GROWTH INHIBITORY EFFECT OF GOSSYPOL ON HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA CELL LINE: AN IN VITRO STUDY

Thesis
Submitted to the Faculty of Dentistry
Ain Shams University
In Partial Fulfillment of the Requirements for the
Masters Degree in Oral Pathology

BY

Nermeen Sami Afifi
(B.D.S)
Ain Shams University
2002
Demonstrator of Oral Pathology
Faculty of Dentistry
Ain Shams University

FACULTY OF DENTISTRY
AIN SHAMS UNIVERSITY
2009

Supervisors

Dr. Ehab Saeed Abdel-Hamid
Associate Professor of Oral Pathology
Faculty of Dentistry
Ain Shams University

Dr. Aly Fahmy Mohamed
G.M. of Applied Research Sector
Vacsera-Egypt

Dr. Houry Moustafa Baghdadi
Lecturer of Oral Pathology
Faculty of Dentistry
Ain Shams University

بسم الله الرحمن الرحيم

وقل ربي زدني علما

صدق الله العظيم

To my lovely parents
Thank you for your constant inspiration
and endless faith in me….

To my beloved husband, Ehab,
and my sweet son, Mohannad,
Thank you for your support and patience….

To all who will read this one day and
find it useful,
Thank you for your time and trust….

Acknowledgement

I would like to express my deep thank to **Allah, the Most Compassionate, the Most Merciful**, for guiding me through this work and enabling me to accomplish it. May all the praise be to Allah.

I am deeply grateful to **Dr. Ehab Saeed Abdel-Hamid,** Associate Professor of Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Ain Shams University, for his constant encouragement, endless efforts and valuable assistance.

Grateful thanks for **Dr. Aly Fahmy Mohamed,** General Manager of Applied Research Sector, Vacsera-Egypt, for his kind support, time and patience he bestowed upon me throughout this work.

I cannot afford to forget to thank **Dr. Adel Mohamed Abdel- Azim**, Professor and Head of Oral Pathology Department, Faculty of Dentistry, Ain Shams University, for his cooperation and advice whenever needed, especially in the field of statistics.

I would like also to thank **Dr. Houry Moustafa Baghdadi**, Lecturer of Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Ain Shams University, for her help and support all through my work.

التأثير المثبط للنمو لمادة الجوسيبول على خط خلايا سرطان الخلايا الحرشفية للرأس والرقبة: تجربة معملية

رسالة مقدمة لكلية طب الأسنان جامعة عين شمس لاستيفاء جزء من متطلبات درجة الماجستير في أمراض الفم

مقدم من

الطبيبة / نيرمين سامي عفيفي
بكالوريوس طب و جراحة الفم و الأسنان جامعة عين شمس
٢٠٠٢
معيدة بقسم باثولوجيا الفم
كلية طب الأسنان جامعة عين شمس

كلية طب الأسنان
جامعة عين شمس
٢٠٠٩

إشراف

د/إيهاب سعيد عبد الحميد
أستاذ مساعد بقسم باثولوجيا الفم
كلية طب الأسنان
جامعة عين شمس

د/علي فهمي محمد
مدير عام البحوث التطبيقية بقطاع الفيروسات
فاكسيرا– مصر

د/حور مصطفى بغدادي
مدرس بقسم باثولوجيا الفم
كلية طب الأسنان
جامعة عين شمس

الملخص باللغة العربية

المقدمة:

في السنوات الأخيرة حظيت مادة الجوسيبول المستخرجة من بذور القطن علي اهتمام كبير نظرا لخصائصها البيولوجية و الطبية المتعددة. وجد أن مادة الجوسيبول نجحت في وقف نمو العديد من الأورام السرطانية التي تصيب الإنسان سواء علي المستوي المعملي أو الإكلينيكي .

