Alexandria University
Faculty of Pharmacy
Department of Pharmaceutics

Formulation and Characterization of Targeted Nanocarriers for Cancer Therapy

A Thesis

Presented to the Graduate School
Faculty of Pharmacy - Alexandria University
In partial fulfillment of the
Requirements for the degree

Of

Doctor of Philosophy

In

Pharmaceutics

By

Passent Mohamed Ehab Moustafa Gaafar
M.D. Pharm.Sci., University of Alexandria, 2013

2017

P.U.A. Library
Library C
Faculty of : Ph.D.M
Serial No : 201
Classification : 615.1

الملخص العربى

بسم الله الرحمن الرحيم

صياغة و توصيف حوامل نانومترية موجهه لعلاج السرطان

السرطان هو السبب الرئيسي للوفاة في جميع أنحاء العالم، لذلك حتى نصل لعلاج فعال للسرطان يجب تحسين معرفتنا بخواص السرطان ، ولذلك فمن الضرورى اكتشاف عقاقير جديدة مضادة للسرطان. العلاج الكيميائي التقليدي يتم توزيعه في الجسم بنظام غير محدد مما يؤثر على الخلايا الطبيعية و السرطانيه على حد سواء. والهدف الأسمى من علاج السرطان هو تحسين نوعية الحياة للمريض عن طريق الحد من سمية العلاج الكيميائي التى تؤثر بشكل عشوائى على باقى الجسم. لذلك فأنه يجب تجنب اختراق العقار للأنسجة الطبيعية بينما يسمح بالوصول تحديدا للأورام. في هذا السياق، برزت أهمية أستخدام العلاجات القائمة على تكنولوجيا النانو كنهج للتغلب على مشكله العلاج الكيميائي التقليدي من حيث الأنتشار العشوائى فى الجسم.

ومن المتوقع أن يكون للعقار المعتمد على تكنولوجيا النانو تأثيرا كبيرا على العلاج الطبى. علما أن استهداف الورم يتضمن ثلاث أنواع من الاستهداف: الاستهداف السلبي ، الاستهداف النشط و الاستهداف المستحيب للمحفزات. علاوة على ذلك فأن الأستهداف المحدد للسرطان بإستخدام حاملات نانومترية يؤدي إلى خواص دوائية أفضل، إنطلاق مستمر للعقار، وتوصيل الدواء حتى يصل لداخل الخلايا، والأهم من ذلك، سمية أقل للجسم، بالأضافه الى حماية الدواء من التفتت و التكسير في الجسم ، وهذا يعد العائق الأكبر فى توصيل أدوية الببتيد والبروتين داخل الجسم.

الببتيدات العلاجية لديها قدره على تشخيص المرض والعلاج ، بينما لها أقل اثار جانبية مقارنة بالدواء التقليدي المضاد للسرطان. وقد أدى التقدم في مجال التكنولوجيا الحيوية على مدى العقود القليلة الماضية لعدد كبير من الأدوية البروتينيه والببتيديه. ومع ذلك، فإن التحديات المرتبطة بصياغة الببتيد لا تزال ذات تأثير كبير. وتشمل هذه العقبات، سوء التوافر البيولوجي نظرا لقلة إمتصاصه، وقابليتة للتكسير الحيوى قبل الوصول إلى الموقع المستهدف. مما يحد من وصولها في المقام الأول إلا عن طريق الحقن. وهكذا، حققت مجال الببتيدات والبروتينات العلاجية نموا سريعا جنبا إلى جنب مع تكنولوجيا النانو.

