EVALUATION OF THE COMBINED CHEMOPREVENTIVE EFFECT OF SOME ANTIANGIOGENIC AGENTS ON DIETHYLNITROSAMINE-INDUCED HEPATOCELLULAR CARCINOMA IN A MOUSE MODEL

Thesis submitted to the Medical Research Institute
Alexandria University
In partial fulfillment for the degree

of

Master

in

Pharmacology and Experimental Therapeutics

By

PUA
Library
C
Pharos University in Alexandria

Omar Abd-El-Aziz Hamed

B. Pharm
Alexandria University, 2008

P.U.A. Library
Library C
Faculty of: Pharmacy
Serial No: 155
Classification: 615

Medical Research Institute
Alexandria University
2012

الملخص العربى

إن التطورات الحديثة فى علاج سرطان الكبد قد احدثت تحسنا واضحا بحالة المرضى الذين يعانون من هذا المرض، الا ان معدل البقاء على قيد الحياة مازال غير مرضى. وبرغم تعدد طرق العلاج الشافية مثل استئصال الكبد عن طريق الجلد والإجتثاث بالترددات الراديوية الا أن معدل البقاء على قيد الحياة لمدة خمس سنوات اقل من ١٠%. وحيث أن المجموعة المعرضة للاصابة بسرطان الكبد الابتدائي أو الثانوي تبدو أكثر وضوحا من نظيرتها من الأنواع الأخرى من الأورام، فقد يصبح من المفيد استخدام العقاقير الوقائية الكيميائية فى تقليل الاصابة بسرطان الكبد وزيادة التكهن بها. إن العقاقير الوقائية الكيميائية يجب أن تكون خالية من السمية ويمكن تحملها عند استخدامها لفترات طويلة بالاضافة الى ارتفاع كفائتها و انخفاض تكلفتها. ويؤدى الاستخدام الطويل المدى لبعض العقاقير المتاحة والتى تقى من حدوث سرطان الكبد إلى بعض الآثار الجانبية الخطيرة مثل تثبيط نخاع العظم. ولذلك تُبذل كثير من الجهود لتقييم العقاقير المتاحة او المواد الكيميائية المستخرجة من النباتات كعقاقير وقائية كيمائية فى حالات سرطان الكبد.

وقد تم مؤخرا تحديد العديد من المسارات الجزئية ومسارات الإشارات والتى تعتبر كخطوات أساسية للإصابة بأورام الكبد السرطانية وتتضمن هذه المسارات تكوين الأوعية الدموية، الالتهاب والجهد التأكسدى. مشاركة هذه المسارات فى التعديلات الجزيئية قد يساهم فى تطور الورم فى بعض مرضى سرطان الكبد، وبالتالى فإن اعاقة هذه المسارات تبدو كفرص علاجية واعدة لتحسين الوقاية من سرطان الكبد مما يستدعى المزيد من التحقيق. استنادا الى نتائج الأبحاث التى اجريت مؤخرا والتى أظهرت ان استخدام احد مضادات تكوين الاوعية منفردا كان غير كافيا لتثبيط تكوين هذه الأوعية، فإن فكرة الجمع بين أكثر من مضاد للأوعية تعمل على مسارات مختلفة مع استهداف آليات مختلفة هو رهن التحقيق. استكشاف هذا المجال يمثل بلا شك تقدما فى الوقاية الكيميائية وعلاج السرطان حيث يؤدى إلى علاج أكثر فاعلية، أقل سمية و ايضا أقل عرضة للمقاومة.

الهدف من الدراسة الحالية هو دراسة تأثير الجمع الوقائى لثلاثة عقاقير هى: البرندوبريل (مثبط لإنزيم محول الأنجيوتنسن)، اللوفلونامید (أحد مضادات الالتهاب) والكوركمين (منتج طبيعى مستخدم على نطاق واسع كإضافة غذائية لها بعض التاثيرات الدوائية المفيدة)، على حدوث سرطان الكبد المستحدث فى الفئران مع تقييم نشاط هذه العقاقير على تكوين الأوعية، الالتهاب والجهد التأكسدى باعتبارها آليات تساهم فى إصابة الكبد بالاورام السرطانية.

