جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل/ كلية العلوم
قسم الكيمياء

عزل انزيم السايكلواوكسيجينيز-٢ من مصل مرضى سرطان المثانة ودراسة التباين الوراثي لجين RS20417 وتأثير النواتج الطبيعية المعزولة من نبات النخوة على دم ونسيج الفئران المستحثة بسرطان المثانة

محمد حسين موسى حمد الجميلي

أطروحة دكتوراه

علوم الكيمياء/ الكيمياء الحياتية

بإشراف

الأستاذ مساعد الدكتور محمد بحري حسن السعدون

1445هـ ٢٠٢٣م

الخلاصة

تضمنت الدراسة عدة اجزاء:

الجزء الاول الدراسة السريرية: – تضمنت ١٥٠ مشاركاً، منهم ٧٥ شخص سليم من كلا الجنسين، تراوحت اعمارهم بين ٥٠–٨٠ سنة كمجموعة سيطرة، و٧٥ شخص مصاب بمرض سرطان المثانة بواقع ٦٨ ذكر و٧ إناث، تراوحت اعمارهم بين ٥٠–٨٠ سنة كمجموعة مرضى، قدرت لهم مستويات المتغيرات الكيموحيوية: انزيم السايكلوأوكسيجنيز–٢ وعامل نخر الورم والانترلوكين–٦ والبروتين الكلي والألبومين وحامض اليوريك وفيتامين C والكلوتاثايون والمالونداياالديهايد والبيليروبين والحديد والزنك، فضلاً عن دراسة تأثير عوامل التدخين والعمر في هذه المتغيرات لدى مرضى سرطان المثانة. وكانت النتائج كالآتي: وجود تأثير معنوي ($P\leq0.01$) لمرض سرطان المثانة في جميع المتغيرات الكيموحيوية المدروسة بأستثناء مستويات حامض اليوريك والبيلروبين، إذ أدى المرض إلى خفض مستويات الالبومين والحديد والبروتين الكلي والزنك وفيتامين C والكلوتاثايون، فيما رفع مستويات انزيم السايكلوأوكسيجينيز–٢ وعامل نخر الورم والانترلوكين–٦ والمالونداياالديهايد. وأظهر التقدم في العمر تأثير معنوي ($P\leq0.05$) على تراكيز انزيم السايكلواوكسيجنيز وعامل نخر الورم وحامض اليوريك –٢ وفيتامين C والمالونداياالديهايد والبيليروبين التي ارتفعت معنويا، وانخفضت تراكيز الحديد والزنك. وجد أن تأثير التدخين كان ذو دلالة احصائية في متوسطات أنزيم السايكلوأوكسجنيز–٢ والمالونداياالديهايد فقط، وسجلت فئة المدخنين أعلى المتوسطات لهذين المتغيرين. وجدت ارتباطات عالية المعنوية عند مستوى احتمال ($P\leq0.01$) بالاتجاه الموجب لانزيم السايكلواوكسيجنيز–٢ مع تركيز عامل نخر الورم والانترلوكين–٦، وارتباطات واطئة المعنوية عند مستوى احتمال ($P\leq0.05$) بالاتجاه الموجب مع تركيز الحديد وفيتامين C.

الجزء الثاني العزل والتنقية: – أظهرت الدراسة لعزل وتنقية إنزيم السايكلوأوكسيجينيز–٢ جزئيًا من مصل الدم لمرضى سرطان المثانة، والتي استعملت فيها طرائق الترسيب بالإزاحة الملحية والفرز الغشائي؛ لتهيئة العينة للاستعمال في تقنية الكروماتوغرافيا بالتبادل الأيوني، والتي رصدت وجود قمة واحدة مميزة للمحلول البروتيني، وكانت عملية التنقية فعالة نسبيًا، مع استرداد أكثر من ٥٠.٨٢٪ من فعالية الانزيم، قدر الوزن الجزيئي التقريبي بتقنية الهجرة الكهربائية، إذ وجدت حزمة بروتينية مميزة أُعتمدت في تقدير الوزن الجزيئي التقريبي للإنزيم والمساوي إلى (72) كيلو دالتون، وكانت الظروف المثلى لقياس فعالية الإنزيم ٥ دقائق لزمن التفاعل و٧.٥ للأس الهيدروجيني ودرجة حرارة ٤٠ °م و٠.٦ ملي مولاري تركيز المادة الاساس.