الهدف من الدراسة:

تهدف هذه الدراسة الي تحري نشاط مادة الجوسيبول السام على سرطان الخلايا الحرشفية لمنطقة الرأس و الرقبة و قدرتها علي إحداث الموت المبرمج لهذه الخلايا.

كما تهدف هذه الدراسة إلى تقييم التغيرات الخلوية وتقييم تفتت الحامض النووي (الديوكسيريبوز) الحادث في هذه الخلايا السرطانية بعد العلاج بمادة الجوسيبول مع محاولة تحديد التركيز و المدة الزمنية المثالية لهذا التأثير.

المواد والطرق المستخدمة:

استخدمت هذه الدراسة اختبار مبدئي لمعرفة تأثير الجوسيبو ل علي حيوية خلايا سرطان الخلايا الحرشفية لمنطقة الرأس و الرقبة باستخدام تركيزات مختلفة تتراوح من ٢٥ميكرومول- ١٥٠ميكرومول خلال ٦, ٢٤و ٤٨ ساعة كما استخدمت فحص تفتت الحامض النووي (الديوكسيريبوز) للخلايا باستخدام الفصل الكهربائي لمعرفة ما إذا كان موت الخلايا ناتجا عن الموت المبرمج أم الموت التحللي كما اعتمدت هذه الدراسة على الفحص الميكروسكوبي للبحث عن التغيرات الخلوية التي تدل على حدوث الموت المبرمج للخلايا و قياس هذه التغيرات بطريقة كمية.

النتائج:

أظهرت نتائج هذه الدراسة أن للجوسيبو ل تأثيرا ساما على سرطان الخلايا الحرشفية لمنطقة الرأس و الرقبة و أن هذا التأثير يتناسب طرديا مع التركيز و وقت التعرض للجوسيبول. كما أثبتت النتائج حدوث تفتت الحامض النووي (الديوكسيريبوز) بصورة أوضح في التركيزا ت المنخفضة من الجوسيبول في حين حددت طريقة القياس المورفولوجي للتغيرات الخلوية التركيز الأمثل (٥٠ميكرومول) الذي يؤدي الي حدوث أقصى نسبة من الموت المبرمج للخلايا مع اقل نسبة من

الموت التحللي و عضدت نتائج التحليل الإحصائي ذلك بأن أظهرت انخفاض ذات مغزى في قياسات أنوية الخلايا بعد ٢٤ساعة من المعالجة بتركيز ٥٠ميكرومول من الجوسيبول.

الاستنتاج:

بناءاً على نتائج هذه الدراسة يمكن تأكيد التأثير السام لمادة الجوسيبو ل على سرطان الخلايا الحرشفية لمنطقة الرأس و الرقبة وأن التركيزات المنخفضة (٥٠ميكرومول فأقل) من الجوسيبول قادرة على إحداث الموت المبرمج للخلايا في حين أن التركيزات الأعلى تجمع بين حدوث الموت المبرمج والموت التحللي للخلايا.

من جهة أخرى فقد أبرزت هذه الدراسة أهمية طريقة القياس الكمي للتغيرات الشكلية الحادثة في أنوية الخلايا السرطانية كأداة مساعدة وسهلة التطبيق للوصول إلى التركيز الأمثل للأدوية المستخدمة في علاج الأمراض السرطانية.

