



جامعة كربلاء

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

تأثير بعض العقاقير المحملة على الكيتوسان النانوي في خط خلايا سرطان  
الكبد البشري HepG2 خارج الجسم الحي

رسالة مُقدمة إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات  
نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

كُتبت بواسطة

زهراء اياد علي

بكالوريوس علوم الحياة 2013 م / جامعة كربلاء

بإشراف

أ.م. د. زينب نزار جواد

تموز / 2024 م

محرم / 1446 هـ

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ

﴿یَرْفَعُ اللّٰهُ الَّذِیْنَ اٰمَنُوْا مِنْكُمْ وَالَّذِیْنَ اٰتَوْا

الْعِلْمَ دَرَجٰتٍ وَاللّٰهُ بِمَا تَعْمَلُوْنَ خَبِیْرٌ﴾

صَدَقَ اللّٰهُ الْعَلِیُّ الْعَظِیْمُ

(سورة المجادلة - الآیة (11))

## «إقرار المشرف على الرسالة»

اشهد بأن إعداد هذه الرسالة الموسومة بـ ( تأثير بعض العقاقير المحملة على الكيتوسان النانوي في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 خارج الجسم الحي ) التي قدمتها الطالبة ( زهراء اباد علي ) قد جرى تحت إشرافي في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء، وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

التوقيع : 

اسم المشرف : د. زينب نزار جواد

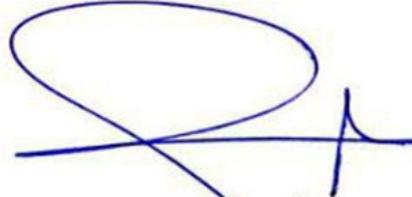
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة / قسم علوم الحياة

التاريخ : 27 / 8 / 2024

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصيات المقدمة أرشح هذه الرسالة للمناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع : 

الاسم: د. نصير مرزة حمزة

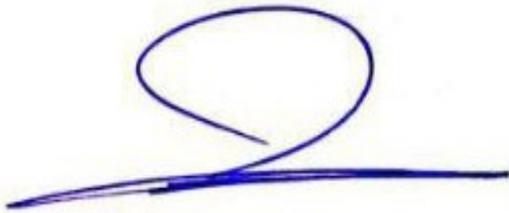
المرتبة العلمية: أستاذ دكتور

العنوان: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة / قسم علوم الحياة

التاريخ : 27 / 8 / 2024

## ﴿إقرار المقوم اللغوي﴾

اشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ ( تأثير بعض العقاقير المحملة على الكيتوسان النانوي في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 خارج الجسم الحي ) في كلية التربية للعلوم الصرفة / قسم علوم الحياة / جامعة كربلاء التي قدمتها الطالبة ( زهراء ايداد علي ) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

التوقيع : 

الاسم : د. مسلم مالك الأسدي

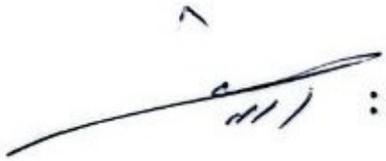
المرتبة العلمية : أستاذ دكتور

العنوان : جامعة كربلاء / كلية العلوم الإسلامية

التاريخ : 27 / 8 / 2024

## ﴿إقرار المقوم العلمي الأول﴾

اشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ ( تأثير بعض العقاقير المحملة على الكيتوسان النانوي في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 خارج الجسم الحي ) في كلية التربية للعلوم الصرفة / قسم علوم الحياة / جامعة كربلاء التي قدمتها الطالبة ( زهراء ايداد علي ) قد تمت مراجعتها من الناحية العلمية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة .

التوقيع : 

الاسم : د. رشا عبد الأمير جواد

المرتبة العلمية : أستاذ

العنوان : جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ : 27 / 8 / 2024

## ﴿إقرار المقوم العلمي الثاني﴾

اشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ ( تأثير بعض العقاقير المحملة على الكيتوسان النانوي في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 خارج الجسم الحي ) في كلية التربية للعلوم الصرفة / قسم علوم الحياة / جامعة كربلاء التي قدمتها الطالبة ( زهراء ايداد علي ) قد تمت مراجعتها من الناحية العلمية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة .

التوقيع :

الاسم : دكتور فاضل محمد نفثة

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : جامعة بغداد / كلية العلوم

التاريخ : / / 2024

## إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة الموقعين ادناه نشهد بأننا قد اطلعنا على الرسالة الموسومة بـ ( تأثير بعض العقاقير المحملة على الكيتوسان النانوي في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 خارج الجسم الحي ) في كلية التربية للعلوم الصرفة / قسم علوم الحياة / جامعة كربلاء التي قدمتها الطالبة ( زهراء اباد علي ) كجزء من متطلبات نيل درجة الماجستير / علم الحيوان ، وبعد اجراء المناقشة العلنية وجد انها مستوفية لمتطلبات الشهادة و عليه نوصي بقبول الرسالة بتقدير امتياز.

عضو اللجنة

التوقيع : 

الأسم : د. الاء شاکر حنتوش

المرتبة العلمية : استاذ

العنوان : الجامعة التقنية الجنوبية / قسم التحليلات المرضية

التاريخ : 2024 / 8 / 27

عضواً ومشرفاً

التوقيع : 

الأسم : د. زينب نزار جواد

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

العنوان : جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ : 2024 / 8 / 27

رئيس لجنة المناقشة

التوقيع : 

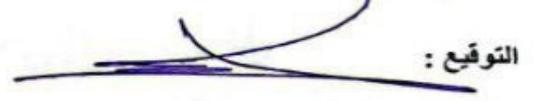
الأسم : د. لقاء حسون صکبان

المرتبة العلمية : استاذ

العنوان : جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ : 2024 / 8 / 27

عضو اللجنة

التوقيع : 

الأسم : د. هبة علوان عبد السلام

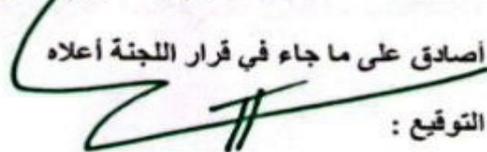
المرتبة العلمية : استاذ مساعد

العنوان : جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ : 2024 / 8 / 27

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

أصادق على ما جاء في قرار اللجنة أعلاه

التوقيع : 

الأسم : د. حميدة عيدان سلمان

المرتبة العلمية : استاذ

العنوان : جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ : 2024 / 9 / 1

## الإهداء

إلى من شرفني بحمل اسمه  
من ألبسني ثوب العلم ببركة دمهِ الطاهر  
والذي شهيد أباد علي  
إلى كل من وقفوا معي  
وساندوني بكلمة أو موقف أو دعاء  
من الأهل والأصدقاء  
وأخيرا إلى كل من ساعدني  
من قريب أو بعيد  
إلى من وهبني الله نعمة وجودهم في حياتي  
ليكم أهدي ثمرة هذا الجهد المتواضع

زهراء

## الشكر و التقدير

أحمد الله تعالى وأشكره بتوفيقه لي على اتمام هذا العمل، وأصلي وأسلم على أشرف الخلق محمد وآله أجمعين وأنطلاقاً من قوله صل الله عليه وآله وسلم "من لم يشكر الناس لم يشكر الله"

أتوجه بجزيل الشكر إلى رئاسة جامعة كربلاء وإلى السيدة عميد كلية التربية للعلوم الصرفة أ.د حميدة عيدان سلمان التي كانت منارة للضوء في أصعب الأوقات

كما أود أن أعبر عن خالص امتناني إلى مشرفتي الفاضلة أ.م. د. زينب نزار جواد نضيراً لما قدمته توجيهٍ ونصحٍ من علمتي الاعتماد على نفسي وكانت لي مصدر إلهامٍ فأسأل الله أن يُجزئها خير الجزاء

و أعتزافاً مني بالجميل أتقدم بعظيم أمتناني إلى رئاسة قسم علوم الحياة متمثلة برئيس القسم أ.د نصير ميرزا حمزة ومقرر القسم أ.د لقاء حسون صكبان وأساتذة القسم المحترمين منهم أ. م. د. يعرب مضر القزويني و أ. م. د. قيصر عبد السجاد محمد حسن و أ. م. د. بان موسى حسن لما قدموه من مساعدة ودعم.

زهراء

## Summary الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية والتي استمرت لمدة تسعة أشهر إلى تقييم دور الكيتوسان النانوي Nano chitosan المحمل بالأمبسلين Ampicillin و الأسيتامينوفين Acetaminophen و حمض الميفانميك acid Mefenamic و السيفالكسين Cephalixin في تنشيط جين Tumor protein 53 (TP53) لتفعيل مسار الموت المبرمج Apoptosis في خط خلايا سرطان الكبد البشري Hepatocellular carcinoma (HepG2) خارج الجسم الحي *in vitro*.

تضمنت الدراسة الحالية الكشف عن فعالية تحميل الكيتوسان النانوي بـ الأمبسلين Ampicillin والسيفالكسين Cephalixin وهما من المضادات الحيوية فئة بيتا-لاكتام Beta-lactam antibiotics بالإضافة إلى حمض الميفانميك acid Mefenamic وهو من مضادات الالتهابات غير الستيرويدية Nonsteroidal anti-inflammatory و الأسيتامينوفين Acetaminophen الذي هو مسكن للألم وخافض حرارة و بواسطة جهاز Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) فكانت ترددات المجاميع الوظيفية الفعالة للعقاقير النانوية ضمن المدى القياسي، و حددت مواقع الارتباط بين العقاقير والأحماض الأمينية لبروتين (p53) Protein 53 بواسطة استخدام تقنية Molecular docking فارتبطت العقاقير في المواقع الفعالة التي تنشط p53.

ايضاً أجري اختبار (MTT) 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide للكشف عن السمية الخلوية للعقاقير النانوية في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 حيث عوملت الخلايا بتركيز نصفية متزايدة للعقاقير النانوية (12.5، 25، 50، 100، 200، 400 ميكغم/مل) ولمدة 72 ساعة تلاه إضافة 28 ميكرو لتر من صبغة MTT، أما نتائج هذا الاختبار فقد وضحت التأثيرات الفعالة للعقاقير النانوية وبالاعتماد على الجرعة حيث قلت حيوية الخلايا كلما ازدادت الجرعة، واعتماداً على Inhibition concentration (IC<sub>50</sub>) كان السيفالكسين الأكثر فعالية (59.07 ميكغم/مل) تلاه الأمبسلين (69.09 ميكغم/مل) ثم حمض الميفانميك (65.44 ميكغم/مل) و أخيراً الاسيتامينوفين (73.88 ميكغم/مل).

أظهرت نتائج اختبار الكشف عن التغيرات الشكلية Morphological changes باستخدام صبغة Crystal violet في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 المعرضة للعقاقير المحملة على الكيتوسان النانوي وبتركيز Half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) لكل عقار ولمدة 24 ساعة التغيرات

المظهرية المصاحبة للمراحل الأولى للموت المبرمج Apoptosis مثل تلف الغشاء الخارجي، أما علامات الموت المبرمج النهائية فقد تم الكشف عنها بإجراء اختبار ثنائي الصبغة باستخدام صبغتي الإيثيديوم بروميد و

الأكردين البرتقالي Acridine orange and ethidium bromide (AO/EtBr) فاصطبغت الخلايا السرطانية السليمة وغير المعاملة بالعقاقير المحملة على الكيتوسان النانوي باللون الأخضر لـ Acridine orange التي تصبغ الحمض النووي للخلايا السليمة، أما الخلايا المعاملة بالعقاقير النانوية أصطبغت باللون البرتقالي لـ Ethidium bromide التي تصبغ الحمض النووي للخلايا الميتة والتي تلف غشائها.

بينت نتائج اختبار (qRT-PCR) Reverse Transcription Polymerase Chain أن ارتفاع التعبير الجيني Gene expression لـ جين *Tp53* في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 وكان السيفالكسين الأكثر تأثيراً حيث كان التعبير الجيني في الخلايا السرطانية التي عُرضت له  $(3.233 \pm 0.2603)$  تلاه الاسيتامينوفين  $(3.233 \pm 0.1764)$  ثم حمض الميفانميك  $(2.867 \pm 0.1202)$  وأخيراً الأمبسلين  $(2.400 \pm 0.2082)$  مقارنةً مع مجاميع السيطرة والتي لم تعامل بالكيتوسان المحمل بالعقاقير  $(1.000 \pm 0.0)$  مما يبين كفاءة العقاقير المحملة على الكيتوسان في تنشيط p53 وتفعيل مسار الموت المبرمج في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2.

## قائمة المحتويات

رقم الصفحة	الموضوع	التسلسل
i-ii	Summary الخلاصة	
iii-vi	قائمة المحتويات	
vi-vii	قائمة الجداول	
vii-ix	قائمة الأشكال وَالصور	
ix-xii	قائمة المختصرات	
<b>الفصل الأول</b>		
1-4	Introduction المقدمة	1.1
3-4	Aim of study هدف الدراسة	2.1
<b>Chapter Tow الفصل الثاني</b>		
5	Literature Review استعراض المراجع	2
5-6	Cancer السرطان	1.2
6-7	Origin Of Cancer نشأة السرطان	2.2
7-8	الجنور الحرة و حدوث السرطان Reactive Oxygen Species and Cancer	3.2
8-9	Programmed Death الموت المبرمج	4.2
9-10	Liver Cancer سرطان الكبد	5.2
10-12	Epidemiology of Liver Cancer وبائية سرطان الكبد	6.2
12-14	Causative Factors of Liver Cancer العوامل المسببة لسرطان الكبد	7.2

15-16	<b>The Role of Mutated Genes in Liver</b> دور الجينات الطافرة في سرطان الكبد	8.2
16-19	<b>جين TP53</b>	9.2
19-20	<b>Role of Nano-chitosan in Drug Delivery</b> دور الكيتوسان النانوي في توصيل الدواء	10.2
20-21	<b>B-Lactam Antibiotic</b> المضادات الحيوية بيتا لاكتام	11.2
21	<b>Ampicillin</b> الامبسيلين	1.11.2
22	<b>Cephalexin</b> السيفالكسيسين	2.11.2
22	<b>Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs</b> مضادات الإلتهاب غير الستيرويدية	12.2
23	<b>Mefenamic acid</b> حمض الميفانميك	1.12.2
23-24	<b>Paracetamol</b> البراسيتامول	13.2
<b>Chapter Three الفصل الثالث</b>		
25	<b>Materials and Methods</b> المواد و طرائق العمل	3
25	<b>Materials</b> المواد	1.3
25-27	<b>Biological and Chemicals Materials</b> المواد البيولوجية والكيميائية المستخدمة	1.1.3
27-29	<b>Laboratory Equipment and Supplies Used in the Study</b> الاجهزة والمستلزمات المختبرية المستخدمة في الدراسة	2.1.3
29	<b>Methods</b> طرائق العمل	2.3
29	<b>Solutions</b> المحاليل المستخدمة	1.2.3
29	<b>PBS</b> محلول دارى الفوسفات	1.1.2.3
29-30	<b>Rosswell Park Institute</b> الوسط الزراعي	2.1.2.3

30	Ethidium Bromide/ Acridine Orange محلول صبغتي بروميد الاثيديوم والاكردين البرتقالية	3.1.2.3
30	MTT صبغة	4.1.2.3
30	EDTA محلول	5.1.2.3
30	Trypsin التربسين	6.1.2.3
30	Fetal bovine Serum مصل البقر الجنيني	7.1.2.3
31	Cell Maintenance حفظ الخلايا	2.2.3
32	Preparation of Nano-chitosan تحضير الكيتوسان النانوي	3.2.3
23	Preparation of Medicines with Nano-chitosan تحضير الأدوية مع الكيتوسان النانوي	4.2.3
23	FTIR أختبار طيف الاشعة تحت الحمراء	5.2.3
32-33	MTT أختبار السمية الخلوية بواسطة فحص	6.2.3
33-34	HepG2 الكشف عن التغيرات الشكلية في خط خلايا سرطان الكبد البشري	7.2.3
34-35	qRT-PCR تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي	8.2.3
35-37	Primers البادئات	1.8.2.3
37	(AO/EtBr) أختبار ثنائي الصبغة	9.2.3
37	Detection of Reactive Oxygen Species الكشف عن أنواع الأوكسجين التفاعلية	10.2.3
38	Molecular Docking تقنية الالتحام الجزيئي	11.2.3
38	Statistical Analysis التحليل الاحصائي	12.2.3
<b>Chapter Four الفصل الرابع</b>		
39	Result and Discussion النتائج والمناقشة	4

39-41	Preparation of Drugs تحضير الأدوية مع الكيتوسان النانوي with Nano-chitosan	1.4
41-45	أختبار السمية الخلوية بواسطة فحص MTT	2.4
45-49	التغيرات المورفولوجية للخلايا السرطانية الكبدية Morphological Changes in HepG2 Cells	3.4
49-51	النسخ العكسي الكمي في الوقت الحقيقي qRT-PCR	4.4
51-53	أختبار ثنائي الصبغة (AO/EtBr)	5.4
53-57	أختبار التدفق الخلوي flow cytometry	6.4
57-63	الالتحام الجزيئي Molecular Docking	7.4
64	الاستنتاجات و التوصيات Conclusion and Recommendations	الفصل الخامس
64-88	المصادر References	الفصل السادس
Summary		

### قائمة الجداول

رقم الصفحة	العنوان	التسلسل
25-27	جدول يوضح المواد البيولوجية و الكيميائية المستخدمة Biological and Chemicals Materials	(1-3)
27-29	الأجهزة المختبرية والأدوات المستخدمة في الدراسة مع الشركة المصنعة والمنشأ	(2-3)
35	بادئات الحمض النووي منقوص الأوكسجين لجين TP53 المستخدمة في أختبار البلمرة المتسلسل في الوقت الكمي الحقيقي .	(3-3)

36	تراكيز المواد المستخدمة في تفاعل البلمرة المتسلسل qRT-PCR.	(4-3)
36	البرنامج المستخدم لأجراء تفاعل qRT-PCR	(5-3)
44	IC <sub>50</sub> للعقاقير المحملة على الكيتوسان النانوي	(1-4)
62	نتائج طاقة الأرتباط لعقار الامبسلين	(2-4)
62	نتائج طاقة الأرتباط لعقار الاسيتامينوفين	(3-4)
63	نتائج طاقة الأرتباط لعقار الميفانميك	(4-4)
63	نتائج طاقة الأرتباط لعقار السيفالكسين	(5-4)

### قائمة الأشكال والصور

رقم الصفحة	العنوان	التسلسل
11	شكل يوضح المواقع الخمسة عشر لأنواع السرطانات عالمياً حسب عدد الوفيات	(1-2)
12	شكل يوضح المواقع الخمسة عشر لأنواع السرطانات في العراق حسب عدد الوفيات	(2-2)
12	يوضح أكثر عشرة سرطانات مسببة للوفاة في عدد من الدول العربية	(3-2)
18	المجالات الوظيفية لبروتين الورم P53	(4-2)
40	طيف الامتصاص FT-IR لعقار الامبسلين – كيتوسان	(1-4)
40	طيف الامتصاص FT-IR لعقار الاسيتامينوفين – كيتوسان	(4-2)
41	طيف الامتصاص FT-IR لعقار الميفانميك – كيتوسان	(3-4)
41	طيف الامتصاص FT-IR لعقار السيفالكسين - كيتوسان	(4-4)

42	سمية عقار الامبسلين-الكيوتوسان النانوي في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2	(5-4)
43	سمية عقار الاسبيتامينوفين-الكيوتوسان النانوي في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2	(6-4)
43	سمية عقار الميفانميك-الكيوتوسان النانوي في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2	(7-4)
44	سمية عقار السيفالكسين- الكيوتوسان على النانوي في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2	(8-4)
46	التغيرات المورفولوجية في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 لمجموعة السيطرة	(9-4)
47	التغيرات المورفولوجية في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 المعاملة بعقار الامبسلين – كيوتوسان	(10-4)
47	التغيرات المورفولوجية في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 المعاملة بعقار الاسبيتامينوفين – كيوتوسان	(11-4)
48	التغيرات المورفولوجية في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 المعاملة بعقار الميفانميك – كيوتوسان	(12-4)
48	التغيرات المورفولوجية في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 المعاملة بعقار السيفالكسين – كيوتوسان	(13-4)
49	التعبير الجيني لجين TP53 في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 بتأثير الأدوية النانوية	(14-4)
52	أختبار (AO/EtBr) لمجموعة خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 غير المعرضة للعقاقير النانوية	(15-4)
52	أختبار (AO/EtBr) لمجموعة خط خلايا سرطان الكبد البشري سرطان الكبد HepG2 المعرضة للامبسلين – كيوتوسان	(16-4)
53	أختبار (AO/EtBr) لمجموعة خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 المعرضة للاسيتامينوفين – كيوتوسان	(17-4)
53	أختبار (AO/EtBr) لمجموعة خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 المعرضة للميفانميك – كيوتوسان	(18-4)

53	أختبار (AO/EtBr) لمجموعة خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 المعرضة للسيفالكسين - كيتوسان	(19-4)
55	أنواع الأوكسجين التفاعلية ROS في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 غير المعاملة بالعقاقير	(20-4)
55	أنواع الأوكسجين التفاعلية ROS في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 المعاملة بالامبسلين - كيتوسان	(21-4)
56	أنواع الأوكسجين التفاعلية ROS في لخط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 المعاملة بالاسيتامينوفين - كيتوسان	(22-4)
56	أنواع الأوكسجين التفاعلية ROS في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 المعاملة بالميفانميك - كيتوسان	(23-4)
57	أنواع الأوكسجين التفاعلية ROS في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG3 المعاملة بالسيفالكسين - كيتوسان	(24-4)
58	الالتحام الجزيئي لعقار الامبسلين النانوي	(25-4)
59	الالتحام الجزيئي لعقار الاسيتامينوفين النانوي	(26-4)
59	الالتحام الجزيئي لعقار الميفانميك النانوي	(27-4)
60	الالتحام الجزيئي لعقار السيفالكسين النانوي	(28-4)

### قائمة المختصرات

المصطلح	المختصر
Serine Threonine Kinase	AKT
Alanine	ALA
Annexin A Protein Family	ANXA
Acridine orange/ethidium bromide staining	AO/EtBr

<b>Arginine</b>	<b>ARG</b>
<b>Asparagine</b>	<b>ASN</b>
<b>Bel-like protein</b>	<b>BAX</b>
<b>B cell lymphoma-2</b>	<b>BCL2</b>
<b>Beta-lactams</b>	<b>B-lactams</b>
<b>Concentration</b>	<b>C</b>
<b>Complementary Deoxyribonucleic acid</b>	<b>cDNA</b>
<b>Cyclooxygenase</b>	<b>COX</b>
<b>Cycle Threshold</b>	<b>CT</b>
<b>C-Terminal Domain</b>	<b>CTD</b>
<b>Catenin Beta 1</b>	<b>CTNNB1</b>
<b>DNA Binding Domains</b>	<b>DBD</b>
<b>Dimethyl Sulfoxide</b>	<b>DMSO</b>
<b>Deoxyribonucleic acid</b>	<b>DNA</b>
<b>Death Signaling Complex</b>	<b>DSC</b>
<b>Ethylene Diamine Tetra Acid</b>	<b>EDTA</b>
<b>Focal Adhesion Kinase</b>	<b>FAK</b>
<b>Fas Ligand</b>	<b>FasL</b>
<b>Fetal bovine Serum</b>	<b>FBS</b>
<b>Fork Head Box</b>	<b>FOX</b>
<b>Fourier transform infrared spectroscopy</b>	<b>FTIR</b>
<b>Ground zero</b>	<b>G0 phase</b>

<b>First growth</b>	<b>G1</b>
<b>Glutamic acid</b>	<b>GLU</b>
<b>Hepatoblastoma cell line</b>	<b>HepG2</b>
<b>Histidine</b>	<b>HIS</b>
<b>Half-Maximal Inhibitory Concentration</b>	<b>IC<sub>50</sub></b>
<b>Mouse Double Minute 2 homolog</b>	<b>MDM2</b>
<b>Minute</b>	<b>Min</b>
<b>(3-[4,5-dimethylimidazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide</b>	<b>MTT</b>
<b>N-Acetyl-P-benzoquinone Imine</b>	<b>NAPQI</b>
<b>Non Steroidal Anti-inflammatory</b>	<b>NSAID</b>
<b>Oligomerization Domains</b>	<b>OD</b>
<b>Cyclin-dependent kinase inhibitor</b>	<b>P21</b>
<b>Phosphate Buffer Saline</b>	<b>PBS</b>
<b>Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein</b>	<b>PMAIPI</b>
<b>Proline Rich Domains</b>	<b>PRR</b>
<b>Phosphate and Tensin Homolog</b>	<b>PTEN</b>
<b>P53 Upregulated Modulator of Apoptosis</b>	<b>PUMA</b>
<b>Real-Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</b>	<b>qRT-PCR</b>
<b>Roswell Park Memorial-1646</b>	<b>RAMI-1646</b>
<b>Ribonucleic acid</b>	<b>RNA</b>
<b>Reactive oxygen species</b>	<b>ROS</b>

<b>Second</b>	<b>S</b>
<b>Synthesis phase</b>	<b>S phase</b>
<b>Serum free media</b>	<b>SFM</b>
<b>Tetramerization Domain</b>	<b>TD</b>
<b>Transcriptional Activation Domains</b>	<b>TDA</b>
<b>Telomerase Reverse Transcriptase</b>	<b>TERT</b>
<b>Tetrahydrofuran</b>	<b>THF</b>
<b>Threonine</b>	<b>THR</b>
<b>Tumor protein 53</b>	<b><i>TP53</i></b>
<b>Tryptophan</b>	<b>TYR</b>
<b>Volume</b>	<b>V</b>

الفصل الأول

المقدمة

**Chapter one**

**Introduction**

## 1.1: المقدمة Introduction

السرطان مرض يتضمن على مجموعة من التغيرات تشترك في صفة واحدة هي الانقسام غير المسيطر عليه للخلايا لكن ليس كل نمو شاذ للخلاية يصنف تحت مسمى السرطان (Preethi et al., 2021). فالأورام تكون على نوعين أما أورام حميدة Benign tumor والتي تتميز بكونها موضعية لا تنتشر إلى أماكن أخرى في الجسم حيث يكون ضررها من خلال الضغط الذي تسببه على العضو الذي تتكون فيه والتي يمكن أستئصالها دون أن تعود ثانية ونادراً ما تعرض حياة الفرد للخطر، أو تكون أورام سرطانية خبيثة Malignant tumor ذات قابلية شره للانتشار وأستعمار حتى الأماكن البعيدة في الجسم (Patel, 2020).

تنشأ الأورام السرطانية نتيجة تراكم الأضرار في الحمض النووي منقوص الأوكسجين Deoxyribonucleic acid (DNA) الأمر الذي يؤدي إلى حدوث الطفرة Mutation و التي تغير تسلسل الشفرة الوراثية للجين المشفر للبروتين و من ثم تغيير وظيفة البروتين أو تعطيله والنتيجة فقدان الوظيفة للجينات الكابحة للورم Tumor Suppressor Gene والتي تسيطر على إنقسام الخلية مما يجعل الخلية تنقسم بشكل غير مُسيطر عليه بفعل اكتساب الوظيفة للجينات الدافعة لدورة الخلية Oncogene وهي المسؤولة عن النمو و الإنقسام (Ceberio and Berardino, 2023).

في الواقع نتعرض يوميا للعديد من العوامل التي تسبب الطفرة Mutation مثل الملوثات البيئية و الكيماويات والأشعة فوق البنفسجية فضلاً عن دور التقدم في العمر و الاستعداد الوراثي الذي يساهم في نشوء السرطان كما في متلازمة السرطان الجيني والتي تكون مرتبطة بالطفرة الجينية الموروثة من أحد الابوين والتي قد تؤدي إلى ظهور السرطان في سن مبكرة، ولكن ليس كل سرطان منتشر في العائلة سببه وراثي في الواقع اكثر الطفرات التي يكتسبها الفرد خلال حياته تكون بسبب عوامل بيئية أو أسلوب الحياة والنظام الغذائي غير الصحي (Moon et al., 2023).

تلعب الجينات دوراً مهماً في تطور السرطان أو الحد من انتشاره أن من أهم الجينات الكابحة للورم والمسيطره على توازن الخلية جين TP53 الموجود على الذراع القصير للكروموسوم السابع عشر في الإنسان 17p13.1، الذي يرتبط بشكل كبير بالأورام البشرية ويلقب بـ "حارس الجينوم" نظراً إلى دوره في الإستجابة لمختلف الضغوط الداخلية والخارجية للخلية التي من الممكن أن تسبب ضرراً للجينوم البشري فهو يمارس عمله أما بواسطة الأرتباط المباشر مع

الحمض النووي DNA مستغلاً تواجدته في النواة أو يرتبط مع بروتينات أخرى مثل بروتين Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor (p21) والتي ينظم من خلالها عمل الجينات التي يسيطر عليها ليووقف دورة الخلية بعدها يحفز جينات الإصلاح إذا كان الضرر قابل للإصلاح أو يفعل الموت المبرمج إذا كان الضرر غير قابل للإصلاح، ولكن عندما تحدث الطفرة فيه تفقده وظيفته أو تغير تعبيره الجيني و توظفه للعمل كعامل نسخ لصالح الورم (Chen, x, et al., 2022).

إن السرطان هو المسبب الثاني للوفيات حول العالم حسب تقارير منظمة الصحة العالمية إذ يوجد أنواع كثيرة من السرطانات وتسمى حسب العضو الذي تستعمره، حيث يُعد سرطان الكبد أحد أكثر الأنواع شيوعاً والذي شكل تحدياً علاجياً عالمياً فهو يبدأ في الخلايا الكبدية ويتميز بعدم وجود أعراض كذلك قابلية عالية لتكرار الإصابة، يتم تشخيص أكثر من 800,000 حالة سنوياً حول العالم بسرطان الكبد (Radzak et al., 2022). والذي ارتبط مع الإصابة بالتهاب الكبد الفيروسي بنوعيه B و C بالإضافة إلى السممة وتناول المشروبات الكحولية وتليف الكبد أيضاً المواد السامة التي تنتقل عن طريق الاغذية مثل Aflatoxins B1 (Carlsson et al., 2022).

نظراً لزيادة حجم هذه الآفة فإن طرق العلاج المتبعة لا توفر نسب النجاح المتوقعة لذلك توجهت الأبحاث نحو استخدام الجسيمات النانوية والتي هي عبارة عن جزيئات صغيرة جداً بأحجام تتراوح من 1 إلى 100 ملم والتي جعلت منها ذات خصائص فريدة حيث أثبتت فعاليتها في توصيل أدوية السرطان إلى الخلية الهدف دون الحاق ضرر بالخلية الطبيعية (Kumar A., al et 2022).

يُعتبر الكيتوسان أحد البوليمرات النانوية والذي هو يتكون من وحدات متكررة من السكريات الأحادية، يمكن الحصول عليه من خلال أسئلة الكيتين الموجود في الهياكل الخارجية للقشريات البحرية والحشرات وجدران خلايا الفطريات، له عدة خصائص جعلت منه مرشحاً للأستخدامات الطبية مثل كونه قابل للتحلل البيولوجي وتوافقه الحيوي (Roman-Doval et al., 2023). تم استعماله في مجال الطب لتحسين الخصائص العلاجية للأدوية مثل المضادات الحيوية بيتا لاكتام (فئة من العلاجات التي يتم عزلها من المستقلبات الثانوية المنتجة من الكائنات الدقيقة) مما اعطاها مميزات جوهرية مثل فعالية اختراق غشاء الخلية وبالتالي رفع كفاءتها (Kaur et al., 2022).

المضادات الحيوية بيتا لاكتام تستخدم في الغالب تستخدم لعلاج الالتهابات لكنها أظهرت فعالية في علاج السرطان بواسطة منع تحول خلاياه إلى جذعية وكونها مضادة للتكاثر فتعمل على إيقاف دورة الخلية في أي مرحلة كانت حتى مرحلة السكون G0 Phase فتعمل على اتلاف الحمض النووي لميتوكوندريا الخلية السرطانية أو تتداخل معه عن طريق الإجهاد التأكسدي المفرط مما يحفز الجينات الكابحة للورم مثل TP53 والذي يفعل الموت المبرمج مثل caspase، من أنواع المضادات الحيوية مجموعة البنسلينات Penicillin's التي تنتمي إلى فئة بيتا لاكتام (Magklaras et al., 2023).