فقد تم اكتشاف ال-كارنوزين ثنائي الببتيد (بيتا-ألانيل-ال-الحامض الاميني) في بداية القرن الماضي. حيث لوحظ وجوده في الهيكل العظمي ، العضلات ، الدماغ والأعضاء الأخرى مثل الرئتين والكلى والمعدة. يتميز ال-كارنوزين بعديد من المهام الفسيولوجية بالأضافه إلى استخدامات علاجية كثيره. لذلك فأن ال-كارنوزين يمكن اعتباره ببيتيد متعدد المهام. ومن وظائفه المحتملة؛ مضاد للأكسدة ، منشط للمناعة ، يساعد على إلتئام الجروح. وعلاوة على ذلك، نشر فى عدة إحصائيات أن ببتيد ال-كارنوزين يمكن أن يمنع نمو الخلايا السرطانية. ولكن الآليات الفسيولوجية والبيوكيميائية المسؤولة عن النشاط المناهض للسرطان لهذا البتيد مازالت غير معروفة. ومع ذلك، فقد أشار بعض العلماء أن قدرة ال ال-كارنوزين على منع نمو الخلايا السرطانية سببها التدخل فى عملية تحلل السرطان، وتشير بعض البيانات على أن ال-كارنوزين يؤدى إلى نقص (HIFα). بالإضافه إلى قدرته على مسح أنواع الاكسجين التفاعلية (ROS).

ولذلك فسوف نستفيد من هذه الخواص الفريدة من نوعها التى يمتلكها هذا الدواء كمضاد للسرطان مع الكثير من الأدلة و الأبحاث التى تدعم ذلك. و سننقل هذا إلى مجال الأبحاث لاختبار نتائج تحضير حاملات نانومتريه لديها القدرة على إستهداف الخلايا السرطانية. جزء من هذه الرسالة سوف يتضمن تصميم صياغة جزيئات نانومترية التى تستهدف الخلايا السرطانية سلبيا. ثم فى جزءا أخر سوف يتم إستهداف الخلايا السرطانية مغناطيسيا من خلال دمج جسيمات مغناطيسية. و فى الجزء الأخير سوف يتم تقييم الصياغات المختلفه من حيث فاعليتها كمضادة للسرطان و سميتها.

الجزء الأول: تطوير وتقييم حوامل نانومترية موجهة سلبيا محتوية على ثنائى ببتايد مضاد للسرطان (ال-كارنوزين)

• الفصل الأول :تطوير جزيئات نانومترية بلورية سائلة محتوية على ثنائى ببتايد ال-كارنوزين

تمت صياغة جزيئات نانومترية بلورية سائلة محتوية على ال-كارنوزين بأستخدام طريقة الاستحلاب. و قد أجرى فحص عدة متغيرات للحصول على الصياغة الأمثل. واشتملت المتغيرات على تركيز كلا من؛ البولاكسمر ٤٠٧، وال-كارنوزين والبولى

ايثيلين جلايكول. علاوة على ذلك فقد تم تقييم الخصائص الفيزيائية للصياغات مثل؛ حجم الجسيمات ، مؤشر التشتت المتعدد ، الشحنة الكهربائية على سطح الجسيمات (جهد الزيتا) ، نسبة إنحباس الدواء. هذا بالإضافة إلى اختبار الصياغات المحضرة بالميكروسكوب الالكترونى النافذ عالى الجودة. تم أيضا دراسة تأثير فترة تخزين الصياغات المعدة لمدة ثلاثة أشهر عند كل من ٤ و ٢٥ درجة مئوية على حجم الجسيمات ، الشحنة الكهربائية على سطح الجسيمات و قدرتها على إنحباس الدواء بها.

وأظهرت النتائج ما يلى:

- الجزيئات البلورية السائلة المغلفه بالبولي ايثيلين جلايكول والتى تتكون من: بولاكسمر٤٠٧ (٠,٥ % w/v)، البولى ايثيلين جلايكول (١٪ w/v) و غليسيريل المونوأولين (٦٪ w/v) ، كانت صغيرة فى الحجم (١٤٧,٥ نانومتر) ،ذات قيمة مرتفعة للشحنة الكهربائية على سطح الجسيمات (-٤٠,٩)، النسبة المئوية عالية لانحباس الدواء (٧٦,٨%) . ولذلك فقد تم اختيارهذه الصيغه لإجراء مزيد من التجارب.

