Alexandria University

Faculty of Pharmacy

Department of Pharmaceutics

Formulation of nanocarrier-based inhalation system for treating lung carcinoma

Thesis Submitted to the Department of Pharmaceutics

Faculty of Pharmacy, Alexandria University

In partial fulfillment of the requirements of the degree of

Doctorate of Philosophy of Pharmaceutical Sciences

in

Pharmaceutics

By

Dina Mohamed Gaber Abd El-Hamid

MSc. in Pharmaceutical Sciences (November 2013)

Alexandria University

Faculty of Pharmacy

December- 2016

P.U.A. Library
Library C
Faculty of : Ph.D.M
Serial No : 198
Classification 615.1

الملخص العربي

صياغة أنظمة حوامل نانومترية للاستنشاق لعلاج سرطان الرئة

مرض السرطان له أشكالٍ كثيرة لا تعد ولا تحصى ويؤثّرُ على ملايينِ الناسِ حول العالم وتَنْمو نسبةِ الاصابة به بصورة خَطِيرةٍ الى أنْ أصبح مرضَ العالمَ الأخطرَ الذي لم يسبق له مثيل. يعد سرطان الرئةِ ورم خبيثٍ يتميّزَ بنمو الخليةِ الذي لا يمكن السيطرة عليهِ في أنسجةِ الرئةِ. تَتضمّنُ الطرقَ الأكثر شيوعاً لعلاج السرطان استعمال العلاج الكيميائي، العلاج بالأشعة و/ أو التدخل الجراحي وينتج عن هذا العلاج التقليدي آثار جانبية حادّةَ، لأنه لا يُميّزُ بين الخلايا السرطانيةِ والخلايا السليمة بالإضافة الي انخفاض نسبة استجابة الورمِ للعلاج، وذلك بسبب الاتاحة الحيوية المنخفضة للعقار و هناك عديد من المحاولات لتحقيق التراكم الأمثل للعقار داخل النسيج السرطانى، لذلك تم تطوير عدد من الحوامل النانومترية مثل اللايبوسومات والجسيمات النانونية المعروفة بقدرتها على اختراق انسجة الورم والتراكم بداخله.

وقد تزايد الاهتمام في الأونة الأخيرة بالأدوية العشبية مثل مركبات الفلافونويد كعقار بديل لعلاج السرطان أكثر أمناً وأسهل توافرا وأرخص ثمنا مقارنة بالأدوية الكيميائية. وتصف العديد من التقارير قدرة بعض الادوية العشبية على مقاومة السرطان وذلك بسبب احتوائهم على مضادات الأكسدة.

هذا ويعد توصيل العلاج الكيميائي و/او العشبي عن طريق الاستنشاق الرئوي نظاما دوائيا واعدا لعلاج سرطان الرئة حيث ان بعد استنشاق الدواء يتمركز المُركّب النشط في او قرب موقع فاعليته وبالتالي فان الجرعة الكلية المعالجة التي تعطى للمريض تكون اقل.

تهدف هذه الرسالة الي تركيز وتسليط الضوء على استخدام عقار الميرستين نظرا لأهميته الصحية في علاج كثير من الامراض مثل المرض السكري والجلطات والسرطان وعلى رغم من اهمية هذا العقار الا انه يعاني من عقبات كثيرة مثل ضعف الذوبان وعدم الثابتية في الحرارة المرتفعة ودرجة الحموضة الفسيولوجية و.لذلك تهدف هذه الرسالة الى إظهار أهمية الحوامل النانومترية لتحسين استقرار وفاعلية عقار الميرستين عبر ادماجه في الجزيئات النانونية الدهنية الصلبة للعلاج الموضعي لسرطان الرئة عبر الاستنشاق.

تم تقسيم العمل في هذه الرسالة الى ثلاث أجزاء:

<u>الجزء الأول:</u>

وضع بروتوكول لضمان ثبات جزيئات الميرستين النانونية الدهنية الصلبة بداية من طريقة التحضير حتى وصولها لمكان التأثير.

