

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and
Scientific Research
University of Mosul / College of Science
Department of Chemistry



Biochemical and Physiological Aspects of Serum
Extracellular domain of HER2 in Breast Cancer
Patients

Baraa Raad Mahmood Ahmad AL-Barhawi

Ph.D. Thesis

Chemistry /Biochemistry

Supervised By

Prof. Dr. Thikra Ali Fathi Allwsh

1444 A.H.

2023 A.D.

Summary

The research involves a biochemical study of HER2 ECD, and is divided into three parts :

1. The clinical part: includes a determination of HER2 ECD levels in the serum of apparently healthy women and breast cancer patients. The results show that the normal mean of HER2 ECD in the serum of the control group (aged between 20 - 79 years) is $(7.52 \pm 0.46 \text{ ng/ml})$. Also, it has been found a significant increase in HER2 ECD levels in the serum of the patients compared with the control group, and the HER2 ECD is not associated by age, while the results show that HER2 ECD is associated by body mass index and menopausal status in patients and control group. In the patients' group, HER2 ECD is also associated by the type of treatment, HER2 status, tumor size, stage and grade.

A number of biochemical parameters are measured in 100 control and 125 breast cancer patients. The result demonstrates a significant increase in the level of programmed death ligand 1, estradiol, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, iron, malondialdehyde, peroxidase, lactoperoxidase, potassium, calcium, phosphorus, lactate dehydrogenase and total protein, while there is a significant decrease in the level of vitamin D, total antioxidant capacity, uric acid and arylesterase in breast cancer patients group compared with the control group.

The correlation coefficient of HER2 ECD with some clinical parameters is examined in control and patients and the results show that HER2 ECD level has a significant positive correlation with the level of creatinine, iron, lactoperoxidase, alkaline Phosphatase, phosphorus and progesterone in the patient group. There is a significant negative correlation between HER2 ECD level and the level of total antioxidant capacity, arylesterase and calcium in the patient group. In the control group, HER2 ECD level is positively correlated with both creatinine and lactate dehydrogenase levels.

2. Technician part: includes the isolation and partial purification of HER2 ECD from the plasma of healthy donor via various biochemical techniques, which included precipitation by ammonium sulfate, dialysis and gel filtration

chromatography (Sephadex G-100). The result shows a high level of HER2 ECD was only in the first peak (peak A) isolated from the human plasma by gel filtration chromatography. The fold of purification of isolated HER2 ECD (peak A) increases to (45.16) fold than the plasma and the specific activity of HER2 ECD increases to (5.42) than the plasma with a recovery percentage (71.4).

Furthermore, high-performance liquid chromatography has been used to identify the purity of isolated HER2 ECD (peak A) by comparing the retention time of (peak A) and HER2 ECD standard solution which is identical.

The comparative molecular weight of isolated and partially purified HER2 ECD (peak A) has been found by using gel filtration chromatography and electrophoresis techniques and it is (75318 ± 1000 Dalton) and (73029 ± 1000 Dalton) respectively.

3. Animals part: includes study the effect of three different doses of isolated and partially purified HER2 ECD (1.0, 2.5 and 5.0 mg/Kg/day) on tissues of the liver, kidney and uterus. After treatment with three different doses of HER2 ECD for four weeks the histological results showed that there was an alteration in the normal architecture of the liver, kidney and uterus characterized by infiltration of lymphocytes, coagulative necrosis, hemorrhage, increase in collagen fibers deposition, hyperplasia, pre-neoplastic lesion with a bizarre nucleus, and adenoma. These irreversible pathological changes which occurred in these organs may be converted to malignancy if they take a longer time (more than one month). In addition, the effect of isolated and partially purified HER2 ECD on some biochemical parameters was studied. After four weeks of treatment, the results show that there is a significant increase in the level of urea, uric acid, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase, creatine kinase and C-reactive protein. In addition, there is a significant decrease in the level of albumin after four weeks of treatment, while the glucose level is not affected.

الخلاصة

تضمن البحث دراسة كيموحيوية لعامل نمو البشرة البشري 2، اذ تضمنت الدراسة ثلاثة أجزاء:

1. الجزء السريري: اذ اشتمل على تقدير مستوى عامل نمو البشرة البشري 2 في مصل الدم لأشخاص اصحاء ظاهريا ومريضات مصابات بمرض سرطان الثدي (تتراوح اعمارهن بين سنة 20-79)، حيث أظهرت النتائج ان العدل الطبيعي لمستوى عامل نمو البشرة البشري 2 (0.46 ± 7.52) نانوجرام /مل) في مصل الدم لدى مجموعة السيطرة، كما بينت النتائج وجود ارتفاع معنوي في مستوى عامل نمو البشرة البشري 2 في مصل الدم لدى المصابات بسرطان الثدي مقارنة مع مجموعة السيطرة، ولم يتأثر مستوى عامل نمو البشرة البشري 2 بالعمر، بينما تأثر بمؤشر كتلة الجسم وحالة انقطاع الطمث لدى مجموعتي السيطرة المرضى. وكذلك تأثر مستوى عامل نمو البشرة البشري 2 بنوع العلاج وحالة عامل نمو البشرة البشري 2 وحجم الورم ومرحلة الورم ودرجة الورم لدى مريضات سرطان الثدي.

