معتمدة بقرار ١٥٥ بتاريخ ٢٠١٦/٦/٢٧
من الهيئة القومية لضمان جودة التعليم والاعتماد

جامعة الإسكندرية
ALEXANDRIA UNIVERSITY

Faculty of Pharmacy
Department of Pharmaceutics

Design and Evaluation of a Targeted Nano-System for Improving The Treatment of Some Cancerous or Pre-Cancerous Lesions.

A Thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of Doctorate of Philosophy

In

Pharmaceutical Sciences

(Pharmaceutics)

Submitted by

Noha Ismail Khamis Ismail

MSc. in Pharmaceutical Sciences

Faculty of Pharmacy, Alexandria University, 2016

2021

P.U.A. Library
Central Medical Library (B)
Faculty of :
Serial No : 775
Classification : 615

الملخص العربي

يصيب السرطان ملايين الأشخاص في جميع أنحاء العالم وينمو بمعدل ينذر بالخطر ليصبح أكثر الأمراض فتكًا في العالم على الإطلاق. سرطان عنق الرحم هو ثاني أكثر أنواع السرطانات شيوعًا بين النساء في العالم النامي. كشف الكشف الأخير لمنظمة الصحة العالمية (WHO) أن سرطان عنق الرحم قد ظهر كأكبر قاتل ، متجاوزًا سرطان الثدي.

على الرغم من تطوير العديد من الأدوية لعلاج السرطان ، إلا أن هذه الأدوية غالبًا ما تؤدي إلى العديد من الآثار الجانبية غير المرغوب فيها ، والسمية ، ومقاومة الأدوية المتعددة ، حيث إن أدوية العلاج الكيميائي المستخدمة حاليًا ليست انتقائية للخلايا السرطانية. وبالتالي ، فإن الجرعات المركزية العالية مطلوبة للوصول إلى تركيزات فعالة علاجياً في موقع الورم ، مما يؤدي إلى آثار جانبية شديدة. تحد هذه الآثار الجانبية من الجرعة التي يمكن إعطاؤها للمرضى ، مما يؤدي إلى انتكاس الورم وتطور مقاومة الأدوية. لذلك ، تم اتباع طرق جديدة لإيجاد علاجات جديدة لعلاج السرطان لتقليل الآثار الجانبية ، والسمية ، وتكرار إعطاء الأدوية الموجودة ، للتغلب على مقاومة الأدوية المتعددة ، وزيادة معدلات البقاء على قيد الحياة.

أحد الأساليب التي تتغلب على هذه القيود هو استهداف الأورام بحاملات النانو. اكتسب تغليف أدوية العلاج الكيميائي في ناقلات النانو اهتمامًا كبيرًا بسبب بنيتها وتكوينها المتنوع وتعديلات سطحها. يمكن توصيل ناقلات النانو الدهنية إلى مواقع محددة عن طريق الاستهداف السلبي المعتمد على الحجم أو عن طريق الاستهداف النشط من خلال الاقتران مع شقوق الاستهداف. يمكن أن يحقق الاقتران مع الجزيئات المستهدفة درجة عالية من الانتقائية لأعضاء محددة ويعزز استيعاب الدواء في الخلايا المستهدفة. يمكن تحقيق الاستهداف من خلال توصيل الدواء إلى الموقع المستهدف من خلال التوصيل المركزى أو الموضعى الذى يحد من سمية الأدوية الجهازية عن طريق التسليم المباشر للدواء إلى الورم. في السنوات الأخيرة ، تم إجراء العديد من الدراسات حول استراتيجيات توصيل الأدوية الموضعية لعلاج سرطان عنق الرحم حيث توجد العديد من الفوائد لإيصال الأدوية الموضعية إلى عنق الرحم مقارنة بالتوصيل المركزى ، مثل منع تداول أدوية العلاج الكيميائي المركزية داخل الجسم مما يؤدي إلى تقليل فقدان الدواء ، انخفاض الآثار الجانبية ، وإعطاء جرعة عالية من العامل النشط في عنق الرحم ، مما يؤدي بدوره إلى تحسين فعالية العلاج.

