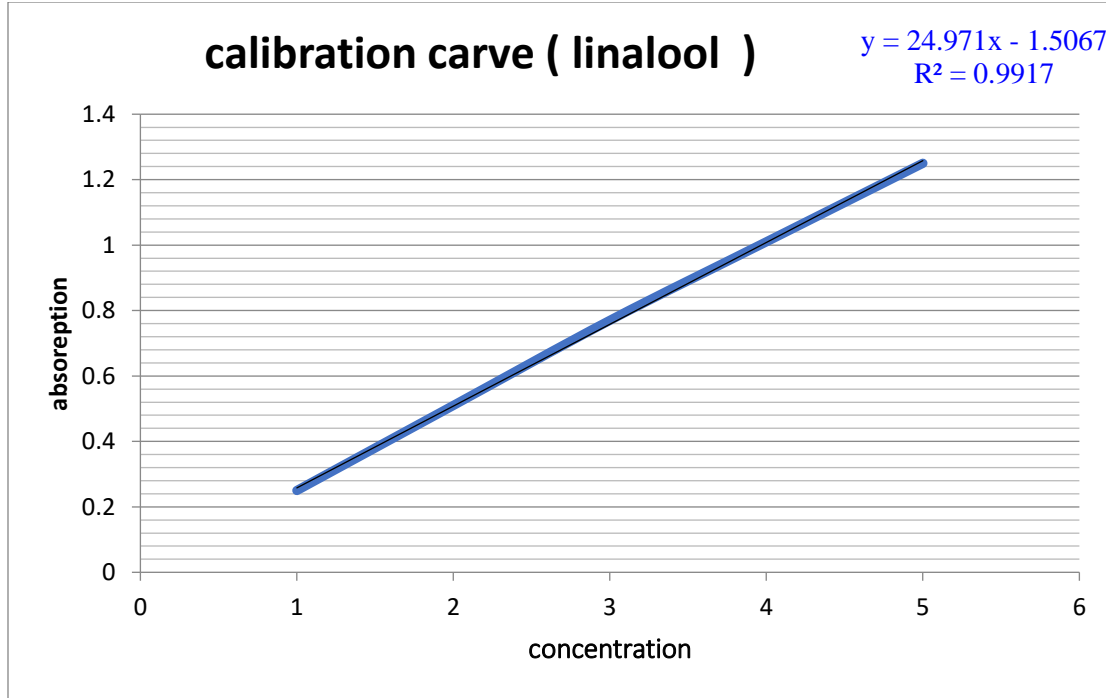
(Absorbance)= y

(Coefficient of Determination)=R

### 8.3.5.3 قياس وتقدير مركبات التربينات:

اتبعت الطريقة المقدمة من قبل العالم (Ghorai *et al.*, 2017) لحساب النسبة المئوية للتربينات في النباتات حيث اخذ (1.5 gm) من العينة النباتية واطف لها (7 ml) مزيج من (الميثانول-الاسيتونترايل) ثم توضع على جهاز الهزاز لمدة نصف ساعة بعدها تترك العينة في الظلام لمدة (24) ساعة، توضع العينة في جهاز الطرد المركزي بسرعة (6000 دورة / دقيقة) ويؤخذ (5 ml) منها وضاف لها (1.5 ml) كلوروفورم + (0.5 ml) حامض الكبريتيك المركز وتخلط جيدا لمدة دقيقة واحدة (في حالة حدوث حرارة يجب تبريد الانبوب بوضعها على الثلج بحيث لا تزيد المدة عن 5 دقائق) بعدها يضاف الميثانول الى العينة لإكمال الحجم الى (10 ml) .

يحضر محلول قياسي من مادة (linalool) بعدة تراكيز وقراءتها بجهاز spectrophotometer بطول موجي (538 nm) وتسجل القراءات وبعدها يتم قراءة النموذج وتسجل الامتصاصية له ويتم حساب النسبة المئوية للتربينات .



شكل (3- 6) المنحني القياسي لمركبات التربينات

(Absorbance)= y  
(Coefficient of Determination)=R

### 6.3 . اختبار السمية الخلوية بواسطة فحص MTT MTT Cytotoxicity test by Assay

أ. المبدأ:

التطبيق الرئيس لاختبار MTT هو تحديد التأثير السام للأدوية عند تركيزات مختلفة باستخدام صفيحة ذات 96 حفرة . تكمن فكرة هذا الاختبار في أن زيادة أو نقصان عدد الخلايا الحية يتوافق مباشرةً مع نشاطها الميتوكوندريا، والذي ينعكس في قدرة الخلايا الحية على تحويل " pale yellow tetrazolium salt/MTT dye " إلى بلورات formazan أرجوانية داكنة بواسطة NADH ، والتي يمكن إذابتها للحصول على قياس غير متغير. وبالتالي، يمكن تمييز أي تغيير في عدد الخلايا الحية عن طريق قياس تركيز الفورمازان المنعكس في الامتصاص باستخدام قارئ صفيحة دقيقة عند 570 nm. كلما أصبح المحلول أعمق، فهذا يعني أعلى عدد من الخلايا الحية والنشطة أيضا.

لأجل اجراء اختبار السمية الخلوية زُرعت خلايا سرطان القولون البشري SW480 في طبق يحتوي على 96 حفرة بكثافة ( $1 \times 10^4$  cells/well) (Kamiloglu et al., 2020)

1. زُرعت الخلايا بكثافة "1x10<sup>4</sup> خلية/حفرة" في طبق (96 حفرة)، ثم حُضِنَت لمدة 24 ساعة لتكوين طبقة أحادية خلوية (مرحلة نمو 80%). بعد ذلك، رُفِعَ الوسط وأُضيف 200 ميكرو لتر من الوسط المحتوي على أدوية تجريبية. لم تُعالج ستة حفر بأي دواء تجريبي لتكون بمثابة مجموعة ضابطة (عولجت 3 حفر بالوسط فقط، وعولجت 3 حفر بالوسط بالإضافة إلى 0.5% من ثنائي ميثيل سلفوكسيد). بعد ذلك، حُضِنَ الطبق لمدة 48 ساعة.

٢. رُفِعَ الوسط في نهاية فترة التعرض للدواء، ثم غُسلت الحفر بفوسفات الصوديوم (PBS) أُجريت مجموعة ضابطة فارغة لتحديد أي تحويل غير محدد للفورمازان.

٣. كان التركيز النهائي المطلوب لـ MTT هو (0.5 ملغ/مل)، لذا سُحِبَ 1.2 مل من محلول MTT الأصلي (5 ملغ/مل) وخط مع 10.8 مل من الوسط. ثم، أُضيف 200 ميكرو لتر من محلول MTT الناتج في كل حفرة.

٤. وُضِعَ الطبق في حاضنة لمدة 3 ساعات، وفي هذا الوقت، كانت بلورات الفورمازان الأرومانية داخل الخلايا مرئية بوضوح تحت المجهر المقلوب.

٥. بعد ذلك، أُزيل السائل العلوي، وأُضيف 100 ميكرو لتر من DMSO لكل حفرة لإذابة بلورات الفورمازان المتكونة. ثم حُضِنَت الطبق في درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة للسماح بتحلل الخلايا وإذابة البلورات.

٦. قياس الامتصاصية باستخدام قارئ صفائح دقيقة عند طول موجي 570 نانومتر.

٧. تم حساب نسبة قابلية الخلايا للبقاء على قيد الحياة:

نسبة قابلية الخلايا للبقاء على قيد الحياة (%CV) = (OD للعينة الاختبارية - OD للعينة الفارغة) / (OD للعينة الضابطة - OD للعينة الفارغة) × 100%.

### 7.3. الخط الخلوي لسرطان القولون البشري (SW480)

استعمل هذا الخط عند التمريرة رقم 25 اشتق هذا الخط من ورم لسرطان القولون من مريض عمره 50 سنة، وكان يعاني (Colon Adenocarcinoma)، وهو النوع الأكثر شيوعاً من سرطان القولون. وتم تنمية الخط في الوسط الزرع (RPMI-1640) المجهز بـ 10% من مصل جنين البقر، تكون الطبقة الاحادية الكاملة Confluent monolayer تعامل الخلايا بمحلول الترسين وذلك لتهيئة الحصول على

المزرعة الثانوية (subculture) تم اشتقاق هذا الخط الخلوي في عام 1975، ويستخدم على نطاق واسع في أبحاث السرطان والوراثة الطبية.

### تجارب الدراسة

- 1- جمع جذور النبات وطحنة
- 2- تأثير المستخلص المائي لجذور نبات الاشواغندا على خط خلايا سرطان القولون البشري .
- 3- تأثير المستخلص الكحولي لجذور نبات الاشواغندا على خط خلايا سرطان القولون البشري.
- 4- تأثير عقار السيسبلاتين Cisplatin على خط خلايا سرطان القولون البشري .
- 5- الكشف الكيميائي للمركبات الفعالة للمستخلصات جذور نبات الاشواغندا
- 6- تأثير الفعل المشترك للمستخلص المائي لجذور نبات الاشواغندا على خط خلايا سرطان القولون البشري مع عقار السيسبلاتين Cisplatin بتركيز (15.6) µg/ml
- 7- تأثير الفعل المشترك للمستخلص الكحولي لجذور نبات الاشواغندا مع تركيز عقار السيسبلاتين Cisplatin بتركيز (15.6) µg/ml . على خط خلايا سرطان القولون البشري
- 8- قياس التعبير الجيني لp53 للخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد فترة تعريض 48 ساعة بعد معاملة بالمستخلص المائي بالتركيز (31.25,250,1000) µg/ml
- 9- قياس التعبير الجيني لp53 للخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد فترة تعريض 48 ساعة بعد معاملة بالمستخلص الكحولي بالتركيز (31.25,250,1000) µg/ml
- 10- قياس التعبير الجيني لp53 للخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد فترة تعريض 48 ساعة بالفعل المشترك للمستخلص المائي مع عقار السيسبلاتين Cisplatin بتركيز (15.6) µg/ml.
- 11- قياس التعبير الجيني لp53 للخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد فترة تعريض 48 ساعة بالفعل المشترك للمستخلص الكحولي مع عقار السيسبلاتين Cisplatin بتركيز (15.6) µg/ml.
- 12- قياس التعبير الجيني ل PIK3CA للخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد فترة تعريض 48 ساعة بعد معاملة بالمستخلص المائي بالتركيز (31.25,250,1000) µg/ml
- 13- قياس التعبير الجيني ل PIK3CA للخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد فترة تعريض 48 ساعة بعد معاملة بالمستخلص الكحولي بالتركيز (31.25,250,1000) µg/ml

14- قياس التعبير الجيني لـ *PIK3CA* للخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد فترة تعريض 48 ساعة بالفعل المشترك للمستخلص المائي مع عقار الـيسسبلاتين Cisplatin بتركيز (15.6)µg/ml.

15- قياس التعبير الجيني لـ *PIK3CA* للخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد فترة تعريض 48 ساعة بالفعل المشترك للمستخلص الكحولي مع عقار الـيسسبلاتين Cisplatin بتركيز (15.6)µg/ml.

ان حصاد خلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) هي عملية تعتمد على تأثير الترسين على المحلل للبروتين لفصل وتفكيك الخلايا الملتصقة احادية الطبقة عن قاع قارورة الزراعة. وقد طبقت هذه العملية لغرض عد الخلايا والزراعة الفرعية لخط الخلايا. خطوات الحصاد هي:

1- فُحصت الخلايا المزروعة تحت المجهر المقلوب للتأكد من أنها سليمة وخالية من التلوث، وأنها تصل إلى نمو 80%)

2- تم التخلص من الوسط ثم تم غسل الخلايا احادية الطبقة باستخدام بفوسفات الصوديوم PBS للتأكد من إزالة الوسط بالكامل من القارورة. بعد ذلك، أُضيف محلول الترسيني (1)مل إلى قنينة سعتها 12.5 سم، والتي تم تدويرها لتغطية الطبقة الأحادية بالترسين. بعد ذلك، حُصنت القارورة عند درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة (2-10 دقائق) حسب خط الخلايا.

3- للتأكد من فصل الخلايا، فُحصت تحت المجهر المقلوب، ويُمكن النقر برفق على جانب القارورة لفصل أي خلايا متبقية ملتصقة.

4- بعد ذلك، تم تعطيل عمل الترسين بإضافة حجم مساوٍ من محلول مصل الدم إلى القارورة. يمكن استخدام هذا المُعلق الخلوي الناتج لزراعة قارورة جديدة (Meleady and O'Connor, 2006).

**8.3. دراسة تأثير المستخلصات المائية والكحولية لجذور نبات الاشواغندا على خلايا خط سرطان القولون البشري (SW480)**

1- عند اتمام تحضير الخلايا السرطانية المزروعة في اطباق الزرع النسيجي الخاص 96 حفره لاجل المعاملة تم تحضير المستخلص (Stock) بأذابة 0.1 غم من المستخلص مع 0.5 مل من محلول و Dimethyl sulfoxide و عقم بواسطة 0.22µm filter paper with holes وحضر منه التخافيف المطلوبة (µg/ml) (1000، 500، 250، 125، 62.5، 31.25).

2- باستعمال الوسط الزراعي الخالي من مصل العجل البقري. استخراج الطبق الزراعي الحاوي على الخلايا السرطانية المزروعة في الحفر وقيست حيوية الخلايا وعددها باستخدام المجهر الضوئي المقلوب للتأكد من ان هذه الخلايا جاهزة للمعاملة وفي ظروف معقمة.

3- أهمل 0.1 مليلتر من الوسط الزراعي القديم ثم أضيف لكل حفرة 0.1 مل من كل من التراكيز المحضرة سابقا وبمعدل ثلاثة مكررات لكل تركيز (سيطرة موجبة) خاصة له مع زراعة الحفر اخرى محتوية فقط على الوسط الزراعي الخالي من مصل العجل البقري والتي تعد السيطرة السالبة .

4- وبعد الانتهاء من معاملة الطبق الزراعي بالمستخلص النباتي المائي والكحولي ثم وضع اللاصق الشفاف على السطح الخارجي ثم وضعت في الحاضنة لمدة 48 ساعة وبعد الانتهاء مدة الحضانة اخرجت الاطباق من الحاضنة واطبق 0.1 مليلتر من صبغة MTT (Goa et al.,2003)

النسبة المئوية للتثبيط % = ( قراءة السيطرة - قراءة المعاملة لكل تركيز ) / قراءة السيطرة × 100

النسبة المئوية لحيوية الخلايا % = (قراءة المعاملة لكل تركيز / قراءة السيطرة ) × 100

حيث ان: IR = النسبة المئوية لمعدل التثبيط A = الكثافة الضوئية للسيطرة السالبة. B = الكثافة الضوئية لمجموعة الاختبار.

### 9.3. الإدامة والمحافظة على الخطوط الخلوية Maintenance of cell lines

تمت إدامة خطوط الخلايا السرطانية بملاحظة هذه الخلايا وعند تكوينها لطبقة أحادية كاملة (Confluent monolayer) تم إجراء المزرعة الثانوية (Subculture) ابتداء بالتخلص من وسط النمو القديم ، يليها غسل الخلايا بـ دارى الفوسفات المعقم بدرجة حرارة 121 °م لمدة 15 دقيقة في ظروف معقمة ، ثم أضيف 3 مل من محلول التريسين - فرسين مع تحريك القنينة برفق ، بعدها تم التخلص من التريسين، ثم حضنت الخلايا في درجة 37°م لحين انفصال الخلايا من القنينة، ثم أضيف إليها وسط نمو جديد وأعيد توزيعها في قناني الزرع الخاصة وحفظت في درجة حرارة 37 °م .

**10.3. الدراسة الجزيئية****1.10.3. تخليق الحمض النووي الريبي منقوص الاوكسجين DNA باستخدام مجموعة استخلاص****الحمض النووي RNA**

1. زُرعت الخلايا بكثافة "  $1 \times 10^4$  خلية/حفرة" في صفيحة (96 حفرة)، ثم حُصِنَت لمدة 24 ساعة لتكوين طبقة أحادية خلوية (مرحلة نمو 80%). بعد ذلك، تم التخلص من الوسط وأضيف  $200 \mu\text{L}$  من الوسط المحتوي على عقار السيسبلاتين Cisplatin. ومستخلصات نبات الاشواغندا (المائية والكحولية) لم تُعالج ست حفر بأي عقار تجريبي وأُستخدمت كمجموعة ضابطة حيث عولجت ثلاث حفر بالوسط فقط، بينما عولجت ثلاث حفر أخرى بالوسط نفسه للتأكد من ثبات ظروف التجربة.

2. عند انتهاء فترة التعرض، تمت إزالة الوسط وخضعت الحفر للغسل باستخدام PBS بعد ذلك، تم قلب اللوحة على ورق الترشيح مع لصقها برفق للتخلص من أي سائل متبقٍ.

3. أُضيف محلول CV (0.5%) بحجم  $50 \mu\text{L}$  لكل حفرة، وحُصِنَت لمدة عشرين دقيقة في درجة حرارة الغرفة.

4. بعد ذلك، تم غسل اللوحة باستخدام ماء الصنبور أربع مرات، ثم قلب اللوحة مع لصقها برفق. يجب تجفيف اللوحة (بدون غطائها) بالهواء في درجة حرارة الغرفة لمدة لا تقل عن ساعتين.

5. أُضيف الميثانول إلى كل حفرة بحجم ( $200 \mu\text{L}$ )، وحُصِنَت اللوحة مع غطائها لمدة 20 دقيقة في درجة حرارة الغرفة.

6. باستخدام قارئ اللوحات الدقيقة، حُدد الامتصاص عند  $570 \text{ nm}$ .

7. حُددت نسبة الخلايا الحية بمقارنة قيمة الامتصاص للحفر المُعالجة بقيمة الامتصاص للحفر الضابطة.

**2.10.3. تخليق cDNA باستخدام مجموعة (AddScript)**

استخدمت طريقة تصنيع الحمض النووي المكمل cDNA من RNA المستخلص بواسطة عداة Accupower Rockscript RT Premix Kit من قبل شركة Bioneer الكورية واستخدام لغرض تحويل RNA الى cDNA تم اجراء هذه وفقاً لطريقة عمل العدة كما موضح في الجدول (3-5)(3-6) بعدها ثم اضافة مكونات مزيج الى انابيب عدة cDNA التي تحتوي على انزيم الاستنساخ العكسي Reverse transcription ومن ثم نقلت كل الانابيب الى جهاز الطرد المركزي تم خلط الجينات

باستخدام جهاز Vortex وتبع ذلك طردها مركزيا باستخدام centrifuge بسرعة 3000 دورة إديقة لمدة 3 دقائق, ثم نقلت الانابيب الى جهاز الدوار الحراري Thermo cycler وطبقت الظروف الحرارية الخاصة بعملية تصنيع العدة الموضحة في الجدول (3-6) ثم حفظ العينات بدرجة حرارة 20-م لحين استخدامها في فحص RT-PCR.

**جدول(3-5) مكونات تفاعل البوليميراز المتسلسل(PCR)**

الكمية	المادة	
1 µl	Nuclease-Free H <sub>2</sub> O	1
10 µl	2x Reaction Buffer	2
2 µl	10mM dNTP Mixture	3
2 µl	10x oligo dT <sub>20</sub> [or 10x random hexamer]	4
1 µl	20x AddScript Enzyme Solution	5
4 µl	RNA template	6
20 µl	Total reaction volume	

**جدول(3-6) ظروف الدورة الحرارية لتصنيع cDNA**

الوقت	درجة (°C) Tm الحرارة	الطور
10 min	25°C	Priming
60 min	50°C	Reverse transcription
5 min	80°C	RT inactivation
∞	12°C	Hold

**3.10.3 تحضير البادئات primers**

يتم إذابة البرايمر (المجفف بالتجميد في الأصل) في ddH<sub>2</sub>O الحر وذلك للحصول على تركيز إجمالي يبلغ 100 pM/µl والذي يعمل كمحلول مخزن عند -20°C. وحضير تركيز 10 pM/µl من البادئات stock لاستخدامه في التجربة كما في الجدول (3-7).

جدول ( 3-7 ) البادئات المستخدمة في تجربة التعبير الجيني

Gene	Primer name	5'-3'	PCR Product (bp)	Accession number	Reference
P53	F	CCTCAGCATCTTATCCGAGTG G	128	NM_000546 .6	Origene Co.
	R	TGGATGGTGGTACAGTCAGAG C			
PIK3CA	F	GGTTGTCTGTCAATCGGTGAC TGT	108	XM_006713 658.5	Riquelme et al., 2018
	R	GAAGTGCAGTGCACCTTTCAA GC			
GAPDH House keeping	F	GGAGTCAACGGATTTGGT	206	NM_002046 .7	Piro and Broze, 2005
	R	GTGATGGGATTTCCATTGAT			

### 4.10.3. تفاعل البوليميراز المتسلسل (qRT-PCR)

تم تقدير مستويات التعبير الجيني لجين PIK3CA باستخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل الكمي العكسي (qRT-PCR)، وهي تقنية حساسة لقياس مستويات mRNA في حالة مستقرة. أُجري تفاعل البوليميراز المتسلسل في الوقت الحقيقي باستخدام طريقة SYBR Green لتأكيد التعبير الجيني للجين المستهدف. صُممت تسلسلات البادئات لجين PIK3CA المستخدمة في هذه الدراسة وفقاً للطريقة (Riquelme et al., 2018)، وحرّنت مجففة بالتجميد عند درجة حرارة -23 درجة مئوية.

جدول (3-8) محتويات عدة تفاعل (Real-Time) PCR

1GoTaq™ qPCR master mix, 2X	1X	10 µl
Forward primer	10 µM/µl	2µl
Reverse primer	10 µM/µl	2µl
ddH <sub>2</sub> O	-	4 µl
cDNA template	-	2µl

جدول (9-3) ظروف الحرارة المثلى لمراحل تفاعل الـ qRT-PCR اعتماداً على نظام GoTaq® RT-qPCR

الدورات	درجة الحرارة Ta (°C)	الوقت	المراحل
1X	95	5 دقائق	Hot-start activation
40X	95	10 ثوان	Denaturation
	58	30 ثانية	Annealing/data collection
	72	30 ثانية	Extension
1X	72	دقيقتان	Dissociation

### 5.10.3. اختبار التعبير الجيني بنظام GoTaq® RT-qPCR

تم إذابة مكونات نظام GoTaq® qPCR مع قوالب cDNA وزوج البادئ إما على الثلج للحفاظ على ثباتها، أو عند درجة حرارة الغرفة، كما يمكن إذابتها عند 37 °م بحسب متطلبات التجربة. مزج كل مكون مذاب بسرعة جيداً. إذا استخدم خلاط ، مزج بسرعة منخفضة لتقليل التهوية. نحفظ بالكاشف المذاب على الثلج. جهزت عينات cDNA في الماء أو سائل مخفف آخر متوافق مع qPCR. مزجت مكونات التفاعل في أنبوب معقم غير لاصق على الثلج. مزجت برفق بعد كل إضافة. ثم مررت أحجام التفاعل بعناية إلى اللوحة على الثلج ونقلت اللوحة من الثلج إلى الجهاز المبرمج مسبقاً. نبدأ التشغيل على الفور. عند اكتمال التشغيل، نحصل على البيانات ونقم بتحليل النتائج.

### 11.3. التحليل الإحصائي:

استخدم نظام التحليل الإحصائي (SAS, 2012) لتقييم تأثير العوامل المختلفة على معايير الدراسة. لمقارنة المتوسطات، استخدم اختبار T واختبار آخر فرق معنوي (LSD). حُللت بيانات التعبير الجيني باستخدام طريقة  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ، على النحو التالي: حُسب الفرق بين قيم  $\Delta Ct$  للجين المستهدف P53 و  $PIK3CA$  وجين (house keeping) (*GAPDH*)

$$\Delta Ct [\text{test}] = Ct [\text{target , test}] - Ct [\text{Ref , test}]$$

$$\Delta Ct [\text{Control}] = Ct [\text{target , Control}] - Ct [\text{Ref , Control}]$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct [\text{test}] - \Delta Ct [\text{Control}]$$

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

**Results and Discussion**

## 4. النتائج والمناقشة Results and Discussion

1.4. دراسة المركبات الكيميائية الفعالة لجذور نبات الاشواغندا *Withania somnifera*

تم احتساب التقدير الكمي للمركبات الفعالة والعناصر الموجودة في جذور نبات الاشواغندا كما هو موضح في الجدول الاتي (A1-4) بواسطة تحليل (HPLC) ، إذ أظهرت المركبات وجود الفلافونيدات ، الفلافونويدات ، الفينولات ، الكلايكوسيدات ، الستيرويدات ، التربينات والصابونيات وتم احتساب التقدير الكمي للعناصر المهمة والفعالة مثل الحديد Fe ، النحاس Cu ، المغنيسيوم Mg و الخارصين Zn الموجودة في جذور نبات الاشواغندا موضح في الجدول (B1-4) بواسطة تحليل Atomic Absorption (AAS) Spectroscopy جاءت النتائج مطابقة لما توصلت اليه المصادر السابقة Elsherif وجماعته (2023) كما و اشارات دراسة إلى أن المستخلص المائي والكحولي للجذور النبات يحتوي على التانينات والفلافونات والفينولات بالإضافة الى المركبات الاخرى (Munir et al., 2022) وكذلك احتواء النبات على العناصر المهمة حيث اظهرت النتائج وجود مركبات الفلافونيدات و الفينولية نسب عالية (114.5 mg / 100 gm),(198.0 mg / 100 gm) على الترتيب بينما كان كل من الكلايكوسيدات والفلافونيدات والتربينات منخفضة .

**جدول (A1-4) التقدير الكمي للمركبات الفعالة الموجودة في جذور نبات الاشواغندا *W. somnifera* بواسطة تحليل (HPLC)**

	Name	Con
1	Total phenolic content	198.0( mg / 100 gm )
2	Total flavonoid content	114.5( mg / 100 gm )
3	Total alkaloid content	3.6%
4	Total glycoside content	1.1%
5	Total terpenoid content	1.6%

تشير نتائج تحليل تراكيز العناصر المعدنية إلى اختلاف ملحوظ في مستوياتها داخل العينة قيد الدراسة. فقد سجّل عنصر المغنيسيوم (Mg) أعلى تركيز بمعدل (60.5 mg/kg)، مما يعكس أهميته الحيوية في العمليات الأيضية ونقل الأوكسجين، إلا أن ارتفاع مستوياته قد يُعزى إلى طبيعة الوسط البيئي أو التربة التي نمت فيها العينة. بينما جاء الحديد (Fe) في المرتبة الثانية (45.9 mg/kg)، وهو عنصر أساسي يدخل

في العديد من التفاعلات الإنزيمية والوظائف الحيوية المرتبطة بالطاقة. في المقابل، لوحظت تراكيز متوسطة لكل من النحاس (Cu) والخارصين (Zn) (24.9 و 19.8 mg/kg على التوالي)، وكلاهما من العناصر النزرة الضرورية لعمل الإنزيمات المضادة للأكسدة ودعم الجهاز المناعي. أما المنغنيز (Mn) فقد سجل أقل تركيز (9.8 mg/kg)، وهو ما يتفق مع كونه يُطلب بكميات قليلة نسبياً في النظام الحيوي، على الرغم من أهميته في التمثيل الضوئي وتفعيل بعض الإنزيمات. وتُظهر هذه النتائج أن توازن العناصر الكبرى والصغرى قد ينعكس بشكل مباشر على القيمة الغذائية والوظائف الفسيولوجية للعينة المدروسة، مما يستدعي مقارنتها بالدراسات السابقة لتوضيح مدى ملاءمتها للمعايير الغذائية أو البيئية.

**جدول (B 1-4) التقدير الكمي للعناصر الموجودة في جذور نبات الاشواغندا *W. somnifera* بواسطة تحليل (AAS)**

No	Name	Con
1	Mg	60.5 mg /kg
2	Fe	45.9 mg /kg
3	Cu	24.9 mg /kg
4	Zn	19.8 mg /kg
5	Mn	9.8 mg /kg

من الجدير بالذكر إن جميع المركبات الفعالة تقريبا تمتلك فعالية طبية مختلفة ومؤثرة إذ تعد كمركبات مضادة للسكري وموسع للأوعية الدموية، ومضاد لسرطان، ومضاد للالتهابات وكذلك خافض للكوليسترول في الدم ومضاد للجراثيم ومحفز لعملية الموت المبرمج بالإضافة الى تحفيزها المضاد للأكسدة وهذا ما جعل لنبات الاشواغندا اهمية طبية لعلاج الكثير من الأمراض المختلفة (Namdev et al., 2023; Mishra and Patnaik, 2020) وان المركبات الفلافونيدية ذات فعالية عالية مضادة للسرطان ونمو البكتيريا والفيروسات (Paul et al., 2021) وكما تعمل مركبات الفينول كمعدلات لغشاء خلايا الدم الحمراء. كذلك تقوم القلويدات بحماية الجسم من الامراض المزمنة بينما مركبات الصابونيات لها دور فعال في معالجة ارتفاع كوليسترول الدم (Sharma and Verma, 2023).

إن نتائج التحليل الكيميائي التي اظهرتها الدراسة الحالية تتوافق مع دراسة السابقة (Mishra and Patnaik, 2020) بالرغم من وجود الاختلافات في بعض المركبات الفعالة وقد يعود السبب الى عدة عوامل منها الظروف البيئية المحيطة بالنبات والتربة حيث تلعب دورا مهما في تكوين المركبات الفعالة

(حمود, 2017 ) أو عوامل تتعلق بالنبات نفسه ومنها موسم جمع العينات وعوامل اخرى مثل طريقة التجفيف والاستخلاص (Saleem et al.,2020).

النباتات الطبية مصدر غني بالمواد الكيميائية النباتية النشطة بيولوجيًا أو المغذيات الحيوية. إن الفهم الصحيح للفحص الكيميائي النباتي للنباتات أمر ضروري لاكتشاف الأدوية وتطوير عوامل علاجية جديدة وتفسير التأثيرات الأليوباثية للعديد من أنواع النباتات (Anwar et al., 2020) وعلى صعيد آخر أظهرت الدراسات التي أجريت خلال العقود الماضية أن المواد الكيميائية الموجودة في النباتات لها دوراً مهماً في التنظيم البيئي وفي الوقاية من الأمراض مثل امراض السرطانية ومن هذا نستنتج أن للتحليل الكيميائية دوراً فعال تلعبه المستخلصات النباتية والآلية التي تعمل بها، وذلك على المستويين العلاجي أو الوقائي (Kamal et al., 2022).

إن كثيراً من العلاجات ذات التأثيرات الجانبية المنخفضة هي من أصل طبيعي (Sabir et al., 2020; Santana et al., 2021). وعلى هذا الاساس، وتؤخذ النباتات على نطاق واسع كمصدر محتمل للمكونات النشطة ذات النشاط المضاد للأورام. ونظرًا للأثار الجانبية للأدوية الكيميائية، يتزايد استخدام الأعشاب للأغراض الطبية في المجال السريري (Albahri et al.,2024). قد يُسهم الضرر التأكسدي المستمر للأدوية الكيميائية على الدهون والبروتينات والحمض النووي (DNA) والجزيئات الأخرى في تطور السرطان (Neri et al., 2021). حيث بينت هذه الدراسة أن نبات *Withania somnifera* الطبيعي ومواده الكيميائية تُظهر كفاءة واعدة في مكافحة السرطان بمختلف انواعه ومنها سرطان القولون البشري.

#### 2.4. التأثيرات السمية الخلوية لمستخلصات جذور نبات *Withania somnifera* الاشواغندا في خط سرطان القولون البشري (SW480)

تم في هذه الدراسة التعرف على التأثير السمي الخلوي لمستخلصات جذور نبات الاشواغندا (المائية والكحولية) على الخط السرطاني لسرطان القولون (SW480) وباستخدام ستة تراكيز (تخافيف نصفية) متسلسلة هي (1000,500, 250, 125, 62,5 31.2)  $\mu\text{g/ml}$  وبفتره زمنية للتعرّض (48) ساعة اذ تم احتساب السمية الخلوية اعتمادا على معدل النسبة المئوية لتثبيط الخلايا (IR) (Inhibition Rate) وذلك بواسطة تعريض الخلايا السرطانية الى المستخلصات نبات الشواغندا ومقارنتها بالسيطرة وباستخدام

صبغة ( Crystal Violet ) لأجل تصبغ الخلايا الحية وقياس الكثافة الضوئية عند الطول الموجي 550 نانوميتر.

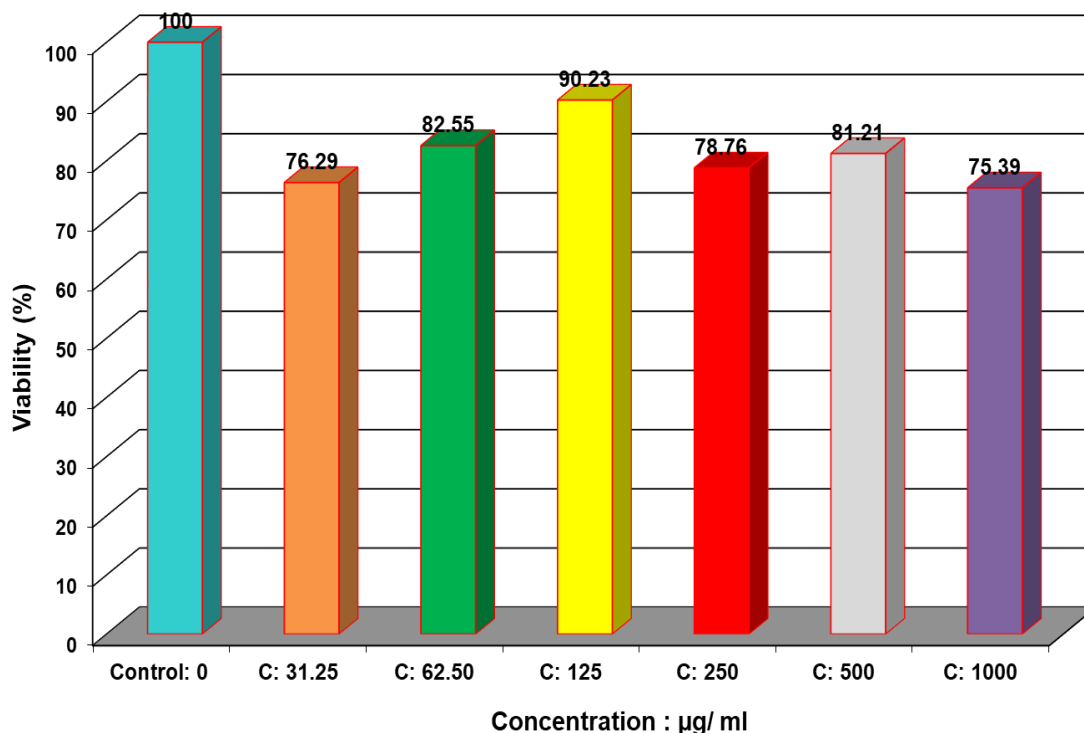
#### 1.2.4. تأثير المستخلص المائي لجذور نبات *Withania somnifera* لحيوية خلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد فترة التعريض 48 ساعة

ان النتائج الموضحة في الجدول (2-4) والشكل (1-4) تبين تأثير المستخلص المائي لجذور نبات الاشواغندا على نمو خلايا سرطان القولون البشري SW480 ومن خلال تعريض خلايا المستخلص المائي وبالتراكيز الستة المستخدمة وذلك باحتساب النسبة المئوية لحيوية الخلايا وبعد مرور 48 ساعة من التعريض وبمقارنة مع السيطرة (100%) اتضح ان نسبة التثبيط نمو الخلايا تعتمد على التراكيز المستخدمة اذ وصلت اعلى نسبة لحيوية الخلايا سرطان القولون عند التركيز (125)  $\mu\text{g/ml}$  حيث وصلت (90.23  $\pm$  3.63) % كما هو ظاهر في الجدول (2-4) اي ان معدل التثبيط 9.67 بينما ظهرت اقل نسبة لحيوية الخلايا السرطانية عند التركيز (1000 $\mu\text{g/ml}$ ) حيث وصلت الى (75.39  $\pm$  5.32%).

جدول (2-4) تأثير المستخلص المائي لجذور نبات الاشواغندا على النسبة المئوية لحيوية خلايا خط سرطان القولون البشري بعد فترة التعريض 48 ساعة

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Mean $\pm$ SE of Viability (%)
Control: 0	100.00 $\pm$ 2.15 a
31.25	76.29 $\pm$ 4.28 c
62.50	82.55 $\pm$ 3.04 bc
125	90.23 $\pm$ 3.63 ab
250	78.76 $\pm$ 1.79 c
500	81.21 $\pm$ 4.44 bc
1000	75.39 $\pm$ 5.32 c
L.S.D. value	10.591 **

المتوسطات التي تحتوي على الاحرف الانكليزي الصغيرة المختلفة للعمود الواحد دلالة على وجود فرق معنوي \*\* ( $P \leq 0.01$ ).



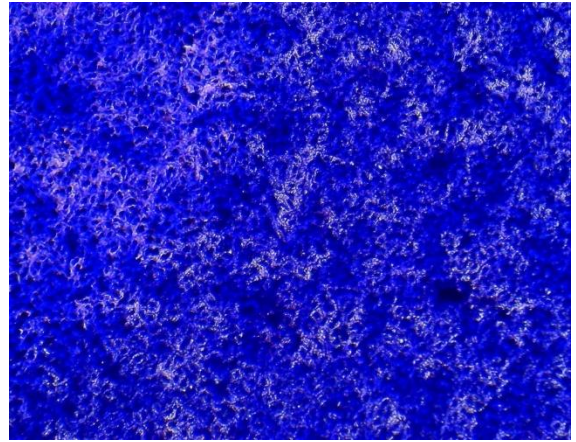
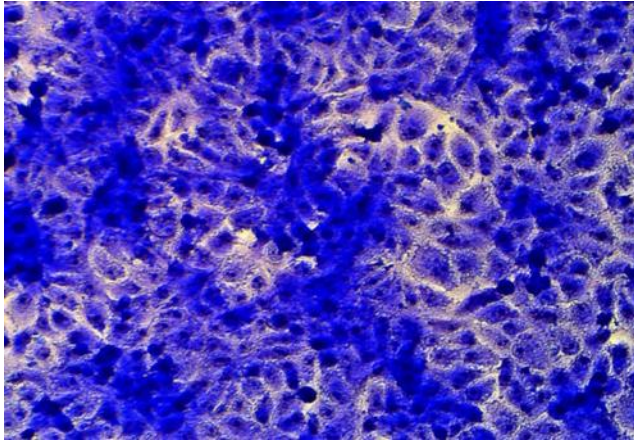
شكل (1-4) تأثير المستخلص المائي لجذور نبات *Withania somnifera* على النسبة المئوية لحيوية خلايا خط سرطان القولون البشري SW480 بعد فترة التعريض 48 ساعة .

تُظهر صورة السيطرة (Control) لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) أن الخلايا تحافظ على شكلها الطبيعي المميز بسرطانية خط الخلايا، حيث تبدو متراسة نسبياً مع تماسك خلوي واضح، إضافة إلى وجود كثافة خلوية عالية تدل على استمرار الانقسام والنمو دون عوائق. في المقابل، تُبين صورة الخلايا المعاملة بالمستخلص المائي لجذور نبات الأشواغندا بتركيز (1000 µg/ml) لمدة 48 ساعة تغيرات واضحة في المورفولوجيا الخلوية، حيث لوحظ انخفاض ملحوظ في الكثافة الخلوية مقارنةً بمجموعة السيطرة، مع تفكك الترابط بين الخلايا، وظهور مساحات فارغة (clear areas) تشير إلى موت أو انفصال الخلايا. كما يمكن ملاحظة فقدان الشكل المنتظم وظهور خلايا بأحجام وأشكال غير متجانسة، وهو ما يعكس حدوث تأثيرات سامة خلوية (cytotoxic effects) ناجمة عن المستخلص صورة (1-4).

تدل هذه النتائج على أن مستخلص الأشواغندا يمتلك قدرة مثبطة على نمو خلايا سرطان القولون عبر إحداث تغيرات مورفولوجية مرتبطة بآليات موت الخلايا، والتي قد تشمل الاستماتة (apoptosis) أو النخر (necrosis)، الأمر الذي ينسجم مع دراسات سابقة أشارت إلى خصائص مضادة للأورام لمركبات

*Withania somnifera* وعليه، فإن هذه التغييرات تؤكد الفعالية المحتملة للمستخلص النباتي في إعاقة نمو الخلايا السرطانية عند التركيزات العالية.

لقد عدت اختبارات تحديد السمية للمواد على الخلايا السرطانية في المختبر من التقنيات الأساسية المستخدمة للتحقق منها إذا كانت هذه المواد قاتلة للخلايا السرطانية وهذا يؤدي الى علاجات على مدى مستقبلي واسع . حيث جاءت دراسة ( Mezher and Saqban,2020 ) تم إثبات الفعالية السمية لدرنات نبات حب العزيز من خلال اختبار السمية الخلوية ضد خلايا سرطان الثدي MCF-7 خارج الجسم الحي. كما أوضحت نتائج سابقة أن المستخلصات الخام المائية والكحولية لنبات الماجورانا (Majorana) أظهرت تأثيرات سامة خلوية على خلايا سرطان الثدي البشري (AMJ13)، مما يشير إلى إمكانية توظيف هذه المستخلصات كمصادر واعدة لتطوير مركبات دوائية مضادة للسرطان في المستقبل. ومن خلال نتائج هذه الدراسة اتضح إن التأثير السمي لجذور نبات الاشواغندا في خط سرطان القولون البشري SW480 معتمدة على تركيز المستخلص . كما أظهرت دراسة أن مستخلص الأشواغندا المائي يضعف من حجم الورم في الخلايا الحيوانية المزروعة بخلايا HT- 29 ، مما يزيد من فعاليتها المحتملة في علاج سرطان القولون (Jawarneh et al.,2022).



