

دور هرمون الاستروجين و/ او مستقبلاته في نشوء و تطور سرطان الكبد المحدث كيميائيا في الجرذان

رسالة مقدمة للحصول على درجة الدكتوراه في العلوم الصيدلانية

(أدوية و سموم)

مقدمة من

**الماجستير / محمد سمير عبدالحميد عبدالرحمن**

مدرس مساعد- قسم علم الادوية و السموم- كلية الصيدلة- جامعة الفيوم – الفيوم

تحت اشراف

**أ.د / أحمد محمد إبراهيم منصور**

الأستاذ بقسم علم الأدوية و السموم

كلية الصيدلة (بنين) – جامعة الأزهر – القاهرة

**أ.د / السيد محمد السيد**

الأستاذ بقسم علم الأدوية و السموم

كلية الصيدلة (بنين) – جامعة الأزهر – القاهرة

**د / رشا عبد الهادي محمد عبدالهادي**

مدرس بقسم علم الادوية و السموم

كلية الصيدلة – جامعة الفيوم – الفيوم

**أ.د / ميمي حجازي محمود**

الأستاذ بقسم علم الأدوية و السموم

كلية الصيدلة (بنين) – جامعة الأزهر – القاهرة

قسم علم الأدوية و السموم

كلية الصيدلة (بنين)

جامعة الأزهر

القاهرة

2024

## الملخص العربي و الإستنتاجات

يُعد سرطان الكبد الخلوي من أكثر الاورام الخبيثة فتكاً و تزداد خطورته بزيادة معدل أنتشاره في جميع أنحاء العالم وهو سبب رئيسي للوفاة المرتبطة بالسرطان. وهناك اختلافات كبيرة بين الجنسين في الإصابة بسرطان الخلايا الكبدية فمعدل الإصابة والوفيات لدى النساء منخفض نسبياً عن الرجال. ومع ذلك، فإن آلية عمل المسارات الخلوية لهذا التفاوت بين الجنسين غير مفهوم بشكل كامل.

لذلك، فإن الفرضية الأساسية لهذه الدراسة هي أن هرمون الاستروجين / ومستقبلات هرمون الاستروجين تلعب دوراً هاماً في تعديل تطور سرطان الكبد الخلوي عن طريق تنظيم عمل الجينات المشاركة في إعادة البرمجة الأيضية.

لتحقيق هذا الهدف , تم تنفيذ هذ المخطط:

• الجزء الأول: دراسة حاسوبية

• الجزء الثاني: دراسة داخل الخلايا الحية

أ- دراسة أولية:

تناولت هذه الدراسة تقدير مستوى الاستراديول في مصل إناث جرذان ويستر ألبينو التي أجريت لها عملية زائفه ومستأصلة المبيض علي فترات زمنية مختلفة و عمل فحص مجهري للمسحة المهبلية.

ب- الدراسة الكاملة:

1- توزيع الحيوانات :

تم تقسيم 84 من إناث جرذان ويستر ألبينو إلى 14 مجموعة ( ستة جرذان لكل مجموعة) على النحو التالي:

المجموعة -1- (الظابطة): تلقت الإناث المحلول الملحي مع مياه الشرب لمدة 16 أسبوعاً.

**المجموعة -2- ( عملية زائفة):** تلقت الإناث التي أجريت لها عملية زائفة مياه الشرب كمذيب لثنائي إيثيل نيتروز أمين لمدة 16 أسبوعًا.

**المجموعة -3- (عملية زائفة + ثنائي إيثيل نيتروز أمين):** تلقت الإناث التي أجريت لها عملية زائفة ثنائي إيثيل نيتروز أمين مع مياه الشرب لمدة 8 أسابيع كما أعطيت الماء فقط لمدة 8 أسابيع أخرى.

**المجموعة -4- (مستأصلة المبيض):** تلقت الإناث مستأصلة المبيض مياه الشرب كمذيب لثنائي إيثيل نيتروز أمين لمدة 16 أسبوعًا.

**المجموعة -5- (مستأصلة المبيض+ زيت السمسم):** تلقت الإناث مستأصلة المبيض زيت السمسم كمذيب لبزوات استراديول، بالحقن تحت الجلد كل أسبوع لمدة 16 أسبوعًا.

**المجموعة -6- (مستأصلة المبيض + ثنائي ميثيل سلفوكسيد :** تلقت الإناث مستأصلة المبيض ثنائي ميثيل سلفوكسيد كمذيب للأورليستات ، بالحقن داخل الغشاء البريتوني يوميًا لمدة 16 أسبوعًا.