كما ذكر من قبل ان ثباتيه عقار الميرستين تعتمد على درجة الحرارة ودرجة الحموضة لذلك تم إجراء دراسة ثبات مفصلة لكل من عقار الميرستين وجزيئات الميرستين النانونية الدهنية الصلبة في محاولة لإيجاد وسيلة في تحقيق ثبات العقار في درجة الحموضة الفسيولوجية ليتم توصيله بكفاءة إلى الرئة للعلاج الموضعي للسرطان. و قد تم دراسة معدل تكسير العقار في السوائل البيولوجية المختلفة. وبالإضافة إلى ذلك، تم الكشف عن دور المواد المضادة للأكسدة، ومثبتات ومساعدات الانحلال في ثبات العقار.

وقد اسفرت النتائج عن طريقة إعداد جزيئات الميرستين النانونية الدهنية الصلبة في درجات الحرارة ٣٥ و٥٥ درجة مئوية الحصول على تركيبات ثابتة كيميائيا. على العكس من ذلك، أدى التحضير في ٨٠ درجة مئوية الي تدهور ٦٠٪ من إجمالي محتوى العقار. وان عدم ثبات العقار في درجات الحرارة المرتفعة يمكن تجنبه عن طريق وضع مضادات الأكسدة القابلة للذوبان في الدهون مثل فيتامين ه او بوتيل هيدروكسي تولوين في تركيز ٠,٠٥٪ للأول و ٠,٠١٪ للأخير. بالإضافة الى لا Poloxamer 407 و لا Tween 80 في تركيزات ٢٪ عن السابق و ٠,٢٥٪ للأخير يمكن أن يوفروا الثبات الكافي لعقار الميرستين إما في حالته او بعد تحميله في جزيئات نانونية دهنية صلبة. واظهرت النتائج ان وجود كبريتيت الصوديوم بتركيز ٠,٠٢٥٪ ادي الي ثبات العقار في درجة الحموضة الفسيولوجية.

الجزء الثاني:

جزيئات الميرستين النانونية الدهنية الصلبة للعلاج الموضعي لسرطان الرئة: تحضير وتقييم والدراسة المعملية للسمية الخلوية.

يعد عقار الميرستين عقار واعد بناءً على نتائج الأبحاث السابقة من حيث فاعليته لعلاج العديد من اشكال السرطان المختلفة ولكن نظراً لمشاكل العقار من حيث الذوبان والثبات يحد من استخدامه كدواء فعال في هذه الحالات.
وعليه يهدف هذا الجزء الى معالجة القصور في هذا العقار عن طريق تحميله في " جزيئات نانونية دهنية صلبة " ودراسة خصائصه الفيزوكيميائية وأيضا التعرف على فاعليته في القضاء على الخلايا السرطانية معمليا.
ينقسم هذا الجزء الى ثلاثة فصول:

الفصل الأول:

دراسة الجوانب التقنية للتحضير للحصول على جزيئات الميرستين النانونية الدهنية الصلبة المثلي والتوصيف المعملي من حيث الخصائص الفيزوكيميائية

يهدف هذا الفصل إلى إعداد جزئيات نانونية دهنية صلبة محملة بالميرستين بطريقة التجانس الساخن و باستخدام اربعة انواع مختلفة من الدهون (**Gelucire39/01، Gelucire50/13، Gelucire 44/14 و Compritol**). وفى هذا الجزء تم صياغة العديد من الجزيئات الدهنية الصلبة ودراسة استخدام **Poloxamer 407** كمثبت و تم دراسة تأثير تركيز الدهون والمثبتات على قدرة احتواء الدواء. كما تم دراسة أهم ما يميز الصياغات المعدة وتقييمها عن طريق تعيين معدل انطلاق الدواء في المعمل وقياس قوة الالتصاق الحيوي. وعلاوة على ذلك، فقد تم دراسة السمية الخلوية المعملية باستخدام خلايا سرطانية للرئة مثل **A549** وتأثير الصياغات المختارة في القضاء على الخلايا السرطانية. وعلاوة على ذلك، تم دراسة تأثير الوقت على الثباتية في ثلاثة ظروف تخزينية مختلفة لمدة ستة أشهر.

