Alexandria University
Medical Research Institute

A Comparative Study of the Effect of Different Tyrosine Kinase Inhibitors on Some Signaling Pathways in Breast Cancer Cell Lines

Thesis submitted to Department of Pharmacology and Experimental Therapeutics

Medical Research Institute-Alexandria University

In partial fulfillment of the requirements for the degree of

Doctor of Philosophy

In

Pharmacology and Experimental Therapeutics

By

Hisham Ahmed Nematalla

Bachelor of Pharmaceutical Sciences, 1998

M Sc. in Biotechnology, 2009

Medical Research Institute
Alexandria University

[2016]

P.U.A. Library
Library C
Faculty of : Ph.D.H
Serial No : 177
Classification : 615.1

Date.....

الملخص العربى

يعد سرطان الثدى أحد أكثر أنواع الاورام انتشاراً فى العالم و أكثرهم حدوثاً فى النساء. و يعتبر العلاج الهرمونى أساس العلاج فى سرطان الثدى الذى يحوى مستقبلات للاستروجين. تعتمد فاعلية هذه العلاجات على اتحاد كل من الاستروجين و عوامل النمو فى التحكم فى نمو الورم السرطانى. ولكن مع زيادة نمو الورم يصبح أكثر مقاومة للعلاجات المضادة للاستروجين مما يتطلب البحث عن بدائل دوائية جديدة لتحسين نتائج العلاج.

تكمن أهمية اكتشاف التفاعلات بين الاستروجين و عوامل النمو فى استحداث علاجات جديدة تستهدف هذا المحور. و تقوم نظرية البروتين العقدى على تغيير استراتيجية العلاج من استهداف مسار واحد إلى استهداف عوامل و مسارات متعددة تتفاعل من خلال شبكة إشارات.

تعتمد هذه الدراسة على التوصل إلى علاج متعدد الاهداف , يستهدف كل من مستقبلات الاستروجين و مسارات نمو الخلايا وذلك لتحسين نتائج العلاج الهرمونى .

من أجل تحقيق هذه الاهداف فقد تم استخدام خلايا حساسة للتموكسفين و أخرى مقاومة لهذا العقار. و قد تم استخدام مثبطات الكينيز لاباتينيب ,لانسيتينيب و داكتوليزيب بالاضافة إلى مثبط الجاما - سكريتيز. يعمل عقار اللاباتينيب على تثبيط كل من مستقبل عامل نمو البشرة و مستقبل الهير-2 بينما يعمل اللانسيتينيب كمثبط انتقائى للكينيز لكل من مستقبل الانسولين ومستقبل عامل النمو المشابه للانسولين.أما الداكتوليزيب فهو يعمل كمانع مزدوج للفوسفوانوسيتيد كيناز-3 و الام-تور.

لتحديد الآثار المحتملة لهذه الأدوية فقد تم تعيين المعاملات الآتية: مُعاملات النمو الميتوزية , تكاثر و نمو الخلايا , موت الخلايا المبرمج, وسائط الجين الورمى و دلالة الخلايا الجذعية.

و قد تم تقسيم العمل إلى ستة مجاميع كالآتى:

- المجموعة الاولى و تشمل الخلايا الحساسة و المقاومة لعقار التموكسيفن و المعالجة بالديمسو بتركيز 1% .
- المجموعة الثانية تشمل الخلايا الحساسة و المقاومة لعقار التموكسيفن و قد تم معالجتها بالتموكسيفن (200 نانومول) المذاب فى الديمسو بحيث يصل التركيز النهائى فى الخلايا إلى 1%.
- المجموعة الثالثة تشمل الخلايا الحساسة و المقاومة لعقار التموكسيفن وقد تم معالجتها بكل من التموكسيفن (200 نانومول) و الداكتوليزيب (50 نانومول) فى تركيز نهائى 1%.
- المجموعة الرابعة تشمل الخلايا الحساسة و المقاومة لعقار التموكسيفن و قد تم معالجتها بكل من التموكسيفن (200 نانومول) و اللاباتينيب (5 ميكرومول) فى تركيز نهائى 1%.
- المجموعة الخامسة تشمل الخلايا الحساسة و المقاومة لعقار التموكسيفن و تم معالجتها بالتموكسيفن (200 نانومول) و اللانسيتينيب (1.5 ميكرومول) فى تركيز نهائى 1%.
- أما المجموعة السادسة تشمل الخلايا الحساسة و المقاومة لعقار التموكسيفن و التى تم معالجتها بالتموكسيفن (200 نانومول) و مثبط الجاما سكريتيز(75 ميكرومول) فى تركيز نهائى 1% .

