

العلاج المدمج من الثيموكوينون والدوسيتاكسال المنقول بواسطة المستحلب النانومتري المعتمد على البوراج كنهج جديد في معالجة سرطان الثدي

إعداد / رغبة سالم عمر باودود
إشراف أ. د. ميسون الخطيب
أ. د. هناء قشلاق

المستخلص

سرطان الثدي النقيلي " المهاجر " هو مرحلة متقدمة من السرطان، يعتمد بشكل كبير على المسارات الخلوية الخاصة بالهجرة، وذلك هو السبب في عدم وضوح الآليات التي تتحكم في حماية الخلايا السرطانية والتي تدفعها لعمليات الهجرة وغزو الخلايا السليمة. لقد تطور نهج إيصال الدواء بشكل كبير مع ظهور تقنية النانو، ولا سيما المستحلبات النانوية المُستهدفة (NE) التي لديها القدرة على تحسين التوافر البيولوجي للأدوية مما يؤدي إلى تحسين كفاءتها العلاجية. قمنا في هذه الدراسة بفحص الدور المحتمل لزيت النانو المستخلص من زيت زهرة البوراج كنظام توصيل لمثبطات الأنابيب الدقيقة الدوسيتاكسيل (DTX) والثيموكينون (TQ) ضد خطوط خلايا سرطان الثدي البشرية MCF-7 و MDA-MB-231 و T47D. تم تحضير المستحلبات النانوية عن طريق جهاز الموجات فوق الصوتية الفائق وتمت دراسة خصائصها الفيزيائية باستخدام جهاز تشتت الضوء الديناميكي. تم تقييم السمية الخلوية في المختبر باستخدام اختبار صبغة السلفورودامين ب بجانب اختبار تجزئة الحمض النووي. بالإضافة إلى ذلك فقد تم تقييم توزيع دورة الخلية وموت الخلايا المبرمج والبلعمة الذاتية والخلايا الجذعية لسرطان الثدي باستخدام جهاز تحليل التدفق الخلوي. كما تم تقييم المزيد من الاختبارات على مستوى التعبير الجيني للجينات المسؤولة عن تحول الخلايا من الحالة الظهارية الساكنة إلى الحالة الوسيطة المتحركة باستخدام تقنية تفاعل سلسلة البلمرة الكمية (q-PCR). كان متوسط الحجم المثالي لقطيرات المستحلبات النانوية للعينات الفارغة NE-pH8 والمحملة DTX+TQ /NE-pH8 يعادل 56.04 ± 4.00 nm و 235.0 ± 10.00 nm على التوالي. كما أن متوسط الحجم المثالي للعينات الفارغة NE-pH7 والمحملة DTX+TQ /NE-pH7 يعادل 117.3 ± 8.0 nm و 373 ± 6.8 nm، على التوالي. لقد وجد ان نصف التركيز الأقصى المثبط ل DTX+TQ /NE-pH8 كان أقل بكثير من التركيبة الحرة ل (DTX +TQ) عند تعريضهم لخلايا MCF-7 و MDA-MB-231. وقد أدى التعرض للدوسيتاكسال والثيموكوينون إلى تأثير مضاد، بينما أدى العلاج ب DTX + TQ / NE-pH8 إلى تأثير تآزري على كل الخلايا التي تم اختبارها. كشفت

الملاحظات المستمدة من تحليل موت الخلية المعالجة ب DTX+TQ /NE-pH8 أن البلعمة الذاتية يمكن أن تعزز موت الخلايا المبرمج مع وجود آلية محتملة تمارس تأثيراً تآزرياً لموت الخلايا في خلايا MCF-7 و MDA-MB-231. علاوة على ذلك فقد تم تثبيط تكاثر الخلايا T47D في عينات المختبر بشكل كبير بسبب التأثير التآزري لتركيبية DTX+TQ /NE-pH7 بالإضافة إلى الكشف عن زيادة ملحوظة في موت الخلايا المبرمج المصحوب بالحث على البلعمة الذاتية في خلايا T47D. كما تم ملاحظة أن تركيبية DTX+TQ /NE-pH8 منعت تكاثر الخلايا السرطانية البشرية عن طريق تعطيل دورة الخلية في الطورين S-phase و G₂/M في خلايا MCF-7 و MDA-MB-231 السرطانية على التوالي. تسببت التركيبية DTX+TQ /NE-pH8 في انخفاض كبير في نشاط هجرة الخلايا السرطانية MCF-7 و MDA-MB-231 كما تم الكشف عنها بواسطة اختبار التنام الجروح. جميع الملاحظات والنتائج السابقة تم تأكيدها عن طريق الكشف عن تثبيط الخلايا الجذعية السرطانية للثدي والمصحوب بانخفاض في التعبير الجيني للجينات SNAIL-1 و TWIST-1. كما أن التركيبية DTX+TQ /NE-pH7 قد عطلت خلايا T47D السرطانية في الطور G₂/M وشجعت على استنزاف الخلايا الجذعية لسرطان الثدي وأعاقت التعبير الجيني للجينات TWIST-1 و ZEB-1. بشكل عام تُظهر النتائج أن التوصيل المشترك للدوسيتاكسال والثيموكوينون في مستحلب نانو البوراج يمكن اعتباره نهجاً علاجياً واعدًا وفعالاً لسرطان الثدي حيث يعزز فعالية الدوسيتاكسال ضد خلايا سرطان الثدي البشرية عن طريق تقليل الجرعة الفعالة المطلوبة وبالتالي تقليل السمية ويمكن أن يمنع نشاط الإشارات بين الخلايا المسؤولة عن هجرة الخلايا. لذلك تقترح الدراسة تركيبية مستحلب نانو البوراج المحتوي على الدوسيتاكسال والثيموكوينون كنهج محتمل لمنع نمو سرطان الثدي من التكاثر والهجرة.

