جامعة الإسكندرية
ALEXANDRIA UNIVERSITY

Accredited 2016
National Authority for Quality Assurance & Accreditation of Education

Institute of Graduate Studies and Research
Department of Biotechnology

Biotechnological study on the role of active component isolated from Piperaceae family on hepatocellular carcinoma treatment

A Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science

In

Biotechnology

Presented by

Maram Yasser Ahmed Mahmoud El-Mansy

B.Sc. Pharmacy, Faculty of Pharmacy,
Pharos University, 2012

P.U.A. Library
Thesis No: 793
660.6

2018

الملخص العربي

المقدمة

يعتبر سرطان الكبد الذى يشار له بـ HCC ورم كبدي خبيث شائع و مشكلة صحية عامة كبيرة في العالم ككل. ويتزايد معدل حدوثه بنسبة من ٣ إلى ٩ % كل عام. أنه ثاني سبب للوفاة الناجمة عن السرطان في العالم. إنه يرتبط بضعف التكهن بالمرض وذلك لأن سرطان الكبد HCC ورم توسعي بخيارات علاج محدودة. في مصر يتزايد حدوث سرطان الكبد HCC حيث تضاعف معدل الحدوث في العشر سنوات الماضية. وهذا بسبب الإصابة بـ HCV وهو أحد عوامل الخطورة المتعلقة بـ سرطان الكبد HCC ومصر بها أعلى نسبة من HCV في العالم حيث أن ١٨ % من السكان مصابين به، وبناء عليه يزداد معدل تعرض المرضى للتليف المتعلق بـ HCV ثم الإصابة بـ سرطان الكبد HCC بعد ذلك. حيث أن أكثر من ٨٠ % من حالات سرطان الكبد HCC تحدث لمرضى يعانون من التليف. وبناء عليه نحن في أمس الحاجة لاستراتيجيات علاجية جديدة للتعامل مع سرطان الكبد HCC .

تلعب المنتجات الطبيعية دور هام كمصدر فعال للمكونات المضادة للأورام. حيث أنه حوالي ٨٠ % من المكونات العلاجية للسرطان المستخدمة حاليا مأخوذة من منتجات طبيعية. ومن أحد هذه المنتجات Piperlongumine (PL) ويطلق عليه أيضا Piplartine، إنه عنصر قلوى موجود في عائلة ال Piperaceae، وعلى وجه الخصوص في ثمرة Long Pepper (Piper Longum Linn). وقد أثبتت الدراسات الحديثة أن Piperlongumine له خصائص خاصة مضادة للسرطان، حيث إنه يقوم بقتل الخلايا السرطانية ويحافظ على الخلايا الأخرى. وبناء عليه يعتبر Piperlongumine عنصر فعال يوصي به لعلاج السرطانات في المستقبل. عقار ال Doxorubicin (DOXO) من أهم العقاقير المعترف بها من منظمة الغذاء و الدواء العالمية فى علاج السرطان و خاصة سرطان الكبد. و لكن وجود مضاعفات خطيرة له و سرعة حدوث مقاومة له من الجسم يحد من إستخدامه. و لذلك حديثا أصبح يفضل إستخدام العقارات المدمجة.

و من الجدير بالذكر أن هناك العديد من المسارات الخلوية التي تؤثر على سرطان الكبد HCC و من أهمها المسار الخلوى RAS/ERK الذى يؤدي دورًا جوهريًا في تنظيم العديد من العمليات الحيوية بداخل الخلية، فهو يلعب دور هام في نمو الخلية واستمرارها وتكاثرها وتميزها وهذا بالاضافة الى دوره الهام فى تكوين الأورام. إذ أن نشاطه الغير طبيعي ملحوظ في عدد من السرطانات البشرية شاملة سرطان الكبد HCC. بروتين ال P- ERK١/٢ هو الشكل المفسفر من بروتين ERK١/٢ وهو يعتبر مكون أساسي فى مسار Ras / Raf / MEK / ERK. و قد أثبتت العديد من الدراسات وجود بروتين P-ERK 1/2 في الصورة النشطة بسرطان الكبد HCC المتواجد في الأجسام الحية ونماذج أنسجة سرطان الكبد HCC البشرية مقارنة بالأنسجة المحيطة بالكبد الغير مصابة بالسرطان. حيث أن مسار Ras/ERK يلعب دور أساسي في كافة الوظائف البيولوجية المعروفة التي تحدث أثناء نمو الأورام البشرية.

بروتين ال β-catenin هو مادة وسيطة أساسية لمسار ال WNT موجودة في ٣ مناطق خلوية: في وصلات التماسك الخلوى (يشار لها بـ AJ) لتثبيت الاتصال بين الخلية والخلية المجاورة والجدار الخلوى والنواة. حيث أنه المسئول عن زيادة بروتينات معينة فى الخلية بما في ذلك Cyclin D1 وc-MYC وSurvivin المسئولين عن انتقال وتوسيع وانتشار الخلايا وتطور دورة الخلية. وقد وجد أن المسار الخلوى WNT/β-catenin يوجد بصورة غير منتظمة فى ٩٥ % من حالات سرطان الكبد HCC. وعادة يتم ملاحظة زيادة وجود و الانتقال النووى لبروتين β-catenin في الخلايا الكبدية التي يكون بها انتشار خلوى غير طبيعي و خلايا سرطان الكبد HCC . بروتين ال cyclin D1 من البروتينات الأساسية التى تحتاجها الخلية لتطور دورتها من ال G1 إلى ال S. و قد لوحظ زيادة وجوده بخلايا سرطان الكبد HCC. حيث أن عدم إنتظام المسران الخلويان Wnt/β-catenin و Ras/ERK فى خلايا سرطان الكبد HCC يؤثران على وجوده و زيادته بها.

