

**Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and
Scientific Research
University of Diyala
College of Science
Biology Department**



Antibacterial and Antitumor Activity of Arbutin Purified from *Vaccinium Corymbosum* L.

A Thesis

**Submitted to the Council of College of Science, University of Diyala as
Partial Fulfillment of the requirement for the Ph. D in Biology**

By

Eyman Alwan Nasser

Supervised By

Prof. Dr.

Ibrahim Hadi Mohammed

Prof. Dr.

Khazal Dh. Wadi Al-Jibouri

2025 AD

1447 AH

Abstract

Plant secondary metabolites are a source of many chemical compounds that can be used in the field of pharmaceutical manufacturing. Arbutin is one such compound, which is used in the manufacture of skin-lightening products and is also used to treat skin cancer which found in some plant families.

The study aimed to isolate and purify arbutin from *Vaccinium corybosum* L. and tested it's effect as antibacterial and antitumor by studying apoptosis and gene expression.

Arbutin isolation and purified from *Vaccinium corybosum* L. . The extraction was carried out by soxhlet method after the leaves of plant dried , Gas chromatography-mass spectrometry determine the chemical composition of the plant leaves. The components have been separated by using column chromatography and further purity assessment was done by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) . Inhibition effect of arbutin determined by well diffusion method. Antitumor of arbutin activity *invitro* determined by cytotoxicity assay and immunoflourescening staining while antitumor activity *invivo* determined by studied apoptosis by TUNEL assay and gene expression by western blotting.

The inhibitory action of arbutin examined on pathogenic bacteria; *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas earuginosa*, *Klibsiella pneumonia*, *Esherichia coli* at 100 and 200 µg/ml using well diffusion method. At 100 µg/ml the inhibition zone was 12mm for *S. aureus*, 10mm for *P. earuginosa*, 11mm for *E. coli* and 12mm for *K. pneumonia*. While inhibition zones at 200 µg/ml was 19 mm for *S. aureus*, 16 mm for *P. earuginosa*, 14 mm for *E. coli* and 13 mm for *K. pneumonia*. Arbutin concentrations employed at 12.5, 25, 50, 100, and 200 µg/ml to examine its cytotoxic effects on lymphocyte

proliferation at the metaphase stage; the highest inhibition rates was 2.10% and 3.93% which noted at 100, and 200 $\mu\text{g/ml}$ consecutively.

Furthermore, cytotoxicity effect of arbutin examined at 12.5, 25, 50, 100, and 200 $\mu\text{g/ml}$ concentration in cancer cell lines; Hepatoblastoma cell line (HepG2), Michigan Cancer Foundation (MCF-7) and Mice Embryonic Fibroblast (MEF). The results showed that the inhibition rate of MCF-7 cells increased with increasing in concentrations which reached 94.57% at 200 $\mu\text{g/ml}$. At the same dose, HepG2 cells displayed a maximal inhibition of 93.14%. The normal MEF cell line only shown 9.5% inhibition at 200 $\mu\text{g/ml}$. IC50 was for MCF-7, HepG2, and MEF cells 99, 100 and 908 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Additionally, the impact of arbutin on microtubule polymerization and apoptosis in HeLa cell have been studied at concentrations 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ which showed greatest reduction of microtubules polymerization 200 $\mu\text{g/ml}$ with apoptosis rates which was 2.95%.

The effect of 1000 μg of arbutin on tumor volume and relative tumor volume was studied at days 0, 12, 15, 18, 21, 24, 27, and 30. On day 30, the tumor volume in the 1000 μg of PBS as control group was 2530 mm^3 , while it was 175 mm^3 in the arbutin-treated group. The relative tumor volume in the control group reached 1179.83% on day 30, while it was at its lowest level of 56.82% in the arbutin-treated group for the same duration. TUNEL assay analysis revealed that arbutin induced apoptosis in tumor tissues at a rate of 26.86% compared to 5.47% in the control group. Gene expression analysis indicated an increase in the protein levels of the tumor suppressor gene P53 and a decrease in the levels of the vascular endothelial growth factor (VEGF) protein with the administration of 1000 μg arbutin.

The study concluded it's could be isolate and purify arbutin from *Vaccinium corybosum* L, arbutin has potential antibacterial effect on pathogenic bacteria, also it can effect the mitotic index of human lymphocyte since it could blocked the cells at the metaphase, forthere more it inhibition cancer by induce apoptosis through impairing the microtubule polymerization or damage DNA and modulated of gene expression.

Chapter One

Introduction

Introduction

Numerous compounds were extracted from natural sources including plants, bacteria, fungi, and marine organisms, many notable antibacterial efficacy in clinical environments, natural products are a raw material for pharmaceutical compounds in the pharmaceutical field. (Kabera *et al.*, 2014). Antimicrobial agents utilized to prevent and treat infections induced by bacteria, fungi, viruses, and parasites, consequently (Jadimurthy *et al.*, 2023).

Arbutin is produced naturally by several plant families, such as Ericaceae, Saxifragaceae, Asteraceae, Rosaceae, Lamiaceae, and Apiaceae. It is abundantly present in meals and can also be consumed in herbal dietary supplements, over-the-counter medications, or through dermal contact with skin- lightening treatments. It is a hydroquinone glycoside chemically (He *et al.*, 2021) .

