The Republic of Iraq

Ministry of Higher Education and

Scientific Research

University of Mosul / College of Sciences

Department of Biology

Cellular and Molecular Effect of ZnS Qdot NPs-LPS with Lipofectamine Complex on Breast Cancer MCF-7 Cell Line as Promising Drug

Asmaa Abdul Azeez Abdullah Ahmad Hadeed

Ph.D. Thesis

Biology /Microbiology

Supervised By

Prof. Dr. Hiyam Adil Ibrahim Al-Taii

2023 A.D. **1444 A.H.**

Summary

Breast cancer is the women's most commonly diagnosed cancer worldwide**.** It's a randomly uncontrolled growth that develops from mutations of genes responsible for cellular growth regulation, which activates oncogenes (OGs) and inactivates Tumor-Suppressor Genes (TSGs), leading to invasion and metastasis. Because of its negative charge, Lipopolysaccharide (LPS) was used in a modified method instead of Deoxyribonucleic acid (DNA) and small interfering RNA (siRNA) in promising a therapeutic complex with Zinc Sulfide Quantum Dots Nanoparticles-Lipopolysaccharide (ZnS Qdots NPs-LPS), once alone and other with lipofectamine on breast cancer MCF-7 cell line and comparing it with the WI-38 healthy cell line. Lipopolysaccharide was isolated and extracted from Gram-negative bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) from patients who suffered from urinary tract infections (UTIs) by using a commercial kit for the first time locally. The purity of LPS was evaluated using a sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kit.

The study results showed that 55/300 (18.3%) samples were positive for *E. coli* collected from hospitals in Mosul city/ Iraq and it was observed that the phenotypes for four groups strains were (7144172, 7144552, 7144752, and 0 044 552) by using analytical profile index (API 20E) Kit. In addition, the alignment of virulence factors ***papC*** and ***iutA*** had a unique genotype that causes UTIs and that produces a biofilm. The results were registered at the National Center for Biotechnology Information under the name *E. coli* HYAH70, which have numbers ON994450 and ON994451, respectively, the former which had ***papC***, considered a uropathogenic *E. coli* (UPEC).

The properties of the ZnS Qdots NPs-LPS promising complex were determined by using Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Transmission Electron Microscopy (TEM), Ultraviolet-visible absorption techniques (UV-vis), Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM), and Energy-Dispersive X-ray analysis (EDX).

The XTT assay was used on MCF-7 to detect the cell viability and cytotoxicity after transfection of ZnS Qdots NPs-LPS with lipofectamine at a concentration of 12.5 µg/ml after 24 hr indicating the inhibition of breast cancer growth at a percentage of (48.79%) with IC50: 12.66 µg/ml which was recognized. In the application of treatment with ZnS Qdots NPs-LPS without lipofectamine, the cytotoxic percentage was (34.06%) with IC50: 18.44 µg/ml. While the promising complex effect was weak on control cells WI-38.

When TUNEL assay was used to detect apoptotic cells that undergo extensive DNA degradation on the MCF-7 cell line under the fluorescent microscope by transfected ZnS Qdot-NPs- LPS with lipofectamine at a concentration of 12.5 µg/ml of therapy after 6 hr. A higher proportion of positive, and bright nuclei green coloration due to the well-evident apoptosis rather than necrosis with a high percentage (78.9%) of cell death, while in a comparison with ZnS Qdot-NPs- LPS, apoptosis only was (37.5 %). On the other hand, WI-38 showed little apoptotic signs.

Reverse transcription polymerase chain reaction (Rt-qPCR) analysis was performed to determine gene expression and fold changes of a set of genes *PIK3CA, HER2, TP53, BRCA1, BAX, IFN-γ,* and *IL-6* and some epigenes (miRNA34a and HOTAIR) as molecular biomarkers. The results showed an increment in fold changes of *TP53, BRCA1, BAX, IFN-γ,* and miRNA34a when transfection by ZnS Qdot-NPs-LPS with lipofectamine on MCF-7. However, the fold change of *PIK3CA, HER2, IL-6,* and HOTAIR significantly decreased, while the treatment with ZnS Qdot-NPs-LPS without lipofectamine showed trivial differences in gene expression.

The present study showed that the combination of ZnS Qdots NPS-LPS with lipofectamine exhibited more significant cell-killing solid abilities on MCF-7 breast cancer at a concentration of 12.5 µg/ml after 24 hr compared to the treatment by ZnS Qdots NPs-LPS with moderate effect. On the other hand, the treatment on WI-38 healthy cell line showed a weaker effectiveness.

الخلاصة

سرطان الثدي هو أكثر أنواع السرطانات شيوعا عند النساء في جميع أنحاء العالم. يتكون السرطان من نمو الخلايا بشكل غير مسيطر عليه ناتج عن طفرة في الجينات المسؤولة عن تنظيم النمو الخلوي المسبب للسرطان ،فيعمل على تنشيط الجينات المسرطنة وكبت الجينات المثبطة للورم وقد يؤدي إلى إجتياح السرطان وانتشاره الى اجزاء مختلفة من الجسم. استخدمت طريقة محورة في هذه الدراسة تعتمد على استعمال عديد السكريات الدهني LPS(بدلاً من DNA و siRNA) بسبب امتلاكه الشحنة السالبة وربطه مع الليبوفكتامين او بدونه في مركب علاجي واعد مع الجزيئات النانوية لكبريتيد الزنك ZnS Qdot-NPs على خط خلايا سرطان الثدي MCF-7 ومقارنتها مع الخلايا الطبيعيه WI-38 . وقد تم استخلاص LPS سلالة من الإشريكية القولونية *Escherichia coli* المسببة لالتهاب المسالك البولية مستخدمين عدة تجاري لأول مرة محلياً. تم تقييم نقاوة LPS باستخدام تقنية الاليزا (ELISA).

