الجمهورية العربية السورية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة المنارة

كلية الصيدلة

النطاف المعدلة لإيصال العلاج المستهدف لأورام الجهاز التناسلي الأنثوي

مشروع تخرج أعد لنيل درجة الإجازة في الصيدلة والكيمياء الصيدلية

إعداد

بتول بسام ناصر **طيف مالك جديد**

إشراف

د. صفاء دلا

العام الدراسي ٢٠٢١/٢٠٢٢

الإهداء

إلى من عُرفت باسمه اكثر من اسمي فكانت تلك شهادة نصري الأولى

إلى الغائب الذي لن يأتي ... إلى الأمين الذي فارقني باكراً ... إلى خالد الذكر .. الذي لولاه لما وصلت ... إلى فخري وعزي ... إلى الساكن في قلبي

إلى شهيدي الغالي العميد بسام ناصر.

إلى من أجد فيها اسمى معاني الحب والحنان

إلى صاحبة الفضل الاكبر بهذا النجاح

إلى صاحبة البسمة التي رافقت صباح هذه السنوات ل تعطيني القوة والعزيمة والأمل

إلى من أجد فيها كل معاني الصبر والتحمل

إلى العظيمة التي لا استطيع انو أوافيها حقها ما حييت

إلى الغالية أمي.

إلى من كان معي بجميع تفاصيل حياتي

إلى من ساعدني وساندني وشجعني وكان خير الشريك والحبيب

إلى العلامة الفارقة في حياتي

إلى عينيك اللامعتين حبّاً ودعماً

الدكتور علاء.

إلى سندي في هذه الحياة

إلى مثال الهدوء والرصانة والشخصية الأكفى

على الإطلاق

إلى رفيق الدرب

إلى من ارى مستقبلي بنجاحه

إلى أخي ال

غالي الدكتور علي.

إلى أنقى وأطهر القلوب

إلى المعطاءة مربية الأجيال

إلى من أتمنى لها السعادة دائماً

اختي الغالية المدرسة علا.

إلى الغائب الذي لا يعوض مكانه أحد

الغالي الذي كان لي بمثابة أخ

إلى من ذكراه محفورة في ذاكرتي

إلى صهري وجد

إلى من شاركنا العصر الذهبي

إلى من كان خير السند كالأخ

إلى من استطيع الاعتماد عليه

صهري المهندس باسل.

إلى شريكة العصر الذهبي

إلى من كانت مصدر الفرح والتفاؤل دائماً

من تعلمت منها الاصرار والعزيمة

أختي الغالية المهندسة بشرى.

إلى من أرى بعينيها ماينبئ بأروع النجاحات

إلى زميلتي بالمهنة

إلى شريكة الضحكات والمشاكسات التي لا تحلو حياتي بدونها

أختي الغالية زينب

إلى طفلتي المدللة آخر الحب وأعذبه

إلى حبي المملوء بالشغب الجميل

إلى من سوف تبقى في نظري الصغيرة الجميلة

اخر العنقود جودي.

إلى ورداتي الصغيرات

إلى من أرى بهم سر الحياة

إلى بنات قلبي

ماسا و ليا

إلى من توجوني فرداً من أسرتهم الدافئة ولي السعادة والشرف

فرحتي اليوم تكتمل بكم

عائلتي الثانية.

إلى الجزء الأجمل في ذاكرتي ... إلى اصدقاء الماضي والحاضر والمستقبل ... إلى أطيب القلوب

ايهاب، وسام ودانيال.

إلى صاحبة القلب الأبيض الذي ينبض بالخير والحب

هبة الحفة.

أتقدم بجزيل الشكر والامتنان العظيم والتقدير العميق إلى الاستاذة الدكتورة صفاء دلا وأساتذتي الجامعيين الكرام كافة

لما منحوه لي من وقت وجهد وارشاد وتوجيه وتشجيع.

إلى شريكة أيام الدراسة

سهرنا معاً ودرسنا معاً وتشاركنا لحظة النجاح

طيف جديد.

إلى المشعة أملاً صاحبة الأثر الجميل

هلا أحمد.

إلى من عرفت كيف أجدهم وعلموني أن لا أضيعهم ... إلى أصدقائي....بسمة صبح، مارسيل القاضي، اية مكنا، ريم ابراهيم، ميس ادناوي، رانيا اسماعيل، أوس أحمد، ولاء عبدالله، اية علي، هبة بظط، زينب رستم، بلسم صبيح وحلا عبيدة.

هذه أطروحة التخرج، كهدية خاصة لكم، لأعبر لكم عن أعمق احترامي وامتناني.

بتول بسام ناصر

الإهداء

إهداء إلى الدكتورة القديرة التي لولاها لما تمّ هذا العمل..

من خصّصت من وقتها الثمين كي ترشدنا لننجز ما أنجزناه..

الدكتورة صفاء دلا

إلى القدوة الحسنة والمثل الأعلى ....إلى مصدر الفخر وأعظم من علمني..

دكاترتي الأفاضل

إلى القلب الكبير والسند الذي لا يميل.....

إلى من أحمل اسمه بكل فخر.....