وقد اسفرت النتائج عن أن اختيار طريقة التجانس الساخن سمح بالتحضير الناجح لجزئيات الميرستين الدهنية الصلبة ذات حجم مقبولا (٣١٥,٨-٦٩,٧٢ نانو متر). كما أظهر ان استخدام (**Gelucire50 / 13-Compritol**) او(**Polxamer 407**) **Gelucire39/01-**) اعطى تأثيرا ايجابيا على قدرة احتواء كمية أكبر من الدواء ومعدل انطلاق بطيء. وبناءاً على نتائج السمية الخلوية المعملية فقد تبين ان الجزيئات النانونية الدهنية الصلبة المحضرة باستخدام (**Gelucire50 / 13-Compritol**) لها

فاعلية أقوى في القضاء على الخلايا السرطانية بتركيز اقل من الجزيئات النانونية الدهنية الصلبة المحضرة باستخدام (Gelucire 39/01-Poloxamer 407). واظهرت النتائج ايضا انه يمكن تخزين جزيئات الميرستين النانونية الدهنية الصلبة إما في درجة حرارة الغرفة ولكن يجب أن تكون محمية من الضوء لمدة شهر أو في الثلاجة لمدة ستة أشهر

الفصل الثاني:

صياغة الجزيئات النانونية الدهنية الصلبة المحملة بفيتوسوم الميرستين بهدف زيادة التحميل الدوائي

يهدف هذا الفصل الى تحضير عقار الميرستين على شكل فيتوسوم بإستخدام فوسفوليبيدات (**ليبويد اس ١٠٠**) بهدف زيادة التحميل الدوائي في الجزيئات النانونية الدهنية الصلبة. تم تحضير الفيتوسوم عن طريق الإذابة والتبخير كذلك تمت دراسة نوعية تفاعل الارتباط باستخدام المسح التفاضلي الحراري (DSC) و التحليل الطيفي باستخدام الأشعة تحت الحمراء (FTIR). كما تم كذلك تحميل فيتوسوم الميرستين في الجزيئات النانونية الدهنية الصلبة وتم توصيف الجزيئات المحملة بفيتوسوم الميرستين والجزيئات المحملة بالعقار من حيث حساب الحجم، جهد الشحنات، كفاءة تحميل الدواء، ومعدل انطلاق الدواء.

وقد أسفرت النتائج ان تحضير الفيتوسوم أسفر عن مقدرة اعلي لتحميل العقار بداخل الجزيئات النانونية مقارنة بتحميل العقار منفرداً. وبتفسير نتائج معدل الانطلاق والتوصيف المعملي من حيث الخصائص الفيزوكيميائية أظهرت النتائج بتفوق الفيتوسوم على العقار الغير معالج.

الفصل الثالث:

الجزيئات النانونية الدهنية الصلبة المحملة بفيتوسوم الميرستين والمقترنة باللاكتوفيررين كمادة محددة لإستهداف سرطان الرئة

يهدف هذا الفصل لدراسة تأثير وجود اللاكتوفيررين كمادة مقترنة على سطح الجزيئات النانونية الدهنية الصلبة على زيادة فاعليتها كمادة تستهدف الخلايا السرطانية الرئوية.

تم في هذا الفصل تحميل اللاكتوفيررين على الجزيئات النانوية المحضرة في الفصل السابق وتم توصيف الجزيئات المقترنة باللاكتوفيرين ومقارنتها بالجزيئات الغير مقترنة من حيث حساب الحجم، جهد الشحنات، كفاءة تحميل الدواء، معدل انطلاق الدواء وقياس السمية الخلوية و الامتصاص الخلوى المعملي.

وقد أظهرت النتائج عدم وجود تغيير ملحوظ في الخصائص الفيزوكيميائية بين الجزيئات مع وجود زيادة ملحوظة في الفاعلية على القضاء على الخلايا السرطانية للجزيئات المقترنة بالاكتوفيررين باستخدامها في تركيزات أقل.