تم تقسيم حيوانات البحث إلى ست مجموعات تشتمل كل منها على ثمانية فئران:

- المجموعة الاولى (الضابطة السلبية): تلقت الفئران ملح الفوسفات العازل (PBS) اسبوعيا.
- المجموعة الثانية (مجموعة الـ DEN): حُثت الفئران لحدوث سرطان الكبد عن طريق حقن DEN بجرعة ٧٥ مجم/كغ فى الغشاء البيروتونى مرة واحدة اسبوعيا لمدة ثلاث أسابيع ثم بجرعة ١٠٠ مجم/كغ لمدة ثلاث أسابيع أخرى .فئران المجموعة الثانية لم تتلق أى علاج إضافى وتمثل مجموعة الضابطة الإيجابية.
- المجموعة الثالثة (مجموعة اللوفلونامید): تلقت الفئران جرعة قدرها ١٠/مجم/كغ من اللوفلونامید عن طريق الفم يوميا.
- المجموعة الرابعة (مجموعة البرندوبريل): تلقت الفئران جرعة قدرها ٢مجم /كغ من البرندوبريل عن طريق الفم يوميا.
- المجموعة الخامسة (مجموعة الكوركمين): تلقت الفئران جرعة قدرها ١٠٠كجم/كغ من الكوركمين عن طريق الحقن فى الغشاء البيروتونى ثلاث مرات اسبوعيا.
- المجموعة السادسة (مجموعة الجمع): الفئران تلقت مزيج من البرندوبريل، اللوفلونامید والكوركمين بنفس طرق الحقن والجرعات المستخدمة لكل عقار فى المجموعات من الثالثة الى الخامسة.

جميع العلاجات تم إعطائها اسبوعين قبل بداية حقن الـ DEN وحتى نهاية التجربة (١٠أسابيع). وفى نهاية فترة التجربة، تم تشريح الفئران ورفع الكبد وتقطيعه لأجزاء صغيرة لاستخدامها فى العديد من الفحوصات.

النتائج: فى هذه الدراسة، كشف الفحص المجهرى لعينات الكبد المأخوذة من مجموعة الـ DEN عن حدوث سرطان الكبد فى جميع الفئران بنسبة ١٠٠% (٨/٨) فى نهاية فترة البحث. وقد انخفضت نسبة حدوث الورم إلى ٢٥% (٨/٢) فى مجموعتى اللوفلونامايد والكوركمين وإلى ٣٧.٥% (٨/٣) فى مجموعة البرندوبريل. بعض عينات الكبد من مجموعات العلاج الوقائى المنفرد، أظهرت خللا فى التنسج بدلا من كبد طبيعى فى نهاية التجربة، وهذه الإستراتيجية اعتبرت وقاية كيميائية حيث أن هذا النهج منع أو أخر تطور حالات ما قبل السرطان الى سرطان خبيث. تم الحصول على استجابة افضل فى مجموعة الجمع حيث لم نجد فئران تعانى من السرطان أو أى خلل فى النسيج الكبدى (٨/٠) فى نهاية التجربة.

استُخدم عامل نمو الأوعية الدموية (VEGF) وكثافة الأوعية الصغيرة (MVD) لتقييم تكوين الأوعية الدموية فى الكبد. زاد هذان المعياران زيادة ذات دلالة احصائية فى مجموعة الـ DEN مقارنة بالفئران الغير معالجة مما يدعم دور هذان العاملان فى الإصابة بأورام الكبد السرطانية. أظهرت نتائج هذه الدراسة أن كل العقاقير المستخدمة احدثت نقصا ذا دلالة احصائية فى كل من VEGF وكثافة الأوعية الصغيرة بالكبد مما يوضح قدراتهم التأثيرية كمضادات لتكوين الأوعية وعلى تثبيط تكوين الأوعية الجديدة فى الكبد. وأظهرت مجموعة الجمع تثبيط تآزرى ل(VEGF) وإنخفاض ذا دلالة احصائية فى الـ MVD مقارنة بالمجموعات التى عولجت بعقار واحد منفرد مما يوضح منع تكوين الأوعية الدموية بفاعلية أكثر.

تم تقييم تأثير المجموعات الوقائية المختلفة على تكوين الأوعية الدموية الناتجة عن نقص الأكسجة، والتى هى واحدة من المسارات التى تؤدى إلى حدوث سرطان الكبد باستخدام التقرير المناعى الكبدى لل HIF-1α. واظهرت النتائج عدم حدوث انخفاض ذا دلالة احصائية فى مستوى الـ HIF-1α فى الكبد عند استخدام عقار البرندوبريل أو اللوفلونامايد مقارنة بمجموعة الـ DEN. ولكن أظهر الكوركمين قدرة على خفض مستوى الـ HIF-1α وهو ما انعكس ايضا على مجموعة الجمع.