B- الخلايا المعاملة بالمستخلص المائي تركيز 1000 µg/ml

A- معاملة السيطرة (غير المعاملة بالمستخلص)

صورة (1-4) مقارنة لشكل خلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بين معاملة السيطرة والخلايا المعاملة بالمستخلص المائي لجذور نبات الاشواغندا عند التركيز (1000) µg/ml بعد فترة التعريض 48 ساعة (Crystal Violet,40X).

تُظهر صورة السيطرة (Control) لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) أن الخلايا تحافظ على شكلها الطبيعي المميز بسرطانية خط الخلايا، حيث تبدو متراسة نسبياً مع تماسك خلوي واضح، إضافة إلى وجود كثافة خلوية عالية تدل على استمرار الانقسام والنمو دون عوائق. في المقابل، تُبين صورة الخلايا المعاملة بالمستخلص المائي لجذور نبات الأشواغندا بتركيز (1000 µg/ml) لمدة 48 ساعة تغيرات واضحة في المورفولوجيا الخلوية، حيث لوحظ انخفاض ملحوظ في الكثافة الخلوية مقارنةً بمجموعة السيطرة، مع تفكك الترابط بين الخلايا، وظهور مساحات فارغة (clear areas) تشير إلى موت أو انفصال الخلايا. كما يمكن ملاحظة فقدان الشكل المنتظم وظهور خلايا بأحجام وأشكال غير متجانسة، وهو ما يعكس حدوث تأثيرات سامة خلوية (cytotoxic effects) ناجمة عن المستخلص .

تدل هذه النتائج على أن مستخلص الأشواغندا يمتلك قدرة مثبطة على نمو خلايا سرطان القولون عبر إحداث تغيرات مورفولوجية مرتبطة بآليات موت الخلايا، والتي قد تشمل الاستماتة (apoptosis) أو النخر (necrosis)، الأمر الذي ينسجم مع دراسات سابقة أشارت إلى خصائص مضادة للأورام لمركبات *Withania somnifera* وعليه فإن هذه التغيرات تؤكد الفعالية المحتملة للمستخلص النباتي في إعاقة نمو الخلايا السرطانية عند التركيزات العالية.

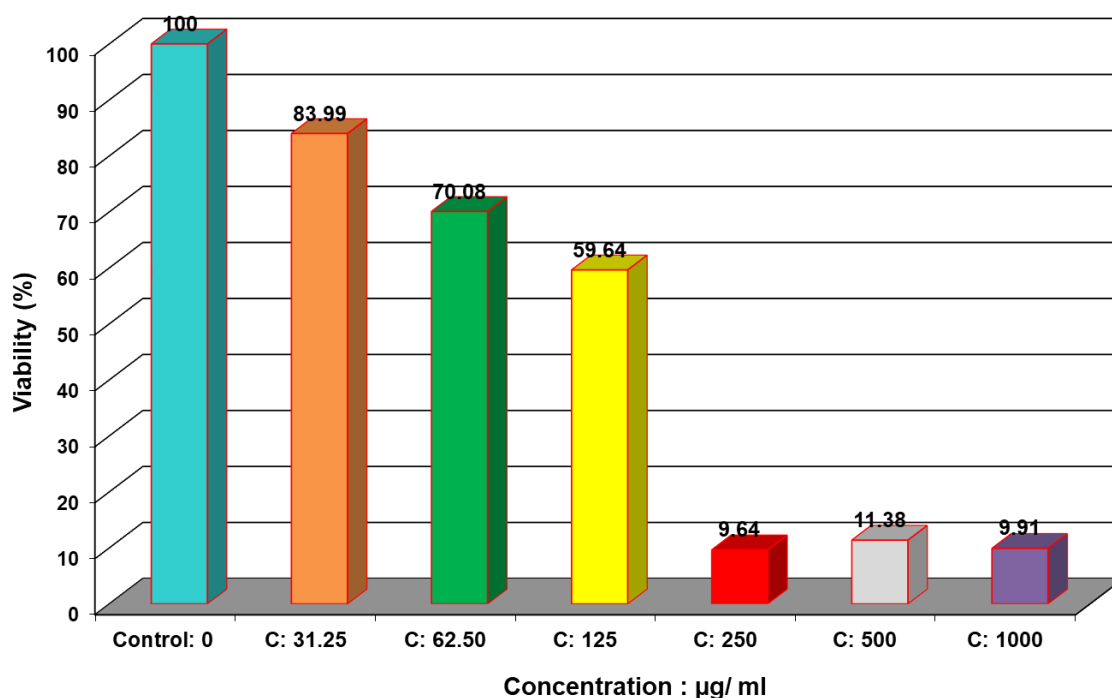
#### 2.2.4. تأثير المستخلص الكحولي لجذور نبات *Withania somnifera* على النسبة المئوية لحيوية خلايا خط سرطان القولون البشري SW480

تظهر النتائج الموضحة في الجدول (3-4) والشكل (2-4) اختلاف عند المستخلص الكحولي عبر تأثيره على حيوية الخلايا السرطانية لسرطان القولون وذلك بعد التعريض للخلايا السرطانية لمستخلص الايثانولي لجذور نبات الاشواغندا ولكافة التراكيز المستخدمة لمدة تعريضه 48 ساعة حيث يبدأ التأثير السمي للمستخلص الكحولي) عند التركيز (31.25) µg/ml إذ إن حيوية الخلايا السرطانية بلغت ( 83.99 ±3.37)% وقلت هذه الحيوية كلما زاد التركيز اذ بلغت عند التركيز (1000) µg/ml إلى الحيوية ( 9.91 ±0.39) % يلاحظ حصول انخفاض تدريجي في النسبة المئوية لحيوية الخلايا السرطانية من التركيز (1000) µg/ml الى اعلى انخفاض في الحيوية عند اقل التركيز (31.25) µg/ml عند فترة تعريض (48) ساعة .

جدول (3-4) تأثير المستخلص الكحولي لجذور نبات الاشواغندا على النسبة المئوية لحيوية خلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد التعريض 48 ساعة

Concentration (µg/ml)	Mean ±SE of Viability (%)
Control: 0	100.00 ±1.98 a
31.25	83.99 ±3.37 b
62.50	70.08 ±3.42 c
125	59.64 ±3.55 d
250	9.64 ±0.22 e
500	11.38 ±1.35 e
1000	9.91 ±0.39 e
L.S.D. value	7.481 **

المتوسطات التي تحتوي على الاحرف الانكليزية الصغيرة المختلفة للعمود الواحد دلالة عدم وجود فرق معنوي \*\* ( $P \leq 0.01$ )



الشكل (2-4) تأثير المستخلص الكحولي لجذور نبات *Withania somnifera* على النسبة المئوية لحيوية خلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد فترة تعريض 48 ساعة .

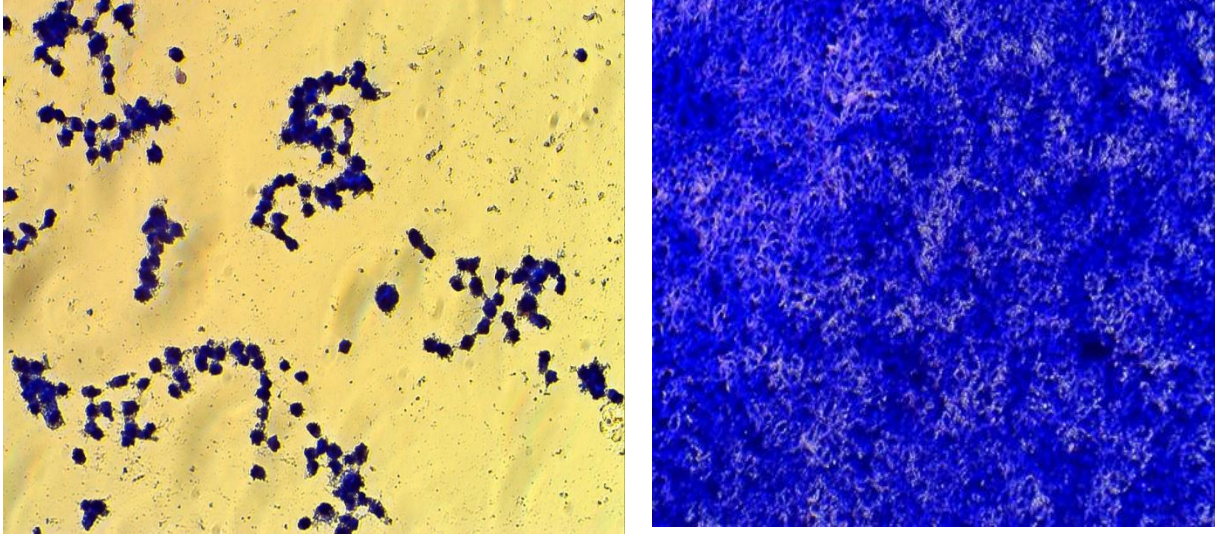
أشارت بعض الدراسات (Baghalpour et al., 2023; Nile et al., 2022) ان دور المستخلص الكحولي لنبات الشواغندا كمضاد للالتهابات بفعالية سريعة الاستجابة من خلال قيامه بتثبيط

الإنزيمات الضرورية التي تشارك في تطوير الالتهاب وحدث سرطان الرئة ومنها 5-Lipoxygenase (5-LOX)، Cyclooxygenase-1 (COX-1) وبذلك يمكن أن يكون بمثابة دواء محتمل ضد الإنزيمات البادئة للالتهابات أجريت العديد من الدراسات حول فعالية النباتات الطبية والمتوفرة في البيئات المحلية قدرتها على قتل الخلايا السرطانية.

أظهرت دراسة Kołodziejska وجماعته (2024) أن المستخلص الكحولي (الإيثانولي) لجذر نبات *Withania somnifera* انه يمتلك قدرة واضحة على تكيس نمو الخلايا السرطانية وذلك من خلال تعطيل عملية انقسام الخلايا. وقد تم وتقييم سميته الخلوية للمستخلص الإيثانولي حيث أظهرت النتائج عن عدة حالات تتعلق بتنشيط نمو الخلايا، شملت تعزيز موت الخلايا المبرمج، وتحليل اضطرابات دورة الخلية، وتجزئة الحمض النووي. كما تبين أن تأثير المستخلص السمي على الخلايا يعتمد بشكل واضح على الجرعة المستخدمة.

كما أظهرت دراسة، (Pant et al.,2021) ان المكونات الكيميائية لجذور نبات *Withaferin* و *Withania A:somnifera* و *Withanolide A*، تعمل على زيادة فعالية السمية الخلوية لخلايا سرطان القولون. تتمتع هذه المكونات الكيميائية بالقدرة على إحداث موت خلوي مبرمج سريع في سلالات الخلايا السرطانية. كما أنها من أكثر المركبات الواعدة التي تُظهر هذا التأثير ضد أنواع أخرى من السرطان، مثل سرطان الثدي والرئة والبروستاتا وسرطان الدم. (Singh et al.,2021) تعمل هذه المركبات أيضاً كعوامل علاجية كيميائية ضد العديد من أنواع سرطان الثدي المختلفة (Vashi et al.,2021).

وقد اثبت Vashi وجماعته(2021) في التجارب السابقة التي أجريت على المستخلص جذور الشواغندا في علاج سرطان الثدي أنه يقلل من التعب الناتج عن العلاج الكيميائي 2 غرام من مستخلص جذر النبات كل 8 ساعات، طوال فترة العلاج الكيميائي.



A - معاملة السيطرة (غير المعاملة بالمستخلص) B - الخلايا المعاملة بالمستخلص الكحولي تركيز 1000 µg/ml

صورة (4-2) مقارنة لخط سرطان القولون البشري (SW480) بين معاملة السيطرة والخلايا المعاملة بالمستخلص الكحولي لجذور نبات الاشواغندا عند التركيز (1000) µg/ml بعد فترة تعريض 48 ساعة (Crystal Violet, 40X)

أظهرت خلايا السيطرة (SW480) نمواً متماسكاً مع توزيع متجانس نسبياً واحتفاظ بالشكل الطبيعي للخلايا السرطانية. في المقابل، بينت الخلايا المعاملة بالمستخلص الكحولي لجذور الأشواغندا بتركيز (1000 µg/ml) بعد 48 ساعة انخفاضاً واضحاً في الكثافة الخلوية، مع ظهور تكتلات صغيرة ومساحات فارغة واسعة نتيجة فقدان الالتصاق الخلوي. كما لوحظت تغيرات مورفولوجية تشير إلى موت الخلايا أو توقفها عن الانقسام، مما يعكس التأثير السام الخلوي للمستخلص الكحولي عند التركيز العالي.

### 3. 2.4 دراسة مقارنة بين التأثير السمي للمستخلصات المائية والكحولية لجذور نبات الاشواغندا على خط خلايا سرطانية القولون SW480

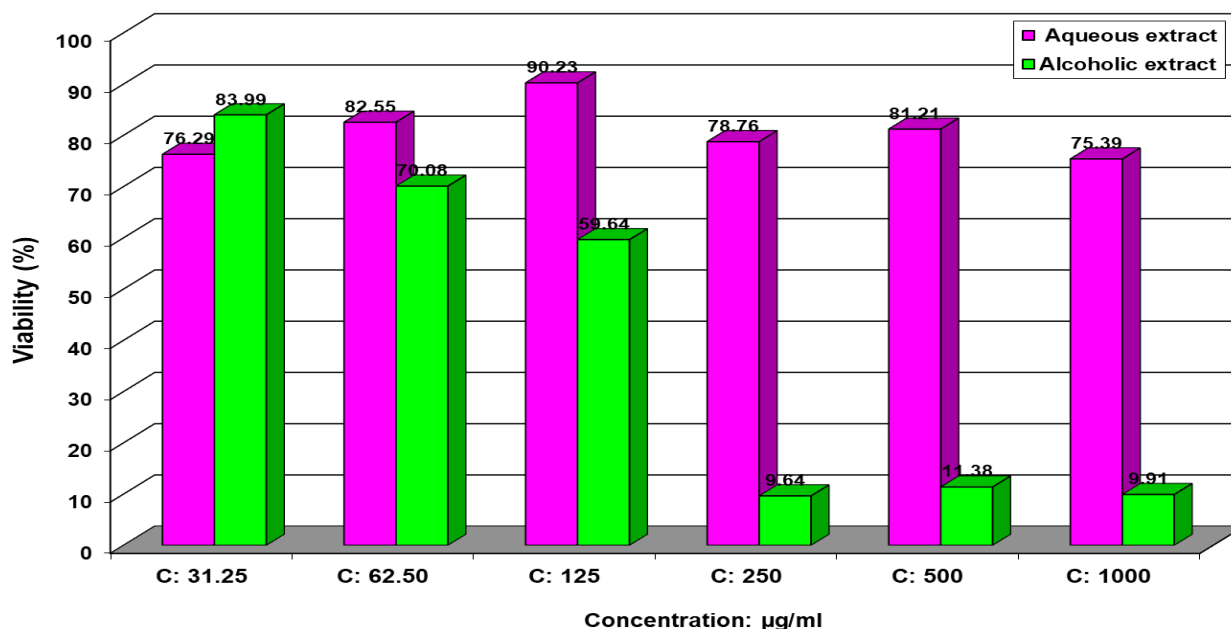
تظهر النتائج الموضحة في الجدول (4-4) والشكل (4-3) مقارنة اختبار السمية الخلوية بين تأثير المستخلصات المائية والكحولية على خلايا سرطان القولون البشري بعد مرور 48 ساعة من تعريض الخلايا للمستخلص جذور نبات الاشواغندا وللتراكيز المستخدمة إذ ظهر أن المستخلص الكحولي له تأثير كبير وفعال على تقليل النسبة المئوية لحيوية الخلايا السرطانية ، إذ أن قلة الحيوية الخلايا السرطان تبدأ عند التركيز (250,500,1000) µg/ml بشكل واضح حيث بلغت النسبة المئوية للحيوية (  $9.64 \pm 0.22$  ) ، (  $11.38 \pm 1.35$  ) ، (  $9.91 \pm 0.39$  ) % على التوالي ، أما عند المستخلص المائي فان حيوية الخلايا

السرطانية يكون تأثيرها عالي حيث تزداد بنسبة عالية للخلايا السرطانية عند التركيز (125)  $\mu\text{g/ml}$  بلغت النسبة (90.23  $\pm$  3.63) % وقد سجلت اقل حيوية للخلايا السرطانية عند التركيز (1000)  $\mu\text{g/ml}$  كانت النسبة (75.39  $\pm$  5.32) %.

جدول (4-4) مقارنة بين تأثير المستخلص (المائي والكحولي) لجذور نبات *Withania somnifera* على النسبة المئوية لحيوية خلايا خط سرطان القولون البشري بعد فترة تعريض 48 ساعة

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Mean $\pm$ SE of Viability (%)		L.S.D. value
	Aqueous extract	Alcoholic extract	
31.25	76.29 $\pm$ 4.28 A b	83.99 $\pm$ 3.37 A b	8.034 NS
62.50	82.55 $\pm$ 3.04 A ab	70.08 $\pm$ 3.42 B b	9.616 **
125	90.23 $\pm$ 3.63 A a	59.64 $\pm$ 3.55 B c	13.904 **
250	78.76 $\pm$ 1.79 A ab	9.64 $\pm$ 0.22 B d	11.537 **
500	81.21 $\pm$ 4.44 A ab	11.38 $\pm$ 1.35 B d	11.083 **
1000	75.39 $\pm$ 5.32 A b	9.91 $\pm$ 0.39 B d	14.226 **
L.S.D. value	12.073 **	7.824 **	---

المتوسطات التي تحتوي على الاحرف الانكليزية الصغيرة المختلفة للعمود الواحد دلالة على وجود فرق معنوي، \*\* (P  $\leq$  0.01).  
المتوسطات التي تحتوي على الاحرف الانكليزية الكبيرة للصف الواحد دلالة على وجود فرق معنوية، \*\* (P  $\leq$  0.01).



شكل (3-4) مقارنة تأثير المستخلص المائي والكحولي لجذور نبات *Withania somnifera* على النسبة المئوية لحيوية خلايا خط سرطان القولون البشري SW480 بعد فترة تعريض 48 ساعة.

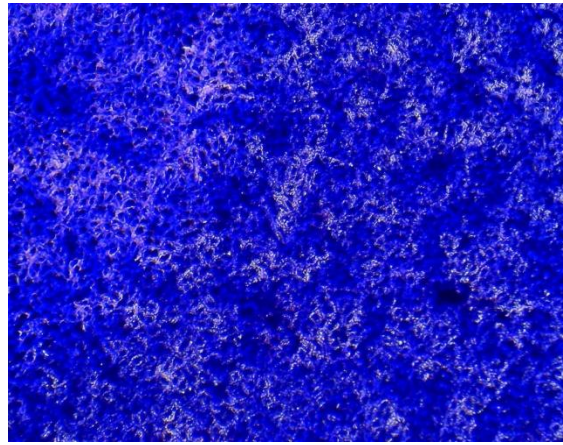
وان نتائج هذه الدراسة اتفقت مع الدراسات السابقة إذ أن تأثير المستخلص يعتمد على تركيز المستخلص وكذلك على نوع المستخلص ، فقد كان المستخلص المائي اقل تأثير و اعلى حيوية للخلايا السرطانية اما المستخلص الكحولي كان له تأثير كبير على الخلايا السرطانية حيث سجل انخفاض عاليا لحيوية الخلايا السرطانية , وهذه النتائج التي حصلنا عليها اذ وجد أن هناك علاقة طردية بين معدل التثبيط والتركيز حيث أنه كلما زاد تركيز المستخلصات المستخدمة زاد معدل التثبيط أو السمية الخلوية وهذا متفق مع العديد من الدراسات والبحوث ومنها دراسة (Abd and Saqban,2023) .

كما اشار Ezez وجماعته (2023) عند التحليل الكيميائي باستخدام تقنية(GC-MS ) لأوراق نبات *Withania somnifera* ، بالإضافة إلى تقييم الخصائص المضادة للأكسدة والمضادة للبكتيريا أظهر مستخلص أوراق *Withania somnifera* قابليته العالية على مقاومة الجذور الحرة، بالإضافة الى خصائص المضادة للأكسدة وفي تثبيط الإجهاد التأكسدي المرتبط بالأمراض المزمنة.

أظهرت دراسات سابقة أن جذور نبات (*Withania somnifera*) لها دور أساس وفعال كمضاد للأكسدة ومزيل للجذور الحرة. (Srivastava et al.,2020; Khan et al.,2020) . تُمَثَلُ المنتجات الطبيعية من النباتات مصدرًا غنيًا للأدوية الجديدة المضادة لسرطان القولون، حيث تُمَثَلُ حوالي نصف علاجات السرطان المستخدمة حاليًا، سواء بشكل مباشر أو غير مباشر. ومن الأمثلة على هذه المركبات الطبيعية الموجودة في النباتات الطبية: الفينولات، والقلويدات، والسكريات المتعددة، والفلافونويدات، والديتربينويدات). بالإضافة إلى العديد من المكونات الوظيفية النشطة بيولوجيًا، والزيوت الطيارة، والسكريات المختزلة. (Huang et al.,2019).

إن *Withania somnifera* يمتلك نشاطًا قويًا مضادًا للسرطان. في دراسات أخرى، إذ تم فحص النشاط المبرمج للخلايا لجميع المستخلصات الإيثانولية حيث تبين بشكل واضح تجزئة الحمض النووي، وهي الصفة المميزة والمهمة لموت الخلايا المبرمج حيث يحتوي جذر *Withania somnifera* على العديد من المستقلبات النشطة التي تمتلك أنشطة علاجية قيّمة والتي كانت تستخدم في الطب الشعبي في العصور القديمة. وقد وصف Roy وجماعته (2013) فعالية نبات *Withania somnifera* ضد أورام البروستاتا، حيث أدى استخدام نبات *Withania somnifera* إلى تثبيط استقلابي لجين Cdc2، متبوعًا بموت الخلايا، مما يُظهر أهمية نبات *Withania somnifera* كمنظم لدورة الخلية G2/M لخلايا الورم ونشاطه ضد أورام البروستاتا التأثيرات على بروتين surviving وقد تبين فعالية المستخلصات وفق الترتيب التالي : المستخلص الايثانولي ,المستخلص المائي –الكحولي ,المستخلص المائي

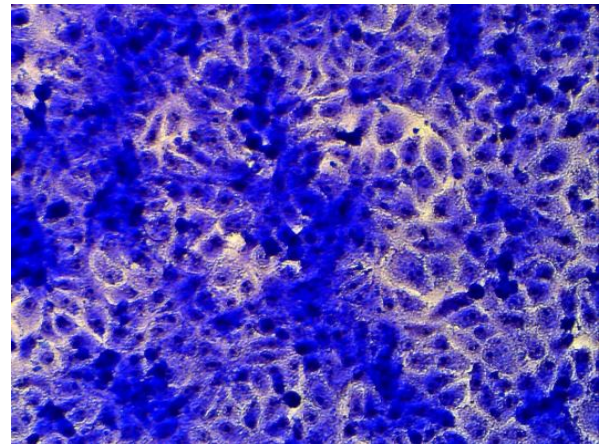
وقد يكون سبب هذه الفعالية العالية الى كبح الجذور الحرة للمستخلص الكحولي يعود السبب الى النسبة العالية من المواد الفعالة اذ تبين ان Withanolid يسجل أعلى نسبة في المستخلص الكحولي أكثر من المستخلص المائي كما أوضحتها الدراسات السابقة (Sharma and Verma 2023) وهذا تم التوصل اليه من خلال اختبار HPLC للمستخلصات المائية والاثيلي وجود واحد أو أكثر من المركبات الثانوية من الفلافونويدات والفينولات في نبات الاشواغندا كما اشارت بعض الدراسات السابقة إلى أن مستخلصات الأشواغندا تظهر نشاطاً مضاداً لسرطان القولون عبر تثبيط تكاثر الخلايا، وتحفيز موت الخلايا المبرمج، وتقليل الإجهاد التأكسدي، وتثبيط إنزيم COX-2 مما يشير إلى إمكانيتها ، كعلاج مساعد آمن وفعال (Macharia et al. 2023 B).



A- معاملة السيطرة (غير المعاملة بالمستخلص)



B- الخلايا المعاملة بالمستخلص الكحولي (1000 µg/ml)



C- الخلايا المعاملة بالمستخلص المائي (1000 µg/ml)

صورة (3 - 4) مقارنة اشكل خلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بين معاميل السيطرة والخلايا المعاملة بالمستخلصات لجذر نبات الاشواغندا (المائية والكحولية) عند التركيز (1000 µg/ml) بعد مرور 48 ساعة (Crystal Violet, 40X)

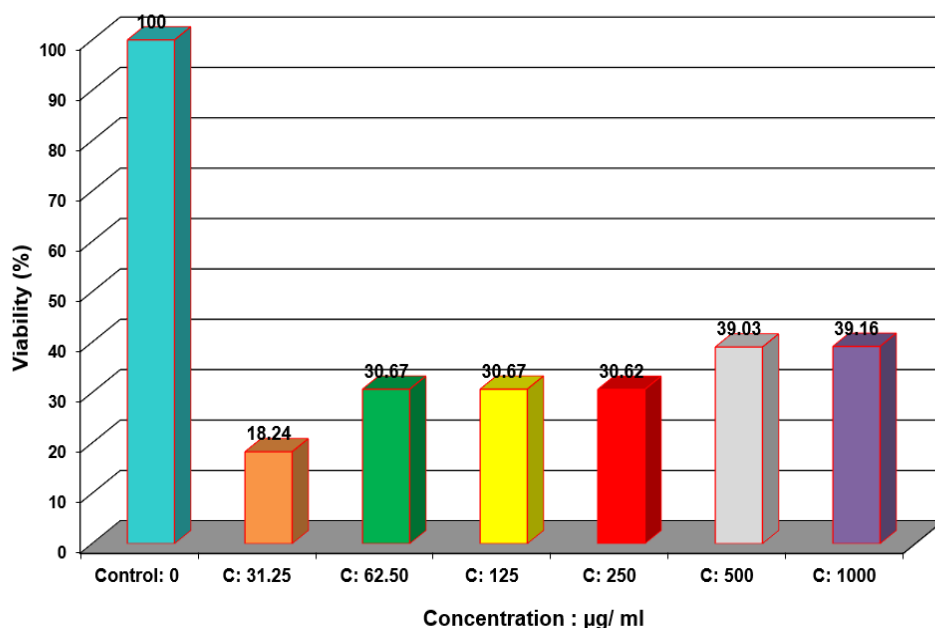
### 3.4. تأثير عقار سيسبلاتين Cisplatin على النسبة المئوية لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) السمية الخلوية

تظهر النتائج الموضحة في الجدول (4-5) والشكل (4-4) تأثير عقار Cisplatin على حيوية الخلايا السرطانية لسرطان القولون ولكافة التراكيز المستخدمة وذلك بمدة التعريض 48 ساعة ويبدأ التأثير للعقار حيث كانت حيوية الخلايا السرطانية  $(39.16 \pm 2.50)\%$  عند التركيز  $1000 \mu\text{g/ml}$  وهي اقل نسبة انخفاض لحيوية الخلايا السرطانية بينما سجلت النتائج عند التركيز  $(31.25 \mu\text{g/ml})$  نسبة  $18.24\%$  ( $\pm 1.44$ ) وهي تمثل اعلى نسبة انخفاض لحيوية الخلايا السرطانية وهناك انخفاض تدريجي طفيف بالنسب ما بين التراكيز الاخرى .

جدول (4-5) تأثير عقار سيسبلاتين Cisplatin بتركيز  $(15.6 \mu\text{g/ml})$  على النسبة المئوية لحيوية خلايا خط سرطان القولون البشري بعد فترة تعريض 48 ساعة

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Mean $\pm$ SE of Viability (%)
Control: 0	100.00 $\pm$ 2.15 a
31.25	18.24 $\pm$ 1.44 d
62.50	30.67 $\pm$ 1.10 c
125	30.67 $\pm$ 1.10 c
250	30.62 $\pm$ 4.60 c
500	39.03 $\pm$ 1.01 b
1000	39.16 $\pm$ 2.50 b
L.S.D. value	7.397 **

المتوسطات التي تحتوي على الاحرف الانكليزي الصغيرة المختلفة للعمود الواحد دلالة على وجود فرق معنوي \*\* ( $P \leq 0.01$ )



شكل (4-4) تأثير عقار سيسبلاتين Cisplatin بتركيز (15.6 µg/ml) على النسبة المئوية لحيوية خلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد فترة تعريض 48 ساعة

إن عمل عقار سيسبلاتين Cisplatin عن طريق إتلاف الحمض النووي للخلايا السرطانية ومنعها من الانقسام والنمو، ويمكن للسيسبلاتين دخول الخلايا عبر الانتشار السلبي عبر غشاء الخلية إذ تعتمد هذه العملية على تدرجات في التركيز، حيث ينتقل السيسبلاتين من منطقة ذات تركيز أعلى من خارج الخلية إلى منطقة ذات تركيز أقل إلى داخل الخلية (Zhou et al., 2022) ينتشر سيسبلاتين بواسطة عملية تسمى البلعمة الخلوية التي تعتبر هذه الآلية الخلوية في امتصاص الادوية المضاد للسرطان (Wang et al., 2020) وبعد الامتصاص الخلوي، يُنقل السيسبلاتين إلى النواة ويبدأ تأثيراته السامة للخلايا.

إن الهدف الأكثر شيوعاً لارتباط السيسبلاتين هو قواعد البيورين، وخاصةً الكوانين (G)، وبدرجة أقل، الأدينين (A). يحدث الارتباط بشكل رئيس مع الموضع N7 للكوانين، وأحياناً مع الموضع N3 للأدينين (Johnstone et al., 2013). ويمكن للسيسبلاتين أيضاً أن يُحفز الإجهاد التأكسدي عن طريق توليد أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) واستنزاف مضادات الأكسدة الخلوية مثل الجلوتاثيون (GSH) وثيوريدوكسين (Trx). يمكن أن تُسبب أنواع الأكسجين التفاعلية المزيد من الضرر للحمض النووي والبروتينات والدهون، مما يؤدي إلى خلل في وظائف الخلايا وموتها (Abdelhamid et al., 2022; Cavalu et al., 2022; Mohammed et al., 2023).

يعد عقار سيسبلاتين (Cisplatin) من العوامل الكيميائية الفعالة في علاج السرطان، حيث يعمل على تحفيز الموت الخلوي المبرمج (Apoptosis) عبر تأثيره على كل من النواة والميتوكوندريا، مما يؤدي إلى تثبيط نمو الخلايا السرطانية وتقليل حيويتها. إلا أن هذه الفعالية العالية يصاحبها تأثيرات جانبية سلبية على الخلايا السليمة المجاورة للورم، مما يحد من استخدامه السريري بسبب يؤدي إلى سمية متعددة للأعضاء الناجمة عن سيسبلاتين مثل سمية الكبد وسمية الكلى والسمية القلب والسمية العصبية (Aldossary, 2019) ولهذا السبب، تم استخدام المستخلصات المائية والكحولية مع العقار. وللتقليل من هذه الآثار الضارة، جرى التوجه إلى استخدام مستخلصات نباتية مائية وكحولية كمركبات مساعدة، لقدرتها المحتملة على تقليل السمية وتعزيز الفعالية (Ibrahim et al., 2018).

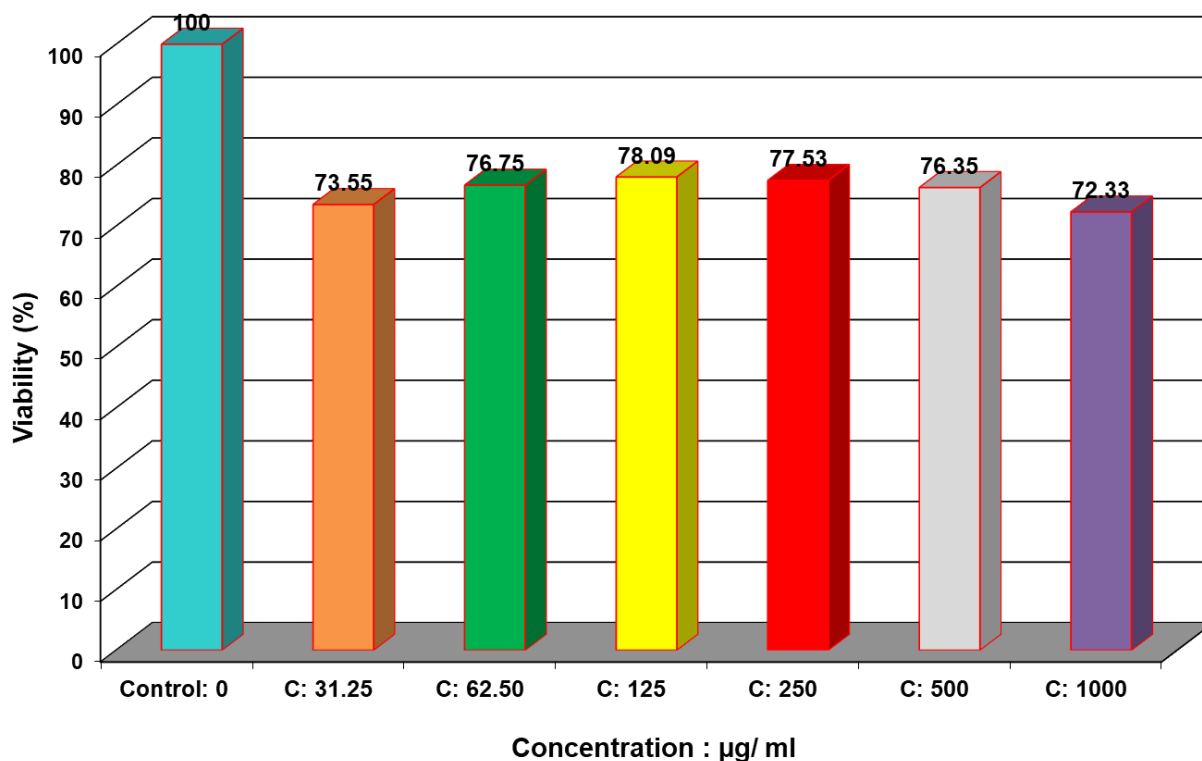
#### 1.3.4. تأثير المستخلص المائي لجذور نبات الشواغندا مع عقار سيسبلاتين Cisplatin بتركيز (15.6 µg/ml) على النسبة المئوية لحيوية خلايا خط سرطان القولون (SW480) بعد تعريض 48 ساعة

تظهر النتائج الموضحة في جدول (4-6) والشكل (4-5) تأثير المستخلص المائي مع العقار من خلال تأثيرها على حيوية الخلايا السرطانية لسرطان القولون فقد وجد لدينا فرق معنوي عالي ولجميع التراكيز المدروسة فقد سجل أعلى تأثير على حيوية الخلايا عند التركيز (1000 µg/ml) كانت النسبة المئوية (72.33 ± 1.57)% بينما سجلت عند التركيز (125 µg/ml) أقل تأثير فقد بلغت 78.09 (± 3.87)% وكان التباين بين التراكيز الأخرى بشكل قليل حيث سجلت نسبة (73.55 ± 4.41)% و (77.53 ± 0.64)% وذلك عند التركيزين (31.25 µg/ml) و (250 µg/ml) على الترتيب.

جدول (4-6) تأثير المستخلص المائي مع عقار سيسبلاتين Cisplatin بتركيز (15.6 µg/ml) على النسبة المئوية لحيوية خلايا خط سرطان القولون البشري بعد فترة تعريض 48 ساعة

Concentration (µg/ml)	Mean ±SE of Viability (%)
Control: 0	100.00 ±1.23 a
31.25	73.55 ±4.41 b
62.50	76.75 ±1.15 b
125	78.09 ±3.87 b
250	77.53 ±0.64 b
500	76.35 ±4.44 b
1000	72.33 ±1.57 b
L.S.D. value	8.019 **

المتوسطات التي تحتوي على الأحرف الانكليزي الصغيرة المختلفة للعمود الواحد دلالة على وجود فرق معنوي \*\* (P ≤ 0.01).



شكل (4-5) تأثير المستخلص المائي لجذور نبات الاشواغندا مع عقار السيسبلاتين تركيز (15.6) على النسبة المئوية لحيوية خلايا خط سرطان القولون (SW480) بعد فترة تعريض 48 ساعة

نظرًا للتأثيرات السامة المرتبطة بعقار السيبلاتين في علاج مرضى السرطان، توجهت الدراسات الحالية إلى استخدام مضادات أكسدة نباتية طبيعية فعالة لمنع أو تقليل الالتهاب الناتجة وتخفيف من تأثيرات الجانبية لهذا العلاج وتقليل من حجم الأورام الناتجة (Dasari et al.,2022).

كما وأشارت دراسة إلى الزيادة في فعالية السيبلاتين وذلك بتثبيط تكاثر الخلايا السرطانية بفضل المواد العشبية، والتي تحفز إلى زيادة فعالية مضادات الأكسدة (GSH tripeptide) و (Glutathione S-Transferase (GST حيث تعمل على تثبيط مقاومة الخلية للسيبلاتين، إذ يرتبط انخفاض السمية بزيادة مقاومة السيبلاتين للمجاميع الخلوية مثل GSH الذي يستخدم كمؤشر في مقاومة الخلايا السرطانية للعلاج الكيميائي حيث أثبت أن زيادته يقلل من تأثير العلاج مثل السيبلاتين ، وتنظيم النشاط الأنزيمي لـ GST ليكون أكثر فعالية من خلال التآزر مع هذه المادة ( Dai et al., 2019). وقد لوحظ ذلك عند استخدام بعض الأعشاب التي تزيد من تأثير وفعالية السيبلاتين ضد الخلايا السرطانية وقد درست العديد من المستخلصات النباتية لاستخدامها المحتمل في علاج سرطان الثدي، ومن بين هذه المستخلصات مستخلص اليانسون (Sarheed and Jaffat,2022) استخدم تركيبات تآزرية من الأدوية، بما في ذلك المركبات الطبيعية، لتعزيز الفعالية العلاجية في مقاومة السرطان والتقليل من مقاومة الأدوية. وتعد المركبات الطبيعية خياراً واعداً نظراً لقدرتها على تثبيط نمو الورم ومنع انتشاره، بما في ذلك تثبيط النقائل الخلوية عبر آليات متعددة مثل كبح الهجرة الخلوية والإنزيمات المرتبطة بتفكك النسيج. وتكوين الأوعية الدموية، والتكاثر، والتميز، وتنظيم الالتهام الذاتي، وتحفيز موت الخلايا المبرمج مع زيادة الفعالية العلاجية وتقليل السمية العامة (Demain et al.,2011). تُستخرج المركبات الطبيعية النشطة بيولوجياً، بما في ذلك المواد الكيميائية النباتية، مثل فينولات والفلافونويدات، والفيتامينات، والمغذيات الدقيقة الأخرى، من النباتات والفطريات والبكتيريا، وكائنات حية أخرى. بعضها موجود في الاطعمة والتوابل ، بينما يُستخرج بعضها الآخر من مصادر غير غذائية (Vidoni et al.,2020). تُشكل المنتجات الطبيعية النشطة بيولوجياً أساساً للعديد من أنواع الطب التكميلي والبديل (complementary and alternative medicines) كما خفف الكركمين من تأثير السيكلوفوسفاميد (cyclophosphamide) على تثبيط نمو الورم سرطان الثدي BT-474 (Somasundaram et al.,2002) .

إن مزيج الكركمين والإيتوبوسيد في خلايا الورم الأرومي الدبقي U251 أظهر تفاعلاً تآزرياً، حيث بلغ مؤشر التفاعل 0.59، مما يشير إلى فعالية مشتركة في تحفيز موت الخلايا السرطانية (Hackman et al.,2020) بالإضافة الى ذلك أظهرت نفس الدراسة أن الجمع بين المركبين الكركمين والإيتوبوسيد

ادى إلى تقليل فعالية العلاج الكيميائي كما في خلايا سرطان عنق الرحم (HeLa)، و سرطان الثدي (MCF-7)، وسرطان القولون (HCT116)، وسرطان الكبد (HepG2) هذا التأثير يحفز إلى توقف الخلايا في مراحل معينة من دورة الخلية وهي (S و G2/M)، مما يعطي الخلايا فترة أطول لإصلاح تلف الحمض النووي، وبالتالي تقليل فعالية العلاج. (Abdel-Warith *et al.*, 2012).

تشير العديد من الأبحاث، من خلال الكشف عن أساليب فعّالة للوقاية من السرطان، بشكل رئيس على استخدام مواد حيوية نشطة طبيعياً قادرة على تحفيز موت الخلايا المبرمج الانتقائي (Mukherjee *et al.*, 2001). ويتفق الباحثون الذين يدرسون السرطان عادةً على الآثار الإيجابية لدمج المستخلص الطبيعي مع أدوية مضادة للسرطان (Cao *et al.*, 2016)، حيث وجد أن مستخلص جذور الأشواغندا يمكن أن يعزز من فعالية السيسبلاتين في علاج سرطان القولون، خاصة في خلايا HT-29، وذلك من خلال تقليل نمو الورم وتعزيز موت الخلايا المبرمج.