بروتين ال p53 هو الحامي الأساسي للجينوم. البروتين المقاوم للورم p53 تثبيطه وظيفيا و جوده فى الصورة الغير نشطة يؤدى لحدوث الأورام ويساعد على ظهور الجينومات الغير مستقرة في ٥٠ % من السرطانات البشرية. بروتين ال p53 هو أكثر البروتينات التى توجد بصورة غير نشطة في السرطان البشري وخاصة سرطان الكبد HCC. ويرتبط شكله الغير نشط بتكوين الورم و أنتشاره. بروتين ال p21 يعتبر البروتين الأكثر استهدافا من ضمن العديد من المنتجات الجينية المستهدفة من بروتين ال p53. إنه عضو من عائلة CIP/KIP الخاصة بمثبطات cyclin dependent kinases (CDK) والتي تعتبر مثبط شامل لتطور دورة الخلية. ويلاحظ إنخفاض معدل ال p21 بكثرة في حالات سرطان الكبد. ويعتبر عدم إنتظام المسار الخلوى p53-p21 عنصر اساسي مرتبط بحدوث سرطان الكبد HCC.

الهدف من الدراسة

لقد ركزت الدراسة التالية على فحص تأثير ال PL كمضاد لسرطان الكبد على حيوية وانتشار خلايا السرطان الكبدى HepG2. وقد قمنا بتقييم أثر ال PL على مستوى تواجد ال P-ERK1/2 كبروتين له تأثير خاص بمسار RAS/ERK. وقمنا أيضا بفحص آلية مكافحة السرطان الخاصة بـ PL من خلال اختبار تأثيره على بروتينات سرطانية مختلفة مثل β-catenin و cyclin D1. و هدفت الدراسة أيضا لفحص أثر PL, DOXO أو الجمع بينهما على مثبط الورم p53 و p21 المستهدف من قبله وأخيرا فحص قدرة PL, DOXO أو الجمع بينهما على إحداث موت مبرمج لخلايا السرطان الكبدى HepG2 من خلال الحث على الموت المبرمج للخلايا و الحث على تنشيط بروتين ال Caspase-3.

الطرق

تم تجريب حيوية الخلية (MTT assay) على خلايا سرطلن الكبد HepG2 المعالجة بال PL بعد ٤٨ ساعة لتقييم IC_{50} الخاصة بها. وفحصنا أيضا التغير المورفولوجي لخلايا ال HepG2 المعالجة بتركيزات مختلفة من PL، DOXO أو العلاج المدمج. وبالإضافة لذلك تم الكشف عن الحث على نشاط بروتين ال caspase-3 و الحث على الموت المبرمج للخلايا بعدعلاج الخلايا بال PL، DOXO أو العلاج المدمج. وعلاوة على ذلك قمنا بفحص مستوى الظهور البروتيني لـ P-ERK1/2 ، β-catenin، cyclin D1، p53 و p21 من قبل Western blot analysis. وأخيرا تم استخدام Immunocytochemical assay لتحديد مدى التمركز فى النواه والجدار الخلوى لـبروتين ال β-catenin المسبب للأورام.

النتائج والاستنتاج

وأخيرا يقوم ال PL بعمل تأثيرات مضادة للسرطان في خلايا HepG2 وقد تم الاستدلال على ذلك من النقص الواضح في حيوية وانتشار خلايا HepG2 بعد علاج استمر لمدة ٤٨ ساعة بشكل يعتمد على التركيز. وبالإضافة لوجود تغير مورفولوجي، كان هناك حث على نشاط بروتين ال caspase-3 و الموت المبرمج للخلايا من قبل PL في خلايا HepG2 بعد علاج استمر لـ ٤٨ ساعة. وعلى المستوى البروتينيPL قلل من وجود بروتين ال P-ERK1/2 وβ-catenin ومنظم دورة الخلية الأساسيcyclin D1 مما يوصي بعلاقة متبادلة بينهم لمنع حدوث سرطان كبد.

ومن ناحية أخرى، فقد رفع ال PL من معدلات المثبط للورم والحامي الأساسي للجينوم، p53 ومثبط دورة الخلية p21. وتم التأكيد على تأثير ال PL على بروتين ال β-catenin من قبل Immunocytochemical analysis (ICC) مما أوضح نقص في التمركز فى النواة والجدار الخلوى وكثافة ال β-catenin مقارنة بالخلايا الغير معالجة. وعلاوة على ذلك أثبت العلاج المدمج الخاص بـ PL و DOXO تأثير أقوى على التغير المورفولوجى والموت المبرمج للخلايا ونشاط بروتين ال caspase-3 ومستوى البروتين p53 و p21 مقارنة بكل مركب على حده مما يوصي بتأثير مشترك بين PL وDOXO على الخلايا السرطانية الكبدية البشرية التي يطلق عليها HepG2.