ايضاً عمل الكيتوسان على تحسين خصائص مضادات الإلتهاب غير الستيرويدية Nonsteroidal anti-inflammatory و التي تعمل من خلال تثبيط أنزيمات Cyclooxygenase (COX)، وقد وجد أن لها تأثير مضاد للأورام والحد من انتشارها النقيلي، مع تحسين خصائصها العلاجية عندما يتم تحميلها على المواد النانوية (Kirtonia et al., 2021).

## 2.1: هدف الدراسة Aim of study

نظراً لأهمية مرض سرطان الكبد وانتشاره المتزايد وفتكه بالكثير من الأرواح وقلّة البحوث التي تستهدفه بالكيتوسان النانوي على المستوى الجزيئي في العراق لذلك هدفت الدراسة الحالية إلى:

1- تقييم فعالية ارتباط الكيتوسان مع العقاقير (الامبسلين، السيفالكسين، الأسيتامينوفين، حمض الميفانميك) بواسطة جهاز FTIR، ايضاً الكشف عن طاقة ومواقع الارتباط الفعالة للكيتوسان المحمل بالعقاقير مع الاحماض الأمينية لبروتين p53 وبأستخدام تقنية Molecular Docking.

2- دراسة التأثيرات العقارية للكيتوسان المحمل بالعقاقير في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 خارج الجسم الحي وتحديد IC<sub>50</sub> لكل عقار بواسطة اختبار MTT .

3- الكشف عن التأثيرات التأزيرية للكيتوسان المحمل بالعقاقير في استحثاث الأجهاد التأكسدي في الخلايا السرطانية من خلال اختبار Flow Symmetry.

4- معرفة مدى كفاءة الكيتوسان المحمل بالعقاقير النانوية في تنشيط p53 وزيادة تعبيره الجيني لتفعيل مسار الموت المبرمج في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 بواسطة اختبار qRt-PCR

5- الكشف عن التغيرات الشكلية المصاحبة للمراحل الاولية للموت المبرمج في خط خلايا سرطان الكبد البشري المعرضة للكيتوسان المحمل بالعقاقير بواسطة صبغة Crystal Violet ، ايضاً الكشف عن المراحل النهائية للموت المبرمج بأستخدام مزيج صبغتي Acridine orange and Ethidium bromide .

الفصل الثاني

استعراض المراجع

**Chapter Two**

**Literature**

**Review**

## 2 - استعراض المراجع: Literature Review

## 1.2: السرطان Cancer

يُطلق مصطلح السرطان Cancer على مجموعة الخلايا التي تتميز بالنمو و الانتشار غير المسيطر عليه والتي تؤدي إلى تدمير الخلايا السليمة حيث أنه من الممكن أن يبدأ في أي مكان من الجسم ثم ينتقل إلى الأعضاء المجاورة للعضو المصاب أو إلى أماكن أخرى بعيدة في الجسم و يسمى حسب العضو الذي يتكون فيه حتى وأن استعمر أعضاء أخرى فهو يبقى محتفظاً بأسم العضو الذي تكون فيه مثلا السرطان المتكون في الكبد عند انتقاله إلى مكان آخر فلا يأخذ اسم العضو الذي استعمره بل يدعى سرطان الكبد النَّقيلي Metastatic liver cancer، يتكون الورم السرطاني Cancer Tumor عندما يفوق عدد الخلايا الوليدة نظائرها الميتة (Nia et al., 2020). بشكل عام الأورام تكون على نوعين:

## • أورام حميدة Benign Tumor

وهي الأورام التي يكون تضاعفها موضعياً وتتميز بمحدودية تطورها وتشبه خلايا العضو الذي تنشأ فيه، أما ضررها يكون من خلال الضغط الذي تسببه على العضو الذي تتكون فيه من أنواعها الأورام الليفية في الرحم Uterine fibroids والتي تعرف أيضاً بالأورام العضلية الملساء Benign smooth muscle tumors بالإضافة إلى الأورام الوعائية في الجلد Hemangiomas و الأورام الشحمية Lipomas في الرقبة والكتفين، (Boutry et al., 2022).

## • أورام خبيثة Malignant Tumors

و التي تعرف بالسرطان Cancer الذي يتميز بنمو غير محدود للخلايا ويحتل الأماكن المحيطة للعضو المصاب، كذلك يرسل نقاتله خلال الدم واللمف ليغزو الأماكن البعيدة في الجسم، أن هذا النوع من الأورام إذا لم يعالج أو لم يستجيب للعلاج فإنه يؤدي إلى الوفاة من أكثر أنواعه شيوعاً سرطان الكبد liver cancer وسرطان الرئة Lung cancer وسرطان الدماغ Brain cancer وسرطان العظام Bone cancer (Patel, 2020).

السرطان مشكلة عالمية فهو يتسبب في وفاة ما يقارب 10 ملايين شخص سنوياً وترتبط وبائيته بالموقع الجغرافي والخدمات الصحية فضلاً عن عامل العمر فقد وجد أن حوالي 50% من حالات السرطان هي في قارة آسيا بسبب نمط الحياة وقلة الخدمات الصحية (Deo et al., 2022). ضراوة السرطان لا تقل شراسة في العراق مما هي عالمياً فقد أحتل العراق المركز السابع في التسبب بالوفاة للعام 2021

(Ervik et al., 2024). إذ سُجّلت حوالي (37,382) حالة مصابة بالسرطان في عام 2022 وتسبب في وفاة (21,536) شخص لنفس السنة منها (3,372) شخص بسبب سرطان الثدي Breast cancer و (2,613) بسبب سرطان الرئة Lung cancer (Iraq Ministry of Health and Environment, 2021).

تضمنت العلاجات التقليدية لمرض السرطان الجراحة التي يتم فيها أستنصال الورم والأنسجة المحيطة به، كذلك العلاج الكيميائي الذي يستخدم لقتل الخلايا السرطانية ويعطى عن طريق الوريد أو الفم، بالإضافة إلى العلاج الإشعاعي الذي يستخدم الأشعة السينية عالية الطاقة (Debela et al., 2021). لكن في الوقت الحاضر توجهت الأنظار نحو أساليب علاجية جديدة منها استعمال مضادات الأكسدة الطبيعية والعلاج بالخلايا الجذعية فضلاً عن الجسيمات النانوية التي فتحت افاقاً واعدة فهي تمتلك امكانات اختراق للخلايا السرطانية دون أن تسبب ضرراً للخلايا السليمة، لكن وعلى الرغم من كل وسائل العلاج المتاحة فإن الاكتشاف المبكر للسرطان هو الأفضل في زيادة فرص بقاء المريض على قيد الحياة (Wang D., 2022).

## 2.2: نشأة السرطان Origin of The Cancer

تتحدّر مليارات الخلايا السرطانية في الأصل من خلية واحدة حصل فيها اضطراب أدى إلى خلل في العوامل الجينية واللاجينية التي تسبب نشوء المرض ومع ذلك فإن خلاً جينياً واحداً يكون غير كافي لتحويل الخلية الطبيعية إلى خلية سرطانية بل يجب أن يكون هنالك تراكم لمجموعة من الأخطاء والتي تحرض على تكون السرطان (Argenzio and Klimmeck, 2021).

تعد الطفرة Mutation هي الأساس الجزيئي لنشوء السرطان والتي قد تحدث بسبب العمليات الحيوية داخل الخلية أو من الممكن أن تكون بسبب ضرر من خارج الخلية مما يسبب تلف في الجينات ومع تراكم هذه الأضرار تصبح الخلية اقل قدرة على اصلاحها مما يؤدي إلى خلل في الوظيفة البيولوجية للخلية (Hanselmann and Welter, 2022). حيث تؤدي الطفرة إلى توقف عمل الجينات الكابحة للورم Tumor suppressors gene مما يفسح المجال للجينات الورمية Oncogene أن تعمل لصالح الخلايا السرطانية من خلال إنتاج عدد كبير جداً من البروتينات التي تحفز على إنقسام الخلية والتي من الممكن أن تكون ذات وظيفة مختلفة عن البروتينات الطبيعية، حيث أن الخلايا السرطانية عكس الخلايا الطبيعية لا توقف دورة الخلية وتصلح الضرر بل تستمر بالإنقسام وبشكل اسرع من المعتاد فتتكون خلايا ذات شكل غير طبيعي وبروزات تشبه اذرع السرطان (Habane et al., 2021).

إن الأورام الخبيثة عادة ما تعرف على انها كُتل صلبة لها القابلية على استعمار العضو الذي تكونت فيه فضلاً عن قابليتها على ارسال قطع من حمضها النووي المشوه "النقائل" Metastases عن طريق الدم واللمف إلى أجزاء أخرى من الجسم (Radzak et al., 2022).

أما العوامل التي تؤدي إلى حدوث الطفرة فهي كثيرة من ضمنها التدخين والذي أصبح من الواضح أنه المسبب الرئيسي لسرطان الرئة فضلاً عن دوره في سرطان الفم و المريء ايضاً سرطان المثانة والكلية والبنكرياس (Davalos and Esteller, 2023).

من العوامل الأخرى التي تسبب الطفرة هو التعرض للملوثات البيئية فضلاً عن السمنة و التقدم بالعمر، من الاسباب الأخرى هي الوراثة بنوعها الجينية أي التي تغير تسلسلات الحمض النووي والوراثة اللاجينية Epigenetic (Danylova and Komisarenko, 2020). و التي تؤدي إلى اعادة برمجة الحمض النووي DNA دون أن تغيير تسلسلات القواعد النيتروجينية مثل تعديلات الهيستون والمثيلة، أن هذا الخلل يسمح للخلايا السرطانية أن تتكاثر وتنتشر وتكتسب صفات جديدة مثل تكوين أوعية دموية لتدعم بقائها (Hart et al., 2020).

### 3.2: الجذور الحرة و حدوث السرطان Reactive Oxygen Species and Cancer

أنواع الأوكسجين التفاعلية ROS أو كما تعرف بالجذور الحرة Free radicals هي جُزيئات تمتلك الكترولونات غير مرتبطة في غلافها الخارجي مما يجعلها نشيطة وشديدة التفاعل فهي في حركة دائمة للبحث عن ذرة أو جزيء لترتبط به لتستقر، هذه الجزيئات تعتبر منتجات ثانوية لعملية الاستقلاب الغذائي وتلعب أدواراً مهمة في نقل الإشارات الخلوية حيث أنها موجودة في الخلية الطبيعية لكن بمستويات منخفضة وثابتة لكن اذا ارتفعت مستوياتها فأنها تسبب ضرراً في الخلية، من أنواعها hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) و superoxide anion radical ( $O_2^-$ ) (Sies and Jones, 2020). حيث أنها تتكون داخل الخلية بشكل أساسي في الميتوكوندريا أو من الممكن تكونها بسبب عوامل الإجهاد الخارجية مثل الإشعاع و الملوثات، ايضاً تولدها الخلايا كمنتجات ثانوية للعمليات البيولوجية (Obeng E, 2021).

لأنواع الأوكسجين التفاعلية ROS أدواراً فسيولوجية مهمة جداً ويتم تنظيم مستوياتها داخل الخلية بواسطة مضادات الأوكسدة مثل الكلوتاثيون Glutathione، لكن عند فقدان التوازن بين إنتاجها وقدرة الجسم على إزالة تأثيرها السمي الضار يحدث ما يعرف بالإجهاد التأكسدي Oxidative stress، تلعب ROS دوراً في نقل الإشارة بين الخلايا مما جعلها تلعب دوراً مهماً في بدء السرطان وانتشاره بدءاً من تكونه ووقفاً عند دعم انتشاره مثلاً بواسطة تولد الأوعية الدموية له وانتهاءً بغزوه واستعماره للجسم فقد وجد أن ارتفاع مستويات

ROS أدى إلى عدم الاستقرار الجيني و تلف في الحمض النووي DNA و من ثم حدوث الطفرة (Rajavel et al., 2021).

إن الإجهاد التأكسدي يؤثر على البروتينات ذات الوظائف الحساسة مثل البروتين الكابح للورم P53 والذي يتحكم في العديد من الجينات فضلاً عن تنظيمه لدورة الخلية مما يفقده الوظيفة التنظيمية و من ثم منع الدور القمعي له ضد السرطان ايضاً بإمكانها أن تسبب تغيرات هيكلية تؤدي إلى توظيف p53 لتشفير بروتينات تدعم تطور الورم وهو ما يعرف ب طفرة اكتساب الوظيفة Gain of function mutation، (Wang Y., et al., 2021).

في الواقع وجد أن الأمر له جانب آخر فالخلايا السرطانية ترفع مستويات أنواع الأوكسجين التفاعلية إلى حد معين لكن عند ارتفاعها إلى مستويات مرتفعه جدا فإن ذلك يسبب الإجهاد التأكسدي فيها مما يؤدي إلى بدء مسار الموت المبرمج Apoptosis وذلك من خلال إعادة تفعيل بروتين P53 (Cordani et al., 2020).

#### 4.2: الموت المبرمج Programmed Death

يُعد الموت المبرمج Programmed Death أو كما يعرف ايضاً Apoptosis أحد أكثر أنواع الموت الخلوي شيوعاً و هو عملية بيولوجية يتم من خلالها التخلص من الخلية عند عدم وجود حاجة لبقائها بطريقة منظمة دون إفراز مواد ضارة في المنطقة المحيطة بها، حيث تلعب هذه العملية دوراً حيوياً في الحفاظ على صحة الأنسجة و الأعضاء من خلال التخلص من الخلايا القديمة أو التالفة وأستبدالها بخلايا جديدة (Morana et al., 2022). يتم تنشيط الموت المبرمج من خلال مساران رئيسان:

##### 1- المسار الخارجي Extremal Pathway

أو كما يعرف بمسار مستقبل الموت Death receptor pathway والذي ينتشط استجابةً لإشارات من خارج الخلية، حيث يرتبط Fas ligand (FasL) مع مستقبله على سطح الخلية Fas receptor مما يؤدي إلى تكون Death signaling complex (DISC) الذي ينشط Caspase 8 والذي يعمل على تنشيط Caspase 3 مما يفعل مسار الموت المبرمج، (Zamaraev et al., 2020).

##### 2- المسار الداخلي Intrinsic Pathway

ايضاً كما يعرف بمسار الميتوكوندريا Mitochondrial pathway والذي يتحفز من خلال الإشارات من داخل الخلية مثل ضرر الحمض النووي DNA أو الإجهاد التأكسدي والذي يستجيب له بروتين p53 وينشط جينات الموت المبرمج Pro-apoptotic genes مثل bcl-like protein

(BAX) 4، بالإضافة إلى phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein1 (PMAIPI) و أيضاً p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA) مما يتسبب في إيقاف البروتينات المضادة للموت المبرمج Anti-apoptotic genes مثل (BCL2) The B Cell Lymphoma-2 والذي يعمل كحارس يمنع خروج Cytochrome c من غشاء الميتوكوندريا مما يؤدي إلى تكون ثقب في غشاء الميتوكوندريا لذلك يتحرر Cytochrome c فيرتبط مع Apoptotic protease activating factor-1 مما ينشط Caspase-9 ثم Caspase-3 ثم Caspase-7 والتي تعمل على تنشيط انزيم Nuclease DNA المسؤول عن تقطيع الحمض النووي (Villalpando-Rodriguez and Gibson, 2021). فتبدأ الخلية بالإنكماش ويتكثف الكروماتين ويتفكك ثم تتكون اجسام الاستماتة Apoptotic bodies والتي يتم التخلص منها عن طريق الـ Phagocyte، حيث أن هذه العملية تتم بطريقة منظمة ودون التسبب في التهاب أو ضرر للأنسجة المحيطة (Schlesinger P., 2024)

## 5.2: سرطان الكبد Liver Cancer

الكبد هو عضو حيوي ذو لون بني محمر غامق يقع في الجزء العلوي الأيمن من التجويف البطني أسفل الحجاب الحاجز، يتكون من فصين وكل فص يتكون من فصيصات صغيرة، يكون تقريباً 2% من وزن الشخص البالغ (Bazira, 2023).

يقوم الكبد بالعديد من الوظائف الحيوية في الجسم مثل إزالة السموم من منتجات التمثيل الغذائي وافراز الصفراء، لذلك فهو معرض للضرر، ينتج تليف الكبد عن إصابة الكبد المستمرة والالتهابات مما يؤدي إلى اعتلال في وظائف الكبد (Berasain et al., 2023). ففي حالة تلف الكبد تعمل الخلايا النجمية على تكوين نسيج سميك ليفي في محاولةٍ منها لترميم التلف لكن سرعان ما يتم استبدال النسيج الطبيعي للكبد بالنسيج الندبي مما يؤدي في النهاية إلى تكون العديد من البقع الندبية التي تسبب فشل العضو والاصابة بسرطان الكبد، أن هذا المرض هو ورم خبيث شديد الغزو يتكون بسبب نمو غير طبيعي للخلايا في الكبد (Chen, X, et al., 2023). بشكل عام يكون سرطان الكبد على نوعين:

### • سرطان الكبد الأولي Primary Liver Cancer

هو نوع من السرطان يبدأ في الكبد نفسه و يعد أحد المسببات الرئيسية للوفيات المرتبطة بالسرطان فقد سُجلت أعلى نسب للإصابة في آسيا وإفريقيا، أن من أكثر أنواعه شيوعاً هو سرطان الخلايا الكبدية Hepatocellular Carcinoma وهي الخلايا الرئيسية في الكبد

(*Jin, B, et al., 2022*). هنالك أنواع أخرى من سرطان الكبد الأولي والتي تعتبر نوعاً ما نادرة مثل سرطان الأفتية الصفراوية Intrahepatic cholangiocarcinoma والذي يبدأ في الخلايا التي تبطن القنوات الصفراوية داخل الكبد أيضاً الورم الأرومي الكبدي Hepatoblastoma الذي يصيب الأطفال الذين تقل أعمارهم عن أربع سنوات (*Yang, C, et al., 2023*).

#### • سرطان الكبد الثانوي Secondary Liver Cancer

هو نوع من السرطان ينتقل إلى الكبد عن طريق الدم أو اللمف من جزء آخر مصاب في الجسم ويعرف بالسرطان النقيلي Metastatic Cancer، ويتم تسميته حسب العضو الأساسي الذي تكون فيه، يتميز هذا النوع بأنه أكثر انتشاراً من السرطان الذي يتكون في الكبد نفسه (*Zhang, X, et al., 2023*).

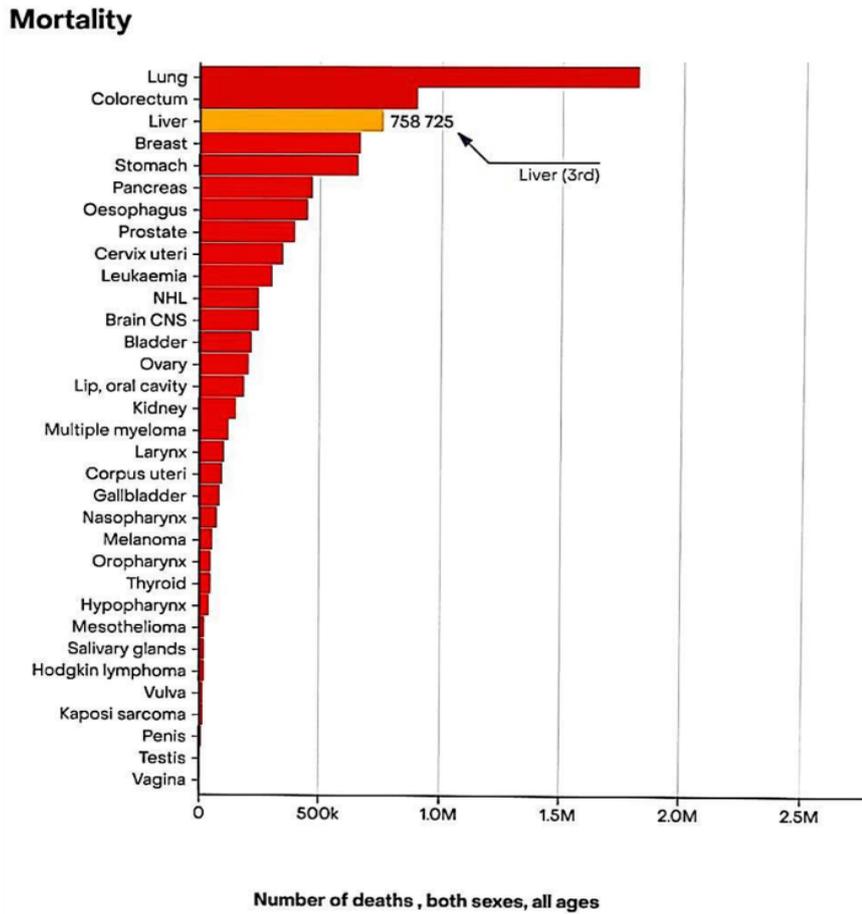
يتميز سرطان الكبد يتميز بعدم وجود أعراض وخاصة في المراحل الأولى ومع ذلك هنالك بعض العلامات البسيطة مثل خسارة الوزن، فقدان الشهية، الشعور بالتعب، الغثيان، إذ أنه يمر بعدة مراحل وحسب حجم الورم الذي يكون أقل من 3 سم في المراحل المبكرة وتكون فرص العلاج في هذه المرحلة أفضل فهو لم يبدأ بالانتشار وتكوين الأوعية الدموية بعد، أما المراحل الأخرى والتي يكون حجم الورم فيها أكبر من 3 سم تقل فيها قابلية المرض للاستجابة للعلاجات المستخدمة وتكون نسبة البقاء على قيد الحياة أقل (*Reig et al., 2022*).

يبدأ سرطان الكبد بحصول تغيرات في العديد من المسارات المهمة مثل مسار إصلاح التيلوميراز Telomerase repair وهي عملية حيوية مهمة للحفاظ على التيلوميرات (تسلسلات متكررة توجد في نهايات الكروموسومات) الذي يتحور فيه جين *Telomerase reverse transcriptase (TERT)* ومسار البيتا كاتينين Beta-Catenin وهو مسار خلوي يلعب دوراً مهماً في تنظيم نمو الخلايا وتمييزها والذي يتحور فيه جين *Catenin beta-1 (CTNNB1)*، فضلاً عن جين *TP53* (*Rebouissou et al, 2020*).

## 6.2: وبائية سرطان الكبد Epidemiology of Liver Cancer

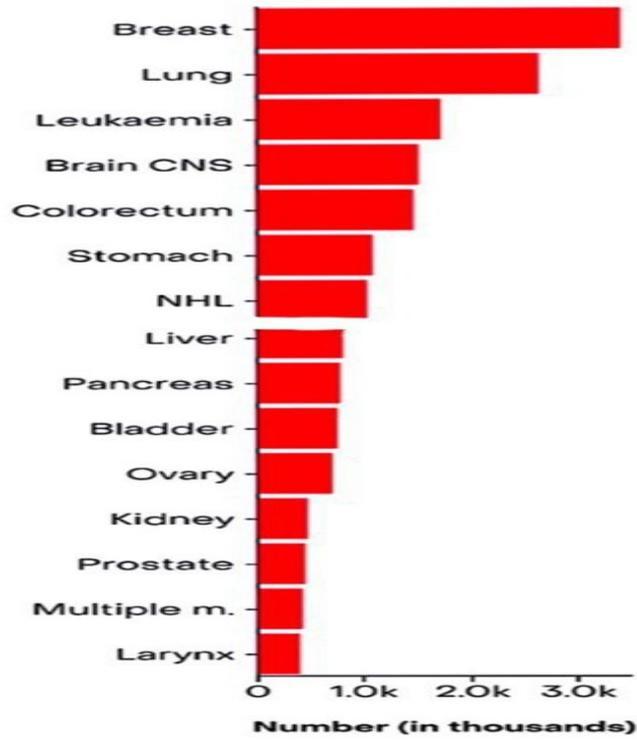
ينتشر سرطان الكبد في جميع دول العالم لكن نسبة الإصابات والوفيات تختلف من مكان إلى آخر حسب الظروف البيئية والخدمات الصحية للبلد، الورم الكبدي الخبيث صُنّف من بين الخمسة أورام الأولى المسببة للوفيات عالمياً لجميع الأعمار ولكلا الجنسين، حيث تسبب في حوالي 745,000 حالة وفاة على مستوى العالم وهو أكثر انتشاراً في شرق وجنوب شرق آسيا (*Zhou, J, et al., 2022*).

في عام 2022 احتل سرطان الكبد المركز الثالث بين المواقع الخمس عشر لأكثر أنواع السرطانات المسببة للوفاة عالمياً حيث تسبب في وفاة حوالي 758,725 شخص من كلا الجنسين ولجميع الفئات العمرية مما يعكس شراسة الورم كما موضح في الشكل (2-1)، أما في العراق فقد احتل المركز العاشر (Ervik et al., 2024). وكما موضح في الشكل (2-2)، إذ كان من بين أكثر أنواع السرطانات فتكاً وحسب احصائيات منظمة الصحة العالمية، ايضاً احتل سرطان الكبد المركز الأول لأكثر أنواع السرطانات شيوعاً لعدداً من الدول العربية (العراق، الأردن، الكويت، لبنان، الامارات، مصر)، حيث تسبب في ما يقارب 28,337 حالة وفاة في البلدان المذكورة آنفاً (World Health Organization, 2024). وكما موضح في الشكل (3-2).



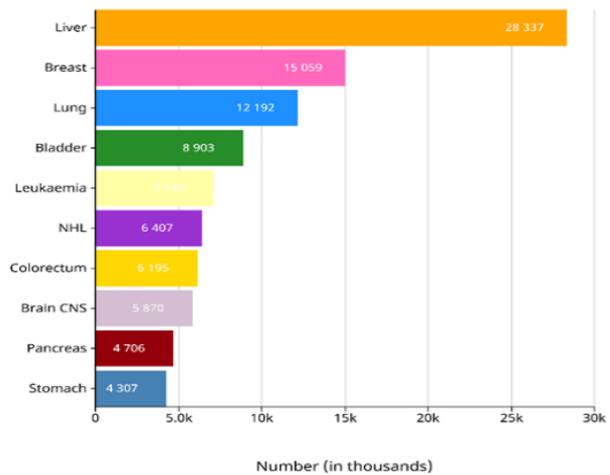
شكل (2-1) المواقع الخمسة عشر لأنواع السرطانات في العراق حسب عدد الوفيات (Ervik et al., 2024).

**Absolute numbers, Mortality, Both sexes, in 2022**  
Iraq  
(Top 15 cancer sites)



الشكل (2-2) المواقع الخمسة عشر لأنواع السرطان في العراق حسب عدد الوفيات  
(World Health Organization, 2024).

**Absolute numbers, Mortality, Both sexes, in 2022**  
Iraq + Jordan + Kuwait + Lebanon + United Arab Emirates + Egypt  
(Top 10 cancer sites)



Cancer TODAY | IARC - <https://gco.iarc.who.int/today>  
Data version : Globocan 2022 (version 1.1)  
© All Rights Reserved 2024

الشكل (3-2) اكثر عشرة سرطانات فتكا في عدد من الدول العربية (Ervik et al., 2024).

## 7.2: العوامل المسببة لسرطان الكبد Causative Factors of Liver Cancer

يعد سرطان الكبد أحد الأسباب الرئيسية للوفيات المرتبطة بالسرطان خصوصاً في الآونة الأخيرة فقد ارتفعت نسبة الإصابة به في جميع انحاء العالم، فقد وجد أن ما يقارب 90% من أمراض الكبد تتطور إلى سرطان الكبد والتي غالباً ما تكون مصحوبة بتلف الكبد الشديد، أما عوامل الخطورة والتي تكون متباينة وبشكل ملحوظ حسب المناطق الجغرافية ونمط الحياة والتي تؤدي إلى سرطان الكبد (Liu and Chen, 2022). من هذه العوامل:

### • التليف الكبدي Liver Fibrosis

و هو حالة مرضية تصبح فيها أنسجة الكبد مكونة من ندوب متعددة وبالتالي لا يمكن للكبد أداء وظائفه بشكل طبيعي وتؤدي إلى مضاعفات خطيرة مثل سرطان الكبد حيث تشكل هذه الحالة حوالي 70% من حالات سرطان الكبد (Lugari et al., 2023).

### • إتهاب الكبد الفيروسي بنوعيه C,B Hepatitis Viruses

و هو عدوى تصيب الكبد و ينتقل عن طريق الدم أو استعمال الابر الملوثة بالإضافة إلى الأطعمة الملوثة فقد وجد أنه المسبب الرئيسي لسرطان الكبد في آسيا وإفريقيا، يتغلب الفيروس على الجهاز المناعي للمضيف بواسطة انزيم النسخ العكسي DNA-polymerase ليتكاثر داخل الخلايا المناعية ثم يتفاعل مع DNA للمضيف بعملية معقدة ينشط من خلالها الجينات الدافعة لدورة الخلية ويثبط الجينات الكابحة للورم مثل بروتين p53 إذ أنه يثبط النسخ له بواسطة منطقة p53-promoter فيشكل معقد معه في السيتوبلازم لمنع وصوله إلى النواة (X. Zhang et al., 2021).

### • التدخين Smoking

يزيد التدخين بشكل كبير من حدوث سرطان الكبد بواسطة مساهمته في تطور أمراض الكبد فقد وجد أن نسبة الإصابة بالتهاب الكبد الفيروسي قد ارتفعت إلى 50% في الأشخاص المدخنين فضلاً عن دوره في الإصابة بمرض الكبد الدهني (Yoo et al., 2023).

### • الكحول Alcohol

لقد وجد أن حوالي 4 % من حالات السرطان حول العالم سببها استهلاك الكحول أي ما يعادل 740.000 حالة إذ أنه يتسبب بآثار ضارة على صحة الجهاز الهضمي (Rumgay et al., 2021). و يؤدي إلى زيادة خطر الإصابة بسرطان الفم والبلعوم و الحنجرة و المريء أيضاً التهاب البنكرياس

فضلاً عن سرطان الكبد بواسطة دوره في التسبب بتليف الكبد، فالأشخاص المصابين بتلف الكبد الناجم عن الكحول ترتفع لديهم نسبة الإصابة بسرطان الكبد (Yuan et al., 2023).

#### • الافلاتوكسين Aflatoxin

وهي عبارة عن مادة سمية تنتجها الفطريات التي تعيش على المحاصيل الزراعية مثل الذرة والفاصوليا السوداني و فول الصويا، تم تحديد Aflatoxin B1 كمادة مسرطنة من الدرجة الأولى لدى البشر، تسببت في العديد من الوفيات بسرطان الكبد، فقد وجد أن هذه المادة تسبب الطفرة في جين TP53 (Han, C, et al., 2020).

#### • مرض الكبد الدهني غير الكحولي Non-alcoholic fatty liver disease

هو شكل من اشكال مرض الكبد الدهني الذي يسبب تورم الكبد معدل انتشاره 25% وهو السبب الرئيسي لتلف الكبد (S. K. Han et al., 2023).

#### • العمر والجنس Age and Gender

العمر و الجنس تعد واحدة من العوامل التي لها علاقة في التسبب بسرطان الكبد إذ أن الشيخوخة تعد عامل خطر قوي خاصة الأشخاص الذين تزيد أعمارهم عن 70 سنة ولعدة أسباب منها تراكم عوامل الخطر بمرور الزمن و إنخفاض كفاءة الجهاز المناعي، علاوة على ذلك وجد أن سرطان الكبد يزداد في الذكور مقارنةً بالإناث بسبب الاختلاف في الهرمونات الجنسية (Oh and Jung, 2021).

• كما وجد أن هنالك مجموعة من الحالات الطبية الوراثية النادرة التي تزيد من خطورة الإصابة بسرطان الكبد مثل داء ترسب الأصبغة التي تؤدي إلى تراكم الكثير من الحديد في الجسم، كذلك مرض نقص مضاد التربسين فلا يستطيع فيها الجسم انتاج ما يكفي من بروتين antitrypsin-alpha 1 (Paul et al., 2022). فضلاً عن مرض ويلسون وهو اضطراب نادر يتراكم فيه النحاس في الكبد والدماغ والعينين والذي من مضاعفاته تشمع وفشل في الكبد ومشاكل في الجهاز الهضمي (Samant et al., 2021).