- بالنسبه للميكروسكوب الإلكترونى فأن الجزيئات البلورية السائلة كانت صغيره فى الحجم (٤٠-١٠٠ نانومتر)، غير كروية من حيث الشكل، مع عدم وجود تجمعات. في حين ظهرت الجزيئات البلورية السائلة المغلفة كروية مثل الهياكل مع طبقة خارجية أكثر كثافة.

- بخصوص إنطلاق الدواء من داخل الجزيئات البلورية السائلة سواء مغلفة او غير مغلفة، فقد حققت إنطلاقا تدريجيا للدواء لمدة تصل إلى ٨ ساعات. وتشيرهذه النتائج إلى أنه من المحتمل ان يكون قد تم إنحباس الدواء في قنوات المياه بداخل الجزيئات أو منجذب للسطح نتيجة للشحنات المعاكسة. مما أدى إلى إنطلاقه التدريجى لمدة أطول. وعلاوة على ذلك، حققت الحوامل البلورية السائلة المغلفة نسبة أقل فى إنطلاق للدواء حيث أنطلق ٢٠,٦% فقط بعد نصف ساعة مقارنة ب ٣٠% للجزيئات البلورية السائلة غير مغلفة . ويمكن أن يرجع سبب إنخفاض إنطلاق الدواء هو وجود طبقة البولي ايثيلين جلايكول والتي كانت بمثابة حاجز ضد إنطلاق الدواء.

- علاوة على ذاك عند قياس النسبة المئوية الناجمة عن تحلل الدم ، فقد حققت الجزيئات البلورية السائلة المغلفة فقط ٢,٨ و ٣,٦٪ بعد ٠,٥ و ٢ ساعة على التوالي مما يفيد أن إضافة البولي ايثيلين جلايكول أدت إلى هذا الانخفاض الملحوظ في نسبة تحلل الدم وبالتالي فإنه يمكن استخدام هذة الصيغة المعدة بأمان في الجسم الحي.

- أخيرا عند دراسة الثبات للصيغ المعدة عند التخزين فى درجة حرارة الغرفة (٢٥ درجة مئوية) و عند ٤ درجات مئوية حدثت تغيرات طفيفة فى كلا من الحجم ، قيمة الشحنة الكهربائية على سطح الجسيمات و تسرب الدواء.

- **<u>الفصل الثاني: تطوير فيتوزومات محتوية على ال-كارنوزين و جزيئات نانومترية بلورية سائلة محتوية على فيتوزومات ال-كارنوزين ومغلفه بمتعدد جليوكول الأيثيلين (ليكويزومات)</u>**

تم في هذا الفصل صياغة أثنين من الحوامل النانومترية ؛ فيتوزمات محتوية على ال-كارنوزين وجزيئات نانومترية بلورية سائله محتوية على فيتوزومات ال-كارنوزين (**ليكويزومات**). تم ذلك بإستخدام فوسفوليبيدات الصويا (ليبويد اس ١٠٠) بهدف زيادة التحميل الدوائي في هذه الحاملات النانومترية. فقد تم تحضير مركب ال-كارنوزين – والدهون الفوسفاتية بإستخدام نسب جزئية مختلفة؛ (١:١ و ١:٢) عن طريق الإذابة والتبخير. كذلك تم التحقق من تكوين الرابطة و نوعية تفاعل الارتباط باستخدام مسعر مسح تباييني والتحليل الطيفي باستخدام الأشعة تحت الحمراء. علما بأن مركب ال-كارنوزين – والدهون الفوسفاتية سوف يستخدم لصياغة كلا من الفيتوزومات و الليكويزومات فيما بعد.