وقد تم تقدير عدد من المتغيرات الكيموحيوية في مصل الدم لدى 100 من الاصحاء و 125 من مريضات سرطان الثدي. وبينت النتائج وجود ارتفاع معنوي في تركيز كل من عامل الموت المبرمج 1، هرمون الاستراديول والهرمون المنشط للحوصلة والهرمون المنبه للجسم الأصفر والحديد والمالوندايالايديايد وانزيمات البيروكسيداز والاكوتوبروكسيداز واللاكتيت ديهيدروجينيز والبوتاسيوم والكالسيوم والفسفور والبروتين الكلي. وانخفاض معنوي في تركيز كل من فيتامين D والسعة الكلية لمضادات الاكسدة وحامض اليوريك وانزيم الاريل استريز في مصل دم مريضات سرطان الثدي مقارنة بمجموعة الاصحاء.

وقد درست العلاقة بين مستوى عامل نمو البشرة البشري 2 وبعض المتغيرات السريرية للأصحاء والمريضات من خلال إيجاد معامل الارتباط الخطي، اذ بينت النتائج وجود علاقة طردية معنوية بين مستوى عامل نمو البشرة البشري 2 وتركيز كل من الكرياتينين والحديد وانزيم لاکتوبروکسیداز وانزيم الفوسفاتيز القاعدي والفسفور اللاعضوي وهرمون البروجستيرون في مجموعة المرضى. ووجود علاقة عكسية معنوية بين مستوى عامل نمو البشرة البشري 2 وتركيز كل من السعة الكلية لمضادات الاكسدة وانزيم الاريل استريز والكالسيوم لدى مجموعة المرضى. وكذلك وجود علاقة طردية معنوية بين مستوى عامل نمو البشرة البشري 2 والكرياتينين واللاكتيت ديهيدروجينيز لدى مجموعة السيطرة.

2. الجزء التقني: تضمن العزل والتنقية الجزئية لعامل نمو البشرة البشري 2 من البلازما وذلك باستخدام الترسيب بكبريتات الامونيوم والديلزة وکروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستخدام (-Sephadex G-100)، وقد لوحظ ظهور حزمتين روتينيتين للمحلول المائي للراسب البروتيني لبلازما الدم بتقنية الترشيح الهلامي، ووجد ان الحزمة البروتينية الأولى (الحزمة A) تمتلك اعلى تركيز لعامل نمو البشرة البشري 2 وان عدد مرات التنقية عامل نمو البشرة البشري 2 بعد الترشيح الهلامي قد ازدادت

بمقدار (45.16) مرة عن بلازما الدم كما ان التركيز النوعي قد ازداد الى (5.42) عن بلازما الدم وبنسبة استعادة بلغت (71.4).

فضلا عن ذلك تم استخدام تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء للكشف عن نقاوة عامل نمو البشرة البشري 2 المعزول (الحزمة A) من خلا مقارنة زمن الاستعادة للحزمة A مع الحزمة الناتجة من تمرير المحلول القياسي لعامل نمو البشرة البشري 2 حيث كان متقارب. كما تم إيجاد الوزن الجزيئي التقريبي لعامل نمو البشرة البشري 2 باستخدام كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي وتقنية الهجرة الكهربائية والذي بلغ (1000±75318 دالتون) و(1000±73029 دالتون) على التوالي.

3. الجزء الحيواني: حيث تم دراسة تأثير حقن ثلاث تراكيز مختلفة (1.0, 2.5 and 5.0 mg/Kg/day) من عامل نمو البشرة البشري 2 المعزول (الحزمة A) ولمدة اربعة أسابيع على اناث الجرذان البيضاء من خلال تتبع التغيرات النسيجية في كل من الكبد والكلية والرحم، حيث أظهرت النتائج النسيجية حدوث تغيرات غير عكسية في البنية الطبيعية للكبد والكلية والرحم يتميز بتسلل الخلايا الليمفاوية ، والتتخر التجلطي والنزف وزيادة ترسب ألياف الكولاجين وتضخم الانسجة و آفات ورمية ذات نواة غريبة وورم غدي (ورم حميد يتكون من تراكيب غدية في النسيج الظهاري) والتي يمكن ان تتحول إلى أورام خبيثة إذا استمرت وقتًا أطول (أكثر من اربعة اسابيع). كما تم أيضا متابعة تأثير الحقن البريتوني لعامل نمو البشرة البشري 2 المعزول على بعض المتغيرات الكيموحيوية، حيث لوحظ حدوث زيادة معنوية في مستوى اليوريا وحامض اليوريك وألانين أمينوترانسفيراز وأسبارتات أمينوترانسفيراز واللاكتات ديهيدروجينيز والكرياتين كينيز، والبروتين التفاعلي C. كما حدث انخفاض معنوي في مستوى الألبومين بعد أربعة أسابيع من الحقن البريتوني بثلاثة تراكيز من عامل نمو البشرة البشري 2، في حين لم يحدث تغيير في مستوى الكلوكوز.



جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الموصل / كلية العلوم

قسم الكيمياء

الوظائف الكيموحياتية والفسلجية لل HER2 في مصل دم مريضات سرطان الثدي

براء رعد محمود احمد البرهاوي

اطروحة دكتوراة

علوم الكيمياء / الكيمياء الحياتية

بإشراف

الاستاذ الدكتور ذكري علي فتحي علوش

٢٠٢٣ م

١٤٤٤ هـ