## 8.2: دور الجينات الطافرة في سرطان الكبد The Role of Mutated Genes in Liver Cancer

يوجد بداخل الخلية الوحدة الوظيفية الأساسية لها وهي النواة Nucleus و التي يوجد بداخلها الجينوم Genome المكون من 23 زوج من الكروموسومات، كل كروموسوم مكون من شريط طويل من الحمض النووي منقوص الأوكسجين DNA ملتف حول بروتينات تدعى الهستونات Histones التي تكون موجبة الشحنة، بداخل ال DNA توجد الجينات Genes التي تحتوي على المعلومات اللازمة لصنع البروتين و عن طريق الحمض النووي الريبوزي Ribonucleic acid (RNA) يتم تشفير المعلومات اللازمة لوظيفة معينه (Saxena and Zou, 2022). لذلك حدوث الطفرة في الجينات تؤدي إلى تعطيل أو إيقاف عمل البروتين مما يحول الخلية إلى خلية متضررة تدعى الخلية السرطانية Cancer cell لذلك فإن التشخيص الجزيئي للسرطانات أدى إلى تحسين نتائج العلاجات المصممة حيث أن كل نوع من السرطان يرتبط بجينات محددة والتي يكثر حصول الطفرة فيها لذلك يعتبر من الضروري معرفتها من أجل أستهدافها علاجياً (Wang, G, et al., 2020). بشكل عام يوجد نوعين من الجينات التي من الممكن أن تفقد وظيفتها والتي ارتبطت بسرطان الكبد:

### 1- الجينات الورمية Oncogene

الجينات الورمية هي المسؤولة عن النمو في الخلية تعمل الطفرات فيها على زيادة التعبير الجيني لها لتعزيز تقدم السرطان (Kontomanolis et al., 2020). يوجد العديد من الجينات الورمية التي ارتبط تعبيرها الجيني المرتفع بسرطان الكبد مثل ABL1 proto-oncogene الذي يشفر بروتين Tyrosine Protein Kinase، يقوم بتنظيم العديد من العمليات الخلوية مثل إنقسام الخلايا والتميز والإستجابة للإجهاد التأكسدي ومحاولة إصلاح الحمض النووي، ارتبط الإفراط في التعبير الجيني له بشكل إيجابي مع فترات بقاء أقصر لمرضى سرطان الكبد (Wang, F, et al., 2020).

كذلك عائلة Annexin A Protein Family (ANXA) التي تتفاعل مع مكونات غشاء الخلية لتشارك في التنظيم الهيكلي للخلية ويمكن أن تعمل كقنوات ناقلة للكالسيوم، وجد أن الأرتفاع في مستويات بروتينات ANXA، ANXA2، ANXA5 مرتبط مع تطور سرطان الكبد (Herrera-Lopez et al., 2023).

كذلك جين Focal Adhesion Kinase (FAK) الذي يشفر بروتين التيروسين كيناز Tyrosin kinase الذي يدعم بقاء الخلية السرطانية وتكاثرها بواسطة اليات معتمدة على الكينازات وايضاً باليات

مستقلة (Song et al., 2021). فضلاً عن بروتينات Fork Head Box (FOX) مثل FOXK1، FOXA3، FOXR2، وهي عوامل نسخ تلعب دوراً النمو و التمايز والشيخوخة والتي وجد أن الأرتفاع في مستوياتها أرتبط بالإصابة بسرطان الكبد حيث إنها تدعم النمو لخلايا سرطان الكبد وتكوين الأوعية الدموية له (Gong et al., 2020).

## 2- الجينات الكابحة للورم Tumor Suppressor Gens

هذه الفئة من الجينات تلعب دور الحارس للحمض النووي DNA اذا نها تستجيب لكل أنواع الضرر سواء كان من داخل الخلية أو من خارجها فتعمد إلى إيقاف الإنقسام وتنشط الموت المبرمج إذا كان الإصلاح غير ممكن، عندما تتحور فإنها تفقد وظيفتها مما يسمح للسرطان بالانتشار بدون قيود، مثل جين Phosphatase and Tensin Homolog (*PTEN*) وهو واحد من اكثر الجينات الكابحة للورم تحوراً في العديد من السرطانات حيث وجد نشاطه الشاذ في حوالي 50% من حالات سرطان الكبد، أن فقدانه لوظيفته يسمح لبروتين AKT ذو الدور الفعال في عمليات النمو والتكاثر و التمثيل الغذائي في الخلايا السرطانية (Bang et al., 2023). كما وجد أن التعبير الجيني المرتفع لجين Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2A (*CDKN2A*) يثبط سرطان الكبد وعند فقدان وظيفته يتنشط جين Mitogen-Activated Protein Kinase (*MAPK*) مما يدعم النمو الورمي (Moon and Ro, 2021). ويعمل جين *TP53* الذي يشفر بروتين P53 على تثبيط سرطان الكبد، إذ أن انخفاض تعبيره الجيني مرتبط بالعديد من السرطانات خصوصاً سرطان الكبد لما له من دور في تنظيم دورة الخلية والموت المبرمج بعد تلف الحمض النووي (Yang, C, et al., 2021).

## 9.2: جين *TP53*

جين *TP53* هو أحد الجينات الكابحة للورم Tumor suppressor gene، يتكون من أحد عشر إكسون وعشرة إنترون ويقع هذا الجين على الذراع القصيرة للكروموسوم السابع عشر في الإنسان Chromosome 17p 13.1، وقد تم اكتشافه لأول مره من قبل العالم ديفيد لين في عام 1979 (Shields et al., 2021). يُشفر جين *TP53* بروتين p53 والذي يعرف بـ "حارس الجينوم" أو "البروتين الكابح للورم" حيث يتكون من 393 حمض اميني ويكون العمر النصفى له قصير لا يتجاوز 20 دقيقة، أما الرقم 53 فهو يرمز إلى كتلته الجزيئية بالكيلو دالتون (Hernandez Borrero and El-Deiry, 2021).

تمثل الطفرات في P53 حوالي 55% من السرطانات التي تصيب الإنسان حيث أن وظيفته الأساسية حماية سلامة الحمض النووي فهو يعتبر المنظم الرئيسي لتحديد مصير الخلية فيعمل كفرامل تبطئ عملية الإنقسام بحثاً عن أي خطأ في عملية الإنقسام، مستغلاً تواجده في السيتوبلازم والنواة، حيث أن p53 يكون خاملاً في الحالة الطبيعية لكنه يتنشط عند تلقيه لإشارة بسبب تلف الحمض النووي أو الإجهاد التأكسدي (Abuetabh et al., 2022).

في الحقيقة من ضمن الأمور التي لازالت غامضة هو الآلية التي يتلقى فيها p53 الإشارة لكن يعتقد أن شظايا DNA المتكسرة هي التي تحفزها أو ربما مخزون الأوكسجين القليل إذ أنه داخل مستعمرة الورم الخبيث تكون نسبة الدم منخفضة لكن الخلايا السرطانية سرعان ما تتغلب على هذه المعضلة بأرسال إشارات لبناء أوعية دموية جديدة لدعم الورم، في بعض الأحيان يتمكن بروتين P53 من تدارك الموقف والقضاء على الخلية السرطانية قبل وصول الدم إليها من خلال إرسال إشارات بالموت المبرمج (Wang , Y, et al., 2022). البروتين الكابح الورم P53 يتكون من خمسة مجالات وظيفيه موضحة في الشكل (2-4) (Nishimura et al., 2022) وهي:

#### • (60-1) Transcriptional Activation Domains (TAD)

يقع هذا المجال في منطقة N-terminus ويقسم إلى منطقتين (40-1) TAD1 و TAD2 (60-41)، ويعد مهماً لتفاعل p53 مع الجينات المستهدفة (Bromley and Daggett, 2020).

#### • (102-61) Proline-rich Domains (PRR)

من المجالات التي تكثر فيها الطفرة ويعتبر مستهدف لإعادة تنشيط p53، حيث انه ومن خلال هذا المجال يتعرف p53 على تسلسل الحمض النووي المستهدف لينظم التعبير الجيني للجينات المستهدفة (Malhotra et al., 2023)

#### • (293-102) DNA Binding Domains (DBD)

اكثر المجالات التي تحدث فيها الطفرة فتفقد البروتين وظيفته وتمنع نشاطه النسخي، وهو من أكبر المجالات وترتبط فيه حوالي 90% من الطفرات الورمية المسرطنة (Loh, 2020).

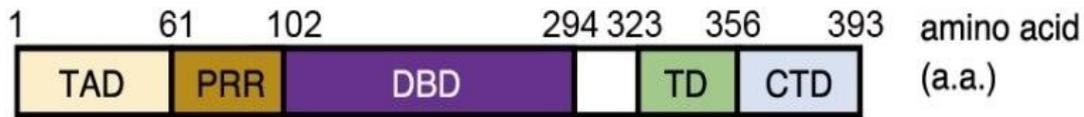
#### • (323-356) Tetramerization Domain (TD)

بواسطة هذه المنطقة يتم تنظيم كابح الورم P53 بواسطة المنظم الرئيسي له وهو جين (MDM2) Mouse double minute 2 هو الجين الدافع لدورة الخلية ويعرف أيضاً بـ

E3 Ubiquitin-Protein Ligase والذي يشفر بروتين Mdm2، والذي يرتبط ببروتين الورم في منطقة Tetramerization وهي المسؤولة عن نشاطه النسخي فيعمل على الارتباط به ومنع نشاطه، فلا يسترجع وظيفته إلا عندما يتخلص من المعقد الذي يكونه معه (Manfredi, 2021).

• C-terminal Domain (CTD) (356-393)

أن هذا المجال يلعب في تنظيم نشاط بروتين P53 إذ أن الطفرة فيه تسمى طفرة اكتساب الوظيفة لأنها تجنده كعامل نسخ لصالح الورم (Mao and Jiang, 2023).



الشكل (2-4) المجالات الوظيفية لبروتين الورم P53 (Nishimura et al., 2022)

إن تحديد تسلسل الجينوم البشري فتح آفاق علاجية واعدة فأصبح بالإمكان رسم خارطة جينية للخلية السرطانية ومقارنتها بالخلية الطبيعية لتحديد الجين صاحب الخلل ليتم أستهدافه علاجياً، إذ أن أستهداف الطفرة لعلاج الأورام يؤدي إلى تطوير المقاييس السريرية فأستهداف الحمض النووي أو أنسجة الورم التي تحتوي تغيرات نادرة يسمح بزيادة المعرفة بالموشرات الاستقصائية ويقلل التكلفة مقارنة بالأختبار المبني على المرضى الذين تكون لديهم أستجابة جينية تعزز الإستجابة العلاجية (Suehnholtz et al., 2024).

أن دور بروتين P53 في تنظيم عمل الخلية يكون بواسطة تمرزه في النواة والسيتوبلازم إذ يسيطر بروتين الورم على توازن إنقسام الخلايا وسلامة الجينوم فيبطئ عملية الإنقسام ليتمكن من تدارك الخلل في الحمض النووي بواسطة تواجده في نقاط نقاط السيطرة Check point للخلية (Shi et al., 2021).

أن الضرر الذي تتعرض له الخلية يكون على نوعين أما من خارج الخلية مثل التعرض للأشعة فوق البنفسجية أو السموم أو المواد الكيميائية، أو من داخل الخلية مثل الإجهاد التأكسدي أو أخطاء أثناء تضاعف DNA (Bakker et al., 2024). مما يؤدي إلى تكسر أجزاء من الحمض النووي والتي تؤدي إلى تحفيز بروتينات الكيناز Kinase proteins مما ينشط بروتين الورم وزيادة مستوياته والذي يستجيب بدوره للضرر فيوقف دورة الخلية في طور (G1) phase (Gap 1) الذي تنمو فيه الخلية ويمنع إنتقالها إلى مرحلة

Synthesis Phase (S phase) التي يتضاعف فيها DNA إذ ينشط بروتين P21 Cyclin-dependent kinase inhibitor الذي يرتبط بـ الكينازات الدافعة لدورة الخلية Cyclin-dependent kinases ويثبطها (Gomzikova et al., 2021).

أما إذا لم يتم إصلاح الضرر يقوم P53 بأمر الخلايا بقتل نفسها بعملية يطلق عليها "الموت المبرمج" ليمنع نسخ الحمض النووي المتضرر، ومن خلال المسار الداخلي للميتوكوندريا (عضويات موجودة في السيتوبلازم لها دور مركزي في إنتاج الطاقه)، هذه العملية تشتمل على مجموعة تغيرات بيولوجية في الخلية بقيادة جينات الموت مثل الكاسباز Caspase لتنتهي وجود الخلية فسيولوجياً (Harakeh et al., 2023).

## 10.2: دور الكيتوسان النانوي في توصيل الدواء Role of Nano-chitosan in Drug Delivery

يعد سرطان الكبد من الأسباب الرئيسية للوفاة حول العالم فقد شكل تحدياً عالمياً بسبب عدم فعالية العلاجات في المراحل المتوسطة والنهائية للإصابة وهي المشكلة التي من المتوقع أن تعالجها التقنيات النانوية لتوصيل الأدوية (Wang, L, et al., 2024).

إن المواد النانوية هي عبارة عن جسيمات متناهية في الصغر تتراوح أبعادها بين 1 إلى 100 نانو متر حيث أنها دخلت في العديد من المجالات من ضمنها الطب، ففي الأونة الأخيرة توجهت الأبحاث نحو استخدامها في التوصيل المستهدف للدواء إذ أنها تعمل على تحسين الخصائص العلاجية للأدوية وتتمثل قوتها في قدرتها على تغيير الحركيات الدوائية Pharmacokinetic و التوزيع الحيوي للدواء داخل الجسم (Jimenez-Gomez and Cecilia, 2020). حيث توجهت العديد من العلاجات نحو تحفيز الموت المبرمج في الخلايا السرطانية كألية علاجية واعدة مثلاً استخدام الجسيمات النانوية والتي تعبر الغشاء البلازمي للخلية السرطانية وتؤدي إلى الإجهاد التأكسدي وتلف الحمض النووي (Jezek et al., 2021).

يوجد العديد من المواد الطبيعية و التي يمكن استعمالها لصناعة المواد النانوية من ضمنها الجسيمات الشحمية و جزيئات الذهب و الكيتوسان، يعتبر الكيتوسان من البوليمرات الطبيعية حيث يتم الحصول عليه من الكيتين الموجود في هياكل الفطريات البحرية و الرخويات فضلاً عن وجوده في الفطريات و بشرة الحشرات، الأمر الذي يجعله متوافق حيويًا Biocompatible، ايضاً له العديد من المميزات مثل إمكانية تحويره كيميائياً، و تحلله البيولوجي Biodegradable و توافره الحيوي Bioavailability، مما جعله مفضلاً في مجالات الطب و الصيدلة وفي توصيل الأدوية إذ أن أكثر (Bonferoni et al., 2020).

الأدوية لا تحقق نتائج فعالة لعدم قدرتها على الوصول إلى الموقع المستهدف وانتشارها في الأماكن السليمة مما يؤدي إلى آثار سيئة حيث أن من العقبات التي يجب على الدواء تخطيها هو الرقم الهيدروجيني والذي يكون في الفم محايداً نوعاً ما بحدود 6 إلى 7 بعدها يمر بالمعدة والمعروفة بارتفاع الحموضة فيها لتكون PH من 1 إلى 3 (Chen et al., 2023). أن هذا الرقم الهيدروجيني يؤثر على استقرار الدواء، بعدها وتحديداً في منطقة الأمعاء وهي المكان الأساسي لامتناس الدواء تزداد القلوية، إذ يمكن التحكم في ذوبانية الكيتوسان بواسطة نزع الاستيل والوزن الجزيئي فكلما انخفضت زادت الفعالية، مما صنع منه خياراً جيداً لتوصيل الأدوية خصوصاً الأدوية التي تستهدف السرطان، فقد وجد أنه بعد ذاته نشط Caspase-3 مما نشط الموت المبرمج (Sangnim et al., 2023).

بالإضافة إلى دور الكيتوسان في القضاء على الورم الكبدي بواسطة تحفيز P53، فالكالكتوز من الروابط الانتقائية المستهدفة للكيتوسان والمرتبطة بسرطان الكبد ترتبط مع مستقبلات الخلية الكبدية ASGPRs مما جعله مضاد فعال لسرطان الكبد (Y. Yang et al., 2023).

من الخصائص الأخرى للكيتوسان هي قدرته على تحسين تراكم الدواء في موقع الورم واختراق الخلايا السرطانية بسبب صغر حجمه فقد وجد أنه يحسن فعالية الأدوية في علاج سرطان الكبد من خلال تعزيز الأستهداف الأنتقائي حيث قلل من سمية العقاقير المحملة عليه فضلاً عن رفع المؤشر العلاجي المتناسب عكسياً مع كمية الدواء (Anwanwan et al., 2020).

## 11.2: المضادات الحيوية بيتا لاكتام Beta-lactam Antibiotic

المضادات الحيوية هي مركبات قد تكون طبيعية أو صناعية أو شبه صناعية ربما تكون عائلة الأدوية الأكثر فعالية في علاج الالتهابات الميكروبية لكنها غير فعالة في حالة الإصابة بالالتهابات الفيروسية مثل نزلات البرد والأنفلونزا، أما آثارها الجانبية هي فرط الحساسية بالإضافة إلى الآثار الضارة التي تسببها للجهاز الهضمي والكبد والكلية (Iuliano, Sarah et al., 2022).

يوجد العديد من الفئات للمضادات الحيوية فيما يخص الأدوية المستخدمة في هذه الدراسة وهي (الأمبيسلين  $C_{16}H_{19}N_3O_4S$ ) و (السيفالكسين  $C_{16}H_{17}N_3O_4S$ ) فإنها تعود إلى فئة بيتا لاكتام Beta-lactam التي تمتلك حلقة بيتا لاكتام (ثلاث ذرات كربون وذرة نيتروجين مع الاختلاف في السلسلة الجانبية بين أعضاء المجموعة)، تعتبر هذه المجموعة واحدة من أكثر المضادات الحيوية استخداماً نظراً لفعاليتها العالية نسبياً وتكلفتها المنخفضة وآثارها الجانبية البسيطة (Fawaz et al., 2021).

أن آلية عمل المضادات الحيوية فئة Beta-lactam يكون عن طريق تثبيط التخليق الحيوي لجدار الخلية من خلال ارتباطها بمستقبلات أولية موجودة في جدار الخلية تسمى Membrane bound penicillin binding Proteins و تعمل على منع الأرتباط المتقاطع لوحداث pentaglycine في جدار الخلية عن طريق تثبيط تفاعل تكوين رابطة الببتيد مما يؤدي إلى التحلل السريع للجدار (Pancu, D. et al., 2021).

أن دور المضادات الحيوية مع السرطان مثير للجدل بالرغم مما أفادت به دراسات بأن استخدامه المفرط أدى إلى التسرطن في نفس الوقت اثبتت دراسات أخرى تأثيرها المضاد للسرطان، لذلك من الأفضل دمجها مع مواد أخرى مثل المواد النانوية مثل الكيتوسان النانوي لتحسين خصائصها الدوائية، فقد وجد أن لها تأثيرات سمية قوية في خطوط خلايا سرطانية من ضمنها الخلايا السرطانية الكبدية حيث أنها سببت ضرراً لحمضها النووي مما نشط بروتين p53 والذي حفز أنزيمات الكاسباز Caspase لتفعيل الموت المبرمج والقضاء على السرطان (Mar Moreno-Gonzalez and Naiara Beraza 2021).

ايضاً وجد أن لهذه الفئة من الأدوية تأثير مضاد لسرطان الكبد بواسطة فعاليتها في علاج تليف الكبد من خلال الدور الذي تمارسه في تحويل حمض الصفراء الأولي إلى الثانوي، إذ أن حمض الصفراء الأولي يعمل على تنشيط الكيموكين CXCL16 الذي يلعب دور مهم في تطور السرطان أما حمض الصفراء الثانوي يحفز على الموت المبرمج للخلايا السرطانية الكبدية عن طريق تنشيط الخلايا القاتلة التائية Natural Killer Tcell والمعروفة بفعاليتها المضادة للأورام، مع ذلك فإن إعادة استخدام المضادات الحيوية Beta-Lactam شكل هدفاً جذاباً واهتماماً متزايداً بين العلماء (Chen, L., et al., 2023).

### 1.11.2: الأمبيسيلين Ampicillin

هو دواء ينتمي إلى فئة البنسلين Penicillin من الأدوية، الصيغ الجزيئية الكيميائية له  $(C_{16}H_{19}N_3O_4S)$  (Murei et al., 2020). يستخدم لعلاج الالتهابات البكتيرية مثل التهاب التهابات المسالك البولية والجهاز التنفسي والشغاف وداء السالمونيلا والتهاب السحايا، من آثاره الجانبية الطفح الجلدي والغثيان والاسهال، و يكون ضعيف الذوبانية في الدهون ولا يخترق غشاء الخلية بسهولة ولا يمكنه الوصول إلى التركيزات العلاجية في موقع الإصابة، المضادات الحيوية مثل الامبيسيلين أصبحت محط أنظار العلماء عن طريق التوليف المشترك مع الاجسام النانوية الأمر الذي يؤدي إلى زيادة فعاليتها لكن لا يتم ادخال هذه المضادات الحيوية مباشرة إلى الجسم بشكلها النشط بل يتم التعديل عليها بواسطة المجموعة الامينية والكاربوكسيلية وبذلك يتم تحسين خصائصها لأنها أفضل من المضادات الحيوية النشطة بسبب قلة امتصاصها

وتوزيعها والتمثيل الغذائي لها وايضاً السمية الجهازية العالية، إذ أن التعديل عليه بواسطة ربطه مع بوليمر الكيتوسان أدى إلى اطلاق مستهدف مع تعزيز الخصائص العلاجية والحد من الآثار الجانبية (Gawronska et al., 2022).

### 2.11.2: سيفالكسيسين Cephalexin

مضاد حيوي شبه صناعي ينتمي إلى عائلة السيفالوسبورين Cephalosporines الصيغة الجزيئية الكيميائية له (C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S) (Kurt et al., 2023). مشتق من الفطر سيفالوسبوريوم cephalosporin acremonium، يستخدم لعلاج أمراض مختلفة مثل التهابات الجهاز التنفسي العلوي والسفلي والسيلان والتهابات المسالك البولية (الحادة والمزمنة) والحمى القرمزية والتهابات المكورات العنقودية و يعطى قبل العمليات الجراحية وبعدها لتقليل خطر العدوى في موقع الجراحة أما آلية عمله تكون بواسطة اعاقه الخطوة الأخيرة من تخليق الببتيدوغليكان وهو المكون الأساسي لجدار الخلية مما يؤدي إلى موت الخلية، يمتلك السيفالكسيسين نفاذية معوية عالية و قابلية للذوبان مع توافر حيوي بنسبة 90% أما أعراضه الجانبية تشمل الالام في البطن والتهاب المعدة وعسر هضم واسهال وتقيؤ (Kanan et al., 2023).

### 12.2: مضادات الإلتهاب غير الستيرويدية Nonsteroidal Anti-inflammatory

#### Drugs

أن مضادات الألتهاب غير الستيرويدية (NSAID) Nonsteroidal Anti-inflammatory هي إحدى أنواع مسكنات الألام الشائع استخدامها لخفض الحرارة وتقليل الالتهابات، كما يعد حمض الميفانميك أحد أنواعها حيث أنها تعمل على تثبيط بعض الأنزيمات التي تزيد من هذه الأعراض مثل البروستوكلاندين Prostaglandin بواسطة معاكسة عمل أنزيمات الأكسدة الحلقية Cyclooxygenase مثل COX1 و COX2 التي تتوسط تكوينها ايضاً بواسطة مسار WNT/B-catenin المسؤول عن نمو الخلية وتطورها وايضاً جين AKT Serine Threonine Kinase 1 الذي له ارتباط بموت الخلية وبقائها وتولد الأوعية، ايضاً تعمل على قمع السرطان بواسطة تنشيط أنواع الأوكسجين التفاعلية ROS مما يؤثر على سلامة الميتوكوندريا وتأثيرها على بروتين Bcl-2 المضاد للموت المبرمج (Thiruchenthooran et al., 2023). يمكن تحميل مضادات الإلتهاب غير الستيرويدية على الكيتوسان النانوي لتحسين فعالية الدواء و تقليل الآثار الجانبية له (Thottathil et al., 2023).

### 1.12.2: حمض الميفانميك Mefenamic acid

حمض الميفانميك الصيغة الكيميائية الجزيئية له ( $C_{15}H_{15}NO_2$ )، هو دواء ينتمي إلى مضادات الإلتهاب غير الستيرويدية يستخدم لعلاج الألم فهو يعمل عن طريق إيقاف عمل المواد المسؤولة عن الألم وارتفاع حرارة الجسم والإلتهاب ايضاً يعمل على تقليل التورم والآم العظام فقد وجد أن هذا الدواء يعزز تثبيط خلايا سرطانات مختلفة مثل سرطان الكبد عن طريق تحفيز الموت المبرمج بواسطة بروتين الورم P53 (Liu and Long, 2023).

### 13.2: البراسيتامول Paracetamol

البراسيتامول أو كما يعرف بالاسيتامينوفين، الصيغة الكيميائية الجزيئية للبراسيتامول ( $C_8H_9NO_2$ )، هو مسكن غير افيني يُستخدم بشكل شائع لعلاج الألم وخفض الحرارة، من أضراره الجانبية أنه يسبب تقرحات هضمية، أن البراسيتامول يشبه مضادات الإلتهاب غير الستيرويدية NSAIDs إلى حد ما إذ أنه يثبط تخليق البروستاكلاندين Prostaglandin (Skwarczynska-Wojza and Puskarewicz, 2024).

أن هذا الدواء سلاح ذو حدين حيث أنه وعلى الرغم من أن جرعاته الزائدة من أكثر المؤثرات شيوعاً لفشل الكبد الحاد لكن في نفس الوقت هو علاج فعال للحماية من استئصال الكبد فالجرعة الزائدة منه تؤدي إلى تلف الكبد بسبب السمية إذ تقسم اليات عمله على 3 مراحل (Esh et al., 2021). في البداية استقلابه يؤدي إلى خلل وظيفي في الميتوكوندريا الذي يؤدي إلى تلف الحمض النووي وموت الخلايا الكبدية، يلي ذلك اطلاق أنزيمات محللة والاستمرار في موت الخلايا أما المرحلة الأخيرة هي مرحلة التعافي إذ تتجدد خلايا الكبد ويبدأ التكاثر وتستبدل الخلايا الميتة عن طريق تنشيط Cytochrome P450 (أحد أنزيمات الكبد يشارك في عمليات التصنيع للعديد من الجزيئات والمركبات داخل الخلية) وغيره من اليات التجديد (Esh et al., 2021).

ايضاً بعد شدة الضرر بسبب الجرعة الزائدة من البراسيتامول يزداد تنشيط بروتين P53 مما يزيد التعبير في P21 والذي يوقف إنقسام الخلايا السرطانية، في النهاية يمكن أن يكون من العلاجات الواعدة ضد استئصال الكبد، حيث أن ما يسبب الضرر هي الجرعات المفرطة و الاستخدام المنتظم (Tian et al., 2024). حيث أنه من المحتمل أن الجرعة الزائدة منه تؤدي إلى إنتاج المستقلب السام N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) الذي يستنزف الكلوتاثيون المضاد للأكسدة ويزيد من الإجهاد التأكسدي عبر توليد أنواع الأوكسجين التفاعلية ROS أو من الممكن أنه يساهم في إنقسام بروتين

سبكترين Spectrin (أحد مكونات الخلية الأساسية الذي هو عبارة عن خيوط اكتين قصيرة) فيعمل البراسيتيمول بواسطة الكاسباز Caspase على إنقسامه، بسبب الاضرار المذكورة سابقا يتفعل مسار الموت المبرمج لكن في الوقت نفسه اشارت الدراسات أن استخدام البراسيتيمول بجرعات علاجية يمكن أن تظهر تأثيرات مضادة لسرطان الكبد (Indumathi et al., 2023).

# الفصل الثالث

## المواد وطرائق العمل

### Chapter Three

### Materials and

### Methods

**3 - المواد وطرائق العمل Materials and Methods****1.3: المواد Materials****1.1.3: المواد البيولوجية و الكيميائية المستخدمة Biological and Chemicals****Materials**

جدول (1-3) المواد المستخدمة في الدراسة

الشركة المجهزة والمنشأ	أسم المادة المستخدمة	
Applied Biosystems (USA)	SYBR Green master (Cat. No. 4385612 UK)	عدة أختبار qRT-PCR
Sigma-Aldrich (USA)	ethidium bromide stain	صبغة بروميد الايثيديوم
Sigma-Aldrich (USA)	Acridine Orange stain	صبغة اكردين البرتقالي
Santacruz Biotechnology (USA)	Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	ثنائي مثيل السلفوكسيد
Invitrogen (USA)	Methyl thiazolyl tetrazolium	صبغة مثيل ثيازوليل تترازوليوم
Pfizer (USA)	Penicillin	البنسلين
GENEX (USA)	Trypsin	التربسين
Qiagen (USA)	Rneasy Mini Kit (Cat. No. 74104)	عدة استخلاص RNA
Invitrogen (USA)	(DNase) Deoxyribonuclease	انزيم الديوكسي ريبونوكلياز
Applied Bio systems (USA)	7900 HT fast system	عدة التسريع الخاصة بأختبار qRT-PCR

Qiagen (USA)	Primers	البيادئات
Invitrogen (USA)	Synthetic DNA Kit Cat. No. 18064-071	عدة استخلاص cDNA
Invitrogen (USA)	Superscript II reverse transcriptase	انزيم النسخ العكسي
SDI Company (Samarra)	Ampicillin	الامبسيلين
SDI Company (Samarra)	Cephalexin	السيفالكسين
SDI Company (Samarra)	Paracetamol	البراسيتامول
SDI Company (Samarra)	Mefenamic acid	حمض الميفانميك
herb Bio-TechInc (Shaanxi Sang)	Nano Chitosan	الكيتوسان النانوي
Capricorn (Germany)	Fetal bovine serum	مصل البقر الجنيني
Capricorn (Germany)	Roswell Park Memorial -1640	الوسط الزراعي RPM-1640
BDH industries Ltd (Germany)	Phosphate buffered saline	محلول دارى الفوسفات الملحي
TROGE (Germany)	Streptomycin	ستربتومايسين
BDH industries Ltd (England)	Sodium Hydroxide	هيدروكسيد الصوديوم
BDH industries Ltd (England)	Ethanol	ايتانول
BDH industries Ltd (England)	Ethar	الايثر

BDH industries Ltd (England)	Hydrochloric acid (HCL)	حمض الهيدروكلوريك
BDH industries Ltd (England)	Acetic acid	حمض الأسيتيك
Fluka (Switzerland)	Crystel violet	صبغة Crystal Violet
LONZA (Switzerland)	Serum Free Media (SFM)	الوسط الخالي من المصل
Thomas Baker (India)	Tetrahydrofuran	رباعي هيدرو الفوران
Iraqi Center for Cancer and Medical Genetic Research· Al-Mustansiriya University ،Baghdad، Iraq	HePG2	خط خلايا سرطان الكبد البشري

### 2.1.3: الأجهزة و المستلزمات المختبرية المستخدمة في الدراسة

#### Laboratory Equipment and Supplies Used in the Study

جدول (2-3) الأجهزة المختبرية والأدوات المستخدمة في الدراسة مع الشركة المصنعة والمنشأ

الشركة المصنعة والمنشأ	اسم الجهاز أو المستلزم	
Santacruz Biotechnology (USA)	Microplate plates 96 and 24 walls	أطباق الزراع النسيجية
GENEX (USA)	Eppendorf tubes	انابيب ابيندروف
Falcon (USA)	Plastic bottles for tissue culture 25 cm <sup>2</sup>	قناني بلاستيكية للزراعة النسيجية حجم 25 cm <sup>2</sup>
BD falcon (USA)	Microtiter reader	قارئ الصفائح الدقيقة

Sail Brand (China)	Glass slides	شرائح زجاجية
LABOAO (China)	Volumetric Flasks of different sizes	دوارق حجمية مختلفة الأحجام
LABOAO (China)	Condenser	المكثف
LABOAO (China)	Graduated Cylinder	أسطوانة مدرجة
LABOAO (China)	Funnel	قمع
LABOAO (China)	Rubber Stoppers	سدادات مطاطية
LABOAO (China)	Stirring Rod	قضيب التحريك الزجاجي
Cypress (China)	cell scraper	كاشط
ROHS (China)	Electric sensitive Balance	ميزان الكتروني حساس
Cypress Diagnostics (Belgium)	CO2 incubator	حاضنة مجهزة بثنائي أكسيد الكربون CO <sub>2</sub>
Cypress Diagnostics (Belgium)	Micropipette of different sizes	ماصات مختلفة الأحجام
K & K Scientific Supplier (Korea)	Laminar flow hood	الكابينة المعقمة
Jeio Tech (Korea)	Filter paper	ورق ترشيح
Heraens (Germany)	Centrifuge	جهاز الطرد المركزي
Millipore (USA)	Filters of different diameters	مرشحات مختلفة الأقطار
Shimadzu (Japan)	Fourier transform infrared	مطياف الأشعة تحت الحمراء
Olympus (Japan)	Inverted microscope	المجهر المقلوب

Afco – dispo (Japan)	Stand	حامل
Sony (Japan)	Digital Camera	كاميرا رقمية
Afco-dispo (Japan)	Test Tube	انبوبة اختبار
Jiassco (India)	Flasks	دورق
Bio Basic (Canada)	Vortex	مازج
Bio Basic (Canada)	Water bath	حمام مائي
Gallen Kamp (U.K)	Oven	فرن

### 2.3: طرائق العمل Methods

#### 1.2.3: المحاليل المستخدمة Solutions

(Yaseen ,et al, 1998 ; Yaseen ,et al, 1990)

#### 1.1.2.3: محلول دارئ الفوسفات ( PBS ) Phosphate Buffer Saline

حُضِر بإذابة 8 غم من كلوريد الصوديوم و 0.2 غم كلوريد البوتاسيوم و 1.15 غم فوسفات الصوديوم في 800 مل ماء مقطر، عدل الاس الهيدروجيني إلى 7.4

#### 2.1.2.3: الوسط الزراعي Rosswell Park Memorial Institute 1640

حُضِر الوسط الزراعي بحسب تعليمات الشركة المصنعة، اذبيت المكونات التالية :

- 10.4 غم RAMI-1640
- 0.5 مل Penicillin
- 0.5 مل Streptomycin
- 100 مل من مصّل البقر الجنيني FBS

اكمل الحجم بعد ذلك إلى لتر واحد بإضافة الماء المقطر، غُدل الاس الهيدروجيني لـ 7.2 بإضافة بيكربونات الصوديوم، حفظ بدرجة حرارة ( 37 م °).