عادة ما يتم نقل ناقلات النانو إلى الخلايا عن طريق الالتقام الخلوي في الإندوسومات ثم يتم تهريبها بعد ذلك إلى مقصورات الليزوزومات الحمضية. يمكن أن تؤدي بيئة الليزوزوم إلى تدهور كبير في البضائع العلاجية. تمارس معظم العلاجات تأثيرها إما في العصارة الخلوية أو النواة ، وبالتالي يجب أن تفلت من الحويصلات الداخلية في خطوة أساسية

تُعرف باسم الهروب الليزوزومى. يُنظر إلى هذا الحدث الحرج على نطاق واسع على أنه خطوة تحديد المعدل أو "عنق الزجاجة" في توصيل العلاجات داخل الخلايا باستخدام الأنظمة القائمة على الناقلات النانوية.

ميثيل ديهيدروجاسمونيت (MDHJ) هو مشتق زيتي من الجاسمونات ، فئة من هرمونات الإجهاد النباتية المعزولة من نبات الياسمين (ياسمينوم أوفيسينالي). في الخلايا النباتية ، عند الجرح أو الهجوم الممرض ، يتسبب ميثيل جاسمونات (MJ) في تحريض وتراكم مثبطات البروتين التي تشارك في تنشيط موت الخلايا المبرمج ، وبالتالي تشبه موت الخلايا المبرمج في الثدييات. في الآونة الأخيرة ، أفادت بعض الدراسات في المختبر وداخل الجسم الحي عن الأنشطة الانتقائية المضادة للسرطان لميثيل ثنائي هيدروجاسمونيت.

بحثت الأطروحة الحالية في إمكانات ناقلات الدهون ذات البنية النانوية المحملة بميثيل ثنائي هيدروجاسمونات (NLCs) لتعزيز الفعالية الموضعية وتعزيز إمكانية الاستهداف لسرطان عنق الرحم. تم تناول أهداف البحث التي تتضمن تحسين الصياغة ، والتوصيف ، وتقييم إمكانية قمع تسلسل الأورام الفيروسي ، والتقييم في المختبر وداخل الجسم الحي للنشاط المضاد للسرطان في ثلاثة أجزاء

الجزء الأول: تطوير ميثيل جاسمونات NLCs للمعالجة الموضعية للبؤر السرطانية وما قبل السرطانية في عنق الرحم: الصياغة والتحسين والتوصيف في المختبر.

عقار الميثيل ثنائي هيدروجاسمونات (MDHJ) العشبي مرشح واعد لعلاج السرطان. ركز هذا الجزء من الأطروحة على تصميم MDHJ-NLCs الجديدة مع تطبيق موضعى محتمل للعلاج غير الجراحي والآمن والفعال للبؤر السرطانية فى عنق الرحم و البؤر ما قبل السرطانية. تم تقسيم العمل في هذا الجزء إلى فصلين.

- **الفصل الأول: الصياغة والتحسين والتوصيف المختبري لميثيل ثنائي هيدروجاسمونات NLCs وتقييم قدرتها على مكافحة السرطان**

كان هذا الفصل معنيًا بصياغة NLCs الجديدة المحملة ب ميثيل ثنائي هيدروجاسمونات (MDHJ-NLCs) بواسطة تقنية التجانس الساخن باستخدام أنواع مختلفة من الدهون بالإضافة إلى poloxamer 407 كمثبت محتمل. تم تحسين الصيغ من حيث نوع الدهن ونسبته وتركيز بولوكسامير وتركيز الدواء المحمل للحصول على ميثيل ثنائي هيدروجاسمونات NLCs مع الخصائص الغروانية المثلى بالإضافة إلى كفاءة الحصر. تم تمييز الصيغ المحضرة من حيث حجم الجسيمات

، مؤشر التشتت المتعدد، إمكانات زيتا ، كفاءة الحصر ، ملف الإفراج عن الدواء والإستقرار و ثبات الخصائص عند التخزين. علاوة على ذلك ، تم تقييم الإمكانات المضادة للسرطان للتركيبات الواعدة ذات الخصائص الصيدلانية المثلى والثبات عند التخزين من خلال دراسة السمية الخلوية على خلايا Hela .