Combination Therapy of Thymoquinone with Docetaxel Delivered by Nanoemulsion-based Borage as a Novel Approach in Treating Breast Cancer

by

Raghdah Salim Bawadud

Principal supervisor

Prof. Mayson Husni Alkhatib

Co-supervisor

Prof. Hana Mohamed Gashlan

Abstract

Metastatic breast cancer is an advanced stage that is highly dependent on migration signaling pathways, though it remains unclear what mechanisms control the maintenance of tumorigenic cells that drives the migration and invasion processes. The drug delivery approach has vastly developed with the emergence of nanotechnology, particularly targeted nanoemulsions (NEs) which have the potential to improve the bioavailability of drugs leading to enhancement in their therapeutic efficiency. In this study, the potential role of borage oil-based nanoemulsion was investigated for the simultaneous administration of the microtubule inhibitors docetaxel (DTX) and thymoquinone (TQ) against MCF-7 and MDA-MB-231 and T47D human breast cancer cell lines. The NE was prepared by ultra-sonication and physically characterized using dynamic light scattering. The *in vitro* evaluation of cytotoxicity involved sulforhodamine B (SRB) assay, alongside a DNA fragmentation assessment. In addition, the distribution of cell cycle, apoptosis, autophagy, and breast cancer stem cells (BCSC) population were evaluated using flow cytometric analysis. Further molecular investigations of selected epithelial-mesenchymal transition genes expression were assessed utilizing a quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR) technique. The optimum mean droplet size formulated for blank-NE-pH8 and the DTX+TQ /NE-pH8 were 56.04 ± 4.00 nm and 235.00 ± 10.00 nm,

respectively. The optimum droplet sizes for blank-NE-pH7 and DTX+TQ /NE-pH7 were 117.3 ± 8.0 nm and 373 ± 6.8 nm, respectively. The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of DTX+TQ /NE-pH8 was considerably lower than the free combination (DTX +TQ) when subjected to MCF-7 and MDA-MB-231 cells. The exposure to DTX plus TQ resulted in an antagonistic effect, whereas treatment with DTX+TQ /NE-pH8 resulted in a synergism effect on both tested cells. The observations derived from the cell death analysis of the DTX+TQ /NE-pH8 have revealed that autophagy can promote apoptosis with a possible mechanism that exerts a synergetic effect of cell death in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Moreover, the *in vitro* proliferation of T47D cells was significantly inhibited with a synergistic effect by the DTX+TQ /NE-pH7 formulation. In addition, a significant increase in apoptosis accompanied by the induction in autophagy was detected in T47D cells. DTX+TQ /NE-pH8 formulation inhibited the cellular proliferation by the G₂/M phase and S-phase cell cycle arrest in MCF-7 and MDA-MB-231 cells, respectively. DTX+TQ /NE-pH8 caused a significant reduction in the cellular migration activity in MCF-7 and MDA-MB-231 cells as detected by the wound-healing assay. This observation could be mediated through the inhibition of BCSC, accompanied by marked down-regulation of SNAIL-1 and TWIST-1 expression. DTX+TQ /NE-pH7 arrested T47D cells at the G₂/M phase, promoted the depletion of BCSC population, and inhibited the expression of TWIST-1 and ZEB-1. Overall, the results demonstrated that the co-delivery of DTX and TQ within NE formulation might be considered as a promising and effective therapeutic approach for breast cancer that enhances the DTX efficacy against human breast cancer cells by reducing its effective dose and thus reducing the associated toxicity that could prevent the intercellular signaling function of metastasis.