### 3.1.2.3: محلول صبغتي بروميد الإيثيديوم والأكردين البرتقالية

#### Ethidium Bromide/Acridine Orange

لتحضير محلول صبغة بروميد الايثيديوم Stock أُذيبَ 3 ملغم من مسحوق الصبغة في 1 مل من دارئ الفوسفات.

حُضِرَ محلول صبغة الاكردين البرتقالية Stock بإذابة 5 ملغم من مسحوق الصبغة في 1 مل من دارئ الفوسفات الملحي.

جهزت الصبغة المزوجة بإضافة 1 مايكرو لتر من كل الصبغتين إلى 1 مل من محلول دارئ الفوسفات الملحي.

### 4.1.2.3: صبغة MTT

حُضِرَت بإذابة 50 ملغم من مسحوق الصبغة في 100 مل من محلول دارئ الفوسفات الملحي.

### 5.1.2.3: محلول Ethylene Diamine Tetra Acid (EDTA)

حُضِرَ بإذابة غرام واحد من EDTA في 100 مل من الماء المقطر ومزج جيداً وعقم في المؤصدة ليحفظ بعد ذلك في درجة حرارة ( 4 م °).

### 6.1.2.3: التربسين Trypsin

أُذيبَ 1 غرام من مسحوق التربسين في 100 مل من الماء المقطر ثم رُشِحَ وحفظ عند درجة حرارة ( 20 - م °).

### 7.1.2.3: مصل البقر الجنيني Fetal bovine Serum

أن المصل جاهز الاستعمال، وتم حفظه بظروف معقمة وتحت حرارة ( 20 - م °) لحين الاستخدام.

### 2.2.3: حفظ الخلايا Cell Maintenance

وضع وعاء خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 في حمام مائي عند درجة حرارة (37 م<sup>0</sup>) ثم رفعت قبل ذوبانها تماماً وعقمت بالإيثانول ذو التركيز 70% بعد ذلك غسلت خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 بواسطة 1 مل من محلول دارئ الفوسفات الملحي، ثم بعد ذلك فصلت خلايا سرطان الكبد HepG2 الملتصقة بحواف الطبق الزرعى باستعمال محلول EDTA-Trypsin (0.25%) لمدة 2 دقيقة وحرارة (37 م<sup>0</sup>) ثم اضيف RPMI-1640 (100 units/mL penicillin، 10% Fetal Bovine Serum، 100 µg/mL streptomycin). وبعد الطرد المركزي ازيل الراشح وبقيت الخلايا في قعر الانبوب بعد ذلك حُفظت خلايا سرطان الكبد HepG2 في الوسط الزرعى RPMI-1640. (Rani et al., 2022).

بعد ذلك وضع الغطاء الخاص بالوعاء الزرعى مع تثبيت لاصق شفاف عليه وحرك ببطء لتوزيع الخلايا بالتساوي داخل الحفر ثم وضع في حاضنه مجهزه 5% CO<sub>2</sub> و في درجة حرارة (37 م<sup>0</sup>).

بعد مضي 24 ساعة اعيد الزرع في مزارع ثانوية للتأكد من وجود نمو في المزرعة وحتى التمريرة التاسعة والعشرين، فحصت خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 بواسطة المجهر المقلوب Inverted Microscope للتأكد من حيوية الخلايا، تم التخلص من الوسط الزرعى بسكبه في وعاء زجاجي داخل كابينة الزرع المعقمة وغسلت الخلايا السرطانية بالمحلول الملحي PBS مرتين ولمدة 10 دقائق مع التخلص من المحلول الملحي بعد كل غسلة.

أما من أجل الحصول على خلايا أحادية الطبقة أضيفت كمية من انزيم التربسين وحضنت الخلايا لمدة (30-60) ثانية وعند حرارة (37 م<sup>0</sup>)، بعد ذلك تمت اضافة مصل البقر الجنيني، ثم أجريت عملية الطرد المركزي (2000 دورة / دقيقة) لمدة (10 دقيقة) لترسيب الخلايا السرطانية والتخلص من الوسط الزرعى وانزيم التربسين، بعد التخلص من الراشح تم إضافة وسط زرعى مدعم بـ 10% من مصل البقر الجنيني FBS إلى المعلق (Al-Ziaydi et al., 2020).

### 3.2.3: تحضير الكيتوسان النانوي Preparation of Nano-chitosan

أُذيبَ (5.0 g, 0.0005 mole) من بودرة الكيتوسان في محلول مائي يحتوي على حمض الالاسيتك acetic acid مع التسخين لدرجة حرارة (45 م<sup>0</sup>) حتى يذوب تدريجياً ويصبح المحلول شفافاً باستعمال Ultrasonic instrument ثم ترك ليُجف في درجة حرارة الغرفة وبعدها رُشح بواسطة ورق الترشيح (Wang, K, et al., 2021).

### 4.2.3: تحضير الأدوية مع الكيتوسان النانوي Preparation of Medicines with Nano-chitosan

أُذيبَ 0.03 mole من (امبسلين، اسيتامينوفين، حمض الميفانميك، سيفالكسين) في 30 ml رباعي هيدروفوران Tetrahydrofuran مع ثلاث قطرات من حامض الهيدروكلوريك المركز ثم اضيف إلى الكيتوسان النانوي (4.77 g, 0.03 mol) اعقب ذلك اجراء عملية التصعيد Reflection لمدة 24 ساعة للحصول على الراسب، بعد ذلك غسل الناتج بمحلول مكون ثنائي اثيل إيثر و هيدروكسيد الصوديوم وترك ليُجف لمدة 16 ساعة (Junyaprasert, et al., 2023).

### 5.2.3: اختبار طيف الأشعة تحت الحمراء Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)

يستخدم هذا الأختبار للكشف عن المجاميع الوظيفية لتحديد فعالية ارتباط الكيتوسان بـ (امبسلين، اسيتامينوفين، حمض الميفانميك، سيفالكسين)، حيث تم تشكيلهم على شكل أقراص مع بروميد البوتاسيوم KBr ثم ضبط FTIR عند المدى (400-4000 cm<sup>-1</sup>) (Manimaran et al., 2022).

### 6.2.3: اختبار السمية الخلوية بواسطة فحص MTT

#### Cytotoxicity test by MTT Assay

من أجل عمل اختبار السمية الخلوية زُرعت خلايا سرطان الكبد HepG2 في طبق يحتوي على 96 حفرة بكثافة (cells/well 1 x 10<sup>4</sup>) (Al-Salman et al., 2020).

تم الحصول على طبقة احادية من الخلايا بعد مرور 24 ساعة من الحضانة ثم تمت معاملة الخلايا السرطانية بالعقاقير المحملة على الكيتوسان النانوي (امبسلين، اسيتامينوفين، حمض الميفانميك، سيفالكسين) وبتراكيز نصفية متزايدة (12.5، 25، 50، 100، 200، 400 مل/غم) وبعد 4 ساعات ازيل الوسط الزراعي بأستخدام محلول دارى الفوسفات Phosphate-buffered Saline واضيف 2 مايكرو لتر من صبغة MTT solution ولكل حفرة مع تحريك الـ Microplate برفق لتوضع بعد ذلك في حاضنة مجهزة بثنائي أكسيد الكربون CO<sub>2</sub> لمدة ساعتان ونصف وبدرجة حرارة (37 م°)، غُسلت خلايا سرطان الكبد HepG2 بمحلول دارى الفوسفات الملحي للتخلص من محلول صبغة MTT وأضيف 130 مايكرو لتر من ثنائي مثيل سلفوكسيد DMSO لأذابه بلورات الصبغة العالقة في الحفر ثم حضنت لمدة 15 دقيقة تحت درجة حرارة الغرفة مع الرج المستمر (*Berridge et al., 2005*). وضعت الـ Microplate بعد ذلك في قارئ الصفائح الدقيقة microplate reader الذي ضُبط عند الطول الموجي (492 نانومتر) لقياس تآلق مادة التترازوليوم الارجوانية للكشف عن حيوية الخلايا في التراكيز المختلفة، ثم تم تحديد جرعة النصف Half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) وذلك حسب ما سبق ذكره من قبل Khashan وآخرون (2020) وكما في المعادلة:

$$\text{Cell viability} = \text{امتصاص العينة} / \text{امتصاص السيطرة} \times 100$$

### 7.2.3: الكشف عن التغيرات الشكلية في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2

تم الكشف عن التغيرات الشكلية للخلايا سرطان الكبد البشري HePG2 بأستخدام صبغة البنفسجي البلوري Crystal Violet، إذ قسمت الخلايا إلى مجموعتين أحدهما لم تعرض للأدوية وعوملت كمجموعة سيطرة أما المجموعة الأخرى عرضت للكيتوسان المحمل بالأدوية (امبسلين، اسيتامينوفين، حمض الميفانميك، سيفالكسين).

زرعت الخلايا في Microplate مكونة من (24) حفرة بكثافة ( $1 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup>) لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة (37 م°)، لتعامل بعد ذلك بالعقاقير المحملة على الكيتوسان النانوي وبتراكيز IC<sub>50</sub> ثم حضنت لمدة 24 ساعة (*Ibrahim et al., 2021*). ثم غُسلت بالمحلول المنظم واضيف

اليها 50 ميكرو لتر من Crystal Violet (0.5 غم من بودرة Crystal Violet في 80 مل ماء مقطر و 20 مل ميثانول) ثم حضت في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة و غسلت بماء الصنبور إلى أن تم التخلص من الصبغة تماماً لتفحص بعد ذلك بالمجهر المقلوب عند قوة تكبير 100x، *et al.*, (Kasper., et al., 2016 ; Abbas ., 2021).

### 8.2.3: تفاعل البوليمراز المتسلسل الكمي العكسي

#### Quantitative Reverse Transcription Real-Time PCR (qRT-PCR)

تم اجراء اختبار البلمرة المتسلسل الكمي العكسي للكشف عن التعبير الجيني لجين *TP53* حيث زرعت طبقة أحادية من خلايا سرطان الكبد HePG2 في صفيحتان بستة حفر ( $1 \times 10^6$  cells/well) ووضعت في الحاضنة لمدة 24 ساعة وعند درجة حرارة (37 °C) (Burgos et al., 2023). ثم اضيف الوسط الزراعي الخالي من المصل Serum free media إلى خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 والتي قُسمت إلى مجموعتين كل مجموعة بواقع ثلاث مكررات لكل من مجاميع السيطرة والمجاميع المعاملة بتركيز  $IC_{50}$  من الكيتوسان المحمل بـ (الامبسلين، الاسيتامينوفين، الميفانميك، السيفالكسين) (Al-Senosy et al., 2021).

بعد ذلك أستخلص الحمض النووي الريبي RNA باستعمال العدة RNeasy Mini Kit (cat. no. 74106) و تبعا لطريقة عمل الشركة المصنعة QIAGEN، إذ حُضنت الخلايا لمدة 48 ساعة ثم اضيف لها 1 مل من محلول دارى الفوسفات PBS البارد بعدها فصلت الخلايا بواسطة cell scraper ووضعت في انابيب ابيندروف وأجريت لها عملية الطرد المركزي (1000 دورة لمدة 10 دقيقة) و حرارة (4 م<sup>0</sup>)

تم التخلص من الرائق، وأخذ الراسب و أضيف له محلول Reaction Buffer المجهز مع عدة استخلاص الحمض الريبي ومزج بواسطة vortex، ثم عومل Total RNA المستخلص بأنزيم DNase للتخلص من بقايا DNA، ولإيقاف عمل الانزيم اضيف EDTA.

كُشف عن نقاوة الحمض الريبي باستعمال جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer الذي يقيس امتصاصية الطول الموجي للحمض النووي (الكثافة البصرية O.D) (260-288 nm)، إذ أن نسبة النقاوه المقبولة للعينه في حدود (1.7-1.9).

بأستخدام العدة (Invitrogen. Cat. No. 18064-071) تم تخليق cDNA وذلك عن طريق معاملت الحمض الريبى الكلى Total RNA بأنزيم (Superscript II reverse transcriptase)، وبعد ذلك طبقت عليه الظروف الحرارية المثلى لعمل الانزيم إذ حضن عند درجة حرارة (42 م<sup>0</sup>) لمدة 50 دقيقة، ولإيقاف التفاعل حضن عند حرارة (70 م<sup>0</sup>) ولمدة 10 دقيقة، ليحفظ بعدها عند درجة حرارة (20 م<sup>0</sup>).

### 1.8.2.3 البادئات Primers

تم تحضير البادئات لجين TP53 وفقاً لطريقة العمل للشركة المجهزة Qiagen، لتجهيز محلولي الخزن والعمل، تم البدء بتحضير محلول الخزن Stock solution بإضافة الماء الخالي من الايونات Deionized water إلى العالق ومن ثم تحضير محلول العمل بسحب 10 مايكروليتر من المحلول السابق وتخفيفه بـ 90 مايكروليتر من الماء المنزوع الايونات Deionized water ثم حفظ بدرجة حرارة (20 م<sup>0</sup>) (Al-Musawi et al., 2020).

جُهزت البادئات من قبل شركة Qiagen الامريكية و كما موضحة تسلسلاتها التي حُصل عليها من بنك الجينات العالمي (Nikolova et al., 2018). في الجدول (3-3).

الجدول (3-3) بادئات الحمض النووي منقوص الأوكسجين لجين TP53 المستخدمة في اختبار البلمرة المتسلسل في الوقت الكمي الحقيقي.

تسلسل القواعد النيروجينية DNA Sequences (5' → 3')	حجم نواتج تضخيم PCR	درجة حرارة التلدين للبادئ tm(C <sup>0</sup> )	النسبة المئوية للقواعد النيروجينية GC(%)
TP53 forward TGA GGA CCT GGT CCT CTG AC	20	65.5	60.00
TP53 Reverse AGA GGA ATC CCA AAG TTC CA	20	59.3	45.00

لأجراء تفاعل البلمرة المتسلسل في الوقت الكمي الحقيقي q-RT-PCR استعملت العدة Fast SYBR Green master mix مع نظام التسريع HT 7900 fast system وبناءً على تعليمات الشركة المصنعة Applied Biosystems، الجدول (4-3) يوضح تراكيز المواد المستخدمة في التفاعل.

جدول (4-3) تراكيز المواد المستخدمة في تفاعل البلمرة المتسلسل qRT-PCR .

PCR	Volume
Mix SYBR Green	7.5 مايكرو لتر
ROX	0.3 مايكرو لتر
forward (F) primer	0.3 مايكرو لتر
reverse (R) primer	0.3 $\mu$ L
cDNA	1 $\mu$ L

ضبط الحجم النهائي إلى 1 مايكرو لتر بإضافة 5.9 مايكرو لتر ماء مقطر غلقت الانبوبة ثم وضعت في جهاز thermal cycle البرنامج المستخدم في الكشف الجزيئي لجين TP53 يوضحه الجدول (5-3). في النهاية تم خفض الحرارة إلى (25 م<sup>0</sup>) قبل فتح الجهاز (Alexandrov et al., 2020)

جدول (5.3) البرنامج المستخدم لأجراء تفاعل qRT-PCR

	Step	Temperature	Time	Cycle
TP53	Initial Denaturation	49 C <sup>o</sup>	2 Min	1
	Amplification			40
	Denaturation	49 C <sup>o</sup>	51 S	
	Annealing	59 C <sup>o</sup>	1 Min	
	Extension	72 C <sup>o</sup>	1 Min	

تم احتساب معدل التعبير الجيني لجين P53 قبل المعاملة وبعد المعاملة بالعقاقير المحملة على الكيتوسان النانوي بالاعتماد على قيمة Cycle Threshold (CT) (Duan, et al., 2020).

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

حيث ( C ) تمثل التركيز Concentration، ( V ) تمثل الحجم Volume

### 9.2.3: اختبار ثنائي الصبغة (AO/EtBr) Acridine orange/ethidium bromide staining

أجري اختبار ثنائي الصبغة للكشف عن قابلية الخلايا على البقاء أي الموت المبرمج باستخدام مزيج الصبغتين 5 ملغم من صبغة الاكريددين و 3 ملغم من الايثيديوم، (Yashaswee and Trigun, 2020).

زرعت خلايا HePG2 في Microplate مكونه من 96 حفرة بكثافة ( $1 \times 10^4$  cells/well) وحضنت لمدة 24 ساعة بعد ذلك عرضت قسم من الخلايا للعقاقير المحملة على الكيتوسان بتركيز جرعة النصف  $IC_{50}$  لكل عقار ولمدة 72 ساعة والمجموعة الأخرى عوملت كمجموعة سيطرة، الخطوة الأخيرة صبغت الخلايا بمزيج الصبغتين (AO/EtBr) وفحصت تحت المجهر الفلوري (Jawad, M, et al., 2023) Fluorescent microscope.

### 10.2.3: الكشف عن أنواع الأوكسجين التفاعلية Detection of Reactive Oxygen Species

أستعمل Dichlorodihydrofluorescein من أجل الكشف عن أنواع الأوكسجين التفاعلية ROS في الخلايا السرطانية الكبدية المستحث تولدها تحت تأثير العقاقير النانوية، تمت زراعة خلايا Hep-G2 في Microplate بكثافة ( $1 \times 10^6$  per well) وحضنت طوال الليل ثم قسمت إلى مجاميع وأضيف لها العقار بتركيز  $IC_{50}$  وحضنت لمدة 6 ساعة، بعد ذلك اضيف ROS probe DCFH-DA بتركيز (15مايكرو لتر) وحضنت لمدة 30 دقيقة في الظلام و تم قياس شدة التآلق بواسطة قارئ الصفيحة (Jawad et al., 2023).

### 11.2.3: تقنية الالتحام الجزيئي Molecular Docking

بأستخدام برنامج (BIOVIA) تم الكشف عن مواقع الأرتباط بين العقار والحمض النووي للخلايا السرطانية والذي يعطي صورة ثلاثية الأبعاد لمواقع الأرتباط لجين *TP53*، أما لتقييم قوة أرتباط العقاقير المحملة على الكيتوسان النانوي مع بروتينات جين *TP53* فقد تم استخدام برنامج (PyRX).

### 12.2.3: التحليل الاحصائي Statistical Analysis

تم تحليل البيانات احصائيا بأستخدام اختبار Unpaired t-test مع برنامج Prism GraphPad 6 إذ تم حساب قيم معدل الانحراف المعياري  $\pm SD$  لقياس ثلاث مكررات (Jihad et al., 2021).

الفصل الرابع  
النتائج والمناقشة

**Chapter Four**  
**Result and**  
**Discussion**

## 4\_ النتائج والمناقشة Result and Discussion

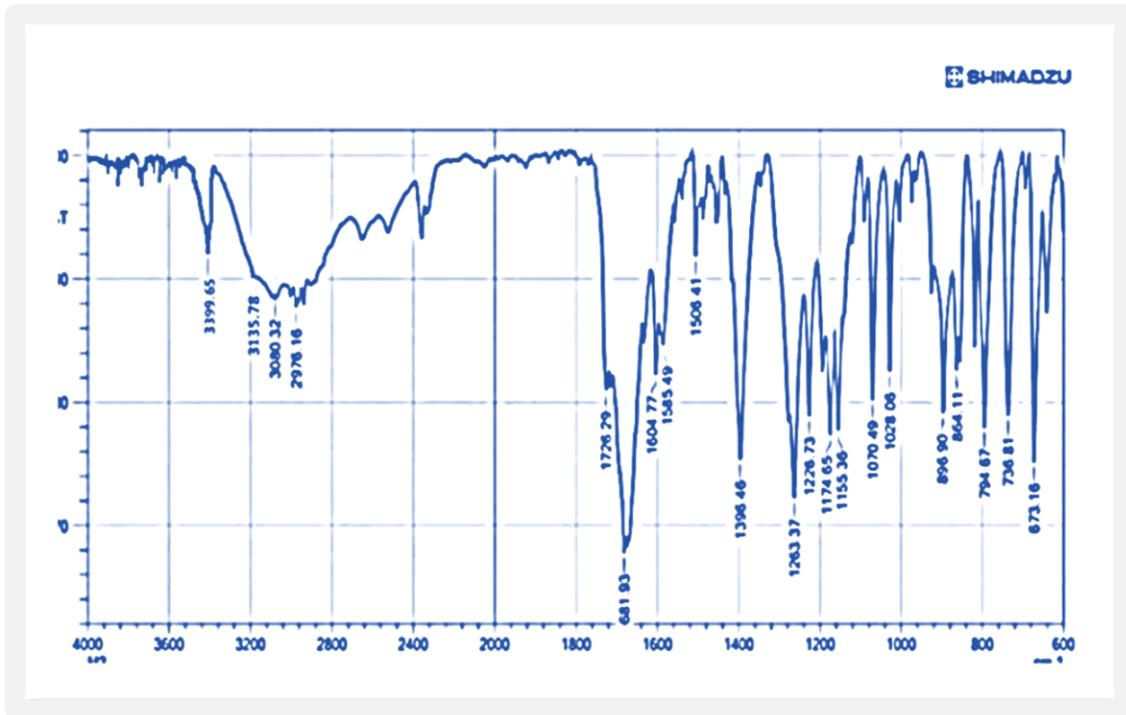
## 1.4: تحضير الأدوية مع الكيتوسان النانوي- Preparation of Drugs with Nano-chitosan

قيمت فعالية العقاقير المحملة على الكيتوسان باستخدام جهاز Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy الذي يقيس مدى امتصاص العينة للضوء، تظهر نتائج طيف الامتصاص للمضادات الحيوية المحملة على بوليمر الكيتوسان في الأشكال (1-4) لعقار الامبسيلين، (2-4) لعقار الاسيتامينوفين، (3-4) لعقار الميفانميك، (4-4) لعقار السيفالكسين.

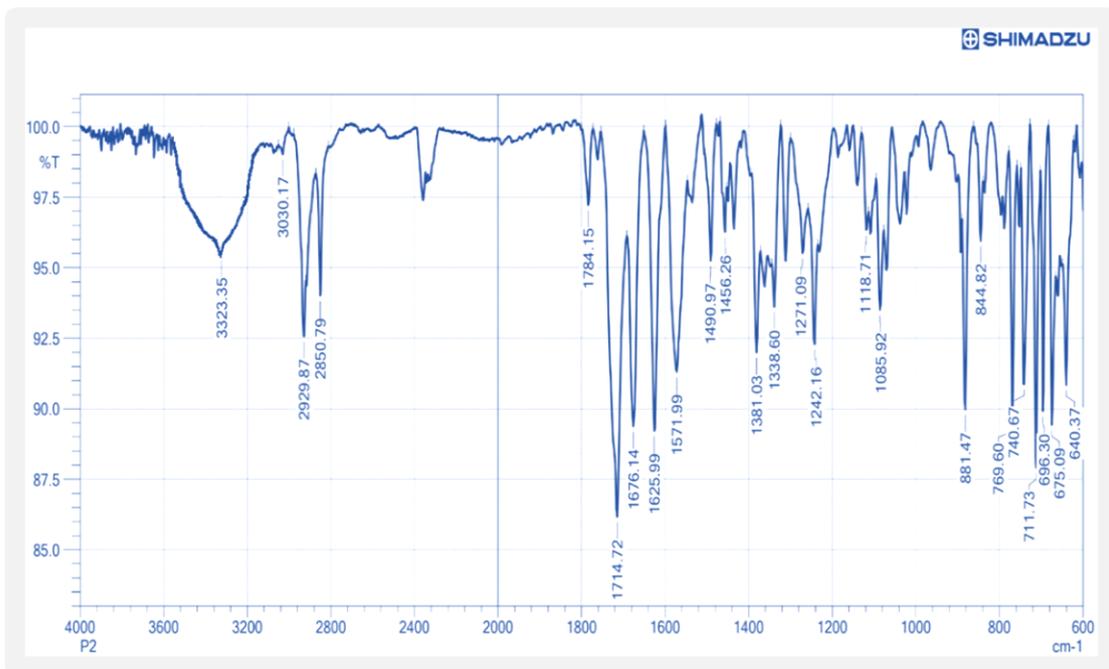
إذ نلاحظ أن تردد مجموعة الهيدروكسيل كان في حدود ( $3396.78 \text{ cm}^{-1}$ ) أما مجموعة الأمين فلم تتجاوز التردد ( $3399.65 \text{ cm}^{-1}$ )، بالنسبة لمجموعتي (C-H) الأروماتية ولألفاتيه ظهرنا ضمن حدود ( $3066.82 \text{ cm}^{-1}$ )، ( $2976.16 \text{ cm}^{-1}$ )، أما مجاميع الأستر و الأמיד ومجموعة (C-O) كان تردد قمم الاهتزاز لهم ( $1726.29 \text{ cm}^{-1}$ )، ( $1681.93 \text{ cm}^{-1}$ )، ( $1269.16 \text{ cm}^{-1}$ ) وعلى التوالي .

ان قمم الاهتزاز القياسية للمجاميع الوظيفية تتطابق مع النتائج التي حصلنا عليها، هذه المجاميع هي ما يعطي البوليمر خصائصه المميزة (Souza et al., 2022). إذ تعتبر المجموعة الامينية الموجبة من اهم المجاميع الوظيفية له والتي تسمح له بالأرتباط بالحمض النووي DNA السالب الشحنة، كذلك تزيد من أمتصاصه من قبل الخلايا السرطانية للوصول إلى العضيات المستهدفة مثل الميتوكوندريا، حيث أظهر الكيتوسان كفاءه في تحسين الأدوية المحبه للماء مثل المضادات الحيوية بيتا لاكتام وتوصيلها إلى داخل الخلية السرطانية مما أدى إلى أستعاد وظيفة P53 (Krysa et al., 2022).

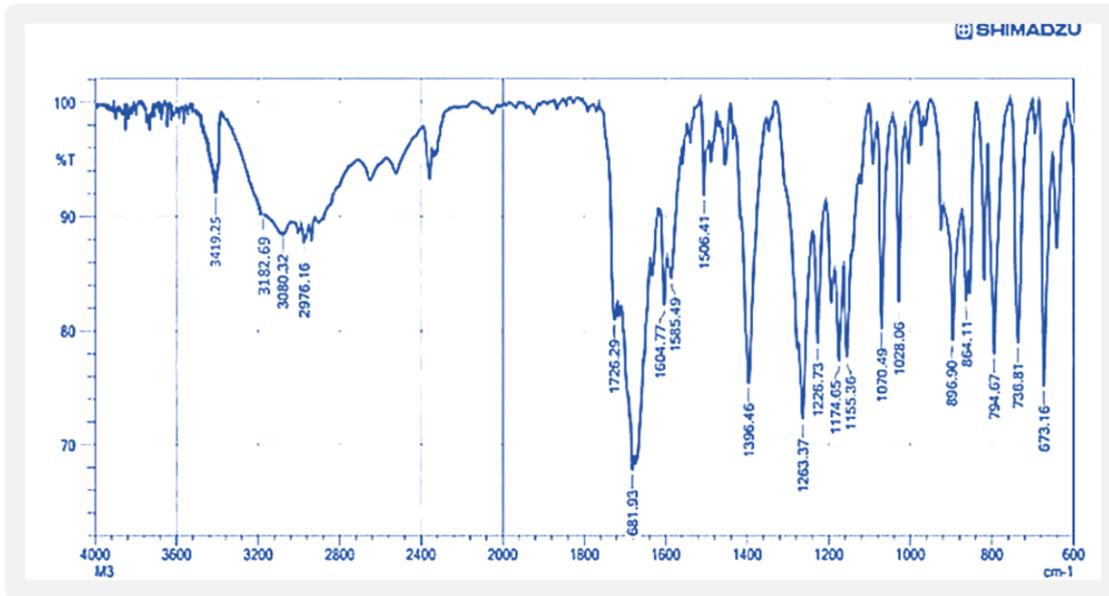
كون الكيتوسان بوليمر حيوي مستخلص من الكيتين الموجود في هياكل القشريات البحرية فهو متوفر بكثرة وله مميزات تجعله مرشحاً للأستخدام الطبي مثل خصائصه المضادة للسرطان وتحلله البيولوجي (Martínez-Robles et al., 2023).