أكدت النتائج التي تم الحصول عليها في هذا الفصل أن تقنية التجانس الساخن المعتمدة كانت ناجحة في تحضير NLCs المحملة بـ ميثيل ثنائي هيدروجاسمونات. و أيضا أنه يمكن إنتاج الحجم الأمثل للجسيمات (<٢٠٠ نانومتر) و مؤشر التشتت المتعدد (<٠,٥) (باستخدام G50 / 13 أو G 44/14 أو G39 / 01) مع أو بدون دهن ميجليول السائل وفي وجود ١٪ PX كمستحلب فى تحضيرات (A_1- A_1M- B_1-B_1M- B_2M- C_1) .

تأثر معدل إطلاق ميثيل ثنائي هيدروجاسمونات من التركيبات المختلفة بالعديد من العوامل مثل نوع الدهون وطول سلسلة الأحماض الدهنية وتكوين الدهون وتركيز الدواء. دمج الدهن السائل Miglyol أثناء استخدام G 39/01 كممثل للدهون الصلبة أعاق بشكل كبير إطلاق الدواء ؛ وبناءً على ذلك ، تم استبعاد التركيبات القائمة على G 39/01 من الاختبارات الإضافية. أظهرت التركيبات التي تحتوي على G 50/13 ك لب شحمي ملف إطلاق دوائى مثالي مع إطلاق أولي متبوعًا بإطلاق مستمر ، وبالتالي تم إستخدام التركيبات B_1, B_1M, B_2M في مزيد من التحقيقات.

كشفت دراسة السمية الخلوية في المختبر عن التأثير السام لمادة الدواء على الخلايا بالإضافة إلى القدرة الفائقة للتركيبات المحضرة على تعزيز خصائص ميثيل ثنائي هيدروجاسمونات المضادة للسرطان وكذلك سلامة التركيبات على الأنسجة.

- **الفصل الثاني : التحضير والتقييم في المختبر لتفعيل ميثيل ثنائي هيدروجاسمونات NLCs باللاكتوفيرين لاستهداف سرطان عنق الرحم.**

يهدف هذا الفصل إلى تفعيل MDHJ-NLCs المُعدة مع اللاكتوفيرين (Lf) للاستهداف النشط لخلايا سرطان عنق الرحم لتعزيز النشاط المضاد للسرطان وتعزيز فعالية التركيبات. من أجل تعظيم الاستفادة الوظيفية من التركيبات NLCs المعدة المحملة بال Lf تم إختيار التركيب الأمثل من حيث تركيز ال (Lf) المضاف وتم تمييز ها لتقييم خصائصها الفيزيائية المختبرية والامتصاص الخلوي في خط خلايا.Hela .

أوضحت قياسات زيتا التي تم الحصول عليها نجاح عملية التفعيل بال Lf كما تم رصدها من خلال الزيادة التدريجية في شحنة السطح مع زيادة تركيز Lf . تم اختيار التركيز الأمثل وتم اختيار الصيغة الوظيفية (Lf-B_2M) لمزيد من التحقيقات حيث أنها تمتلك خصائص غروانية جيدة بسبب وجود الدهن السائل Miglyol .أظهرت دراسة السمية الخلوية في المختبر

تأثيرًا يعتمد على التركيز على قابلية خلايا Hela المختبرة مع قيمة IC_{50} أقل بكثير من تلك الخاصة بالتركيبات غير المقترنة بال Lf ؛ مما يشير إلى أن Lf هو بالفعل وكيل استهداف مناسب للاستهداف النشط الانتقائي لـ ميثيل ثنائي هيدروجاسمونات لعلاج سرطان عنق الرحم.

الجزء الثاني: تصميم وتقييم NLCs متعددة الإقتران المحملة ببيتا ألانين و ميثيل ثنائي هيدروجاسمونات للاستهداف الموضعي لبؤر سرطان عنق الرحم البؤر ما قبل السرطانية.