وتم أيضا صياغة فيتوزومات ال-كارنوزين فى نسب جزئية مختلفه (١:١ و ١:٢) عن طريق إضافة مركب ال-كارنوزين – والدهون الفوسفاتية إلى محلول منظم درجة حموضته ٧,٤ . أما بالنسبه للجزيئات النانومترية البلورية السائله المحتوية على فيتوزومات ال-كارنوزين بداخلها (الليكويزومات) فقد صيغت من خلال إضافة الفيتوزومات التى صيغت من قبل إلى الجزيئات البلورية السائلة. وتم قياس حجم الجسيمات و الشحنة الكهربائية على السطح (جهد الزيتا) بالأضافه إلى تعيين نسبة إنحباس الدواء . هذا بجانب مقارنة سرعة إنطلاق الدواء من الصيغ المعده. ثم تم دراسة اختبار الصياغات المعدة بالميكروسكوب الالكترونى النافذ عالى الجوده. تم أيضا دراسة تأثير فترة تخزين الصياغات المعدة لمدة ثلاثة أشهر عند كلا من ٤ و ٢٥ درجة مئوية على حجم الجسيمات و قدرتها على حبس الدواء.

وكشفت النتائج ما يلى:

- تم تكوين مركب كامل بين ال-كارنوزين والدهون الفوسفاتية (ليبويد اس ١٠٠) في النسبه الجزئيه ١: ٢ في حين فشلت النسبة الجزئية ١:١ حيث أنه تبين وجود جزء متبقي من ال-كارنوزين لم يرتبط بالدهون الفوسفاتية (ليبويد اس ١٠٠) و بناءا على ذلك تم أختيار النسبة الجزئية (١:٢) لاستكمال الإختبارات .

- كلا من الفيتوزومات والليكويزومات كانت صغيره فى الحجم (١٠٥,٦ و ١٤٩,٣ نانومتر على التوالي)، وذو قيمة مرتفعة للشحنة الكهربائية على سطح الجسيمات (-٣٤,٤ و -٤٠,٢ على التوالي)، و نسبة مئوية عالية لانحباس الدواء (٩٢,١% و ٩٧,٥% على التوالي).

- بالنسبة للميكروسكوب الإلكترونى فأن الفيتوزومات المعدة كانت كروية من حيث الشكل، مع عدم وجود أى تجمعات. في حين ظهرت الليكويزومات كروية الشكل مع وجود حويصلات أخرى بداخلها.

- بالنسبة لإنطلاق الدواء من داخل الصيغ المعدة ، فقد حققت كلا الصيغتين إنطلاقا تدريجيا للدواء مقارنة بمحلول ال-كارنوزين وعلاوة على ذلك، فقد حققت الليكويزومات نسبة أقل فى إنطلاق الدواء حيث إنطلق ٧٥,٣٨ % فقط بعد ٢٤ ساعة مقارنة ب ٩٧,٥% من الفيتوزومات. على العكس من ذلك، أنطلق ١٠٠% من محلول ال-كارنوزين بعد ساعتين فقط . وتعتبر هذه النتائج غير مسبوقه خصوصا عندما نتعامل مع دواء عالى الذوبان فى الماء مثل ال-كارنوزين.

الجزء الثاني: تطوير وتقييم حوامل نانومترية مستجيبة للمحفزات: جسيمات نانومترية مغناطيسية مغلفة بال-كارنوزين و بلورات سائلة ممغنطه محتوية على ال-كارنوزين

في هذا الجزء، تم صياغة نظامين للتوصيل الموجه مغناطيسيا خصيصا لمكان الورم. فقد تم صياغه جسيمات نانومترية مغناطيسية مغلفة بطريقة الترسيب الكيميائي. ثم تم صياغة البلورات السائلة الممغنطه المحتوية على ال-كارنوزين بتحميل هذه الجسيمات المغناطيسية فى الحوامل النانومترية البلورية السائلة. أما بالنسبة للجسيمات النانومترية المغناطيسية المغلفة بال-كارنوزين فقد صيغت بتغليف الجسيمات النانوية المغناطيسية بال-كارنوزين .