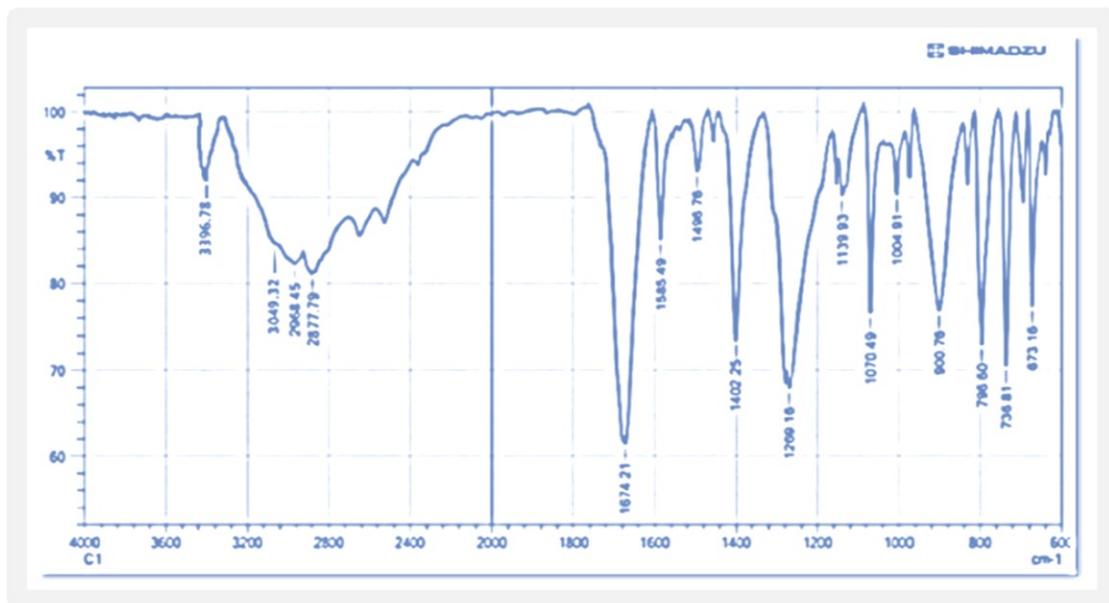
الشكل (1-4) طيف FT-IR لعقار الأمبسلين - كيتوسان



الشكل (2-4) طيف FT-IR لعقار الازيتاميتوفين - كيتوسان



الشكل (3-4) طيف الامتصاص FT-IR لعقار الميفانميك - كيتوسان



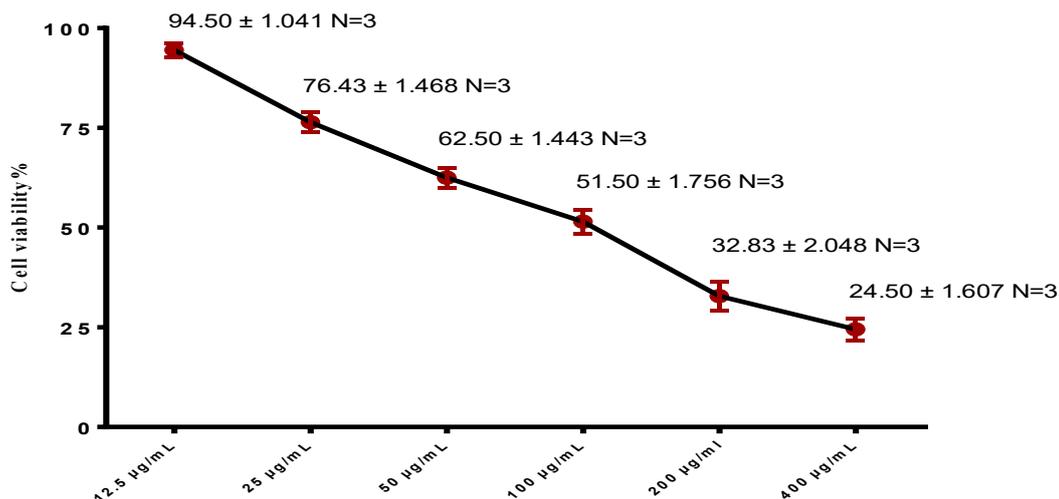
الشكل (4-4) طيف FT-IR لعقار السيفالكسين - كيتوسان

## 2.4: اختبار السمية الخلوية بواسطة فحص MTT

## Cytotoxicity Test by MTT Assay

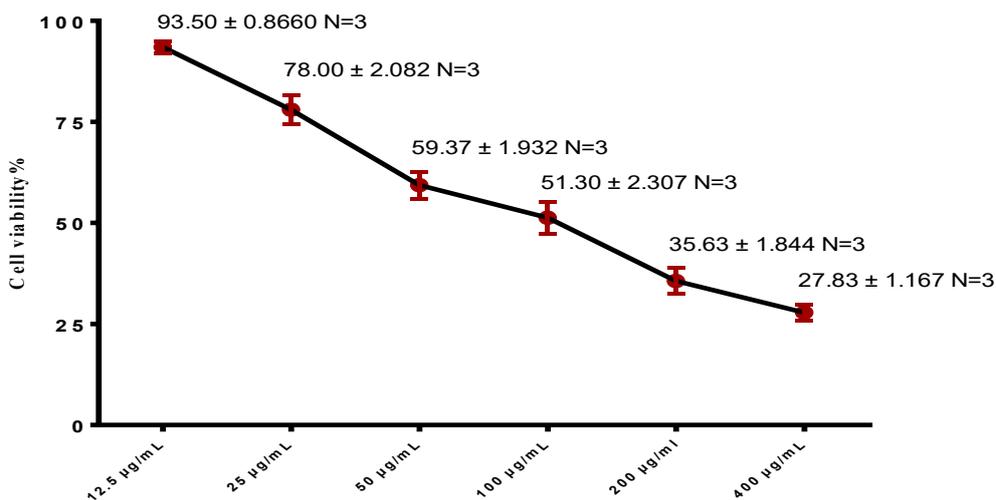
استخدمت صبغة Methyl thiazolyl tetrazolium لقياس فعالية الكيتوسان النانوي المحمل بالعقاقير (الامبسيلين، الاسيتامينوفين، الميفانميك ، السيفالكسين) في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2.

الشكل (4-5) يظهر نتائج اختبار السمية الخلوية حيث نلاحظ انخفاضاً في حيوية خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 مع زيادة تركيز العقار، فعند استخدام أقل تركيز 12.5 مكغم/مل لعقار الامبسيلين المحمل على الكيتوسان كانت النسبة المئوية لحيوية الخلايا  $(94.50 \pm 1.04)$  أما عند التركيز 100 مكغم/مل انخفضت النسبة إلى  $(1.756 \pm 51.50)$  وقلت حيوية خلايا سرطان الكبد HepG2 اكثر، أما عند رفع تركيز العقار إلى 400 مكغم/مل بلغت النسبة المئوية لحيوية الخلايا  $(24.50 \pm 1.607)$ .



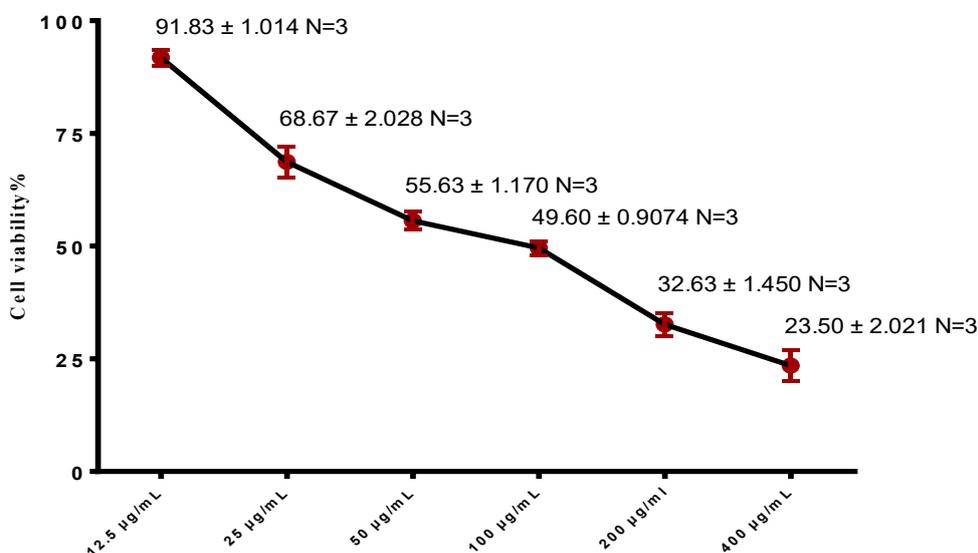
الشكل (4-5) سمية عقار الكيتوسان-امبسيلين في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2

أما عند تعريض خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 إلى عقار الاسيتامينوفين المحمل على الكيتوسان النانوي بتركيز 12.5 مكغم/مل كانت النسبة المئوية لحيوية الخلايا  $(93.50 \pm 0.8660)$  وعند التركيز 100 مكغم/مل بلغت النسبة المئوية  $(51.30 \pm 2.307)$  وقلت حيوية الخلايا السرطانية اكثر عند رفع تركيز العقار إلى 400 مكغم/مل لتبلغ النسبة المئوية لحيوية الخلايا  $(27.83 \pm 1.167)$  وكما موضح في الشكل (4-6).



الشكل (6-4) سمية عقار الكيتوسان-اسيتامينوفين في خط خلايا سرطان الكبد HepG2

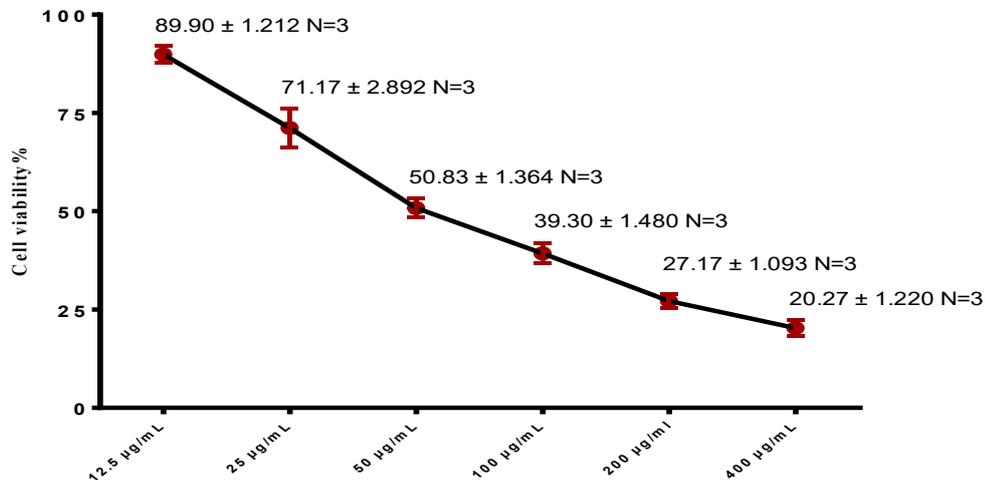
كانت النسبة المئوية لحيوية الخلايا (91.83 ± 1.014) عند استخدام عقار الميفانمك النانوي بتركيز 12.5 مكغم/مل وبلغت (49.60 ± 0.9074) عند التركيز 100 مكغم/مل لتصل النسبة المئوية إلى (24.50 ± 2.021) عند التركيز 400 مكغم/مل وكما موضح في الشكل (7-4).



الشكل (7-4) سمية عقار الكيتوسان-ميفانميك في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2

أظهرت نتائج اختبار السمية لعقار السيفالكسين المحمل على الكيتوسان والموضحة في الشكل (8-4) أن النسبة المئوية لحيوية الخلايا (89,90 ± 1.212) عند التركيز 12.5 مكغم/مل وعند رفع الجرعة إلى 100 مكغم/مل

انخفض عدد الخلايا الحية إلى  $(39.30 \pm 1.480)$  أما عند التركيز 400 مكغم/مل انخفضت حيوية الخلايا السرطانية أكثر لتصل النسبة المئوية إلى  $(20.27 \pm 1.220)$ .



الشكل (8-4) السمية لعقار الكيتوسان-سيفالكسين في خط خلايا سرطان الكبد HepG2

وبالاعتماد على قيمة جرعة النصف  $(IC_{50})$  Half-maximal inhibitory concentration والتي تم استخدامها في بقية الاختبارات كان السيفالكسين الأكثر تأثيراً تلاه حمض الميفناميك والامبسلين ثم البراسيتامول وكما موضح في الجدول (1-4).

الجدول (1-4)  $IC_{50}$  للعقاقير المحملة على الكيتوسان النانوي

اسم العقار المحمل على الكيتوسان النانوي	الجرعة النصف مؤثرة $IC_{50}$
السيفالكسين Cephalexin	59.07 مكغم/مل
حمض الميفيناميك Mefenamic acid	65.44 مكغم/مل
الامبسلين Ampicillin	69.09 مكغم/مل
البراسيتامول Paracetamol	73.88 مكغم/مل

في اختبار MTT تُحدد حيوية الخلايا على أساس نشاطها الأيضي ويتم ذلك بواسطة مقياس طيفي لشدة الضوء واعتماداً على تركيز الفورمازان formazan داخل الخلايا فكلما زاد التركيز زاد اللون البنفسجي وقلت الامتصاصية، فالخلايا الحية وذات الأغشية السليمة فقط يمكنها تحويل أملاح النترات إلى بلورات الفورمازان formazan البنفسجية تحت تأثير انزيم هيدروجيناز السكسينات الموجود في الغشاء الداخلي للميتوكوندريا، لذلك فإن الانخفاض في عدد الخلايا مبني على أساس تلف غشاء الميتوكوندريا مما يفقدها نشاطها لاستقلابي للصبغة، تعمل المضادات الحيوية المحملة على البوليمرات النانوية مثل الكيتوسان النانوي على إيقاف تكاثر الخلايا بواسطة ارتباطها ببروتينات جدار الخلية وتعطيله (Ghasemi et al., 2021).

أما حمض الميفانميك والاسيتامينوفين فعند تحميلهما على الكيتوسان النانوي تحسنت الخصائص العلاجية لهما و من ثم كان لهما تأثيرات سمية على الخلايا السرطانية (Bahaa et al., 2023). إذ أنه يتمكن من إيصال الدواء إلى داخل الخلايا السرطانية فينتسبب في تلف أغشيتها بواسطة تراكمه الانتقائي فيها مما يؤدي إلى قطع الاتصالات الخلوية بين الخلايا (Sharifi-Rad et al., 2021). فالضرر في الميتوكوندريا المسؤولة عن استقلاب الطاقة يعد من المحفزات الأولية للموت المبرمج التي يستجيب لها p53 (Hiliṭanu et al., 2024). و الذي وجد أنه لا ينظم غشاء الميتوكوندريا الخارجي بل يحفز نفاذية غشائها الداخلي أيضاً مما يطلق السييتوكروم وتفعيل الموت المبرمج في الخلية السرطانية (Baharlouei and Rahman, 2022 ; Roy et al., 2024). وهذا ما اتفق مع نتائج الدراسة الحالية إذ أن الكيتوسان المحمل بالأدوية سبب ضرراً في أغشية خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 وبشكل طردي مع زيادة التركيز.

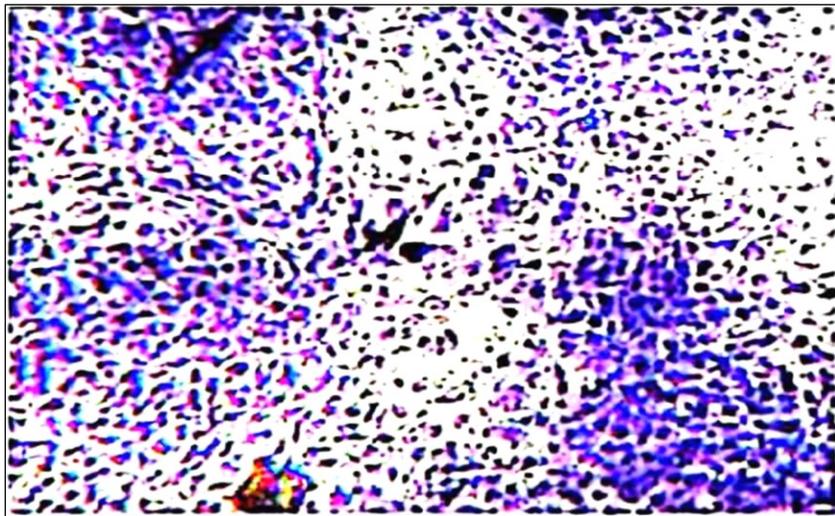
### 3.4: التغيرات المورفولوجية للخلايا السرطانية الكبدية Morphological Changes in HepG2 Cells

للموت المبرمج في الخلايا السرطانية، إذ أضيفت الص معالجة الخلايا السرطانية بصبغة Crystal Violet من الطرق المستعملة للكشف التغيرات المظهرية المرافقة بعة إلى خلايا سرطان الكبد HepG2 المعاملة بجرعة IC<sub>50</sub> للعقاقير المحملة على الكيتوسان، فضلاً عن مجموعة السيطرة والتي لم تعرض للأدوية النانوية ثم فحصت بالمجهر المقلوب بقوة تكبير (x100).

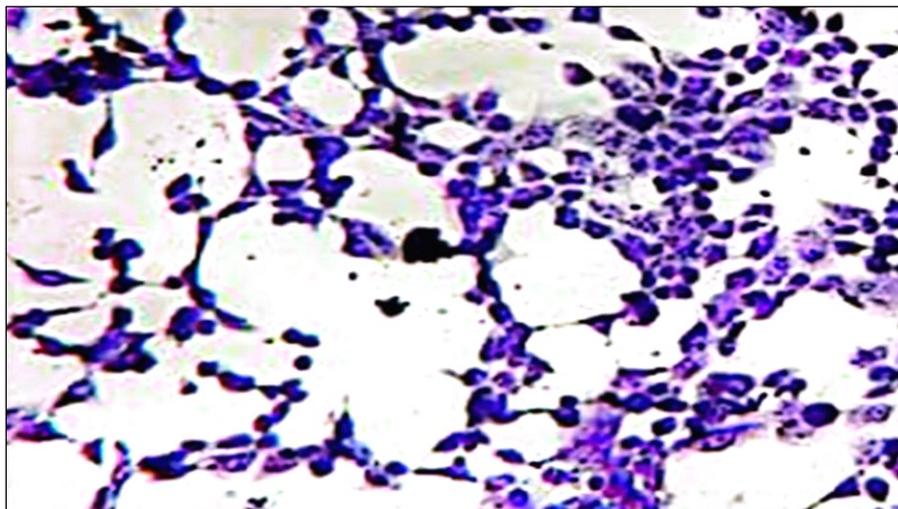
أظهرت نتائج اختبار التغيرات المورفولوجية في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 لمجموعة السيطرة و الموضحة في الشكل (4-5) أن الخلايا السرطانية قريبة من بعضها البعض و متراسة و اللون البنفسجي لصبغة Violet Crystal واضح جداً، أيضاً الحدود بين الخلايا يمكن تمييزها، النوية وغشاء الخلية يبدوان سليمين ولا

توجد أي تغييرات يمكن ملاحظتها، على خلاف خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 المعاملة بالعقاقير و الموضحة في الأشكال (9-4)، (10-4)، (11-4)، (12-4) و التي تعود لعقار الامبسيلين و الاسيتامينوفين و الميفانميك و السيفالكسين على التوالي إذ لوحظ وجود تغييرات مظهرية مرضية عديدة تباينت بين ظهورها بحجم أصغر من حجمها الأصلي أو تجمعها مع بعضها بشكل مجاميع خلوية صغيرة ذات سيتوبلازم بلون باهت و غشاء غير واضح الحدود.

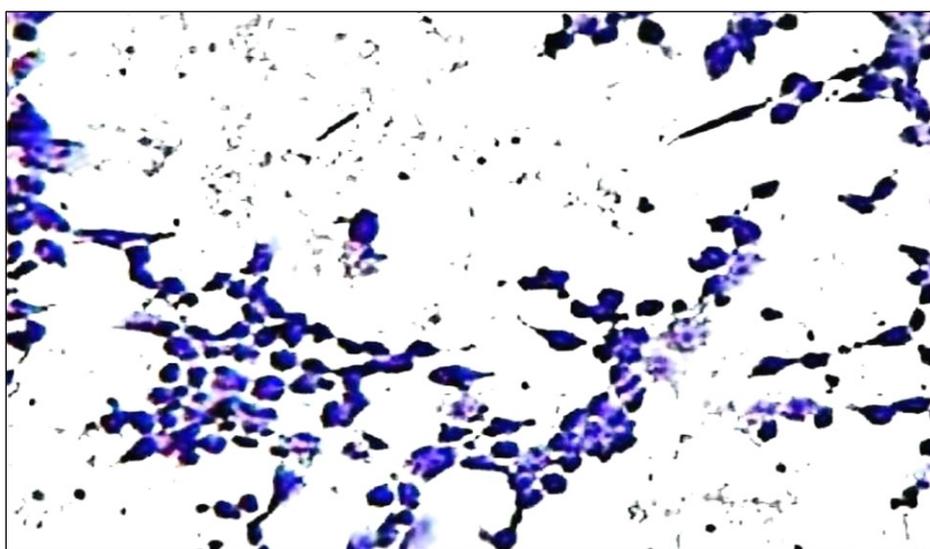
ان موت الخلايا المبرمج هو عملية مُنظمة بالجينات وله العديد من السمات المورفولوجية النموذجية مثل انكماش الخلايا وتكثيف الكروماتين النووي وحصول تجايف في السيتوبلازم وتفتت النوية وتجزئة الحمض النووي وتكوين اجسام الموت المبرمج، فضلاً عن فقدان سلامة الاغشية الذي يؤثر على قدرتها على الالتصاق مع بعضها وعلى الاسطح، فالإجهاد على الخلية السرطانية يحفز بروتين P53 والذي يفعل الموت المبرمج بواسطة المسار الداخلي للميتوكوندريا، فقد وجد أن المضادات الحيوية ومضادات الإلتهاب غير الستيرويدية المحملة على الكيتوسان كانت لها آثار ضارة في خط خلايا سرطان الكبد البشري وادت إلى تحريض الموت المبرمج وسببت ضرراً لها (Hojati et al., 2023 ; Liyanage et al., 2024). وهذا ما اتفق مع النتائج التي حصلنا عليها إذ أن التغييرات المورفولوجية التي تم رصدها في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 مثل انخفاض الكتلة الخلوية ووجود مسافات بين الخلايا بسبب انكماش سايتوبلازمها وتلف أغشيتها مما أفقدها القدرة على التراص مع بعضها، ايضاً الصبغة كانت مشتتة وباهتة ويعزى ذلك إلى نفاذية غشائها، كلها تشير إلى الموت المبرمج لتعكس فعالية العقاقير المحملة على الكيتوسان في أستعادة وظيفة P53 .



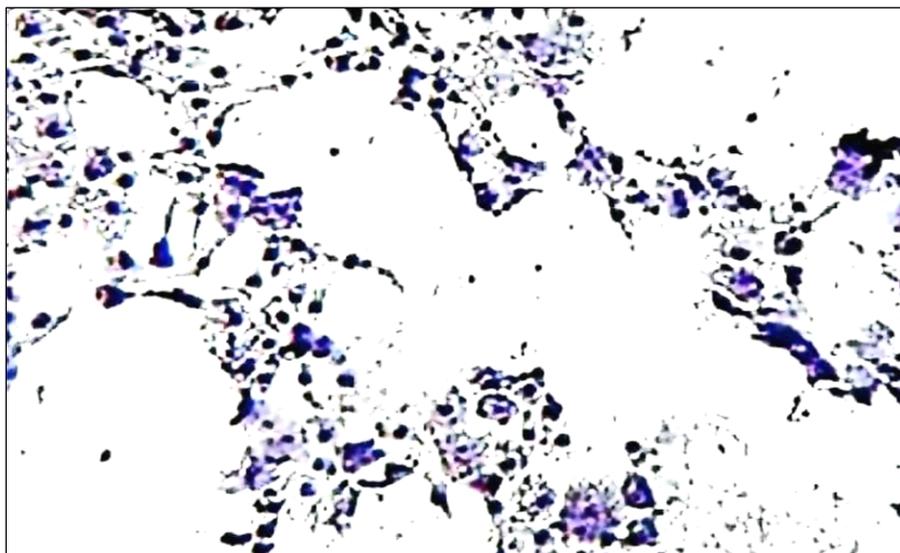
الشكل (9-4) التغييرات المورفولوجية في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 لمجموعة السيطرة



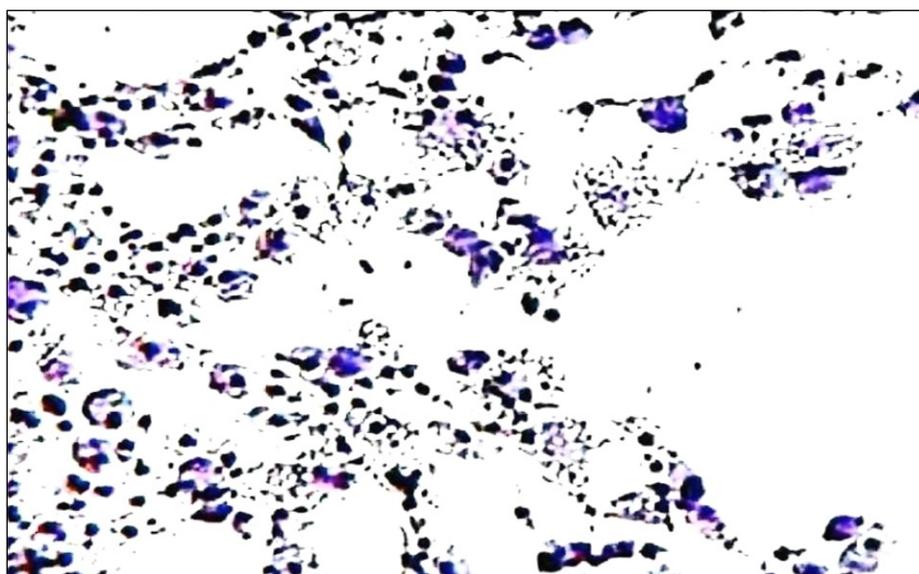
الشكل (10-4) التغيرات المورفولوجية في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 المعاملة الامبسلين - كيتوسان  $IC_{50} = 69.09$  مكغم/مل



الشكل (11-4) التغيرات المورفولوجية في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 المعاملة بالاسيتامينوفين - كيتوسان  $IC_{50} = 73.88$  مكغم/مل



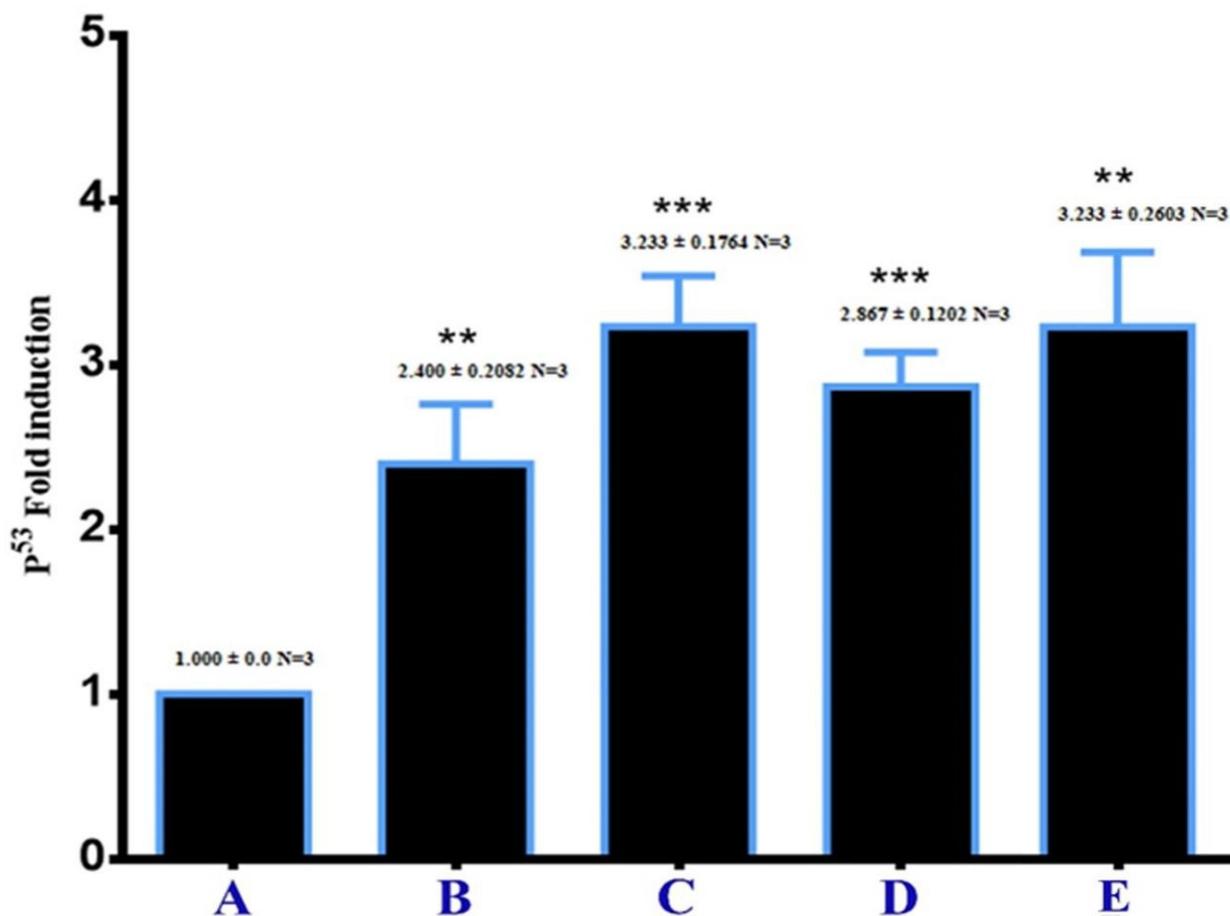
الشكل (4-12) التغيرات المورفولوجية في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 المعاملة بالميفناميك – كيتوسان  
 $IC_{50} = 65.44$  مكغم/مل



الشكل (4-13) التغيرات المورفولوجية في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 المعاملة بالسيفالكسين – كيتوسان  
 $IC_{50} = 59.07$  مكغم/مل

#### 4.4: النسخ العكسي الكمي في الوقت الحقيقي (qRT-PCR) Reverse Transcription

من أجل الكشف عن التعبير الجيني لـ *TP53* لخلايا سرطان الكبد البشري HepG2 استخدمت تقنية النسخ العكسي الكمي qRT-PCR وبالاعتماد على تآلق صبغة SYBR Green المشعة. أوضحت نتائج الدراسة الحالية والموضحة في الشكل (4-14) والتي كشفت عن ارتفاع في مستويات التعبير الجيني لـ P53 في المجاميع المعاملة بالمضادات الحيوية وبنسبة  $(2.400 \pm 0.2082)$  للامبسيلين،  $(3.233 \pm 0.1764)$  للاسيتامينوفين،  $(2.867 \pm 0.1202)$  للميفيناميك،  $(3.233 \pm 0.2603)$  للسيفالكسين، مقارنة مع مجموعة السيطرة  $(1.000 \pm 0.0)$ .



الشكل (4-14) التعبير الجيني لـ P53 لخلايا سرطان الكبد البشري HepG2: A مجموعة السيطرة، B مجموعة الخلايا المعرضة للامبسيلين-كيتوسان، C مجموعة الخلايا المعرضة للاسيتامينوفين-كيتوسان، D مجموعة الخلايا المعرضة للميفيناميك-كيتوسان، E مجموعة الخلايا المعرضة للسيفالكسين-كيتوسان.

جين *TP53* منظم إذ أنه لا يبدأ نشاطه إلا عندما يصل الإجهاد ذروته أي في مرحلة التدهور ثم بعد ذلك يستجيب اعتماداً على نوع الضرر (Shahmoradi et al., 2023). حيث يعطي الإشارة بواسطة بروتين P53 الذي يعد عامل نسخ معزز للتعبير الجيني لعدد من الجينات ذات العلاقة بتحديد مصير الخلية والذي يتواجد في النوية ويرتبط مباشرة بمواقع معينه في الحمض النووي تسمى عناصر الإستجابة Response element في الحقيقة أن الطفرات تؤثر على قدرته على الارتباط بهذه العناصر بواسطة تغيير تسلسله (Ly, et al., 2020).

وجد أن المضادات الحيوية بيتا لاكتام المحملة على الكيتوسان شكلت عوامل علاجية واعدة إذ أدت إلى رفع مستوى ROS (Fan et al., 2022). مما سبب ضرراً على غشاء الميتوكوندريا لخلايا سرطان الكبد HepG2، أيضاً مضادات الإلتهاب غير الستيرويدية لها تأثير مضاد لسرطان بواسطة تثبيط انزيم COX2 الذي له تعبير عالي في سرطان الكبد (Sakr et al., 2022). فعند تعرض الخلية إلى الإجهاد تعمل بروتينات الكيناز Kinase مثل Ataxia Telangiectasia Rad3-related protein و Ataxia Telangiectasia Mutate (ATM) و ChK1 و (ATR) وغيرها على تنشيط P53 الذي بدوره يرتبط بعناصر الإستجابة في الحمض النووي ليقوم بإيقاف دورة الخلية في طور G2 بواسطة تحفيز التعبير الجيني لـ *CDKN1A*، كذلك يوقف دورة الخلية في طور G1 بواسطة ارتباطه بـ P21 Promoter الذي بدوره يرتبط بـ Checkpoint Kinase (Cdk2)، إذا لم يتم إصلاح الحمض النووي فإن التعبير الجيني لكابح الورم يزداد ليفعل مسار الموت المبرمج الداخلي الذي تهيمن عليه عائلة البروتينات Bcl2 المتحكمة في اطلاق Cytochrome-c من الميتوكوندريا (Huo et al., 2023). أيضاً يفعل الموت المبرمج بواسطة *PUMA* والتي تثبط الجينات المضادة للاستماتة وتفعيل كاسبيزات الموت المبرمج caspase، أو بواسطة Fasr apoptosis antigen (FAS) والتي ارتبطت مستوياتها المنخفضة بتقدم الورم، أيضاً زيادة التعبير الجيني لبروتين الورم يثبط الخلايا السرطانية بواسطة تثبيط تحلل السكر و تنشيط الفسفرة التأكسدية وذلك بواسطة بروتين الكاينيز AMPK فضلاً عن ذلك يزداد التعبير الجيني لكابح الورم استجابة للإجهاد التأكسدي المستحث وتراكم ROS فيعمل على تنظيم عائلة جينات BAX مما يحفز على اطلاق السيوكروم C الأمر الذي ينشط Caspase-9 (Hernandez Borrero and El-Deiry, 2021).