يهدف هذا الجزء إلى التحقق من إمكانية استخدام الحمض الأميني (بيتا ألانين) كعامل محتمل مضاد للسرطان لعلاج سرطان عنق الرحم بسبب هامش الأمان المرتفع المبلغ عنه كعامل طبيعي موجود عادة في جسم الإنسان. ينقسم العمل في هذا الجزء إلى فصلين:

- **الفصل الأول: الصياغة والتحسين والتقييم في المختبر لـ ميثيل ثنائي هيدروجاسمونات -بيتا ألانين NLCs المقترنة بـالاكتوفرين**

يهدف هذا الفصل إلى تطوير بيتا ألانين NLCs (β ala -NLCs) وبيتا ألانين مع ميثيل ثنائي هيدروجاسمونات NLCs (MDHJ-H ala- NLCs)، بالإضافة إلى إقرانها مع Lf . تم إجراء توصيف فيزيائي كيميائي من حيث الخصائص الغروية ودراسة السمية الخلوية في المختبر على خط خلية HeLa لبعض التركيبات المختارة.

كشفت النتائج أن تركيبات NLC المحملة بـ بيتا ألانين وNLC المحملة بـ بيتا ألانين و ميثيل ثنائي هيدروجاسمونات تم تحضيرها بنجاح باستخدام نفس تقنية التجانس الساخنة المعتمدة في تحضير NLCs المحملة بميثيل ثنائي هيدروجاسمونات. أظهرت التركيبات المحضرة خواصًا غروانية جيدة ، وتحريرًا جانبيًا مع إطلاق ما يقرب من ٩٠ ٪ من الدواء بعد ساعتين. والاستقرار عند التخزين.

كشفت دراسة السمية الخلوية في المختبر أن بيتا ألانين عند اقترانها بـميثيل ثنائي هيدروجاسمونات كان لها تأثير تآزري على الخصائص السامة ل ميثيل ثنائي هيدروجاسمونات على خلايا سرطان عنق الرحم (خلايا HeLa) كما تم رصدها من خلال الانخفاض الكبير في قيم IC_{50}. تم تأكيد سلامة التركيبة على الأنسجة من خلال عدم وجود تأثيرات سامة على الخلايا للصيغة الفارغة الغير محملة بالدواء بالإضافة إلى محلول الالانين فى الماء.

- **الفصل الثاني: تطوير ميثيل ثنائي هيدروجاسمونات -البيتا ألانين NLCs متعددة الإقتران مع قدرة محتملة على الهروب من الليزوزومات واستهداف البؤر السرطانية فى عنق الرحم.**

يهدف هذا الفصل إلى تحقيق الهروب الليزوزومي من خلال تفعيل بعض الصيغ القائمة على ميثيل ثنائي هيدروجاسمونات و بيتا ألانين مع البوليمر داى أولايل ٣ ثلاثي ميثيل الأمونيوم البروبان .(DOTAP) تم تحسين التركيبات المحضرة وتقييمها لاحتمال هروب الليزوزومات والنشاط المضاد للسرطان باستخدام خط خلايا. HeLa .

أظهرت التركيبات المقترنة ب DOTAP المحضرة خصائص غروانية جيدة ، ونمط إطلاق مشابه تقريبًا لتلك الخاصة بالتركيبات غير المقترنة والاستقرار عند التخزين. كشفت دراسة السمية الخلوية في المختبر عن تحسن كبير في التأثيرات السامة على الخلايا لمادة الدواء ميثيل ثنائي هيدروجاسمونات عند دمجها مع DOTAP مما يشير إلى تأثير تآزري على الخصائص السامة على الخلايا لـ ميثيل ثنائي هيدروجاسمونات على خطوط خلايا سرطان عنق الرحم (خلايا Hela). تم تأكيد سلامة التركيبة على الأنسجة من خلال عدم وجود تأثيرات سامة على الخلايا للصيغة الفارغة الغير محملة بالدواء بالإضافة إلى التركيبة الغير محملة بالدواء و المقترنة بال DOTAP.