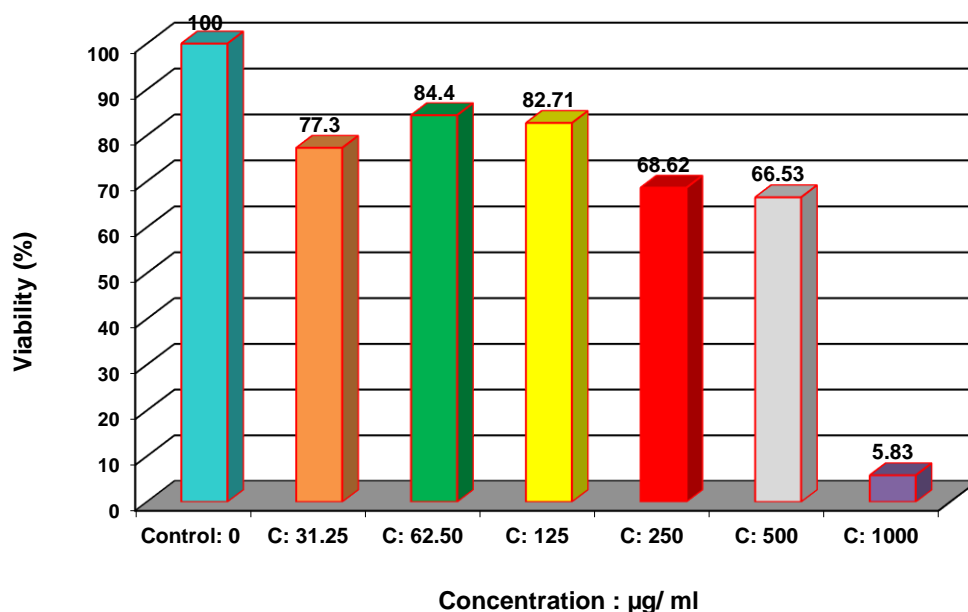
#### 2.3.4. تأثير المستخلص الكحولي لجذور نبات الشواغندا مع تركيز عقار السيسبلاتين (Cisplatin) على النسبة المئوية لحيوية خلايا خط سرطان القولون (SW480) ( $15.6 \mu\text{g/ml}$ )

خلال النتائج الموضحة في الجدول (4-7) والشكل (4-6) التي تبين بوساطتها التأثير السام للمستخلص الكحولي لجذر نبات الأشواغندا من خلال تأثيره على النسبة المئوية لحيوية خلايا خط سرطان القولون ولقد ظهرت لدينا فروق معنوية ولجميع التراكيز المدروسة فقد سجل أعلى انخفاض على حيوية الخلايا عند التركيز ( $1000 \mu\text{g/ml}$ ) كانت النسبة المئوية ( $5.83 \pm 0.14$ )% أي أعلى نسبة تثبيط لخلايا السرطان القولون البشري، بينما عند التركيز ( $62.50 \mu\text{g/ml}$ ) سجلت أقل انخفاض في حيوية الخلايا السرطانية وكانت النسبة ( $84.40 \pm 0.68$ )% وقد سجلت النتائج عند التركيزين ( $31.25 \mu\text{g/ml}$ )، ( $125 \mu\text{g/ml}$ ) كانت النسبة المئوية ( $77.30 \pm 1.91$ )%، ( $82.71 \pm 2.83$ )% على الترتيب.

جدول (7-4) تأثير المستخلص الكحولي لجذور نبات الاشواغندا مع عقار Cisplatin (15.6)  $\mu\text{g/ml}$  على النسبة المئوية لحيوية خلايا خط سرطان القولون البشري بعد التعريض (48) ساعة

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Mean $\pm$ SE of Viability (%)
Control: 0	100.00 $\pm$ 1.23 a
31.25	77.30 $\pm$ 1.91 c
62.50	84.40 $\pm$ 0.68 b
125	82.71 $\pm$ 2.83 bc
250	68.62 $\pm$ 1.47 d
500	66.53 $\pm$ 3.39 d
1000	5.83 $\pm$ 0.14 e
L.S.D. value	5.711 **

المتوسطات التي تحتوي على الاحرف الاتكليزي الصغيرة المختلفة للعمود الواحد دلالة على وجود فرق معنوي \*\* ( $P \leq 0.01$ ).



شكل (6-4) تأثير المستخلص الكحولي لجذور نبات الاشواغندا مع عقار السسبلاتين بتركيز (15.6)  $\mu\text{g/ml}$  على النسبة المئوية لحيوية خلايا خط سرطان القولون البشري بعد فترة تعريض 48 ساعة

تشير الأدلة التجريبية إلى أن المستخلص الكحولي وجذور الأشواغندا تمنع الخلايا السرطانية من الانتشار (Govindaram et al.,2022 ;Singh et al.,2021) وقد ثبت أن مستخلص الإيثانول من النبات شديدة السمية للخلايا وتمنع نمو سلالة خلايا سرطان الثدي البشرية، كما و أثبتت الدراسات التجريبية على الحيوانات أن استخدام مستخلص جذر الأشواغندا والصيام المتقطع يعيدان حلاً واعداً في معالجة سرطان الثدي للتغلب على مقاومة السيبلاتين (Jawarneh and Talib,2022) ومن جهة اخرى، أظهر مستخلص الكحولي لجذر نبات أشواغندا القياسي (Oncowithanib) نشاطاً علاجياً فعالاً في خلايا سرطان الثدي MCF7 . (Albahri et al.,2024).

إن مستخلصات الأشواغندا أظهر أن Withaferin A مركباً رئيساً في الأشواغندا يرتبط بمواقع تثبيط إنزيم AKT-1 وBCL-2 ، وبالأخص عند الدمج مع مركب جارسينول من نبات (*Garcinia indica*) ، مما يزيد فعالية المستخلص المضاد للورم ويعزز الموت الخلوي (Biswas et al.,2025) .

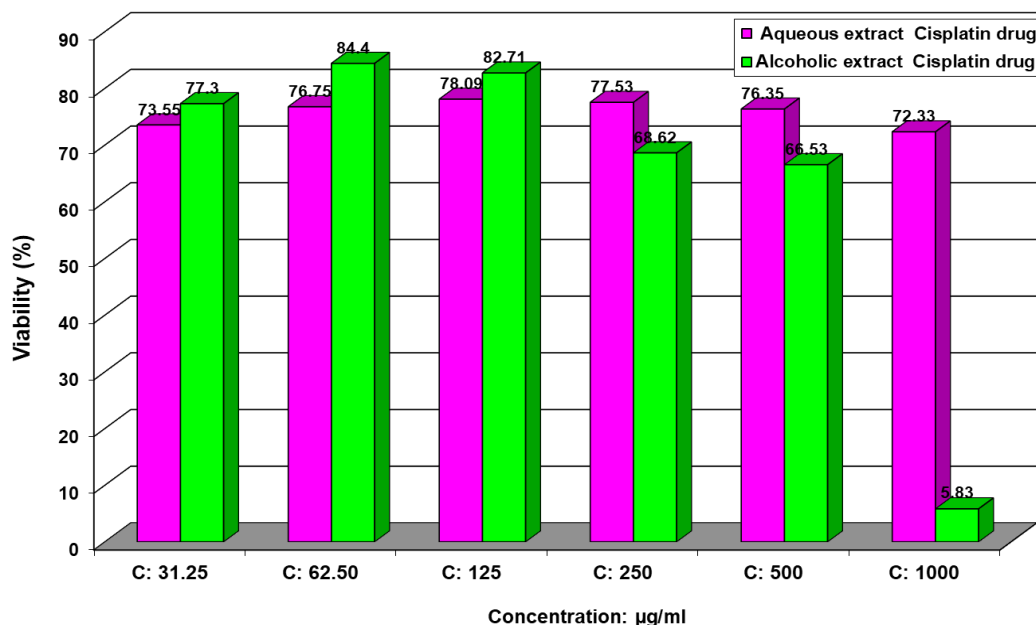
### 3.3.4. دراسة مقارنة بين التأثير السمي للمستخلصات المائية والكحولية لجذور نبات الأشواغندا مع عقار السيبلاتين Cisplatin على خط خلايا سرطان القولون SW480 بعد فترة تعريض 48 ساعة

كما تظهر النتائج الموضحة في الجدول (4-8) والشكل (4-7) تأثير المستخلصات المائية و الكحولية مع العقار Cisplatin من خلال تأثيرها على حيوية الخلايا السرطانية لسرطان القولون وقد اظهرت لدينا فرق معنوي ولجميع التراكيز المدروسة فقد سجل اعلى انخفاض لحيوية الخلايا السرطانية عند التركيز  $1000 \mu\text{g/ml}$  للمستخلصين المائي والكحولي مع العقار فكانت النسبة  $72.33 \pm 1.57$  % (و  $5.83 \pm 0.14$  % على التوالي حيث سجلت النتائج الحالية وان المستخلص الكحولي مع العقار سجل اعلى نسبة انخفاض في حيوية الخلايا لخط سرطان القولون اي اعلى تثبيط في نمو الخلايا السرطانية مما يعزز استخدام المستخلص المائي و الكحولي في قتل الخلايا السرطانية دون تأثير على الخلايا الطبيعية لم يحصل فيها اي تأثير من العقار والمستخلص وهذا هو ما جاءت بها اساسيات عمل جذور نبات الأشواغندا ومن النتائج الموضحة أيضاً إن أعلى حيوية للخلايا السرطانية سجلتها النتائج للمستخلص المائي مع العقار كانت عند التركيز  $250 \mu\text{g/ml}$  النسبة  $77.53 \pm 0.64$  % اما في المستخلص الكحولي سجلت النتائج عند التركيز  $62.50 \mu\text{g/ml}$  كانت النسبة  $84.40 \pm 0.68$  % من خلال النتائج الموضحة إن تأثير المستخلص يعتمد على نوع المستخلص وتركيز المستخلص وكذلك مرحلة المرض .

جدول (4-8) تأثير المستخلصات المائية والكحولية لجذور نبات الاشواغندا مع عقار Cisplatin (15.6) µg/ml على النسبة المئوية لحيوية خلايا خط سرطان البشري (SW480) بعد فترة تعريض 48 ساعة

Concentration (µg/ml)	Mean ±SE of Viability (%)		L.S.D. value
	Aqueous extract Cisplatin drug	Alcoholic extract Cisplatin drug	
31.25	73.55 ±4.41 A a	77.30 ±1.91 A b	5.861 NS
62.50	76.75 ±1.15 B a	84.40 ±0.68 A a	6.075 *
125	78.09 ±3.87 A a	82.71 ±2.83 A ab	5.923 NS
250	77.53 ±0.64 A a	68.62 ±1.47 B c	7.178 *
500	76.35 ±4.44 A a	66.53 ±3.39 B c	6.845 *
1000	72.33 ±1.57 A a	5.83 ±0.14 B d	10.502 **
L.S.D. value	7.619 NS	6.405 **	---

المتوسطات التي تحتوي على الاحرف الانكليزية الصغيرة المختلفة للعمود الواحد دلالة على وجود فرق معنوي ، \*\* (P ≤ 0.01).  
المتوسطات التي تحتوي على الاحرف الانكليزية الكبيرة المختلفة للصف الواحد دلالة على وجود فرق معنوية\*\* (P ≤ 0.01)



شكل (4-7) مقارنة بين التأثير السمي للمستخلصات المائية والكحولية لجذور نبات الاشواغندا مع عقار السيسبلاتين Cisplatin (15.6) µg/ml على خلايا خط سرطانية القولون SW480

نظرا للآثار الجانبية الشديدة للعلاج الكيميائي المتمثلة بتلف الخلايا السليمة الطبيعية، استخدمت المواد الكيميائية النباتية ونظائرها الآن بشكل كبير في علاج سرطان القولون والوقاية منه مما يفتح الباب أمام اليات علاجية نباتية جديدة كبداية فعالة وآمنة. تُمثل المنتجات الطبيعية النباتية، بشكل مباشر أو غير مباشر، حوالي 50% من جميع العلاجات الكيميائية المستخدمة بانتظام، مما يجعلها مصدراً فعالاً لأدوية جديدة مضادة لسرطان القولون (Macharia et al., 2022 B).

يُركز العلماء على مرض السرطان اليوم وبشكل أكبر على دور المستخلصات المائية والكحولية للنباتات مع عقار السييسبلاتين. وقد اظهرت نتائج سابقة بتأزر العلاج المشترك بالكرمين والسييسبلاتين بشكل تآزري إلى تثبيط هجرة الخلايا، وتنشيطها، وفسفر STAT-3 وانخفاض مستواه بروتين يحفز نمو الخلايا السرطانية وبقائها، وخفض مستويات الخلايا الجذعية في سرطان الغدة الدرقية (Khan et al., 2020). كما أن العلاج المشترك بالكرمين والسييسبلاتين زاد من معدل موت الخلايا المبرمج في سرطان المثانة مقارنةً بالخلايا المعرضة لظروف العلاج بعامل واحد (Ameer et al., 2024).

كما يُعدّ العلاج المشترك بالزنجيل مع السييسبلاتين خياراً موقفاً. حيث أشارت الدراسة إلى أن الزنجرون وهو أحد مكونات الزنجبيل اظهرت بعض الدراسات إلى ان من فوائد للزنجرون في التخفيف من التأثيرات الجانبية للسييسبلاتين يوفر حماية من الضرر التأكسدي الناتج عن السييسبلاتين في الامعاء(الصائم) لدى فئران (Tian et al., 2020; Farrokh-Eslamlou et al., 2024).

استُخدم حمض الأسكوربيك مع السييسبلاتين كعلاج مساعد للعديد من أنواع السرطان يتمتع بمجموعة واسعة من التأثيرات الدوائية، بما في ذلك تأثيرات مضادة للسرطان، ومضادة للالتهابات، ومضادة للأكسدة، ومضادة للسكري، ومضادة لالتنام الجروح، ومضادة لهشاشة العظام (Ortekin et al., 2020). وتتمثل آلية عمل الفلافونويد في تعزيز علاج السييسبلاتين في استنزاف آلية الأكسدة الخلوية، مما يُساعد على خلل وظائف الميتوكوندريا، وبالتالي يؤدي إلى موت الخلايا المبرمج (Casanova et al., 2021) بالإضافة إلى ذلك، يُحفز فيتامين (C) مع السييسبلاتين موت الخلايا عن طريق تغيير المؤشرات الحيوية المؤكسدة في الخلية وزيادة تنظيم البروتين p53، مما يُحفز موت الخلايا المبرمج وكذلك كشفت دراسة حديثة أُجريت على خلايا نخاع العظم أن كريات الدم الحمراء متعددة الألوان ذات النوى الدقيقة التي يُحفزها السييسبلاتين قد انخفضت مع استخدام مضادات الأكسدة، مثل فيتامين C (Zaied and Elballat, 2019).

ولتحديد إمكانات المستخلصات المائية والكحولية وتأثيرها على خلايا سرطان القولون البشري (SW480)، واستخدامها كعلاج مستقبلي للسرطان. كما ساهمت المركبات الفعالة المستخلصة من نبات *Withania somnifera* في تثبيط نمو الخلايا السرطانية، وتحفيز الخلايا المناعية على مكافحة الأورام. وقد عكست العديد من الدراسات كفاءة النباتات الطبية الموجودة في البيئات المحلية وقدرتها على تدمير الخلايا السرطانية، حيث أظهرت الدراسة (Saqban et al.,2022) فعالية مستخلصات ثمار و بذور نبات الحنظل ضد خلايا سرطان الكبد البشري (Hep-G2) .

وكما أظهرت نتائج دراسة سابقة ان مستخلص جذر *W. somnifera* الإيثانولي يحتوي على مركبات فينولية، وفلافونويدات، وتانينات، وجليكوسيدات ستيرويدية، وقلويدات، وسكريات مختزلة. اذ يُعد ويثافين أ Withaferin-A أحد مكونات اللاكتون الستيرويدية في جذر النبات، عند اختباره على سلالات مختلفة من الخلايا السرطانية نشاطاً ساماً للخلايا، ويقلل من الآثار الجانبية للـ Doxorubicin دوكسوروبوسين عند إعطائه بشكل تآزري المضادة للسرطان لمستخلص الأشواغندا الإيثانولي كعامل مساعد مع الدوكسوروبوسين في خط خلايا سرطان الثدي MCF7 (Elzayat et al.,2025).

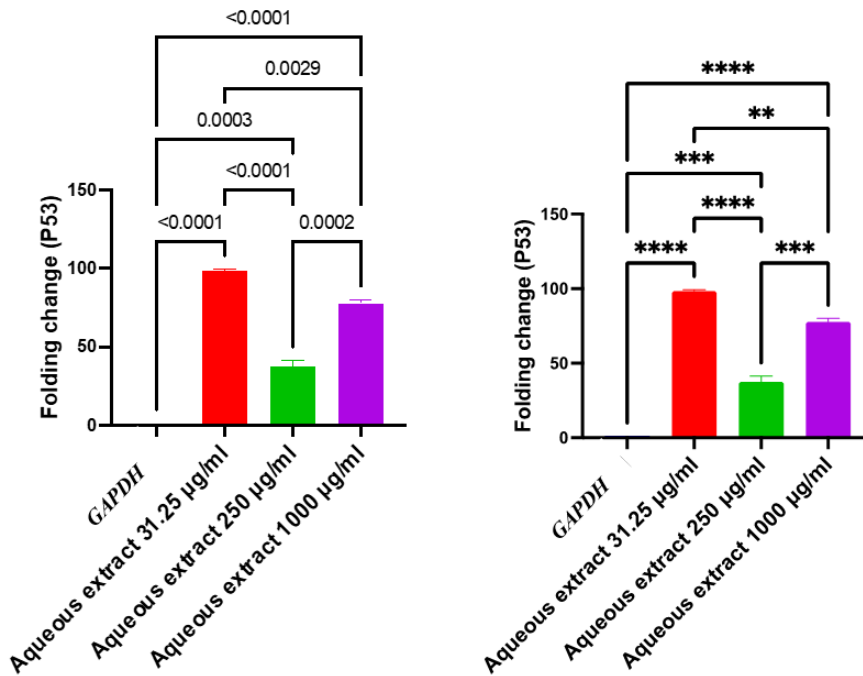
واشارة دراسة عند تعريض مركبات كيميائية في *W. somnifera* مثل withanolide A و withaferin A لخطوط خلايا HL-60، كانت هذه المركبات قادرة على تحفيز التنظيم التصاعدي لموت المستقبلات بالإضافة إلى تغيير نسبة أفراد عائلة Bcl 2 من البروتينات وقد أدى ذلك إلى تنشيط إنزيمي Caspase-3 وPARP، مما تسبب في تحلل الحمض النووي (DNA fragmentation) داخل الخلية، وهو ما يُعد علامة مميزة لبدء عملية الموت الخلوي المبرمج (Apoptosis) (Saleem et al.,2020) .

#### 4.4. الدراسة الجزيئية Genetic Study

1.4.4. تأثير مستخلصات جذور نبات الاشواغندا على التعبير الجيني لجين *P53* لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة

1.1.4.4. تأثير المستخلص المائي لجذور نبات الاشواغندا على التعبير الجيني لجين *P53*

يظهر من خلال الشكل (4-8) قيم التعبير الجيني لجين *P53* لمختلف المجاميع وكانت في التركيز  $\mu\text{g/ml}$  (31.25) سجلت النتائج نسبة التعبير الجيني لجين *P53* كانت  $(98.36 \pm 0.9642)\%$  بالمقابل مع التعبير الجين السيطرة *GAPDH*  $(1.000 \pm 0.0)\%$  بينما كانت النتائج عند التركيزين  $\mu\text{g/ml}$  (250),  $\mu\text{g/ml}$  (1000) كانت النسبة  $(37.50 \pm 3.853)\%$ ,  $(77.73 \pm 2.285)\%$  على الترتيب ومن خلال النتائج يظهر زيادة واضحة في قيمة التعبير الجيني لجين *P53* عند التركيز  $\mu\text{g/ml}$  (31.25) للمستخلص المائي لجذور نبات الاشواغندا .



الشكل (4-8) تأثير المستخلص المائي لجذور النبات الاشواغندا على قيمة التعبير الجيني لجين *P53* لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة ومقارنة مع جين السيطرة

*GAPDH*

تُسهم التعديلات الجينية والوراثية في مسارات موت الخلايا المبرمج في تحفيز على التكاثر الخلوي الخارج عن السيطرة. التي تنتج بسبب طفرات جينية، مما يؤدي إلى نمو الورم بشكل غير منتظم كما ويُعد الحفاظ على التوازن الدقيق بين موت الخلايا المبرمج وتكاثرها أمراً أساسياً في تنظيم الاستقرار الداخلي لنسيج القولون. ولكن اختلال هذا التوازن يشكل عاملاً رئيسياً في تطور ونمو سرطان القولون. غالباً ما تتميز أورام هذا النوع من السرطان بزيادة في مقاومة الخلايا للموت المبرمج، مما يُسهم في تعزيز مقاومة الخلايا السرطانية للعلاج. (Ramachandran et al., 2000).

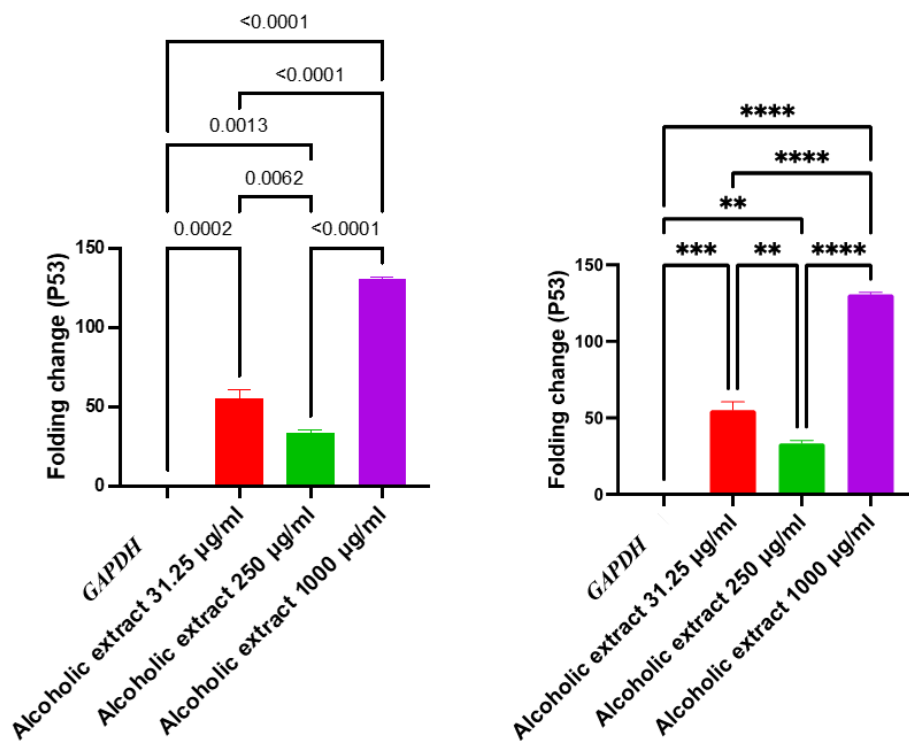
أظهرت نتائج إحدى الدراسات أن المزج بين مستخلص نبات الكاسيا (*Cassia fistula*) الذي هو نفس عائلة النبات المستخدم في دراستنا وعقار السيسبلاتين (*Cisplatin*) أسفر عن تأثير تآزري في تعزيز تحفيز مسار موت الخلايا المبرمج (*Apoptosis*)، مما يدعم إمكانية توظيف هذا المستخلص كعامل مساعد فعّال في بروتوكولات علاج سرطان القولون. (Talib et al., 2023).

يعد جين *P53* أكثر الجينات الكابحة للورم *Tumor suppressor genes* التي تتعرض للطفرات في الأورام البشرية، حيث أظهرت الدراسات أن أكثر من 50% من السرطانات البشرية حيث يفقد قدرته على أداء وظائفه الطبيعية عندما يتعرض *p53* للطفرات، مما يحفز الخلايا التالفة بالانقسام والنمو الغير مسيطر عليه، مما يساهم في تكوين الأورام وتطورها. تُعد هذه الطفرات من الأحداث المبكرة في عملية التسرطن، وتُلاحظ بشكل واضح في أنواع مختلفة من السرطانات، بما في ذلك سرطان القولون، حيث تصل نسبة الطفرات في *TP53* إلى حوالي 56% و في سرطان الرئة 50% بينما سرطان الثدي تصل نسبة الطفرات إلى 30-50% (Macleod, 2000; Lee and Muller, 2010).

#### 2.1.4.4. تأثير المستخلص الكحولي لجذور نبات الاشواغندا على التعبير الجيني ل *P53* لخلايا خط

سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة

جاءت النتائج الموضحة في الشكل (4-9) تقدير التعبير الجيني لجين *P53* في مختلف المجاميع ووصلت قيمة التعبير الجيني عند التركيز (1000)  $\mu\text{g/ml}$  للجين *P53*  $(130.7 \pm 1.281)$  وهي اعلى نسبة تعبير جيني يسجلها المستخلص الكحولي لجذور النبات مقارنة بقيمة التراكيز المستخدمة (31.25) و  $(250) \mu\text{g/ml}$  حيث بلغت قيم التعبير الجيني  $(55.08 \pm 5.391)$  و  $(33.39 \pm 1.963)$  على الترتيب.

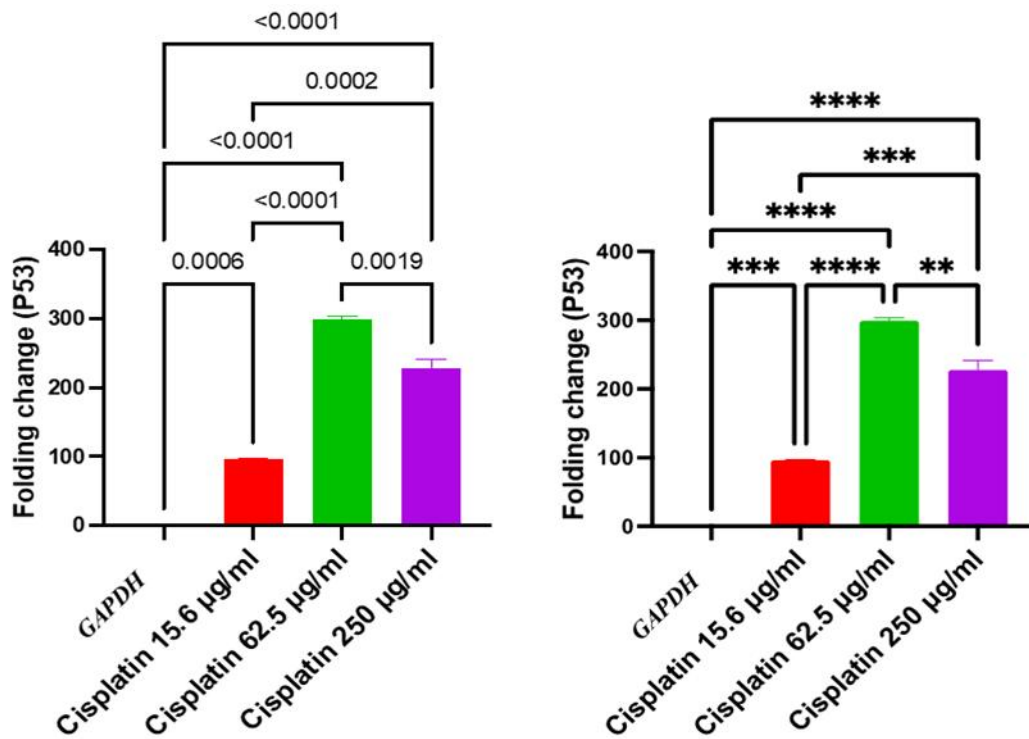


الشكل (9-4) تأثير المستخلص الكحولي لجذور النبات الاشواغاندا على قيمة التعبير الجيني لجين *P53* لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة ومقارنة مع الجين السيطرة *GAPDH*

في دراسة اخرى تبين أن مستخلصات اوراق الكرديه الغنية بالأنثوسيانين تُفعل بروتين كيناز المنشط بواسطة AMP (AMPK) activated protein kinase (AMPK)، مما يؤدي إلى تنشيط مسار Fas/FasL، وتفعيل الكاسباز-8، وإطلاق السيروترون C من الميتوكوندريا، وبالتالي تحفيز الكاسباز-3 الذي يُسبب موت الخلايا المبرمج في خلايا سرطان القولون البشري (Yasmin et al., 2023) أن مستخلص أنثوسيانين في نبات الكرديه يحفز على تنظيم *p53* في خلايا سرطان البروستاتا والقولون. ويمكن Anthocyanin تحفيز نسخ *p21* و *p27*، وهو مثبط واسع النطاق لـ CDK وبالتالي يمنع الخلايا السرطانية من دخول الدورة الخلوية ويوقفها من الانقسام (Tsai et al., 2023). وقد أظهرت دراسة أخرى أن مستخلص الأشواغاندا يزيد من النسبة بين BAX/BCL-2 ويرفع مستويات التعبير الجيني لـ *p53* في خلايا سرطان البروستاتا (Sharma et al., 2018).

#### 2.4.4. تأثير عقار السيسبلاتين Cisplatin على التعبير الجيني لجين P53 لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة

اظهرت النتائج في الشكل (4-10) تأثير العقار السيسبلاتين فقط على التعبير الجيني للجين P53 فقد سجلت نسبة التأثير عند التركيز  $62.5 \mu\text{g/ml}$  أعلى نسبة تأثير كانت  $(299.2 \pm 4.400)\%$  بالمقارنة مع التعبير الجيني للسيطرة  $GAPDH$   $(1.000 \pm 0.0)\%$  وكذلك مقارنتها مع التركيزين  $(250)$  و  $(15.6) \mu\text{g/ml}$  فكان التأثير بنسبة  $(227.7 \pm 13.39)\%$  و  $(96.34 \pm 0.9443)\%$  على الترتيب.



الشكل (4-10) تأثير عقار السيسبلاتين Cisplatin على قيمة التعبير الجيني لجين P53 لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد 48 ساعة من التعريض ومقارنة مع جين السيطرة **GAPDH**

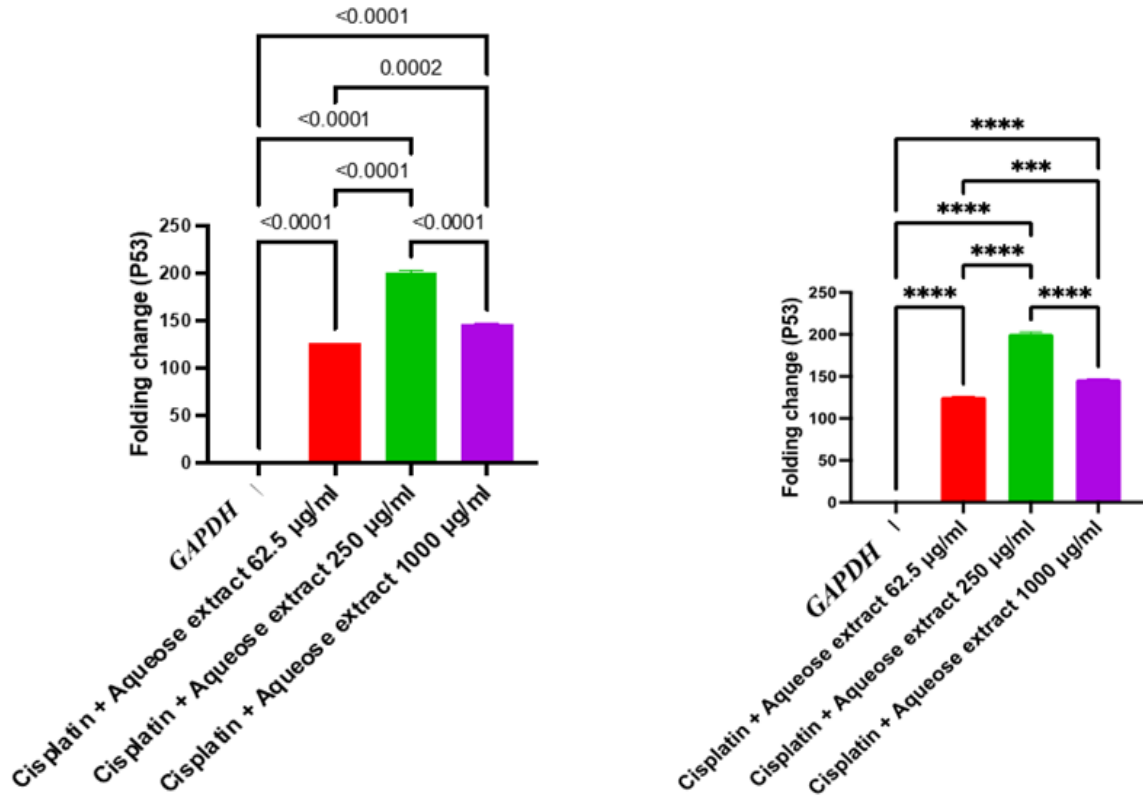
تشير النتائج الحالية إلى أن السيسبلاتين أظهر فعالية في تقليل قابلية خلايا سرطان القولون (SW480) للبقاء حية معتمدة على التركيز. فقد أظهر انخفاض واضح في البقاء وذلك بزيادة تركيز الدواء، حيث كان نسبة بقاء الخلايا المُعالجة بالسيسبلاتين أقل بشكل واضح مقارنة بالخلايا غير المعالجة ( $P < 0.05$ )، وهذا يشير إلى التأثير السمي القوي للعلاج على الخلايا السرطانية. وعند مقارنة تأثير المستخلص للنبات مع

خلايا السيطرة، يظهر أن للمستخلص تأثيرًا مثبطًا قويًا على نمو الخلايا، إذ سجلت الخلايا المُعالجة أدنى مستويات للبقاء، مما يدل على السمية الخلوية مرتفعة للمستخلص النباتي ضد هذا النوع من السرطان وقد سجل أكبر انخفاض لحيوية الخلايا عند تركيز  $62.5 \mu\text{g/ml}$  من المستخلص، مما يجعل إمكانية استخدامه كعامل بديل في العلاجات الكيميائية ضد سرطان القولون.

لقد أظهرت دراسة أن السيسبلاتين يزيد من مستويات التعبير الجيني والبروتيني لـ p53 و p21 على خلايا سرطان الكبد (HepG2)، مما يؤدي إلى توقف دورة الخلية في طور G1، وبالتالي يتم تحفيز الشيخوخة الخلوية (Saleh et al., 2021).

#### 1.2.4.4 تأثير المستخلص المائي لجذور نبات الاشواغندا مع عقار السيسبلاتين Cisplatin على التعبير الجيني لجين P53

أشارت النتائج إلى أن قيمة التعبير الجيني لجين P53 في خلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) عند استخدام المستخلص المائي مع العقار المعالج اليسسبلاتين في مختلف المجاميع إذ أظهرت النتائج أن أعلى قيمة للتعبير الجيني للجين كانت عند التركيز  $250 \mu\text{g} / \text{m l}$  ( $200.9 \pm 1.969$ ) % بينما سجلت كل من التركيزين الآخرين تعبير جيني أقل فكانت النسبة عند التركيز (1000)  $\mu\text{g} / \text{m l}$  حوالي ( $146.5 \pm 0.7182$ )% في حين سجلت قيمة التعبير الجيني للجين P53 عند التركيز  $\mu\text{g} / \text{m l}$  62.5 كانت حوالي ( $125.8 \pm 0.6166$ )% كما هو يظهر في الشكل (4-11).



شكل (11-4) تأثير المستخلص المائي لجذور النبات الاشواغندا مع عقار السيسبلاتين **Cisplatin** على قيمة التعبير الجيني لجين **P53** ومقارنة مع جين السيطرة **GAPDH**

تم تحفيز مسار موت الخلايا المبرمج لخط خلايا سرطان القولون SW480 من خلال العلاج بمستخلص المائي لجذور نبات الاشواغندا. وقد تبين أن آليات موت الخلايا المبرمج لـ **P53** ومستخلص المائي للنبات نشطة شكل (4- 11). بالإضافة إلى ذلك، عند مقارنتها بالخلايا الضابطة الخلايا غير المعرضة (السيطرة)، ارتفع مستوى التعبير الجيني في التركيز (250 µg/ml).

إن زيادة الإجهاد التأكسدي في خلايا السرطان هي ما يمنح المواد الكيميائية النباتية المحتوية على الفينول خصائصها المضادة للتكاثر. يتم ذلك عن طريق إزالة أنظمة أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS)، وتعطيل إشارات البقاء، وتنشيط الإشارات المرتبطة بالموت الخلوي المبرمج، وتحفيز تلف الحمض النووي، وتنشيط مسارات الإشارات التي تعزز تكاثر الخلايا السرطاني (Chikara et al., 2018).

تشير نتائج هذه الدراسة إلى الاتفاق مع نتائج بحث آخر استخدم نبات من نفس العائلة لنبات دراستنا حيث أشار إلى أن مستخلصات نبات الكاسيا فيستولا *Cassia fistula* تُنظّم بشكل ملحوظ التعبير عن

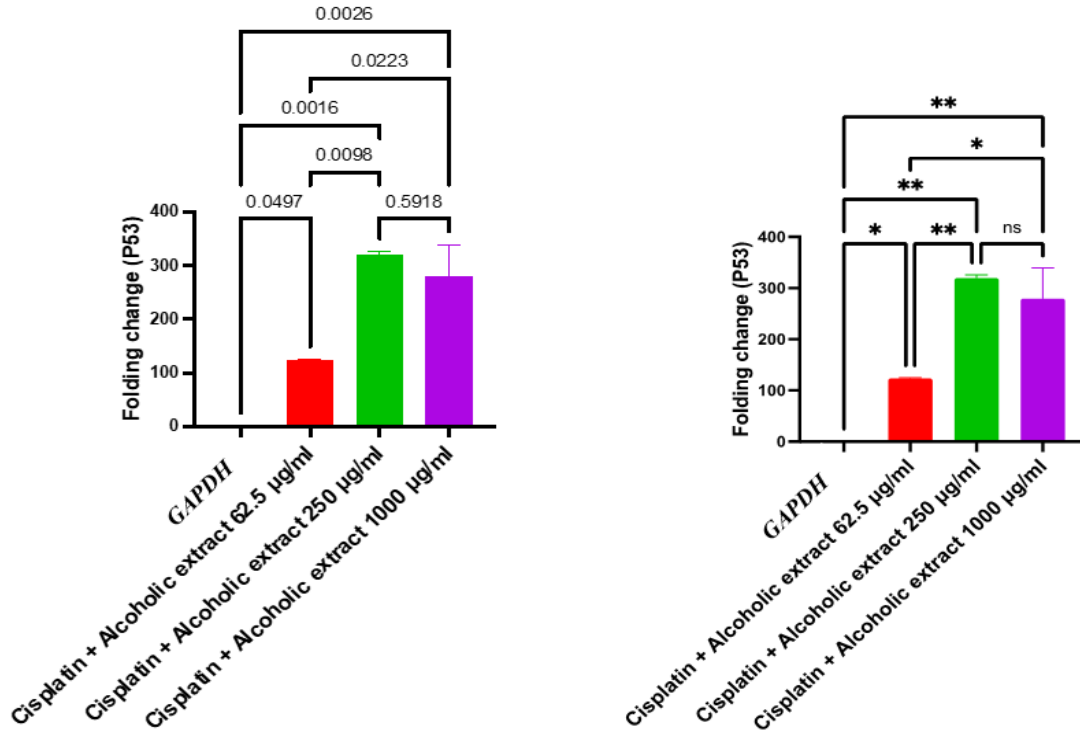
جينات *p53* و *Msh2* لتحفيز موت الخلايا المبرمج. ونظرًا لتأثيرها السام للخلايا والمُحفِّز لموت الخلايا، يُمكن اعتبار كاسيا فيستولا اكتشافًا جديدًا لعلاج سرطان القولون (Talib et al., 2023).

وكذلك شملت بعض الدراسات دور المركب *Withaferin A* على تحفيز عملية الموت المبرمج موت الخلايا المبرمج المعتمد على البروتين *p53* عن طريق تثبيط جينات فيروس الورم الحليمي البشري وزيادة تنظيم بروتينات قمع الورم في خلايا سرطان عنق الرحم البشرية (Munagala et al., 2011)، حيث اشارت الدراسات الحديثة إلى أن *Withaferin A* المستخلص من جذور الأشواغاندا يؤثر بشكل إيجابي على التعبير الجيني لـ *p53*، من خلال تثبيط الجينات الورمية الفيروسية التي تسبب في اعاقة عمل *p53* وتنظيم *microRNAs* المرتبطة بمسارات السرطان و زيادة تعبير الجيني لجين *p53* وتفعيله وهذه النتائج تظهر القدرات و الإمكانيات العلاجية لمركب *Withaferin A* في مكافحة السرطان من خلال استهداف مسار *p53* (Lin et al., 2021).

أما ثبت أن مستخلص الأشواغاندا يمكنه تقليل التعبير عن الجينات الالتهابية مثل *L-6* و *L-1β* و *IL-8*، مما يساهم في تقليل الالتهاب المرتبط بتطور السرطان وتحفيز الإجهاد التأكسدي وموت الخلايا السرطانية إذ اشارت الدراسات إلى أن مستخلص أوراق الأشواغاندا ومركب *Withanone* يمكنهما تحفيز إنتاج أنواع الأكسجين التفاعلية (*ROS*) في الخلايا السرطانية، مما يؤدي إلى تلف الحمض النووي وتفعيل مسارات موت الخلية المعتمدة على *p53* مما يعزز من تأثيرها المضاد للسرطان (Sikandan et al., 2024; Zhang et al., 2025).

#### 2.2.4.4. تأثير المستخلص الكحولي لجذور نبات الاشواغاندا مع عقار السيسبلاتين *Cisplatin* على التعبير الجيني لجين *P53* في خلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة

لقد أظهرت النتائج إن قيمة التعبير الجيني لجين *P53* عند المستخلص الكحولي مع العقار المعالج السيسبلاتين في مختلف المجاميع كانت زيادة واضحة عند التركيز (250) حيث سجلت قيمة التعبير الجيني للجين المستهدف حوالي (  $319.6 \pm 6.265$  )% وهي تمثل اعلى قيمة للتعبير الجين اما التركيزين الاخرين (1000)  $\mu\text{g/ml}$  و (62.5)  $\mu\text{g/ml}$  فقد كان تقييم التعبير الجيني لهما (  $279.5 \pm 59.81$  )% و (  $123.6 \pm 1.212$  )% على الترتيب الشكل (4-12) إذ كان للمزيج تأثيرٌ حدّ من تكاثر خط خلايا سرطان القولون SW480 عند التركيز (250)  $\mu\text{g/ml}$  عالية.



شكل (4-12) تأثير المستخلص الكحولي لجذور النبات الاشواغاندا مع عقار السيسبلاتين Cisplatin على قيمة التعبير الجيني لجين P53 مقارنة مع جين السيطرة GAPDH

كما اشارت النتائج ارتفاع في مستوى التعبير الجيني لجين p53 في كلا المستخلصات النباتية (المائية والكحولية) مع عقار السيسبلاتين بشكل ملحوظ وزيادة التعبير الجيني عند التراكيز (62.5, 250) µg/ml مقارنة تركيز 1000 ml/µg وخلايا السيطرة غير معالجة مع وجود فروق معنوية بين التراكيز الاخرى والمجموعة الضابطة وقد قيم التعبير الجيني للتراكيز المستخدمة ومجموعة السيطرة .