يعد P53 مستهدف علاجياً لأن أستعادة وظيفته تؤدي إلى زيادة مستوياته و من ثم زيادة تعبيره الجيني الذي من خلاله يتم القضاء على السرطان وذلك من خلال المواد النانوية مثل الكيتوسان النانوي الذي يعمل على تحفيز P53 بواسطة الإجهاد التأكسدي المستحث وزيادة مستويات أنواع الأوكسجين التفاعلية في الميتوكوندريا، والذي بدوره يستجيب للضرر فيرتبط بالحمض النووي ويحفز التعبير الجيني لجينات الموت المبرمج و من ثم إيقاف

الورم (Szewczyk-Roszczenko and Barlev, 2023). وهذا ما اتفق مع النتائج التي حصلنا عليها إذ أن الكيتوسان عزز توصيل الأدوية عبر الاغشية البيولوجية مما زاد من فعاليتها ضد الخلايا السرطانية بواسطة تنشيط P53 وزيادة مستوياته الأمر الذي أدى إلى تفعيل الموت المبرمج.

#### 5.4: اختبار ثنائي الصبغة (AO/EtBr) Acridine orange/ethidium bromide staining

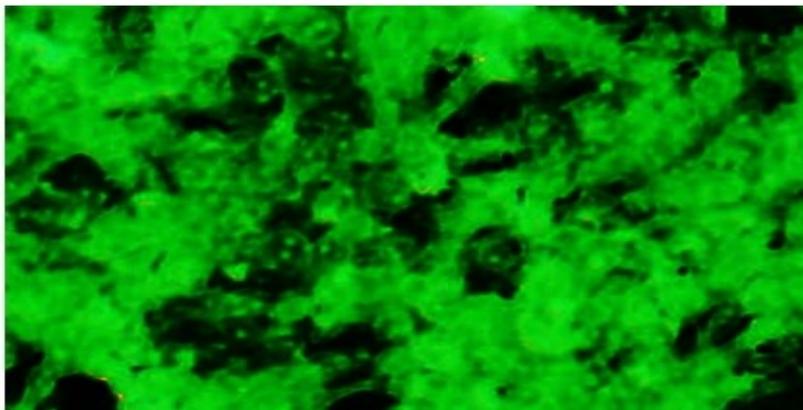
يستخدم هذا الاختبار للكشف عن تلف الحمض النووي في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 المعرضه إلى  $IC_{50}$  من العقاقير النانوية و مقارنتها مع مجموعة السيطرة بأستخدام صبغة الاكردين اورنج ائيديوم برومايد AO/EtBr.

أن الخلايا غير المعاملة بالعقاقير و الموضحة في الشكل (4-15) اصطبغت باللون الأخضر، أما خلايا سرطان الكبد HepG2 المعاملة بالعقاقير المحملة على الكيتوسان النانوي ظهرت باللون البرتقالي وكما موضح في الأشكال (4-16) لعقار الامبسيلين، (4-17) لعقار الاسيتامينوفين، (4-18) لعقار الميفانميك، (4-19) لعقار السيفالكسين.

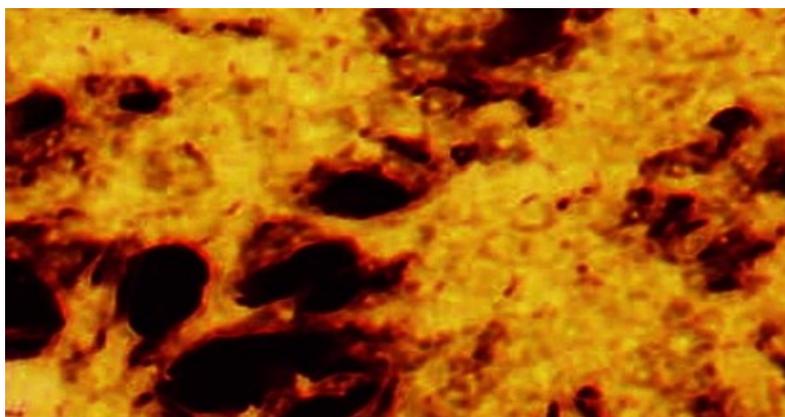
أن AO/EtBr هي صبغات فلورية تستخدم لتلوين الأحماض النووية في DNA الخلايا السرطانية، إذ تعد آلية الأمتصاص مهمه للكشف عن موت الخلية حيث أن أصطبغ الخلايا باللون الأخضر يعزى إلى امتصاص اغشيت الخلايا السرطانية السليمة الانتقائي لصبغة AO مما يدل على حيويتها وسلامة اغشيتها لان صبغة EtBr كبيرة الحجم وموجبة الشحنة مما يجعلها غير قادرة على المرور عبر الغشاء الخلوي السليم فقط الخلايا الميتة أو تلك التي تعرضت أغشيتها إلى الضرر تسمح بتلوين باللون البرتقالي ل EtBr إذ تحشر نفسها بين قواعد الحمض النووي، وكلما كان اللون اغمق دل ذلك على انها في مرحلة متقدمة من الموت المبرمج و الذي من مميزاته تجزئة الحمض النووي (Kari et al., 2022). والذي يحدث في المراحل النهائية لذلك فإن اختبار (AO/EtBr) يؤكد أنه تم القضاء على السرطان بواسطة الموت المبرمج تحديدا إذ أن الصبغة استطاعت اختراق غشاء الخلية الذي اصبح نفاذاً للغاية ثم وصلت إلى النوية وحشرت نفسها بين قواعد الحمض النووي (Chelliah et al, 2022). وهذا ما اتفق مع النتائج التي حصلنا عليها إذ ظهرت الخلايا باللون البرتقالي وسيتوبلازم منكمش وحدود غير واضحة. وجد أن الخلايا السرطانية تكون حساسه لفئات المضادات الحيوية التي لم تتعرض لها من قبل وبنسبه اكبر من مثيلاتها الي عولجت بها مما يجعلها اكثر فعالية في تثبيط السرطان، مثلا في الخلايا السرطانية الكبدية

التي وان تم أستهدافها فإنها لا تموت وتدخل في طور السكون G0 ثم تعود لتنتشر من جديد لكن المضادات الحيوية المحملة على المواد النانوية عملت على إيقافها حتى في ذلك الطور بواسطة تحفيز بروتين الورم P53 الذي بدوره يؤثر على P21 و من ثم ينتشط Cyclin-B مما يؤدي إلى تثبيط 2 Cyclin dependent Kinase الأمر الذي يوقف الدورة التكاثرية ويبدأ مسار الموت المبرمج لتلك الخلايا (Gao et al., 2020).

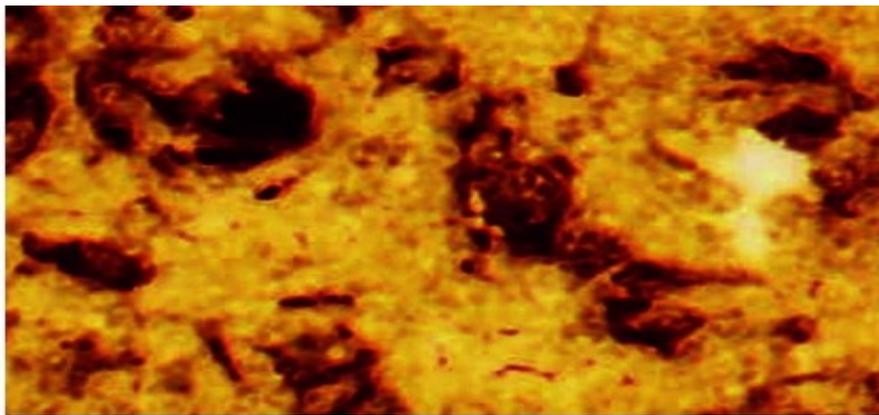
أما مضادات الإلتهاب غير الستيرويدية مثل حمض الميفانميك فإن الأساس الجزيئي لعملها يتم من خلال تثبيطها لأنزيمات الأكسدة الحلقية COXS وإيقاف تخليق Prostaglandin المشتقه من حمض اللينوليك Linolenic acid الموجود في غشاء الخلية، و بواسطة بروتين AKT المسؤول عن التوازن بين تكاثر الخلية وموتها والذي يؤثر على Mdm2 و من ثم تنشيط P53 الذي ينشط P21 و من ثم إيقاف عمل Cyclinacs الدافعة لدورة الخلية (Kolawole and Kashfi., 2022).



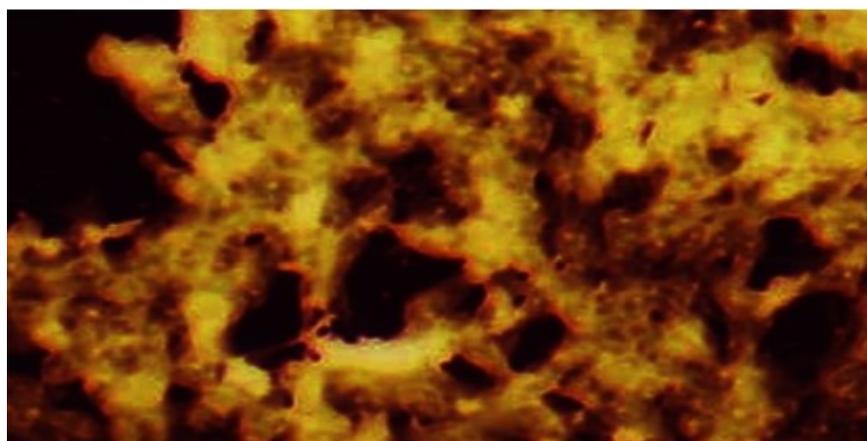
الشكل (15-4) اختبار (AO/EtBr) لمجموعة خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 غير المعرضة للعقاقير النانوية



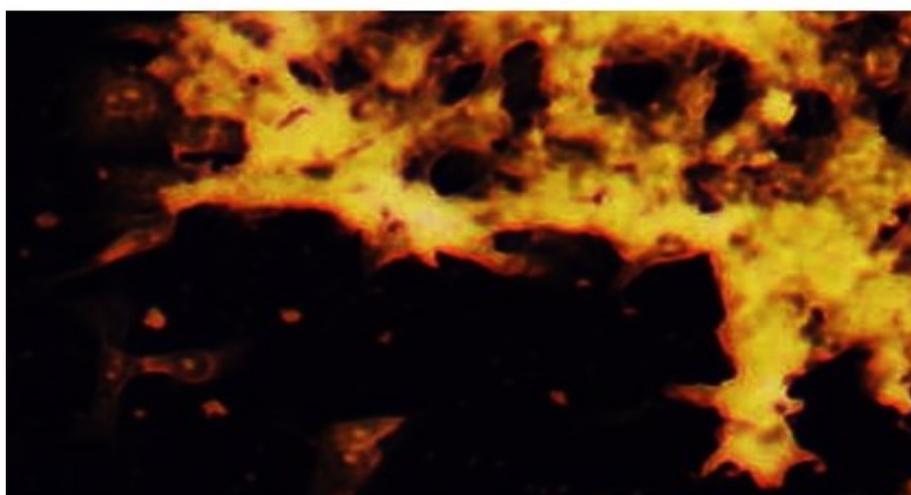
الشكل (16-4) اختبار (AO/EtBr) لمجموعة خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 المعرضة للامبسيلين-كيتوسان



الشكل (4-17) اختبار (AO/EtBr) لمجموعة خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 المعرضة للبراسيتيمول-كيتوسان



الشكل (4-18) اختبار (AO/EtBr) لمجموعة خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 المعرضة للميفانميك-كيتوسان



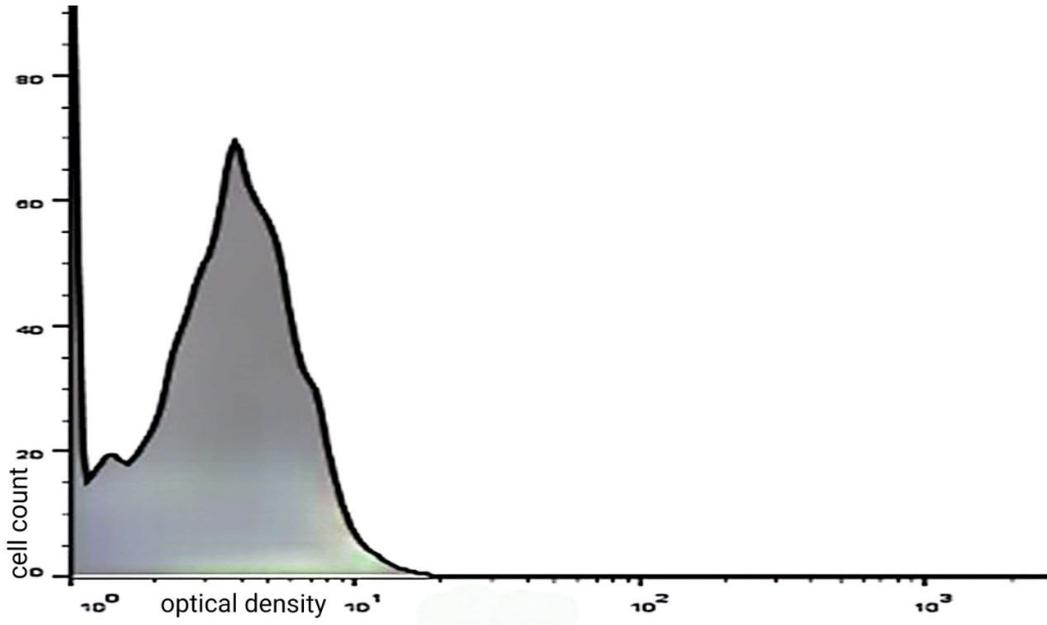
الشكل (4-19) اختبار (AO/EtBr) لمجموعة خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 المعرضة للسيفالكسين-كيتوسان

## 6.4: اختبار التدفق الخلوي flow Cytometry

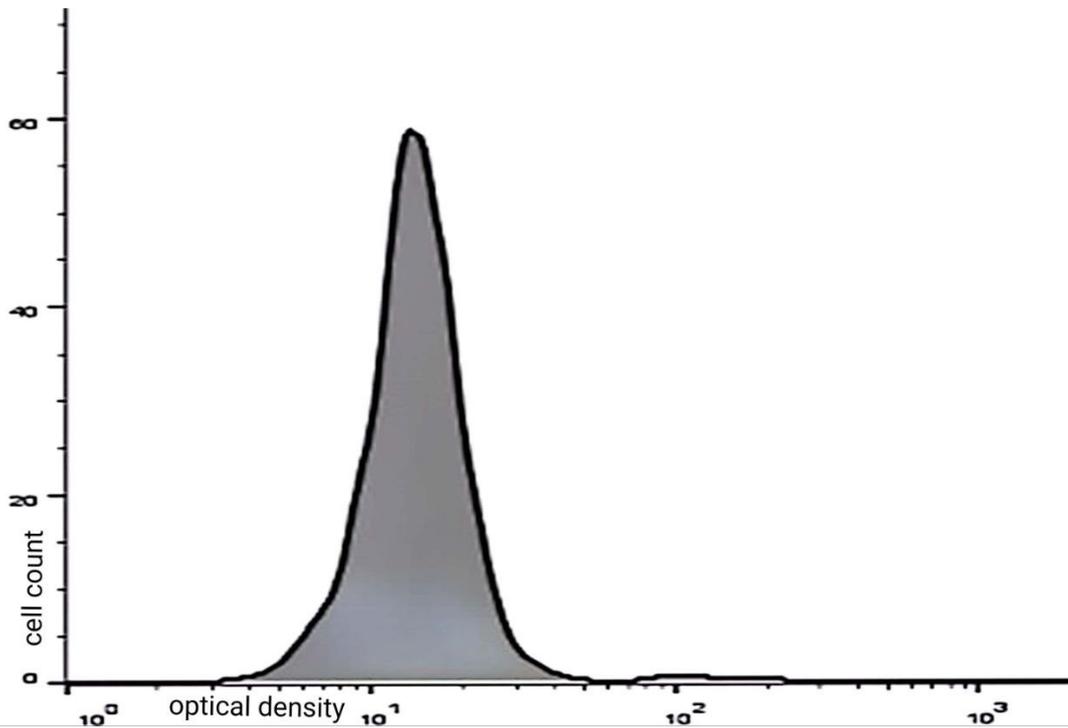
أن أنواع الأوكسجين التفاعلية ROS هي جزيئات مهمة تعمل على نقل الإشارات و الحفاظ على توازن الأكسدة الخلوي وهي أيضاً أداة للقضاء على السرطان لذلك تم استخدام اختبار التدفق الخلوي لمعرفة تأثير العقاقير المحملة على الكيتوسان النانوي في استحثاث تكون ROS في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 وذلك باستعمال صبغة ROS prob DCFH-DA وهي الأساس لهذا الأختبار المبني على قياس الكثافة الضوئية لهذه الصبغة، وضعت العينات في قارئ الصفائح الميكروية، الشكل (4-20) يوضح النتائج لمجموعة السيطرة أما الشكل (4-21) لعقار الامبسيلين والشكل (4-22) لعقار الاسيتامينوفين والشكل (4-23) يعود لعقار الميفانميك والشكل (4-24) لعقار السيفالكسين.

عند مقارنة المنحنيات نلاحظ إزاحة القمم إلى اليمين في المجاميع المعاملة بالأدوية مقارنة مع مجموعة السيطرة فكلما ازدادت الإزاحة الخطية إلى اليمين دل ذلك على أن هذه الخلايا تكونت فيها نسبة أكثر من ROS لان هذه الجزيئات لا تمتص الضوء فتعمل على تشتته، إذ أن المحور السيني يمثل شدة التآلق واصطبأغ خلايا HepG2 أما المحور الصادي يمثل عدد الخلايا.

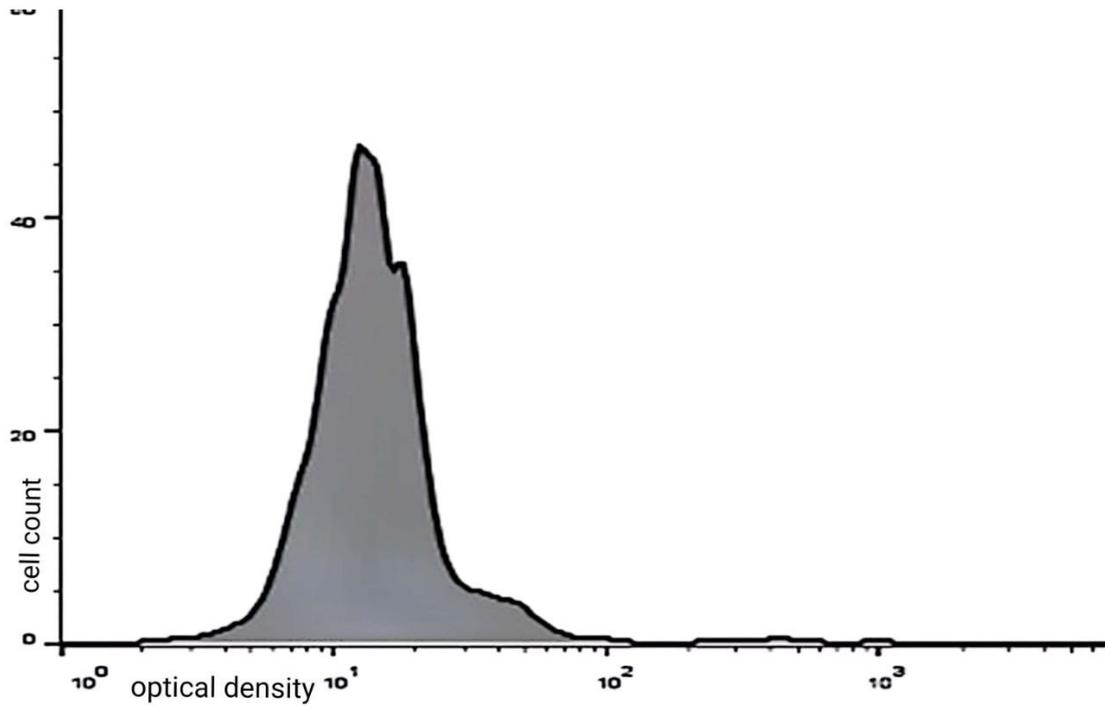
نسبة أنواع الأوكسجين التفاعلية ROS في الخلايا السرطانية من الخلايا الطبيعية ولكن ضمن حدود معينه تدعم بقائها و انتشارها لكن إذا تجاوزتها أدى ذلك إلى اجهاد في الخلية لا تستطيع التعامل معه الأمر الذي استخدم كآليه علاجية ضد السرطان (Shen et al., 2023). مثلا المضادات الحيوية ومضادات الإلتهاب غير الستيرويدية المحملة على المواد النانوية استحثت الإجهاد التأكسدي مما سبب ضرراً للحمض النووي فتحفز بروتين P53 والذي يعمل على تنشيط *Noxa* و *Puma* و يثبط الجينات المضادة للاستماتة (X. Liu et al., 2020) مما يؤثر على نفاذية غشاء الميتوكوندريا ويطلق السيتوكروم، أما الاسيتامينوفين يسبب تلف الحمض النووي DNA للخلايا السرطانية بواسطة منتج السام N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) الذي يرتبط ببروتينات سلسلة نقل الالكترن في الميتوكوندريا مما يسبب خلل وظيفي يؤدي إلى الإجهاد التأكسدي (Amiri et al. 2023). يعزز بروتين P53 الأستجابة للإجهاد التأكسدي مما يسبب زيادة في تكون ROS عن طريق تعزيز الفسفرة التأكسدية في الميتوكوندريا بواسطة جينات معينه (Nakamura and Takada, 2021 ; Capuozzo et al., 2022). وهذا ما تطابق مع نتائج الدراسة الحالية التي رصدت الزيادة في ROS بعد معاملة خلايا سرطان الكبد HepG2 بالكيتوسان المحمل بالعقاقير والذي أكد فعاليته في التسبب بالضرر واستحثاث الإجهاد التأكسدي.



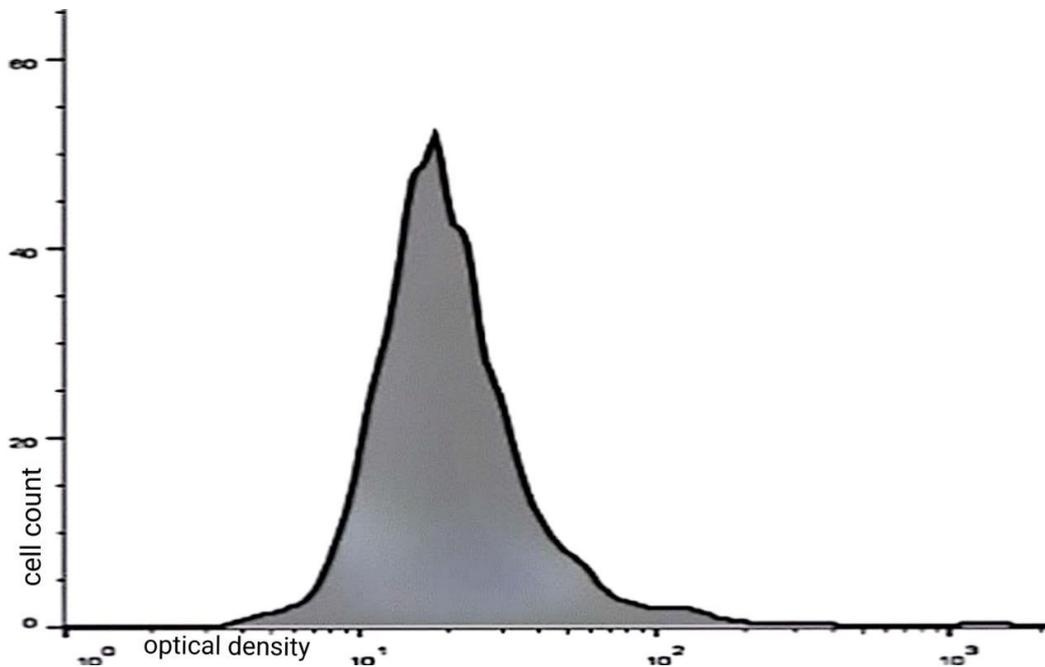
الشكل (4-20) أنواع الأوكسجين التفاعلية ROS في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 غير المعاملة بالأدوية النانوية



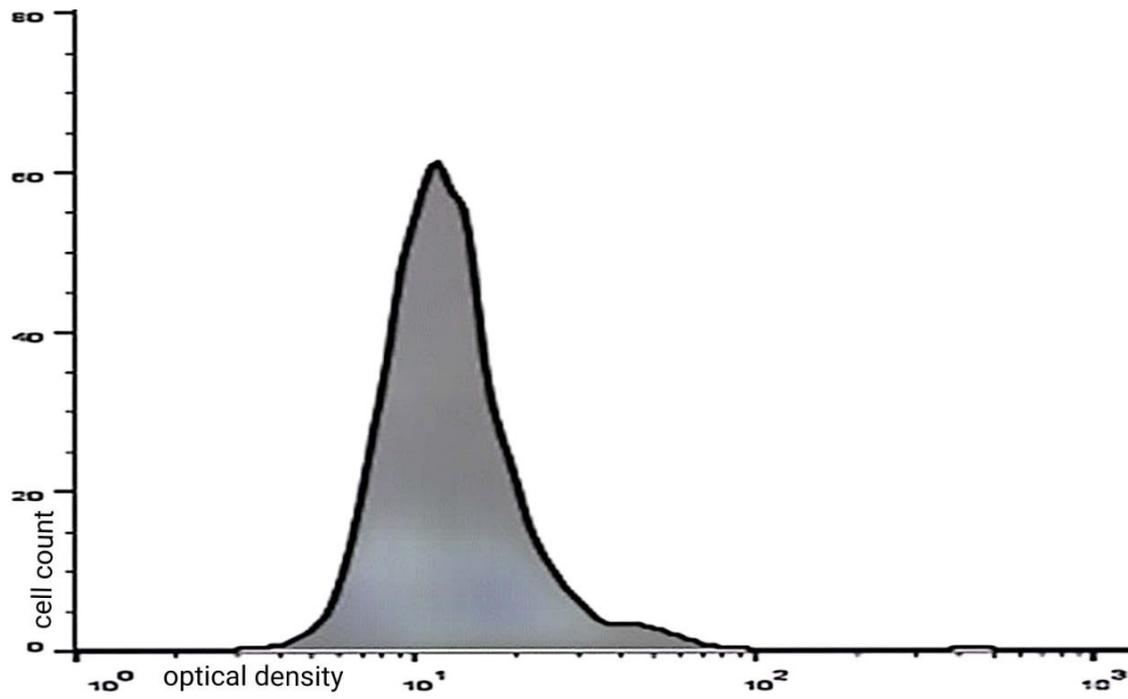
الشكل (4-21) أنواع الأوكسجين التفاعلية ROS في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 المعاملة بالامبسيلين-كيتوسان



الشكل (22-4) أنواع الأوكسجين التفاعلية ROS في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 المعاملة بالبراسيتيمول-كيتوسان



الشكل (23-4) أنواع الأوكسجين التفاعلية ROS في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 المعاملة بالميفانميك -كيتوسان



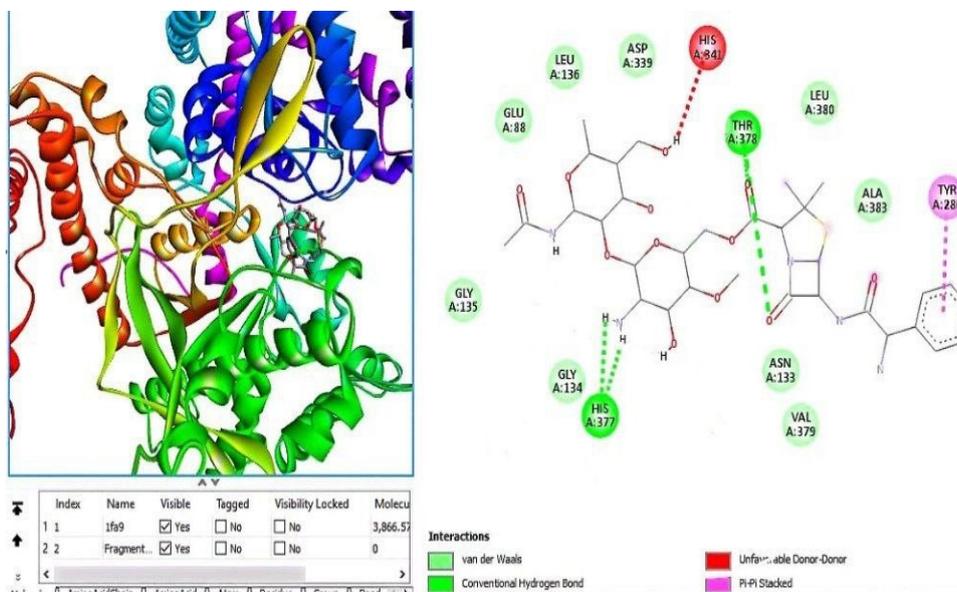
الشكل (4-24) أنواع الأوكسجين التفاعلية في خط خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 المعاملة بالسيفالكسين-كيتوسان

#### 7.4: الالتحام الجزيئي Docking Molecular

يبقى الحمض النووي الهدف الأساسي لأي دواء فمن أجل تنظيم التعبير الجيني ترتبط عوامل النسخ بمناطق معينة من الحمض النووي تدعى مجالات الربط، بمجرد ارتباطها تقوم بتجنيد بروتينات وعوامل تنظيمية أخرى لتغير نشاط جينات أخرى، بروتين P53 هو أحد عوامل النسخ التنظيمية التي ترتبط بتسلسلات محددة في الحمض النووي ومن خلالها ينظم دورة الخلية فهو يمتلك من 300 إلى 3000 موقع فعال على الجينوم البشري، في حالة السرطان الطفرة أدت إلى فقدان وظيفته فغيرت تسلسل الأحماض الامينية له و من ثم لا يستطيع الارتباط بالتسلسلات التكميلية له على الحمض النووي، بروتين الورم يتكون من عدة مجالات وظيفية تكون مستهدفة علاجياً بواسطة ارتباط العقار معها بأصره تساهمية أو فاندرالس وغيرها والتي عند إصلاح الطفرة فيها يستعيد وظيفته (Hu et al., 2021). وهذا ما تكشفه تقنية الالتحام الجزيئي فهي تتنبأ باتجاه الربط المفضل لأحد الجزيئين بالنسبة للآخرى عند ارتباطهما لتحديد موقع الربط المستهدف والذي يلعب دوراً مهماً في تصميم العلاج، أيضاً نوع الاواصر الي تم الارتباط بواسطتها مثل فاندرالس والتساهمية والهيدروجينية، الالتحام الجزيئي مبني في خطوتين الأولى تحديد موقع الربط الذي من خلاله يُنشط الجين ليمارس وظيفة محددة معتمدة على مكان

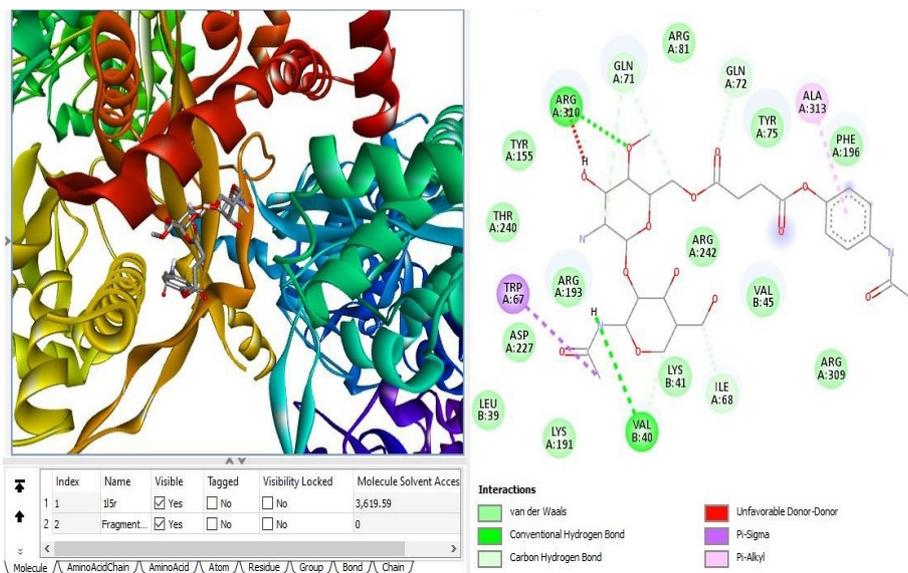
الربطة أما الخطوة الثانية هي تحديد تقارب الارتباط لما له من دور في إصلاح خلل الحمض النووي فكلما كانت قيمته السالبة أصغر كلما كان العقار فعالا اكثر (Chauhan and Kumar, 2022).