الجزء الثالث الدراسة الجزيئية: – درس تأثير تعدد الاشكال للجين RS20417 للمرضى والاصحاء لمعرفة تأثيره في مرض سرطان المثانة، وأظهرت النتائج أن الفرد الذي لديه الأليل G من الجين RS20417، فإنه من المرجح أن ينتج مستويات أعلى من البروستاكلاندين، مما قد يزيد من خطر الإصابة بسرطان المثانة، كما وجد من دراسة العلاقة بين الانماط الجينية وفعالية انزيم السايكلوأوكسيجينيز–٢ أن الاشخاص الذين يحملون النمط الجيني GG حققوا المتوسط الاعلى معنوياً لفعالية الانزيم مقارنة بالاشخاص الذين يحملون النمط CC.

الجزء الرابع النواتج الطبيعية للنبات: – تضمنت الدراسة استخلاص النواتج الطبيعية (الزيت والفلافون والقلويد) لبذور نبات النخوة، وتشخيص المركبات الفعالة في هذه النواتج، إذ استخلصت من بذور نبات النخوة الناتج الزيتي والذي شخص فيه الحامضين لينوليك ولينولينك والناتج الفلافوني والذي شخصت فيه مركبات Apigenin و caffeic acid و catechine و qurcetine و Rutin والناتج القلويدي، وكان الناتج القلويدي اكثرها كفاءة في خفض فعالية انزيم السايكلوأوكسيجينيز–٢ تلاه الناتج الفلافوني ثم الزيتي بتسجيل اقل فعالية.

الجزء الخامس الدراسة الحيوانية: – اشتملت التجربة على دراسة كيموحيوية ونسيجية على الفئران المستحدث فيها مرض سرطان المثانة، والتي تمت معالجتها بالنواتج الطبيعية لبذور نبات النخوة، وأظهرت النتائج الآتي:

الدراسة الكيموحيوية: اظهر تطبيق النواتج الطبيعية المعزولة من بذور نبات النخوة على الفئران المستحدث فيها مرض سرطان المثانة، أن الناتج الزيتي كان اكثرها كفاءة في خفض مستويات أنزيم السايكلوأوكسيجينيز–٢ والانترلوكين–٦ وعامل نخر الورم في مصل دم الفئران مقارنة بالفئران المصابة وغير المعالجة.

الدراسة النسيجية: توافقت نتائج الدراسة التشريحية مع النتائج الكيموحيوية، إذ وجد أن الناتج الزيتي أدى إلى ترقق طبقات المثانة، وجعل الظهارة الانتقالية المبطنة للطبقة المخاطية والطبقة العضلية تستعيد شكلها الطبيعي بدرجة كبيرة.

Summary

The study consisted of several parts:

