



Alexandria University

Medical Research Institute

Department of Pharmacology and Experimental Therapeutics

**Evaluation of the Potential Antitumor Effects of Berberine and
Diosmin Alone or in Combination with Tamoxifen on Breast
Cancer Cell Lines**

Thesis

Submitted to the Medical Research Institute- Alexandria University
In partial fulfillment of the requirements for the Degree of

Master of Science

In

Pharmacology and Experimental Therapeutics

By

Dina Saleh Moussa Hany

Bachelor of Pharmaceutical Sciences
Pharos University in Alexandria, 2011

Medical Research Institute

Alexandria University

2016

الملخص العربي

سرطان الثدي هو السرطان الأكثر انتشارا بين السيدات. و قد أدى وجود العلاجات الهرمونية ذات الفاعلية الملحوظة، إلى تحسين التكهن بالمرض والبقاء على قيد الحياة. و لأكثر من ثلاثة عقود، يمثل التاموكسيفين العلاج القياسي و الكفاء لسرطان الثدي الموجبة لمستقبلات الإستروجين. وبالرغم من ذلك، يمثل حدوث المقاومة للعلاج بالتاموكسيفين مشكلة رئيسية. و قد تم اكتشاف عدة آليات ذات علاقة متبادلة لها دور كبير في حدوث تلك المقاومة. و في هذه الدراسة، تم التركيز على بعض الجزيئات الإشارية التي ساهمت في حدوث المقاومة للتاموكسيفين مثل: السيكلين دي ١ ، البي ٥٣ ، الهير ٢ ، الأي جي إف ١ ، عامل نسخ نووي كابا بيتا ، الفنت/بيتا كاتينين وعامل نمو بطانة الاوعية الدموية، كمحاولة لإيجاد مجموعات واعدة وجديدة وفعالة لتعطي مجتمعة مع عقار التاموكسيفين. و لقد تم تقييم تأثير اثنين من المنتجات الطبيعية، و هما: البربرين و الدايزومين كعوامل مضادة للورم سواء كل منهما علي حدا أو مجتمعين مع التاموكسيفين على خطين لخلايا سرطان الثدي و هما: الإم سي إف ٧ المصنفة كموجبة لمستقبلات الإستروجين، و خط الخلايا إم سي إف ٧/إل سي سي المقاومة للتاموكسيفين.

و لتقييم تأثير هذه الأدوية على الانتشار الخلوي، تم إجراء تقييم للتعبير البروتيني لمنظم دورة الخلية السيكلين دي ١. حيث وجد أن السيكلين دي ١ يرتبط ويقوم بتفعيل مستقبلات الإستروجين بطريقة غير معتمدة علي وجود محفز، كما يمنع تثبيطها من قبل التاموكسيفين، وبالتالي يساهم في حدوث المقاومة. و في الدراسة الحالية، أدى العلاج بكل من الدايزومين والبربرين مجتمعين مع التاموكسيفين إلى تثبيط ذو دلالة إحصائية في التعبير البروتيني للسيكلين دي ١ بالمقارنة مع الزيادة الناتجة من العلاج بالتاموكسيفين منفردا، في خطوط خلايا الإم سي إف ٧ و الإم سي إف ٧/إل سي سي ٢. و علاوة على ذلك، من أجل صورة أكثر تفصيلا للتأثير على انتشار الخلايا وتوازنه مع موت الخلايا المبرمج، فقد تم قياس نشاط إنزيم الكاسباز ٣ و التعبير الجيني للجين المثبط للورم و هو البي ٥٣. و قد أظهر العلاج المجمع للبربرين مع التاموكسيفين زيادة ذات دلالة إحصائية في نشاط الكاسباز ٣ في كلا من خطوط الخلايا، في حين أظهر العلاج المجمع بين الدايزومين مع التاموكسيفين زيادة ذات دلالة إحصائية في خطوط خلايا الإم سي إف ٧ فقط. و نظرا لأن فقدان التعبير للبي ٥٣ بالإضافة إلي فقدان وظيفته أثناء عملية تكون الأورام يؤدي إلي تثبيط عمل مستقبلات الإستروجين، فإنه بالتالي، يؤدي إلي عدم الاستجابة للتاموكسيفين. و قد أظهرت هذه الدراسة أن النظامين العلاجيين بالبربرين أو الدايزومين مع التاموكسيفين قد أظهرتا زيادة ذات دلالة إحصائية في التعبير الجيني للبي ٥٣ في خطوط الخلايا المقاومة للتاموكسيفين، و خاصة في الخلايا المعالجة بالبربرين و التاموكسيفين. مما يدل علي أن تأثير كلا من العقارين مع التاموكسيفين على انتشار الخلايا وموتها المبرمج يعتمد على تنظيم السيكلين دي ١، الكاسباز ٣ و البي ٥٣.