تقنية الالتحام الجزيئي تعتبر تقنية قوية للكشف عن فعالية العقار لان الوصول إلى الموقع النشط لهدف بيولوجي والارتباط به يعد مقياسا لنجاح الدواء (Rath et al., 2021; Asiamah et al., 2021). وهذا ما اتفق مع نتائج الالتحام الجزيئي التي حصلنا عليها بواسطة برنامج BIO VIA، والموضحه في الشكل (4-25) الذي يعود لعقار الامبسلين تبين ارتباطه بأصره هيدروجينية في الأحماض الامينية THR (A : 378) والهستيدين HIS (A : 377) الذي ارتبط بأصرتين، ايضاً تكونت رابطة بسبب التنافر في HIS (A : 341)، أما TYR (A : 280) كانت فيه Pi-Pi Stacked.



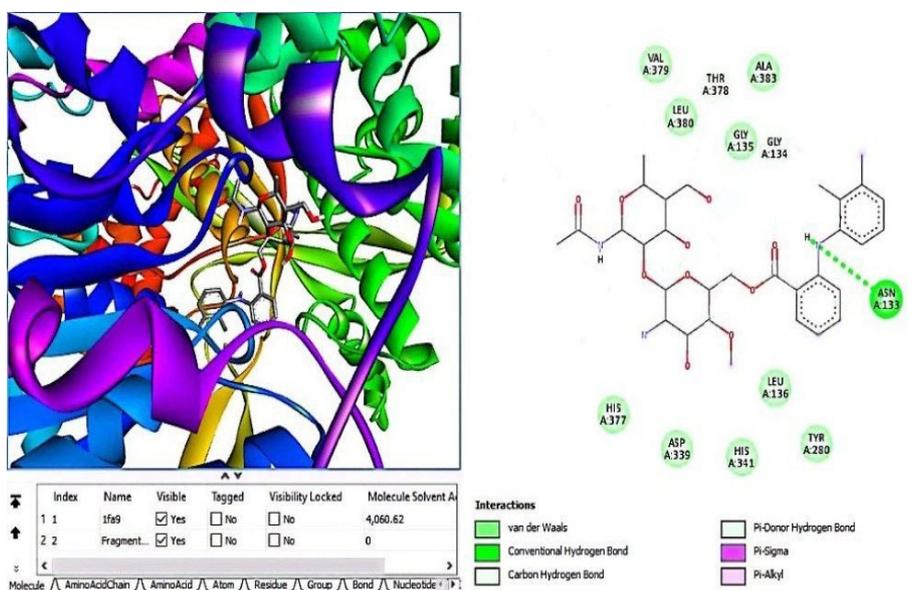
الشكل (4-25) الالتحام الجزيئي لعقار الامبسلين النانوي

أما الشكل (4-26) الالتحام الجزيئي لعقار الأسييتامينوفين النانوي إذ نلاحظ الأصرة الهيدروجينية في الأحماض الامينية ARG (A : 310) و VAL (B : 40) وظهرت رابطة الكيل في ALA (A : 313) و باني سيكما في TRP (A : 67).



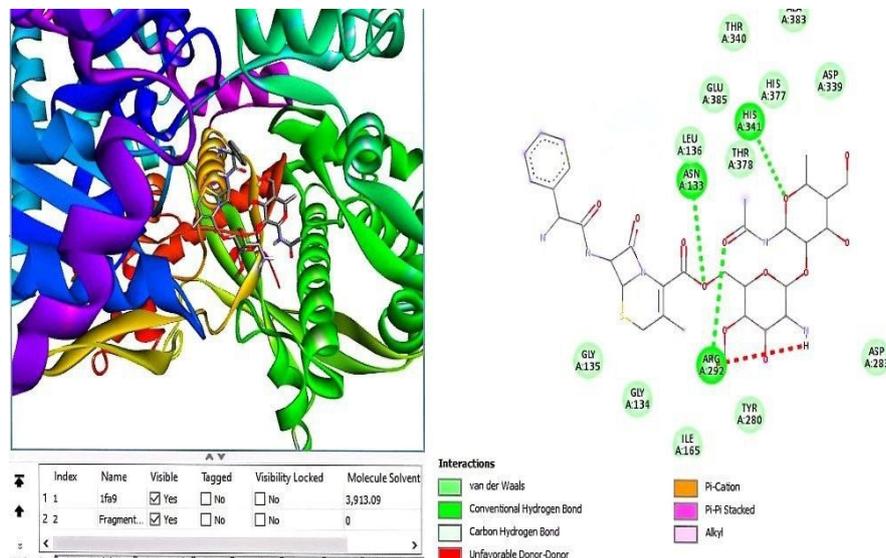
الشكل (4-26) الالتحام الجزيئي لعقار الاسيتامينوفين النانوي

في ما يخص الالتحام الجزيئي لعقار الميفانميك النانوي الموضح في الشكل (4-27)، ظهرت الأصرة التساهمية في الحمض الاميني ASN (A : 133).



الشكل (4-27) الالتحام الجزيئي لعقار الميفانميك النانوي

الشكل (4-28) لعقار السيفالكسين إذ مثل اللون الأخضر الغامق الأصرة الهيدروجينية في الأحماض الامينية (ARG (A: 292)، (ASN (A: 133)، (HIS (A: 341)، أما الأصرة باللون الأحمر التي تكونت بسبب التنافر، تعود ل (ARG (A: 292).



الشكل (4-28) الالتحام الجزيئي لعقار السيفالكسين النانوي

يتكون P53 هيكلية من أربعة مجالات وظيفية غالباً ما تحدث فيها الطفرة المسرطنة لذلك تكون مستهدفة في الربط من أجل إصلاح الخلل، مثلاً مجال ربط الحمض النووي الأساسي DBD، (101-306) الطفرة فيه تعطل الوظيفة القمعية لـ P53 وتوظفه للعمل لصالح السرطان بواسطة المنظم الأساسي له وهو MDM2 (Kumari et al., 2022). لذلك فإن ارتباط العقار في هذه المواقع يمكنه على استعادة دورة إيقاف دورة الخلية بواسطة التخلص من MDM2 هذا الجين الذي يدعم التقدم في دورة الخلية إذ يرتبط ببروتين الورم ويكون معقد معه مما يعطل وظيفته أيضاً هذا الارتباط من خلاله يوظف بروتين الورم للعمل كعامل نسخ لصالح الورم وذلك بالية التغذية الراجعة التنظيمية لأن زيادة تكون المعقد المذكور تؤدي إلى زيادة في مستويات P53 وبالنتيجة زيادة MDM2 التي تدعم تكاثر الخلايا السرطانية بواسطة موقع ارتباط العقار بالحمض النووي وإصلاح الخلل و من ثم منع تكون المعقد MDM2-P53 عن طريق اليوبكتين الذي يرتبط ب MDM2 مما يمنع ارتباطه بـ P53 ليتمكن من استعادة دوره التنظيمي و الارتباط بمستقبلاته على جينات إيقاف دورة الخلية، أيضاً التسلسلات من 325 إلى 393 تؤدي استعادة P53 لوظيفته بواسطة تعطيل Mdm2 (Gomes et al., 2021). وهذا ما اتفق

مع نتائج الدراسة الحالية إذ ظهر الارتباط في عقار السيفالوكسين في الموقعين (A: 292، A:133) والموقع (A: 280) للامبسلين ايضاً الموقع (A: 387) للميفانميك و (A: 377،378) للامبسلين.

ان مضادات الإلتهاب الغير ستيرويدية التي تثبط انتاج البروستوكلاندينات لها تأثير مضاد لسرطان الكبد على الرغم من أن هذه العقاقير لم تصمم لعلاج السرطان، لكنها تمارس نشاطها بواسطة آليتها المضادة لإنزيم COX-2، إذ تكون أواصر هيدروجينية في مواقع الربط الفعالة لتنشيط p53 الذي يفعل P21 ليثبط السيكلين كاينيز وبالتالي إيقاف النسخ الغير فعال لصالح الورم (Kahraman et al., 2022).

ايضاً مواقع الربط TAD (61-1) و DBD (96-292) لها أهمية في القضاء على الورم (Wang, H, et al., 2023) إذ اكدت هذه الدراسات النتائج التي حصلنا عليها فالعقاقير نجحت في أستعادة الوظيفة البيولوجية لـ p53 والقضاء على السرطان (Grande et al., 2021).

أن التقارب الجزيئي Binding affinity مصطلح يستخدم في البيولوجيا الجزيئية لوصف مدى قوة الارتباط بين بروتين p53 والعقار النانوي وهو أساسي لتصميم الأدوية التي ترتبط بأهدافها بشكل إنتقائي ومحدد من خلال التنبؤ بألفة الارتباط حيث ان العقار يرتبط مع البروتين في مناطق تدعى جيوب الارتباط (تجاويف او اخاديد موجودة على سطح البروتين) والتي من خلالها تثبط أو تنشط وظيفة محددة ويجب ان ترتبط بأحكام لأن قوة الارتباط مع البروتين المستهدف تحمي العقار من الارتباط مع البروتينات الأخرى وبالتالي تقليل الآثار الجانبية للدواء (Jarmoskaite et al., 2020). حيث ان Binding affinity تعمل كمفتاح ديناميكي وهمي يعزى الية قدرة العقار على التكيف مع مواقع الارتباط المستهدفة والتي تجعل من الصعب على المفتاح الارتباط بهياكل أخرى و عليه كلما كانت قيم Binding affinity صغيرة كلما كان تقارب الرابط عاليا (Desantis et al., 2022). وبالتالي ازدياد فعالية الدواء، لان جزيء العقار الذي يمتلك طاقة جزيئية عالية لن يكون قادراً على تغيير تكويناته بسهولة ليتناسب مع موقع الارتباط داخل البروتين (Vazquez et al.,2020). وهذا ما اتفق مع نتائج الدراسة الحالية للأدوية النانوية مع بروتينات الحمض النووي والتي قيمت اعتماداً على برنامج Pyrex و الموضحة في الجداول (2-4) لعقار الامبسلين، (3-4) لعقار الاسيتامينوفين، (4-4) لعقار الميفانميك، (5-4) لعقار السيفالوكسين إذ أن القيم ظهرت منخفضة.

الجدول (2-4) نتائج طاقة الارتباط لعقار الامبسلين

Ligand	Binding Affinity (kcal/mol)	Mode	RMSD lower bound	RMSD upper bound
1fa9_Fragment_uff_E=1640.42	-8.9	0	0.0	0.0
1fa9_Fragment_uff_E=1640.42	-8.6	1	2.775	6.206
1fa9_Fragment_uff_E=1640.42	-8.5	2	3.566	6.585
1fa9_Fragment_uff_E=1640.42	-8.4	3	3.134	6.679
1fa9_Fragment_uff_E=1640.42	-8.2	4	5.157	7.164
1fa9_Fragment_uff_E=1640.42	-8.1	5	3.939	9.842
1fa9_Fragment_uff_E=1640.42	-8.0	6	5.943	9.424
1fa9_Fragment_uff_E=1640.42	-7.8	7	5.101	8.293
1fa9_Fragment_uff_E=1640.42	-7.8	8	2.845	9.241

الجدول (3-4) نتائج طاقة الارتباط لعقار الاسيتامينوفين

Ligand	Binding Affinity (kcal/mol)	Mode	RMSD lower bound	RMSD upper bound
1l5r_Fragment_uff_E=645.79	-8.6	0	0.0	0.0
1l5r_Fragment_uff_E=645.79	-8.2	1	2.592	3.654
1l5r_Fragment_uff_E=645.79	-8.0	2	2.288	2.538
1l5r_Fragment_uff_E=645.79	-7.9	3	40.804	43.703
1l5r_Fragment_uff_E=645.79	-7.6	4	49.519	54.443
1l5r_Fragment_uff_E=645.79	-7.6	5	3.259	3.808
1l5r_Fragment_uff_E=645.79	-7.6	6	32.693	35.317
1l5r_Fragment_uff_E=645.79	-7.6	7	34.467	37.552
1l5r_Fragment_uff_E=645.79	-7.4	8	48.749	54.223

الجدول (4-4) نتائج طاقة الارتباط لعقار الميفانميك

Ligand	Binding Affinity (kcal/mol)	Mode	RMSD lower bound	RMSD upper bound
1fa9_Fragment_uff_E=936.07	-9.6	0	0.0	0.0
1fa9_Fragment_uff_E=936.07	-9.6	1	2.634	5.562
1fa9_Fragment_uff_E=936.07	-9.4	2	3.455	10.292
1fa9_Fragment_uff_E=936.07	-9.4	3	3.886	6.178
1fa9_Fragment_uff_E=936.07	-9.2	4	2.487	4.67
1fa9_Fragment_uff_E=936.07	-9.1	5	3.941	10.058
1fa9_Fragment_uff_E=936.07	-9.0	6	2.392	3.566
1fa9_Fragment_uff_E=936.07	-9.0	7	3.609	6.228
1fa9_Fragment_uff_E=936.07	-9.0	8	3.121	9.201

الجدول (5-4) نتائج طاقة الارتباط لعقار السيفالكسين

Ligand	Binding Affinity (kcal/mol)	Mode	RMSD lower bound	RMSD upper bound
1fa9_Fragment_uff_E=1613.60	-9.0	0	0.0	0.0
1fa9_Fragment_uff_E=1613.60	-8.6	1	2.995	7.737
1fa9_Fragment_uff_E=1613.60	-8.4	2	2.889	7.735
1fa9_Fragment_uff_E=1613.60	-8.3	3	1.407	2.907
1fa9_Fragment_uff_E=1613.60	-7.5	4	2.441	5.702
1fa9_Fragment_uff_E=1613.60	-7.4	5	3.092	7.716
1fa9_Fragment_uff_E=1613.60	-7.4	6	2.381	6.139
1fa9_Fragment_uff_E=1613.60	-7.4	7	2.388	6.556
1fa9_Fragment_uff_E=1613.60	-7.3	8	3.031	7.998

الفصل الخامس

الاستنتاجات والتوصيات

**Conclusions**

**and**

**Recommendations**

## 5- الاستنتاجات Conclusions

في ضوء النتائج التي حصلنا عليها:

1. الكيتوسان النانوي حَسَّنَ الخصائص العلاجية للعقاقير القديمة و الموافق عليها مسبقاً والتي شملت كلٍ من (الامبسلين، الالسيتامينوفين، حمض الميفانميك، السيفالكسين) مما يبشر بالآثار التآزرية في تحقيق علاجات أكثر فعالية ضد سرطان الكبد.
2. أظهرت العقاقير المحملة على الكيتوسان النانوي تأثيرات فعالة ادت إلى القضاء على سرطان الخلايا الكبدية وذلك بالاعتماد على زيادة التركيز.
3. ان الأدوية النانوية سببت ضرراً في الخلايا السرطانية وحدثت تغيرات مورفولوجية فيها بدأت بتلف أغشيتها وتفتت النوية وتجزئة حمضها النووي.
4. ان الكيتوسان المحمل بالعقاقير نشط جين *TP53* فازداد تعبيره الجيني في مجموعة خلايا سرطان الكبد البشري HepG2 المعاملة بالعقاقير مقارنة مع مجموعة السيطرة.
5. استحثت العقاقير المحملة على الكيتوسان النانوي الأجهاد التأكسدي في خط خلايا سرطان الكبد HepG2 من خلال تكوين كميات كبيرة من أنواع الأوكسجين التفاعلية ROS والذي أدى إلى وتلف غشاء الميتوكوندريا وتفعيل الموت المبرمج.
6. ارتبطت الأدوية في الموقع النشط ل *p53* وتفعيل مسار الموت المبرمج الداخلي للميتوكوندريا بواسطة أنزيمات الكاسباز Caspase.

## التوصيات Recommendations

- 1- اختبار جينات أخرى أكثر ارتباطاً بسرطان الكبد غير جين *TP53* لمعرفة مدى تأثير الكيتوسان المحمل بالعقاقير في تنشيطها والقضاء على الخلايا السرطانية .
- 2- استخدام مواد نانوية أخرى لتحميل الأدوية عليها أو تجربة ادوية أخرى لكشف مدى فعاليتها في تنشيط بروتين *p53*.
- 3- دراسة الأدوية في خطوط خلايا سرطانية أخرى.
- 4- اجراء التجربة في الجسم الحي للتحقق من كفاءة الكيتوسان في توصيل الدواء والتأكد من أنه لا يظهر أي سمية دموية .

الفصل السادس

المصادر

**Chapter Six**

**References**

## References

- Abbas, Z. S., Sulaiman, G. M., Jabir, M. S., Mohammed, S. A., Khan, R. A., & Mohammed, H. A. (2021). Galangin/ $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complex as a Drug-Delivery System for Improved Solubility and Biocompatibility in Breast Cancer Treatment. *Molecules*, 27(14), 4521. <https://doi.org/10.3390/molecules27144521>
- Abuetabh, Y., Wu, H. H., Chai, C., Al Yousef, H., Persad, S., Sergi, C. M., & Leng, R. (2022). DNA damage response revisited: the p53 family and its regulators provide endless cancer therapy opportunities. In *Experimental and Molecular Medicine* (Vol. 54, Issue 10). <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00863-4>
- Alexandrov, L. B., Kim, J., Haradhvala, N. J., Huang, M. N., Tian Ng, A. W., Wu, Y., Boot, A., Covington, K. R., Gordenin, D. A., Bergstrom, E. N., Islam, S. M. A., Lopez-Bigas, N., Klimczak, L. J., McPherson, J. R., Morganella, S., Sabarinathan, R., Wheeler, D. A., Mustonen, V., Alexandrov, L. B., ... von Mering, C. (2020). The repertoire of mutational signatures in human cancer. *Nature*, 578(7793), 94–101. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1943-3>
- Al-Musawi, S., Albukhaty, S., Al-Karagoly, H., Sulaiman, G. M., Jabir, M. S., & Naderi-Manesh, H. (2020). Dextran-coated superparamagnetic nanoparticles modified with folate for targeted drug delivery of camptothecin. In *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* (Vol. 11, Issue 4). <https://doi.org/10.1088/2043-6254/abc75b>
- Al-Salman, H. N. K., Ali, E. T., Jabir, M., Sulaiman, G. M., & Al-Jadaan, S. A. S. (2020). 2-Benzhydrylsulfinyl-N-hydroxyacetamide-Na extracted from fig as a novel cytotoxic and apoptosis inducer in SKOV-3 and AMJ-13 cell lines via P53 and caspase-8 pathway. In *European Food Research and Technology* (Vol. 246, Issue 8, pp. 1591–1608). <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03515-x>

- Al-Senosy, N. K., Ebeed, N. M., Salem, L. M., Girgis, S. M., & Ahmad, E. S. (2021). The anticancer activity of artemisia judaica crude extract in human hepatocellular carcinoma hepg2 cells by induction of apoptosis and cell cycle arrest. *International Journal of Current Research and Review*, 13(7). <https://doi.org/10.31782/IJCRR.2021.13732>
- Argenzio, E., & Klimmeck, D. (2021). On the molecular, cellular and tissue origin of cancer. *The EMBO Journal*, 40(17). <https://doi.org/10.15252/emboj.2021109115>
- Al-Ziaydi, A. G., Al-Shammari, A. M., Hamzah, M. I., Kadhim, H. S., & Jabir, M. S. (2020). Hexokinase inhibition using D-Mannoheptulose enhances oncolytic newcastle disease virus-mediated killing of breast cancer cells. In *Cancer Cell International* (Vol. 20, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01514-2>
- Amiri, S., Pashizeh, F., Moeinabadi-Bidgoli, K., Eyvazi, Y., Akbari, T., Salehi Moghaddam, Z., Eskandarisani, M., Farahmand, F., Hafezi, Y., Nouri Jevinani, H., Seif, M., Mousavi- Niri, N., Chiani, M., & Tavakkoli Yarak, M. (2023). Co-encapsulation of hydrophilic and hydrophobic drugs into niosomal nanocarrier for enhanced breast cancer therapy: In silico and in vitro studies. *Environmental Research*, 239. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117292>
- Anwanwan, D., Singh, S. K., Singh, S., Saikam, V., & Singh, R. (2020). Challenges in liver cancer and possible treatment approaches. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1873(1), 188314. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.188314>
- Asiamah, S. A. Obiri, W. Tamekloe, F. A. Armah, L. S. Borquaye, Applications of molecular docking in natural products-based drug discovery. *Scientific African*. 20 (2023) <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e0159>
- Bahaa Karim AL-Ghanimi Zainab Nizar Jawad Mohammad N. Al-Baiati. (2023). STUDY OF THE EFFECTIVE RANGE OF DRUG LEVEL USING A NANO CHITOSAN-MEFENAMIC ACID.

- Baharlouei, P., & Rahman, A. (2022). Chitin and Chitosan: Prospective Biomedical Applications in Drug Delivery, Cancer Treatment, and Wound Healing. In *Marine Drugs* (Vol. 20, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/md20070460>
- Bakker, M. J., Sørensen, H. V., & Skepö, M. (2024). Exploring the Role of Globular Domain Locations on an Intrinsically Disordered Region of p53: A Molecular Dynamics Investigation. *Journal of Chemical Theory and Computation*. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.3c00971>
- Bang, J., Jun, M., Lee, S., Moon, H., & Ro, S. W. (2023). Targeting EGFR/PI3K/AKT/mTOR Signaling in Hepatocellular Carcinoma. In *Pharmaceutics* (Vol.15, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15082130>
- Bazira, P. J. (2023, June 1). Anatomy of the liver. *Surgery* (United Kingdom). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2023.02.024>
- Berasain, C., Arechederra, M., Argemí, J., Fernández-Barrena, M. G., & Avila, M. A. (2023, February 1). Loss of liver function in chronic liver disease: An identity crisis. *Journal of Hepatology*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.09.001>
- Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005, September 28). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7)
- Bonferoni, M. C., Gavini, E., Rassu, G., Maestri, M., & Giunchedi, P. (2020). Chitosan Nanoparticles for Therapy and Theranostics of Hepatocellular Carcinoma (HCC) and Liver-Targeting. *Nanomaterials*, 10(5), 870. <https://doi.org/10.3390/nano10050870>
- Boutry, J., Tissot, S., Ujvari, B., Capp, J. P., Giraudeau, M., Nedelcu, A. M., & Thomas, F. (2022). The evolution and ecology of benign tumors. In *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (Vol. 1877, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188643>

- Burgos, R., Garcia-Ramallo, E., Shaw, D., Lluch-Senar, M., & Serrano, L. (2023). Development of a Serum-Free Medium To Aid Large-Scale Production of Mycoplasma -Based Therapies . In *Microbiology Spectrum* (Vol. 11, Issue 3). <https://doi.org/10.1128/spectrum.04859-22>
- Capuozzo, M., Santorsola, M., Bocchetti, M., Perri, F., Cascella, M., Granata, V., Celotto, V., Gualillo, O., Cossu, A. M., Nasti, G., Caraglia, M., & Ottaiano, A. (2022). p53: From Fundamental Biology to Clinical Applications in Cancer. In *Biology* (Vol. 11, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/biology11091325>
- Carlsson, M. J., Vollmer, A. S., Demuth, P., Heylmann, D., Reich, D., Quarz, C., Rasenberger, B., Nikolova, T., Hofmann, T. G., Christmann, M., Fuhlbrueck, J. A., Stegmüller, S., Richling, E., Cartus, A. T., & Fahrner, J. (2022). p53 triggers mitochondrial apoptosis following DNA damage-dependent replication stress by the hepatotoxin methyleugenol. *Cell Death and Disease*, 13(11). <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05446-9>
- Ceberio, M. R., & Berardino, B. G. (2023). Context, human being and epigenetics. *Interdisciplinaria*, 40(1), 81–97. <https://doi.org/10.16888/interd.2023.40.1.5>
- Chauhan, K., & Kumar, K. (2022). Molecular Docking of Medicinal plants Compounds as New Potential Inhibitors of Novel Coronavirus. *International Journal of Innovative Research in Science Engineering and Technology* 2022, 3(5).
- Chelliah, R., & Oh, D.-H. (2022). Screening for Anticancer Activity: Dual Staining Method (pp. 427–429). [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1\\_55](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1_55)
- Chen, L., Wei, X., Gu, D., Xu, Y., & Zhou, H. (2023). Human liver cancer organoids: Biological applications, current challenges, and prospects in hepatoma therapy. In *Cancer Letters* (Vol. 555). <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2022.216048>

- Chen, X., Zhang, T., Su, W., Dou, Z., Zhao, D., Jin, X., Lei, H., Wang, J., Xie, X., Cheng, B., Li, Q., Zhang, H., & Di, C. (2022). Mutant p53 in cancer: from molecular mechanism to therapeutic modulation. In *Cell Death and Disease* (Vol. 13, Issue 11). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05408-1>
- Chen, Z., Ding, C., Gu, Y., He, Y., Chen, B., Zheng, S., & Li, Q. (2023). Association between gut microbiota and hepatocellular carcinoma from 2011 to 2022: Bibliometric analysis and global trends. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 13). <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1120515>
- Cordani, M., Butera, G., Pacchiana, R., Masetto, F., Mullappilly, N., Riganti, C., & Donadelli, M. (2020). Mutant p53-associated molecular mechanisms of ROS regulation in cancer cells. In *Biomolecules* (Vol. 10, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/biom10030361>
- Danylova, T. V., & Komisarenko, S. V. (2020). Standing on the shoulders of giants: James watson, francis crick, maurice wilkins, rosalind franklin and the birth of molecular biology. *Ukrainian Biochemical Journal*, 92(4), 154–165. <https://doi.org/10.15407/ubj92.04.154>
- Debela, D. T., Muzazu, S. G. Y., Heraro, K. D., Ndalama, M. T., Mesele, B. W., Haile, D. C., Kitui, S. K., & Manyazewal, T. (2021). New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. In *SAGE Open Medicine* (Vol. 9). <https://doi.org/10.1177/20503121211034366>
- Deo, S. V. S., Sharma, J., & Kumar, S. (2022). GLOBOCAN 2020 Report on Global Cancer Burden: Challenges and Opportunities for Surgical Oncologists. In *Annals of Surgical Oncology*. <https://doi.org/10.1245/s10434-022-12151-6>
- Desantis, F., Miotto, M., Di Rienzo, L., Milanetti, E., & Ruocco, G. (2022). Spatial organization of hydrophobic and charged residues affects protein thermal stability and binding affinity. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16338-5>

- Davalos, V., & Esteller, M. (2023). Cancer epigenetics in clinical practice. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 73(4). <https://doi.org/10.3322/caac.21765>
- Duan, Z. L., Han, W. H., Yan, L., & Wu, B. (2020). Reference gene selections for real time quantitative PCR analysis of gene expression in different oat tissues and under salt stress. *Biologia plantarum*, 64(1).
- Fan, P., Ma, Z., Partow, A. J., Kim, M., Shoemaker, G. M., Tan, R., Tong, Z., Nelson, C. D., Jang, Y., & Jeong, K. C. (2022). A novel combination therapy for multidrug resistant pathogens using chitosan nanoparticles loaded with  $\beta$ -lactam antibiotics and  $\beta$ -lactamase inhibitors. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 195, pp. 506–514). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.035>
- Fawaz, S., Merzouk, M., Barton, S., & Nabhani-Gebara, S. (2021). Stability of amoxicillin and clavulanic acid in separate containers for administration via a y-site. In *Drug Design, Development and Therapy* (Vol. 15, pp. 3979–3984). <https://doi.org/10.2147/DDDT.S310418>
- Gao, Y., Shang, Q., Li, W., Guo, W., Stojadinovic, A., Mannion, C., Man, Y. G., & Chen, T. (2020). Antibiotics for cancer treatment: A double-edged sword. In *Journal of Cancer* (Vol. 11, Issue 17, pp. 5135–5149). <https://doi.org/10.7150/jca.47470>
- Gawronska, M., Kowalik, M., & Makowski, M. (2022). Recent advances in medicinal chemistry of ampicillin: Derivatives, metal complexes, and sensing approaches. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 155). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116691>
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>

- Gomes, A. S., Ramos, H., Inga, A., Sousa, E., & Saraiva, L. (2021). Structural and drug targeting insights on mutant p53. In *Cancers* (Vol. 13, Issue 13). <https://doi.org/10.3390/cancers13133344>
- Gomzikova, M. O., James, V., & Rizvanov, A. A. (2021). Mitochondria Donation by Mesenchymal Stem Cells: Current Understanding and Mitochondria Transplantation Strategies. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 9). <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.653322>
- Gong, Z., Yu, J., Yang, S., Lai, P. B. S., & Chen, G. G. (2020). FOX transcription factor family in hepatocellular carcinoma. In *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (Vol. 1874, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188376>
- Grande, F., Giordano, F., Occhiuzzi, M. A., Rocca, C., Ioele, G., De Luca, M., Ragno, G., Panno, M. L., Rizzuti, B., & Garofalo, A. (2021). Toward multitasking pharmacological COX-targeting agents: Non-steroidal anti-inflammatory prodrugs with antiproliferative effects. *Molecules*, 26(13). <https://doi.org/10.3390/molecules2613394>
- Habbane, M., Montoya, J., Rhouda, T., Sbaoui, Y., Radallah, D., & Emperador, S. (2021). Human mitochondrial DNA: Particularities and diseases. In *Biomedicines* (Vol. 9, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9101364>
- Han, C., Yu, T., Qin, W., Liao, X., Huang, J., Liu, Z., Yu, L., Liu, X., Chen, Z., Yang, C., Wang, X., Mo, S., Zhu, G., Su, H., Li, J., Qin, X., Gui, Y., Mo, Z., Li, L., & Peng, T. (2020). Genome-wide association study of the TP53 R249S mutation in hepatocellular carcinoma with aflatoxin B1 exposure and infection with hepatitis B virus. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 11(6). <https://doi.org/10.21037/JGO-20-510>

- Han, S. K., Baik, S. K., & Kim, M. Y. (2023). Non-alcoholic fatty liver disease: Definition and subtypes. In *Clinical and Molecular Hepatology* (Vol. 29). <https://doi.org/10.3350/cmh.2022.0424>
- Hanselmann, R. G., & Welter, C. (2022). Origin of Cancer: Cell work is the Key to Understanding Cancer Initiation and Progression. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.787995>
- Harakeh, S., Al-Raddadi, R., Alamri, T., Al-Jaouni, S., Qari, M., Qari, Y., Kumar, A., Tashkandi, H. M., Moulay, M., Aldahlawi, A. M., Slama, P., & Haque, S. (2023). Apoptosis induction in human hepatoma cell line HepG2 cells by trans- Anethole via activation of mitochondria-mediated apoptotic pathways. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 165. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115236>
- Hart, S. N., Polley, E. C., Yussuf, A., Yadav, S., Goldgar, D. E., Hu, C., LaDuca, H., Smith, L. P., Fujimoto, J., Li, S., Couch, F. J., & Dolinsky, J. S. (2020). Mutation prevalence tables for hereditary cancer derived from multigene panel testing. *Human Mutation*, 41(8), e1–e6. <https://doi.org/10.1002/humu.24053>
- Hernandez Borrero, L. J., & El-Deiry, W. S. (2021). Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting. In *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (Vol. 1876, Issue 1). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188556>
- Hernandez Borrero, L. J., & El-Deiry, W. S. (2021, August 1). Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188556>
- Hernandez, C. L. (2023). Mitochondrial DNA in Human Diversity and Health: From the Golden Age to the Omics Era. In *Genes* (Vol. 14, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/genes14081534>

- Hernandez, C. L. (2023). Mitochondrial DNA in Human Diversity and Health: From the Golden Age to the Omics Era. In *Genes* (Vol. 14, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/genes14081534>
- Herrera-Lopez, E. E., Guerrero-Escalera, D., Aguirre-Maldonado, I., Lopez-Hernández, A., Montero, H., Gutiérrez-Nava, M. A., del Pozo-Yauner, L., Arellanes-Robledo, J., Camacho, J., & Pérez-Carreón, J. I. (2023). Annexins A2 and A5 are potential early biomarkers of hepatocarcinogenesis. *Scientific Reports*, *13*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34117-8>
- Hilițanu, L. N., Mititelu-Tarțău, L., Popa, E. G., Bucă, B. R., Gurzu, I. L., Fotache, P. A., Pelin, A. M., Pricop, D. A., & Pavel, L. L. (2024). Chitosan Soft Matter Vesicles Loaded with Acetaminophen as Promising Systems for Modified Drug Release. *Molecules*, *29*(1). <https://doi.org/10.3390/molecules29010057>
- Hojati, T., Pashapour, S., Almasirad, A., & Mousavi, Z. (2023). The cytotoxic activity evaluation of an arylhydrazone derivative of mefenamic acid on HEPG2 liver cancer cells and normal gingival HGF cells. In *Gene Reports* (p. 101810). <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2023.101810>
- Hu, J., Cao, J., Topatana, W., Juengpanich, S., Li, S., Zhang, B., Shen, J., Cai, L., Cai, X., & Chen, M. (2021). Targeting mutant p53 for cancer therapy: direct and indirect strategies. In *Journal of Hematology and Oncology* (Vol. 14, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01169-0>
- Huo, Y., Cao, K., Kou, B., Chai, M., Dou, S., Chen, D., Shi, Y., & Liu, X. (2023). TP53 BP2: Roles in suppressing tumorigenesis and therapeutic opportunities. In *Genes and Diseases* (Vol. 10, Issue 5, pp. 1982–1993). <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.08.014>

Ibrahim, Abeer A., et al. "Pt (II)-thiocarbohydrazone complex as cytotoxic agent and apoptosis inducer in Caov-3 and HT-29 Cells through the P53 and caspase-8 pathways." *Pharmaceuticals* 14.6 (2021): 509.