اظهرت نتائج الدراسة ان ٥٥(١٨,٣٪) عينة من اصل ٣٠٠ عينة ادرار جمعت من مستشفيات مدينة الموصل و موجبة للإشريكية القولونية كانت ذا نمط ظاهري لأربعة مجاميع من السلالات (٧١٤٤١٧٢ ، ٧١٤٤٥٥٢ ، ٧١٤٤٧٥٢ ، ٥٥٢ ٠٤٤ ٠) باستخدام API 20E . سجلت نتائج عوامل الضراوة ***papC*** و***iutA*** والمسؤولة عن تكوين الغشاء الحيوي والتابعة للاشريكية القولونية الممرضة(UPEC) Uropathogenic *Escherichia coli* في المركز الوطني لتقنيات المعلومات الحيوية (NCBI) تحت اسم *E. coli* HYAH70 ، والتي لها أرقام تسلسل (ON994450 و ON994451 ،على التوالي).

حددت خصائص معقد الجزيئات النانوية لكبريتيد الزنك وعديد السكاريد الدهني باستخدام مقياس طيف الاشعة تحت الحمراء باستخدام تحويل فورييه (FTIR) وطريقة النفاذ الالكتروني المجهري الدقيق(TEM) وتقنيات الامتصاص المرئية للأشعة فوق البنفسجية (UV-vis) واستخدام طريقة المسح الانبعاثي الالكتروني المجهري الدقيق (FESEM) , تحليل الأشعة السينية المشتتة للطاقة(EDX).

استخدام فحص XTT للكشف عن حيوية وسمية الخلايا بعد معاملتها بالمركب العلاجي ZnS Qdots NPs-LPS مع ليبوفكتامين بتركيز ١٢,٥ ميكروغرام / سم^{٣} والذي اظهر تثبيط نمو سرطان الثدي بالنسبة المئوية (٤٨,٧٩٪) مع التركيز المثبط لـ ٥٠٪ IC50: 12.66 حيث كشف عنه بعد 24 ساعة تحضين. اما عند تطبيق المركب العلاجي ZnS Qdots NPs-LPS بدون ليبوفيكتامين كانت النسبة المئوية المثبطة للنمو (٣٤,٠٦٪) مع IC50 18.44 ميكروغرام / سم^{٣}. بينما كانت النتائج ذات تأثير ضعيف على خلايا الخط السليمة WI-38.

تم استخدام طريقة TUNEL للكشف عن موت الخلايا المبرمج التي تخضع لتدهور واسع النطاق للحمض النووي وفحص خط خلايا سرطان الثدي المعاملة بالمركب العلاجي ZnS Qdots NPs-LPS

بوجود ليبوفكتامين تحت المجهر الفلوري بتركيز ١٢,٥ ميكروغرام / مل لمدة ٦ ساعات ؛ ظهر لون أخضر براق كنتيجة ايجابية للتاثير الواضح على الخلايا بسبب موتها المبرمج الواضح بعد مرور ٢٤ ساعة بنسبة (٧٨,٩٪) بدلاً من النخر الخلوي ، في حين اظهرت نتيجة معاملة الخلايا بالمركب العلاجي ZnS Qdot-NPs- LPS بدون ليبوفكتامين نسبة موت خلوي مبرمج (٣٧,٥٪). و من ناحية أخرى ظهر القليل من علامات الموت المبرمج على خلايا الخط السليمة WI-38.

أجريت تقنية التضخيم الكمي اللحظي (Real Time-qPCR) لتحديد التعبير الجيني لمجموعة من الجينات *(PIK3CA, HER2, TP53, BRCA1, BAX, IFN-γ,* and *IL-6)* وعوامل الوراثة فوق الجينية (miRNA34a and HOTAIR) كمعلمات حيوية جزيئية ، حيث أظهرت النتائج زيادة في التعبير الجيني (*TP53* و *BRCA*1 و *BAX* و *IFN-γ* و miRNA34a) وانخفاض التعبير الجيني (*PIK3CA* و *HER2* و *IL*-6 و HOTAIR)، في حين أظهرت النتائج تغيرات ليست بذات نتيجة إحصائية واضحة على التعبير الجيني عند معاملتها بالمعقد العلاجي ZnS Qdots NPs-LPS بدون ليبوفيكتامين.

في الدراسة الحالية اظهر المركب العلاجي ZnS Qdot-NPs-LPS مع ليبوفيكتامين له قدرات قتل خلوي على خلايا سرطان الثدي استنادا الى نتائج البحث على خط خلايا سرطان الثدي MCF-7 بتركيز ١٢,٥ ميكروغرام / سم^{٣} بعد ٢٤ ساعة تحضين ، بينما أظهر العلاج بواسطة ZnS Qdots NPs-LPS تاثير معتدلاً. من ناحية أخرى ، أظهر العلاج ضعف في فعاليته على خط الخلايا السليمة WI-38 .

جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل / كلية العلوم
قسم علوم الحياة

التأثير الخلوي والجزيئي لمعقد ZnS Qdot NPs-LPS مع ليبوفكتامين على خط خلايا سرطان الثدي MCF-7 كعلاج واعد

أسماء عبدالعزيز عبدالله أحمد حديد

اطروحة دكتوراه

علوم الحياة / احياء مجهرية

باشراف
الاستاذ الدكتورة
هيام عادل ابراهيم الطائي

١٤٤٤هـ ٢٠٢٣م