أشتملت الإختبارات المعملية على؛ قياس حجم الجسيمات، الشحنة الكهربائية على سطح الحويصلات (جهد الزيتا) والقياسات المغناطيسية .بالأضافه إلى تعيين نسبة إنحباس الدواء. هذا بجانب مقارنة سرعة إنطلاق الدواء من الصيغ المحضرة ودراسة شكل الصياغات المحضرة بالميكروسكوب الالكترونى النافذ عالى الجوده. و أيضا دراسة تأثير فترة تخزين الصياغات المعدة لمدة ثلاثة أشهر عند ٤ درجة مئوية على حجم الجسيمات و الشحنة الكهربائية على سطح الحويصلات (جهد الزيتا) بالاضافة إلى قدرتها على حبس الدواء. أما بالنسبه للجسيمات النانومترية المغناطيسية المغلفة بال-كارنوزين، فقد تم التأكد من تكوين الرابطه بين الدواء والجسيمات النانومترية المغناطيسية بإستخدام مسعر مسح تباينى والتحليل الطيفي باستخدام الأشعة تحت الحمراء.

وأظهرت النتائج ما يلي:

- تم التأكد من تكوين رابطة بين ال-كارنوزين والجسيمات النانومترية المغناطيسية باستخدام مسعر مسح تباييني والتحليل الطيفي باستخدام الأشعة تحت الحمراء

- جميع الصيغ المحضرة ؛ جسيمات مغناطيسيه غير مغلفة ، جسيمات نانومترية مغناطيسية مغلفة بال-كارنوزين أو البلورات السائلة المغنطة أمتلكت؛ حجم صغير (٩٠ ، ١٢٠ و ١٤٣,٥ نانومتر على التوالي)، قيمة مرتفعه للشحنة الكهربائية على سطح الجسيمات (-٤٩,١ ، -٢٧,٣ ، و-٣٩,٥ على التوالي)، ، وقيم مغناطيسية عالية (٨٤,٥٣، ٥١,٥٢ و٤١,٧٢ emu/g على التوالي). هذا بالأضافه إلى نسبة منوية عالية لاتحباس الدواء بداخل كلا من الجسيمات النانومترية المغناطيسية المغلفة بال-كارنوزين و البلورات السائلة المغنطة (٨٨,٣% و و ٧٤,١ % على التوالى) .

- بالنسبه للميكروسكوب الإلكترونى فأن الجسيمات النانومتريه المغناطيسيه سواء مغلفة أوغير مغلفة كانت كروية من حيث الشكل. فى حين أن البلورات السائلة المغنطة كانت مكعبة الشكل حيث شوهد وجود جزيئات مغناطيسية بداخلها كنقاط سوداء، في كثير من الأحيان ككتلة بينما في أحيان أخرى غير موزعه بشكل موحد.

- أما بالنسبة لإنطلاق الدواء من داخل الصيغ المعدة، فقد حققا إنطلاقا تدريجيا للدواء مقارنة بمحلول ال-كارنوزين. حيث حققت الجسيمات النانومتريه المغناطيسيه المغلفة بطنا أكثر فى معدل إنطلاق الدواء حيث إنطلق ٧٦,٥% فقط بعد ٨ ساعات مقارنة ب ٩٧,٢% فى حالة البلورات السائلة المغنطة .

- عند دراسة الثبات، بعد تخزين كلا من الصيغاتين ؛ (الجسيمات النانومترية المغناطيسية المغلفة بال-كارنوزين و البلورات السائلة المغنطة) عند ٤ درجات منوية، حدثت تغيرات طفيفة فى كل من الحجم ، قيمة الشحنة الكهربائية على سطح الجسيمات و تسرب الدواء مقارنة بالجسيمات المغناطيسيه الغير مغلفه. و علاوة على ذلك قد لوحظ تغيير غير ملحوظ في محتوى الدواء بداخل الصيغ المعدة بعد فترة التخزين ثلاثة أشهر ، مؤكدا على الاستقرار الكيمياني للدواء بداخل الصيغ المعدة.

و بناء على النتائج السابقة، فإن هذه الصيغ يمكن أن تمثل سبيلا فعالا لتوصيل ال-كارنوزين خصيصا للمكان المستهدف تحت تأثير المغناطيس. لذلك، فقد تم اختيارهم لاختبار فعاليتهم ضد السرطان داخل الجسم.