إلى من كان يؤمن بي وزرع فيّ بذور التحدي والقوّة..

إلى من لقّبني بالدكتورة منذ نعومة أظفاري...

إلى من يفاخر بإنجازاتي ويتباهى فيها أمام الناس...

إلى من كان يدعمني ويقف بجانبي ، فكان هذا النجاح نتيجة لجهوده وتكريماً لعطائه..

أبي الغالي

إلى منبع الحب والحنان والعطف...

إلى الحضن الذي يختصر معاني الأمان...

إلى من كانت دعواتها سر نجاحي وحنانها بلسم لإيامي....

إلى من أفتخر بشبهي لها....

إلى من وجودها يختصر الجميع بنظري....

إلى من لا أجد لها كلمات تعبر عنها أو توفيها حقها....

إلى ريحانتي وأماني ومأمني وسكينتي ومسكني....

جنتي في الدنيا وصديقة روحي "أمي"

إلى قمري وملاكي الجميل...

إلى أميرة بيتنا وبهجة حياتنا..

إلى سُكّرتي الجميلة..

إلى شمسي ونوري وتوءم روحي..

إلى من دعمتني في كل خطوة..

من كانت بجانبي في كل لحظة..

أختي وغاليتي جودي

إلى من أتمنى أن يعلو قمم الحياة بفخر...من لا تحلو جمعات العائلة إلا به...

إلى من كان سنداً لي على الدوام...

أخي عبدالرزاق

أصغر معجبيّ وحبيب القلب وآخر العنقود...صاحب الضحكات الرنانة...

الأحن والألطف على الإطالق...

إلىُ مدللي الذي سيبقى طفلاً بعيني مهما كبر...

أخي علي

إلى من كان يأخذ يد حفيدته خطوة بخطوة..

من زرع صورتي في كل مجلس له لأكون عند ثقتك..

إلى تجاعيد خدودك ولهفة صوتك وفرحة عينيك وانت تتلقى أخبار نجاحي وتفوّقي

جدي الغالي عبد الرزاق

إلى من تمنيت لو أنه شاركني فرحتي هذا اليوم...

إلى من رافقتني روحه في كل خطوة أخطيها...

إلى من نال شرف الشهادة العظمى...

إلى روح عمي الغالي الشهيد مصطفى جديد

أتمنى من الله أن يحفظ أولادك وأن أراهم في المراتب العليا...

علي جديد

زين العابدين جديد

إلى من قدموا لي كل الحب والحنان والتشجيع...إلى عائلتي الكبرى وسعادة الحياة..

أعمامي وعماتي

إلى من ساندوني وقدّموا لي يد العون

إلى من وقفوا بجانبي في حزني وفرحي ونجاحي

أخوالي وخالاتي

إلى ذات القلب الرقيق...

إلى شقيقة القلب والروح....

إلى ألطف إنسانة ، المميزة دائماً...

صيدلانية المستقبل تاله اسماعيل

إلى من كانت عوناً وسنداً لي...

إلى من وجدتها دائما بجانبي وقدمت لي الكثير...

الصيدلانية ولاء علشة

إلى من شاركوني طفولتي وأجمل ذكريات حياتي...

إلى من تجمعني بهم صلة القلب والدم والحب والرحم...

المهندسة شام ديب

الصيدلانية جوى علشة

الدكتورة جوانا علشة

الآنسة شهد عباد

وإلى صيادلة المستقبل رجاء عباد و كرستين علشة

إلى رفيق الروح، الذي يُراهن على نجاتي، ويُذكرني بمدى قوتي وإستطاعتي، ذلك الذي لا يُحبطني ويؤمن بشجاعتي مهما ضَعفت وإرتخيت، واقفًا خلفي مثل ظلي...

خضر حسن

إلى بسمة الروح وضحكة الأمان...

إلى من كانوا لروحي قريبة...

إلى من كانوا طاقتي الإيجابية...

هيا سعيد

حلا عبيدة

بسمة حمامة

إلى صديقة الطفولة...

أمامة الخيّر

إلى القلب المؤمن بأن الحلم سيتحقّق...

إلى من كان دعاؤه سرّ نجاحي...

إلى من قال لي دعوة بحماس "انشالله بشوفك دكتورة قد الدنيا"...

وكان رفيقاً لتعبي وسهري...

علي أحمد

إلى من كانوا النور الذي أضاء دربي...

إلى من لم يبخلوا عليّ بكل وقت وجهد...

الآنسة نور العين اسماعيل الآنسة مها سلطان الاستاذ رامي سباهية

إلى من جمعتني به الحياة صدفة...

إلى من يحلو معه الحديث والمزاح والسهر...

إلى من يحوّل إنجازاتي الصغيرة الى بطولات خارقة...

إلى صاحب الأحلام الكبيرة عسى ان يحققها الله له...

المهندس توفيق صافيا

لى رفيقة أيام الجامعة...

إلى من شاركت معها الحماس والخيبات ومصاعب الدراسة...

الصيدلانية نايا جبور

إلى رفاق الخطوة الاخيرة من جعلوا النهاية سعيدة...