**المجموعة -7- (مستأصلة المبيض + ثنائي إيثيل نيتروز أمين):** تلقت الإناث مستأصلة المبيض ثنائي إيثيل نيتروز أمين مع مياه الشرب لمدة 8 أسابيع ثم أعطيت الماء فقط لمدة 8 أسابيع أخرى.

**المجموعة -8- (عملية زائفة + ثنائي إيثيل نيتروز أمين + فولفسترانت ):** تلقت الإناث التي أجريت لها عملية زائفة ثنائي إيثيل نيتروز أمين مع مياه الشرب لمدة 8 أسابيع ثم أعطيت الماء فقط لمدة 8 أسابيع أخرى و أعطيت الفولفسترانت (حقن عضلي 5 ملجم / كجم) ، و ذلك كل أسبوع لمدة 16 أسبوعًا.

**المجموعة -9- (مستأصلة المبيض + ثنائي إيثيل نيتروز أمين + فولفسترانت):** تلقت الإناث مستأصلة المبيض ثنائي إيثيل نيتروز أمين مع مياه الشرب لمدة 8 أسابيع ثم أعطيت الماء فقط لمدة 8 أسابيع أخرى و أعطيت فولفسترانت (حقن عضلي 5 ملجم / كجم)، و ذلك كل أسبوع لمدة 16 أسبوعًا.

**المجموعة-10-(مستأصلة المبيض + ثنائي إيثيل نيتروز أمين+ بنزوات الاستراديول):** تلقت الإناث مستأصلة المبيض ثنائي إيثيل نيتروز أمين مع مياه الشرب لمدة 8 أسابيع ثم تلقت الماء فقط لمدة 8 أسابيع أخرى و أعطيت بنزوات الاستراديول (حقن تحت الجلد 30 ميكروجرام / كجم) كل أسبوع لمدة 16 أسبوعًا.

**المجموعة -11- (مستأصلة المبيض + الاورليستات) :** تلقت الإناث مستأصلة المبيض أورليستات يوميًا بجرعة 240 ملجم / كجم، بالحقن داخل الغشاء البريتوني ، و ذلك لمدة 16 أسبوعًا.

**المجموعة -12- (مستأصلة المبيض + الاورليستات + ثنائي إيثيل نيتروزأمين):** تلقت الإناث مستأصلة المبيض أورليستات يوميًا بجرعة 240 ملجم / كجم، بالحقن داخل الغشاء البريتوني ، و ذلك لمدة 16 أسبوعًا و ثنائي إيثيل نيتروزأمين مع مياه الشرب لمدة 8 أسابيع ، ثم أعطيت الماء فقط لمدة 8 أسابيع أخرى.

**المجموعة -13- ( مستأصلة المبيض + السيليمارين):** أعطيت الإناث مستأصلة المبيض سيليمارين يوميًا (بمعدل 50 ملجم / كجم)، عن طريق الفم لمدة 16 أسبوعًا.

**المجموعة -14- ( مستأصلة المبيض + السيليمارين + ثنائي إيثيل نيتروزأمين):** أعطيت الإناث مستأصلة المبيض سيليمارين يوميًا (بمعدل 50 ملجم / كجم)، عن طريق الفم لمدة 16 أسبوعًا، و ثنائي إيثيل نيتروزأمين مع مياه الشرب لمدة 8 أسابيع ، ثم أعطيت الماء فقط لمدة 8 أسابيع أخرى.

في نهاية التجربة، تم تخدير الحيوانات باستخدام إيثر ثنائي الإيثيل ثم أُعدمت بخلع الفقرة العنقية.

تم جمع عينات الدم والكبد لتحضير المصل والأنسجة لإجراء فحوصات البيوكيميائية و الهيستولوجية

2. تحديد زيادة الوزن و وزن الكبد النسبي.

3. الفحص العياني (الفحص بالعين المجردة).

4. تقدير دلالات تلف الكبد في السيرم ( AFP, ALT, AST, ALP, T. Bil & D. Bil )

5. تقييم ملف الدهون في المصل ( TG, TC, LDL, HDL & VLDL )

6. تحديد مؤشرات الإجهاد التأكسدي في الكبد ( Nrf2, MDA, GSH, GPx, SOD & CAT )

7. تحديد محتوى الكبد من السيتوكين (IL-6) المسبب للالتهاب.

8. الفحص الهيستولوجي لأنسجة الكبد.