List of Abbreviations

Apaf-1: Apoptotic peptidase activating factor 1

ATCC: 'American Type Culture Collection

bp: base pair

CCT: Cell Culture Technology

CDK: Cyclin Dependent Kinase

DEPC: Di Ethyl Pyro Carbonate

DISC: Death-Inducing Signaling Complex

EDTA: Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid

ESC: Enteric Septicemia of Catfish

FADD: Fas- Associated Death Domain

FBS: Foetal Bovine Serum

GP: Gossypol

HEp-2: Human Epidermoid carcinoma

hLDHs: human Lactate Dehydrogenase

HNSCC: Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

HRP: Human Reproduction Programme

IAPs: Inhibitor of Apoptosis Protiens

MAC: Mitochondrial Apoptosis-induced Channel

MEM-H: Minimum Essential Medium modified with Hank's salts

NAC: N-Acetyl-Cysteine

NAF: Nuclear Area Factor

NH: New Hampshire

PBS: Phosphate Buffer Saline

pfLDH: plasmodium falciparum Lactate Dehydrogenases

Rb: Retinoblastoma gene

RPM: Revolutions Per Minute

List of Abbreviations

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

SMACs: Second Mitochondria-Derived activator of Caspases

TBE: Tris/Borate/EDTA

TGF: Transforming Growth Factor

TNF: Tumor Necrosis Factor

TNFR: Tumor Necrosis Factor Receptor

TRADD: TNF Receptor-Associated Death Domain

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling

VDAC2: Voltage- Dependent Anion Channel 2

WHO: World Health Organization

List of Figures

Fig. 1: Enantiomers of gossypol……………………..………….. 4

Fig. 2: Photomicrograph showing epithelial like morphology of HEp-2 cells forming a monolayer in tissue culture flask (photographed using inverted microscope attached to digital camera)……………………………………………………… 32

Fig. 3: Tissue culture flask.. 32

Fig. 4: 96 well tissue culture plate……………………..………..... 33

Fig. 5: Vortex…………………………………………………... 33

Fig. 6: A plate showing the various steps for the photometry of nuclei of HEp-2 cells treated with gossypol………………… 34

Fig. 7: Eppendorf tube………………..……………………….….. 35

Fig. 8: Gel tank for gel electrophoresis……..……………………. 35

Fig. 9: Digital camera connected to ultraviolet box for gel imaging... 36

Fig. 10: Evaluation of gossypol cytotoxicity to HEp-2 cells in relation to different concentrations and duration using cytotoxicity assay……………………………………….…………… 38

Fig. 11: A histogram representing the mean viability percentages of HEp-2 cells 6 hours post treatment with different concentrations of gossypol using cytotoxicity assay……..…. 39

Fig. 12: A histogram representing the mean viability percentages of HEp-2 cells 24 hours post treatment with different concentrations of gossypol using cytotoxicity assay………… 39

Fig. 13: A histogram representing the mean viability percentages of HEp-2 cells 48 hours post treatment with different concentrations of gossypol using cytotoxicity assay……..…. 40

Fig. 14: Evaluation of cytotoxicity of different concentrations of gossypol on HEp-2 cells at different time intervals using cytotoxicity assay………………………………………………. 40

Fig. 15: Photomicrograph of control cells 6 hours post treatment showing regular HEp-2 cells (A), pleomorphic HEp-2 cells (B) and apoptotic HEp-2 cell with peripheral condensation of chromatin (c) (H&E x1000 oil)……………………………… 43

Fig. 16: Photomicrograph of control cells 24 hours post treatment showing regular HEp-2 cells (A), pleomorphic HEp-2 cells (B) and apoptotic HEp-2 cell with peripheral condensation of chromatin (c) (H&E x1000 oil)………………………….. …. 43

Fig. 17: Photomicrograph of control cells 48 hours post treatment showing regular HEp-2 cells (A), pleomorphic HEp-2 cells (B) and apoptotic HEp-2 cell with peripheral condensation of chromatin (c) (H&E x1000 oil)………….. …………………. 44

Fig. 18: Photomicrograph of HEp-2 cells 6 hours post treatment with 25µM of gossypol showing peripheral condensation of chromatin (A), nucleolar segregation (B) and irregular nuclear and cellular outlines (C) (H&E x1000 oil)……..…... 44

Fig. 19 Photomicrograph of HEp-2 cells 6 hours post treatment with 25µM of gossypol showing peripheral condensation of chromatin (A), nuclear fragmentation (B) and apoptotic bodies (C) (H&E x1000 oil)……………………………….... 45