إلى لطفاء الروح مؤنسي الوقت صيادلة المستقبل...

ماهر خيربك، أوس احمد، روبيرت ابراهيم، علي مظلوم، علي يوسف، بشار حويجي ،كنانة علي، لين علي، ميس الادناوي، رانيا اسماعيل، فرح داوود، نيرمين صيوح، مايا مخلوف، لين عيد، محمد مخلوف، عبير محمد، سلاف حمدان، عرين خيربك، يوسف حطاب

الى شركاء المشروع والأيام الجميلة .....
من كانوا اخوة وأصدقاء....

الصيادلة هلا احمد، بتول ناصر

الى كل ومضة عين قاومتها ليلاً...

الى كل غفوة قاطعتها لأجل الوصول..

الى رجفة يدي قبل الدخول للامتحان وعند ظهور النتائج..

الى كل من راهن على عدم وصولي و وصلت ..

الى احلامي التي رأيتها تبتعد ثم تقترب ..واليوم التقينا..

الى النجاح والفرح الذي يعانق اهدائي وعملي هذا..

واخيراً وليس اخراً...الى كل من يحمل بعضاً من الحب في قلبه اليّ..

الى كل من لم تسعفني ذاكرتي بكتابة اسمائهم لكنهم في قلبي دوماً..

اهدي هذا النجاح اليكم...

طيف مالك جديد

ملخص البحث

تمثل الأدوية الموجهة حجر الزاوية في الطب الدقيق، الذي يستخدم المعلومات المتاحة حول جينات الشخص لتشخيص وعلاج الأمراض الخاصة به. لهذا تكمن الميزة الأساسية لهذا النوع من العلاج في قدرته على التأثير بشكل أساسي في خلايا السرطان وحدها دون أن يؤثر على الخلايا الطبيعية. العلاج الموجه يستهدف التغييرات الداخلية في دورة حياة الخلية السرطانية فقط لذا تختلف الأعراض الجانبية للأدوية الموجهه والتي تعتبر أقل سمية من العلاج الكيماوي التقليدي. تعتبر الأجسام المضادة وحيدة النسيلة والجسيمات الصغيرة أهم الأدوية الموجهة المستخدمة في علاج السرطان. على الرغم من الجهود البحثية المكثفة ، لا يزال توصيل الدواء إلى أماكن الاستهداف أمر يمثل تحديات لمصنعي الأدوية والباحثين. حيث يوجد العديد من العوامل التي تؤثر على التوافر الحيوي للعلاج الموجه إذا أخد عن طريق الفم أو الوريد. في هذا المشروع نسلط الضوء على أحدث ما توصل إليه العلم في إيصال الدواء الموجه إلى أورام الجهاز التناسلي الأنثوي. من خلال محرك الحيوانات المنوية الأصغري الهجين للإيصال المستهدف للدواء. تم إثبات أن هذا النظام وسيلة فعالة لتوصيل الأدوية عن طريق تحميل خلية الحيوانات المنوية المتحركة بدواء مضاد للسرطان (دوكسوروبيسين هيدروكلوريد) ، وتوجيهها مغناطيسياً، إلى ورم كروي مستزرع في المختبر، وأخيراً تحرير خلية الحيوانات المنوية لتوصيل الدواء موضعياً.

Abstract:

Prescribing drugs are the cornerstone of precision medicine, which uses available information about a person's genes to diagnose and treat their diseases.Therefore ,the main advantage of this type of treatment lies in its ability to affect mainly cancer cells alone without affecting normal cells. Targeted therapy targets only internal changes in the cancer cell's life cycle, so the side effects of targeted drugs differ, which are less toxic than conventional chemotherapy. Monoclonal antibodies and small particles are the most important targeted drugs used in cancer treatment. Despite extensive research efforts, drug delivery to target locations remains challenging for drug manufacturers and researchers.

There are many factors that affect the bioavailability of targeted therapy if it is taken orally or intravenously. In this project, we highlight the latest scientific findings in the delivery of targeted drugs to tumors of the female reproductive system. Through a hybrid microsperm drive for targeted drug delivery. This system has been shown to be an effective drug delivery method by loading the motile sperm cell with an anticancer drug (doxorubicin hydrochloride), magnetically guiding it into a tumor spheroid cultured in vitro, and finally releasing the sperm cell to locally deliver the drug.

الفهرس

العلاج المستهدف للسرطان. ١٧

آلية عمل العلاج المستهدف للسرطان ١٧

تعيين الدواء الموجه..... ..... ١٨

أنواع العقاقير الموجهة لعلاج الأورام..... ١٩

الطرق الحديثة في إيصال العلاج المستهدف (البروتين العلاجي) ٢٠

الحيو انات المنوية المستخدمة في إيصال العلاج الموجه ٢٤

ميزات الحيو انات المنوية كنو اقل حيوية للأدوية الموجهة ٢٥

تحميل الدواء في الحيو انات المنوية ٢٧

الفعالية المضادة للأورام للحيو انات المنوية المحملة بالأدوية ٣١

نقل الحيو انات المنوية وتوصيل الأدوية ٣٥

الاستنتاجات..... ..... ٤١

تقنيات العمل ومواده..... ..... ٤٢

المراجع..... ..... ٥٢

العلاج المستهدف للسرطان

بدأت الأبحاث في مجال الأدوية الموجهه في الماضي حتى أعتمدت إدارة الغذاء والدواء الأمريكية أول دواء موجه لعلاج السرطان عام ١٩٩٧ وهو ريتوكسيماب لعلاج سرطان الخلايا البائية الليمفاوي اللاهودجيكي الذي لم يعد يستجيب لأنواع العلاج الأخري.

