العلاج المدمج من التوبوتيكان والكارفاكرول المنقول بواسطة المستحلب النانومتري المعتمد على زيت السمسم كنهج جديد في معالجة السرطان

هديل محمد الحسن بيومي

إشراف

أ. د. مديحة نوح الصيني

المستخلص

هدفت هذه الدراسة إلى تحسين السمية الخلوية للتوبوتيكان عن طريق تقليل جرعة العلاج الكيميائي الفعالة وبالتالي آثارها الجانبية. لتحقيق هذا الهدف، تم فحص طرق مختلفة: تم دمج التوبوتيكان مع مضاد السرطان الطبيعي، الكارفاكرول، إما مذاب في الماء أو محمّل في مستحلب نانومتري أساسه زيت السمسم، والتوبوتيكان كعلاج وحيد تم دمجه في المستحلب النانومتري من زيت السمسم. بعد تطوير ست تركيبات من المستحلب النانومتري من زيت السمسم، مع نسب مختلفة من الزيت-إلى-المواد الخافضة للتوتر السطحي، عن طريق تقنية الموجات فوق الصوتية عالية الضغط، تم وصف الخصائص الفيزيائية لصيغ المستحلب النانومتري من زيت السمسم، بواسطة جهاز قياس الزيتا، ومقياس الطيف فوق البنفسجي، والميكروسكوب الإلكتروني النافذ، واختبار تحرر الدواء في المختبر. تم تقييم التأثيرات السامة للخلايا من العلاجات المختلفة في ستة خلايا سرطانية مختلفة (سرطان عنق الرحم، وسرطان القولون، وسرطان الثدي، وسرطان الكبد، وسرطان المبيض، وسرطان الرئة) بعد أربعة وعشرين ساعة فترة احتضان باستخدام اختبار البنفسج البلوري لتحديد تثبيط النمو، والصبغ بالكوماسي بلو أو بالدابي المشع لتقييم الشكل الخلوي. بالإضافة إلى ذلك، تم تحديد الامتصاص الخلوي للتوبوتيكان. وفقًا لنتائج التوصيفات الفيزيائية لصيغ المستحلب النانومتري من زيت السمسم، كان المستحلب النانومتري من زيت السمسم ٣:١٥ (نسبة زيت السمسم: المواد الخافضة للتوتر السطحي)، مستقرا بمرور الوقت، وكان حجم الجسيمات صغيرًا (١١٥,٢٠ ± ١,٠٨ نانومتر) وكان صاحب أقل نسبة المادة الخافضة للتوتر السطحي (١٥٪) بالمقارنة مع المستحلبات النانومترية الأخرى من زيت السمسم. عندما تم تحميل التوبوتيكان في المستحلب النانومتري من زيت السمسم، كانت جزيئاته مستقرة وكروية وانخفض حجمها بشكل كبير من (١١٥,٢٠ ± ١,٠٨ نانومتر) إلى (٧٤,٦٨ ± ٧,٣٨ نانومتر) وأظهرت تحريرا مفيدًا طويل الأمد ومستدام للتوبوتيكان على مدار أربعة وعشرين ساعة. عندما عولجت الخلايا باستخدام التوبوتيكان مع الكارفاكرول، نتج انخفاضًا بمقدار ٧,٧٠ و ٥,٧١ ضعف في تركيز التوبوتيكان الأقصى المثبط لنصف الخلايا في خلايا سرطان عنق الرحم وسرطان القولون، على التوالي، بينما نتج عن علاج خلايا سرطان الثدي،

و الكبد، والمبيض، والرئة السرطانية -1.49، ١,٣٣-، ١,٥٠- و ١,٢٦ ضعفًا في تركيز التوبوتيكان الأقصى المثبط لنصف الخلايا، على التوالي ، بالنسبة إلى العلاج الفردي بالتوبوتيكان. في جميع الخلايا السرطانية التي تم اختبارها، تأثيرات تركيبة المستحلب النانومتري من زيت السمسم المحملة بـالتوبوتيكان على تكاثر الخلايا السرطانية، شكل نواة الخلية، وامتصاص الخلايا الخلوي للتوبوتيكان ، أظهرت مقاومة انتشار كبيرة ، وانخفاض تركيز التوبوتيكان الأقصى المثبط لنصف الخلايا بشكل ملحوظ ، وتغيرات واضحة في موت الخلايا المبرمج ، والتي قد تكون بسبب تعزيز امتصاص الخلايا للتوبوتيكان. تم تقييم آليات موت الخلايا عن طريق قياس مستويات الالتهاب الالتهابي انترلوكين ٦ والالتهام الذاتي (LC-3) وكاسبيز ٣. في خلايا سرطان الثدي والكبد، تُعزى السمية الخلوية إلى التأثير المضاد للالتهابات، وإلى تحريض موت الخلايا المبرمج من النوع الأول والموت الالتهام الذاتي من النوع الثاني. في خلايا سرطان عنق الرحم، على الرغم من أن آلية تحريض موت الخلايا المبرمج كانت أيضًا من خلال كلا النوعين من موت الخلايا (الأول والثاني)، لم يتم ملاحظة تأثير مضاد للالتهابات. في خلايا القولون، عزز المستحلب النانومتري من زيت السمسم حساسية الخلايا لـلتوبوتيكان عن طريق تثبيط الالتهام الذاتي، بالإضافة إلى التأثير المضاد للالتهابات وتحريض موت الخلايا المبرمج من النوع الأول عن طريق زيادة مستويات كاسبيز ٣ مقارنةً بالخلايا غير المعالجة. مع ذلك، أدت إضافة الكارفاكرول إلى المستحلب النانومتري من زيت السمسم المحمل بالتوبوتيكان إلى زيادة كبيرة في قيم التوبوتيكان القصوى المثبطة لنصف الخلايا في جميع الخلايا السرطانية بالنسبة للمعالجة بالمستحلب النانومتري من زيت السمسم المحمل بالتوبوتيكان بسبب فصل الطور. في الختام، عزز الكارفاكرول السمية الخلوية والامتصاص الخلوي للتوبوتيكان فقط في خلايا سرطان عنق الرحم والقولون، ولكنه سبب مقاومة التوبوتيكان في الخلايا الأخرى. من ناحية أخرى، أدى تحميل التوبوتيكان في المستحلب النانومتري من زيت السمسم ٣:١٥ إلى تحسين سميته الخلوية في جميع الخلايا السرطانية المختبرة. لذلك، تحميل التوبوتيكان في المستحلب النانومتري من زيت السمسم ٣:١٥ هو النهج الجديد في علاج السرطان.