الجزء الثالث: التقييم البيولوجي للحاملات الموجهة سلبيا ومغناطيسيا و المحتوية على ال-كارنوزين كعلاج واعد للسرطان: دراسة معملية للسمية الخلوية ، دراسه حيوية للنشاط المضاد للسرطان من حيث الوقاية والعلاج والسمية

في هذا الجزء، تم إجراء دراسة معملية للسمية الخلوية لمقارنة و تقييم تأثير الصيغ المعدة، إما الموجهه بشكل سلبي مثل الفيتوزومات و الليكويزومات؛ أو الحوامل النانومترية الموجهه للسرطان مغناطيسيا ؛ الجسيمات المغناطيسية المغلفة بال-كارنوزين أو البلورات السائلة المغنطة، بتركيز ١، ٥، ١٠، ٢٥، ٥٠، ١٠٠ ميلى مول لمدة ٢٤ ساعة و ٤٨ ساعة على خط خلايا سرطان الثدي البشرية (MCF-٧). وبعد ذلك، تم مقارنة فاعلية الصيغ المعده كمضادة للسرطان في نموذج الفئران والتي اعتمدت على أثنين من بروتوكولات العلاج. أولا، تم اختبار قدرتهم على الوقاية من السرطان. وعلاوة على ذلك، تم تقييم القدرة التوجيهية لهذه الحوامل النانومترية المستجيبة للمحفزات الخارجية. ثانيا، بناء على النتائج التي حصلنا عليها من الدراسة السابقة، تم اختبار الصياغات المختارة على قدرتها على القضاء على سرطان الثدي. ثم تم تقييم سمية هذه الصيغ فى الجسم عن طريق فحص أعضاء الجسم المختلفه، قياس وظائف الكبد و الكلى بالأضافة إلى الفحص النسيجي.

وأظهرت النتائج ما يلى:

- جميع الصيغ المعده ؛ الليكويزومات، الفيتوزومات، الجزيئات النانومترية البلورية السائلة، الجسيمات النانومترية المغناطيسية المغلفة بال-كارنوزين و البلورات السائلة الممغنطة كانت أكثر سميه على الخلايا السرطانية مقارنة بمحلول ال-كارنوزين حيث حققت IC_{50} ٢٥,٩ ، ٣٦,٨ ، ٤٧,٢ ، ٣٢,٢ ، ٤٣,٧ على التوالي) بعد ٢٤ ساعة. وعلاوة على ذلك، فأن كل الصياغات الفارغة (الغير محتويه على الدواء) لم تظهر أي سمية على الخلايا السرطانية بعد ٤٨ ساعة ، مما يدل على سلامة هذه الصيغ. وفيما يتعلق بالسمية الخلوية للجسيمات النانومترية المغناطيسية الفارغة، فإنها لم تظهر أي آثار سامة حتى ٨,٧٤ ميلى جرام/ ميلى. و لكن عند زيادة التركيز أكثر من ٨,٧٤ ميلى جرام/ ميلى، إنخفضت نسبة الخلايا الحيه ٢٧ % بعد ٤٨ ساعه.

- عند تقييم فعالية الصيغ المحضره كمضادة للسرطان من خلال حساب نسبة تثبيط نموالورم. أظهرت جميع الصيغ المعدة؛ الليكويزومات، الفيتوزومات، الجسيمات النانومترية المغناطيسية المغلفة بال-كارنوزين الموجهه و الغير موجهه و البلورات السائلة الممغنطة الموجهه و الغير موجهه فاعلية كمضاد للسرطان أعلى من محلول ال-كارنوزين. ظهر هذا من خلال؛ نسبة أقل فى تثبيط نمو الورم (٧,١% ، ١٦,١ % ، ٥,٣ % ، ١٩,١ % ، ١١,٧ % ، ٢٥,٥ % على التوالي) مقارنة بمحلول ال-كارنوزين (٥٠%).