ومع مرور السنوات تم إعتماد العديد من الأدوية الموجهه والتي أصبحت من أحدث طرق العلاج المستخدمة في علاج السرطان.

تتميز الخلايا السرطانية بإختلافات في المادة الوراثية (DNA) عن الخلايا الطبيعية والتي تختلف أيضا حسب نوع السرطان وهذا التغير الجيني يؤدي بدوره إلي سرعة إنقسام الخلايا السرطانية مما يؤدي لتكون الأورام السرطانية.

يعتبر هذا العلاج أحد أنواع العلاج الكيماوي ولكن يختلف في آلية عمله عن العلاج الكيماوي التقليدي الذي يعمل على قتل الخلايا السرطانية بينما يلجأ العلاج الموجه لإيقاف نمو الخلايا السرطانية وبالتالي السيطرة على نمو الأورام السرطانية وإنتشارها.

تمثل هذه الأدوية حجر الزاوية في الطب الدقيق، الذي يستخدم المعلومات المتاحة حول جينات الشخص لمنع وتشخيص وعلاج الأمراض الخاصة به. لهذا تكمن الميزة الأساسية لهذا النوع من العلاج في قدرته على التأثير بشكل أساسي في خلايا السرطان وحدها دون أن يؤثر على الخلايا الطبيعية.

آلية عمل العلاج المستهدف للسرطان

العلاج الموجه يستهدف التغييرات الداخلية في دورة حياة الخلية السرطانية فقط لذا تختلف الأعراض الجانبية للأدوية الموجهه والتي تعتبر أقل سمية من العلاج الكيماوي التقليدي.

بينما يستهدف العلاج الكيماوي التقليدي قتل الخلايا السرطانية سريعة الإنقسام مما قد يؤثر بدوره على بعض الخلايا الطبيعية بالجسم ذات الإنقسام السريع مما يؤدي لظهور الأعراض الجانبية للعلاج الكيماوي التقليدي يعتمد العلاج الموجه في عمله على:

• غلق الإشارات الكيميائية المسؤولة عن النمو و الإنقسام داخل الخلية السرطانية .

• تغيير طبيعة البروتين الذي يلعب دورا أساسياً في تكوين المادة الوراثية (DNA) داخل الخلية السرطانية.

• تعطيل تكوين الأوعية الدموية المغذية للخلايا السرطانية.

• رفع كفاءة عمل الجهاز المناعي للجسم للعمل ضد الخلايا السرطانية .

• إدراج مواد سامة إلي داخل الخلية السرطانية فقط لقتلها دون الإضرار بالخلايا السليمة.

• التداخل مع عمل بعض الهرمونات المحفزة لنمو بعض الأورام بتعطيل تكوينها أو الحد من تأثيرها في الجسم، هذا النوع من العلاج الهرموني تم إعتماده لعلاج سرطان الثدي وسرطان البروستات.

تعيين الدواء الموجه

١- التعرف على الأهداف التي يمكن استهدافها، حيث يتم تحديد أهداف مناسبة يمكن أن تؤثر على نمو السرطان وانتشاره. إحدى هذه الطرق هي مقارنة نسبة العديد من البروتينات في الخلايا السرطانية مع تلك الموجودة في الخلايا الطبيعية. البروتينات الموجودة في الخلايا السرطانية دون الخلايا الطبيعية أو الموجودة بنسبة أعلى في الخلايا السرطانية قد تكون أهدافاً محتملة، وخاصة إذا كانت معروفة بدورها في نمو الخلايا أو بقائها على قيد الحياة. كما قد يكون هذا البروتين المستهدف بروتيناً طبيعياً موجوداً على سطح الخلية، لكن حدوث إحدى الطفرات فيه أدت إلى حدوث السرطان أو انتشاره.

٢- بعد التعرف على هذا الهدف يعمل الباحثون لإيجاد طريقة أو مركب يتعامل مع هذا الهدف ليساعد على منع نمو أو تطور الورم.

٣- بعدها يتم اختبار هذا العلاج لضمان فاعليته.

