Alexandria University
Medical Research Institute
Department of Pharmacology

Evaluation of the Potential Antitumor Effect of Honokiol Alone or in Combination with Sorafenib on Hepatocellular Carcinoma Cell Line

Thesis Submitted to Department of Pharmacology
Medical Research Institute- Alexandria University
In partial fulfillment of the requirements for the degree of
Master of Science

In

Pharmacology and Experimental Therapeutics

By

Amira Magdy Mansour
Bachelor of Pharmaceutical Sciences, 2011
University of Pharos

P.U.A. Library
Library C
Faculty of : Ph.D.M
Serial No : 217
Classification : 616.3

Medical Research Institute
Alexandria University

2017

الملخص العربي

يعتبر سرطان الخلايا الكبديه هو الاكثر شيوعا بين سرطانات الكبد كما يحتل المرتبه الخامسه بين اكثر انواع السرطان شيوعا في العالم. كما يعد سرطان الكبد السبب الرئيسي الثاني للوفيات الناشئه عن الاصابه بالسرطان. و في مصر يمثل سرطان الخلايا الكبديه 70 % من جميع الاورام التي تصيب الكبد. عالميا من اسباب حدوث سرطان خلايا الكبد الاصابه المزمنه بالتهاب الكبد الوبائي بي (80%) يليه الكبد الوبائي سي (20%) بالاضافه الي تعاطي الكحوليات و الغذاء الملوث بالافلاتوكسين و الاصابه بداء السكري.

ان تكوين و تطور سرطان الخلايا الكبديه هي عمليه متعددة المراحل يحكمها تراكم التعديلات الجينيه المسؤله عن تنشيط الجينات المسرطنه، و تعطيل الجينات المثبطه للورم مما يؤدي الي تعطل العمليات الخلويه الاساسيه.

و كثيرا ما يحدث تنشيط مسارات راس/راف/ام ايه كه/ايه ار كه و بي اي 3 كه/اكت/امتور بواسطة عوامل النمو و السيتوكينات. و يعتبر تفعيل مسار راس/ ام ايه بي كه المسؤول عن الانتشار الخلوي الاليه الرئيسيه لتطور سرطان الخلايا الكبديه.

وقد لوحظ ان تأخرظهور الاعراض التي تشير الي الاصابه بالمرض يؤدي الي اكتشافه في مراحل متقدمه يصعب معها العلاج. و تتنوع خيارات العلاج طبقا لنظام التدريج بي سي ال سي حسب مرحلة اكتشاف المرض ما بين الزرع و الاستئصال و التذريه لمراحل المرض المبكره، و تي ايه سي ايه كعلاج افضل للمرحله المتوسطه واخيرا العلاجات المستهدفه للمراحل المتقدمه.

عقار سورافينيب، مثبط ملتيكيناز، يستهدف راف كيناز وانشطة تيروزين كينيز الخاصه بمستقبل في إي جي إف-2 و 3 و مستقبل بي دي جي إف-بيتا و قد اجيز سورافينيب كأول دواء فعال لعلاج سرطان الخلايا الكبديه المتقدم إلا ان الاستجابه لعقار سورافينيب لا تزال غير مرضيه.

هونوكيول، مركب طبيعي يؤثر علي نمو الخلايا السرطانيه كما انه يساعد علي تنشيط الموت المبرمج للخلايا من خلال تثبيط ستات-3 بواسطة إس إتش بي-1 و تفعيل بي 38 إم إيه بي كه و كسباس-3 اللازم لبدء إشارة موت الخلايا المبرمج في خطوط الخلايا الكبديه البشريه. هذه الاكتشافات ألقت الضوء علي الهونوكيول كعلاج محتمل إما منفردا أو بالاضافه إلي العلاجات الاخري، التي يمكن ان تمنع كل من الأورام الأوليه و التنقليه وتساهم في التغلب علي مقاومة الجسم للعلاج و الحد من السميه المرتبطه بالعلاج الكيميائي.