- عند قياس دلالات الأورام المختلفة أظهرت النتائج أنه فيما يتعلق بال VEGF، فأن جميع الصيغ المعدة؛ الجسيمات النانومترية المغناطيسية المغلفة بال-كارنوزين الموجهه و الغير موجهه مغناطيسيا، البلورات السائلة الممغنطة الموجهه و الغير موجهه مغناطيسيا، ، الفيتوزومات، و الليكويزومات حققت تأثير أفضل كمضاد لنمو الخلايا السرطانيه بالمقارنة مع محلول ال-كارنوزين، حيث حققت إنخفاض ملحوظ في مستوى VEGF (١٢,٨، ٣٠,٥ ، ٢٢,٩ ، ٤١,٩ ، ٢٦,٤ و ١٤,٣ بيكوجرام/ جرام أنسجة على التوالى) مقارنة بمحلول ال-كارنوزين و التى حققت ٥٤,٤ بيكوجرام/ جرام أنسجة. وعلاوة على ذلك انخفاض في مستوى Cyclin D١ (١٢,١ ، ٣٨,٥ ، ٢٧,٦ ، ٤٦,٣ ، ٢٤,١ و ١٥,٥ نانوجرام / جرام الأنسجة على التوالي) مقارنة بمحلول ال-كارنوزين و التى حققت ٦٧,٤ نانوجرام / جرام الأنسجة. و أيضا حققت الصيغ أرتفاع فى ال Caspase ٣ activity (٤٤,١ ، ٢٠,٧ ، ٢٨,٩ ، ١٥,٣ ، ٢٣,٦ و ٣٦,٤ نانوجرام / جرام الأنسجة على التوالي) مقارنة بمحلول ال-كارنوزين و التى حققت ٩,١ نانوجرام / حرام الأنسجة على التوالي.

و من الجدير بالذكر أن بالنسبة للجسيمات النانومترية المغناطيسية الموجهه المغلفة بال-كارنوزين و البلورات السائلة الممغنطة الموجهه فأن وجود المغناطيس الخارجي المثبت على مكان الورم و الذي قاد الصيغ الموجهه بعد حقن خصيصا إلى موقع الورم، أدي إلى زيادة فعالية هذه الصيغ كمضاد للسرطان مقارنة بالصيغ الموجهه سلبيا حيث أن هذه الفعاليه المميزه كانت نتيجة معيارين أساسين؛ أولا، خصائص مغناطيسية عالية لكلا من البلورات السائلة الممغنطة والجسيمات النانومترية المغناطيسية المغلفة بال-كارنوزين وثانيا، فإن المجال المغناطيسي القوي الناجم عن المغناطيس الخارجي، كان قادرا على جذب هذه الجسيمات النانومترية إلى موقع الورم.

- و عند الفحص النسيجى للخلايا، حققت كل الصيغ المعده نسبه دمورللخلايا السرطانية أعلى من محلول ال-كارنوزين.

- عند التحقيق من سمية الصيغ المعده بعد ٢١ يوما من العلاج تم فحص الأعضاء المختلفه فى جسم الفأر، و تبين أنه فى حالة عدم توجيه الصيغ المعده إلى مكان الورم مغناطيسيا (البلورات السائلة الممغنطة و الجسيمات المغناطيسية المغلفة بال-كارنوزين) ، أدى ذلك إلى ترسيب الجسيمات المغناطيسية (كما واضح من البقع السوداء) في الأعضاء المختلفة. وجدير بالذكر أن هذا الترسيب كان واضح تحديدا في الكبد حيث أظهر الفحص النسيجى للكبد وجود تجمعات للجسيمات النانومترية المغناطيسية بعد فترة العلاج بكلا من البلورات السائلة الممغنطة و الجسيمات المغناطيسية المغلفة بال-كارنوزين الغير موجهه، مما قد يؤدي إلى آثار جانبية سامة. على العكس من ذلك فأن عند توجيه كلا من؛ البلورات السائلة الممغنطة و الجسيمات النانومترية المغناطيسية المغلفة بال-كارنوزين للسرطان، تأكد وجود هذه الجسيمات المغناطيسية فقط فى مكان الورم.