أنواع العقاقير الموجهة لعلاج الأورام

هناك نوعان رئيسيان من العقاقير العلاجية الموجهة Targeted therapy

• **الأجسام المضادة أحادية النسيلةMonoclonal Antibodies :** وتعمل عموما عن طريق استهداف بروتينات معينة موجودة خارج الخلية أو على سطح الخلية لقتل الخلية السرطانية أو منع انقسام الخلية أو نموها. بعض الأجسام المضادة وحيدة النسيلة لها مواد مشعة مرتبطة بها من أجل تعزيز فعاليتها في تدمير الخلايا السرطانية. وعادة يعطى دواء الأجسام المضادة وحيدة النسيلة monoclonal antibodiesعن طريق الوريد. الأجسام المضادة وحيدة النسيلة هي مثال واضح على العلاجات الموجهة، وقد حصل العديد منها على ترخيص إدارة الغذاء والدواء الأمريكية ووكالة الأدوية الأوروبية مثل:

- ريتوكسيماب
- بيفاسيزوماب
- سيتوكسيماب
- ترازتوموماب

• **الجزيئات الصغيرة Small Molecules :** هي عقاقير ذو جزيئات صغيرة يمكن أن تخترق غشاء الخلية للتفاعل مع الخلايا المستهدفة سواءً داخل و على سطح الخلايا السرطانية. وعادة تؤخذ عقاقير الجزيئات الصغيرة small molecules عن طريق الفم.

الجزيء الصغير يقصد به المركب ذو الكتلة الجزيئية أقل من ٩٠٠ دالتون. وهنالك العديد من الجزئيات الصغيرة التي تعد علاجات موجهة منها:

- إيماتينيب
- جيفيتينيب

- إرلوتينيب
- بورتيزوميب

عيوب العلاجات الموجهة

برغم أن العلاج الموجه يحمل العديد من الميزات، لكن هناك بعض العيوب والمشاكل التي يجب أخذها في الاعتبار. فهذه الأنواع من العلاج قد لا تناسب كل المرضى، حيث يجب أن يتم أولاً تحديد ما إذا كان المريض يملك الطفرة الجينية المحددة التي تمثل هدفاً لهذا العلاج. كما يتم استخدام هذه العلاجات بشكل تجريبي لدى بعض المرضى الذين لا يستجيبون لأنواع العلاج الأخرى.

هناك مشكلة أخرى قد تحدث أثناء العلاج وهي أن الخلايا السرطانية قد تقاوم هذه الأنواع من الأدوية، لذلك يفضل استخدام هذه الأدوية مع أنواع أخرى من العلاج الكيماوي التقليدي.

بالإضافة إلى ذلك، هناك بعض الأعراض الجانبية لهذه الأدوية، فبعض أنواع هذه الأدوية قد تتسبب في حدوث التهابات في الكبد أو مشاكل تتعلق بتجلط الدم والتئام الجروح، كما قد يتسبب بعضها في ارتفاع ضغط الدم أو تثبيط المناعة أو العديد من المشاكل الجلدية.

كما أن الجانب الاقتصادي في استخدام هذه الأدوية لا يمكن إغفاله. فمعظم هذه الأدوية غالية وبعضها باهظ الثمن، وهو ما يمثل عقبة كبيرة في استخدامها خاصة في الدول النامية.

الطرق الحديثة في إيصال العلاج المستهدف (البروتين العلاجي)

على الرغم من الجهود البحثية المكثفة ، لا يزال توصيل البروتين العلاجي إلى أماكن الاستهداف أمر يمثل تحديات لمصنعي الأدوية والباحثين. حيث يوجد العديد من العوامل التي تؤثر على التوافر الحيوي للبروتين العلاجي، فإذا أخذنا الطريق الفموي كمثال، فإن درجة حموضة المعدة المنخفضة وتدرك البروتينات بواسطة أنزيم البروتياز والنفوذية الضعيفة للبروتينات عبر الحاجز المعوي جميعها عوائق في وجه التوافر الحيوي للبروتين، تؤدي إلى إنقاص عمره النصفي ولزوم إعطاء متكرر للجرعات مما يسبب زيادة في التكلفة مع انخفاض امتثال المريض

للمعالجة ،وفي محاولات إيجاد حلول لهذه العقبات أظهرت الجسيمات النانوية Nano particlesنتائج واعدة بالنسبة للنواقل الحيوية، حيث أنها تؤمن حماية للبروتينات وبالتالي تؤمن الحصول على التأثير المطلوب، والسبب في ذلك هو أن الجزيئات النانوية تمتلك نفوذية كبيرة بسبب الحجم الصغير ومساحة السطح الكبيرة التي تسمح بتعديلات لجعله محب أو كاره للماء.

وبالفعل فإن هذه الأنظمة حسنت من ثباتية البروتين وزيادة عمره النصفي الدوراني وتم إثبات ذلك بملاحظات in vivo وفي سبيل تحسين التوافر الحيوي للبروتين العلاجي عند الإعطاء الفموي، تم استخدام مجموعة كبيرة من الجسيمات النانوية البوليميرية القابلة للتحلل الحيوي والتي يمكن أن تعزز حركية و ثباتية الدواء وتؤمن ضبط للتحرر .

يتم أيضا استخدام بوليميرات مخاطية مثل الشيتوزان ذو الشحنة الموجبة الذي يتفاعل مع حمض السياليك الموجود في مخاطية المعدة ويحقق التصاق وبالتالي إطالة لزمن البقاء و تأخير التصفية وأيضا بولي ايتيلين غليكول ومشتقاته تستخدم لنفس الغرض.