و قد اجريت هذه الدراسه لبحث تأثير الهونوكيول إما منفردا أو مجتمعا مع عقار سورافينيب في علاج سرطان الكبد. تم تقييم هذه التأثيرات من خلال قياس مستويات التعبير البروتيني لعوامل النمو المختلفه و عوامل النسخ و جزيئات الإشاره مثل بروتين الراس النشط، بروتين الأكت، معامل النمو إتش جي إف، معامل بدء الترجمه-4 اي ، ستات-3، منظم دورة الخليه سيكلين دي-1، بروتين موت الخلايا المبرمج باكس، نشاط الإتزيم كاسباس-3، إتش اي إف-1 الفا و في ايه جي إف.

الملخص العربي

و قد اجريت هذه الدراسه علي خط خلايا هيج-2 . و قد اجريت قياسات لحيوية الخلايا و فحوصات السميه الخلويه باستخدام إم تي تي و تحليل البروتينات التراكمي بواسطة الإليزا.

و تؤدي عوامل النمو دورا حاسما في تفعيل مسارات الإشارات المختلفه مثل راس/راف/إم ايه بي كه و مسارات بي أي 3 كه/اكت/إمتور التي تعتبر ضروريه لنقل إشارات الإنتشار و إشارات البقاء علي قيد الحياه من المستقبلات خارج الخليه إلي النواه لتعديل مختلف الوظائف الخلويه لصالح نمو سرطان الخلايا الكبديه.

يتميز راس النشط بقدرته علي تحفيز مؤثرات فعاله في عدة مسارات مثل بروتين الراف و ال بي أي 3 كه لتنشيط كلا من المسارات راس/راف/إم ايه بي كه و بي أي 3 كه/أكت/إمتور. في الدراسه الحاليه، أحدث الهونوكيول منفردا انخفاضا بمستوي التعبير البروتيني لبروتين راس النشط، و لكن الهونوكيول مع السورافينيب مجتمعين احدثا مزيدا من الإنخفاض في مستوي التعبير لبروتين راس النشط، إلا أن هذا الإنخفاض لم يكن ذا دلاله إحصائيه مقارنة بكل عقار منفردا.

يعمل بروتين راس النشط علي تنشيط البروتين راف في غشاء الخليه الذي ينشط إم إيه كه و بالتالي تنشيط بروتين إيه ار كه 2/1 ليصل إلي نواة الخليه و يفعل نسخ الجينات المستهدفه. يؤدي تناقص تنشيط بروتين الراس إلي إزالة فسفرة بروتين إيه ار كه2/1 التي تكون اهدافها النهائيه هي بي 70 إس 6 كيناز ، منك-1 و سي-فوس.

تثبيط بي 70 إس6 كيناز يقلل من التعبير البروتيني لبروتين إتش اي إف-1الفا، تثبيط منك-1 أدي إلي إنخفاض مستوي التعبير البروتيني للصوره المفسفره لمعامل بدء الترجمه-4 اي الذي ينظم نسخ مختلف الاهداف مثل سيكلين دي-1، إتش أي إ ف-1 الفا و في إي جي إف. و اخيرا، تثبيط بي 38 إم أيه بي كه عن طريق تقليل بروتين راس النشط، يقلل التعبير البروتيني ل سي-فوس و منك-1 .

علاوة علي ذلك، فان مسار بي اي 3 كيه/اكت/متور ينظم الانتشار الخلوي، البقاء علي قيد الحياه، الغزو، التمثيل الغذائي و تكاثر الاوعيه الدمويه. و بالمثل، بي اي 3 كيه يتم تنشيطه عن طريق بروتين راس النشط، الذي ينشط بروتين اكت الذي ينظم اهدافه مثل مركب متور-1. كما هو مبين في نتائجنا، تثبيط فسفرة البروتين اكت من قبل الهونوكيول منفردا او مجتمعا مع سورافينيب يمنع مركب متور-1 و اهدافه مثل بي 70اس 6 كيناز.

تفعيل ستات-3 من خلال الفسفره يؤدي الي تنشيطه و نقله الي النواه لتحفيز نسخ العديد من الجينات و هي سيكلين دي-1، اتش اي اف-1 الفا و الفي اي جي اف. و اظهرت النتائج الحاليه ان الهونوكيول منفردا خفض مستوي التعبير البروتيني لستات-3 المفسفر من خلال تثبيط سي-سرك، جاك 2/1 و اس اتش بي-1. و مع ذلك، ادي العلاج بالسورافينيب الي المزيد من الانخفاض في مستوي تعبيرستات-3 المفسفر.