Combination Therapy of Topotecan with Carvacrol Delivered by Nanoemulsion-based Sesame Oil as a Novel Approach in Treating Cancer

Hadeel Mohamed Elhassan Bayoumi

Principal Supervisor

Prof. Madeha Nooh Alseeni

Abstract

This study aimed to enhance topotecan (TOPO) cytotoxicity by minimizing its effective chemotherapeutic dose and thereby its side effects. To achieve this goal, different approaches were examined: TOPO was combined with the natural anticancer agent, carvacrol, either solubilized in water or loaded in sesame oil-based nanoemulsion (SO-NE); and TOPO, as lone treatment, was incorporated into SO-NE. After developing six SO-NE formulations, with different oil-to-surfactants ratios, by high-pressure ultrasonication technique, the produced SO-NE formulas were physically characterized by zeta-sizer, ultraviolet-spectrophotometer, transmission electron microscope (TEM), and *in vitro* drug release assay. The cytotoxic effects of different treatments were evaluated in six different cancer cell lines (HeLa cervical, HCT116 colon, MCF-7 breast, HepG2 liver, SKOV3 ovarian and A549 non-small cell lung) after 24 hours-incubation using crystal violet assay for growth inhibition determination, and Coomassie blue or DAPI fluorescent staining for cellular morphology assessment. Additionally, the cellular uptakes of TOPO were determined. According to the results of the physical characterizations for the SO-NE formulas, 3:15 (SO: surfactants ratio) SO-NE, was stable over time, had small particle size (115.20 ± 1.08 nm) and had the least surfactants percentage (15%) compared to the other SO-NEs. When TOPO loaded in SO-NE, its particles were stable, spherical, significantly decreased in size to (74.68 ± 7.38 nm) and exhibited beneficial TOPO prolonged and sustained release over 24 hours. When cells were treated with carvacrol/TOPO, HeLa and HCT116 resulted in 7.70- and 5.71-fold reduction in TOPO half maximal inhibitory concentration (IC_{50}), respectively, while treatment of

MCF7, HepG2, SKOV3, and A549 cancer cells resulted in 1.49-, 1.33-, 1.50- and 1.26-fold increase in TOPO IC_{50}, respectively, relative to TOPO single treatment. In all cell lines tested, the effects of TOPO-loaded SO-NE formula on cancer cells proliferation, nuclear morphology, and TOPO cellular uptake, displayed significant anti-proliferation, considerable decreased IC_{50} and clear apoptotic changes, which may be due to the enhanced cellular uptake of TOPO. The mechanisms of cell death were assessed by measuring inflammatory interleukin-6, autophagy LC-3 and caspase-3 levels. In MCF-7 and HepG2 cells, the cytotoxicity was attributed to the anti-inflammatory effect, and to the induction of type I apoptotic and type II autophagic cell death. In HeLa cells, although the apoptotic induction mechanism was also through both types of cell death (I and II), an anti-inflammatory effect was not noticed. In HCT116 cells, SO-NE enhanced the sensitivity of cells to TOPO via autophagy inhibition, in addition to the anti-inflammatory effect and the induction of type 1 apoptosis by increasing caspase-3 levels in comparison with control. However, carvacrol addition to the TOPO-loaded SO-NE led to a significant increase in IC_{50} values in all cell lines relative to TOPO-loaded SO-NE treatment due to phase separation. In conclusion, carvacrol enhanced TOPO cytotoxicity and cellular uptake only in HeLa and HCT116 cancer cells but caused TOPO resistance in the other cells. On the other hand, loading TOPO in 3:15 SO-NE had remarkably improved its' cytotoxicity in all tested cancer cells. Therefore, TOPO loaded in 3:15 SO-NE is the novel approach in treating cancer.