ويتم إجراء تجارب حول إمكانية زيادة التوافر الحيوي للأنسولين فموياً باستخدام الجسيمات الميكروية حيث تم تغليف الأنسولين بجزيئات بوليميرpolylactid-co-glycolid وتم تقييم الفعالية الخافضة للسكر في فئران التجارب، تم تسجيل انخفاض في غلوكوز الدم بنسبة ٤٣,٨% لمدة ٢٠ ساعة بجرعة U/KG100 من الأنسولين المحاط بهذا البوليمير وهو ما يعني بداية التوصل لثورة في العلوم الطبية وهي إمكانية إعطاء الأنسولين فموياً.

ومن الأنظمة المستخدمة في التوصيل نذكر الجسيمات الشحمية التي تغلف الدواء/الببتيد يتم تناولها من قبل الجهاز اللمفاوي الذي يضعها مباشرة في الدوران وبالتالي يتم تجاوز عملية التمثيل الغذائي الأولى، نذكر بعض الأدوية المعتمدة على الجسيمات الشحمية المستخدمة سريريا : أمفوتريسين شحمي- دوكسوروبيسين شحمي.

أنظمة أخرى مثل : الاقتران مع الببتيد المخترق للخلايا (CPP (Penetratin - HIV-1 Tat - Oligoarginine أو مع Thioetherالحاوي على كبريت الذي يزيد مقاومة الببتيد للتحلل ويزيد امتصاصه وهي الطريقة المجربة مع الأنجيوتنسين، ومن الممكن اتباع نظام المستحلبات باصطناع تركيبات زيتية تحتوي على الببتيد المحب للماء.

وكعوائق ممكن مواجهتها في إيصال العلاج الدوائي هو إيصاله إلى الدماغ، ويعود ذلك لوجود الحاجز الدماغي الدموي BBB الذي يمتلك مقاومة لمرور المواد الغريبة Xenobiotics (بما في ذلك الأدوية) ، وهو يسمح فقط بمرور الأجزاء المحبة للدسم صغيرة الحجم، ومع ذلك فإن العديد من الجزيئات المحققة لهذه الشروط قد يتم طردها نتيجة وجود بروتينات مقامة لأدوية متعددة Multi-drug resistant protein ، وهو سبب نجاح ٥% فقط من الجزيئات المستخدمة في تطوير الأدوية.

إحدى الطرق المتبعة لتحسين إيصال الأدوية هنا جنبا إلى جنب الجسيمات النانوية هو استهداف مستقبلات معينة يتم التعبير عنها في الخلايا البطانية للحاجز الدماغي الدموي، حيث يتم إقران الدواء بركيزة لهذا المستقبل ، وعند ارتباط الركيزة بمستقبلها سيتم تأمين وصول الدواء المقترن بها إلى المستقبل الذي يعبر عنه في BBB ، ومن هذه المستقبلات : مستقبلات ترانسفيرين- مستقبلات الأنسولين- مستقبلات الليبتين- مستقبلات الليبوبروتين منخفض الكثافة- LDLالمستقبلات الشبيهة بالبروتين الدهني منخفض الكثافة-LPR1 وكذلك مستقبلات الجسم المضاد العابر للحاجز الدماغي.FC5 كمثال: مستقبلات LPR1 التي تشكل معHDL (البروتين الدهني عالي الكثافة) جزيء يسمى ApoE الذي ينقل بدوره الكوليسترول وليبيدات أخرى عبرBBB ، تمت الاستفادة من هذا المعقد بإقرانه مع جسيمات نانوية حاملة للدواء لإيصال الجزيئات العلاجية. كما يمكن تحفيز هذه المستقبلات بالأجسام المضادة كوسيلة لتوصيل نموذجي لأدوية الجهاز العصبي المركزي.

أنظمة إيصال الجينات في العلاج الجيني

يوفر العلاج الجيني ، أو تعديل التعبير الجيني أو تصحيح الجينات المختلة، إمكانات كبيرة علاجية لعدد كبير من الأمراض -فعلى عكس الأدوية التقليدية -فإن العلاج الجيني يعدل الخلايا وراثياً وبالتالي يفتح إمكانيات علاج الأمراض التي كان يُعتقد في السابق أنها غير قابلة للشفاء ولا يقتصر العلاج على الأعراض فقط.

وبما أن الأمراض الجينية هي الأصعب في علاجها، يجب اعتماد أنظمة توصيل الجينات العلاجية إلى الخلايا / النسج الهدف، و قد أثبتت النواقل الفيروسية أنها أدوات فعالة لإيصال الجينات ، مع إمكانية إجراء تعديلات لدى هذه النواقل بهدف زيادة التعبير الجيني، الأمر الذي يخدم في علاج السرطانات الموجه وغيرها من الأمراض الجينية.

ولكن على الرغم من تطوير العديد من أنظمة توصيل الجينات الفيروسية وغير الفيروسية في العقود الثلاثة الماضية، لم يتم تصميم أي نظام توصيل يمكن تطبيقه في العلاج الجيني لجميع أنواع الخلايا في المختبر أو في الجسم الحي بدون عوائق أو آثار جانبية.

