

دراسة تأثير التحفيز الكيميائي لماده البكتانول مع الاسبراجينيز المنتج بواسطه بكتيريا ايشيريشيا كولاي على بعض
الخصائص المناعية لخلايا اللوكيميا الليمفاويه من النوع الحاد

تسليم علي محمد باصبرين

المستخلص

إشراف :

د. عاليه محمد علي الدهلوي

يستخدم الأسبراجينيز (L-asparaginase) المستخرج من بكتيريا الايكولاي (*E. coli*) في علاج سرطان الدم الليمفاوي الحاد (ALL) ، و مع ذلك فهو يعتبر السبب الأول في فرط الحساسيه الحاد اذ انه يحفز جهاز المناعه على انتاج أجسام مضاده مما يقلل من مفعول الانزيم. البكتانول (Piceatannol) عباره عن مركب نباتي موجود في بذور الفاكهه و هو مشتق من ماده الريسفيراترول ، اثبتت الدراسات ان هذا المركب يقلل من الالتهابات المزمنه. **الهدف:** التحقق من التأثيرات التآزرية لانزيم الأسبراجيناز المتولد من *E. coli* (Kidrolase ، و Oncospore) مع PIC على بعض الخصائص المناعية والقدرة المضادة للاورام على جميع الخلايا (Jurkat cell). **الطريقة:** يتم استزراع خلايا ALL في المختبر ثم تعالج بواسطه إنزيم الاسبراجينيز وحده و بالإقتران مع البكتانول. تم تقييم السمية الخلوية وحيوية الخلايا من خلال اختبار WST-8. تم فحص الخصائص المظهرية ، مستوى البروتين ، موت الخلايا المبرمج ، ودورة DNA الخلية باستخدام قياس التدفق الخلوي (Flow cytometry). تم إجراء اختبار الحساسيه بحقن لإنزيم في الفئران BALB / C ، و استخدمت تقنيات ELISA لتحديد مستويات MCPT-1 ، IgE ، IgG ، و IgM في بلازما الفئران من خلال اتباع بروتوكول الحقن. وعلاوة على ذلك ، تم التحقيق من المستوى الجزيئي وإشارات الجينات في الخلايا الليمفاويه باستخدام RT-PCR. **النتيجة:** أظهرت النتائج أن الاسبراجينيز مقرونا مع مركب البكتانول لهما تأثير مثبط لنكاثر جميع الخلايا و ذلك بالكشف عنها بواسطه اختبار حيويه الخلية WST-8. كما لوحظ انخفاض ملحوظ في CD 34 و CD 117 مع زيادة كبيرة في CD 38 في الخلايا المعالجة مع البكتانول والنظام العلاجي. انخفاض كبير في Notch-1 و Jagged-1 و CXCR-4 في الخلايا المعالجة بمزيج من الاسبراجينيز بالإضافة إلى Piceatannol. من ناحية أخرى ، تسبب مزيج الأنزيم مع PIC إلى زيادة النسب المئوية موت الخلايا المعالجة مقارنة بالخلايا المعالجة بالأنزيم وحده. ومن المثير للاهتمام، أن اختبار الحساسيه للفئران المحقونه بالانزيم مقرونا مع PIC يشير إلى أن الفئران كانت لها استجابات أقل حساسية من مثيلتها التي حقنت بالانزيم البكتري وحده. تم تقييم هذا بواسطة الحصول على تركيزات اقل من IgG ، IgE ، و IgM في بلازما الفئران المحقونة بالانزيم مقرونا مع PIC مقارنة بنظيرتها في المجموعات الأخرى المحقونة بالانزيم فقط. بالإضافة إلى ذلك ، أظهرت الخلايا المعالجة ب الاسبراجينيز و البكتانول تغيرات جزيئية في عدة تعبيرات جينية. **الاستنتاج :** أظهرت دراسته أن الجمع بين الانزيم العلاجي و البكتانول قد يحسن العلاج الحالي لسرطان الدم اللمفاوي الحاد ، على الرغم من أن هناك حاجة لدراسات إضافية لاقتراح هذا التحضير كمرشح فعال لتحسين علاج المرض.

**Studying the Chemosensitization Effect of Piceatannol with L- asparaginase
Produced by *Escherichia coli* on some Immunological Characteristics of Acute
Lymphoblastic Leukemia Cell Line**

By

Tasneem Ali Mohammed Basbrain

Supervised by

Dr. Alia M. Aldahlawi

Abstract

L-Asparaginase enzyme isolated from *Escherichia coli* has been commonly used in the treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). However, hypersensitivity reactions and silent inactivation have been clinically reported due to the generation of antibodies against *E. coli*-L-asparaginase. Piceatannol (PIC) a natural analog of resveratrol (RES) is a phytochemical compound found in passion fruit seeds. Several studies have been revealed that PIC can potentially suppress some chronic inflammation. **Aim:** to investigate the synergetic effects of L-asparaginase enzyme generated from *E. coli* (Kidrolase, and Oncospare) combined with PIC on some immunological characteristic and antitumor capability on ALL cell-line (Jurkat cell). **Methods:** ALL cell-line was cultured *in vitro* and treated with therapeutic enzyme alone and in combination with Piceatannol. The cytotoxicity and cell viability were evaluated by the WST-8 assay. Phenotypic characteristics, several proteins expressions, apoptotic inductions, and DNA cell cycle were determined using flow cytometry. Sensitization with enzyme preparation was conducted *in vivo* using BALB/C mice, and ELISA techniques were used to determine MCPT-1, IgG, IgE, and IgM levels in mice plasma following injection protocol. Moreover, several signaling genes expressions were investigated using RT-PCR. **Result:** The present data demonstrated that L-asparaginase and Piceatannol have enhanced anti-proliferative effects on ALL cells as detected by the WST-8 assay. Cells treated with enzyme preparation were also exhibited significant decrease in CD34, and CD117 associated with significant increase in CD38 surface markers. Beside that Notch-1, Jagged-1, and CXCR-4 protein expressions were also significantly decreased. On the other hand, enzyme combination with PIC increased the apoptotic percentages of treated cells compared to cells treated with enzyme alone. Interestingly, *in-vivo* sensitization with enzyme preparation indicated that mice treated with the combination had less allergic responses than bacterial enzyme alone. This was assessed by lower plasma concentrations of IgG, IgE, IgM and mMCP-1 in mice injected with enzyme preparation than other injected groups. Additionally, cells treated with L-asparaginase and Piceatannol showed molecular changes in several gene expressions. Furthermore, preliminary results of genetic expression were showed a significant decrease Nothch-1, Jagged-1, BCL-2, NFκB, and CXCR-4 which can lead to induction of apoptosis and tumor suppression. **Conclusion:** our data revealed that combining therapeutic enzyme with Piceatannol might improve current ALL treatment, although additional studies are required to introduce this preparation as potential candidate for improving ALL therapy.