تمثل مستقبلات الاستروجين عاملا مهم في عملية بدء سرطان الثدي وتقدمه. و من الآليات الكامنة وراء المقاومة للتاموكسيفين هي قدرة الخلايا السرطانية علي تنشيط مستقبلات الإستروجين بطريقة غير معتمدة علي وجود محفز. حيث يتم فسفرة مستقبلات الإستروجين عن طريق مستقبلات الأغشية المحركة للتيروزين مثل مستقبلات عامل النمو: الهير ٢ و الأي جي إف ١ أ.ر. مما يؤدي إلى تفعيل وتعزيز مسارات الإشارة اللاحقة التي تؤدي إلى زيادة في الانتشار الخلوي، والتمايز، والقدرة علي البقاء والأهم من ذلك، المقاومة للتاموكسيفين. في هذه الدراسة، أظهر العلاجيين المجمعين للدايزومين والبربرين مع التاموكسيفين تثبيط للهير ٢ على مستوى التعبير الجيني والبروتيني بالمقارنة مع العلاج بالتاموكسيفين منفردا. و علي مستوى التعبير الجيني، فإن تأثير العلاج المجمع للبربرين كان أعلى في خلايا الإم سي إف ٧، في حين أظهر العلاج المجمع للدايزومين تأثيرا أعلى في خلايا الإم سي إف ٧/إل سي سي ٢. وبالمثل، فإن العلاجيين قد أظهرتا تثبيطاً للأبي جي إف ١ على مستوى التعبير الجيني والبروتيني بالمقارنة مع التأثير الناتج عن العلاج بالتاموكسيفين علي حدا، في خطوط الخلايا المقاومة للتاموكسيفين.

و من أحد أهم الجزيئات التنظيمية الرئيسية التي تمثل رابطة آلية مشتركة في المقاومة الهرمونية هو عامل النسخ النووي كابا بيتا حيث يرتبط بتفعيل عامل النسخ النووي كابا بيتا بفقدان تعبير مستقبلات الإستروجين ، وبالمثل، فقد وجد أن تفعيل مستقبلات الإستروجين يسبب تثبيط عامل النسخ النووي كابا بيتا. و في الواقع، هذا التثبيط المتبادل قد أوضح أن أي زيادة في كل من ارتباط عامل النسخ النووي كابا بيتا بالحمض النووي والتعبير عن الجينات المستهدفة من قبل عامل النسخ النووي كابا بيتا تكون مصحوبة بتحول الخلايا إلى عدم الاعتماد علي هرمون الإستروجين في سرطان الثدي. كما وجد أيضا أن الهير ٢ و الأبي جي إف ١ من العوامل المشاركة في تنظيم عامل النسخ النووي كابا بيتا. و في سرطان الثدي، قد يسبب عقار التاموكسيفين تنشيط لعامل النسخ النووي كابا بيتا ، مما يؤدي إلي زيادة في مسارات الإشارة لانتشار سرطان الثدي، والمساهمة في المقاومة الهرمونية. و في هذا البحث، أظهر العلاجيين

المجمعين للدايوزمين والبربرين كلا مع التاموكسيفين تثبيطا للتعبير الجيني ولفسفرة بروتين عامل النسخ النووي كابا بيتا في كلا من خطوط الخلايا بالمقارنة مع التنشيط الناجم عن العلاج بالتاموكسيفين وحده.