بالنسبة للنواقل الفيروسية، تم اختبار ٥ نواقل فيروسية للتطبيقات السريرية :

الفيروسات القهقرية-الفيروسات الغدية-الفيروسات المرتبطة بالغدة-فيروسات الهربس البسيط-الفيروسات البطيئة

أول تجربة علاج جيني بشري أنجزت عام ١٩٩٠ باستخدام فيروسات قهقرية لعلاج نقص المناعة المشترك الشديد، ولكن العلاج لقي نكسة كبيرة في أواخر التسعينيات بسبب موت مريض ناتج عن الاستجابة المناعية ضد الفيروسات القهقرية عام ١٩٩٩، وبعدها بعام تم تسجيل تطور لابيضاض الدم عند أربع مرضى محرض بالفيروسات القهقرية، مما قاد للتوجه إلى تطوير ناقلات فيروسية أكثر أمانا أو النقل غير الفيروسي. والفيروسات التي أثبتت فعاليتها وأمانها هي الفيروسات الغدية والمرتبطة بالغدة وفيروسات الهربس البسيط. وفي الشكل المدرج يتم توضيح نسب استخدام النواقل الفيروسية الثلاث الآمنة ضمن ٢٨٤ تجربة سريرية حيث يظهر تراجع واضح في استخدام الفيروسات القهقرية كنواقل فيروسية.

إن السبب الرئيسي لاستخدام الفيروسات كناقلات لإيصال الجينات عائد لقدرتها الطبيعية على إصابة الخلايا ونقل المواد الجينية ذات الأهمية بكفاءة للخلايا المضيفة . وقد تم اعتماد دواء IMLYGIC® من قبل هيئة الدواء والغذاء FDA كالدواء الأول والوحيد المعتمد على فيروس في علاج السرطان الميلانومي الجلدي وتحت الجلدي والعقدي، والدواء هذا معتمد على فيروس الهربس البسيط المعدل HSV-1 حيث تم حذف اثنين من الجينات الفيروسية γ34.5وα47 ، اللذان يشفران بروتين الخلية المصابة ICP34.5 و ICP47 على التوالي واستبدالهما بجين عامل تحفيز الخلايا المحببة البشرية GM-CSF

إن حذف جينγ34.5 يمكن الفيروس من التكاثر الانتقائي داخل الأورام وليس ضمن النسج السليمة، بينما حذف α47 يبطل قمع الاستجابة المناعية للفيروس ويساعد على تنشيط جهاز المناعة، يجذب GM-CSF -المعبر عنه موضعيا-الخلايا المتغصنة المقدمة لمستضد الورم مؤديا لاستجابة مناعية تكيفية ضد الورم.

الحيوانات المنوية المستخدمة في إيصال العلاج الموجه

يعتبر محرك الحيوانات المنوية الأصغري الهجين للإيصال المستهدف للدواء مرغوباً به لعلاج الأمراض التي قد تصيب الجهاز التناسلي الأنثوي. تم إثبات أن هذا النظام وسيلة فعالة لتوصيل الأدوية عن طريق تحميل خلية الحيوانات المنوية المتحركة بدواء مضاد للسرطان (دوكسوروبيسين هيدروكلوريد) ، وتوجيهها مغناطيسياً، إلى ورم كروي مستزرع في المختبر ، وأخيراً تحرير خلية الحيوانات المنوية لتوصيل الدواء موضعياً.

تم تصميم آلية إطلاق النطاف لتحرير الحيوانات المنوية عند التقاء المحرك الميكروبيولوجي الهجين بجدران الورم ، مما يسمح له بالسباحة ضمن الورم وإيصال الدواء من خلال اندماج غشاء الخلية السرطانية بالغشاء الخلوي للحيوانات المنوية. في تجاربنا، أظهرت خلايا الحيوانات المنوية قدرة عالية على تغليف الأدوية واستقرارية حمل الدواء، مما يقلل بشكل جيد من الآثار الجانبية السامة وتراكم الأدوية غير المرغوب فيه في الأنسجة السليمة.

بشكل عام، تعتبر خلايا الحيوانات المنوية مرشح ممتاز للعمل في البيئات الفيزيولوجية ، لأنها لا تظهر أي بروتينات مرضية ولا تتكاثر لتشكل مستعمرات غير مرغوب بها، على عكس الخلايا أو الكائنات الحية الدقيقة الأخرى. هذا المحرك الصغير الهجين هو منصة متوافقة حيوياً مع إمكانية التطبيق في مجال الرعاية الصحية لأمراض النساء، وعلاج أو اكتشاف السرطان أو أمراض أخرى في الجهاز التناسلي الأنثوي.

يعد تطوير أنظمة توصيل الأدوية التي توفر جرعات فعالة موضعياً بطريقة مضبوطة أحد الأهداف الرئيسية في مكافحة السرطان في جميع أنحاء العالم.

وتشمل التحديات الحالية الامتصاص غير النوعي من قبل أعضاء أخرى ، تغلغل محدود للأنسجة ، وانخفاض التركيز الفعال بسبب التمدد في سوائل الجسم.