Iuliano, S., Senn, L., Moi, L., Muller, Y. D., Ribí, C., Buss, G., & Comte, D. (2022). Management of Beta-Lactam Antibiotics Allergy: A Real-Life Study. *Frontiers in Allergy*, 3. <https://doi.org/10.3389/falgy.2022.853587>

J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2024). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.who.int/today>,

J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2024). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.who.int/today>,

Jarmoskaite, I., Alsadhan, I., Vaidyanathan, P. P., & Herschlag, D. (2020). How to measure and evaluate binding affinities. *ELife*, 9, 1–34. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.57264>

Jawad, M. H., Jabir, M. S., Ozturk, K., Sulaiman, G. M., Abomughaid, M. M., Albukhaty, S., Al-kuraishy, H. M., Al-Gareeb, A. I., Al-Azzawi, W. K., Najm, M. A. A., & Jawad, S. F. (2023). Induction of apoptosis and autophagy via regulation of AKT and JNK mitogen-activated protein kinase pathways in breast cancer cell lines exposed to gold nanoparticles loaded with TNF- $\alpha$  and combined with doxorubicin. *Nanotechnology Reviews*, 12(1). <https://doi.org/10.1515/ntrev-2023-0148>

- Jawad, Z. N. (2023). Molecular detection of caspase 3, 8, 9 genes and ADIPOR1 (rs2275738) polymorphism in colorectal cancer. *Applied Nanoscience (Switzerland)*, 13(8), 5365–5368. <https://doi.org/10.1007/s13204-023-02879-2>
- Jezek, J., Cooper, K. F., & Strich, R. (2021). Review the impact of mitochondrial fission-stimulated ros production on pro-apoptotic chemotherapy. In *Biology* (Vol. 10, Issue 1, pp. 1–20). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biology10010033>
- Jezek, J., Cooper, K. F., & Strich, R. (2021). Review the impact of mitochondrial fission-stimulated ros production on pro-apoptotic chemotherapy. In *Biology* (Vol. 10, Issue 1, pp. 1–20). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biology10010033>
- Jihad, M. A., Noori, F. T. M., Jabir, M. S., Albukhaty, S., AlMalki, F. A., & Alyamani, A. A. (2021). Polyethylene Glycol Functionalized Graphene Oxide Nanoparticles Loaded with *Nigella sativa* Extract: A Smart Antibacterial Therapeutic Drug Delivery System. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(11), 3067. <https://doi.org/10.3390/molecules26113067>
- Jimenez-Gomez, C. P., & Cecilia, J. A. (2020). Chitosan: A Natural Biopolymer with a Wide and Varied Range of Applications. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 17). <https://doi.org/10.3390/molecules25173981>
- Jin, B., Du, S., Mao, Y., & Sang, X. (2022). Interpretation on the Updated Points of Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Primary Liver Cancer (2022 Edition). *Medical Journal of Peking Union Medical College Hospital*, 13(5). <https://doi.org/10.12290/xhyxzz.2022-0274>
- Junyaprasert, V. B., & Thummarati, P. (2023). Innovative Design of Targeted Nanoparticles: Polymer–Drug Conjugates for Enhanced Cancer Therapy. *Pharmaceutics*, 15(9), 2216. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092216>

- Kahraman, D. C., Bilget Guven, E., Aytac, P. S., Aykut, G., Tozkoparan, B., & Cetin Atalay, R. (2022). A new triazolothiadiazine derivative inhibits stemness and induces cell death in HCC by oxidative stress dependent JNK pathway activation. In *Scientific Reports* (Vol. 12, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17444-0>
- Kanan, M., Atif, S., Mohammed, F., Balahmar, Y., Adawi, Y., AlSaleem, R., Farhan, A., Alghoribi, M., Mohammed, S., Alshanbari, R., Fahad, M., Kallab, R., Mohammed, R., Alassaf, D., & Hazza, A. (2023). A Systematic Review on the Clinical Pharmacokinetics of Cephalexin in Healthy and Diseased Populations. *Antibiotics*, 12(9), 1402. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12091402>
- Kasper, S. P. (2016). The Processes. In *Latent Print Processing Guide* (pp. 49–167). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803507-8.00005-5>
- Kaur, M., Cohen, Y., Poverenov, E., & Eltzov, E. (2022). Synergistic antimicrobial effect of the combination of beta-lactam antibiotics and chitosan derivative on multidrug-resistant bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 223, 1107–1114. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.132>
- Khashan, K. S.; Abdulameer, F. A.; Jabir, M. S.; Hadi, A. A. and Sulaiman, G. M. (2020). Anticancer activity and toxicity of carbon nanoparticles produced by pulsed laser ablation of graphite in water. *Advances in Natural Sciences and Nanoscience Nanotechnology*, 11(3), 035010.
- Kirtonia, A., Gala, K., Fernandes, S. G., Pandya, G., Pandey, A. K., Sethi, G., Khattar, E., & Garg, M. (2021). Repurposing of drugs: An attractive pharmacological strategy for cancer therapeutics. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 68, pp. 258–278). <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.04.006>

- Kolawole, Oluwafunke R., and Khosrow Kashfi. 2022. "NSAIDs and Cancer Resolution: New Paradigms beyond Cyclooxygenase" *International Journal of Molecular Sciences* 23, no. 3: 1432. <https://doi.org/10.3390/ijms23031432>
- Kontomanolis, E. N., Koutras, A., Syllaios, A., Schizas, D., Mastoraki, A., Garmpis, N., Diakosavvas, M., Angelou, K., Tsatsaris, G., Pagkalos, A., Ntounis, T., & Fasoulakis, Z. (2020). Role of oncogenes and tumor-suppressor genes in carcinogenesis: A review. In *Anticancer Research* (Vol. 40, Issue 11, pp. 6009–6015). International Institute of Anticancer Research. <https://doi.org/10.21873/anticanres.14622>
- Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., & Zdunek, A. (2022). FT-IR and FT-Raman fingerprints of flavonoids – A review. In *Food Chemistry* (Vol. 393). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133430>
- Kumar A, Sharipov M, Turaev A, Azizov S, Azizov I, Makhado E, Rahdar A, Kumar D, Pandey S. Polymer-Based Hybrid Nanoarchitectures for Cancer Therapy Applications. *Polymers*. 2022; 14(15):3027
- Kurt, A., Shakir, F., & Yonar, T. (2023). The effect of various parameters on electrochemical removal of ampicillin with Sn/Sb/NiTi anodes. *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 38(2),1141–1151. <https://doi.org/10.17341/gazimmfd.1011142>
- Liu, C., & Long, S. (2023). 4-Methyl-2-(2-methylanilino) benzoic acid. *IUCr Data*, 8(Pt 7). <https://doi.org/10.1107/S2414314623005990>
- Liu, X., Fan, L., Lu, C., Yin, S., & Hu, H. (2020). Functional Role of p53 in the Regulation of Chemical-Induced Oxidative Stress. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2020). <https://doi.org/10.1155/2020/6039769>

- Liu, Y. Bin, & Chen, M. K. (2022). Epidemiology of liver cirrhosis and associated complications: Current knowledge and future directions. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 28, Issue 41). <https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i41.5910>
- Liyanage, T. D., Nikapitiya, C., & De Zoysa, M. (2024). Chitosan nanoparticles-based in vivo delivery of miR-155 modulates the Viral haemorrhagic septicaemia virus-induced antiviral immune responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish and Shellfish Immunology*, 144. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.109234>
- Lugari, S., Baldelli, E., & Lonardo, A. (2023). Metabolic primary liver cancer in adults: risk factors and pathogenic mechanisms. In *Metabolism and Target Organ Damage* (Vol. 3, Issue 1). <https://doi.org/10.20517/mtod.2022.38>
- Ly, E., Kugel, J. F., & Goodrich, J. A. (2020). Single molecule studies reveal that p53 tetramers dynamically bind response elements containing one or two half sites. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73234-6>
- Magklaras, A. D. C., Banti, C. N., & Hadjidakou, S. K. (2023). Antiproliferative Activity of Antibiotics through DNA Binding Mechanism: Evaluation and Molecular Docking Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3). <https://doi.org/10.3390/ijms24032563>
- Malhotra, L., Singh, A., Kaur, P., Ethayathulla, A. S., Samath, A., & Additional, E. (2023). Phenotypical mapping of TP53 unique missense mutations spectrum in human cancers. *BioRxiv*, 2023.02.06.527255. Retrieved from <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.02.06.527255v1>

- Manimaran, D., Elangovan, N., Mani, P., Subramanian, K., Ali, D., Alarifi, S., Palanisamy, C. P., Zhang, H., Rangasamy, K., Palanisamy, V., Mani, R., Govarthanan, K., Aruni, W., Shanmugam, R., Srinivasan, G. P., & Kalirajan, A. (2022). Isolongifolene-loaded chitosan nanoparticles synthesis and characterization for cancer treatment. In *Scientific Reports* (Vol. 12, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23386-4>
- Moon, H., & Ro, S. W. (2021). MAPK/ERK Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*, 13(12), 3026. <https://doi.org/10.3390/cancers13123026>
- Moon, J., Kitty, I., Renata, K., Qin, S., Zhao, F., & Kim, W. (2023). DNA Damage and Its Role in Cancer Therapeutics. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms24054741>
- Morana, O., Wood, W., & Gregory, C. D. (2022, February 1). The Apoptosis Paradox in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23031328>
- Moreno-Gonzalez, M., & Beraza, N. (2021, May 2). The role of the microbiome in liver cancer. *Cancers*. MDPI. <https://doi.org/10.3390/cancers13102330>
- Murei, A., Ayinde, W. B., Gitari, M. W., & Samie, A. (2020). Functionalization and antimicrobial evaluation of ampicillin, penicillin and vancomycin with *Pyrenacantha grandiflora* Baill and silver nanoparticles. In *Scientific Reports*
- Nakamura, H., & Takada, K. (2021). Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions. In *Cancer Science* (Vol. 112, Issue 10, pp. 3945–3952). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/cas.15068>
- Nia, H. T., Munn, L. L., & Jain, R. K. (2020). Physical traits of cancer. In *Science* (Vol. 370, Issue 6516). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAZ0868>

- Nikolova, D., Chalovska-Ivanova, V., Genadieva-Dimitrova, M., Eftimov, A., Jovanovik, R., & Janevska, V. (2018). TP53 mutation in correlation to immunohistochemical expression of P53 protein in patients with hepatocellular carcinoma. In *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*
- Nishimura, M., Takizawa, Y., Nozawa, K., & Kurumizaka, H. (2022). Structural basis for p53 binding to its nucleosomal target DNA sequence. *PNAS Nexus*, 1(4). <https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgac177>
- Obeng, E. (2021). Apoptosis (Programmed cell death) and its signals-a review. In *Brazilian Journal of Biology* (Vol. 81, Issue 4). <https://doi.org/10.1590/1519-6984.228437>
- Oh, S., & Jung, J. (2021). Sex-dependent liver cancer xenograft models for predicting clinical data in the evaluation of anticancer drugs. *Laboratory Animal Research*, 37(1). <https://doi.org/10.1186/s42826-021-00087-z>
- Pancu, D. F., Scurtu, A., Macasoï, I. G., Marti, D., Mioc, M., Soica, C., Coricovac, D., Horhat, D., Poenaru, M., & Dehelean, C. (2021). Antibiotics: Conventional Therapy and Natural Compounds with Antibacterial Activity-A Pharmacotoxicological Screening. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 10(4), 401.
- Patel, A. (2020, September 1). Benign vs Malignant Tumors. *JAMA Oncology*. American Medical Association. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.2592>
- Paul, B., Lewinska, M., & Andersen, J. B. (2022). Lipid alterations in chronic liver disease and liver cancer. *JHEP Reports*, 4(6), 100479. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2022.100479>
- Preethi, K. A., Lakshmanan, G., & Sekar, D. (2021). Antagomir technology in the treatment of different types of cancer. In *Epigenomics* (Vol. 13, Issue 7). <https://doi.org/10.2217/epi-2020-0439>

- Radzak, S. M. A., Khair, S. Z. N. M., Ahmad, F., Patar, A., Idris, Z., & Yusoff, A. A. M. (2022). Insights regarding mitochondrial DNA copy number alterations in human cancer (Review). In *International Journal of Molecular Medicine* (Vol. 50, Issue 2). <https://doi.org/10.3892/IJMM.2022.5160>
- Radzak, S. M. A., Khair, S. Z. N. M., Ahmad, F., Patar, A., Idris, Z., & Yusoff, A. A. M. (2022). Insights regarding mitochondrial DNA copy number alterations in human cancer (Review). In *International Journal of Molecular Medicine* (Vol. 50, Issue 2). <https://doi.org/10.3892/IJMM.2022.5160>
- Rajavel, M., Kumar, V., Nguyen, H., Wyatt, J., Marshall, S. H., Papp-Wallace, K. M., Deshpande, P., Bhavsar, S., Yeole, R., Bhagwat, S., Patel, M., Bonomo, R. A., & van den Akker, F. (2021). Structural characterization of diazabicyclooctane  $\beta$ -lactam “enhancers” in complex with penicillin-binding proteins pbp2 and pbp3 of *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio*, 12(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.03058-20>
- Rani, U.; Singh, M.; Saith, A.; Jain, S. L.; Aggarwal, A. and Aggarwal, S. (2022). Evaluation of Use of RPMI Medium to Preserve Cell Morphology for Pleural/Peritoneal Fluid Cytology. *Journal of cytology*, 39(1), 26–29. [https://doi.org/10.4103/joc.joc\\_130\\_21](https://doi.org/10.4103/joc.joc_130_21)
- Rebouissou S, Nault JC. Advances in molecular classification and precision oncology in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2020 Feb;72(2):215-229. [doi: 10.1016/j.jhep.2019.08.017](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.08.017). PMID: 31954487.
- Reig, M., Forner, A., Rimola, J., Ferrer-Fàbrega, J., Burrel, M., Garcia-Criado, Á., Kelley, R. K., Galle, P. R., Mazzaferro, V., Salem, R., Sangro, B., Singal, A. G., Vogel, A., Fuster, J., Ayuso, C., & Bruix, J. (2022). BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update. In *Journal of Hepatology* (Vol. 76, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.11.018>

Republic of Iraq Ministry of Health and Environment Iraqi Cancer Board  
2021, Number and percentage of cancers.

Roman-Doval, R., Torres-Arellanes, S. P., Tenorio-Barajas, A. Y., Gómez-Sánchez, A., & Valencia-Lazcano, A. A. (2023, July 1). Chitosan: Properties and Its Application in Agriculture in Context of Molecular Weight. *Polymers*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).  
<https://doi.org/10.3390/polym15132867>

Rumgay, H., Murphy, N., Ferrari, P., & Soerjomataram, I. (2021). Alcohol and cancer: Epidemiology and biological mechanisms. In *Nutrients* (Vol. 13, Issue 9).  
<https://doi.org/10.3390/nu13093173>

Sakr, M. A., Al-Azzawi, M. A., Anis, A., Abd El-Aziz, A. A., Ebeid, M. E., Shokeer, M. A., & fayed, A. (2022). The correlation between P53 and COX-2 expression and the pathological alteration in hepatocellular carcinoma. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s43042-022-00230-y>

Samant, H., Amiri, H. S., & Zibari, G. B. (2021). Addressing the worldwide hepatocellular carcinoma: Epidemiology, prevention and management. In *Journal of Gastrointestinal Oncology* (Vol. 12, pp. 361–373). AME Publishing Company.  
<https://doi.org/10.21037/JGO.2020.02.08>

Sangnim, T., Dheer, D., Jangra, N., Huanbutta, K., Puri, V., & Sharma, A. (2023). Chitosan in Oral Drug Delivery Formulations: A Review. In *Pharmaceutics* (Vol. 15, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092361>

Saxena, S., & Zou, L. (2022). Hallmarks of DNA replication stress. In *Molecular Cell* (Vol. 82, Issue 12, pp. 2298–2314). Cell Press.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.05.004>

Schlesinger, P. H. (2024, April 4). *apoptosis*. *Encyclopedia Britannica*.  
<https://www.britannica.com/science/apoptosis>

- Shahmoradi, S. S., Salehzadeh, A., Ranji, N., & Habibollahi, H. (2023). Trigger of apoptosis in human liver cancer cell line (HepG2) by titanium dioxide nanoparticles functionalized by glutamine and conjugated with thiosemicarbazone. *3 Biotech*, 13(6). <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03609-9>
- Sharifi-Rad, J., Quispe, C., Butnariu, M., Rotariu, L. S., Sytar, O., Sestito, S., Rapposelli, S., Akram, M., Iqbal, M., Krishna, A., Kumar, N. V. A., Braga, S. S., Cardoso, S. M., Jaferník, K., Ekiert, H., Cruz-Martins, N., Szopa, A., Villagran, M., Mardones, L., ... Calina, D. (2021). Chitosan nanoparticles as a promising tool in nanomedicine with particular emphasis on oncological treatment. In *Cancer Cell International* (Vol. 21, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02025-4>
- Shen, J., Wang, Q., Mao, Y., Gao, W., & Duan, S. (2023). Targeting the p53 signaling pathway in cancers: Molecular mechanisms and clinical studies. In *MedComm* (Vol. 4, Issue 3). <https://doi.org/10.1002/mco2.288>
- Shi, T., van Soest, D. M. K., Polderman, P. E., Burgering, B. M. T., & Dansen, T. B. (2021). DNA damage and oxidant stress activate p53 through differential upstream signaling pathways. *Free Radical Biology and Medicine*, 172. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.06.013>
- Shields, H. J., Traa, A., & Van Raamsdonk, J. M. (2021). Beneficial and Detrimental Effects of Reactive Oxygen Species on Lifespan: A Comprehensive Review of Comparative and Experimental Studies. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 9). <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.628157>
- Sies, H., & Jones, D. P. (2020, July 1). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>

Souza, L.M.L.R.d., Novos complexos fenantrolínicos de cobre e cobalto com ligantes derivados do monastrol: síntese, estudo espectroscópico e eletroquímico. 2022, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Suehnholz, S. P., Nissan, M. H., Zhang, H., Kundra, R., Nandakumar, S., Lu, C., Carrero, S., Dhaneshwar, A., Fernandez, N., Xu, B. W., Arcila, M. E., Zehir, A., Syed, A., Brannon, A. R., Rudolph, J. E., Paraiso, E., Sabbatini, P. J., Levine, R. L., Dogan, A., ... Chakravarty, D. (2024). Quantifying the Expanding Landscape of Clinical Actionability for Patients with Cancer. *Cancer Discovery*, 14(1), 49–65. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-23-0467>

Szewczyk-Roszczenko, O., & Barlev, N. A. (2023, December 1). The Role of p53 in Nanoparticle-Based Therapy for Cancer. *Cells*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cells12242803>

Thiruchenthooran, V., Sánchez-López, E., & Gliszczynska, A. (2023, January 1). Perspectives of the Application of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Cancer Therapy: Attempts to Overcome Their Unfavorable Side Effects. *Cancers*. MDPI. <https://doi.org/10.3390/cancers15020475>

Thottathil, S., Puttaiahgowda, Y. M., & Kanth, S. (2023). Advancement and future perspectives on ampicillin-loaded antimicrobial polymers- A review. In *Journal of Drug Delivery Science and Technology* (Vol. 81). <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104227>

Vazquez-Jimenez, L. K., Juárez-Saldivar, A., Gómez-Escobedo, R., Delgado-Maldonado, T., Mendez-Alvarez, D., Palos, I., Bandyopadhyay, D., Gaona-Lopez, C., Ortiz-Pérez, E., Noguera-Torres, B., Ramírez-Moreno, E., & Rivera, G. (2022). Ligand-Based Virtual Screening and Molecular Docking of Benzimidazoles as Agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 10047. <https://doi.org/10.3390/ijms231710047>

- Villalpando-Rodriguez, G. E., & Gibson, S. B. (2021). Reactive Oxygen Species (ROS) Regulates Different Types of Cell Death by Acting as a Rheostat. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2021). <https://doi.org/10.1155/2021/9912436>
- Wang, D. (2022). New progress and challenge in gynecological cancer. *Annals of Translational Medicine*, 10(2). <https://doi.org/10.21037/atm-2021-45>
- Wang, F., Hou, W., Chitsike, L., Xu, Y., Bettler, C., Perera, A., Bank, T., Cotler, S. J., Dhanarajan, A., Denning, M. F., Ding, X., Breslin, P., Qiang, W., Li, J., Koleske, A. J., & Qiu, W. (2020). ABL1, Overexpressed in Hepatocellular Carcinomas, Regulates Expression of NOTCH1 and Promotes Development of Liver Tumors in Mice. *Gastroenterology*, 159(1), 289-305.e16. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.03.013>
- Wang, G., Wang, Q., Liang, N., Xue, H., Yang, T., Chen, X., Qiu, Z., Zeng, C., Sun, T., Yuan, W., Liu, C., Chen, Z., & He, X. (2020). Oncogenic driver genes and tumor microenvironment determine the type of liver cancer. In *Cell Death and Disease* (Vol. 11, Issue 5). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2509-x>
- Wang, H., Guo, M., Wei, H., & Chen, Y. (2023). Targeting p53 pathways: mechanisms, structures, and advances in therapy. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 8, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01347-1>
- Wang, K., Zhao, L., & He, B. (2021). Chitosan/Montmorillonite Coatings for the Fabrication of Food-Safe Greaseproof Paper. *Polymers*, 13(10), 1607. <https://doi.org/10.3390/polym13101607>

- Wang, L., Wu, Y., Yang, N., Yin, W., Yang, H., Li, C., Zhuang, Y., Song, Z., Cheng, X., Shi, S., & Wu, Y. (2024). Self-assembly of maltose-albumin nanoparticles for efficient targeting delivery and therapy in liver cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*, 258, 128691. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128691>
- Wang, Y. H., Ho, T. L. F., Hariharan, A., Goh, H. C., Wong, Y. L., Verkaik, N. S., ... Lane, D. P. (2022). Rapid recruitment of p53 to DNA damage sites directs DNA repair choice and integrity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(10). <https://doi.org/10.1073/pnas.2113233119>
- Wang, Y., Qi, H., Liu, Y., Duan, C., Liu, X., Xia, T., Chen, D., Piao, H. L., & Liu, H. X. (2021). The double-edged roles of ROS in cancer prevention and therapy. *Theranostics*, 11(10). <https://doi.org/10.7150/thno.56747>
- World Health Organization cancer today IARC,2024, <https://gco.iarc.who.com>
- Yang, C., Huang, X., Li, Y., Chen, J., Lv, Y., & Dai, S. (2021). Prognosis and personalized treatment prediction in TP53-mutant hepatocellular carcinoma: An in silico strategy towards precision oncology. In *Briefings in Bioinformatics*
- Yang, C., Zhang, H., Zhang, L., Zhu, A. X., Bernards, R., Qin, W., & Wang, C. (2023). Evolving therapeutic landscape of advanced hepatocellular carcinoma. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 20, Issue 4). <https://doi.org/10.1038/s41575-022-00704-9>
- Yang, Y., Xiong, L., Li, M., Jiang, P., Wang, J., & Li, C. (2023). Advances in radiotherapy and immunity in hepatocellular carcinoma. In *Journal of Translational Medicine* (Vol. 21, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s12967-023-04386-y>
- Yaseen,N.Y.(1990). Sytgenetic Study of human colorectal cancer cell.Ph D. thesis , university of Sheffield.

- Yashaswee, S., & Trigun, S. K. (2020). Cytotoxicity and Induction of Apoptosis in Melanoma (MDA-MB-435S) Cells by Emodin. *Journal of Scientific Research*, 64(02), 158–166. <https://doi.org/10.37398/JSR.2020.640223>
- Yasseen, N, Y. ; Tawfiq, M.S. ; Humadi, A.A. and Estivan, A.G. (1998) Cytogenetic studies on patient with chronic myelocytic leukemia. *med J. Tikrit University*, 4: 5-
- Yoo, J. J., Park, M. Y., Cho, E. J., Yu, S. J., Kim, S. G., Kim, Y. J., Kim, Y. S., & Yoon, J. H. (2023). Smoking Increases the Risk of Hepatocellular Carcinoma and Cardiovascular Disease in Patients with Metabolic-Associated Fatty Liver Disease. *Journal of Clinical Medicine*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/jcm12093336>
- Yuan, S., Chen, J., Ruan, X., Sun, Y., Zhang, K., Wang, X., Li, X., Gill, D., Burgess, S., Giovannucci, E. L., & Larsson, S. C. (2023). Smoking, Alcohol Consumption, and 24 Gastrointestinal Diseases: Mendelian Randomization Analysis. *ELife*, 12. <https://doi.org/10.7554/eLife.84051>
- Zamaraev, A. V., Zhivotovsky, B., & Kopeina, G. S. (2020, October 1). Viral Infections: Negative Regulators of Apoptosis and Oncogenic Factors. *Biochemistry (Moscow)*. Pleiades journals. <https://doi.org/10.1134/S0006297920100077>
- Zhang, X., Guan, L., Tian, H., Zeng, Z., Chen, J., Huang, D., Sun, J., Guo, J., Cui, H., & Li, Y. (2021). Risk Factors and Prevention of Viral Hepatitis-Related Hepatocellular Carcinoma. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.686962>
- Zhang, X., Lou, D., Fu, R., Wu, F., Zheng, D., & Ma, X. (2023). Association between Statins Types with Incidence of Liver Cancer: An Updated Meta-analysis. *Current Medicinal Chemistry*, 31(6), 762–775. <https://doi.org/10.2174/0929867330666230701000400>

Zhou, J., Sun, H., Wang, Z., Cong, W., Zeng, M., Zhou, W., Bie, P., Liu, L., Wen, T., Kuang, M., Han, G., Yan, Z., Wang, M., Liu, R., Lu, L., Ren, Z., Zeng, Z., Liang, P., Liang, C., Chen, M., ... Fan, J. (2023). Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Primary Liver Cancer (2022 Edition). *Liver cancer*, 12(5), 405–444. <https://doi.org/10.1159/000530495>

## Summary

In the current work, which lasted for nine months an *ex vivo* human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line was used to assess the function of nano chitosan loaded with ampicillin, acetaminophen, mefenamic acid, and cephalexin in activating the Tumor protein 53 (*TP53*) gene to trigger the apoptotic pathway. The purpose of the current study was to determine how well beta-lactam antibiotics, such as Ampicillin and Cephalexin, work when loaded into chitosan nanoparticles along with nonsteroidal anti-inflammatory drug Mefenamic acid and painkiller and antipyretic acetaminophen. The drugs were bound to the active sites that activate Protein 53 (p53) after the molecular docking technique identified the binding sites between the drugs and the amino acids of p53. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) confirmed that the frequencies of the functional groups of the nanoparticles were within the standard range. To find out how cytotoxic nanomedicines were to human liver cancer cell line HepG2, another test known as the (MTT) 3-(4,5-dimethylimidazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide test was used. The cells were exposed to increasing half-concentrations of nanomedicines (12.5, 50.25, 100, 200, and 400 mg/ml) for 72 hours before 28  $\mu$ l of MTT dye was added. The test's findings demonstrated how effective nanomedicines can be dose-dependently since increasing doses caused a drop in cell viability. Cephalexin (59.07  $\mu$ g/ml) was the most effective antibiotic based on the Inhibition concentration ( $IC_{50}$ ), followed by ampicillin (69.09  $\mu$ g/ml), mefenamic acid (65.44  $\mu$ g/ml), and acetaminophen (73.88  $\mu$ g/ml).

The human liver cancer cell line HepG2 was exposed to drugs loaded on nano chitosan at a concentration of  $IC_{50}$  for each drug for 24 hours. The results of the test to detect morphological changes using Crystal violet dye showed phenotypic changes accompanying the early stages of apoptosis, such as

damage to the outer membrane, while the final signs of apoptosis were detected by performing a dual-stain test with the dyes Acridine orange and ethidium bromide (AO/EtBr). Acridine orange, which stains DNA in healthy cells, was used to stain the green cancer cells that were not treated with medications placed on nano chitosan. On the other hand, the cells treated with nano pharmaceuticals were stained orange with Ethidium bromide, which stains the DNA of dead cells whose membranes were damaged.

The human liver cancer cell line HepG2 showed increased *Tp53* gene expression according to the results of the quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain (qRT-PCR) test. Cephalexin was the most effective drug, as shown by the gene expression in the exposed cancer cells (0.2603 + 3.233), followed by acetaminophen (0.1764), mefenamic acid (0.1202 + 2.867), and ampicillin (0.2082 + 2.400) in comparison to the control groups that were not treated with chitosan loaded with drugs (0.0 + 1.000). This indicates the effectiveness of drugs loaded on chitosan in activating p53 and initiating the programmed death pathway in the human liver cancer cell line HepG2.



**University of Kerbala**  
**College of Education for Pure Sciences**  
**Department of Biology**

**Effect of some drugs loaded on nano chitosan on human  
liver cancer HepG2 cell line *in vitro***

**A Thesis**

**submitted to the Council of the College of Education for Pure Sciences /  
University of Kerbala as part of the requirements for obtaining a  
master's degree in Biology**

**written by**

**Zahraa Ayad Ali**

**Bachelor of Biology 2013 / University of Kerbala**

**Supervised by**

**Assist. Prof . Dr . Zainab Nazar Jawad**

**July 2024 A.D**

**Muharram 1446 A.H**