و من مسارات الإشارة الهامة التي تلعب دورا مؤثرا في قدرة الخلية علي الهجرة، والغزو، والنمو الثانوي، والالتصاق والبقاء على قيد الحياة هو فنت/بيتا كاتينين. فقد وجد أن مسار الفنت/بيتا كاتينين يكون مفعلا في المقاومة المكتسبة للتاموكسيفين بالإضافة إلي أن تفعيله يمنع آثار التاموكسيفين. وعلاوة على ذلك، فإن تثبيط الفنت/بيتا كاتينين يعيد الاحساس بالتاموكسيفين للخلايا المقاومة. وفي الدراسة الحالية، فإن النظامين العلاجيين المجمعين أنتجا تثبيطا ذو دلالة إحصائية للتعبير الجيني للبيتا كاتينين في كلا من خطوط الخلايا. ومع ذلك، فإن العلاجين المجمعين للدايوزمين والبربرين كلا مع التاموكسيفين لم يظهر أي اختلاف لا في التعبير الكلي لبروتين البيتا كاتينين ولا في نسبة البروتين النشط الغير مفسفر إلى إجمالي البروتين الكلي للبيتا كاتينين بين جميع مجموعات العلاج.

و من الجزينات الإشارية التي تم تحديدها لتكون ذات صلة بالمقاومة للتاموكسيفين هو عامل نمو بطانة الاوعية الدموية. فإن عامل نمو بطانة الاوعية الدموية محفزا قويا لعملية تكوين الاوعية الدموية التي تزيد بشكل ملحوظ في الأورام. و يؤدي الجمع بين عقار التاموكسيفين ومثبطات عامل نمو بطانة الاوعية الدموية إلي إطالة حساسية الخلايا بالتاموكسيفين ويمنع النمو الثانوي للورم في المرضى الذين يعانون من أورام ذات مستقبلات الإستروجين الموجبة. في هذه الدراسة، أظهرت العلاجين المجمعين تثبيطا ذو دلالة إحصائية لعامل نمو بطانة الاوعية الدموية، بالمقارنة مع التاموكسيفين منفردا، في كلا من خطوط الخلايا. أيضا، علي مستوى التعبير الجيني، أظهر العلاج المجمع للدايوزمين تثبيطا لعامل نمو بطانة الاوعية الدموية، بالمقارنة بمجموعة التاموكسيفين، في خلايا الإم سي إف ٧. و علي العكس، فقد أظهر العلاج المجمع للبربرين زيادة مؤثرة لعامل نمو بطانة الاوعية الدموية، في كلا من خطوط الخلايا.

و يتضح مما سبق أنه لم تكن هناك فروق ذات دلالة إحصائية بين النظامين العلاجيين المجمعين للبربرين و الدايوزمين علي مستوى التعبير البروتيني لجميع القياسات في كلا من خطوط الخلايا. ومع ذلك، علي مستوى التعبير الجيني، فقد أظهر العلاج بالبربرين مجتمعا مع التاموكسيفين تفوقا في تنظيم الهير ٢ في خلايا الإم سي إف ٧ والبي ٥٣ في خلايا الإم سي إف ٧/إل سي سي ٢. من الناحية أخرى، كان العلاج المجمع للدايوزمين مع التاموكسيفين أفضل في تنظيم عامل نمو بطانة الاوعية الدموية في خلايا الإم سي إف ٧ و الهير ٢ في خط خلايا الإم سي إف ٧/إل سي سي ٢.