Part 1: Clinical study: - The study included 150 participants, of whom 75 were healthy people of both sexes, aged 50-80 years as a control group, and 75 people with bladder cancer, with 68 males and 7 females, aged 50-80 years as a patient group. The levels of the biochemical variables were estimated for them: cyclooxygenase-2 enzyme, tumor necrosis factor, interleukin-6, total protein, albumin, uric acid, vitamin C, glutathione, malondialdehyde, bilirubin, iron, and zinc, in addition to studying the effect of smoking and age factors in these variables in bladder cancer patients. The results were as follows: There was a significant effect ($P \leq 0.01$) of bladder cancer on all the studied biochemical variables except for the levels of uric acid and bilirubin. The disease led to a decrease in the levels of albumin, iron, total protein, zinc, vitamin C, and glutathione, while increasing the levels of cyclooxygenase-2 enzyme, tumor necrosis factor, interleukin-6, and malondialdehyde. Age progression showed a significant effect ($P \leq 0.05$) on the concentrations of cyclooxygenase-2 enzyme, tumor necrosis factor, uric acid, vitamin C, malondialdehyde, and bilirubin, which increased significantly, and the concentrations of iron and zinc decreased. It was found that the effect of smoking was statistically significant in the averages of cyclooxygenase-2 enzyme and malondialdehyde only, and the smoking category recorded the highest averages for these two variables. High significant correlations were found at a probability level of ($P \leq 0.01$) in the positive direction of cyclooxygenase-2 enzyme with the concentration of tumor necrosis factor and interleukin-6, and low significant correlations at a probability level of ($P \leq 0.05$) in the positive direction with the concentration of iron and vitamin C.

Part 2: Isolation and purification: - The study showed the isolation and partial purification of cyclooxygenase-2 enzyme from the serum of bladder cancer patients. The study used salt precipitation and membrane filtration methods to prepare the sample for use in ion exchange chromatography. The chromatography detected a single characteristic peak of the protein solution. The purification process was relatively efficient, with a recovery of more than 50.82% of the enzyme activity. The approximate molecular weight was estimated by electrophoresis, as a characteristic protein band was found that was used to estimate the approximate molecular weight of the enzyme, which is equal to 72 kilodaltons. The optimal conditions for measuring enzyme activity were 5 minutes' reaction time, 7.5 pH, 40 ˚C temperature, and 0.6 millimolar concentration of the substrate.

Part 3: Molecular study: - The study investigated the effect of the RS20417 gene polymorphism in patients and healthy individuals to determine its effect in bladder cancer. The results showed that an individual who has the G allele of the RS20417 gene is more likely to produce higher levels of prostaglandin, which may increase the risk of bladder cancer. The study also found that the relationship between genetic patterns and cyclooxygenase-2 enzyme activity showed that people with the GG genotype achieved a significantly higher average enzyme activity than people with the CC genotype.

Part 4: Natural products of the plant: - The study included the extraction of natural products (oil, flavonoid, and alkaloid) from the seeds of the fenugreek plant, and the diagnosis of active compounds in these products. The oil product was extracted from the seeds of the fenugreek plant, in which the linoleic and linolenic acids were diagnosed. The flavonoid product was extracted from the seeds of the fenugreek plant, in which the compounds Apigenin, caffeic acid, catechin, quercetin, and Rutin were diagnosed. The alkaloid product was also extracted from the seeds of the fenugreek plant. The alkaloid product was the most efficient in reducing the activity of cyclooxygenase-2 enzyme, followed by the flavonoid product, and then the oil product, which recorded the lowest efficiency.

Part 5: Animal study: - The experiment included a biochemical and histological study on mice with induced bladder cancer, which were treated with the natural products of fenugreek seeds. The results showed the following:

Biochemical study: The application of the natural products isolated from fenugreek seeds on mice with induced bladder cancer showed that the oil product was the most efficient in reducing the levels of cyclooxygenase-2 enzyme, interleukin-6, and tumor necrosis factor in the mice's serum compared to the infected and untreated mice.

Histological study: The results of the anatomical study agreed with the biochemical results. It was found that the oil product led to thinning of the bladder layers.

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

Isolation of The Cyclooxygenase-2 From The Serum of Bladder Cancer Patients and Studing the Genetics Vareaetion of the Rs20417 Gene, And The Effect of Natural Products Isolated from The Ajwain Plant On the Blood and Tissue of Mice Induced with Bladder Cancer

Mohammed Hussin Mousa Hamad Aljomaely

Ph. D.
Chemistry Scince/ Biochemistry

Supervised by
Assist. Prof. Dr. Mohammed Bahry Hasan Al-Saadoon

1445 A.H **2023 A.D**