كما يحتوي جذور الأشواغاندا على مركبات فعالة، أبرزها Withaferin A ، وبوليفينولات (Polyphenols) والقلويدات (Alkaloids) وترينويدات (Terpenoids) ان هذه المركبات تُسبب إجهاداً تأكسدياً خفيفاً يؤدي إلى تلف الحمض النووي (DNA) ، مما يحفز تنشيط P53 كرد فعل وقائي. التي أظهرت تأثيرات مضادة للسرطان من خلال استهداف مسارات جزيئية متعددة، بما في ذلك مسار p53. هذه المركبات يمكن أن تسبب ضغطاً تأكسدياً طفيفاً (mild oxidative stress) في داخل الخلية، مما يحفز إشارات الاستجابة مثل MAPK/p38 signaling pathways و p53-dependent DNA damage response.

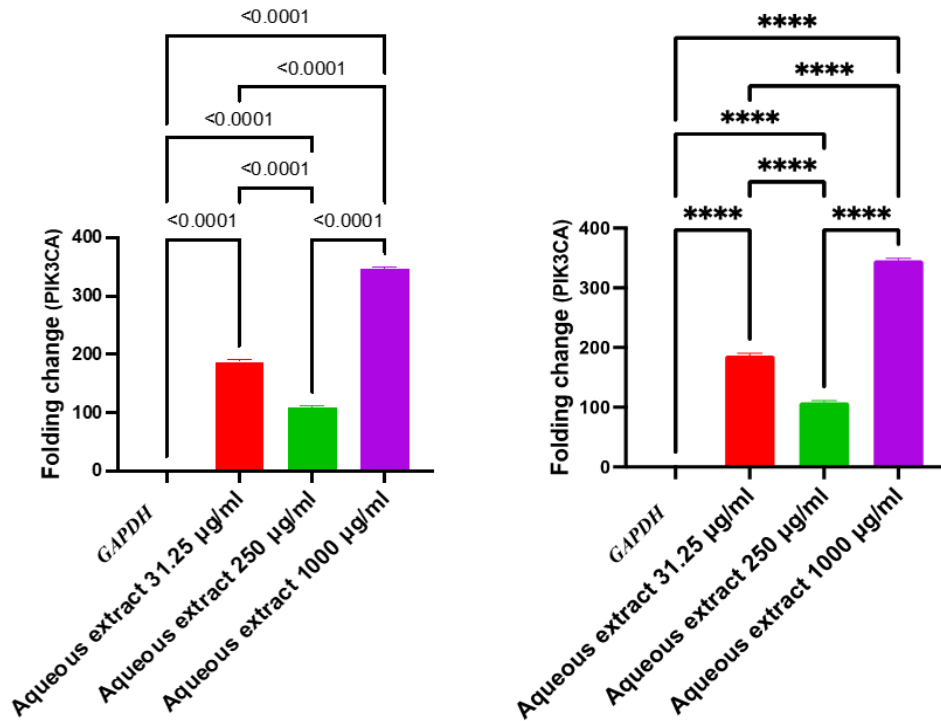
وهناك مركبات نباتية، مثل ريسفيراترول (Resveratrol) وكيرسيتين (Quercetin)، تُظهر قدرتها على تثبيط MDM2، وهو البروتين الذي يُثبِّط p53 ويستهدفه للتحلل. عند تثبيط MDM2، يُمنح p53 فرصة للتراكم والتفعيل (Shu et al., 2019).

إن المستخلصات الكحولية قد تؤثر أيضاً على مستوى الميثيلاسيون (DNA methylation) في المناطق المحفّز في الجين TP53، وهذا يحفز من نشاط النسخ، وهذا التأثير يمكن أن يظهر عند استخدام المستخلصات النباتية التي تحتوي على مركبات مثبّطة لأنزيمات methyltransferases وكما تبين أن مركبات الأشواغاندا، وخاصة Withaferin A، تؤثر بشكل فعال على التعبير الجيني لـ p53، مما يحفز من قدرته على تعزيز الموت الخلوي المبرمج في الخلايا السرطانية. هذا مما يفتح لنا آفاقاً جديدة لاستخدام نبات الأشواغاندا كمكمل علاجي لمكافحة مرض السرطان (Meeran et al., 2010).

#### 3.4.4. تأثير المستخلصات لجذور نبات الأشواغاندا على التعبير الجيني لجين PIK3CA لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة

##### 1.3.4.4. تأثير المستخلص المائي لجذور نبات الأشواغاندا على التعبير الجيني لجين PIK3CA

لقد أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (4-13) تأثير المستخلص المائي لجذور نبات *Withania somnifera* تم تقدير التعبير الجيني للجين PIK3CA في مجموعات مختلفة أظهرت النتائج زيادة واضحة في التعبير الجيني للجين PIK3CA في مجموعة التركيز (1000 µg/ml) حيث بلغت قيمة التعبير الجيني للجين المستهدف (346.1 ± 3.393) % مقارنة بالتعبير الجيني للجين السيطر *GAPDH* (1.000 ± 0.000) % بينما كانت قيمة التعبير الجيني للجين PIK3CA عند التركيزين الآخرين (31.25 µg/ml) و (250 µg/ml) فكانت حوالي (186.8 ± 3.661) % و (108.4 ± 2.656) % على الترتيب عند (P < 0.0001). ويظهر من خلال النتائج أيضاً أن التراكيز العالية من المستخلص المائي لجذور نبات الأشواغاندا لها تأثير واضح على التعبير الجيني للجين PIK3CA ومن خلال هذه الدراسة يتبين لنا أن تركيز (1000 µg/ml) من المستخلص المائي للنبات زاد من قيمة التعبير عن جين PIK3CA.



شكل (4-13) التراكيز المستخدمة للمستخلص المائي لجذور النبات الاشواغاندا وتأثيرها على قيمة التعبير الجيني لجين *PIK3CA* لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة مقارنة مع جين السيطرة *GAPDH*

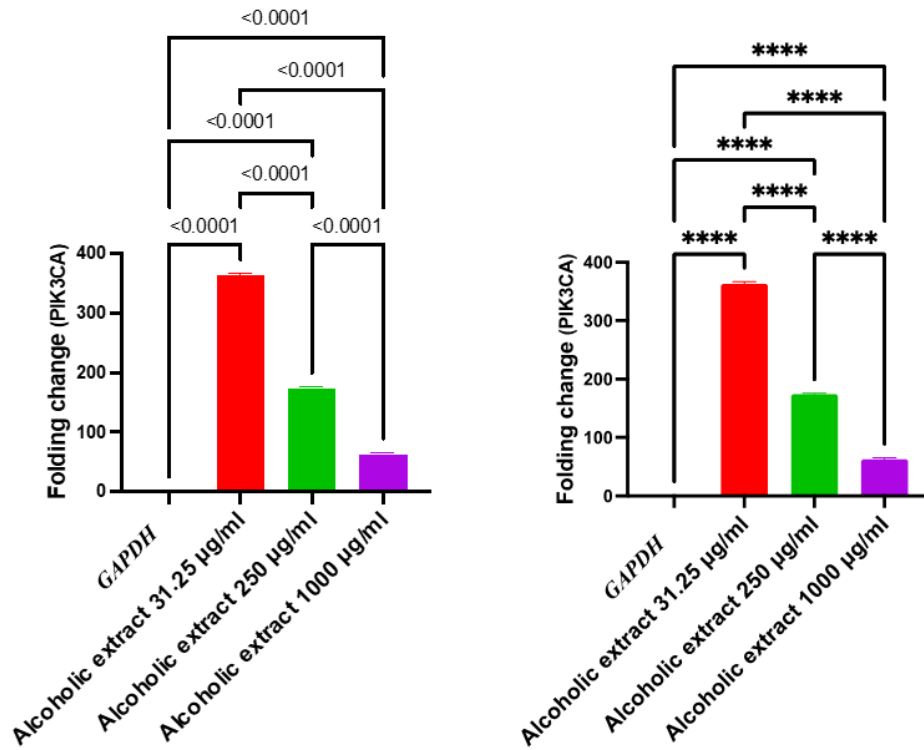
أظهرت النتائج أن قدرة المستخلص المائي على مكافحة التكاثر تعتمد على النمط المستخلص وعلى تركيز المستخلص. عند تركيز 1000 µg/ml أظهر المستخلص النباتي أكبر تأثير مضاد للتكاثر على خلايا سرطان القولون. وقد لوحظت هذه التأثيرات في الخلايا المعالجة بسيسبلاتين.

يُعتبر الجين *PIK3CA* مكوناً أساسياً في مسار *PI3K/AKT/mTOR* المسؤول عن نمو الخلايا وبقائها، وقد ارتبط فرط تعبيره بالعديد من السرطانات مثل القولون والثدي والرئة إضافة إلى بعض الاضطرابات الأيضية (Rascio et al., 2021). أظهرت الدراسات أن مستخلص جذور الأشواغاندا يمتلك تأثيراً مثبطاً لهذا المسار بفضل المركب النشط *Withaferin A*، الذي يؤدي إلى خفض فسفرة *AKT* و *mTOR* وبالتالي تقليل النشاط الوظيفي أو التعبير الجيني لـ *PIK3CA* (Almotlak et al., 2023). وقد انعكس ذلك في تحفيز الاستماتة (Apoptosis) وتثبيط نمو الخلايا السرطانية الحاوية على طفرات مفعلة في هذا الجين. كما أشارت بعض التقارير إلى أن الأشواغاندا تقلل التعبير عن بروتينات البقاء الخلوي من خلال تثبيط عوامل النسخ مثل *NF-κB* (Kakar et al., 2020). وتشير هذه النتائج مجتمعةً

إلى أن للمستخلص النباتي دوراً محتملاً كعامل مضاد للسرطان عبر استهداف غير مباشر لمسار PI3K/AKT/mTOR.

#### 2.3.4.4. تأثير المستخلص الكحولي لجذور نبات الأشواغندا على التعبير الجيني لـ *PIK3CA* لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة

أظهرت النتائج الموضح في الشكل (4-14) التي تم التوصل إليها في نتائجنا ان قيمة التعبير الجيني لـ *PIK3CA* عند معاملة خلايا سرطان القولون البشري (SW480) بمستخلص الكحولي لجذور نبات الأشواغندا بتركيز مختلفة، تشير القيم الإحصائية ( $P < 0.0001$ ) إلى وجود فرق معنوي عالي بين مستويات التعبير الجيني لـ *PIK3CA* في الخلايا المعاملة بمستخلص جذور الأشواغندا مقارنة بجين السيطرة (*GAPDH*). وتوضح النتائج أن العلاقة بين تركيز المستخلص والتعبير الجيني لـ *PIK3CA* كانت عكسية؛ أي أن زيادة تركيز المستخلص أدت إلى انخفاض واضح في مستوى التعبير الجيني. فقد بلغ التعبير عند التركيز 250 µg/ml قيمة  $(174.3 \pm 1.708\%)$ ، بينما انخفض أكثر عند التركيز 1000 µg/ml مسجلاً  $(62.92 \pm 2.467\%)$ . يشير ذلك إلى أن المستخلص يمتلك قدرة مثبطة للتعبير الجيني لـ *PIK3CA* بصورة تعتمد على الجرعة (dose-dependent manner)، مما يعكس دور الأشواغندا في تعطيل مسار PI3K/AKT/mTOR المرتبط ببقاء وتكاثر الخلايا السرطانية.



الشكل (4- 14) تأثير المستخلص الكحولي لجذور النبات الاشواغندا على قيمة التعبير الجيني لجين *PIK3CA* لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد 48 ساعة من التعريض بالمقارنة مع جين السيطرة *GAPDH*

أظهرت الدراسة أن المستخلص الكحولي لجذور نبات *Withania somnifera* يمتلك تأثيراً سميّاً ملحوظاً تجاه خلايا سرطان القولون من نوع (SW480)، ويُعزى هذا التأثير إلى وجود مركبات فعالة بيولوجياً، مثل ويثانوليد A وويثافيرين A. وتُساهم هذه المركبات في تحفيز عدة آليات خلوية وجزئية تؤدي إلى موت الخلايا المبرمج (Apoptosis) وزيادة مستويات الإجهاد التأكسدي داخل الخلايا السرطانية. وتتمثل الآليات السمية لهذه المركبات في تفعيل مسارات موت الخلية المبرمج سواء عبر المسارات الداخلية أو الخارجية، وذلك نتيجة لزيادة توليد الأنواع التفاعلية من الأكسجين (ROS) وأكاسيد النيتريك (RNS) في بيئة الخلية السرطانية، مع المحافظة على سلامة الخلايا الطبيعية (Mishra et al., 2017).

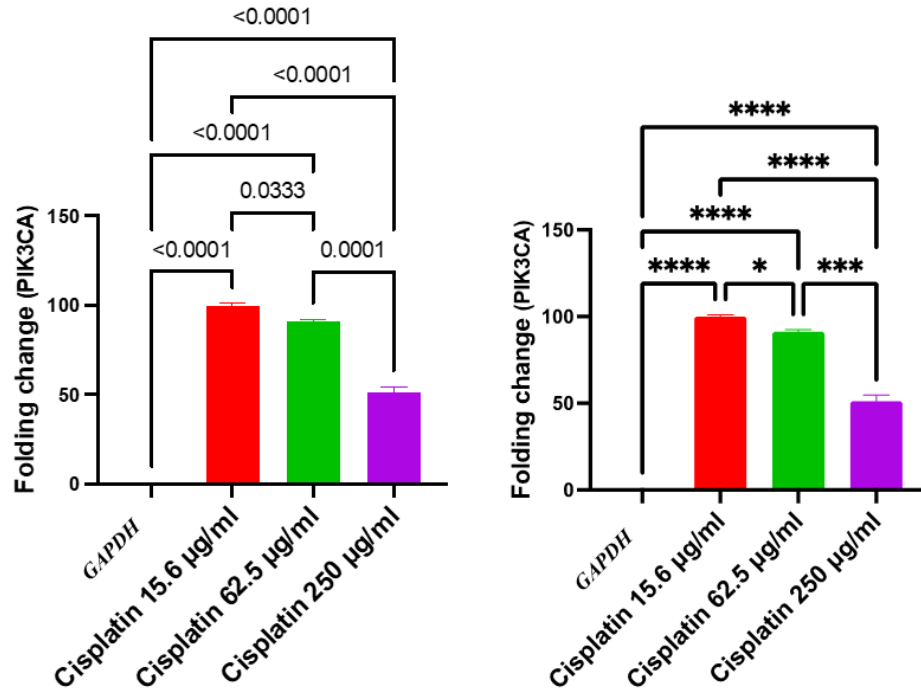
وفي سياق متصل، أظهرت بعض النباتات الطبية الأخرى، مثل نبات البردقوش (*Origanum majorana*)، خصائص دوائية واعدة في مكافحة السرطان، حيث يمتلك هذا النبات القدرة على تثبيط إنزيم السيكلوأكسجيناز-2 (COX-2)، وتنظيم الجهاز المناعي، ومنع تكوين الأوعية الدموية الجديدة

(Anti-angiogenesis)، وكبح تكاثر الخلايا، وتنشيط مسارات موت الخلايا المبرمج، بالإضافة إلى تقليل الإجهاد التأكسدي. وتُظهر المستخلصات النباتية من *O. majorana* خصائص مضادة لسرطان القولون، إلى جانب تأثيرها المضاد للأكسدة ضد خلايا سرطان الثدي من نوع AMJ13 (Ali Shaheed et al., 2023).

وفي دراسة Almotlak وجماعته (2023) أشار إلى أن مستخلص نبات الأشواغندا (*Withania somnifera*) يساهم في تثبيط مسار إشارات PI3K/AKT، مما يؤدي إلى تقليل التثبيط المفروض على بروتين p53، وبالتالي تعزيز تعبيره الجيني وتنشيط مسارات موت الخلايا (apoptosis) في الخلايا السرطانية ونظرًا لهذه الأدوار البيولوجية المهمة و الفعالة التي أظهرتها هذه المركبات الكيميائية، لذلك تم اختيارها كمادة واعدة وبديلة للعلاج الكيميائي الاصطناعي، وذلك بالسعي لتقليل من الآثار الجانبية وتحسين الاستجابة العلاجية" (Atanasov et al.,2021;Motta et al.,2021).

#### 3.3.4.4 تأثير عقار السيسبلاتين Cisplatin على التعبير الجيني لـ *PIK3CA* لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة

كما تظهر النتائج من خلال الشكل (4-15) تأثير العقار السيسبلاتين فقط على التعبير الجيني للجين *PIK3CA* فقد سجلت نسبة التأثير عند التركيز (15.6) µg/ml أعلى نسبة تأثير كانت (0.9810 ± 100.1%) بالمقارنة مع التعبير الجيني للسيطرة *GAPDH* (0.0 ± 1.000) % وكذلك بمقارنتها مع التركيزين (250) و (62.5) µg/ml فكان التأثير بنسبة (3.507 ± 51.15) % و (91.14 ± 1.340) % على الترتيب.



الشكل (4-15) تأثير عقار السيسبلاتين *Cisplatin* على قيمة التعبير الجيني لجين *PIK3CA* لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة بالمقارنة مع جين السيطرة *GAPDH*

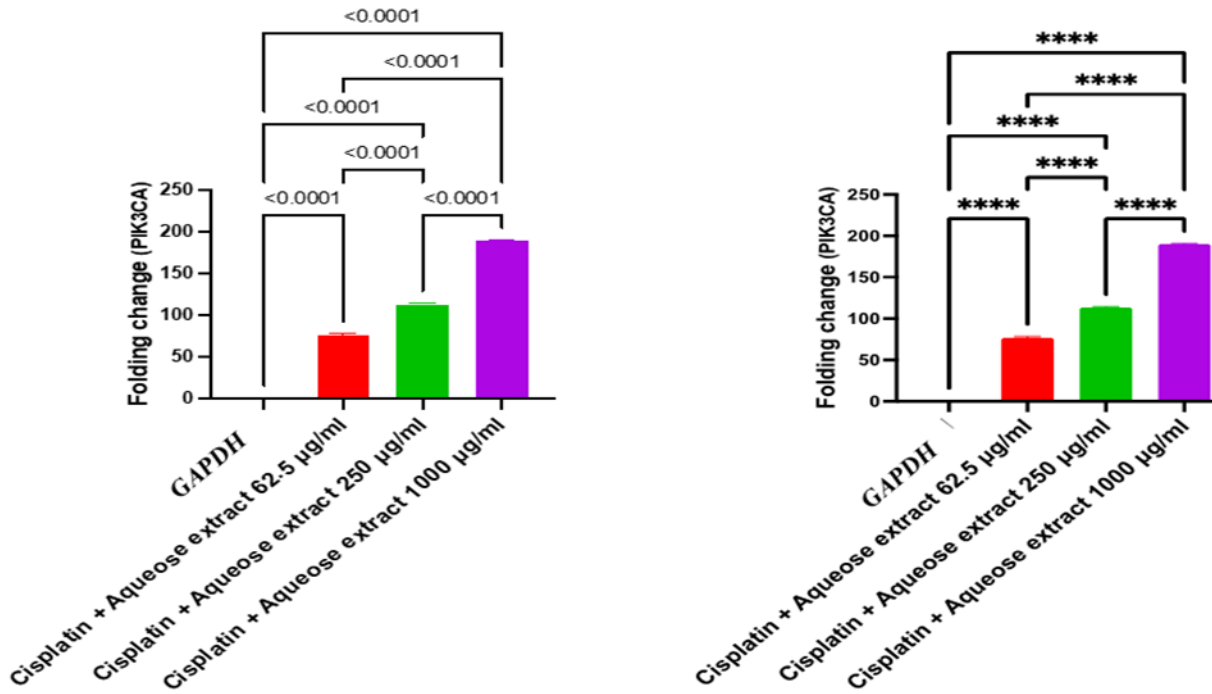
يعد عقار السيسبلاتين *Cisplatin* ركيزة أساسية في عيادات السرطان على مدى السنوات القليلة الماضية، ويُعدّ اكتساب مقاومة لمركبات *Cisplatin* مصدر قلقٍ كبيرٍ للعديد من الأورام الخبيثة، بما في ذلك سرطان المبيض الظهاري. كما اكتشفت في دراسات أخرى ان لتأثير السيسبلاتين على الخلايا الجانبية الغنية بالخلايا الجذعية السرطانية في الخلايا المقاومة *Cisplatin* آفاقاً جديدةً في فهمنا لكيفية تعديل تأثير دواءٍ سامٍ للخلايا بواسطة البيئة الخلوية. ويُعدّ تنشيط *NF-kB*، الذي يؤدي إلى زيادة التعبير الجيني لـ *PIK3CA*، السمة الجزيئية الرئيسة وراء هذا التأثير للسيسبلاتين. على الرغم من أن مشاركة بإشارات أخرى *NF-kB* أمر محتمل، فإن بياناتنا الحالية تشير إلى أن مسار *PI3K/AKT* هو المحدد الرئيس لعمل في الخلايا المقاومة. قد يصبح الاضطراب في توازن الخلايا الجذعية السرطانية من خلال منع إشارات *PI3K/AKT* نهجاً للتدخل في الانتكاس المقاوم للسيسبلاتين (Kaltschmidt *et al.*, 2022).

لوحظ أن عقار *cisplatin* يعمل على تنشيط ارتباط عامل النسخ *NF-kB* وبروموتر الجين *PIK3CA* بشكل ملحوظ، ما يؤدي إلى زيادة التعبير الجيني لـ *PIK3CA*. وأشارت تحاليل (qPCR) مقارنة التعبير من الحالة المعالجة ضد الحالة الضابطة إلى تضاعف مستوى *PIK3CA* في الخلايا المعالجة بـ

cisplatin أو TNF $\alpha$  فقط في خلايا A2780-CisR ، بينما لم يُلاحظ أي تغيير مماثل في الخلايا الحساسة. A2780 يُذكر أن *GAPDH* استُخدم كجين داخلي للتحكم في تجارب CHIP-qPCR، مع فترة تعبيرية مستقرة لم تتأثر بالعلاج، مما يؤكد صحة التغيرات الملاحظة في تعبير لجين *PIK3CA* (Thakur and Ray,2017).

**4.3.4.4. تأثير المستخلص المائي لجذور نبات الاشواغندا مع عقار السيسبلاتين Cisplatin على التعبير الجيني لجين *PIK3CA* لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة**

لقد أظهرت النتائج أن قيمة التعبير الجيني لجين *PIK3CA* عند المستخلص المائي مع العقار المعالج السيسبلاتين في مختلف المجاميع كانت هناك زيادة واضحة عند التركيز (1000) حيث سجلت قيمة التعبير الجيني للجين المستهدف ( $0.9313 \pm 190.0$ %) وهي تمثل اعلى قيمة للتعبير الجيني اما التركيزين الاخرين ( $250 \mu\text{g/ml}$ ) و ( $62.5 \mu\text{g/ml}$ ) فقد كان تقييم التعبير الجيني لهما ( $113.4 \pm 1.111$ %) و ( $76.65 \pm 1.878$ %) على الترتيب الشكل (4-16) اذ كان للمزيج تأثير حَدَّ من تكاثر خط خلايا سرطان القولون SW480 عند التركيز ( $1000 \mu\text{g/ml}$ ) عالية.



شكل ( 4-16 ) تأثير المستخلص المائي لجذور النبات الاشواغندا مع عقار السيسبلاتين Cisplatin وتأثيرها على قيمة التعبير الجيني لجين *PIK3CA* لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة مقارنة مع جين السيطرة *GAPDH*

تظهر الدراسة أن ارتفاع التعبير الجيني لجين *PIK3CA* عند المعالجة بالمستخلص المائي قد يكون بسبب تأثير المستخلص على عوامل النسخ أو التعديل فوق الجيني .

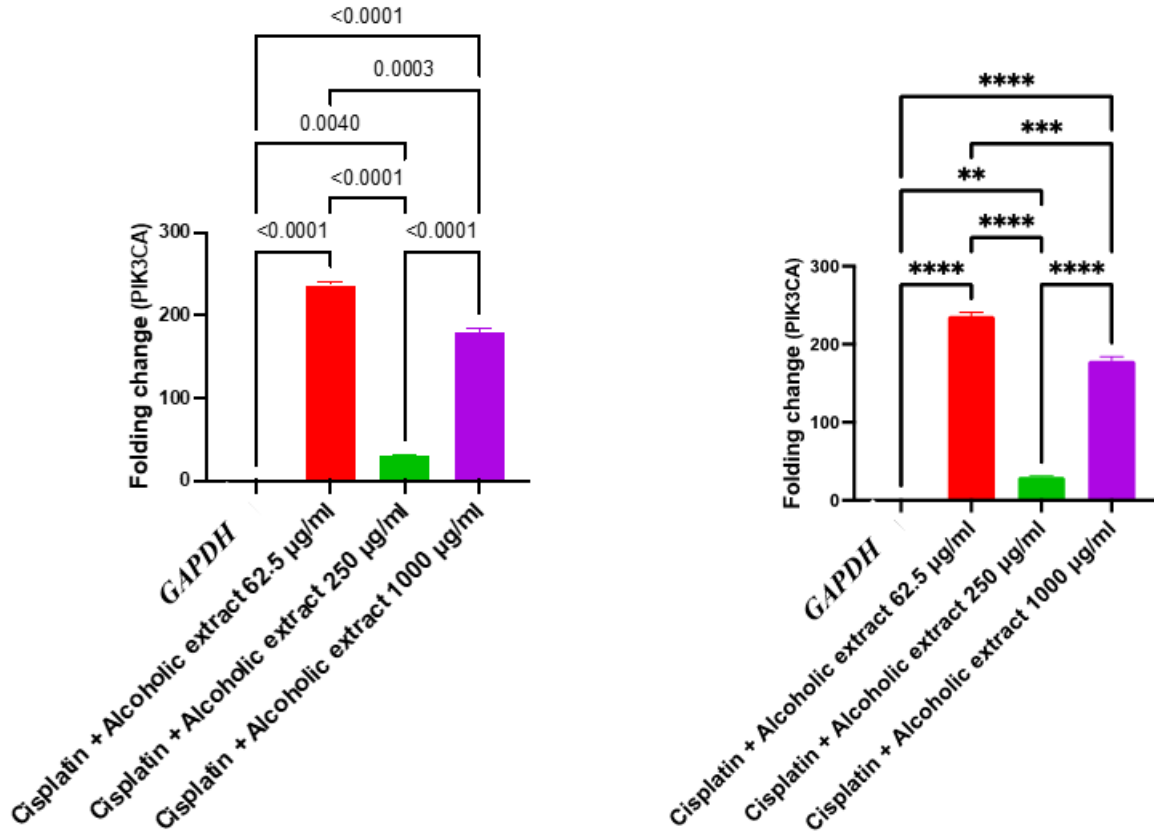
وكذلك تظهر الدراسات السابقة تحفيز المستخلص المائي لجذور نبات الاشواغندا لسطح الخلية الذي ينشط PI3K أو استجابة خلوية لضغط المؤكسد وان هذه الزيادة في التعبير الجيني للجين المستخدم قد يعود احتواء المستخلص المائي على مركبات فعالة تعمل كمحفزات أو مستقبلات مثل ( IGF-1R ) مستقبل عامل النمو المشابه للأنسولين أو ( EGFR ) مستقبل عامل النمو البشري وان تنشيط هذه المستقبلات ( Simanshu et al.,2017).

وإن الأدلة العلمية أشارت إلى أن مستخلص جذور الأشواغندا يمتلك تأثيرات بيولوجية متعددة تستهدف بشكل مباشر وغير مباشر التعبير الجيني لـ *PIK3CA* وتفعيل مسار p53 , وهذه الأدلة تجعل الأشواغندا مرشحاً قوياً ضمن العلاجات التكميلية المضادة للسرطان CAM ، مما يتطلب إجراء المزيد من التجارب العلمية لمعرفة وتحديد جرعاته المثلى وتأثيراته الجانبية (Zhang et al., 2024 B) .

تشير هذه النتائج إلى أن مستخلص الأشواغندا له دور في تعديل التعبير الجيني لجين *PIK3CA* ، خاصة عند استخدامه بالتزامن مع أدوية كيميائية مثل السييسبلاتين حيث تمت في هذه الدراسة اظهار التأثير المشترك للمستخلص المائي لجذور نبات الأشواغندا (*Withania somnifera*) بالاشتراك مع دواء السييسبلاتين (Cisplatin) على التعبير الجيني لجين *PIK3CA* ، وهو أحد الجينات الرئيسية المرتبطة بمسار PI3K/AKT المسؤول عن تنظيم نمو الخلايا، وبقائها، ومقاومتها للعلاج الكيميائي. وتشير النتائج إلى أن الجمع بين المركبين قد يؤدي إلى تحويل التعبير الجيني لـ *PIK3CA*، مما يعزز الفعالية العلاجية للسييسبلاتين ويقلل من مقاومة الخلايا السرطانية.

#### 5.3.4.4. تأثير المستخلص الكحولي لجذور نبات الأشواغندا مع عقار السييسبلاتين Cisplatin على التعبير الجيني لجين *PIK3CA* لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة

لقد أظهرت النتائج كما موضحة في الشكل (4-17) ان قيمة التعبير الجيني لجين *PIK3CA* عند المستخلص الكحولي مع عقار السييسبلاتين في مختلف المجاميع كانت هناك زيادة واضحة عند التركيز (62.5)  $\mu\text{g/ml}$  إذ سجلت قيمة التعبير الجيني للجين المستهدف حوالي (4.635  $\pm$  236.4) % وهي تمثل اعلى قيمة للتعبير الجين اما التركيزين الاخرين (1000)  $\mu\text{g/ml}$  و (250)  $\mu\text{g/ml}$  فقد كان تقييم التعبير الجيني لهما ( 5.269  $\pm$  179.2) % و (0.8934  $\pm$  30.39) % على الترتيب اذ كان للمزيج تأثيرٌ قلل من تكاثر خط خلايا سرطان القولون SW480 عند التركيز (62.5)  $\mu\text{g/ml}$  عالية.



الشكل (4-17) تأثير المستخلص الكحولي لجذور النبات الاشواغندا مع عقار السيسبلاتين **Cisplatin** على قيمة التعبير الجيني لجين **PIK3CA** لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة مقارنة مع جين السيطرة **GAPDH**

يعمل المستخلص الكحولي على تعطيل توازن اغشية الخلية ويغير من الجهد الداخلي وكذلك يعمل على تحفيز مسار الاستجابة الحيوية لتشكيل **PIK3CA** (Liu et al., 2024).

أظهرت نتائج دراسة سابقة أن المستخلص الكحولي لنبات *Kigelia africana* يمتلك نشاطاً مضاداً لتكاثر خلايا سرطان الثدي البشرية، مع تأثير على التعبير الجيني لجينات مثل **TP53** و **BCL2** على الرغم من أن الدراسة لم تذكر الجين **PIK3CA** بالتحديد، إلا أن التأثير على مسارات الإشارة المرتبطة يشير إلى احتمال تأثير المستخلص على التعبير الجيني لـ **PIK3CA** (Li et al., 2024 ; Kalsoom et al., 2023).

وقد أظهرت دراسة الحديثة أن المستخلصات النباتية لا تُحسّن فعالية العلاج فحسب، بل تسمح أيضاً بتقليل جرعات الأدوية الكيميائية، مما يقلل من احتمالية مقاومة الأدوية المتعددة والآثار الجانبية الخطيرة للعلاج. (Ng et al., 2022). وتشير التقديرات إلى أن 80% من الناس حول العالم ما زالوا يستخدمون

العلاجات العشبية لعلاج أمراض مختلفة، بما في ذلك السرطان، وفقاً لمنظمة الصحة العالمية (Chung *et al.*,2021).

لا تزال العلاقة بين caspase-9 وسرطان القولون غير مفهومة جيداً حتى الآن. قد توفر دراسة ارتباطه بالخصائص السريرية والمرضية وطول العمر بيانات قيمة للبقاء على قيد الحياة واختيار آلية واضحة للعمل. حيث يُعدّ المستخلص الكحولي لنبات *Withania somnifera* ساماً للخلايا السرطانية ( $\mu\text{g}/\text{ml}$  99.7) ويحفز موت الخلايا المبرمج، ويمنع تكوين الأوعية الدموية وهجرة الخلايا (Chung *et al.*,2021). وقد تبين ان سبب التأثير المضاد للسرطان لمستخلصات *Withania somnifera* L يعود إلى زيادة تحفيز الالتهام الذاتي وتأثيرات موت الخلايا المبرمج للنبات. يعد كل من Cdc20 و Mad2 عنصرين مهمين في مجمع نقطة تفتيش المغزل (Spindle Assembly Checkpoint)، إذ يتم تنظيم مستوياتها جزئياً من خلال تحللها عبر البروتيازومات. وقد أظهرت الدراسات أن الإفراط في التعبير عن Mad2 يمكن ان يساهم في التوقيت السليم لبدء الطور الانفصالي (anaphase) وتحفيز على بقاء الخلايا. أن مركب Withaferin A ، أحد المركبات النشطة بيولوجياً في جذور نبات الأشواغندا (*Withania somnifera*) ، يؤدي إلى قتل الخلايا السرطانية بواسطة تثبيط تقدم الانقسام الخلوي، مما يؤدي إلى تأخر انقسام الخلية وعدم استقرار كروموسومي (Chromosomal Instability)، وهذه هي احد آليات التحفيز على موت الخلايا المبرمج في الخلايا الورمية (Ghosh *et al.*,2021; Amjad *et al.*,2023).

**الاستنتاجات والتوصيات**

**Conclusions  
and  
Recommendations**

## 5. الاستنتاجات والتوصيات Conclusions & Recommendations

### 1.5.1 الاستنتاجات Conclusions:

1- اتضحت النتائج بواسطة تحليل (HPLC) وجود المركبات الفعالة في جذور نبات الاشواغندا *Withania somnifera* القلويدات , الفلافونويدات , الفينولات , الكلايكوسيدات , الستيرويدات , القلويدات , التربينات. اما نتائج تحليل ASS أظهرت وجود العناصر المهمة والفعالة مثل الحديد Fe , النحاس و Cu المغنيسيوم Mg و الخارصين Zn

2- امتلاك مستخلصات جذور نبات الاشواغندا *Withania somnifera* (المائية والكحولية) تأثيرات سمية عالية ضد نمو خط خلايا سرطان القولون البشري (SW480) وكلما زاد تركيز المستخلص زادت فعالية السمية لقتل الخلايا السرطانية بعد مرور (48) ساعة من التعريض

3- إن المستخلص الكحولي اكثر كفاءة من المستخلص المائي في تأثيره السمي تجاه الخلايا السرطانية (WS480) لجذور نبات *W. somnifera*

4- إن التركيز 1000 µg/ml للمستخلص الكحولي والمائي لجذور نبات الاشواغندا اعطت نسب عالية لتنشيط حيوية الخلايا السرطانية (SW480) عند تأزره مع عقار السيسبلاتين Cisplatin بعد مرور (48) ساعة من التعريض

5- أظهرت نتائج الدراسة أن المستخلص الكحولي لجذور نبات *Withania somnifera* يمتلك تأثيراً ملحوظاً على التعبير الجيني، إذ أدى التركيز العالي إلى تعزيز التعبير الجيني لجين P53 بعد 48 ساعة، في حين أسهمت التراكيز المنخفضة في التأثير بفاعلية على التعبير الجيني لجين PIK3CA.

### 2.5.2 التوصيات Recommendation

1- إجراء دراسات لمعرفة التأثيرات السمية لمستخلصات جذور نبات الاشواغندا داخل الجسم *In vivo*

2- دراسة تحفيز الجهاز المناعي في تثبيط مقاومة الخلايا السرطانية في داخل خلايا الجسم وخارجة

3- إجراء دراسة تأثير المستخلصات جذور نبات الشواغندا في تثبيط نمو خلايا خطوط خلوية سرطانية اخرى مثل سرطان الثدي وسرطان الرحم وسرطان الدماغ ودراسة تأثيره على جينات أخرى.

4- دراسة تأثير اجزاء النبات الأخرى مثل البذور والأوراق والسيقان نبات الشواغندا على نمو خلايا الخطوط السرطانية والطبيعية داخل وخارج الجسم الحي

5- اجراء دراسات على جينات اخرى لها دور مهم في عملية مقاومة الخلايا السرطانية أو عقار آخر مثل (الكابسيتابين Capecitabine) او (سيكلوفوسفاميد Cyclophosphamide) او (وكلورامبيوسيل Chlorambucil).

6- اجراء دراسة مستقبلية باستخدام تقنية (RNA- Seq) لتحليل التأثيرات الجزيئية لمستخلص نبات الشواغندا على انماط التعبير الجيني ,مما يساهم في توضيح الاليات الجينية المرتبطة تأثيرها العلاجي

المصادر

**References**

## المصادر العربية

الربيعي، داوود جاسم. (2014). الموسوعة العربية للعلاج بالأعشاب الطبية . الطبعة الاولى، المجلد الاول، الجزء الرابع، شركة الغدير للطباعة والنشر المحدودة : ص 413-415 .

حمود, علي خلف .(2017).تأثير البنزل ادنين وحامض السالسليك في انتاج المركبات الفعالة لنبات سم الفراخ *Withania somnifera* L داخل وخارج الجسم الحي . أطروحة دكتوراه ,كلية الزراعة ,جامعه بغداد

## References

- Abadi, A. J., Mirzaei, S., Mahabady, M. K., Hashemi, F., Zabolian, A., Hashemi, F., and Sethi, G. (2022).** Curcumin and its derivatives in cancer therapy: Potentiating antitumor activity of cisplatin and reducing side effects. *Phytotherapy Research*, 36(1), 189-213.
- Abd, A. S., and Saqban, L. H. (2023).** Study of the effect of cytotoxicity of extracts from *Origanum Majorana* leaves on human breast cancer cell line (AMJ13) in vitro. In AIP Conference Proceedings (Vol. 2414, No. 1). AIP Publishing
- Abdelhamid, A. M., Youssef, M. E., Cavalu, S., Mostafa-Hedeab, G., Youssef, A., Elazab, S. T., and Saber, S. (2022).** Carbocysteine as a modulator of Nrf2/HO-1 and NFκB interplay in rats: new inspiration for the revival of an old drug for treating ulcerative colitis. *Frontiers in pharmacology*, 13, 887233.
- Abdel-Warith, A., Abdel-Khalek, A., Fathallah, S., and others. (2012).** Antagonism between curcumin and the topoisomerase II inhibitor etoposide in tumor cell lines. *\*Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals\**, 27(2), 101–110.
- Abuetabh, Y., Wu, H. H., Chai, C., Al Yousef, H., Persad, S., Sergi, C. M., and Leng, R. (2022).** DNA damage response revisited: the p53 family and its regulators provide endless cancer therapy opportunities. *Experimental & molecular medicine*, 54(10), 1658-1669.
- Ahmad, Z., Shareen, Ganie, I. B., Firdaus, F., Ramakrishnan, M., Shahzad, A., and Ding, Y. (2024).** *Anticancer effects of withanolides: In silico prediction of molecular targets including DNA-PK inhibition. Molecules.* Advance online publication.

- Ahmed, N. S., Nada, S. M., Younan, H. Q., and Rikabi, Z. H. A. Al. (2012).** Study the effect of partially purified L-Aspariginase on production perforin concentration of perforin and hemolytic activity from leukemia lymphocyte culture. *Kerbala Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4, 103–110
- Aine, M., Haider, Z., Momeny, M., Nunes, S. P., & Curtis, C. (2025).** The DNA methylation landscape of primary triple-negative breast cancer. *Nature Communications*, 16(1), 1021.
- Ajanal, M., Gundkalle, M. B., and Nayak, S. U. (2010).** Estimation of total alkaloid in Chitrakadivati by UV-Spectrophotometer. *Ancient Science of Life*, 29(4), 11–13.
- Albahri, G., Badran, A., Abdel Baki, Z., Alame, M., Hijazi, A., Daou, A., and Baydoun, E. (2024).** Potential anti-tumorigenic properties of diverse medicinal plants against the majority of common types of cancer. *Pharmaceuticals*, 17(5), 574.
- Aldossary, S. A. (2019).** Review on pharmacology of cisplatin: clinical use, toxicity and mechanism of resistance of cisplatin. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 12(1), 7-15.
- Alfaifi, M. Y., Saleh, K. A., El-Boushnak, M. A., Elbehairi, S. E. I., Alshehri, M. A., and Shati, A. A. (2016).** Antiproliferative activity of the methanolic extract of *Withania somnifera* leaves from Faifa mountains, southwest Saudi Arabia, against several human cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17(5), 2723-2726.
- Ali Shaheed. Saqban, L.H. (2023)** Study of the effect of cytotoxicity of extracts from *Origanum Majorana* leaves on human breast cancer cell line (AMJ13) in vitro. AIP Conf. Proc. 13 February; 2414 (1): 020027.