Since their discovery in the early 1900s, antibiotics have transformed medicine and saved countless lives, however, the worrying increase in antibiotic resistance has eclipsed the history of antibiotics, the unrelenting adaptability of microbes, antibiotic abuse and overuse is the cause of this global issue (Muteeb *et al.*, 2023) . There are some types of bacteria called ESKAPEE because of their ability to evade the effects of antibiotics due multidrug resistance, such as *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiell pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus fecium*, and *Enterobacter spp* (Parmanik *et al.*, 2022) .

Plant secondary metabolites (SMs) are being developed and used as potent pharmacological medicines in the treatment of cancer, due to their frequent natural occurrences and many of them have low toxicity, combining two or three plant secondary metabolites, or one SM with a particular anticancer medication, may reduce the dosage required, extend the window for

chemotherapeutic treatment, mediate more efficient inhibition of cell growth, and prevent the negative consequences of high drug concentrations (El-Readi *et al.*, 2021). Numerous SMs may successfully make cancer cells more susceptible to chemotherapy (Eid *et al.*, 2015).

A multimodal medicine for cancer has been created, increasing the possibility of cure to 70-80% in patients with cancer; yet, in metastatic cases, a cure remains unavailable with current cancer therapies (Harbeck *et al.*, 2019).

In the next years, it is anticipated that the number of people at risk for cancer would increase. with expectation up to 420 million new cases annually by 2025. (Zagazagoita *et al.*, 2016).

Multidrug resistance (MDR) in cancer cells may be transmitted to the progeny cells. Adenosin triphosphate binding cassette ABC transporter are the most common MDR proteins that can undergo mutations or modifications, which is a common method for drug resistance to develop (Hamed *et al.*, 2019). Recent research has established the principal factor contributing to MDR in malignancies is ATP dependent transport protein P-glycoprotein due to prevent accumulation of drugs in cancer cells (Patel *et al.*, 2021).

Since the beginning of anticancer drug research, screening has been the primary method for determining the biological activity of potential drugs. The earliest preclinical step of this process involves conducting studies by using cancer cell lines, recent advancements have enabled researchers to add a wide variety of cell lines include human stem cell line, endothelial cell lines, and cell lines that contain specific mutations (Richter *et al.*, 2021 ; Capula *et al.*, 2019). The use of cell lines is a viable option to investigate a substantial number of medication combinations, as they offer a readily available and

easily propagated source of material, facilitating high-throughput assays (Wilding & Bodmer, 2014).

The Aime of study

Evaluating antibacterial activity of arbutin as alternative antimicrobial and anticancer agent *in vivo* and *in vitro*.

Objectives

- 1- Extraction of arbutin from *Vaccinium corymbosum* L.
- 2- Study the effect inhibitory of arbutin by well diffusion method .
- 3- Study effect of arbutin on mitotic index by short term culture.
- 4- Investigate anticancer activity of arbutin *in vitro*.
- 5- Investigate ability of arbutin as apoptosis inducer *in vitro*.
- 6- Study arbutin biological activity *in vivo*.

الخلاصة

تُعدّ المستقلبات الثانوية النباتية مصدرًا مهمًا للعديد من المركبات الكيميائية التي يمكن استخدامها في مجال الصناعات الدوائية. ويُعدّ الأربوتين أحد هذه المركبات، إذ يُستخدم في تصنيع مستحضرات تفتيح البشرة، كما يُستعمل في علاج سرطان الجلد، وهو موجود في بعض العائلات النباتية. هدفت الدراسة إلى عزل وتنقية مركب الأربوتين من نبات *Vaccinium corymbosum* L.، ودراسة تأثيره المضاد للبكتيريا والمضاد للأورام من خلال تقييم الاستماتة الخلوية (Apoptosis) والتعبير الجيني.

تم عزل وتنقية الأربوتين من أوراق نبات *Vaccinium corymbosum* L.، حيث أُجريت عملية الاستخلاص باستخدام طريقة سوكليت بعد تجفيف أوراق النبات. كما جرى تحديد التركيب الكيميائي لأوراق النبات باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الغاز-مطياف الكتلة (GC-MS) وتم فصل المكونات باستعمال كروماتوغرافيا العمود، ثم أُجري تقييم إضافي للنقاوة باستخدام كروماتوغرافيا السائل عالية الأداء (HPLC) وقد حُدِد التأثير التثبيطي للأربوتين باستخدام طريقة الانتشار بالخُفر (Well diffusion) أما الفعالية المضادة للأورام *in vitro* فقد قُيِّمت بواسطة اختبار السمية الخلوية والتلوين المناعي الفلوري، في حين حُدِدَت الفعالية المضادة للأورام *in vivo* من خلال دراسة الاستماتة باستخدام اختبار TUNEL وتحليل التعبير الجيني بواسطة تقنية اللوحة الغربية (Western blotting)

دُرِس التأثير التثبيطي للأربوتين على البكتيريا الممرضة *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Klebsiella pneumoniae* و *Escherichia coli* بتركيزين

