A Comparative Study of the Additive Effect of Rosuvastatin, Omega-3 or Captopril on the Antitumoral Activity of Doxorubicin in Experimentally -Induced Hepatocellular Carcinoma in Mice

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

Of

Master

In

Pharmacology and Experimental Therapeutics

By

Ibrahim Elsayed Mohammed

B Sc Pharmaceutical Science (2006)
Alexandria University
Demonstrator - Department of Pharmacology and Toxicology - Pharos University

Medical Research Institute
Alexandria University
2013

الملخص العربى

فى جميع أنحاء العالم يعتبر سرطان الكبد هو السرطان الخامس الأكثر شيوعا والسبب الثالث الأكثر شيوعا للوفاة المتصلة بالسرطان. ويعتبرسرطان الكبد الغير مستأصل أو المنتشر من المضاعفات الخطيرة أيضا ، والعلاج المنهجى باستخدام العوامل السامة للخلية يوفر فائدة هامشية. غالبية المرضى (أكثر من ٨٠%) يعانون من سرطان كبد متطور، حتى المرضى الذين تم استئصال جزء من الكبد احتمال حدوث المرض مرة أخرى لديهم يتجاوز ٥٠% فى خلال عامين. وقد تم تقييم العديد من الأدوية المختلفة (عوامل العلاج الكيميائى النظامية لعلاج سرطان الكبد). ولكن كانت النتائج مخيبة للآمال وربما يكون هناك عدة أسباب لذلك:

أولا: عقد الورم تتضاعف ببطئ الذى يجعلها مقاومة نسبيا.

ثانيا: لقد تم تعزيز هذه المقاومة من قبل التعبير عن الجينات المقاومة للأدوية المتعددة، كما أن عوامل العلاج الكيميائى استخراج الكبد لها منخفض.كما يعتبرمقاومة سرطان الكبد لموت الخلايا المبرمج هو جانب حاسم فى علاج السرطان لأنه يضعف فعالية نظم العلاج المختلفة

ويشيع استخدام دوكسوروبيسين لعلاج سرطان الكبد وله قيمة هائلة لا جدال فيها فى علاج مجموعة متنوعة من الأمراض الخبيثة الصلبة والدموية ومع ذلك لدى عقار دوكسوروبيسين مشكلة قاتلة وهى اعتلال عضلة القلب.اعتلال عضلة القلب الناتج عن دوكسوروبيسين من الممكن أن يتطور فى وقت متأخر (عشر سنوات) بعد التوقف عن الدواء.على الرغم من عدم توضيح آلية اعتلال عضلة القلب الناجم عن دوكسوروبيسين بشكل واضح يعتبر تكوين الأكسدة الأكثر احتمالا من بين الآليات المقترحة والتى تشمل تثبيط الأحماض النووية والبروتين، تكوين أنواع الأكسجين التفاعلية والإفراج عن الأمينات الفعالة فى الأوعية وحدوث موت مبرمج للخلايا.

لهذه الأسباب فى هذه الدراسة الحالية محاولة لإيجاد تركيبة جديدة مع دوكسوروبيسين ضد مرض سرطان الكبد لزيادة تأثيره فى الموت المبرمج للخلايا وتقليل تأثيره فى اعتلال عضلة القلب فهناك ثلاثة أدوية مختلفة كابتوبريل (مثبط أنزيم تحويل أنجيوتنسين)، روزفاستاتين (مانع تكوين الكوليسترول) و أوميجا-٣ (أحماض دهنية غير مشبعة) تم استخدامهم لزيادة فاعلية الدوكسوروبيسين والحد من اعتلال عضلة القلب.

تم تقسيم فئران بيضاء ذكور (عمر من ستة أسابيع إلى ثمانية أسابيع) إلى ست مجموعات.

المجموعة (١) (المراقبة السلبية): الفئران تم حقنها فى داخل الغشاء البريتونى بـ ملح الفوسفات العازل.

المجموعة (٢) (مجموعة DEN): حثت الفئران لحدوث سرطان الكبد عن طريق حقن DEN بجرعة ٧٥مجم/كجم فى الغشاء البريتونى مرة واحدة أسبوعيا لمدة ثلاث أسابيع تتم بجرعة ١٠٠ مجم/كجم لمدة ثلاث أسابيع أخرى وبعد التأكد من حدوث سرطان الكبد فى نهاية الأسبوع الثامن تم تقسيم هذه الفئران فى أحد المجموعات التالية:

- **المجموعة (٢) أ** (مجموعة دوكسوروبيسين): تم حقن الفئران بجرعة دوكسوروبيسين (١٢مجم/كجم) مقسمة على أربع جرعات متتالية فى الغشاء البريتونى بداية من الأسبوع التاسع.
- **المجموعة (٢) ب** (مجموعة الروزفاستاتين): تم حقن الفئران بنفس طريقة المجموعة (٢) أ ولكن بإضافة دواء الروزفاستاتين ٢٠مجم/كجم يوميا لمدة ٢١ يوم عن طريق الفم.
- **المجموعة (٢) ج** (مجموعة الكابتوبريل): تم حقن الفئران بنفس طريقة المجموعة (٢) أ ولكن بإضافة دواء الكابتوبريل ٢٥مجم/كجم يوميا لمدة ٢١ يوم عن طريق الفم.
- **المجموعة (٢) د** (مجموعة الأوميجا-٣): تم حقن الفئران بنفس طريقة المجموعة (٢) أ ولكن بإضافة دواء الأوميجا-٣ ١جم/كجم يوميا لمدة ٢١يوم عن طريق الفم.