- Al-jubory, Ibrahim; jasiem,Thamer; Jaafar, I., and Radhi, A. (2017).** Pharmacognostical with preliminary phytochemical studies of Iraqi Aswagandha ( *Withania somnifera* L .) plant. Research Journal of *Pharmaceutical* , Biological and Chemical Sciences. 8(2) 1934-1939.
- Almotlak, A. A., Al-Malki, A. L., and Al-Malki, M. A. (2023).** Phytochemicals targeting *PI3K/AKT/mTOR* signaling pathways in cancer therapy. *Molecules*, 28(4), 12455.
- Alnuqaydan, A. M., Rah, B., Almutary, A. G., and Chauhan, S. S. (2020).** Synergistic antitumor effect of 5-fluorouracil and withaferin-A induces endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy and apoptosis in colorectal cancer cells. *American Journal of Cancer Research*, 10(3), 799.
- Alsuhaimi, N. M., Ali, M. A., Alwahibi, M. S., Ahmed, S. S., Rahman, M. O., Pandey, S. K., Elshikh, M. S., Alshallali, S. R. S., Lee, J., and Kim, S. Y. (2024).** Complete chloroplast genome sequence of a novel *Withania somnifera* (L.) Dunal: Comparative genomics and phylogenetic insights. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy*, 31(2), 205–223.
- Alzahrani, S. M., Al Doghaither, H. A., Al-Ghafari, A. B., and Pushparaj, P. N. (2023).** 5-Fluorouracil and capecitabine therapies for the treatment of colorectal cancer (Review). *Oncology Reports*, 50, 175.
- Ambiye, V. R., Langade, D., Dongre, S., Aptikar, P., Kulkarni, M., and Dongre, A. (2013).** Clinical evaluation of the spermatogenic activity of the root extract of Ashwagandha (*Withania somnifera*) in oligospermic males: a pilot study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013(1), 571420.
- Ameer, S. F. A., Mohamed, M. Y., Elzubair, Q. A., Sharif, E. A. M., and Ibrahim, W. N. (2024).** Curcumin as a novel therapeutic candidate for

- cancer: Can this natural compound revolutionize cancer treatment?*  
*Frontiers in Oncology*, 14, Article 1438040.
- American Cancer Society. (2024).** Colon Cancer Stages.
- American Cancer Society. (2024).** *Immunotherapy for colorectal cancer.*  
Retrieved from <https://www.cancer.org/cancer/types/colonrectalcancer/treating/immunotherapy.htm>
- Amjad, M., Khan, A. U., Iqbal, Z., and Ashfaq, U. A. (2023).** An updated review on phytochemistry and molecular targets of *Withania somnifera* (L.) Dunal (Ashwagandha). *Phytochemistry Reviews*. Advance online publication.
- Anselmino, L. E., Baglioni, M. V., Reynoso, G., Rozados, V. R., Scharovsky, O. G., Rico, M. J., and Menacho-Márquez, M. (2023).** Potential effect of chloroquine and propranolol combination to treat colorectal and triple-negative breast cancers. *Scientific Reports*, 13(1), 7923.
- Anwar, T., Qureshi, H., Parveen, N., Bashir, R., Qaisar, U., Munazir, M., and Wali, M. (2020).** Avaliação do potencial de bioherbicida das folhas de *Carica papaya*. *Brazilian Journal of Biology*, 80, 565-573.
- Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., and Supuran, C. T. (2021).** Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature reviews Drug discovery*, 20(3), 200-216
- Atta, W. S., and Al-Ani, N. (2015).** Antimicrobial activity and cytotoxicity of active compounds of *Withania somnifera* extracts (Issue January 2015). Al-Nahrain University
- Atteeq, M. (2022).** Evaluating anticancer properties of Withaferin A—a potent phytochemical. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 975320.
- Azab, K. S., Maarouf, R. E., Abdel-Rafei, M. K., El Bakary, N. M., and Thabet, N. M. (2022).** *Withania somnifera* (Ashwagandha) root extract

- counteract acute and chronic impact of  $\gamma$ -radiation on liver and spleen of rats. *Human & Experimental Toxicology*, 41, 09603271221106344.
- Baghalpour, N., Bakhtiyari, J. M., Almarhoon, Z. M., Chandran, D., Shinwari, A. K., Kumar, M., Sharifi-Rad, J., and Shinwari, Z. K. (2023).** Antinociceptive, anti-inflammatory, and antioxidant studies on *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Pakistan Journal of Botany*, 55(4), 1551–1561.
- Baker, C., Kirby, J. B., O'Connor, J., Lindsay, K. G., Hutchins, A., and Harris, M. (2022).** The perceived impact of ashwagandha on stress, sleep quality, energy, and mental clarity for college students: qualitative analysis of a double-blind randomized control trial. *Journal of medicinal food*, 25(12), 1095-1101.
- Balkrishna, A., Pokhrel, S., Singh, H., Joshi, M., Mulay, V. P., Haldar, S., and Varshney, A. (2021).** Withanone from *Withania somnifera* attenuates SARS-CoV-2 RBD and host ACE2 interactions to rescue spike protein induced pathologies in humanized zebrafish model. *Drug design, development and therapy*, 1111-1133.
- Banik, K., Khatoon, E., Harsha, C., Rana, V., Parama, D., Thakur, K. K., and Kunnumakkara, A. B. (2022).** Wogonin and its analogs for the prevention and treatment of cancer: A systematic review. *Phytotherapy Research*, 36(5), 1854-1883.
- Bence, R.L.(2022).** Are chemical compounds in medical mushrooms potent against colorectal cancer carcinogenesis and antimicrobial growth? *Cancer Cell Int.*, 22, 379.
- Benson, A. B., Venook, A. P., Adam, M., Chang, G., Chen, Y. J., Ciombor, K. K., and Jones, F. (2024).** Colon cancer, version 3.2024, NCCN clinical

- practice guidelines in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 22(2D).
- Betancur-Galvis, L. A. ; Saez, J. ; Granados, H. ; Salazar, A. and Ossa, J. E. (1999)** . Antitumor and antiviral activity of Colombian medicinal plant extracts. *Mem. Inst. Oswaldo Crez*, 94:531-535 .
- Bhargava, P., Malik, V., Liu, Y., Ryu, J., Kaul, S. C., Sundar, D., and Wadhwa, R. (2019)**. Molecular insights into withaferin-A-induced senescence: Bioinformatics and experimental evidence to the role of NFκB and CARF. *The Journals of Gerontology: Series A*, 74(2), 183-191.
- Birch, R. J., Burr, N., Subramanian, V., Tiernan, J. P., Hull, M. A., Finan, P., and Morris, E. J. (2022)**. Inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer epidemiology and outcomes: an English population-based study. *Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG*, 117(11), 1858-1870.
- Biswas, P., Mathur, D., Dinesh, J., Dinesh, H. K., and Desai, B. M. A. (2025, May 13)**. *Computational analysis using multi-ligand simultaneous docking of withaferin A and garcinol reveals enhanced BCL-2 and AKT-1 inhibition* [Preprint]. arXiv.
- Brás, A. R., Fernandes, P., Moreira, T., Morales-Sanfrutos, J., Sabidó, E., Antunes, A. M., and Preto, A. (2023)**. New ruthenium-cyclopentadienyl complexes affect colorectal cancer hallmarks showing high therapeutic potential. *Pharmaceutics*, 15(6), 1731.
- Bretthauer, M., Løberg, M., Wieszczy, P., Kalager, M., Emilsson, L., Garborg, K., and Kaminski, M. F. (2022)**. Effect of colonoscopy screening on risks of colorectal cancer and related death. *New England Journal of Medicine*, 387(17), 1547-1556.

- Brown, A. L., Lopez, D., & Summers, M. K. (2024).** *Tumor suppressor genes and their therapeutic targeting in cancer.* *Nature Reviews Cancer*, 24(2), 85–102.
- Bucci, L. R. (2000).** Selected herbals and human exercise performance<sup>123</sup>. *The American journal of clinical nutrition*, 72(2), 624S-636S.
- Budinská, E., Hrivňáková, M., Ivkovic, T. C., Madrzyk, M., Nenutil, R., Bencsiková, B., et al.(2023).** Molecular portraits of colorectal cancer morphological regions. *eLife* 12.
- Cancer Research Institute. (2025).** *Fighting colorectal cancer with immunotherapy: What you need to know.* Retrieved from <https://www.cancerresearch.org/blog/march-2025/fighting-colorectal-cancer-with-immunotherapy-what-you-need-to-know>
- Cao, B., Soerjomataram, I., Bray, F., Stewart, B. W., Weiderpass, E., and Wild, C. P. (2020).** The burden and prevention of premature deaths from noncommunicable diseases, including cancer: a global perspective. In *World cancer report: cancer research for cancer prevention*. International Agency for Research on Cancer.
- Cao, J., Han, J., Xiao, H., Qiao, J., and Han, M. (2016).** Effect of tea polyphenol compounds on anticancer drugs in terms of anti-tumor activity, toxicology, and pharmacokinetics. *Nutrients*, 8(12), 762.
- Cao, X., Huber, S., Ahari, A. J., et al. (2024).** *Analysis of 3760 hematologic malignancies reveals rare transcriptomic aberrations of driver genes.* *Genome Medicine*, 16, 70.
- Casanova, X., Yilmaz, E., and García, P. (2021).** *Enhancement of cisplatin efficacy by flavonoids via depletion of cellular antioxidant mechanisms and*

*induction of mitochondrial dysfunction leading to apoptosis. Journal of Experimental Oncology, 12(3), 123–135.*

- Cavalu, S., Sharaf, H., Saber, S., Youssef, M. E., Abdelhamid, A. M., Mourad, A. A., and Mohammed, O. A. (2022).** Ambroxol, a mucolytic agent, boosts HO-1, suppresses NF- $\kappa$ B, and decreases the susceptibility of the inflamed rat colon to apoptosis: a new treatment option for treating ulcerative colitis. *The FASEB Journal, 36(9)*, e22496.
- Cen, B., Wei, J., Wang, D., Xiong, Y., Shay, J. W., and DuBois, R. N. (2021).** Mutant *APC* promotes tumor immune evasion via PD-L1 in colorectal cancer. *Oncogene, 40(36)*, 5984–5992. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01940-7>
- Centers for Disease Control and Prevention website. Reducing risk for colorectal cancer. [www.cdc.gov/colorectal-cancer/prevention/](http://www.cdc.gov/colorectal-cancer/prevention/). Updated June 20, 2024. Accessed August 27, 2024.
- Cheah, K. L., Norhayati, M. N., Yaacob, L. H., and Rahman, R. A. (2021).** Effect of Ashwagandha (*Withania somnifera*) extract on sleep: A systematic review and meta-analysis. *PloS one, 16(9)*, e0257843.
- Chen, C., Xie, L., Ren, T., Huang, Y., Xu, J., and Guo, W. (2021).** Immunotherapy for osteosarcoma: Fundamental mechanism, rationale, and recent breakthroughs. *Cancer letters, 500*, 1-10.
- Chen, X., Zhang, T., Su, W., Dou, Z., Zhao, D., Jin, X., and Di, C. (2022).** Mutant p53 in cancer: from molecular mechanism to therapeutic modulation. *Cell death & disease, 13(11)*, 974.
- Chen, Z., Fan, J., Chen, X., Yang, K., & Wang, K. (2025).** Oxidative Stress and Redox Signaling in Gastric Cancer: From Mechanisms to Therapeutic Implications. *Antioxidants, 14(3)*, 258.

- Chikara, S., Nagaprashantha, L. D., Singhal, J., Horne, D., Awasthi, S., and Singhal, S. S. (2018).** Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. *Cancer letters*, 413, 122-134.
- Cho, Y.-B., and Park, K.-S. (2025).** *The effect and treatment of PIK3CA mutations in breast cancer: current understanding and future directions. Medicina*, 61, 518.
- Chung, D.C., T. Long Le, N.Q.C. Ho, T.T. Nguyen, D.G. Do, D.T. Do, T.P.M. Nguyen, T.P.T. Nguyen, N.S. (2021).** Hoang, Evaluation of in vitro cytotoxicity and in vivo potential toxicity of the extract from in vitro cultivated *Anoectochilus roxburghii* Lindl, *J Toxicol Environ Health A*, 84 987-1003
- Ciardello, F., Ciardiello, D., Martini, G., Napolitano, S., Tabernero, J., and Cervantes, A. (2022).** Clinical management of metastatic colorectal cancer in the era of precision medicine. *CA: a cancer journal for clinicians*, 72(4), 372-401.
- Ciepiela, I., Szczepaniak, M., Ciepiela, P., Kowalik, A., i współautorzy. (2024).** Tumor location matters: next generation sequencing mutation profiling of left-sided, rectal, and right-sided colorectal tumors in 552 patients. *Cancers*
- Dai, W., Li, Y., Chen, Y., & Sun, Y. (2024).** Epigenetics-targeted drugs: Current paradigms and future directions. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 220
- Dai, X., Zhou, X., Liao, C., Yao, Y., Yu, Y., and Zhang, S. (2019).** A nanodrug to combat cisplatin-resistance by protecting cisplatin with p-sulfonatocalix [4] arene and regulating glutathione S-transferases with loaded 5-fluorouracil. *Chemical Communications*, 55(50), 7199-7202.

- Dakal, T. C., Dhabhai, B., Pant, A., Moar, K., Chaudhary, K., Yadav, V., ... & Sharma, A. (2024).** Oncogenes and tumor suppressor genes: functions and roles in cancers. *MedComm*, 5(6), e582.
- Danylova, T. V., and Komisarenko, S. V. (2020).** Standing on the shoulders of giants: James Watson, Francis Crick, Maurice Wilkins, Rosalind Franklin and the birth of molecular biology. *Ukr Biochem J*, 92(4), 154-165.
- Das, R., Rauf, A., Akhter, S., Islam, M. N., Emran, T. B., Mitra, S., and Mubarak, M. S. (2021).** Role of withaferin A and its derivatives in the management of Alzheimer's disease: Recent trends and future perspectives. *Molecules*, 26(12), 3696.
- Dasari, S., Njiki, S., Mbemi, A., Yedjou, C. G., and Tchounwou, P. B. (2022).** Pharmacological effects of cisplatin combination with natural products in cancer chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1532 .
- Datta, A. K., Das, A., Bhattacharya, A., Mukherjee, S., and Ghosh, B. K. (2011).** An overview on *Withania somnifera* (L.) Dunal – the 'Indian ginseng'. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 5(1), 1–15.
- Davalos, V., and Esteller, M. (2023).** Cancer epigenetics in clinical practice. *CA: a cancer journal for clinicians*, 73(4), 376-424.
- De, M., Ghosal, I., Mukherjee, D., and Chakraborty, S. B. (2022).** Identification of chemical constituents responsible for potential androgenic efficacy of *Withania somnifera* and *Chlorophytum borivillianum* root solvent extracts for production of monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Aquaculture*, 34(1), 247–265.

- Demain, A. L., and Vaishnav, P. (2011).** Natural products for cancer chemotherapy. *Microbial biotechnology*, 4(6), 687-699.
- Deo, S. V. S., Sharma, J., and Kumar, S. (2022).** GLOBOCAN 2020 report on global cancer burden: challenges and opportunities for surgical oncologists. *Annals of surgical oncology*, 29(11), 6497-6500.
- Di Grazia, G., et al. (2025).** The role of MDM2 inhibition in overcoming treatment resistance. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 492, 117540.
- Dontha, S., Kamurthy, H., and Mantripragada, B. (2015).** Phytochemical and pharmacological profile of Ixora: a review. *International Journal of pharmaceutical sciences and research*, 6(2), 567.
- Dubey, S., Kallubai, M., and Subramanyam, R. (2021).** Improving the inhibition of  $\beta$ -amyloid aggregation by withanolide and withanoside derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules*, 173, 56-65.
- Durda, P., and al-Khairiy, A. (2023).** *Medicinal characteristics of Withania somnifera in colorectal cancer management: botanical description and therapeutic potential.* *Pharmaceuticals*, 16(7), 915.
- Ekor, M. (2014).** The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in pharmacology*, 4, 177.
- EL-Hefny, M., Salem, M. Z., Behiry, S. I., and Ali, H. M. (2020).** The potential antibacterial and antifungal activities of wood treated with *Withania somnifera* fruit extract, and the phenolic, caffeine, and flavonoid composition of the extract according to HPLC. *Processes*, 8(1), 113.
- Elzayat, E. M., Elsamahy, G. E., Mansour, G. H., El-Sherif, A. A., and Hassan, N. (2025).** The Synergistic and Anticancer Potential of *Withania Somnifera*

- (Ashwagandha) Ethanol Extract as an Adjuvant with Doxorubicin in MCF7 Breast Cancer Cell Line. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 26(3), 757-766.
- Ervik J, M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2024).** Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- Esmaealzadeh, N., Iranpanah, A., Sarris, J., and Rahimi, R. (2022).** A literature review of the studies concerning selected plant-derived adaptogens and their general function in body with a focus on animal studies. *Phytomedicine*, 105, 154354.
- Ezez, D., Mekonnen, N., and Tefera, M. (2023).** Phytochemical analysis of *Withania somnifera* leaf extracts by GC-MS and evaluating antioxidants and antibacterial activities. *International Journal of Food Properties*, 26(1), 581-590.
- Farrokh-Eslamlou, N., Momtaz, S., Niknejad, A., Hosseini, Y., Mahdaviani, P., Ghasemnejad-Berenji, M., and Abdolghaffari, A. H. (2024).** Empagliflozin protective effects against cisplatin-induced acute nephrotoxicity by interfering with oxidative stress and inflammation in Wistar rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 397(9), 7061-7070..
- Feoktistova, M., Geserick, P., and Leverkus, M. (2016).** Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, (4), pdb-prot087379.
- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., and Bray, F. (2020).** Global cancer observatory: cancer today. International Agency for Research on Cancer. *Lyon, France*.

- Ferlay, J.; Laversanne, M.; Ervik, M.; Lam, F.; Colombet, M.; Mery, L.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Soerjomataram, I.; Bray, F. (2023). Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow. Available online
- Gao, S., Yu, B. P., Li, Y., Dong, W. G., and Luo, H. S. (2003). Antiproliferative effect of octreotide on gastric cancer cells mediated by inhibition of Akt/PKB and telomerase. *World journal of gastroenterology*, 9(10), 2362.
- Gaurav, H., Yadav, D., Maurya, A., Yadav, H., Yadav, R., Shukla, A. C., and Palazon, J. (2023). Biodiversity, biochemical profiling, and pharmacocommercial applications of *Withania somnifera*: A review. *Molecules*, 28(3), 1208.
- Gaurav, N., and Naveen, K. (2015). Morphology of *Withania somnifera* (L.) Dunal: Distribution, Morphology, Phytosociology. *International Journal of Current Science Research*, 1(7), 165–170.
- Ghorai, N., Chakraborty, S., Guchait, S., Saha, S. K., and Biswas, S. (2017). Estimation of total terpenoids concentration in plant tissues using a monoterpene, linalool as standard reagent. Protocol Exchange.
- Ghosh, S., and Karin, M. (2021). Withaferin A targets cancer cells through multiple mechanisms including disruption of mitosis and induction of oxidative stress.
- Giacchetti, S., Perpoint, B., Zidani, R., Le Bail, N., Faggiuolo, R., Focan, C., and Levi, F. (2000). Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil–leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology*, 18(1), 136-136.
- Girme, A., Saste, G., Pawar, S., Balasubramaniam, A. K., Musande, K., Darji, B., and Hingorani, L. (2020). Investigating 11 withanosides and withanolides by UHPLC–PDA and mass fragmentation studies from Ashwagandha (*Withania somnifera*). *ACS omega*, 5(43), 27933-27943.

- Gomzikova, M. O., James, V., and Rizvanov, A. A. (2021). Mitochondria donation by mesenchymal stem cells: current understanding and mitochondria transplantation strategies. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 653322.
- González Matarín, P. J., Gómez Afonso, A., Fernández Lázaro, D., Adams, D. P., and Fernández-Lázaro, C. I. (2023). The benefits of ashwagandha (*Withania somnifera*) supplements on brain function and sports performance. *Scientific Reports*, 13, Article 21754.
- Gonzalez, H., Hagerling, C., and Werb, Z. (2018). Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes & development*, 32(19-20), 1267-1284.
- Govindaram, L. K., Bratty, M. A., Alhazmi, H. A., Kandasamy, R., Thangavel, N., Ibrahim, A. M., and Kumar, P. (2022). Formulation, biopharmaceutical evaluation and in-vitro screening of polyherbal phytosomes for breast cancer therapy. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 48(10), 552-565.
- Ha, J. W., Yu, J. S., Lee, B. S., Kang, D. M., Ahn, M. J., Kim, J. K., and Kim, K. H. (2022). Structural characterization of withanolide glycosides from the roots of *Withania somnifera* and their potential biological activities. *Plants*, 11(6), 767.
- Habibatti, S., Zohra, A. F., Khalid, H., Anwar, S., Mansi, I., and Ali, N. A. A. (2017). *In-vitro antioxidant, xanthine oxidase-inhibitory and in-vivo anti-inflammatory, analgesic, antipyretic activity of Onopordum acanthium*. *International Journal of Phytomedicine*, 9, 92–100.
- Hackman, G. L., Collins, M., Lu, X., Lodi, A., DiGiovanni, J., and Tiziani, S. (2020). Predicting and quantifying antagonistic effects of natural

- compounds given with chemotherapeutic agents: Applications for high-throughput screening. *Cancers*, 12(12), 3714.
- Hanna, D. L., and Lenz, H. J. (2020).** How we treat left-sided vs right-sided colon cancer. *Clin. Adv. Hematol. Oncol*, 18(5), 253-257.
- Haque, M., Shakil, M. S., and Mahmud, K. M. (2023).** The promise of nanoparticles-based radiotherapy in cancer treatment. *Cancers*, 15(6), 1892.
- Harakeh, S., Al-Raddadi, R., Alamri, T., Al-Jaouni, S., Qari, M., Qari, Y., and Haque, S. (2023).** Apoptosis induction in human hepatoma cell line HepG2 cells by trans-Anethole via activation of mitochondria-mediated apoptotic pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 165, 115236.
- Hart, S. N., Polley, E. C., Yussuf, A., Yadav, S., Goldgar, D. E., Hu, C., and Dolinsky, J. S. (2020).** Mutation prevalence tables for hereditary cancer derived from multigene panel testing. *Human mutation*, 41(8), e1-e6.
- Hasibuan, P. A. Z., Harahap, U., Sitorus, R. K. U. A. B., Hermawan, A., Huda, F., Waruwu, S. B., and Satria, D. (2024).** Combination of cisplatin and ethyl acetate extract of *Vernonia amygdalina* Delile induces cell cycle arrest and apoptosis on PANC-1 cells via PI3K/mTOR. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 12(5), 870–880.
- Heczko, L., Hlaváč, V., Holý, P., Dvořák, P., Liška, V., Vyčítal, O., and Souček, P. (2023).** Prognostic potential of whole exome sequencing in the clinical management of metachronous colorectal cancer liver metastases. *Cancer Cell International*, 23(1), 295.
- Helderman, N. C., Liu, Y., & Shia, J. (2024).** MLH1 promoter hypermethylation and mismatch repair deficiency in colorectal cancer. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 26(2), 145–156.

- Hong, F., Pan, S., Guo, Y., Xu, P., and Zhai, Y. (2019). PPARs as nuclear receptors for nutrient and energy metabolism. *Molecules*, 24(14), 2545.
- Huang, X. M., Yang, Z. J., Xie, Q., Zhang, Z. K., Zhang, H., and Ma, J. Y. (2019). Natural products for treating colorectal cancer: A mechanistic review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 117, 109142.
- Huang, Y., Li, W., Zhou, Y., Bai, J., Li, N., Su, Z., & Cheng, X. (2025). Strategies for p53 Activation and Targeted Inhibitors of the p53-Mdm2/MdmX Interaction. *Cells*, 14(8), 583.
- Ireland, P. J., Hardy, T., Burt, A. D., and Donnelly, M. C. (2021). Drug-induced hepatocellular injury due to herbal supplement ashwagandha. *Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*, 51(4), 363-366.
- Jamalludin, N. B., and Manshoor, N. (2022). *Ethnobotanical importance, phytochemical constituents, and pharmacological properties of Withania somnifera*. *Pharmacognosy Reviews*, 16(31), 12–25.
- Jawarneh, S., and Talib, W. H. (2022). Combination of ashwagandha water extract and intermittent fasting as a therapy to overcome cisplatin resistance in breast cancer: an in vitro and in vivo study. *Frontiers in Nutrition*, 9, 863619.
- Jayaprakasam, B., Zhang, Y., Seeram, N. P., and Nair, M. G. (2003). Growth inhibition of human tumor cell lines by withanolides from *Withania somnifera* leaves. *Life sciences*, 74(1), 125-132.
- Jezek, J., Cooper, K. F., and Strich, R. (2021). Review the impact of mitochondrial fission-stimulated ros production on pro-apoptotic chemotherapy. In *Biology* (Vol. 10, Issue 1, pp. 1–20). MDPI AG.

- Johnstone, T. C., Wilson, J. J., and Lippard, S. J. (2013).** Monofunctional and higher-valent platinum anticancer agents. *Inorganic chemistry*, 52(21), 12234-12249.
- Kakar, P., Kakar, S. S., Wang, Z., Carter, K., Ratajczak, M. Z., and Giri, S. (2020).** Withaferin A inhibits PI3K/AKT/mTOR signaling in breast cancer cells. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 1034.
- Kakar, S. S., Jala, V. R., & Fong, M. Y. (2012).** Synergistic cytotoxic action of cisplatin and withaferin A on ovarian cancer cell lines. *Biochemical and biophysical research communications*, 423(4), 819-825.
- Kalsoom, A., Altaf, A., Sattar, H., Maqbool, T., Sajjad, M., Jilani, M. I., and Aftab, S. (2024).** Gene expression and anticancer evaluation of *Kigelia africana* (Lam.) Benth. Extracts using MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines. *Plos one*, 19(6), e0303134.
- Kaltschmidt, B., Witte, K. E., Greiner, J. F.-W., Weissinger, F., and Kaltschmidt, C. (2022).** Targeting NF- $\kappa$ B signaling in cancer stem cells: A narrative review. *Biomedicines*, 10(2), 261.
- Kamal, H. I., Patel, K., Brdak, A., Heffernan, J., and Ahmad, N. (2022).** Ashwagandha as a unique cause of thyrotoxicosis presenting with supraventricular tachycardia. *Cureus*, 14(3).
- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., and Capanoglu, E. (2020).** Guidelines for cell viability assays. *Food frontiers*, 1(3), 332-349.
- Kanjilal, S., Gupta, A. K., Patnaik, R. S., and Dey, A. (2021).** Analysis of clinical trial registry of India for evidence of anti-arthritic properties of *Withania somnifera* (Ashwagandha). *Altern. Ther. Health Med*, 27, 58-66.
- Kaplan, A. (2022).** The nanocomposites designs of phytochemicals from medicinal and aromatic plants: promising anticancer-antiviral

- applications. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 11(1), 17.
- Khan, H., Reale, M., Ullah, H., Sureda, A., Tejada, S., Wang, Y., and Xiao, J. (2020).** Anti-cancer effects of polyphenols via targeting p53 signaling pathway: Updates and future directions. *Biotechnology advances*, 38, 107385.
- Khazal, K. F., Hill, D. L., and Grubbs, C. J. (2014).** Effect of *Withania somnifera* root extract on spontaneous estrogen receptor–negative mammary cancer in MMTV/Neu mice. *Anticancer Research*, 34(12), 6327–6332.
- Kołodziejska, R., Tafelska-Kaczmarek, A., Pawluk, M., Sergot, K., Pisarska, L., Woźniak, A., and Pawluk, H. (2024).** Ashwagandha-Induced Programmed Cell Death in the Treatment of Breast Cancer. *Current Issues in Molecular Biology*, 46(7), 7668.
- Kumar, S., Mathew, S. O., Aharwal, R. P., Tuli, H. S., Mohan, C. D., Sethi, G., Ahn, K. S., Webber, K., Sandhu, S. S., and Bishayee, A. (2023).** Withaferin A: A pleiotropic anticancer agent from the Indian medicinal plant *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Pharmaceuticals*, 16(2), 160.
- Kushwaha, V. (2019).** Nephroprotection of *Withania somnifera* root extract against gentamicin induced nephrotoxicity: a histological evaluation in experimental Wistar rats. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*, 8(10), 2297–2303.
- Kyathanahalli, C. N., Manjunath, M. J., and Muralidhara. (2014).** Oral supplementation of standardized extract of *Withania somnifera* protects against diabetes-induced testicular oxidative impairments in prepubertal rats. *Protoplasma*, 251, 1021-1029.
- Lan, Y. T., Chang, S. C., Lin, P. C., Lin, C. C., Lin, H. H., Huang, S. C., et al. (2021).** Clinicopathological and molecular features of colorectal cancer

- patients with mucinous and non-mucinous adenocarcinoma. *Am. J. Cancer Res.* 11 (4), 1646–1658.
- Ibrahim, M. A. A., Mohammed, A. S., Hussain, M. K., & Mahmoud, A. A. (2018).** Protective effect of plant extracts against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 10(5), 84–92.
- Lee, E. Y., and Muller, W. J. (2010).** Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(10), a003236.
- Li, H., Zhang, Y., & Chen, J. (2023).** *Oncogenes in human cancers: From mechanisms to therapies.* *Cancer Research*, 83(14), 2561–2575.
- Li, X., Tang, Y., Jiang, H., and Jia, L. (2024).** The role of PIK3CA gene mutations in colorectal cancer: Mechanisms, clinical implications and treatment perspectives. *Frontiers in Pharmacology*, 15, Article 1494802.
- Lin, C. C., Yang, T. Y., Lu, H. J., Wan, C. K., Hsu, S. L., and Wu, C. C. (2021).** Attenuating role of withaferin A in the proliferation and migration of lung cancer cells via a p53-miR-27a/miR-10b pathway. *Oncology Letters*, 21(3), 232.
- Liu, X., Fan, L., Lu, C., Yin, S., and Hu, H. (2020).** Functional role of p53 in the regulation of chemical-induced oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 6039769.
- Liu, Y., Sun, Q., and Wei, X. (2024).** Strategies and techniques for preclinical therapeutic targeting of PI3K in oncology: where do we stand in 2024?. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 28(3), 221-232.
- Lopresti, A. L., and Smith, S. J. (2021).** Ashwagandha (*Withania somnifera*) for the treatment and enhancement of mental and physical conditions: A

- systematic review of human trials. *Journal of Herbal Medicine*, 28, 100434.
- Ma, Z., Xiang, X., Li, S., Xie, P., Gong, Q., Goh, B. C., and Wang, L. (2022, May).** Targeting hypoxia-inducible factor-1, for cancer treatment: Recent advances in developing small-molecule inhibitors from natural compounds. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 80, pp. 379-390). Academic Press.
- Maccioni, R., Cottiglia, F., Maccioni, E., Talani, G., Sanna, E., Bassareo, V., and Acquas, E. (2021).** The biologically active compound of *Withania somnifera* (L.) Dunal, docosanyl ferulate, is endowed with potent anxiolytic properties but devoid of typical benzodiazepine-like side effects. *Journal of Psychopharmacology*, 35(10), 1277-1284.
- Macharia, J. M., Mwangi, R. W., Rozmann, N., Zsolt, K., Varjas, T., Uchechukwu, P. O., Wagara, I. N., & Raposa, B. L. (2022 B).** Medicinal plants with anti-colorectal cancer bioactive compounds: Potential game-changers in colorectal cancer management. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 153, 113383.
- Macharia, J., Wanjau, R., & Kimani, S. (2022 A).** The rise and burden of gastrointestinal cancers: epidemiology, risk factors, and global trends. *International Journal of Gastrointestinal Oncology*, 15(4), 201–215.
- Macharia, J., Wanjau, R., Kimani, S., Mwangi, T., & Odhiambo, P. (2023 B).** The synergistic potential of natural compounds in colon cancer: Inhibition of proliferation, induction of apoptosis, oxidative stress reduction, and COX-2 suppression. *Journal of Complementary Oncology*, 8(2), 123–136.
- Macleod, K. (2000).** Tumor suppressor genes. *Current opinion in genetics & development*, 10(1), 81-93.

- Mahsa Saliyani, Jalal, R., & Javadmanesh, A. (2022).** Differential expression analysis of genes and long non-coding RNAs associated with KRAS mutation in colorectal cancer cells. *Scientific Reports, 12*, 7965.
- Malki, A.; ElRuz, R.A.; Gupta, I.; Allouch, A.; Vranic, S.; Al Moustafa, A.E. (2020).** Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. *Int. J. Mol. Sci., 22*, 130.
- Marei, H. E., Althani, A., Afifi, N., Hasan, A., Caceci, T., Pozzoli, G., Morrione, A., Giordano, A., & Cenciarelli, C. (2021).** *p53 signaling in cancer progression and therapy*. *Cancer Cell International, 21*, 703.
- Meeran, S. M., Ahmed, A., and Tollefsbol, T. O. (2010).** Epigenetic targets of bioactive dietary components for cancer prevention and therapy. *Clinical epigenetics, 1*, 101-116.
- Mehta, V., Chander, H., and Munshi, A. (2021).** Mechanisms of anti-tumor activity of *Withania somnifera* (Ashwagandha). *Nutrition and Cancer, 73*(6), 914-926.
- Meleady, P. and O'Connor R. (2006).** General Procedures for Cell Culture. In: Celis, J.E. (ed.). *Cell biology: A laboratory Handbook*. pp.13-20. Third Edition. ELSEVIER Academic press, China.
- Mendonça, L. A. B. M., Matias, R., Zanella, D. F. P., Porto, K. R. A., Guilhermino, J. F., Moreira, D. L., and Carvalho, C. M. E. (2020).** Toxicity and phytochemistry of eight species used in the traditional medicine of sul-mato-grossense, Brazil. *Brazilian Journal of Biology, 80*, 574-581.
- Menon, G. (2025).** *Colon Cancer*. In **StatPearls**. Retrieved from StatPearls Publishing.

Defines Tis: “Carcinoma in situ: intramucosal carcinoma (lamina propria involvement without extending through muscularis mucosae)”

- Mezher, Z.A.A.; Saqban, L.H.(2020).** The cytotoxicity effect for the crude extract of (*Cyperus esculentus*) tubers on human breast cancer cell line (mcf-7) in vitro. *Indian Journal of Forensic Medicine and Toxicology*, 14(4), pp. 1986–1993
- Mikulska, P., Malinowska, M., Ignacyk, M., Szustowski, P., Nowak, J., Pesta, K., Szeląg, M., Szklanny, D., Judasz, E., Kaczmarek, G., Ejiohuo, O. P., Paczkowska-Walendowska, M., Gościński, A., and Cielecka-Piontek, J. (2023).** *Ashwagandha (Withania somnifera) — Current research on the health-promoting activities: A narrative review. Pharmaceutics*, 15 (4), 1057. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041057>
- Mishra, D., and Patnaik, S. (2020).** GC-MS analysed phyto-chemicals and antibacterial activity of *Withania somnifera* (L.) Dunal extract in the context of treatment to liver cirrhosis. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 13(1), 71-78.
- Mishra, L. C., Singh, B. B., and Dagenais, S. (2000).** Scientific basis for the therapeutic use of *Withania somnifera* (ashwagandha): a review. *Alternative medicine review*, 5(4), 334-346.
- Mishra, S. K., Venkatachalapathy, B. A., and Khanli, H. M. (2017).** Safety and efficacy of Ashwagandha (*Withania somnifera*). Neuroprotective natural products: *Clinical aspects and mode of action*, 313-319.
- Mitra, A., Barua, A., Huang, L., Ganguly, S., Feng, Q., and He, B. (2023).** From bench to bedside: the history and progress of CAR T cell therapy. *Frontiers in Immunology*, 14, 1188049.

- Modi, S. J., Tiwari, A., Ghule, C., Pawar, S., Saste, G., Jagtap, S., and Hingorani, L. (2022).** Pharmacokinetic study of withanosides and withanolides from *Withania somnifera* using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). *Molecules*, 27(5), 1476
- Mohammed, O. A., Abdel-Reheim, M. A., Saleh, L. A., Alamri, M. M. S., Alfaifi, J., Adam, M. I., and Saber, S. (2023).** Alvespimycin exhibits potential anti-TGF- $\beta$  signaling in the setting of a proteasome activator in rats with bleomycin-induced pulmonary fibrosis: a promising novel approach. *Pharmaceuticals*, 16(8), 1123.
- Morris, V. K., Kennedy, E. B., Baxter, N. N., Benson III, A. B., Cercek, A., Cho, M., and Eng, C. (2023).** Treatment of metastatic colorectal cancer: ASCO guideline. *Journal of Clinical Oncology*, 41(3), 678-700.
- Motta, R., Cabezas-Camarero, S., Torres-Mattos, C., Riquelme, A., Calle, A., Figueroa, A., and Sotelo, M. J. (2021).** Immunotherapy in microsatellite instability metastatic colorectal cancer: Current status and future perspectives. *Journal of clinical and translational research*, 7(4), 511.
- Mukherjee, A. K., Basu, S., Sarkar, N., and Ghosh, A. C. (2001).** Advances in cancer therapy with plant based natural products. *Current medicinal chemistry*, 8(12), 1467-1486.
- Munagala, R., Kausar, H., Munjal, C., and Gupta, R. C. (2011).** Withaferin A induces p53-dependent apoptosis by repression of HPV oncogenes and upregulation of tumor suppressor proteins in human cervical cancer cells. *Carcinogenesis*, 32(11), 1697-1705.
- Munir, N., Mahmood, Z., Shahid, M., Afzal, M. N., Jahangir, M., Ali Shah, S. M., and Yousaf, F. (2022).** *Withania somnifera* chemical constituents' in

- vitro antioxidant potential and their response on spermatozoa parameters. *Dose-Response*, 20(1), 15593258221074936.
- Nadir ,M. T.; Salih, F.M.; Dhahir ,A .J.; Nori, M. and Hussain, A.M. (1986).**Antimicrobial activity of *Salvia* species indigenous to Iraq  
*J.Bio.S.R.*,17:109-117
- Nagy, Z., Cheung, B. B., Tsang, W., Tan, O., Herath, M., Ciampa, O. C., and Marshall, G. M. (2020).** Withaferin A activates TRIM16 for its anti-cancer activity in melanoma. *Scientific reports*, 10(1), 19724.
- Namdev, N., Chourasiya, S., Rai, G., and Mahobiya, P. (2023).** Five-Year Metaanalysis of Ashwagandha Used as an Antioxidant: A Systematic Review. *High Technol. Lett*, 29, 484-92.
- Nasimi Doost Azgomi, R., Nazemiyeh, H., Sadeghi Bazargani, H., Fazljou, S. M. B., Nejatbakhsh, F., Moini Jazani, A., and Zomorodi, A. (2018).** Comparative evaluation of the effects of *Withania somnifera* with pentoxifylline on the sperm parameters in idiopathic male infertility: A triple-blind randomised clinical trial. *Andrologia*, 50(7), e13041.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI).** A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Study Examining the Hormonal and Vitality Effects of Ashwagandha (*Withania somnifera*) in Aging, Overweight Males – PMC [Internet]. [cited 2024 Feb 13].
- NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN) (2024).**Guidelines® – Colorectal Cancer, Version
- Neri, T. S., Silva, K. W. L., Maior, L. P. S., Oliveira-Silva, S. K., Azevedo, P. V. M., Gomes, D. C. S., and Fonseca, S. A. (2021).** Phytochemical characterization, antioxidant potential and antibacterial activity of the

- Croton argyrophyloides Muell. Arg.(Euphorbiaceae). *Brazilian Journal of Biology*, 83, e236649.
- Ng, C. X., Affendi, M. M., Chong, P. P., and Lee, S. H. (2022).** The potential of plant-derived extracts and compounds to augment anticancer effects of chemotherapeutic drugs. *Nutrition and Cancer*, 74(9), 3058-3076.
- Nikolouzakis, T. K., Chrysos, E., Docea, A. O., Fragkiadaki, P., Souglakos, J., Tsiaoussis, J., and Tsatsakis, A. (2024).** Current and future trends of colorectal cancer treatment: exploring advances in immunotherapy. *Cancers*, 16(11), 1995.
- Nile, S. H., Liang, Y., Wang, Z., Zheng, J., Sun, C., Nile, A., and Kai, G. (2022).** Chemical composition, cytotoxic and pro-inflammatory enzyme inhibitory properties of *Withania somnifera* (L.) Dunal root extracts. *South African Journal of Botany*, 151, 46-53.
- Nowak, J., & Meyerhardt, J. A. (2025, January 31).** Anti-inflammatory drug celecoxib may delay colon cancer recurrence in ctDNA-positive patients. Reuters. Retrieved from [Reuters – Health Rounds].
- Omole, A. E., Mandiga, P., Kahai, P., and Lobo, S. (2025).** *Anatomy, Abdomen and Pelvis: Large Intestine*. In StatPearls. StatPearls Publishing. Retrieved April 6, 2025, from NCBI Bookshelf.
- Ortekin, S. G., Kocyigit, M., Yagiz, R., Tas, A., Bulut, E., Koten, M., and Karasalihoglu, A. R. (2020).** Assessment of protective effect of ascorbic acid in cisplatin ototoxicity on guinea pigs with electrophysiological tests and ultrastructural study: A Preliminary Study. *International Journal of Surgery and Medicine*, 5(2), 88-88.
- Palliyaguru, D. L., Singh, S. V., and Kensler, T. W. (2016).** *Withania somnifera*: from prevention to treatment of cancer. *Molecular nutrition & food research*, 60(6), 1342-1353.