100 و 200 ميكروغرام/مل باستخدام طريقة الانتشار بالحفر. عند تركيز 100 ميكروغرام/مل، بلغ قطر منطقة التثبيط 12 ملم لـ *S. aureus*، و 10 ملم لـ *P. aeruginosa*، و 11 ملم لـ *E. coli*، و 12 ملم لـ *K. pneumoniae* أما عند تركيز 200 ميكروغرام/مل فقد بلغت مناطق التثبيط 19 ملم لـ *S. aureus*، و 16 ملم لـ *P. aeruginosa*، و 14 ملم لـ *E. coli*، و 13 ملم لـ *K. pneumoniae* استُخدمت تراكيز من الأربوتين بلغت 12.5 و 25 و 50 و 100 و 200 ميكروغرام/مل لدراسة تأثيره السمي الخلوي على تكاثر الخلايا اللمفاوية في الطور الاستوائي (Metaphase)، حيث سُجلت أعلى نسب التثبيط عند تركيزي 100 و 200 ميكروغرام/مل وبلغت 2.10% و 3.93% على التوالي.

علاوة على ذلك، دُرس التأثير السمي الخلوي للأربوتين بتراكيز 12.5 و 25 و 50 و 100 و 200 ميكروغرام/مل على خطوط الخلايا السرطانية، وهي خط خلايا سرطان الكبد الجيني (HepG2)، وخط خلايا سرطان الثدي (MCF-7)، وخط خلايا الأرومات الليفية الجينية للفأر (MEF). وأظهرت النتائج أن نسبة تثبيط خلايا MCF-7 ازدادت بزيادة التركيز لتصل إلى 94.57% عند تركيز 200 ميكروغرام/مل، في حين أظهرت خلايا HepG2 أعلى نسبة تثبيط بلغت 93.14% عند التركيز نفسه. أما خط الخلايا الطبيعية MEF فقد أظهر نسبة تثبيط منخفضة بلغت 9.5% عند تركيز 200 ميكروغرام/مل. وبلغت قيمة IC50 لكل من خلايا MCF-7 و HepG2 و MEF نحو 99 و 100 و 908 ميكروغرام/مل على التوالي. إضافةً إلى ذلك، دُرس تأثير الأربوتين في بلمرة الأنابيب الدقيقة (Microtubule polymerization) والاستماتة في خلايا HeLa عند تراكيز 6.25 و 12.5 و 25 و 50 و 100 و 200 ميكروغرام/مل، حيث لوحظ أكبر انخفاض في بلمرة الأنابيب الدقيقة عند تركيز 200 ميكروغرام/مل، مع نسبة استماتة بلغت 2.95%.

كما دُرس تأثير 1000 ميكروغرام من الأربوتين في حجم الورم والحجم النسبي للورم خلال الأيام 0 و12 و15 و18 و21 و24 و27 و30. ففي اليوم الثلاثين بلغ حجم الورم في مجموعة السيطرة المعاملة بـ PBS مقدار 2530 مم³، في حين بلغ 175 مم³ في المجموعة المعالجة بالأربوتين. ووصل الحجم النسبي للورم في مجموعة السيطرة إلى 1179.83% في اليوم الثلاثين، بينما انخفض إلى أدنى مستوى له في مجموعة الأربوتين وبلغ 56.82% خلال المدة نفسها. وكشف تحليل اختبار TUNEL أن الأربوتين حفّز الاستماتة في أنسجة الورم بنسبة 26.86% مقارنةً بـ 5.47% في مجموعة السيطرة. كما أظهر تحليل التعبير الجيني زيادة في مستويات بروتين الجين الكابح للأورام P53، وانخفاضاً في مستويات بروتين عامل نمو بطانة الأوعية الدموية (VEGF) عند إعطاء جرعة 1000 ميكروغرام من الأربوتين.

واستنتجت الدراسة إمكانية عزل وتنقية مركب الأربوتين من نبات *Vaccinium corymbosum* L. وأن للأربوتين فعالية محتملة مضادة للبكتيريا الممرضة، فضلاً عن تأثيره في معامل الانقسام للخلايا اللمفاوية البشرية من خلال إيقاف الخلايا في الطور الاستوائي. كما يمتلك الأربوتين قدرةً على تثبيط الخلايا السرطانية عبر تحفيز الاستماتة، سواءً من خلال إعاقة بلمرة الأنابيب الدقيقة أو إحداث تلف في الحمض النووي (DNA)، فضلاً عن تنظيمه للتعبير الجيني.



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية العلوم
قسم علوم الحياة

الفاعلية ضد البكتيرية ضد السرطانية للأربوتين المنقى

من *Vaccinium Corymbosum L.*

اطروحة مقدمة الى

مجلس كلية العلوم - جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الدكتوراه في علوم
الحياة

من قبل الطالبة

ايمان علوان ناصر

بكلوريوس علوم الحياة/ كلية العلوم - جامعة ديالى

ماجستير علوم الحياة/ جامعة ديالى

بإشراف

أ.د. خزعل ضبع وادي

أ.د. ابراهيم هادي محمد

1447هـ

2025 م