فى نهاية فترة العلاج، تم التضحية بالفئران عن طريق خلع العنق. تم عزل أنسجة الورم والقلوب مبردة على الثلج على الفور وتم وزنها. تم تقسيم كل كبد أو قلب إلى عدة أجزاء لمزيد من التقييم. وأجريت بعض التقيمات على الفور بعد التضحية، أما الأجزاء المتبقية من عينات الكبد أو القلب تم الاحتفاظ بها فى المجمدة -٨٠° سيلزيوس حتى استخدامها.

عند فحص أنسجة الكبد تحت الميكروسكوب المجهرى وجدنا:

الفئران التى عولجت بـ (DEN) عانت من سرطان كبد (جيد أو معتدل التباين) بعد نهاية الأسبوع الثامن من حقن مادة DEN مع حدوث ورم بنسبة ١٠٠% (٨/٨) مع عدم وجود موت مبرمج للخلايا.أما فئران الدوكسوروبيسين أيضا لم يحدث لها موت مبرمج للخلايا على العكس مجموعات الكابتوبريل ، الروزفاستاتين والأوميجا-٣ قد تسببت فى حدوث موت مبرمج للخلايا بنسبة أكبر من الدوكسوروبيسين وحده. ومجموعة الكابتوبريل والروزفاستاتين تسببت بحدوث موت مبرمج للخلايا أكثر من مجموعة الأوميجا-٣.

وقد تم استخدام عامل نمو بطانة الأوعية الدموية (VEGF) لتقييم تكوين الأوعية الدموية فى كبد الفأر. وتم العثور على أعلى تركيز من عامل نمو بطانة الأوعية الدموية (VEGF) فى مجموعة (DEN) أكثر من أى مجموعة أخرى.واستطاعت مجموعات الكابتوبريل , الروزفاستاتين والأوميجا-٣ التقليل من هذا العامل (VEGF).

وقد تم قياس النسبة المئوية لبقاء الخلية السرطانية باستخدام طريقة الاستبعاد التربيان الأزرق. كما هو متوقع تراوحت النسبة المئوية لبقاء الخلية السرطانية فى الفئران المعالجة بمادة (DEN) من (٩٩% - ٩٥%) ومع ذلك انخفض نسبة بقاء الخلية السرطانية بشكل كبير فى كل المجموعات الأخرى مجموعة دوكسوروبيسين، كابتوبريل، روزفاستاتين ومجموعة الأوميجا-٣.ومع ذلك أظهرت المجموعات المعالجة (الكابتوبريل والروزفستاتين) أعلى انخفاض فى بقاء الخلايا السرطانية.

ولقد تم تقييم التعبير عن الجزيئات المضادة أو المؤيدة للموت المبرمج للخلية ("بى-سى-إل-إكس" - "باك") فى أنسجة الورم. كان التعبير عن (باك) صفر فى خلايا السرطان الكبد المستحدث بمادة DEN، وكان (+٣) فى مجموعات الكابتوبريل والروزفاستاتين، وكان (+٢) فى مجموعة الأوميجا-٣ وكان (+١) فى مجموعة الدوكسوروبيسين. أما بالنسبة لمعدل الـ (بى سى إل – إكس) لم يختلف فى أى مجموعة عن الأخرى.

عند فحص أنسجة القلب تحت الميكروسكوب المجهرى وجدنا:

١- القلب المستخرج من مجموعة الدوكسوروبيسين قد تدهورت الألياف القلبية (Purkinje fibers)مع اختفاء النواة بها.
٢- القلب المستخرج من مجموعة الكابتوبريل والروزفاستاتين ومجموعة الأوميجا-٣ يوضح انخفاض فى معدل السمية من عقار الدوكسوروبيسين.

وعند فحص قياس عامل (TNF-∝)، عامل(MDA) والنشاط المضاد للأكسدة (SOD) و (GSH) أظهرت النتائج ارتفاع فى عامل (TNF-∝)و عامل(MDA) وانخفاض فى معدل (SOD) و (GSH) فى مجموعة الدوكسوروبيسين وعلى العكس من ذلك فقد حدث انخفاض ملحوظ فى عامل(TNF-α) وارتفاع واضح فى معدل (SOD) و (GSH) فى بقية المجموعات المعالجة. اما بالنسبة لعامل (MDA) فقد ارتفع في مجموعة الاوميجا -٣ و انخفض انخفاضا ملحوظا في مجموعتى الكابتوبريل و الروزفاستاتين.

خلال فترة العلاج كان معدل الوفيات ما يقرب من ٩٥% فى مجموعة دوكسوروبيسين وحوالى ٧٠% فى مجموعة الأوميجا-٣ ومع ذلك وقعت أعلى انخفاض فى معدل الوفيات فى مجموعة الكابتوبريل ومجموعة الروزفاستاتين حيث وصلت إلى ٥٠% وقد أظهرت الفئران التى عولجت بدواء الدوكسوروبيسين خسارة كبيرة فى وزن القلب وحدث أيضا تضخم فى البطن وتضخم الكلى والكبد ولكن إضافة الكابتوبريل أو الروزفاستاتين أو الأوميجا-٣ قلل من حدوث ذلك.

فى النهاية يمكننا القول بأن إضافة كل من الكابتوبريل و الروزفاستاتين أو الأوميجا-٣ قد تزيد من تأثير الدوكسوروبيسين على خلايا الكبد السرطانية من خلال زيادة موت الخلايا المبرمج ووقف تكوين الاوعية الدموية، وتقلل من تأثيره السام على خلايا القلب.