Fig. 20: Photomicrograph of HEp-2 cells 6 hours post treatment with 50µM of gossypol showing shrunken apoptotic cells with peripheral condensation of chromatin (A), nucleolar segregation (B) and irregular nuclear and cellular outlines (C) (H&E x1000 oil)……………………………………… 45

Fig. 21: Photomicrograph of HEp-2 cells 6 hours post treatment with 50µM of gossypol showing shrunken apoptotic cells with peripheral condensation of chromatin (A), irregular nuclear outlines (B), nuclear fragmentation (C), apoptotic bodies (D) and membrane blebbing (E) (H&E x1000 oil)…………... …. 46

Fig. 22: Photomicrograph of HEp-2 cells 6 hours post treatment with 75µM of gossypol showing necrotic cells having coarse staining and clumping of the heterochromatin admixed with euchromatin (A). Apoptotic cells with peripheral condensation of chromatin (B) also could be seen (H&E x1000 oil)…………………………………………………… 46

Fig. 23: Photomicrograph of HEp-2 cells 6 hours post treatment with 75µM of gossypol showing peripheral condensation of chromatin (A), nucleolar segregation (B) and irregular nuclear and cellular outlines (C) (H&E x1000 oil)………….. 47

Fig. 24: Photomicrograph of HEp-2 cells 6 hours post treatment with 100µM of gossypol showing necrotic cells having coarse staining and clumping of the heterochromatin admixed with euchromatin (A). Only one apoptotic cell could be observed in the field (B) (H&E x1000 oil)………... 47

Fig. 25: Photomicrograph of HEp-2 cells 6 hours post treatment with 100µM of gossypol showing peripheral condensation of chromatin (A) and irregular nuclear outlines (B) (H&E x1000 oil)…………………………………………….. 48

Fig. 26: Photomicrograph of HEp-2 cells 6 hours post treatment with 150µM of gossypol showing swollen necrotic cell having coarse staining and clumping of the heterochromatin admixed with euchromatin (A) with rupture of cell membrane (B) (H&E x1000 oil)…………………………….. 48

Fig. 27: Photomicrograph of HEp-2 cells 6 hours post treatment with 150µM of gossypol showing peripheral condensation of chromatin (A), nucleolar segregation (B) and irregular nuclear and cellular outlines (C). Necrotic cell with coarse staining and clumping of the heterochromatin admixed with euchromatin could be detected (D) (H&E x1000 oil)……… 49

Fig. 28: Photomicrograph of HEp-2 cells 24 hours post treatment with 25µM of gossypol showing shrunken apoptotic cells with peripheral condensation of chromatin (A) and irregular nuclear outlines (B). The pale structures in the background demonstrate cell debris (D) (H&E x1000 oil)……………….. 49

Fig. 29: Photomicrograph of HEp-2 cells 24 hours post treatment with 50µM of gossypol showing shrunken apoptotic cells with peripheral condensation of chromatin (A), irregular nuclear outlines (B), nucleolar segregation (C) and nuclear fragmentation (D). The pale structures in the background demonstrate cell debris (E) (H&E x1000 oil) ……………… 50

Fig. 30: Photomicrograph of HEp-2 cells 24 hours post treatment with 50µM of gossypol showing nuclear fragmentation (A), membrane blebbing (B) and apoptotic bodies (C) (H&E x1000 oil)…………………………………………………… 50

Fig. 31: Photomicrograph of HEp-2 cells 24 hours post treatment with 75µM of gossypol showing nuclear fragmentation (A) and membrane blebbing (B) (H&E x1000 oil)……………… 51

Fig. 32: Photomicrograph of HEp-2 cells 24 hours post treatment with 75µM of gossypol showing peripheral condensation of chromatin (A), nucleolar segregation (B), irregular nuclear and cellular outlines (C), membrane blebbing (D) and nuclear fragmentation (E) (H&E x1000 oil)………………… 51