الجزء الثالث:

المركبات المجهرية الجافة للاستنشاق التي تتضمن الجزيئات النانونية الدهنية الصلبة المحملة بفيتوسوم الميرستين: دراسات التحضير، التوصيف المعملي والترسيب الرئوي المعملي والحيوي

إن الهدف من هذا الجزء هو دراسة استراتيجية واعدة لزيادة فعالية العلاج التقليدي لمرض سرطان الرئة استناداً إلى تصميم مركبات مجهرية مجففة لتوصيل الجزيئات النانونية الدهنية الصلبة المحملة بفيتوسوم الميرستين عن طريق الاستنشاق. تم استخدام

تقنية التجفيف بالرذاذ لتحويل معلقات ا الجزيئات النانونية الدهنية الصلبة المحملة بفيتوسوم الميرستين سابقا إلى الحالة الصلبة وذلك بإضافة مجموعة من الناقلات المختلفة مكونة من المالتوديكسترين، والمانيتول، والليوسين. و تم إعداد ستة تراكيب مجففة محملة بهذه الجزيئات باستخدام نسب مختلفة من هذه الناقلات بهدف تطوير صياغة هذه المساحيق المجففة وفقا لأعلى جرعة منبعثة من أجهزة الاستنشاق والجزء الصالح للاستنشاق. وتم تحليل الصواغات المحضرة معمليا بواسطة المجهر الإلكتروني الماسح، وقياس حجم الجسيمات بتقنية حيود الليزر، والتحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء، والمسح التفاضلي الحراري، وعلاوة على ذلك تم دراسة خصائص التدفق لهذه المساحيق الجافة. وقد أجريت مقارنة لتقييم تأثير هذه المركبات المجهرية على معدل إنطلاق عقارالميرستين. وتم اختبار تأثير التجفيف بالرذاذ على حجم الجسيمات وشحنتها، ومعدل التبعثر. وفي خلال هذه الدراسة تم تقييم الأداء الرذاذي للمساحيق الجافة بواسطة الترسيب المعملي باستخدام جهاز(Andresen cascade impactor) والايروليز كجهاز للاستنشاق لتحديد السلوك الهوائي الحركي، والجزء القادر على الوصول إلى الرئة من الناحية النظرية.

وقد أبرزت نتائج هذا الفصل أن المركبات المجهرية المثلى تحتوي على **مانيتول:مالتوديكسترين:ليوسين** بنسبة ١,٥:٠,٧٥:٠,٧٥على التوالي. ولقد أظهرت هذه التركيبة أعلى عائد، وتدفق مقبول، وانخفاض في حجم الجسيمات ومعدل التبعثر. وكشفت النتائج ايضا أن التجفيف بالرذاذ لم يؤثر بشكل كبير على حجم وشحنة جسيمات الصياغة المختارة الجزيئات النانونية الدهنية الصلبة المحملة بفيتوسوم الميرستين. وعلاوة على ذلك، أظهرت هذه المركبات المجهرية قدرة جيدة على زيادة معدل انطلاق العقار مقارنة بالجزيئات النانونية الدهنية الصلبة المحملة بفيتوسوم الميرستين. وبالنسبة للخواص الرذاذية لهذه المركبات النانومترية، وجد أن الجرعة المنبعثة لها ٩٣٪ وذلك باستخدام جهاز الايروليز عند معدل تدفق الهواء ٢٨لتر/ دقيقة. كما اظهرت نتائج الترسيب الرنوى ان العلاج الموضعي عن طريق الاستنشاق ادي الي ترسيب للجسيمات النانونية في الرئة بنسبة اكبر من الاعضاء الاخري مثل (الكبد، الكلي، الطحال و المخ) علي عكس العلاج عن طريق الدم.

لذلك يمكن الاستنتاج من النتائج السابقة ان العلاج الموضعي لسرطان الرئة عن طريق الاستنشاق الرئوي يعد نظاما دوائيا واعدا حيث ان بعد استنشاق الدواء يتمركز المُركّب النشط في موقع فاعليته و عدم ترسيبه في باقي اعضاء الجسم وبالتالي الجرعة الكلية المعالجة التي تعطى للمريض سوف تكون اقل.