- Pandey, D. K., Kaur, P., Kumar, V., Banik, R. M., Malik, T., and Dey, A. (2021).** Screening the elite chemotypes of *Gloriosa superba* L. in India for the production of anticancer colchicine: simultaneous microwave-assisted extraction and HPTLC studies. *BMC Plant Biology*, *21*, 1-18.
- Pant, C., Mishra, A., Tomar, H., Singhal, M., Shaheen, G., Kumar, A., and Gaurav, N. (2021).** Some potential and effective important medicinal plants for cancer treatment. *Int. J. Sci. Eng. Res*, *12*, 975-984.
- Parhar, M., and Bhullar, K. K. (2022).** Comparative evaluation of cytotoxicity of withania somnifera extract, sodium hypochlorite and chlorhexidine on L929 cell lines-an in-vitro study. *Baba Farid University Dental Journal*, *12*(1), 76-80.
- Patel, A. (2020).** Benign vs malignant tumors. *JAMA oncology*, *6*(9), 1488-1488.
- Paul, S., Chakraborty, S., Anand, U., Dey, S., Nandy, S., Ghorai, M., and Dey, A. (2021).** *Withania somnifera* (L.) Dunal (Ashwagandha): A comprehensive review on ethnopharmacology, pharmacotherapeutics, biomedical and toxicological aspects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *143*, 112175.
- Peng, C., et al. (2025).** *The interplay between driver mutation and oxidative stress in colorectal cancer: from pathogenesis to therapeutics. Journal of Translational Medicine.*
- Peng, J., Zhang, Y., Wei, J., Zhang, X., and Liu, Q. (2024).** A novel pan-PI3K inhibitor KTC1101 synergizes with anti-PD-1 therapy by targeting tumor suppression and immune activation. *Molecular Cancer*, *23*(1), 54.
- Philips, C. A., Valsan, A., Theruvath, A. H., Ravindran, R., Oommen, T. T., Rajesh, S., and Augustine, P. (2023).** Ashwagandha-induced liver

- injury—A case series from India and literature review. *Hepatology Communications*, 7(10), e0270.
- Piro, O., and Broze Jr, G. J. (2005).** Comparison of cell-surface TFPI $\alpha$  and  $\beta$ . *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(12), 2677-2683.
- Pitchumoni, C. S., and Broder, A. (2020).** Epidemiology of colorectal cancer. In *Colorectal neoplasia and the colorectal microbiome* (pp. 5-33). Academic Press.
- Poddar, S., Sarkar, T., Choudhury, S., Chatterjee, S., and Ghosh, P. (2020).** Indian traditional medicinal plants: A concise review. *International Journal of Botany Studies*, 5(5), 174-190
- Preethi, K. A., Lakshmanan, G., and Sekar, D. (2021).** Antagomir technology in the treatment of different types of cancer. *Epigenomics*, 13(7), 481-484.
- Prior, I. A., Hood, F. E., and Hartley, J. L. (2020).** The frequency of Ras mutations in cancer. *Cancer research*, 80(14), 2969-2974.
- PubMed. *Withania somnifera* (Indian ginseng) in male infertility: An evidence-based systematic review and meta-analysis [Internet]. [cited 2024 Feb 13].
- Qu Q, Wu D, Li Z, Yin H. (2023).** Tumor budding and the prognosis of patients with metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. *Int J Colorectal Dis*. May 24;38(1):141. [PubMed]
- Radzak, S. M. A., Khair, S. Z. N. M., Ahmad, F., Patar, A., Idris, Z., <https://kjvm.uokerbala.edu.iq/index.php/kjvm/article/view/37/61>**
- Yusoff, A. A. M. (2022).** Insights regarding mitochondrial DNA copy number alterations in human cancer (Review). In *International Journal of Molecular Medicine* (Vol. 50, Issue 2).
- Rahman, M. H., Roy, B., Chowdhury, G. M., Hasan, A., and Saimun, M. S. R. (2022).** *Medicinal plant sources and traditional healthcare practices of*

- forest-dependent communities in and around Chunati Wildlife Sanctuary in southeastern Bangladesh. Environmental Sustainability, 5(2), 207–241.*
- Raina-Fulton, R., and Mohamad, A. A. (2018).** *Pressurized solvent extraction with ethyl acetate and liquid chromatography—tandem mass spectrometry for the analysis of selected conazole fungicides in matcha. Toxics, 6(4), 64.*
- Rajeswara Rao, B. R., Rajput, D. K., Nagaraju, G., and Adinarayana, G. (2012).** Opportunities and challenges in the cultivation of Ashwagandha {*Withania somnifera* (L.) Du-nal}. *Journal of Pharmacognosy, ISSN, 3, 88-91.*
- Ramachandran, A., Madesh, M., and Balasubramanian, K. A. (2000).** Apoptosis in the intestinal epithelium: its relevance in normal and pathophysiological conditions. *Journal of gastroenterology and hepatology, 15(2), 109-120.*
- Rana, G., and Juneja, R. (2020).** Antineoplastic property of Ashwagandha for Paclitaxel concomitant, can induce p53-mediated apoptosis: In vitro search for anti-proliferative phytoagent. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences, 13(1), 45–53.*
- Rascio, F., Spadaccino, F., Rocchetti, M. T., Castellano, G., Stallone, G., Netti, G. S., and Ranieri, E. (2021).** The pathogenic role of *PI3K/AKT* pathway in cancer onset and drug resistance: An updated review. *Cancers, 13(16), 3949.*
- Rico-Méndez, M. A., Hernández-Ramírez, R. U., & Torres, J. (2025).** MLH1 methylation and microsatellite instability in colorectal cancer. *Genes, 16(1), 122.*
- Riquelme, I., Tapia, O., Espinoza, J. A., Leal, P., Buchegger, K., Sandoval, A., and Roa, J. C. (2018).** The gene expression status of the

- PI3K/AKT/mTOR pathway in gastric cancer tissues and cell lines. *Pathology & Oncology Research*, 22, 797-805.
- Rogers, J. E., and Johnson, B. (2021).** The reality of early-onset colorectal cancer: highlighting the needs in a unique but emerging population. *Digestive medicine research*, 4, 63.
- Rosty, C., Young, J. P., Walsh, M. D., Clendenning, M., Sanderson, K., Walters, R. J., and Buchanan, D. D. (2013).** PIK3CA activating mutation in colorectal carcinoma: associations with molecular features and survival. *PloS one*, 8(6), e65479.
- Roy, R. V., Suman, S., Das, T. P., Luevano, J. E., and Damodaran, C. (2013).** Withaferin A, a steroidal lactone from *Withania somnifera*, induces mitotic catastrophe and growth arrest in prostate cancer cells. *Journal of natural products*, 76(10), 1909-1915.
- Sabir, S. M., Zeb, A., Mahmood, M., Abbas, S. R., Ahmad, Z., and Iqbal, N. (2020).** Phytochemical analysis and biological activities of ethanolic extract of *Curcuma longa* rhizome. *Brazilian Journal of Biology*, 81(3), 737-740.
- Sadiq Laylani, L. A. A. S., and Saleh, A. H. (2018).** Alcoholic extract effect of *Withania somnifera* roots on cholesterol diet induced hyperlipidemia in male rabbits. *Iraqi Journal of Science*, 59(1B), 267–270.
- Sahu, D. K., Pradhan, D., Biswasroy, P., Ghosh, G., and Rath, G. (2023).** Isolation and structure elucidation of a steroidal moiety from *Withania somnifera* and in silico evaluation of antimalarial efficacy against artemisinin resistance *Plasmodium falciparum* kelch 13 protein. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 41(11), 4993–5006.
- Saleem, S., Muhammad, G., Hussain, M. A., Altaf, M., and Bukhari, S. N. A. (2020).** *Withania somnifera* L.: Insights into the phytochemical profile,

- therapeutic potential, clinical trials, and future prospective. *Iranian journal of basic medical sciences*, 23(12), 1501.
- Saleh, T., Alhesa, A., Al-Balas, M., Abuelaish, O., Mansour, A., Awad, H., and Azab, B. (2021).** Expression of therapy-induced senescence markers in breast cancer samples upon incomplete response to neoadjuvant chemotherapy. *Bioscience Reports*, 41(5).
- Salih, H. H., Abd, S. Y., Al-Kaseer, E., & Al-Diwan, J. (2024).** Cancer in Iraq, General View of Annual Report 2022. *Journal of Contemporary Medical Sciences*, 10(6).
- Santana, C. B., Souza, J. G. L., Toledo, A. G., Alves, L. F. A., Alves, D. S., Corrêa, J. M., and Pinto, F. G. S. (2021).** Antimicrobial and insecticidal effects of essential oil and plant extracts of *Myrcia oblongata* DC in pathogenic bacteria and *Alphitobius diaperinus*. *Brazilian Journal of Biology*, 82, e233425.
- Saqban, L. H., Mezher, Z. A. A., and Ali, H. I. (2022).** Cytotoxic effect of the crude alcoholic extract of the fruits of *Citrullus colocynthis* on human hepatocyte carcinoma (Hep-G2). *Archives of Razi Institute*, 77(4), 1389–1395.
- Sarheed, N. M., and Jaffat, H. S. (2022, July).** Protective effect of anise extract loaded by chitosan nanoparticles in mice treated with cisplatin. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2450, No. 1). AIP Publishing.
- Sengupta, P., Agarwal, A., Pogrebetskaya, M., Roychoudhury, S., Durairajanayagam, D., and Henkel, R. (2018).** Role of *Withania somnifera* (Ashwagandha) in the management of male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 36(3), 311–326.

- Shao, J., and Schneider, B. (2025). *Harnessing p53 for targeted cancer therapy: new advances and review. Cellular Oncology.*
- Sharma, A. K., Basu, I., and Singh, S. (2018). Efficacy and safety of ashwagandha root extract in subclinical hypothyroid patients: a double-blind, randomized placebo-controlled trial. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 24(3), 243-248.
- Sharma, P. K., Kumar, L., Goswami, Y., Pujani, M., Dikshit, M., and Tandon, R. (2023). Extraction of Bioactive Compounds From *Withania somnifera*. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1139654.
- Sharma, S., and Verma, R. (2023). Studies on quality assessment of ashwagandha root (*Withania somnifera*) powder. *ResearchGate*. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/377775749\\_Studies\\_on\\_quality\\_assessment\\_of\\_ashwagandha\\_root\\_Withania\\_somnifera\\_powder](https://www.researchgate.net/publication/377775749_Studies_on_quality_assessment_of_ashwagandha_root_Withania_somnifera_powder)
- Shehata, F. A., Hamdy, R., and Hafez, R. M. (2024). Biosystematic studies of genus *Withania* Pauquy in Egypt. *Scientific Reports*, 14, Article 21754.
- Shree, P., Mishra, P., Selvaraj, C., Singh, S. K., Chaube, R., Garg, N., and Tripathi, Y. B. (2022). Targeting COVID-19 (SARS-CoV-2) main protease through active phytochemicals of ayurvedic medicinal plants–*Withania somnifera* (Ashwagandha), *Tinospora cordifolia* (Giloy) and *Ocimum sanctum* (Tulsi)—a molecular docking study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(1), 190-203.
- Shu, Y., Zhang, Y., Wang, Y., Li, Y., and Zhang, Y. (2019). Quercetin enhances p53 expression via inhibition of MDM2 in colon cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 162, 1–11.

- Siegel, R. L., Miller, K. D., Goding Sauer, A., Fedewa, S. A., Butterly, L. F., Anderson, J. C., and Jemal, A. (2020). Colorectal cancer statistics, *CA: a cancer journal for clinicians*, 70(3), 145-164.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., and Jemal, A. (2023). Cancer statistics, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(1), 17–48.
- Sikandan, A. K., Kumar, V., Tripathi, S., et al. (2024). Anti-inflammatory effects of *Withania somnifera* leaf extracts: Suppression of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 and COX-2 via NF- $\kappa$ B pathway in human keratinocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, 315, 115064.
- Simanshu, D. K., Nissley, D. V., and McCormick, F. (2017). RAS proteins and their regulators in human disease. *Cell*, 170(1), 17-33.
- Singh, R., & Gupta, M. (2024). *DNA repair pathways in cancer development and therapy*. *Molecular Cancer*, 23(1), 19.
- Singh, R., Kaur, N., Kishore, L., and Gupta, G. K. (2021). *Withania somnifera* as a potential source of anticancer agents: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 279, 114372.
- Somasundaram, S.; Edmund, N.A.; Moore, D.T.; Small, G.W.; Shi, Y.Y.; Orłowski, R.Z. (2002) Dietary curcumin inhibits chemotherapy-induced apoptosis in models of human breast cancer. *Cancer Res.*, 62, 3868–3875 [PubMed]
- Soumya, T., Lakshmipriya, T., Klika, K. D., Jayasree, P. R., and Manish Kumar, P. R. (2021). Anticancer potential of rhizome extract and a labdane diterpenoid from *Curcuma mutabilis* plant endemic to Western Ghats of India. *Scientific reports*, 11(1), 552.
- Srivastava, S. K., Agrawal, B., Kumar, A., and Pandey, A. (2020). Phytochemicals of *Azadirachta indica* source of active medicinal

- constituent used for cure of various diseases: A Review. *Journal of Scientific Research*, 64(1), 285-290.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2020).** Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249.
- Surya Ulhas, R., and Malaviya, A. (2023).** In-silico validation of novel therapeutic activities of withaferin a using molecular docking and dynamics studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 41(11), 5045-5056.
- Talib, R., Enayah, S. H., and Ghaleb, R. A. (2023).** Gene expression of effect of combination Cassia fistula extract and cisplatin on inhibition of human colon cancer SW480 cell line. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 90(1), 1940-1949.
- Tandon, N., and Yadav, S. S. (2020).** Safety and clinical effectiveness of *Withania Somnifera* (Linn.) Dunal root in human ailments. *Journal of ethnopharmacology*, 255, 112768.
- Tewari, D., Chander, V., Dhyani, A., Sahu, S., Gupta, P., Patni, P., and Bishayee, A. (2022).** *Withania somnifera* (L.) Dunal: Phytochemistry, structure-activity relationship, and anticancer potential. *Phytomedicine*, 98, 153949.
- Thakur, B., and Ray, P. (2017).** Cisplatin triggers cancer stem cell enrichment in platinum-resistant cells through an NF- $\kappa$ B–TNF $\alpha$ –PIK3CA loop. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 36(1), 164.
- Thompson, W. J., Piazza, G. A., Li, H., Liu, L., Fetter, J., Zhu, B., and Pamukeu, R. (2000).** Exisulind induction of apoptosis involves guanosine

- 3', 5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase inhibition, protein kinase G activation, and attenuated  $\beta$ -catenin. *Cancer research*, 60(13), 3338-3342.
- Tian, L., Qian, W., Qian, Q., Zhang, W., and Cai, X. (2020).** Gingerol inhibits cisplatin-induced acute and delayed emesis in rats and minks by regulating the central and peripheral 5-HT, SP, and DA systems. *Journal of natural medicines*, 74, 353-370.
- Tie, J., Cohen, J. D., Lahouel, K., Lo, S. N., Wang, Y., Kosmider, S., Wong, R., Shapiro, J., Lee, M., Harris, S., Khattak, A., Burge, M., Harris, M., Lynam, J., Nott, L., Day, F., Hayes, T., McLachlan, S.-A., Lee, B., Ptak, J., Silliman, N., Dobbyn, L., Popoli, M., Hruban, R., Lennon, A. M., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Tomasetti, C., and Gibbs, P.; DYNAMIC Investigators. (2022).** *Circulating tumor DNA analysis guiding adjuvant therapy in stage II colon cancer*. *New England Journal of Medicine*, 386(24), 2261–2272.
- Tiwari, N., Mishra, J., Singh, N., Mishra, S. K., Trisal, M., & Verma, S. (2025).** Epigenetics and cancer stem cells—The world of cancer genesis: A review. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 21(1), 5-9.
- Tofighi, Z. (2013).** *Phytochemical investigation of Securigera securidaca (L.) Deg. & Dorf.* (Ph.D. thesis). Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
- Tofighi, Z., and Ghazi-Saeidi, N. (2016).** Determination of cardiac glycosides and total phenols in different generations of *Securigera securidaca* suspension culture. *Research Journal of Pharmacognosy*, 3(2), 25–31.
- Trease, G. E., and Evans, W. C. (2002).** *Pharmacognosy* (15th ed.). Philadelphia, PA: WB Saunders, Elsevier Science Limited.

- Tsai, M. C., Chen, C. C., Tseng, T. H., Chang, Y. C., Lin, Y. J., Tsai, I. N., and Wang, C. J. (2023).** Hibiscus anthocyanins extracts induce apoptosis by activating AMP-activated protein kinase in human colorectal cancer cells. *Nutrients*, 15(18), 3972.
- Turrens, J. F. (2023).** Role of antioxidants in health and disease prevention. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 24(1), 45–60.
- Upendra, R. S., and Ahmed, M. R. (2021).** Healthcare prominence and immune boosting activity of ashwagandha against various clinical conditions and covid 19 disease outbreak. *Int J Pharm Res*, 13(3), 489-497.
- Uthirapathy, S., and Tahir, T. F. (2021).** *Withania somnifera*: correlation of phytoconstituents with hypolipidemic and cardioprotective activities. *Aro-The Scientific Journal Of Koya University*, 9(2), 15-21.
- Vaidya, V. G., Naik, N. N., Ganu, G., Parmar, V., Jagtap, S., Saste, G., and Hingorani, L. (2024).** Clinical pharmacokinetic evaluation of *Withania somnifera* (L.) Dunal root extract in healthy human volunteers: a non-randomized, single dose study utilizing UHPLC-MS/MS analysis. *Journal of Ethnopharmacology*, 322, 117603.
- Vashi, R., Patel, B. M., and Goyal, R. K. (2021).** Keeping abreast about Ashwagandha in breast cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 269, 113759.
- Venditti, P., and Di Meo, S. (2020).** *The role of reactive oxygen species in the life cycle of the mitochondrion*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3171.
- Vidoni, C., Ferraresi, A., Secomandi, E., Vallino, L., Dhanasekaran, D. N., and Isidoro, C. (2020, November).** Epigenetic targeting of autophagy for cancer prevention and treatment by natural compounds. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 66, pp. 34-44). Academic Press.

- Villalpando-Rodriguez, G. E., & Gibson, S. B. (2021).** *Reactive oxygen species (ROS) regulates different types of cell death by acting as a rheostat. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021, 9912436.*
- Voutsadakis, I. A. (2023).** *The role of PIK3CA gene mutations in colorectal cancer and their correlation with clinical characteristics, prognosis, and treatment response. World Journal of Surgical Oncology, 21(1), Article 50.*
- Wadhwa, R., Singh, R., Gao, R., Shah, N., Widodo, N., Nakamoto, T., ... and Kaul, S. C. (2013).** Water extract of Ashwagandha leaves has anticancer activity: identification of an active component and its mechanism of action. *Plos one, 8(10), e77189.*
- Wang, L., Zhao, X., & Xu, Q. (2023).** *Apoptosis regulation genes in tumorigenesis and cancer therapy. Frontiers in Oncology, 13, 1123456.*
- Wang, X., Qiu, Y., Wang, M., Zhang, C., Zhang, T., Zhou, H., ... and Shao, R. (2020).** Endocytosis and organelle targeting of nanomedicines in cancer therapy. *International journal of nanomedicine, 9447-9467.*
- Wargo, J. A., and Grothey, A. (2024).** *Clinical manifestations, diagnosis, and staging of colorectal cancer. UpToDate.*
- Wele, P., Wu, X., and Shi, H. (2022).** Sex-dependent differences in colorectal cancer: With a focus on obesity. *Cells, 11(22), 3688.*
- Wo, J. Y., Anker, C. J., Ashman, J. B., Bhadkamkar, N. A., Bradfield, L., Chang, D. T., ... and Das, P. (2021).** Radiation therapy for rectal cancer: executive summary of an ASTRO clinical practice guideline. *Practical radiation oncology, 11(1), 13-25.*

- World Health Organization. (2023).** *Traditional, complementary and integrative medicine.* <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/traditional-complementary-and-integrative-medicine>
- World Health Organization. (2025).** Cancer fact sheet. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Xi, Y., and Xu, P. (2021).** Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Translational oncology*, 14(10), 101174.
- Xie, Y. H., Chen, Y. X., and Fang, J. Y. (2020).** Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 22.
- Xie, Y., Hu, J., Wang, R., & Li, S. (2024).** *Colorectal cancer: Genetic alterations, novel biomarkers, current therapeutic strategies and clinical trials.* *Gene*, 890, 147102. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.147102>
- Yadav, R. C., Bhujbal, S. S., and Supekar, A. (2024).** Evaluation of prebiotic potential and HPTLC analysis of *Withania somnifera* with application in improving the chemotherapy-induced GI side effects. *Journal of Natural Remedies*, 24(6), 1289–1295. <https://doi.org/10.18311/jnr/2024/35804>.
- Yasmin, R., Gogoi, S., Bora, J., Chakraborty, A., Dey, S., Ghaziri, G., ... and Singh, L. H. (2023).** Novel insight into the cellular and molecular signalling pathways on cancer preventing effects of *Hibiscus sabdariffa*: a review. *Journal of Cancer Prevention*, 28(3), 77.
- Ye, Z. L., Qiu, M. Z., Tang, T., Wang, F., Zhou, Y. X., Lei, M. J., ... and He, C. Y. (2020).** Gene mutation profiling in Chinese colorectal cancer patients and its association with clinicopathological characteristics and prognosis. *Cancer medicine*, 9(2), 745-756.
- Zaied, F. A., and Elballat, S. E. (2019).** Reduction in the Formation of Micronucleated Polychromatic Erythrocytes Induced by Cisplatin in Bone

- Marrow Cells of Rats by using Antioxidants. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. C, Physiology and Molecular Biology*, 11(2), 47-55.
- Zhang, H., Kim, H., Yuan, T., and Wadhwa, R. (2025).** *Cellular oxidative stress and sirtuins mediate regulation of ROS-induced p53-dependent apoptosis by Withania somnifera* [Preprint]. bioRxiv.
- Zhang, H., Li, X., Wang, Y., & Wang, X. (2024 B).** Dietary and lifestyle risk factors for colorectal cancer: A comprehensive review. *Cancers*, 16(8), 1530.
- Zhang, W., Yan, Y., Wu, Y., Yang, H., Zhu, P., Yan, F., ... and Su, Z. (2020).** Medicinal herbs for the treatment of anxiety: a systematic review and network meta-analysis. *Pharmacological Research*, 179, 106204.
- Zhou, G., Gu, Y., Zhu, Z., Zhang, H., Liu, W., Xu, B., ... and Ding, J. (2022).** Exosome mediated cytosolic cisplatin delivery through clathrin-independent endocytosis and enhanced anti-cancer effect via avoiding endosome trapping in cisplatin-resistant ovarian cancer. *Frontiers in medicine*, 9, 810761.
- Zhuang, Y., Wang, H., Jiang, D., Li, Y., Feng, L., Tian, C., ... and Liu, P. (2021).** Multi gene mutation signatures in colorectal cancer patients: predict for the diagnosis, pathological classification, staging and prognosis. *BMC cancer*, 21, 1-16.

الملحق

**Appendix**

## ملحق I

جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة / شعبة الدراسات العليا / شعبة شؤون الدراسات العليا

طالبة الدكتوراه - زينب عبد الأمير مرهر احمد

نات الإنبعا

الاسم العلمي / *Withania somnifera*

اسم العائلة الباذنجانية / Solanaceae




د. جواد كظم علي

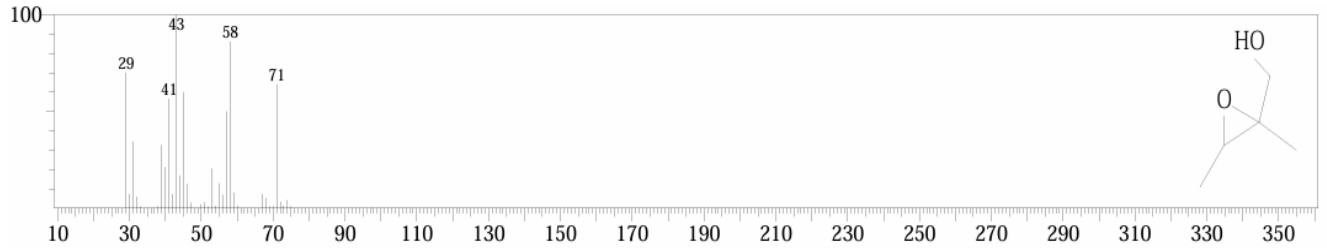
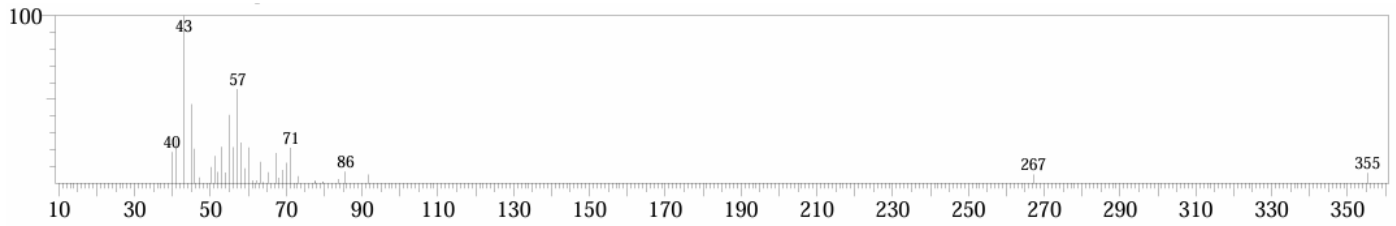
كلية الزراعة / قسم المحاصيل الحقلية

## ملحق II

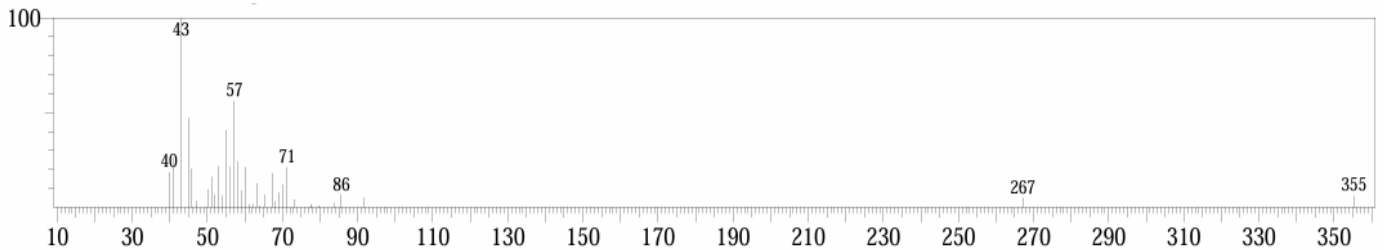
Table (1) Peak Report TIC

Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	2.076	2.025	2.142	325939	3.47	76222	1.90	4.20	MI	
2	2.599	2.542	2.658	8221012	87.52	3646336	91.05	2.25	MI	
3	2.865	2.808	2.900	224284	2.39	68660	1.71	3.25	MI	
4	2.949	2.917	2.975	116632	1.24	61641	1.54	1.89	MI	
5	3.050	3.025	3.083	33342	0.35	18515	0.46	1.81	MI	
6	13.214	13.133	13.325	167398	1.78	34687	0.87	4.82	MI	
7	13.723	13.683	13.767	53196	0.57	29622	0.74	1.80	MI	
8	19.266	19.208	19.325	117563	1.25	45493	1.14	2.56	MI	
9	21.090	21.000	21.208	133416	1.42	23392	0.58	5.66	MI	
				9392782		100.00	4004568	100.00		

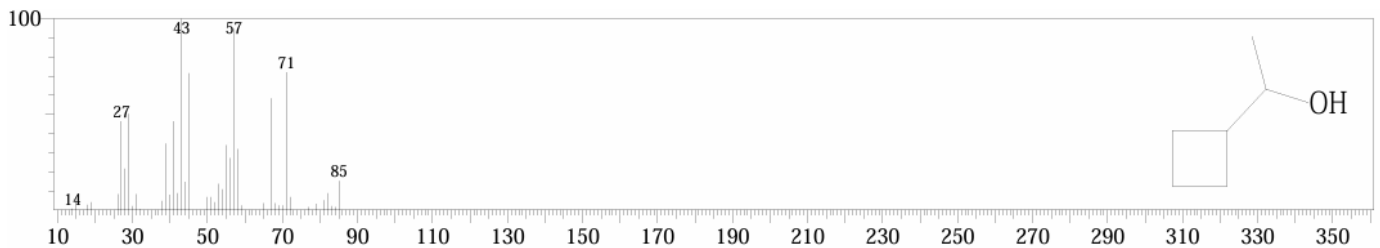
## المجموعة الاولى



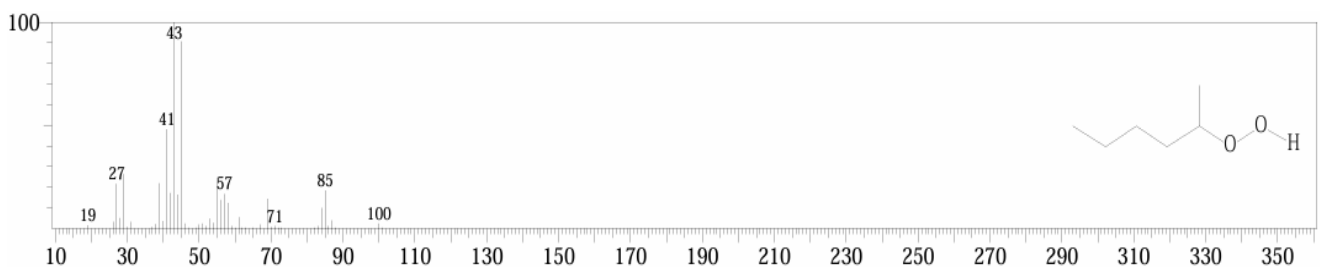
شكل (1) يبين المجاميع الفعالة للمركبات (2,3) Dimethyloxiranyl) methanol لمستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC .



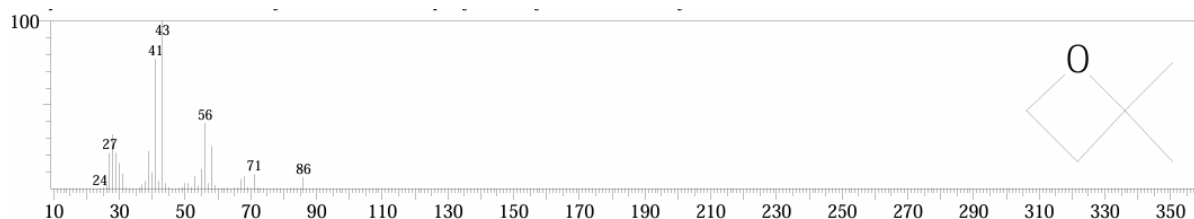
شكل (2) يبين المجاميع الفعالة للمركبات 1-Cyclobutylethanol و alpha.-methyl Cyclobutane methanol لمستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC .



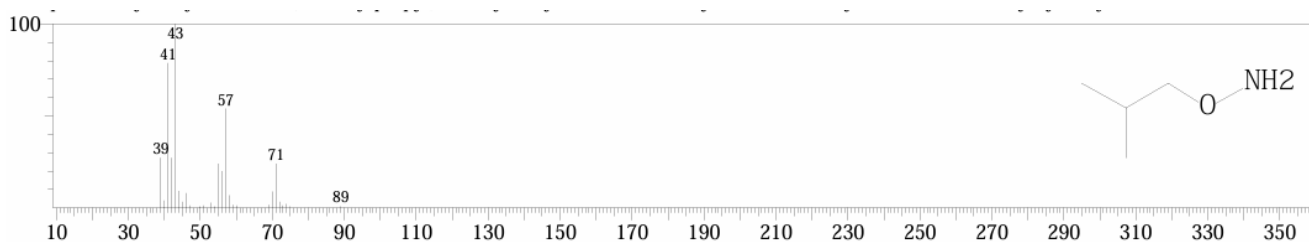
شكل (3) يبين المجاميع الفعالة للمركبات 1-methylpentyl Hydroperoxide و 2-Hexyl hydroperoxide و 1-methylpentyl Hydroperoxide و 2-Hydroperox n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>CH(CH<sub>3</sub>)OOH و Methylpentyl hydroperoxide لمستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC .



شكل ( 4 ) يبين المجاميع الفعالة للمركبات Oxetane, 2,2-dimethyl- \$\$\$ Butane, 1,3-epoxy-3-methyl- \$\$\$ 2,2- Dimethyloxetane \$\$\$ لمستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC .



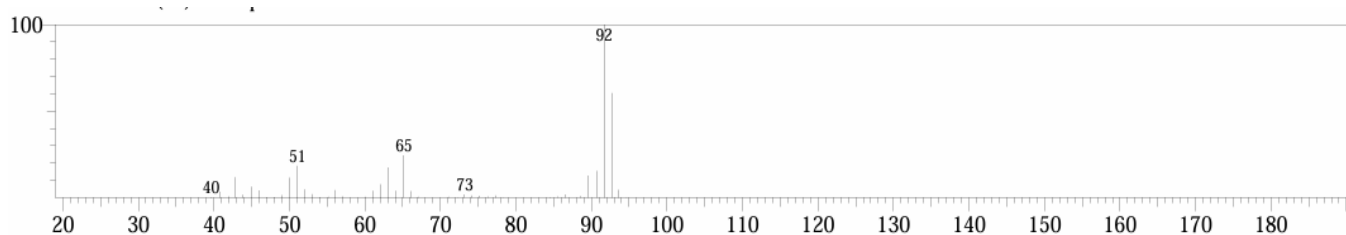
شكل ( 5 ) يبين المجاميع الفعالة للمركبات Hydroxylamine, O-(2-methylpropyl)- \$\$\$ Hydroxylamine, O-isobutyl- \$\$\$ iso-Butoxyamine \$\$\$ O-Isobutylhydroxylamine \$\$\$ لمستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC .



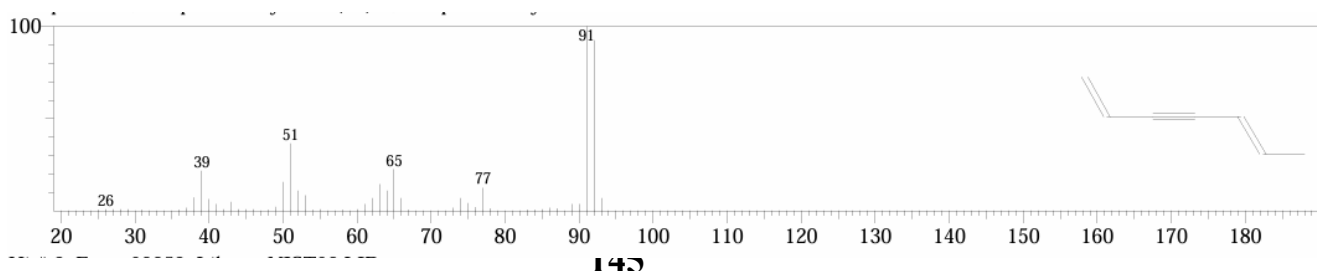
<< Target >>

Line#:2 R.Time :2.600(Scan#:73) MassPeaks:45 RawMode: Averaged 2.542-2.658(66-80)

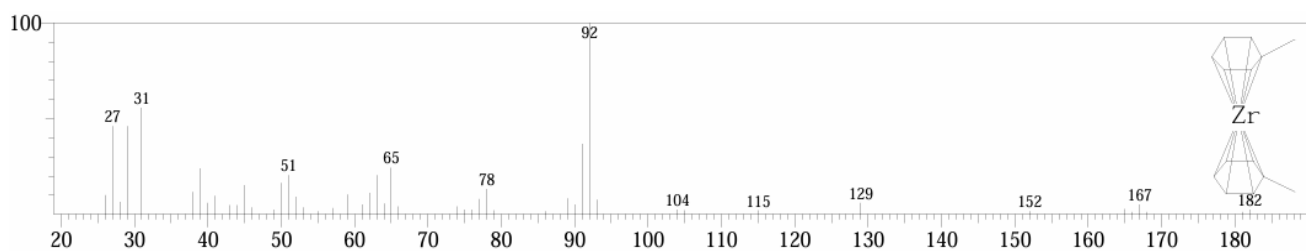
BasePeak:91.65(261531) BG Mode:2.633(77) Group 1 - Event 1



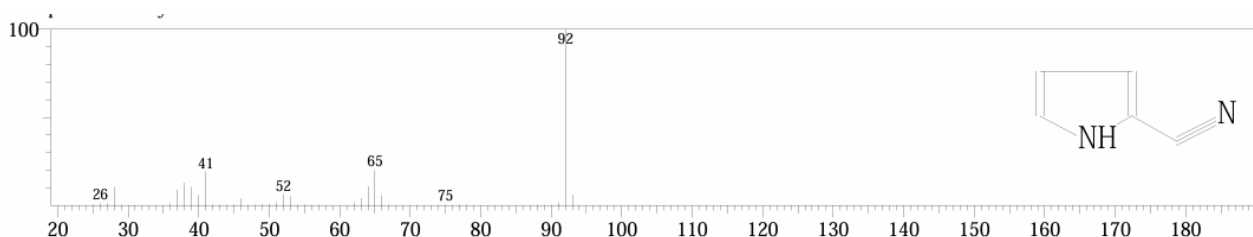
شكل ( 6 ) يبين المجاميع الفعالة للمركبات 1,5-Heptadien-3-yne \$\$\$ (5E)-1,5-Heptadien-3-yne # \$\$\$ لمستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC .



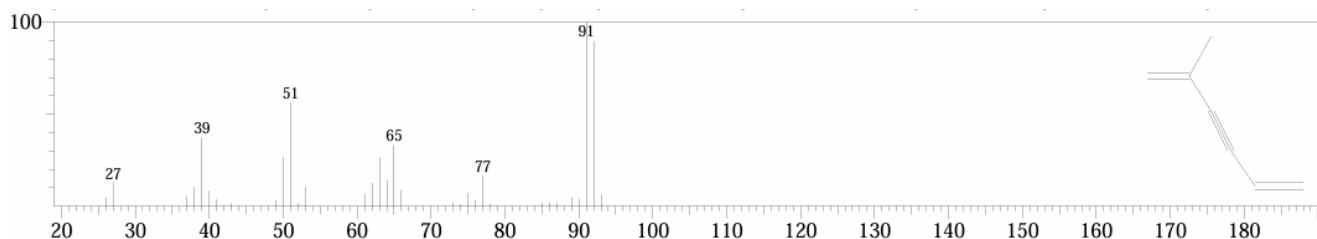
شكل (7) يبين المجاميع الفعالة للمركبات-Zirconium, bis(.eta.6-methylbenzene)- : لمستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC



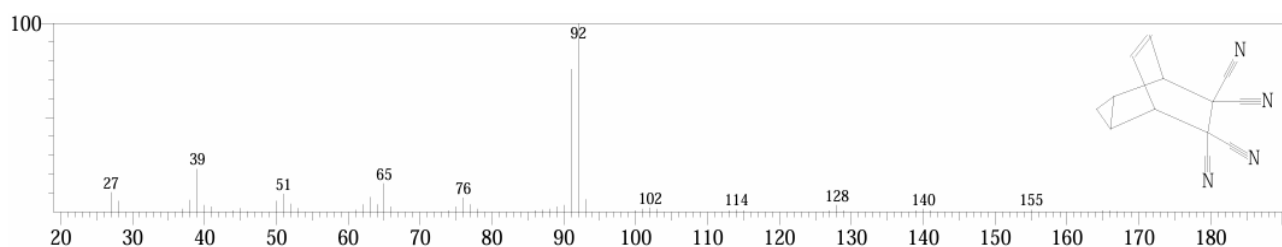
ملحق (8) يبين المجاميع الفعالة للمركبات 1H-Pyrrole-2-carbonitrile لمستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC



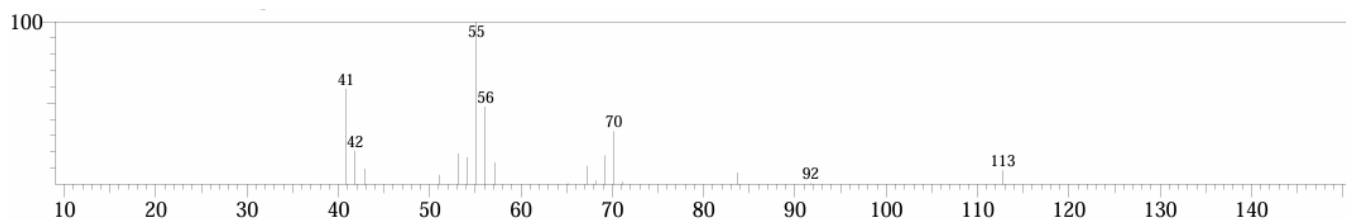
شكل (9) يبين المجاميع الفعالة للمركبات -Methyl divinyl acetylene- 1,5-Hexadien-3-yne, 2-methyl- \$\$\$\$ Methyl-1,5-hexadiene-3-yne \$\$\$\$ 2-Methyl-1,5-hexadien-3-yne # \$\$\$\$ لمستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC



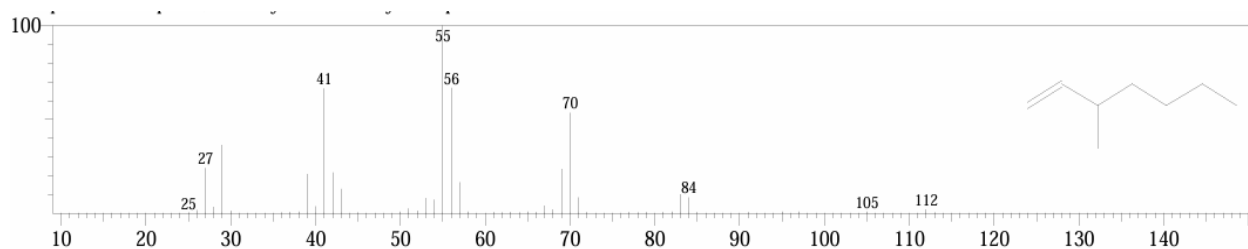
شكل (10) يبين المجاميع الفعالة للمركبات -Tricyclo[3.2.2.0(2,4)]non-8-ene-6,6,7,7-tetracarbonitrile- لمستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC



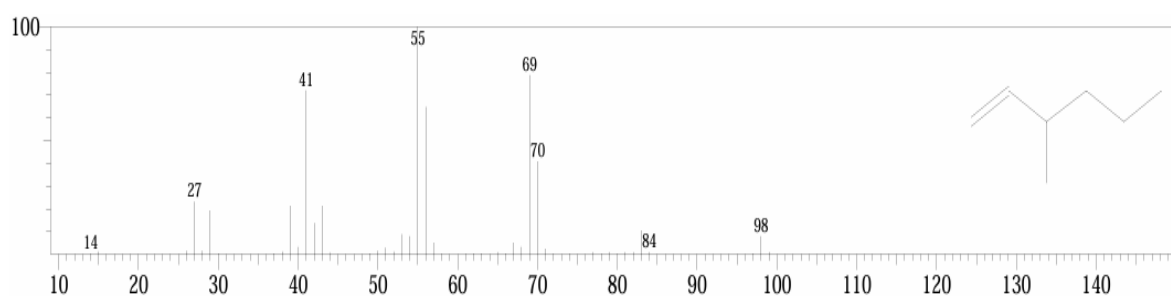
شكل (11) يبين المجاميع الفعالة للمركبات 1-Heptene, C8H16 CAS:4810-09-7 MolWeight:112 RefIndex:742 3-Methyl-1-heptene \$\$\$\$ 3-methyl-1-heptene \$\$\$\$ لمستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC



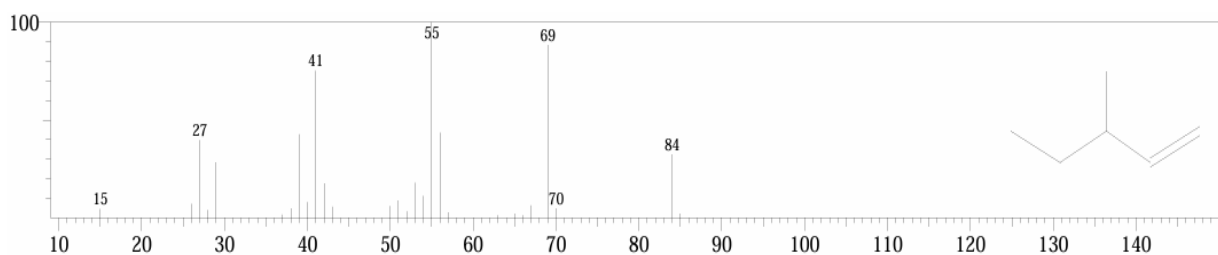
شكل (12) يبين المجاميع الفعالة للمركبات 1-Heptene, CAS:4810-09-7 MolWeight:112 RetIndex:742 - C<sub>8</sub>H<sub>16</sub> PHLC استخدام طريقة 3-methyl- \$\$\$\$ 3-Methyl-1-heptene \$\$\$\$ لمستخلص جذور نبات الشواغندا



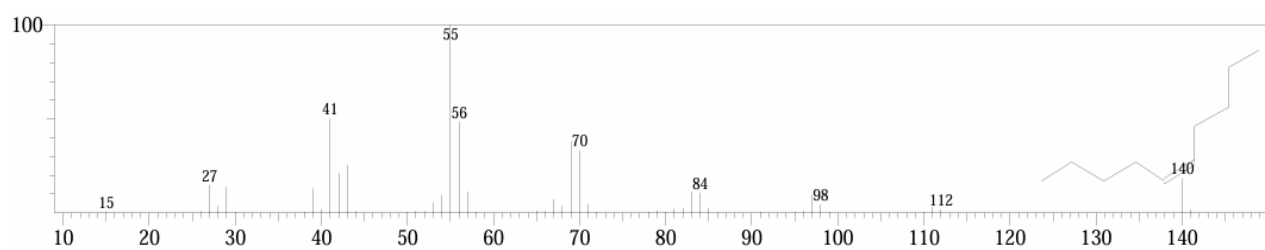
شكل (13) يبين المجاميع الفعالة للمركبات 1-Hexene, 3-methyl- \$\$\$\$ 3Methyl-1-hexene \$\$\$\$ لمستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC



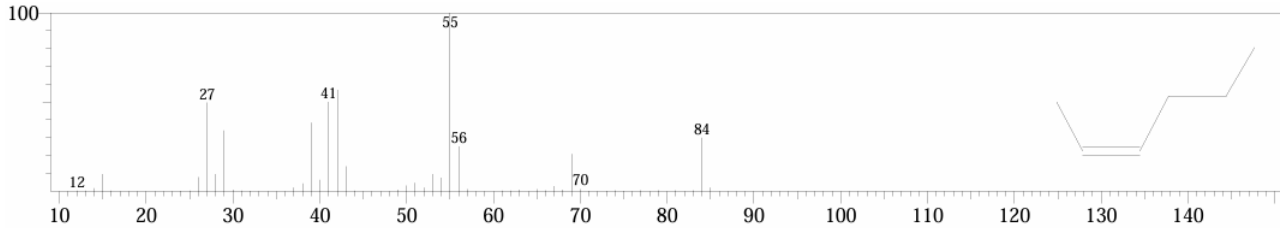
شكل (14) يبين المجاميع الفعالة للمركبات 1-Pentene, 3-methyl- \$\$\$\$ 3-Methyl-1-pentene \$\$\$\$ لمستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH=CH<sub>2</sub> \$\$\$\$ 3-Methyl-1-pentene prosnth \$\$\$\$ sec-Butylethene \$\$\$\$



شكل (15) يبين المجاميع الفعالة للمركبات (Z)-5-Decene \$\$\$\$ (Z)-5-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub> \$\$\$\$ cis-5-Decene \$\$\$\$ 5-Decene, (Z)- \$\$\$\$ لمستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC (5Z)-5-Decene # \$\$\$\$



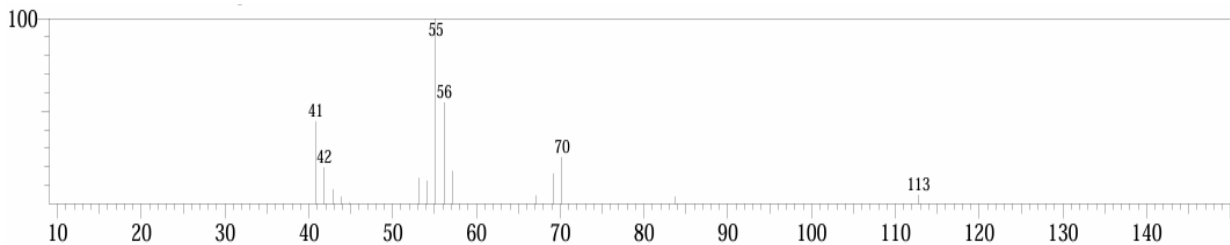
شكل ( 16 ) يبين المجاميع الفعالة للمركبات 2-Hexene, (Z)- 2-Hexene (Z)-2-C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> لمستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC



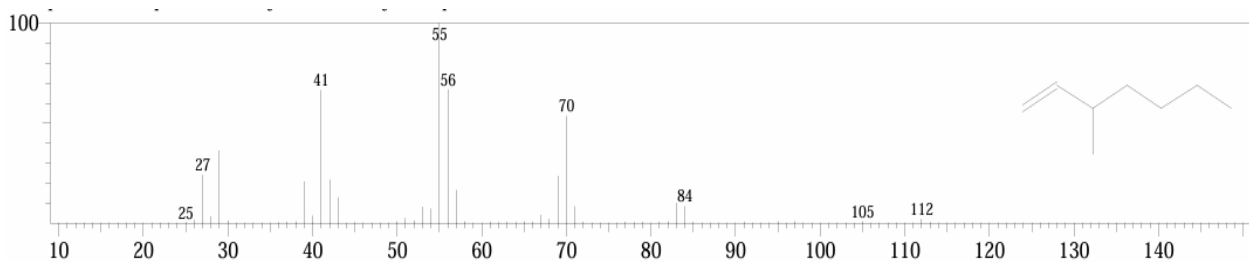
<< Target >>

Line#:4 R.Time:2.950(Scan#:115) MassPeaks:15 RawMode: Averaged 2.917-2.975(111-118)

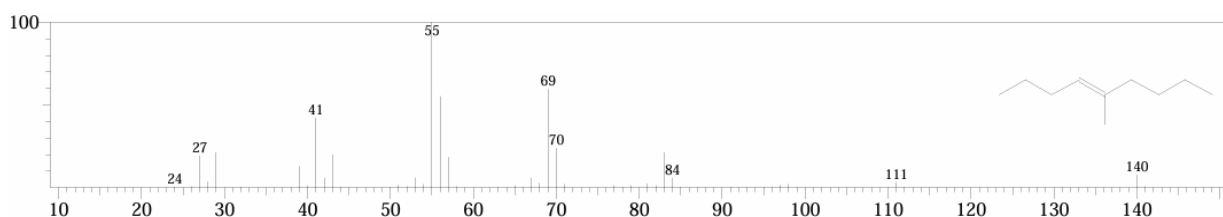
BasePeak:55.15(10729) BG Mode:2.983(119) Group 1 - Event 1



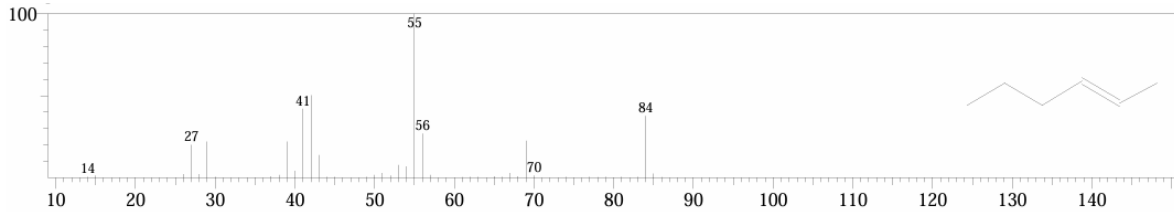
شكل ( 17 ) يبين المجاميع الفعالة للمركبات 1-Heptene, 3-methyl- 3-Methyl-1-heptene لمستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC



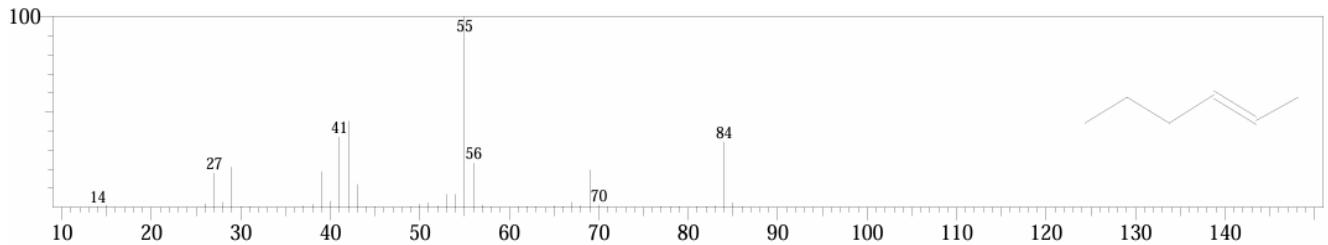
شكل ( 18 ) يبين المجاميع الفعالة للمركبات 4-Nonene, 5-methyl- 5-Methyl-4-nonene (4E)-5-Methyl-4-nonene لمستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC



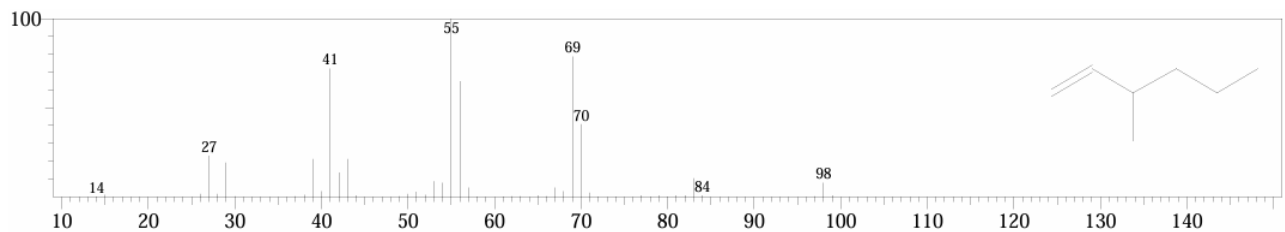
شكل (19) يبين المجاميع الفعالة للمركبات 2-Hexene cis + trans Hexene-(2) 2-Hexene,c&t 2-Hexene PHLC استخدام طريقة  
 2-Hexene (c,t) # (2E)-2-Hexene لمستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة



شكل (20) يبين المجاميع الفعالة للمركبات trans-2-Hexene (E)-2-C6H12 (E)-2-Hexene PHLC استخدام طريقة  
 2-Hexene, (E)- # (2E)-2-Hexene لمستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة



شكل (21) يبين المجاميع الفعالة للمركبات 3-Methyl-1-hexene 1-Hexene, 3-methyl- PHLC استخدام طريقة  
 الشواغندا استخدام طريقة

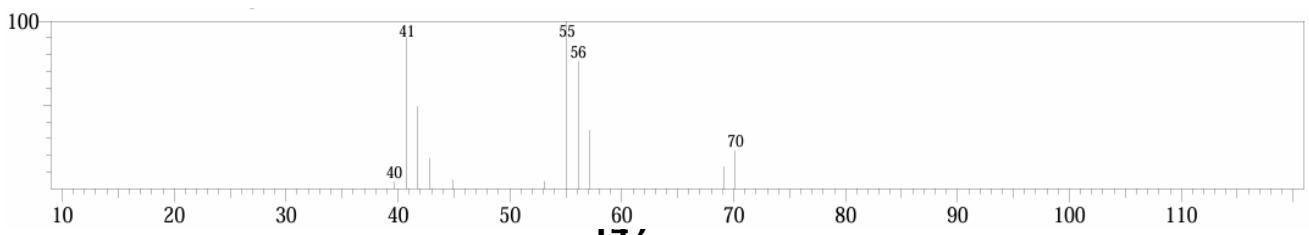


<< Target >>

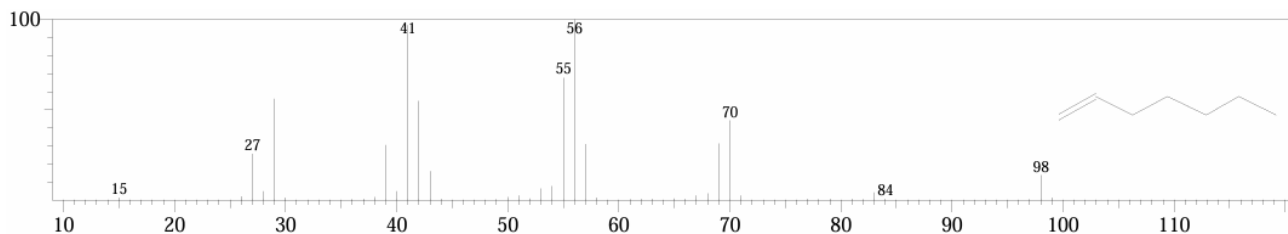
Line#:5 R.Time:3.050(Scan#:127) MassPeaks:11

RawMode: Averaged 3.017-3.083(123-131) BasePeak:55.10(2605) BG Mode:3.092(132) Group

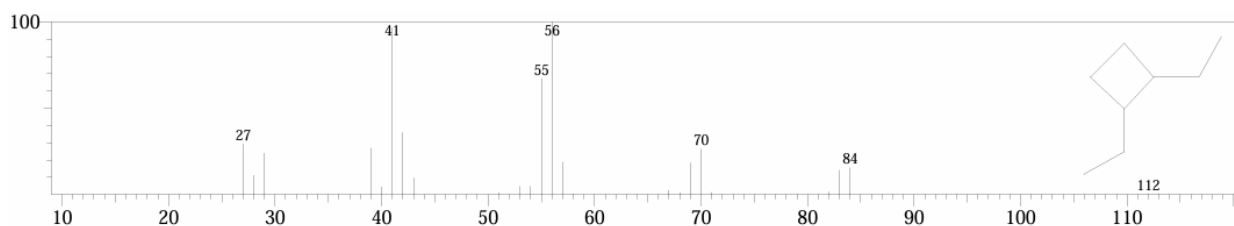
1 - Event 1



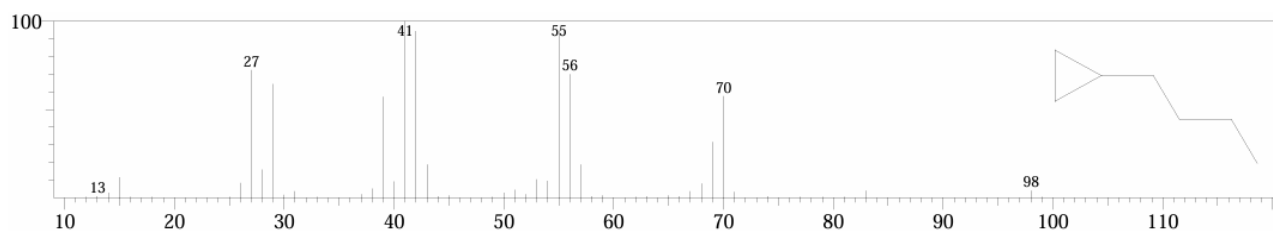
شكل ( 22 ) يبين المجاميع الفعالة للمركبات .alpha.- 1-n-Heptene  $C_7H_{14}$  .  
 Heptylene  $C_7H_{14}$  المستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC



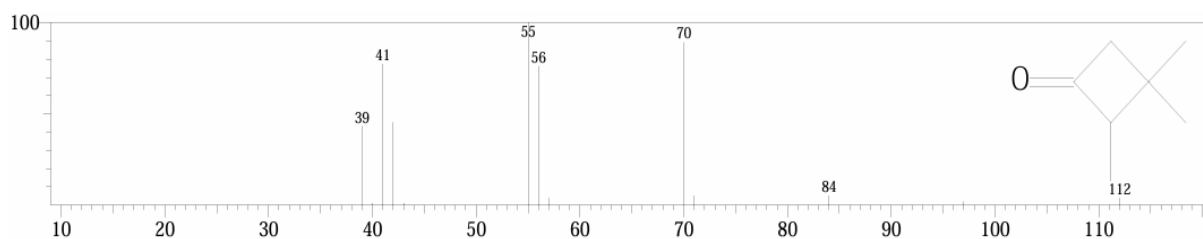
شكل ( 23 ) يبين المجاميع الفعالة للمركبات 1,2-Diethylcyclobutane #  
 لمستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC



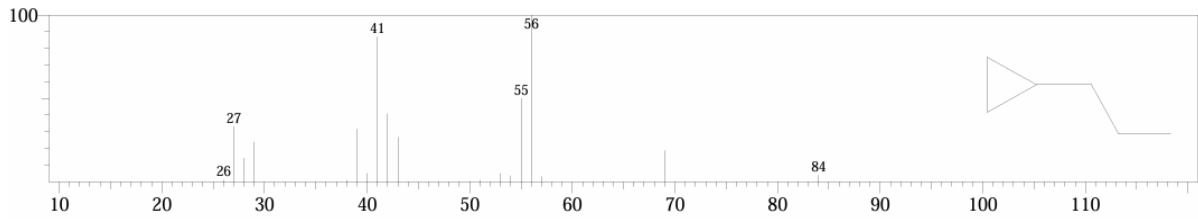
شكل ( 24 ) يبين المجاميع الفعالة للمركبات Butane, 1-cyclopropyl-  
 Butylcyclopropane المستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC



شكل (25) يبين المجاميع الفعالة 2,3,3-Trimethylcyclobutanone #  
 للمركبات المستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC

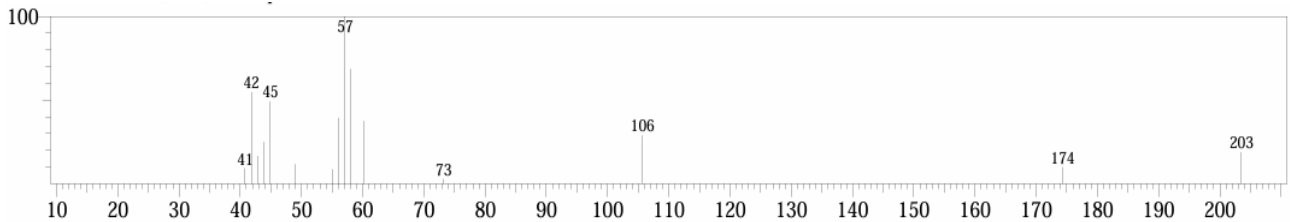


شكل ( 26 ) يبين المجاميع الفعالة للمركبات Cyclopropane, propyl- Propane, 1-cyclopropyl- Propylcyclopropane المستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC

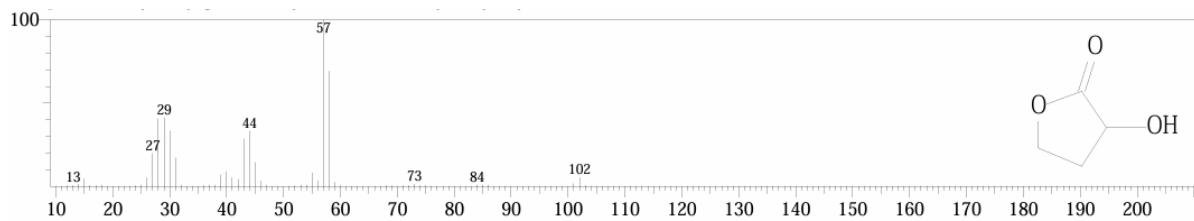


<< Target >>

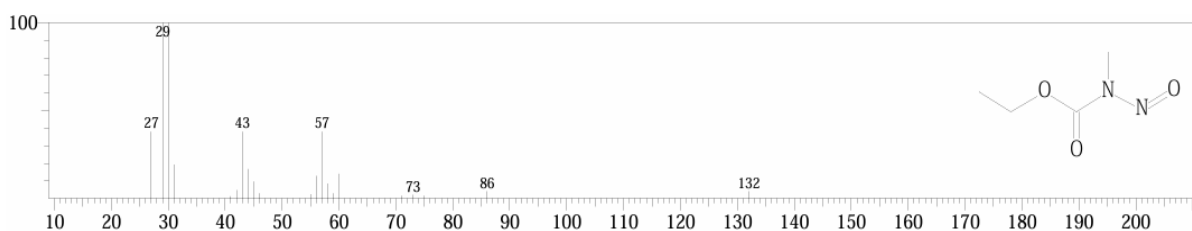
Line#:6 R.Time:13.217(Scan#:1347) MassPeaks:15 RawMode:Averaged 13.117-13.325(1335-1360) BasePeak:57.10(1462) BG Mode:13.308(1358) Group 1 - Event 1



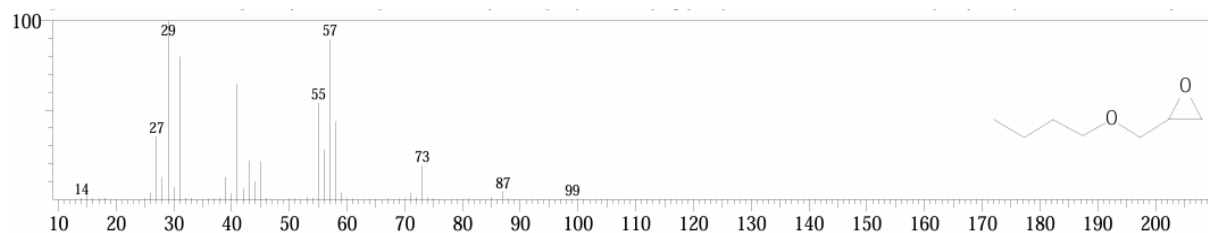
شكل ( 27 ) يبين المجاميع الفعالة للمركبات 2-Hydroxy-gamma-butyrolactone 3-Hydroxydihydro-2(3H) المستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC



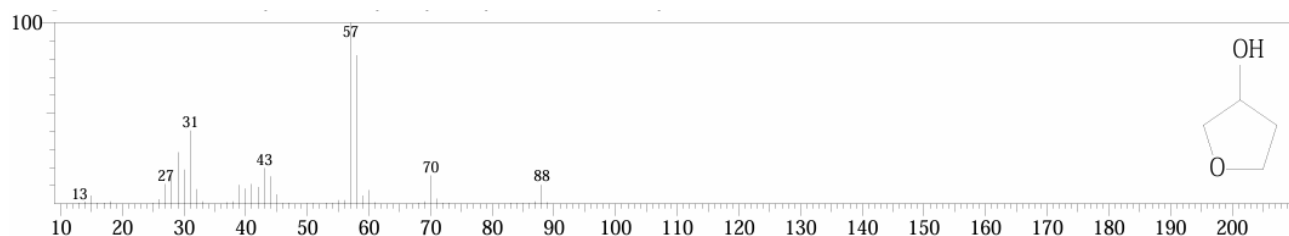
ملحق ( ) يبين المجاميع الفعالة للمركبات Carbamic acid, methylnitroso-, ethyl ester Ethyl N-methylnitrosocarbamate Methylnitrosocarbamate Methylnitrosourethane Methylnitrosourethane المستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC



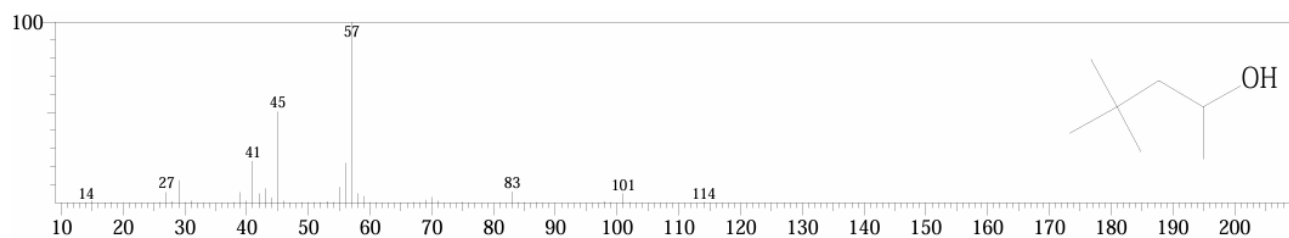
شكل ( 28 ) يبين المجاميع الفعالة للمركبات Oxirane, (butoxymethyl)- Propane, 1-butoxy-2,3-epoxy- Butyl glycidyl ether Erl 0810 Glycidyl butyl ether 1-Butoxy-2,3- PHLC طريقة استخدام



شكل ( 29 ) يبين المجاميع الفعالة للمركبات 3-Furanol, tetrahydro- 3-Hydroxytetrahydrofuran Tetrahydro- 3-furanol لمستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC

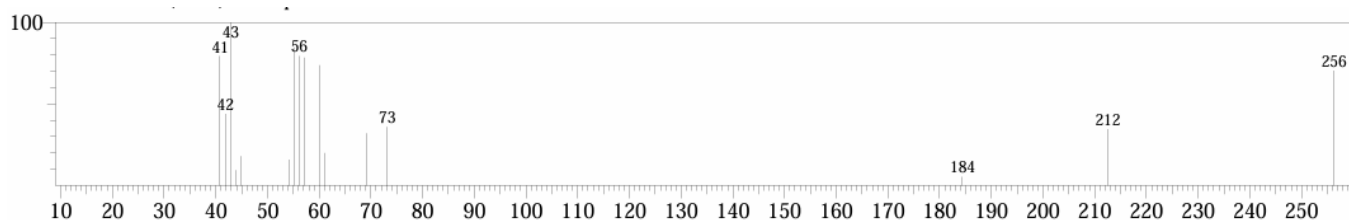


شكل ( 30 ) يبين المجاميع الفعالة للمركبات 2-Pentanol, 4,4-dimethyl- Methylneopentylcarbinol 4,4- Dimethyl-2-pentan لمستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC

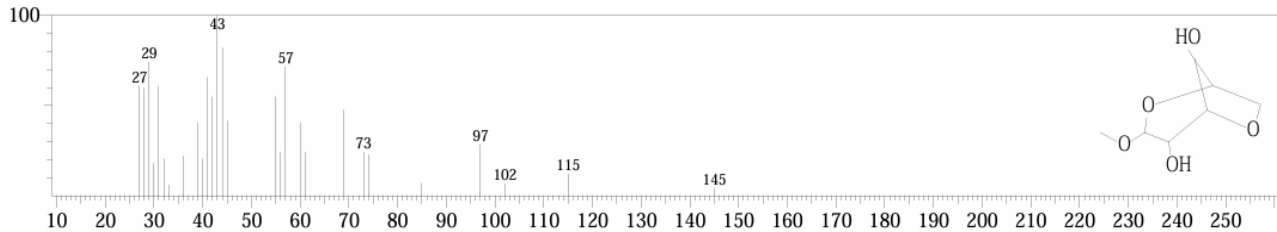


<< Target >>

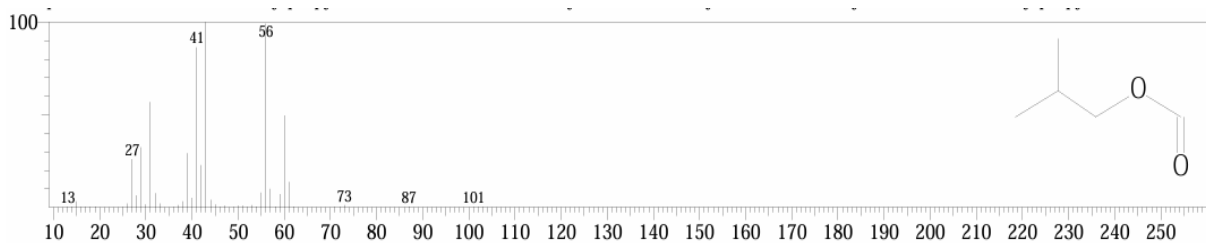
Line#:7 R.Time:19.267(Scan#:2073) MassPeaks:16 RawMode: Averged 19.208-19.325(2066-2080) BasePeak:42.85(1314) BG Mode:19.333(2081) Group 1 - Event 1



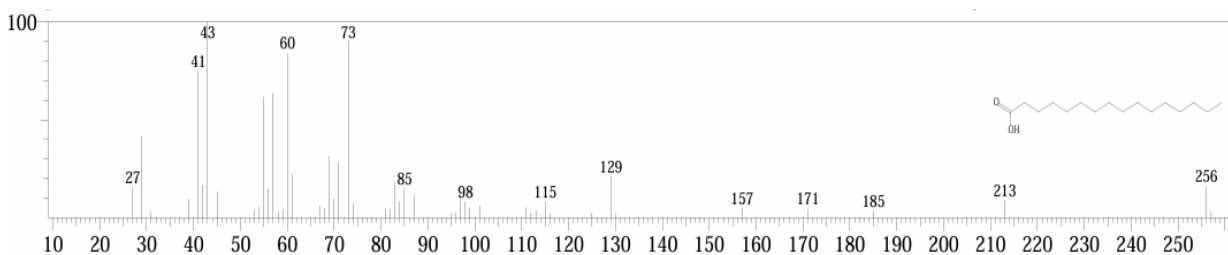
شكل (31) يبين المجاميع الفعالة للمركبات  $\alpha$ -D-Mannopyranoside, methyl 3,6-anhydro- Mannopyranoside, methyl 3,6-anhydro-,  $\alpha$ -D- Methyl 3,6-anhydrohexopyra الشواغندا استخدام طريقة PHLC



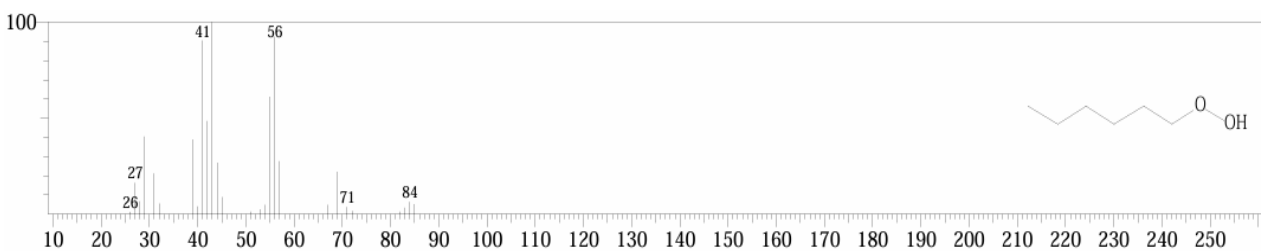
شكل (32) يبين المجاميع الفعالة للمركبات Formic acid, 2-methylpropyl ester Formic acid, isobutyl ester Isobutyl formate Tetryl formate 2-Methylpropyl formate Iso استخدام طريقة PHLC



شكل (33) يبين المجاميع الفعالة للمركبات n-Hexadecanoic acid Hexadecanoic acid n-Hexadecoic acid Palmitic acid Pentadecanecarboxylic acid 1-Pentadecanecarb استخدام طريقة PHLC

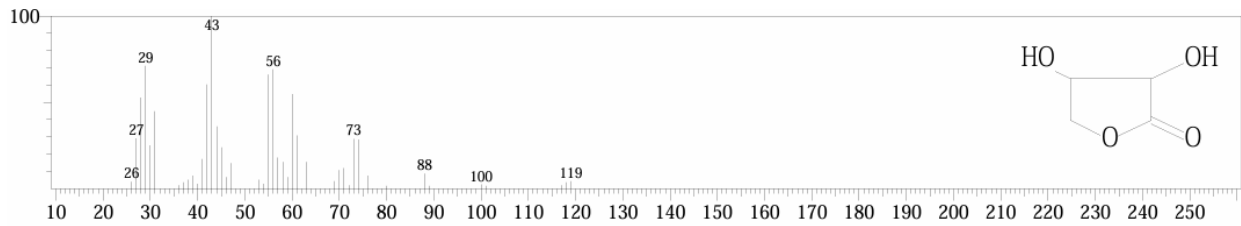


شكل (34) يبين المجاميع الفعالة للمركبات Hexyl hydroperoxide n-C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>OOH 1-Hydroperoxyhexane الشواغندا استخدام طريقة PHLC

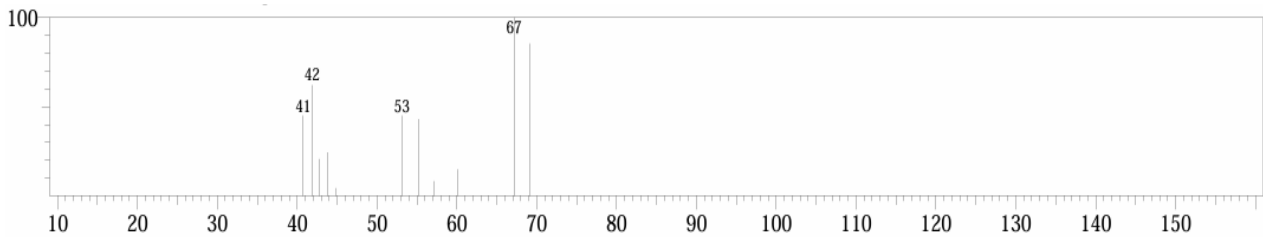


شكل (35) يبين المجاميع الفعالة للمركبات 2-Furanone, 3,4-dihydroxytetrahydro الشواغندا استخدام

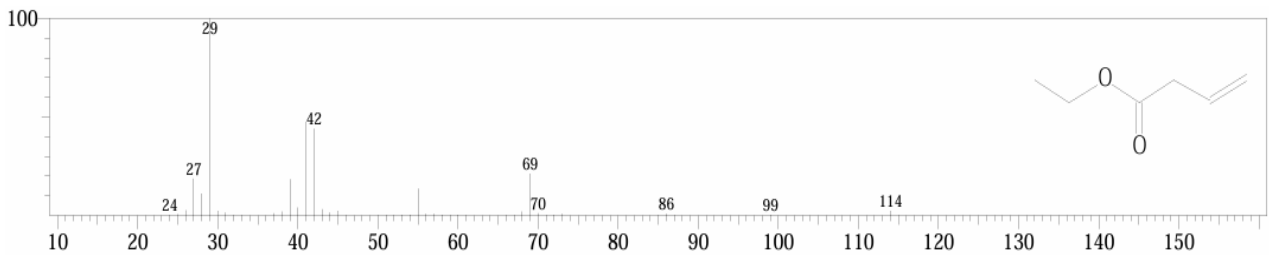
## طريقة PHLC



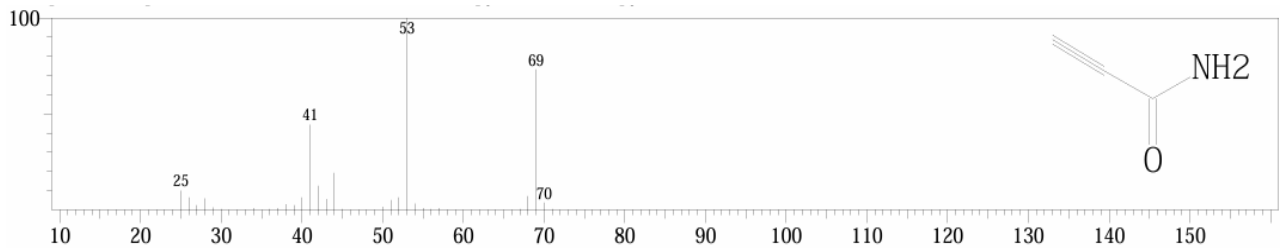
<< Target >> Line#:8 R.Time:21.092(Scan#:2292) MassPeaks:11 RawMode:Averaged 20.992-21.217(2280-2307) BasePeak:67.15(822) BG Mode:21.225(2308) Group 1 - Event 1



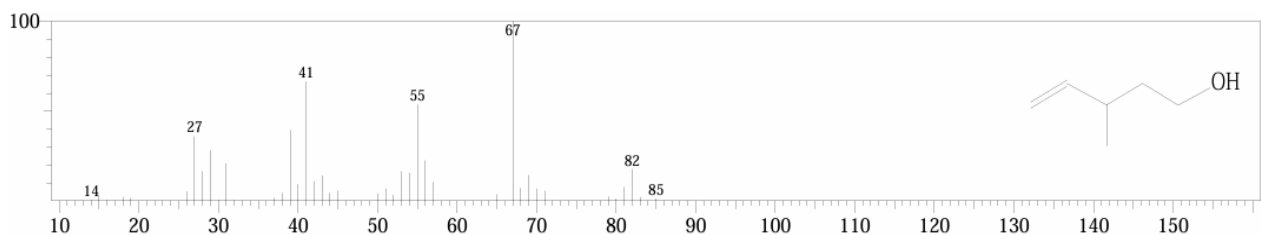
114 RetIndex:775 CompName:3-Butenoic acid, ethyl ester \$\$ Ethyl 3-butenoate \$\$  
 شكل ( 36 ) يبين المجاميع الفعالة للمركبات PHLC  
 مستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC



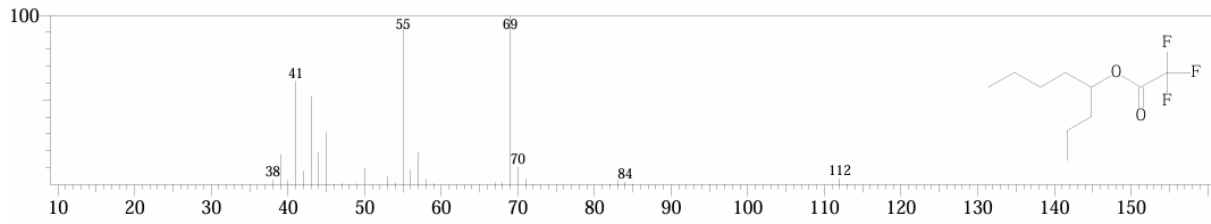
Propiolamide \$\$ HC\$.CCONH2 \$\$ 2-Propynamide \$\$ Propynamide  
 شكل ( 37 ) يبين المجاميع الفعالة للمركبات PHLC  
 مستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC



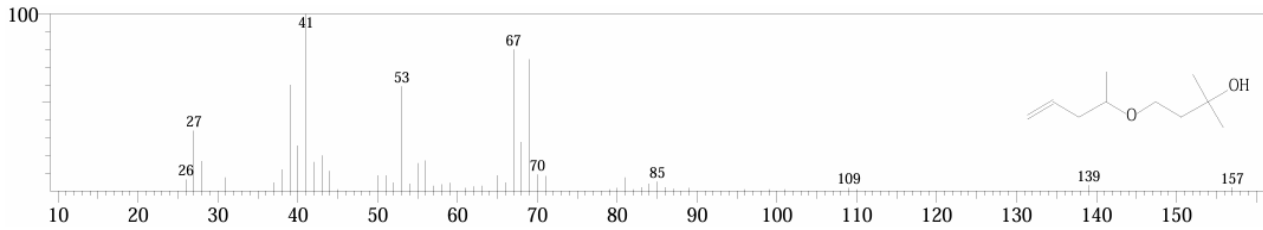
4-Penten-1-ol, 3-methyl- \$\$ 3-Methyl-4-penten-1-ol \$\$  
 شكل ( 38 ) يبين المجاميع الفعالة للمركبات PHLC  
 نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC



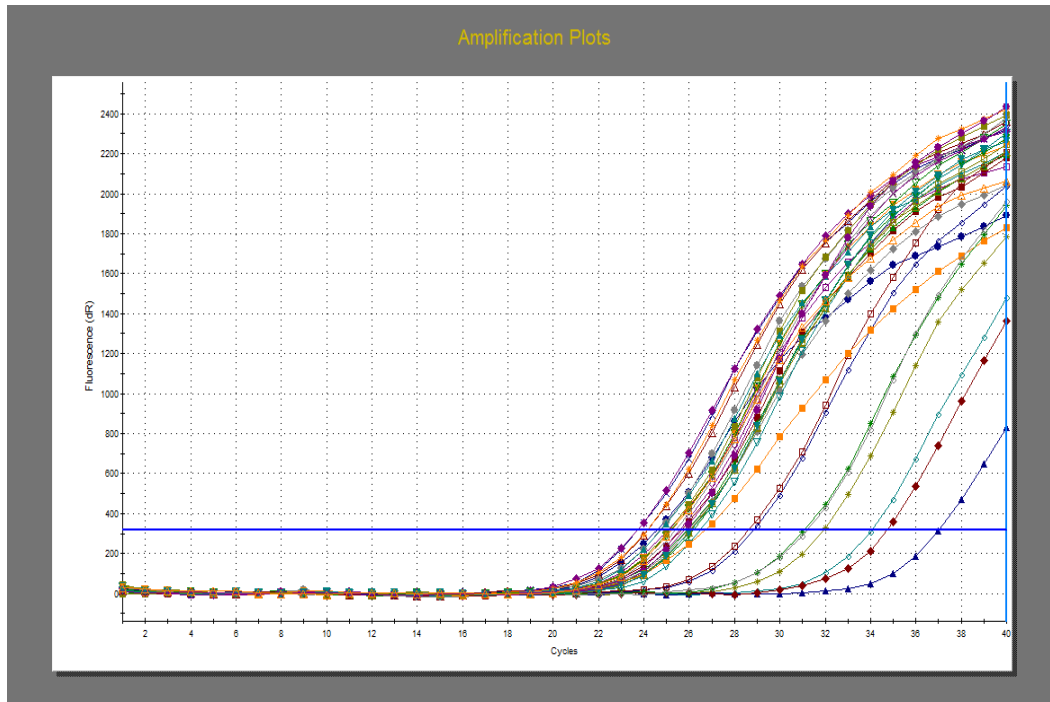
شكل (39) يبين المجاميع الفعالة للمركبات # 1-Propylpentyl trifluoroacetate 4-Trifluoroacetoxystane  
 \$\$\$ لمستخلص جذور نبات الشواغندا استخدام طريقة PHLC