الجزء الثالث: تقييم احتمالية كبت تسلسل الأورام الفيروسي وإمكانات مكافحة السرطان في الجسم الحي لبعض تركيبات NLCs المحملة بميثيل ثنائي هيدروجاسمونات و بيتا ألانين.

ينقسم العمل في هذا الجزء إلى فصلين:

- **الفصل الأول: تقصي احتمالية تثبيط تسلسل الأورام الفيروسية لبعض التركيبات المختارة.**

يهدف هذا الفصل إلى التحقق من إمكانات التركيبات المحضرة ضد التتابعات السرطانية لفيروس الورم الحليمي البشري (HPV)كسبب رئيسي للعديد من أنواع السرطانات بما في ذلك سرطان عنق الرحم. تم إجراء تفاعلات RT-PCR شبه الكمية لاختبار إمكانات التركيبات لقمع العديد من متواليات الأورام السرطانية الفيروسية مثل E6 و P53 و survivin في خطوط خلايا.HeLa .

- **الفصل الثاني: التطبيق المحتمل لتركيبات مختارة للعلاج الموضعي غير الجراحي لسرطان عنق الرحم: دراسة على الحيوانات في الجسم الحي.**

تم إجراء استقصاء داخل الجسم الحي للتأثير المضاد للسرطان لبعض التركيبات الجديدة المختارة المعدة مسبقًا. تم إحداث سرطان عنق الرحم في نماذج الفئران. تم علاج مجموعات الفئران من خلال بروتوكولات العلاج الموضعية والمركزية للمقارنة.تم اختيار NLCs الواعدة التي تم تحضيرها في الفصول السابقة والتي أظهرت الخصائص الغروانية المثلى ونمط الإطلاق المناسب والثبات عند التخزين بالإضافة إلى الأنشطة السامة المتفوقة على الخلايا في المختبر (خلايا هيلا) ، لإجراء تحقيقات داخل الجسم الحي. تم فحص صيغة NLC المحملة بميثيل ثنائي هيدروجاسمونات (B2M) ، صيغة NLC المحملة ب بيتا ألانين (βala-MB0)و NLCs المحملة بـ بميثيل ثنائي هيدروجاسمونات و بيتا الانين (βala-B2M) لتأكيد إمكانات المنتجات الطبيعية ميثيل ثنائي هيدروجاسمونات و بيتا الانين في علاج سرطان عنق الرحم كما اقترحت نتائج التجارب المعملية. تم أيضًا فحص التأثيرات الإيجابية التي لوحظت عند تفعيل NLCs المحضرة باستخدام Lf و DOTAP في المختبر في الجسم الحي.

أكدت النتائج الآثار الواعدة المضادة للسرطان للمنتجات الطبيعية ميثيل ثنائي هيدروجاسمونات و بيتا ألانين داخل الجسم الحى بالإضافة إلى نجاح نظام توصيل الأدوية النانوية المستخدم. ثبت أيضًا أن تفعيل التركيبات باستخدام Lf كلمستهدف نشط أدى إلى تعزيز كبير للنشاط المضاد للورم في التركيبات المختبرة. لوحظ تحسن أفضل بشكل ملحوظ في شدة التغيرات النسيجية المرضية مع التسرطن لعنق الرحم باستخدام التركيبات المقترنة ب DOTAP. وهذا يؤكد أيضًا القدرة المفترضة للبوليمر DOTAP على إحداث الهروب الليزوزومى وزيادة التركيز السيتوبلازمي للتركيبات المأخوذة وبالتالي تعزيز نشاطها.

بناءً على النتائج المذكورة أعلاه ، يمكن الاستنتاج أن الاستهداف المحلي للبؤر السرطانية لعنق الرحم بواسطة NLCs متعددة الإقتران المحملة بـ ميثيل ثنائي هيدروجاسمونات و بيتا ألانين كعوامل مفردة بالإضافة إلى NLCs المحملة بـ ميثيل ثنائي هيدروجاسمونات و بيتا ألانين معًا هو نهج محتمل للسيطرة على تقدم المرض وتقديم علامات واعدة للتعافي السريع .