9. تقدير مستقبلات هرمون الاستروجين من النوع ألفا و التعبير البروتيني لإنزيم تخليق الأحماض الدهنية في أنسجة الكبد باستخدام تقنية لطفة ويسترن.

10. تقدير التعبير البروتيني لانزيم تخليق الأحماض الدهنية ومجموعة التمايز 36 في أنسجة الكبد باستخدام تقنية المناعة النسيجية الكيميائية.

و يمكن تلخيص النتائج في النقاط الآتية:

- وجدت الدراسة أن ثنائي إيثيل نيتروزأمين حفز الإصابة بسرطان الكبد الخلوي في إناث جرذان ويستر ألبينو مستأصلة المبيض وقد اتضح ذلك من خلال ارتفاع مستويات الدلالات الحيوية لتلف الكبد (AFP, ALT, AST, ALP, T. Bil & D. Bil) ، وظهور عقيدات سرطان خلايا الكبد، وزيادة مستويات السيتوكين IL-6 المسبب للالتهاب.
- أظهرت الدراسة أن كل من بنزوات استراديول و أورليستات و سليمارين قللت من خطر الإصابة بسرطان الكبد الخلوي المستحث بثنائي إيثيل نيتروزأمين وذلك في إناث جرذان ويستر ألبينو مستأصلة المبيض.
- أظهرت الدراسة أن عقار فولفسترانت قام بحجب التأثير الوقائي للإستروجين الداخلي في جرذان المجموعة الزائفة و زيادة التأثير السمي للكبد الناجم عن ثنائي إيثيل نيتروزأمين في جرذان المجموعة التي استؤصل مبيضها. يشير هذا إلى أهمية مستقبلات هرمون استروجين في التأثير الوقائي للإستروجين ضد سرطان الكبد الخلوي .
- وجدت الدراسة أن ثنائي إيثيل نيتروزأمين تسبب في تدهور كبير في مستوى الدهون في المصل في إناث الجرذان مستأصلة المبيض أكثر من الجرذان التي أجريت لها عملية زائفه. وأوضحت الدراسة أن ثنائي إيثيل نيتروزأمين أدى إلى ارتفاع مستويات الدهون الثلاثية ، والكوليسترول الكلي ، والدهون منخفضة الكثافة ، والدهون منخفضة الكثافة للغاية في الجرذان التي استؤصل مبيضها. كما أدى إلى انخفاض ذو دلالة إحصائية في مستويات الدهون عالية الكثافة.
- أوضحت النتائج أن كلا من بنزوات استراديول و أورليستات و سليمارين ساهموا في تحسين تدهور مستوى الدهون في المصل الناجم عن المعاملة بثنائي إيثيل نيتروزأمين في إناث الجرذان مستأصلة المبيض .

- وجدت الدراسة أن عقار فولفستراننت ساهم في تفاقم تدهور مستوى الدهون في مصّل الجرذان مستأصلة المبيض والجرذان التي أجريت لها عملية زائفه التي تعرضت لثنائي إيثيل نيتروزأمين. وهذا يشير إلى أن مستقبلات الإستروجين تلعب دورًا مباشرًا في إعادة برمجة استقلاب الدهون في سرطان الخلايا الكبدية .
- حفز ثنائي إيثيل نيتروزأمين الإجهاد التأكسدي في جردان مستأصلة المبيض أكثر من الجرذان التي أجريت لها عملية زائفه ، حيث أوضحت النتائج أن هناك إنخفاض ذو دلالة إحصائية في محتوى الكبد من (Nrf2& GSH)، ونشاط كل من (SOD; CAT & GPx) ، بالإضافة إلى زيادة كبيرة في محتوى الكبد منMDA.
- أظهرت النتائج ان كلا من بنزوات استراديول و أورليستات و سليمارين كان لهم دورا فعالا في تحسين تدهور معايير الإجهاد التأكسدي المستحث بثنائي إيثيل نيتروزأمين.
- أدى عقار فولفستراننت إلى تدهور معايير الإجهاد التأكسدي في مجموعتي العملية الزائفه و مستأصلة المبيض التي عولجت بثنائي إيثيل نيتروزأمين ، هذا يشير إلى أن مستقبلات هرمون الإستروجين تلعب دورًا مهمًا في تأثير الإستروجين كمضاد لسرطان الكبد الخلوي عن طريق حماية الخلايا الكبدية من الإجهاد التأكسدي.
- أدت المعاملة ببنزوات استراديول الي انخفاض التعبير البروتيني لكلا من FASN و CD36 والذي ألغاه عقار فولفستراننت.
- أظهرت الدراسة أن انخفاض تعبير جينات FASN و CD36 كان مرتبطًا بزيادة التعبير الجيني لمستقبلات الإستروجين ألفا بواسطة مادة بنزوات استراديول.
- لم يؤثر سليمارين بشكل ملحوظ على تعبير جينات FASN وCD36، على الرغم من خصائصه المضادة لسرطان الكبد، وقد يرجع ذلك إلى تأثيراته المضادة للأكسدة والالتهابات.
- يقلل أورليستات من تعبير جين FASN وبينما لا يوجد له تأثير على تعبير جين CD36.
- في هذه الدراسة، لم تكن هناك أي تأثيرات لتناول المركبات الحاملة أو غيرها من العوامل المختلفة بدون تناول ، مما يستبعد تداخلها مع نتائج التجارب.