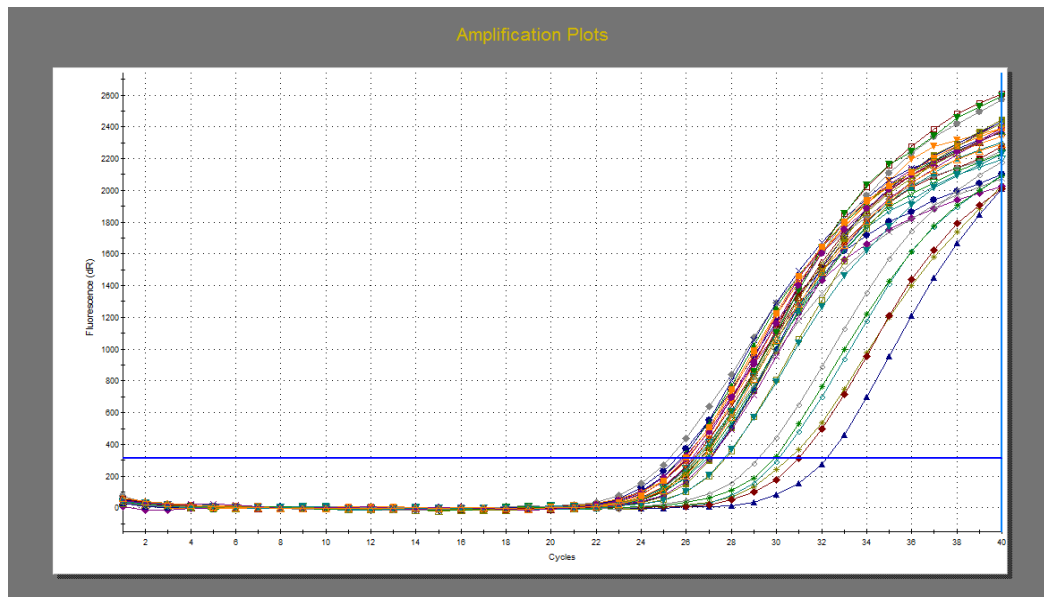
شكل (40) يبين المجاميع الفعالة للمركبات 1-Methyl-3-butenyl 3-methyl-3-hydroxybutyl ether لمستخلص جذور نبات  
 الشواغندا استخدام طريقة PHLC



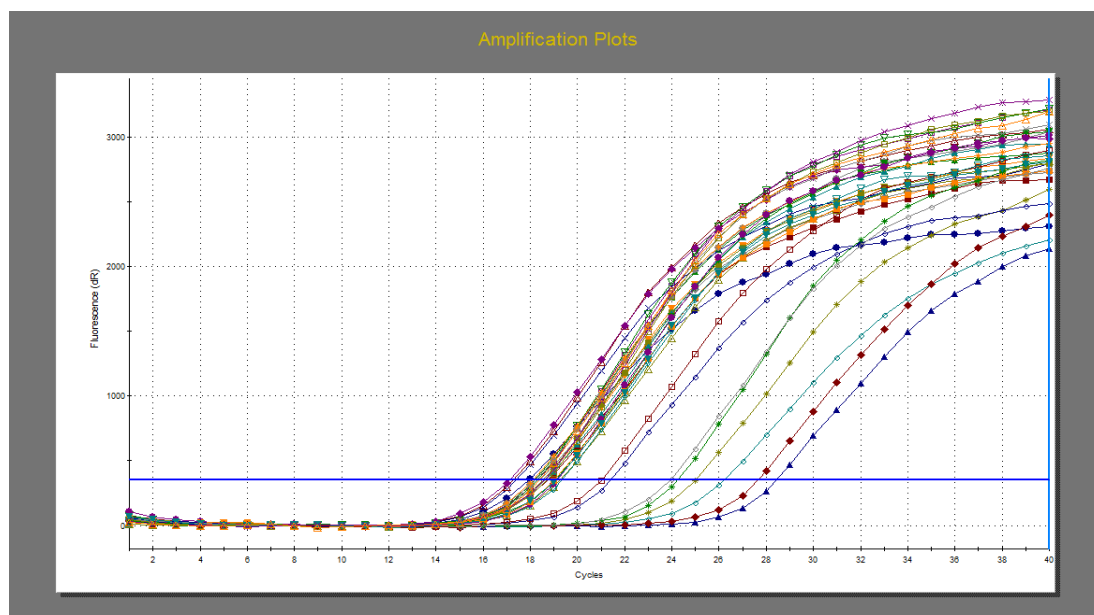
### ملحق III



الشكل ( 41 ) : منحنى تضخيم qRT-PCR لتقدير التعبير الجيني لجين P53 في خلايا سرطان القولون SW480 بواسطة نظام Mx3005P Stratagene



الشكل ( 42 ) : منحنى تضخيم qRT-PCR لتقدير التعبير الجيني لجين PIK3CA في خلايا سرطان القولون SW480 بواسطة نظام Mx3005P Stratagene



الشكل ( 43 ) : منحنى تضخيم qRT-PCR لتقدير التعبير الجيني لجين GAPDH في خلايا سرطان القولون SW480 بواسطة نظام Mx3005P Stratagene

### ملحق III

#### قيم التعبير الجيني

جدول رقم (2) تأثير عقار السيسبلاتين Cisplatin على قيمة التعبير الجيني لجين P53 لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد 48 ساعة من التعريض ومقارنة مع جين السيطرة GAPDH

#### Descriptive analysis

	Control	Cisplatin 15.6 µg/ml	Cisplatin 62.5 µg/ml	Cisplatin 250 µg/ml
Minimum	1.000	95.67	296.1	218.3
25% Percentile	1.000	95.67	296.1	218.3
Median	1.000	96.34	299.2	227.7
75% Percentile	1.000	97.01	302.3	237.2
Maximum	1.000	97.01	302.3	237.2
Range	0.000	1.336	6.222	18.93
Mean	1.000	96.34	299.2	227.7
Std. Deviation	0.000	0.9443	4.400	13.39
Std. Error of Mean	0.000	0.6678	3.111	9.466

جدول رقم (3) تأثير المستخلص المائي لجذور النبات الاشواغندا على قيمة التعبير الجيني لجين P53 لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة ومقارنة مع جين السيطرة GAPDH

## Descriptive analysis

	Control	Aqueous extract 31.25 µg/ml	Aqueous extract 250 µg/ml	Aqueous extract 1000 µg/ml
Minimum	1.000	97.68	34.78	76.11
25% Percentile	1.000	97.68	34.78	76.11
Median	1.000	98.36	37.50	77.73
75% Percentile	1.000	99.04	40.22	79.34
Maximum	1.000	99.04	40.22	79.34
Range	0.000	1.364	5.449	3.232
Mean	1.000	98.36	37.50	77.73
Std. Deviation	0.000	0.9642	3.853	2.285
Std. Error of Mean	0.000	0.6818	2.724	1.616

جدول رقم (4) تأثير المستخلص الكحولي لجذور النبات الاشواغندا على قيمة التعبير الجيني لجين P53 لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة ومقارنة مع الجين السيطرة GAPDH

## Descriptive analysis

	Control	Alcoholic extract 31.25 µg/ml	Alcoholic extract 250 µg/ml	Alcoholic extract 1000 µg/ml
Minimum	1.000	51.27	32.00	129.8
25% Percentile	1.000	51.27	32.00	129.8
Median	1.000	55.08	33.39	130.7
75% Percentile	1.000	58.89	34.78	131.6
Maximum	1.000	58.89	34.78	131.6
Range	0.000	7.624	2.776	1.812
Mean	1.000	55.08	33.39	130.7
Std. Deviation	0.000	5.391	1.963	1.281
Std. Error of Mean	0.000	3.812	1.388	0.9059

جدول رقم (5) تأثير المستخلص المائي لجذور النبات الاشواغندا مع عقار السيسبلاتين Cisplatin على قيمة التعبير الجيني لجين P53 ومقارنة مع جين السيطرة GAPDH

## Descriptive analysis

	Control	Cisplatin + Aqueose extract 62.5 µg/ml	Cisplatin + Aqueose extract 250 µg/ml	Cisplatin + Aqueose extract 1000 µg/ml
Minimum	1.000	125.4	199.5	146.0
25% Percentile	1.000	125.4	199.5	146.0
Median	1.000	125.8	200.9	146.5
75% Percentile	1.000	126.2	202.3	147.0
Maximum	1.000	126.2	202.3	147.0
Range	0.000	0.8720	2.784	1.016
Mean	1.000	125.8	200.9	146.5
Std. Deviation	0.000	0.6166	1.969	0.7182
Std. Error of Mean	0.000	0.4360	1.392	0.5078

جدول رقم (6) تأثير المستخلص الكحولي لجذور النبات الاشواغندا مع عقار السيسبلاتين Cisplatin على قيمة التعبير الجيني لجين P53 مقارنه مع جين السيطرة GAPDH

## Descriptive analysis

	Control	Cisplatin + Alcoholic extract 62.5 µg/ml	Cisplatin + Alcoholic extract 250 µg/ml	Cisplatin + Alcoholic extract 1000 µg/ml
Minimum	1.000	122.8	315.2	237.2
25% Percentile	1.000	122.8	315.2	237.2
Median	1.000	123.6	319.6	279.5
75% Percentile	1.000	124.5	324.0	321.8
Maximum	1.000	124.5	324.0	321.8
Range	0.000	1.714	8.861	84.59
Mean	1.000	123.6	319.6	279.5
Std. Deviation	0.000	1.212	6.265	59.81
Std. Error of Mean	0.000	0.8570	4.430	42.29

جدول رقم (7) تأثير عقار السيسبلاتين Cisplatin على قيمة التعبير الجيني لجين *PIK3CA* لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة بالمقارنة مع جين السيطرة *GAPDH*

## Descriptive analysis

	Control	Cisplatin 15.6 µg/ml	Cisplatin 62.5 µg/ml	Cisplatin 250 µg/ml
Minimum	1.000	99.39	90.20	48.67
25% Percentile	1.000	99.39	90.20	48.67
Median	1.000	100.1	91.14	51.15
75% Percentile	1.000	100.8	92.09	53.63
Maximum	1.000	100.8	92.09	53.63
Range	0.000	1.387	1.895	4.960
Mean	1.000	100.1	91.14	51.15
Std. Deviation	0.000	0.9810	1.340	3.507
Std. Error of Mean	0.000	0.6937	0.9476	2.480

جدول رقم (8) التراكيز المستخدمة للمستخلص المائي لجذور النبات الاشواغندا وتأثيرها على قيمة التعبير الجيني لجين *PIK3CA* لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة مقارنة مع جين السيطرة *GAPDH*

## Descriptive analysis

	Control	Aqueous extract 31.25 µg/ml	Aqueous extract 250 µg/ml	Aqueous extract 1000 µg/ml
Minimum	1.000	184.2	106.5	343.7
25% Percentile	1.000	184.2	106.5	343.7
Median	1.000	186.8	108.4	346.1
75% Percentile	1.000	189.4	110.3	348.5
Maximum	1.000	189.4	110.3	348.5
Range	0.000	5.178	3.756	4.798
Mean	1.000	186.8	108.4	346.1
Std. Deviation	0.000	3.661	2.656	3.393
Std. Error of Mean	0.000	2.589	1.878	2.399

جدول رقم (9) تأثير المستخلص الكحولي لجذور النبات الاشواغندا على قيمة التعبير الجيني لجين *PIK3CA* لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد 48 ساعة من التعريض بالمقارنة مع جين السيطرة *GAPDH*

## Descriptive analysis

	Control	Alcoholic extract 31.25 µg/ml	Alcoholic extract 250 µg/ml	Alcoholic extract 1000 µg/ml
Minimum	1.000	360.8	173.0	61.18
25% Percentile	1.000	360.8	173.0	61.18
Median	1.000	363.3	174.3	62.92
75% Percentile	1.000	365.8	175.5	64.67
Maximum	1.000	365.8	175.5	64.67
Range	0.000	5.036	2.416	3.488
Mean	1.000	363.3	174.3	62.92
Std. Deviation	0.000	3.561	1.708	2.467
Std. Error of Mean	0.000	2.518	1.208	1.744

جدول رقم (10) تأثير المستخلص المائي لجذور النبات الاشواغندا مع عقار السيسبلاتين *Cisplatin* وتأثيرها على قيمة التعبير الجيني لجين *PIK3CA* لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة مقارنة مع جين السيطرة *GAPDH*

## Descriptive analysis

	Control	Cisplatin + Aqueose extract 62.5 µg/ml	Cisplatin + Aqueose extract 250 µg/ml	Cisplatin + Aqueose extract 1000 µg/ml
Minimum	1.000	75.32	112.6	189.4
25% Percentile	1.000	75.32	112.6	189.4
Median	1.000	76.65	113.4	190.0
75% Percentile	1.000	77.98	114.2	190.7
Maximum	1.000	77.98	114.2	190.7
Range	0.000	2.656	1.572	1.317
Mean	1.000	76.65	113.4	190.0
Std. Deviation	0.000	1.878	1.111	0.9313
Std. Error of Mean	0.000	1.328	0.7859	0.6586

جدول رقم (11) تأثير المستخلص الكحولي لجذور النبات الاشواغندا مع عقار السيسبلاتين Cisplatin على قيمة التعبير الجيني لجين *PIK3CA* لخلايا خط سرطان القولون البشري (SW480) بعد تعريضها لمدة 48 ساعة مقارنة مع جين السيطرة *GAPDH*

## Descriptive analysis

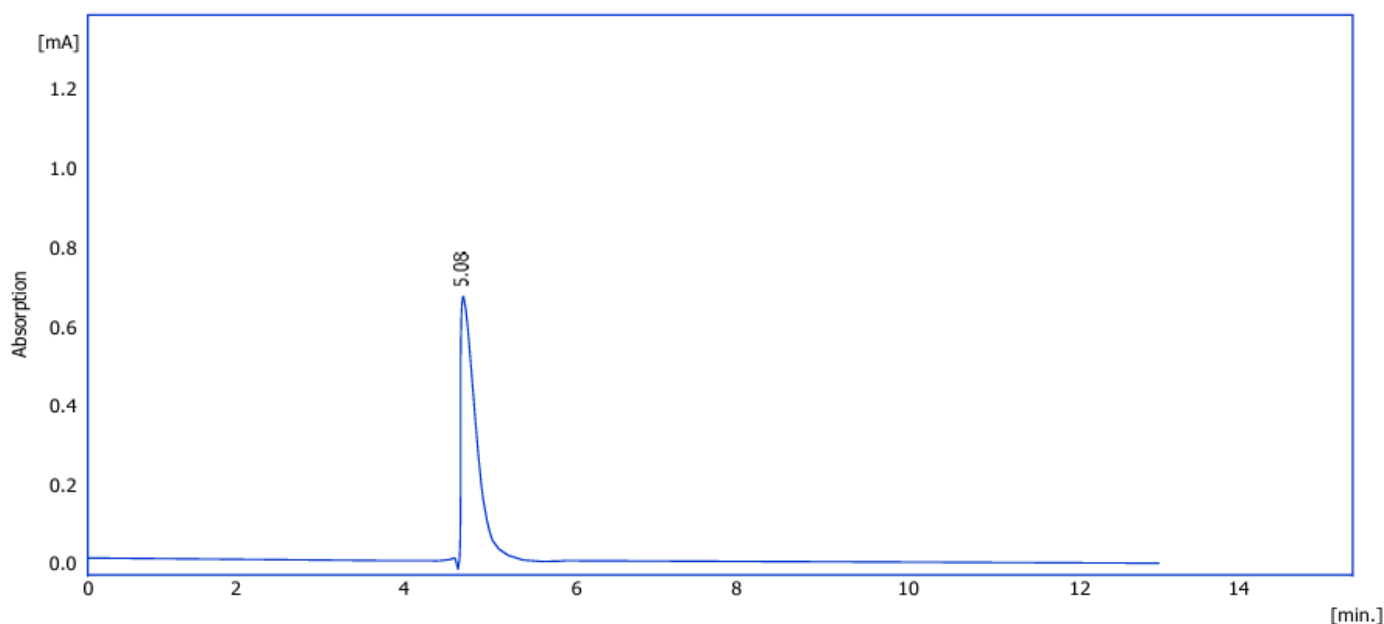
	Control	Cisplatin + Alcoholic extract 62.5 µg/ml	Cisplatin + Alcoholic extract 250 µg/ml	Cisplatin + Alcoholic extract 1000 µg/ml
Minimum	1.000	233.1	29.75	175.5
25% Percentile	1.000	233.1	29.75	175.5
Median	1.000	236.4	30.39	179.2
75% Percentile	1.000	239.7	31.02	182.9
Maximum	1.000	239.7	31.02	182.9
Range	0.000	6.554	1.264	7.451
Mean	1.000	236.4	30.39	179.2
Std. Deviation	0.000	4.635	0.8934	5.269
Std. Error of Mean	0.000	3.277	0.6318	3.726

## ملحق IV

## اختبار HPLC للأبيجينين ( apigenin )

:Sample Info

Sample ID	apigenin 5 ppm	Amount	0
Sample	apigenin 5 ppm	ISTD Amount	0
Inj. Volume [mL]	0.1	Dilution	1
Autostop	min 20.00	External Start	Start - Restart, Down
Detector 1	Detector 3	Range 1	Bipolar, 2000 mAU, 10 Samp. per .Sec
Subtraction Chromatogram	(None)	Matching	No Change



Result chromatography Table (Uncal - F:\ apigenin 5 ppm )

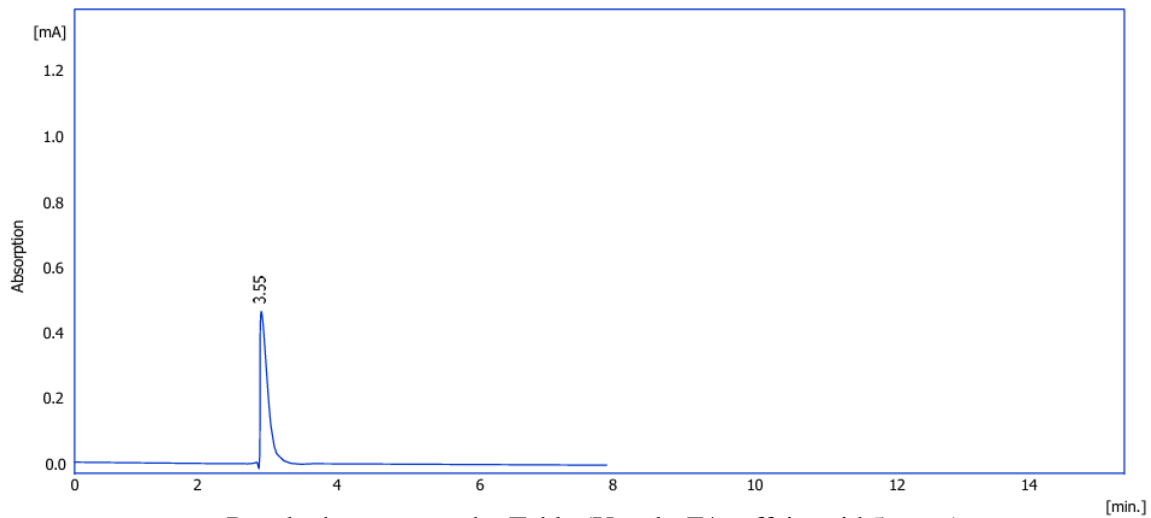
No	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W 05 [min]	Compound Name
1	5.08	2314.50	704.80	100.00	100.00	0.20	
	Total	2314.50	704.80	100.00	100.00		

## ملحق V

## اختبار HPLC لحمض الكافيين ( caffeic acid )

Sample Info:

<b>Sample ID :</b>	caffeic acid 5 ppm	<b>Amount</b>	0
<b>Sample :</b>	caffeic acid 5 ppm	<b>ISTD Amount</b>	0
<b>Inj. Volume [mL]</b>	0.1	<b>Dilution</b>	1
<b>Autostop :</b>	20.00 min	<b>External Start :</b>	Start - Restart, Down
<b>Detector 1 :</b>	Detector 3	<b>Range 1 :</b>	Bipolar, 2000 mAU, 10 Samp. per Sec.
<b>Subtraction Chromatogram :</b>	(None)	<b>Matching :</b>	No Change



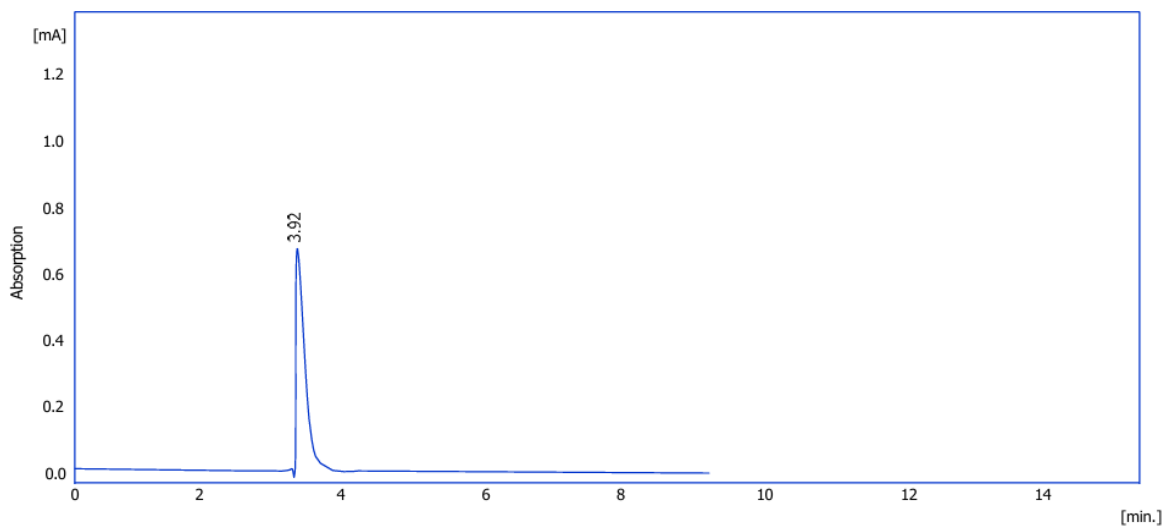
Result chromatography Table (Uncal - F:\ caffeic acid 5 ppm )

No	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W 05 [min]	Compound Name
1	3.55	1524.89	460.99	100.00	100.00	0.20	
	Total	1524.89	460.99	100.00	100.00		

## ملحق VI

## اختبار HPLC لحمض الفيروليك ( Ferulic acid )

<b>Sample ID :</b>	Ferulic acid 5 ppm	<b>Amount</b>	0
<b>Sample :</b>	Ferulic acid 5 ppm	<b>ISTD Amount</b>	0
<b>Inj. Volume [mL] :</b>	0.1	<b>Dilution</b>	1
<b>Autostop :</b>	20.00 min	<b>External Start :</b>	Start - Restart, Down
<b>Detector 1 :</b>	Detector 3	<b>Range 1 :</b>	Bipolar, 2000 mAU, 10 Samp. per Sec.
<b>Subtraction Chromatogram :</b>	(None)	<b>Matching :</b>	No Change



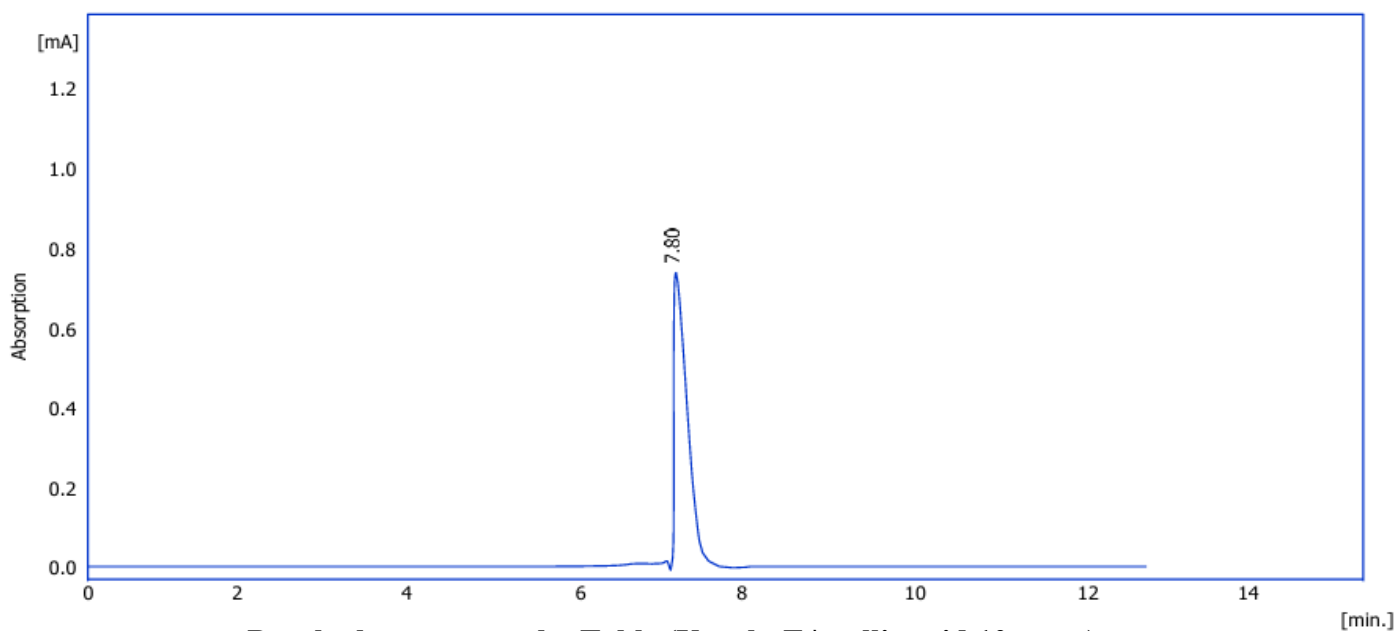
Result chromatography Table (Uncal - F:\ Ferulic acid 5 ppm )

No	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W 05 [min]	Compound Name
1	3.92	2103.65	685.44	100.00	100.00	0.20	
	Total	2103.65	685.44	100.00	100.00		

## ملحق VII

## اختبار HPLC لحمض الغالك ( gallic acid )

<b>Sample ID :</b>	gallic acid 10 ppm	<b>Amount</b>	0
<b>Sample :</b>	gallic acid 10 ppm	<b>ISTD Amount</b>	0
<b>Inj. Volume [mL] :</b>	0.1	<b>Dilution</b>	1
<b>Autostop :</b>	20.00 min	<b>External Start :</b>	Start - Restart, Down
<b>Detector 1 :</b>	Detector 3	<b>Range 1 :</b>	Bipolar, 2000 mAU, 10 Samp. per Sec.
<b>Subtraction Chromatogram :</b>	(None)	<b>Matching :</b>	No Change



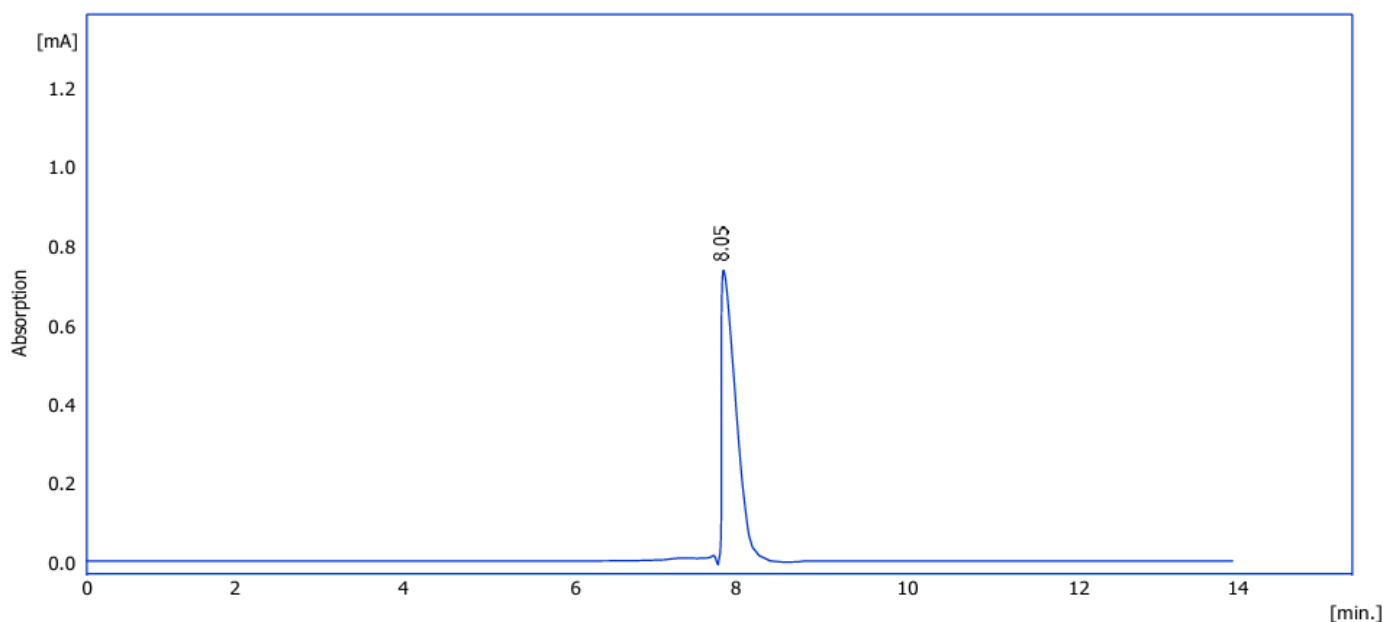
Result chromatography Table (Uncal - F:\ gallic acid 10 ppm )

No	Reten Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W 05 [min]	Compound Name
1	7.80	2510.64	794.08	100.00	100.00	0.20	
	Total	2510.64	794.08	100.00	100.00		

## ملحق VIII

## اختبار HPLC للكيرسيتين (Qurcetine)

<b>Sample ID :</b>	Qurcetine 10 ppm	<b>Amount</b>	0
<b>Sample :</b>	Qurcetine 10 ppm	<b>ISTD Amount</b>	0
<b>Inj. Volume [mL] :</b>	0.1	<b>Dilution</b>	1
<b>Autostop :</b>	20.00 min	<b>External Start :</b>	Start - Restart, Down
<b>Detector 1 :</b>	Detector 3	<b>Range 1 :</b>	Bipolar, 2000 mAU, 10 Samp. per Sec.
<b>Subtraction Chromatogram :</b>	(None)	<b>Matching :</b>	No Change



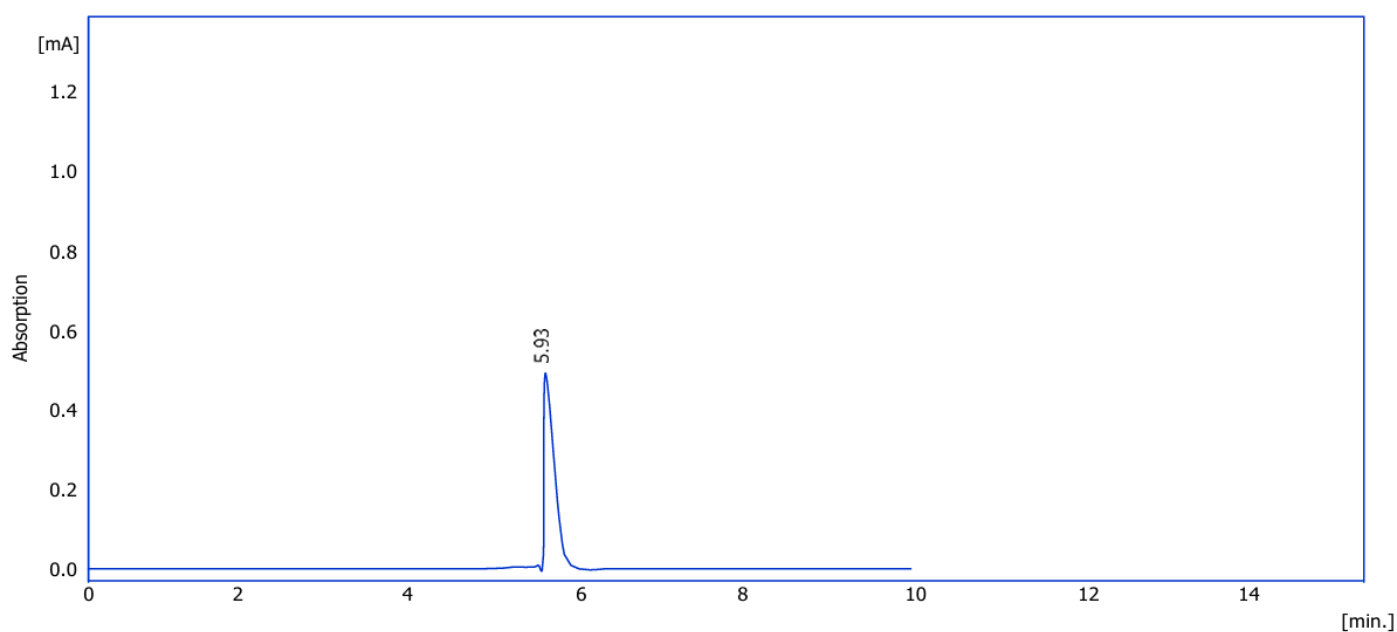
Result chromatography Table (Uncal - F:\ qurcetine 10 ppm )

No	Reten Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W 05 [min]	Compound Name
1	8.05	1624.05	786.22	100.00	100.00	0.20	
	Total	1624.05	786.22	100.00	100.00		

## ملحق IX

## اختبار HPLC للروتين (Rutin)

<b>Sample ID :</b>	Rutin 5 ppm	<b>Amount</b>	0
<b>Sample :</b>	Rutin 5 ppm	<b>ISTD Amount</b>	0
<b>Inj. Volume [mL] :</b>	0.1	<b>Dilution</b>	1
<b>Autostop :</b>	20.00 min	<b>External Start :</b>	Start - Restart, Down
<b>Detector 1 :</b>	Detector 3	<b>Range 1 :</b>	Bipolar, 2000 mAU, 10 Samp. per Sec.
<b>Subtraction Chromatogram :</b>	(None)	<b>Matching :</b>	No Change



Result chromatography Table (Uncal - F:\ Rutin 5 ppm )

No	Reten Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W 05 [min]	Compound Name
1	5.93	1897.80	480.55	100.00	100.00	0.20	
	Total	1897.80	480.55	100.00	100.00		

## Summary

This study was conducted during the period from February 2024 to January 2025 at Rawafed Al-Ulum Company for Training and Research Development and UGENE Laboratory in Babylon Governorate. The quantitative chemical detection of the active components of *Withania somnifera* roots was performed using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The HPLC analysis results showed the presence of active components in the *Withania somnifera* root extract, including alkaloids, glycosides, terpenes, and mineral elements at lower levels compared to phenolic compounds and flavonoids, which were at high levels, reaching (198.0) and (114.5) mg/100 gm, respectively. The results of the AAS Atomic Absorption Spectroscopy analysis also showed the presence of active components in the plant, including (Fe, Cu, Mg, Zn, and Mn). The current study included two axes: the first included evaluating the cytotoxic activity of the aqueous and alcoholic extracts of the plant roots *Withania somnifera* on the growth of human colon cancer cell line Sw480 cells for an exposure period of 48 hours in vitro and compared with the effect of Cisplatin by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay (MTT) on human colon cancer cells Sw480. The combined effect of aqueous and alcoholic extracts of *Withania somnifera* roots with Cisplatin at a concentration of 15.6 µg/ml on the percentage of viability of Sw480 cells for an exposure period of 48 hours was also studied. The other aspect of the study included calculating the gene expression of both *P53* and *PIK3CA* genes for Sw480 cancer cells after exposure to the aqueous and alcoholic extract of *Withania somnifera* roots for 48 hours, as well as estimating the gene expression of *P53* and *PIK3CA* genes for Sw480 cancer cells after Exposing them to a mixture of aqueous and alcoholic extract of *Withania somnifera* roots and Cisplatin for 48 hours.

The cytotoxic effect of the aqueous and ethyl alcohol extract (70%) of *Withania somnifera* roots was measured using six half concentrations (1000, 500, 250, 125,

62.5, 31.2 µg/ml). The results showed the highest percentage of viability Inhibition Rate (IR) for Sw480 colon cancer cells when exposed to the aqueous extract *Withania somnifera*, which reached 24.61% at a significant level ( $P \leq 0.01$ ) compared to the control (cells not treated with the extract) ( $100.00 \pm 2.15$ ). When the cells were treated with the alcoholic extract *Withania somnifera*, which was more effective in inhibiting the growth of cancer cells, the percentage of viability of Sw480 colon cancer cells reached ( $9.91 \pm 0.39$ )% at a concentration of 1000 µg/ml, meaning that the percentage of viability reached (90.09) at a significant level ( $P \leq 0.01$ ). Highly significant ( $P \leq 0.01$ ) compared to other used concentrations and the control treatment ( $100.00 \pm 2.15$ ). When treating Sw480 cells with Cisplatin, it was observed that the drug had a significant effect on the viability of Sw480 cancer cells at all used concentrations and with an exposure period of 48 hours, with a significant difference ( $P \leq 0.01$ ). The percentage of Sw480 cell viability reached  $39.16 \pm 2.50\%$  at the highest used concentration of 1000 µg/ml, while the percentage of Sw480 cell viability reached  $18.24 \pm 1.44\%$  at the lowest concentration (31.25 µg/ml). There was a slight gradual difference in cell viability between the other concentrations.

The results of the molecular study, which included measuring the level of gene expression of *PIK3CA* in Sw480 cells when treated with the aqueous extract of *Withania somnifera* roots for 48 hours, showed a significant increase, with the gene expression value reaching ( $363.3 \pm 3.561$ )% at the lowest concentrations used (31.25 µg/ml) compared to  $1.000 \pm 0.0\%$  of the gene expression value of the control gene *GAPDH*. When measuring the gene expression level of P53 when treating Sw480 human colon cancer cells with the aqueous extract of *Withania somnifera* roots, it reached ( $98.36 \pm 0.9642$ )% at the concentration (31.25 µg/ml) compared to  $1.000 \pm 0.0\%$  of the gene expression value of the control gene *GAPDH*. When using the alcoholic extract *Withania somnifera*, the results indicated that the highest percentage of gene expression levels for *PIK3CA* in cells Sw480 reached ( $363.3 \pm 3.561$ )% at a concentration of (31.25 µg/ml) and at a high significance level

( $P \leq 0.0001$ ), while the highest percentage of gene expression was recorded in the same extract for the *P53* gene, which reached  $(1.281 \pm 130.7)\%$  at a concentration of  $(1000 \mu\text{g/ml})$  at a significance level ( $P \leq 0.0001$ ) compared to  $(1.000 \pm 0.0)\%$  gene expression value for the control gene *GAPDH*. The results of gene expression of *PIK3CA* when treating human colon cancer cells Sw480 with Cisplatin at a concentration of  $15.6 \mu\text{g/ml}$  showed that the highest percentage of gene expression reached  $(100.1 \pm 0.9810\%)$ , while the highest level of gene expression value for the *P53* gene appeared when treating the cells with Cisplatin, which was  $(299.2 \pm 4.400\%)$  at a concentration of  $(62.5 \mu\text{g/ml})$  and at a significant level ( $P \leq 0.0001$ ).

The results of the combined action of the aqueous extract of the roots of the *Withania somnifera* plant with the drug Cisplatin at a concentration of  $(15.6 \mu\text{g/ml})$  revealed that the highest percentage of gene expression for *PIK3CA* reached  $(0.9313 \pm 190.0)\%$  at a concentration of  $(1000 \mu\text{g/ml})$ , while the combined action of the aqueous extract *Withania somnifera* and the drug Cisplatin gave the highest percentage of gene expression for *P53*  $(200.9 \pm 1.969)\%$  at a concentration of  $(250 \mu\text{g/ml})$ . As for the results of the alcoholic extract *Withania somnifera* with the drug Cisplatin, the highest percentage of gene expression for *PIK3CA*  $(4.635 \pm 236.4)\%$  at a concentration of  $(62.5 \mu\text{g/ml})$ , while the highest percentage of gene expression for the *P53* gene was  $(319.6 \pm 6.265)\%$  at a concentration of  $(250 \mu\text{g/ml})$  at a significance level of ( $P \leq 0.0001$ ) versus  $(1.000 \pm 0.0\%)$ , the expression value of the control gene *GAPDH*. From the above study, we conclude that the active compounds in the aqueous and alcoholic extracts of the roots of *Withania somnifera* rendered the plant significantly cytotoxic to human colon cancer cell line Sw480 cells and to the percentage of gene expression levels for both *PIK3CA* and *P53*. Furthermore, the combined action of the aqueous and alcoholic extracts of the plant with the drug Cisplatin resulted in better toxicity results for Sw480 cells, mediated by both the percentage of cell viability and the level of gene expression for *PIK3CA* and *P53*.



University of Kerbala  
College of Education for Pure Sciences  
Department of Biology

**Evaluation of the cytotoxic and molecular effects of  
*Withania somnifera* L. aqueous and alcoholic root  
extracts and cisplatin on the gene expression of *p53*  
and *PIK3CA* genes in SW480 colon cancer cell line in  
*in vitro***

A Dissertation

Submitted to the Council of the College of Education for Pure Sciences /  
University of Kerbala as part of the requirements for obtaining a of  
Philosophy degree in Biology-Zoology

written By

Zainab Abd Amir Mezher Ahmed

Supervised By:

Prof. Dr. Liqaa H. Saqban

2025 A.D

1447 A.H