تشير النتائج أن علاج كل من الخلايا المقاومة و الحساسة بالتموكسيفن أظهر زيادة فى المُعامل النووى كاباـب, نوتش-1,البيتا كتينين, مستقبل الهير-2,مستقبل عامل نمو البشرة, مستقبل الاستروجين المقترن ببروتين الجوانين-1 و كذلك عامل البدء حقيقى النواة-4E. و قد أظهر عقار التموكسيفن زيادة فى التعبير الجينى لمستقبل الاستروجين المقترن ببروتين الجوانين-1 بمقدار 8.75 فى الخلايا الحساسة للتموكسيفين مقارنة بالخلايا الغير معالجة . بينما زاد هذا التعبير الجينى لهذا

المستقبل خمسة عشر ضعفا قيمته فى الخلايا المقاومة و المعالجة بالتموكسفين مما يوضح دور هذا المعامل فى استحداث مقاومة الخلايا للعلاج الهرمونى. اما مستقبل الهير-2 , فقد أظهر زيادة فى الخلايا المقاومة تقدر بحوالى ضعفين قيمته المعينه فى الخلايا الحساسة و ذلك بعد علاج كلاهما بالتموكسيفين. قد أظهرت النتائج زيادة متقاربة للمعاملات الآتية فى الخلايا الحساسة و المقاومة للتموكسيفن : المُعامل النووى كاباب, نوتش- 1,البيتا كتينين ,مستقبل عامل نمو البشرة و عامل البدء حقيقى النواة-4E . و قد نتج عن الدمج بين عقار التموكسيفن و العقاقير المستخدمة انخفاض كل هذة المُعاملات فى الخلايا الحساسة و المقاومة لعقار التموكسيفن.

و من ناحية أخرى فقد تم التحكم فى التعبير الجينى لكل من السيكلين-د1 و السيرفيفين و مُعامل موت الخلايا المبرمج بنسب متفاوتة مما يظهر مدى تشابك الاشارات الداخلية للخلايا و تباين تأثيرها على هذه المعاملات. كما أظهرت النتائج أن الدمج بين العقاقير المستخدمة و التموكسيفين أدى إلى انخفاض دلالة الخلايا الجذعية و المقاومة الهرمونية سوكس-2 .

وبتحليل المنظومة المعقدة للاشارات المتبادلة , فقد تم ملاحظة الدور الفعال لمستقبل الاستروجين-1 فى التأثير الغير جينى لعقار التموكسيفن على مسار الفوسفوانوسيتيد كيناز-3/الاكت/ام-تور .و يتصل هذا المسار مع النوتش-1 عبر المُعامل النووى كاباب.

و قد لوحظ أن الدمج بين عقار الداكتوليزيب و التاموكسيفن كان الاكثر تأثيراً من بين العقاقير المستخدمة على الاشارات الداخلية للخلايا. و يخرج الداكتوليزيب من إطار التأثير على مسار واحد إلى فكرة التأثير على أكثر من محور متشابك للاتصال بين الخلايا السرطانية مما نتج عنه انخفاض مقاومة الخلايا لعقار التموكسيفن.

بناءً على نتائج هذا البحث ,يمكن استنتاج التالى:

- تنتج مقاومة عقار التموكسيفن من التداخل بين عدة مسارات و أهمها مستقبل عامل نمو البشرة / مستقبل الهير-2 , عامل النمو المشابه للانسولين ,الونت, النوتش , ,مسار الفوسفوانوسيتيد كيناز-3/الاكت/ام-تور بالاضافة إلى اشارات مستقبل الاستروجين.
- يلعب مستقبل الاستروجين المقترن ببروتين الجوانين-1 دوراً اساسياً فى مقاومة الخلايا السرطانية للتموكسيفن عن طريق تحفيز الاشارات الغير- جينية لمستقبل الاستروجين.
- تهدف استراتيجية استهداف بروتينات الكينيز المرتبطة بجينوم الورم السرطانى إلى تحسين استجابة الخلايا المقاومة للتموكسيفن للعلاج الهرمونى.
- يعمل عقار اللانسيتينيب كمثبط انتقائى للكينيز لكل من مستقبل الانسولين ومستقبل عامل النمو المشابه للانسولين مما ينتج عنه تثبيط اشارات عامل النمو المشابه للانسولين-1 و التشويش على تداخله مع النوتش-1 ,الونت, المُعامل النووى كاباب ,الهير-2 و الاشارات الغير-جينية لمستقبل الاستروجين.
- يعمل عقار اللاباتينيب كمثبط لكل من مستقبل عامل نمو البشرة و مستقبل الهير-2 و بذلك يحسن من قدرة التموكسيفن على خفض كل من الهير-2 , النوتش-1 , المُعامل النووى كاباب , البيتا كتينين و مستقبل الاستروجين المقترن ببروتين الجوانين-1.
- أظهر عقار الجاماسكريتيز تأثيراً ضعيفاً على المسارات السابق ذكرها و يرجع ذلك إلى للاشارات الغير تقليدية للنوتش-1.
- مقارنة بمثبطات الكينيز المستخدمة فى البحث, فقد كان لعقار الدكتوليزيب التأثير الأقوى فى تحسين استجابة الخلايا لعقار التموكسيفن و ذلك عن طريق تأثيره على المسارات الاساسية المتحكمة فى الاشارات الداخلية للخلايا السرطانية و أهمهما اشارات منع الموت المبرمج و نمو وتكاثر الخلايا.

ولذلك فان عقار الدكتوليزيب يتطلب مزيداً من الابحاث المعملية و السريرية لتحديد مدى الاستفادة من الدمج بينه و بين التموكسيفن و تقييم تأثير هذا الدمج على تحسين الاستجابة للعلاج الهرمونى فى الخلايا المقاومة لعقار التموكسيفن.