- وعلاوة على ذلك، أكدت نتائج فحص وظائف الكبد و الكلى، أن جميع الصيغ المعدة لم تسبب أى أعراض سلبيه أو سميه على وظائف الكلى. أما بالنسبه لوظائف الكبد فقد أظهرت النتائج أن كلا من الجسيمات المغناطيسية المغلفة بال-كارنوزين و البلورات السائلة الممغنطة الغير موجهه لمكان الورم أثر تأثير سلبيا كبيرا على الكبد من حيث مستوى عال من إنزيمات الكبد. على العكس من ذلك، فأن البلورات السائلة الممغنطة و الجسيمات النانومترية المغناطيسية المغلفة بال-كارنوزين الموجهه مغناطيسيا لمكان الورم أظهرت سمية أقل من ذلك بكثير.

لأذلك فأن كلا من الجسيمات النانومترية المغناطيسية المغلفة بال-كارنوزين الموجهه مغناطيسيا لمكان الورم و الليكويزومات التى تستهدف السرطان بشكل سلبي، حققت نتائج متفوقة مقارنة مع غيرها من الصيغ المعدة. ولذلك فقد تم اختيارهم لتققيم قدرتهم للقضاء على السرطان. في هذا البروتوكول العلاجى، تم بدأ العلاج بعد أن وصل الورم حجم معين (٥٠ ميلى مكعب).

- أظهرت الجسيمات النانومترية المغناطيسية المغلفة بال-كارنوزين الموجهه مغناطيسيا لمكان الورم فاعلية عالية كمضادة للسرطان مقارنة بالليكويزومات المستهدفة السرطان سلبيا، حيث حققت نسبة أقل فى تثبيط نمو الورم (١٣,١ و ٢١,٤ % على التوالى) بالأضافه إلى انخفاض مستويات VEGF(عامل نمو بطانة الاوعية) (٣٤,٧، ٥٣,٤ بيكو جرام / جرام بروتين الأنسجة)، ومستويات Cyclin D1 أقل (٣٦,١، ٤٧,٣ نانو جرام / جرام بروتين الأنسجة على التوالى) وارتفاع مستويات (Caspase ٣) (٥٠,٤، ٤٥,٩ نانوجرام / جرام بروتين الأنسجة) على التوالي.

- عند التحقيق من سمية الصيغ المعده بعد ١٤ يوما من العلاج تم فحص الأعضاء المختلفه فى جسم الفأر، و تبين أن الجسيمات النانومترية المغناطيسية المغلفة بال-كارنوزين الموجهه مغناطيسيا استهدفت موقع الورم تحديدا. وأيضا أكد الفحص النسيجى للكبد عدم وجد أيه تجمعات لهذه الجسيمات المغناطيسيه فى الكبد. علاوه على ذلك، كشفت عند تحليل وظائف الكبد و الكلى أن كلا من الصيغ المعدة أمانن على الكبد و الكلى و لم تسبب أى أعراض جانبيه .

من ثم إن نتائج هذه الدراسة تشير إلى أن الحاملات النانومترية المحتوية على ال-كارنوزين و الموجهه إما سلبيا أو تحت تأثير مغناطيس خارجى حققت فاعلية عالية كمضادة للسرطان مقارنة بمحلول ال-كارنوزين على الرغم من أن (الجسيمات المغناطيسية المغلفة بال-كارنوزين) الموجهه مغناطيسيا أظهرت نتائج متفوقة بالمقارنة مع جميع الصيغ أخرى، ينبغي على الباحث أن يضع سمية هذه الجسيمات فى عين الإعتبار.حيث أنه يستلزم تغليفها ، و أختيار تركيز آمن فى الاستخدام. وأخيرا يتوجب توجيهها خصيصا لموقع الورم ، لأنها اذا لم توجه لمكان الورم فأنها تؤثر بدرجة عالية على السمية ويتم ترسيبها في الأعضاء المختلفه. و من الناحيه الأخرى فأن الليكويزومات، على الرغم من أعتمادها فقط على التوجيه السلبي، ولكن قد أظهرت نتائج متفوقة مقاربه للجسيمات المغناطيسية المغلفة بال-كارنوزين الموجهه مغناطيسيا.