في هذه الدراسه، تم تقييم مستوي التعبير البروتيني لمختلف الاهداف لمسارات راس/ام ايه بي كيه و بي اي 3 كيه/اكت/متور. بدا من معامل بدء الترجمه-4 اي كعامل اساسي لبدء ترجمة العديد من الجينات بينها سيكلين دي-1 كمنظم لدورة الخليه، اتش اي اف-1الفا و الفي اي جي اف كعلامات لصنع الاوعيه الدمويه الجديده.

و قد انخفض مستوي معامل بدء الترجمه- 4اي المفسفر عند العلاج بالهونوكيول منفردا او مجتمعا مع السورافينيب و يعزي ذلك لتثبيط اشارة راس/راف/منك-1 او بي اس 3 كيه/اكت/متور.

تم تخفيض التعبير لسيكلين دي-1 بواسطة الهونوكيول وحده او بالاشتراك مع سورافينيب، و لكن الجمع بينهما انتج انخفاضا اكثر وضوحاعلي مستوي تعبير سيكلين دي-1 بالمقارنه مع كل دواء منفردا. و يمكن ان يعزي ذلك الي تثبيط مزدوج لمنظمين سيكلين دي-1 مثل سي-فوس، ستات-3 و معامل بدء الترجمه 4 اي بواسطة الهونوكيول و السورافينيب.

لفهم افضل لتأثير الهونوكيول منفردا او مجتمعا مع السورافينيب علي موت الخلايا المبرمج، تم قياس تعبير البروتين باكس و نشاط الانزيم كاسباس-3. و قد كشفت النتائج ان تعرض خلايا هيج-2 الي الهونوكيول منفردا ادي الي زياده في مستوي تعبير البروتين باكس كنتيجه محتمله لتنشيط مسار البي 53 و تثبيط مانع النسخ هستون دياستيليز-1 ذلك بالاضافه الي زياده في نشاط الانزيم كاسباس-3. و قد ادي تعرض الخلايا للعقارين معا الي زياده اضافيه في تعبير البروتين باكس و نشاط الانزيم كاسباس-3 .

علي الرغم من انخفاض مستوي التعبير البروتيني للاتش اي اف-1الفا تحت ظروف ضغط الاكسجين الطبيعي انخفاضا ذا دلاله احصائيه عند العلاج بالهونوكيول. كان السورافينيب اكثر فاعليه عن الهونوكيول في خفض تعبير الاتش اي اف-1الفا من خلال نشاطه المثبط عديد من التيروزين كيناز و تثبيط تنشيط مسار الراس/راف/ام ايه بي كيه و مسار البي اي 3 كيه/اكت/متور علي مستويات متعدده كما ورد في الدراسه الحاليه. لذلك، فان انخفاض مستوي تعبير الاتش اي اف-1 الفا علي العلاج بالهونوكيول و السورافينيب مجتمعين قد يعزي الي تأثير عقار سورافينيب.

من المثير للاهتمام ان تعرض الخلايا لعقار الهونوكيول منفردا او مجتمعا مع السورافينيب ادي الي انخفاض مستوي التعبير البروتيني للفي اي جي اف.

و يتضح مما سبق ان الهونوكيول منفردا قد اظهر العديد من التأثيرات المضاده للاورام مثل تثبيط التعبير البروتيني لكلا من بروتين راس النشط، بروتين اكت، ستات-3 المفسفر، فسفرة معامل بدء الترجمه-4اي، سيكلسن دي-1، اتش اي اف-1الفا و الفي اي جي اف. بجانب زيادة التعبير البروتيني للبروتين باكس و زيادة نشاط النزيم كاسباس-3 .و عند استخدام العقارين معا، كان لذلك تأثيرا اقوي علي تعبير البروتينات في هذه الدراسه. اما فيما يتعلق بتخفيض التعبير البروتيني لكلا من ستات-3، اتش اي اف-1 الفا و زيادة نشاط الانزيم كسباس-3 فقد كان عقار السورافينيب اكثر فاعليه عن الهونوكيول.