- لوحظ أيضًا أن مجموعة مستأصلة المبيض + ثنائي إيثيل نيتروزأمين + فولفسترانت أظهرت الشكل الأكثر عدوانية لسرطان خلايا الكبدية بالمقارنة بمجموعات أخرى عولجت بثنائي إيثيل نيتروزأمين و حرمت من هرمون الاستروجين، مما يشير إلى الأدوار التكاملية بين منبهات مستقبلات هرمون الاستروجين ومستقبلات هرمون الاستروجين في حدوث سرطان الكبد الخلوي.
- أوضحت الدراسة أن كلاً من مجموعات مستأصلة المبيض + السيليمارين + ثنائي إيثيل نيتروزأمين و مستأصلة المبيض + ثنائي إيثيل نيتروزأمين+ بنزوات استراديول أظهرت تحسناً ملحوظاً في جميع الدلالات السابقة، بطريقة مشابهة لتأثير الإستروجين الداخلي في مجموعة عملية زائفة + ثنائي إيثيل نيتروزأمين .
- تجدر الإشارة إلى أن مجموعتي مستأصلة المبيض + السيليمارين + ثنائي إيثيل نيتروزأمين و مستأصلة المبيض + ثنائي إيثيل نيتروزأمين+ بنزوات الاستراديول كانتا متشابهين في معظم الدلالات باستثناء التعبير البروتيني لكلا من FASN & CD36، ويشير هذا إلى أن مستقبلات الإستروجين من النوع ألفا تلعب دوراً أساسياً في إعادة برمجة استقلاب الدهون في سرطان الكبد الخلوي .

## الاستنتاج

أستنتجنا من هذه الدراسة دور الإستروجين الوقائي من سرطان الكبد الخلوي المستحث بثنائي إيثيل نيتروزأمين. ويرجع هذا التأثير الوقائي إلى مستقبلات هرمون الإستروجين ألفا ، والتي تمنع التعبير عن جينات FASN و CD36 المشاركة في استقلاب الدهون، فيؤدي ذلك إلى حرمان الورم من مصدر الطاقة الحيوي اللازم للبقاء ، ويساعد أيضًا على تثبيط السيتوكين IL-6 المسبب للالتهاب. و قد أحدث أورليستات تأثيرًا مماثلًا في تخفيف سرطان الكبد المستحث بثنائي إيثيل نيتروزأمين ويرجع ذلك إلى قدرته على تثبيط التعبير عن جين FASN ، وكذلك إلى تأثيراته المضادة للالتهابات و الأورام. وأخيرًا، وجدت الدراسة أن سيليمارين يمكن أن يساعد أيضًا في تخفيف سرطان الكبد المستحث بثنائي إيثيل نيتروزأمين وقد يرجع ذلك إلى تأثيراته المضادة للأكسدة والالتهابات، وليس إلى تأثيراته الاستروجينية على جينات FASN & CD36 .

## التوصيات:

إستندت المفاهيم المقدمة في هذه الدراسة إلى نموذج تجريبي للقوارض لسرطان الكبد الخلوي المستحث بثنائي إيثيل نيتروزأمين. ولكن، من المهم أيضًا إشراك الدراسات البشرية في هذا المجال البحثي، خاصةً في تقييم استخدام أورليستات كمثبط واعد لجين FASN. سيتضمن ذلك إظهار الفعالية العلاجية والاستخدام لأورليستات في سرطان الكبد الخلوي ، خاصةً الناجم عن NAFL أو NASH. يوصى أيضًا بأن استخدام كل من طرق الحرمان من هرمون الاستروجين الجراحية والدوائية له قيمة محتملة في عمل نماذج تجريبية ناجحة تدرس آثار الحرمان من هرمون الاستروجين على الأمراض المختلفة.