كما أوضحت نتائج الدراسة الحالية تأثير النظم الوقائية المختلفة على مستوى الـ TNF-α فى الكبد والذى يشارك فى تكوين الأوعية الدموية بواسطة الالتهابات وفى بعض خطوات الإصابة بأورام الكبد السرطانية، وبالتالى فتقليل هذا العامل هو هدف علاجى للوقاية من سرطان الكبد. عند المقارنة بمجموعة الـ DEN، فإن كل المجموعات الوقائية أحدثت نقصا ذا دلالة احصائية فى مستوى الـ TNF-α فى الكبد. يذكرأن اللوفلونامايد أظهر أقصى انخفاض من بين مجموعات الأدوية المنفردة. وجدير بالذكر، فقد حدث أكبر انخفاض فى مستوى الـ TNF-α فى الكبد فى مجموعة الجمع مما أظهر قوة تأثير هذه المجموعة كمضادات للالتهابات.

تأثير النظم الوقائية المستخدمة على عملية الجهد التأكسدى والتى تعتبر احدى الوسائل التى تؤدى لحدوث سرطان الكبد، كان متغيرا فى هذه الدراسة. فقد تجلى نشاط قوى مضاد للأكسدة مع استخدام الكوركمين والذى أحدث ارتفاعا كبيرا ذا دلالة احصائية فى مستوى الـ GSH ونشاط انزيم الـ SOD فى الكبد مقارنة بمجموعة الـ DEN. وعلى الرغم من أن اللوفلونامايد والبرندوبريل تسببا فى زيادة طفيفة فى مستوى GSH ونشاط انزيم الـ SOD، إلا أنها كانت ذات دلالة احصائية مقارنة بمجموعة الـ DEN. و عند استخدام مجموعة الجمع كان مستوى الـ GSH ونشاط انزيم الـ SOD فى الكبد أكثر ارتفاعا مقارنة بكل من مجموعات العلاج الفردية.

كما تشير هذه النتائج إلى مساهمة مختلفة لتأثيركل من المسارات المقترحة المستهدفة على تثبيط الإصابة بسرطان الكبد عن طريق العقاقير المستخدمة فى هذه الدراسة. وجدير بالذكر ان التأثير الوقائى للوفلونامايد ضد سرطان الكبد تم ظهوره للمرة الأولى فى هذه الدراسة و ليس فقط كمضاد للالتهابات المتسبب فى تثبيط الـ TNF-α فى الكبد، ولكن أيضا عن طريق منع تكوين الأوعية الدموية والتأثير الأقل كمضاد للأكسدة. وتعزى كفاءة البرندوبريل فى الوقاية من سرطان الكبد الى قدرتة على منع تكوين الأوعية بالإضافة الى قدرته كمضاد للالتهابات والأكسدة. ومع ذلك فإن آليات أخرى شاركت فى الوقاية الكيمايائية لهذه الأدوية التى لا تزال تحتاج إلى المزيد من التوضيح وإجراء المزيد من الدراسات. تمت دراسة آليات متنوعة للقدرة الوقائية للكوركمين، وقد أظهرت هذه الدراسة بعض من هذه الآليات كتأثير الكوركمين كمضاد قوى للأكسدة، مضاد للالتهابات ومثبط لتكوين الأوعية الناتجة عن نقص الأكسجة كمسارات مستهدفة لها دور رئيسى فى الوقاية الكيميائية الموضحة فى هذه الدراسة.

إعطاء الكوركمين مجتمعا مع اللوفلوناميد والبرندوبريل أدى إلى منع تآزرى لتكوين الأوعية الدموية وقد تكوّن نتيجة الأليات المختلفة للعقاقير المستخدمة مع تثبيط عوامل ومستقبلات متنوعة تساعد على تكوين الأوعية، بالإضافة لمنع الالتهابات والأكسدة كوسائط لتكوين الأوعية. هذا يؤيد مبدأ الجمع بين أكثر من عقارمضاد للأوعية الدموية مع آليات متكاملة مما يؤدى إلى زيادة الكفاءة والاستجابة العلاجية. علاوة على ذلك فإن مجموعة الجمع أظهرت نشاطا قويا كمضادات للالتهاب والأكسدة بالمقارنة بكل من العقاقير المختبرة منفردة وبالتالى توفر فعالية وقائية واضحة ومؤثرة ناتجة عن الآليات المتكاملة والمتميزة. الجدير بالذكر أن هذه التأثيرات قد تحققت باستخدام جرعات منخفضة مستخدمة إكلينيكيا. ولأن العقاقير المستعملة فى هذه الدراسة تستخدم على نطاق واسع إكلينيكيا دون أى آثار سلبية خطيرة، فإن الجمع بين العقاقير الثلاث قد يمثل إستراتيجية جديدة محتملة للوقاية الكيميائية ضد سرطان الكبد فى المستقبل.