من بين أكثر الأساليب الواعدة بتقنية النانو والحواجز الدقيقة للتغلب على هذه العقبات هي أنظمة توصيل الدواء الخلوي، حيث تعمل الخلايا أو الكائنات الحية الدقيقة كناقلات للأدوية، حيث تتمتع بمزايا مثل

- سيولة الغشاء.
- القدرة على التفاعل مع الخلايا / الأنسجة الأخرى.
- العمر الطويل.
- التوافق الحيوي العالي.

تم استخدام الخلايا الجذعية ، على سبيل المثال ، كنظام تجميعي لتوصيل الأدوية الموجهة للعلاج التجديدي. يوجد تقارير أن البلاعم الخلوية وخلايا الدم الحمراء تعمل مع أو بدون التوجيه الصناعي أو مكونات الدفع كناقلات لعلاج السرطان وإطلاق الدواء المستدام في الدم ، على التوالي.

وبالمثل ، فإن الخلايا ذاتية الدفع ، كمزيج من التغليف الخلوي والدفع ، أثارت اهتمام العلماء في جميع أنحاء العالم بسبب أدائها في التنقل ضمن البيئات الفيزيولوجية الدقيقة المعقدة.

أظهرت البكتيريا ذات الخصائص الجاذبة الكيميائية و / أو مع مكونات التوجيه الصنعي المرتبطة بها ، أنها تنقل الأدوية بشكل فعال وتوصلها إلى أنسجة الورم.

على سبيل المثال ، يوجد تقارير أن البكتيريا الممغنطة الهوائية تقوم بتوصيل الجسيمات الشحمية المحملة بالأدوية إلى مناطق نقص الأكسجين في أنسجة الورم عند الفئران. ومع ذلك ، من الجدير بالذكر أن الفقد السريع للدواء أو حتى تفاعلات المناعة الذاتية قد يكون سببها الاستجابة المناعية ضد بكتيريا معينة.

ميزات الحيو انات المنوية كنو اقل حيوية للأدوية الموجهة

بالمقارنة مع ناقلات الأدوية الخلوية الأخرى فإن الحيوانات المنوية محسنة بشكل طبيعي للسباحة في الجهاز التناسلي الأنثوي، مما يجعلها مرشحة واعدة لعلاج سرطان عنق الرحم وأمراض النساء الأخرى. تتمتع خلايا

الحيوانات المنوية أيضًا بقدرة غير عادية على تغليف الأدوية المنحلة بالماء، والتي لها ألفة عالية للارتباط بالحمض النووي ، وتخزينها في نواتها البلورية.

من خلال ذلك، يمكن لغشاء الحيوانات المنوية حماية الأدوية من التخفيف في سوائل الجسم، وردود الفعل المناعية، والتفكك بواسطة الأنزيمات. يمكن للحيوانات المنوية أيضًا أن تتجنب بكفاءة الإغراق (فرط) بالجرعة الدوائية، والتي تعتبر مشكلة رئيسية لحاملات الجزيئات الغروانية، وذلك بفضل نظام الغشاء الخلوي المضغوط الخاص بها.

لتحقيق إيصال مستهدف للدواء، تم أيضاً عرض بعض المحاولات المثمرة باستخدام المحركات الدقيقة الصنعية. على سبيل المثال، يوجد تقارير أن السوط الاصطناعية شاركت بنقل المادة الوراثية في جينات خلايا الكلى الجنينية البشرية ٢٩٣ HEK ، من خلال نقل الليبوبليكسات الشحمية المحملة بـ pDNA ولإطلاق حمولة الجسيمات الشحمية المحملة بالكالسين إلى الخلايا العضلية للفأر في المختبر.

تم أيضًا استخدام المحركات الدقيقة المعتمدة إلى على المغنيزيوم بنجاح لإيصال الأدوية الى معدة الفأر لعلاج الالتهابات البكتيرية.

ومع ذلك ، بالنظر إلى التطبيق الفعال لعلاج السرطان في الجهاز التناسلي الأنثوي فإن الحيوانات المنوية مرشحة أكثر ملاءمة لنقل الأدوية مقارنة بالمحركات الدقيقة الصنعية البحتة لأنها تتكيف بشكل طبيعي للسباحة في مثل هذه البيئة وتتمتع بمزايا عملية مثل حماية الحمولة وتقليل السمية الخلوية بفضل غشاءها المضغوط. علاوة على ذلك ، يمثل نقل الدواء بالحاملات الدقيقة الاصطناعية مثل الكرات والكبسولات الدقيقة، والمحركات الدقيقة مشكلة بسبب النقل الغشائي غير الفعال بين هذه الناقلات والخلايا غير الصحية.

في المقابل ، من المتوقع أن تعمل خلايا الحيوانات المنوية على تحسين نقل الدواء والتوافر الحيوي للدواء إلى الخلايا المستهدفة عن طريق قدرتها على الاندماج الخلوي. تشارك العديد من بروتينات غشاء الحيوانات المنوية مثل CD9 والإنتغرينات في هذه العملية.

أظهرت الدراسات السابقة استخدام الحيوانات المنوية أيضا كناقلات للجسيمات النانوية والحويصلات الشحمية على غشاءها بهدف التوطين البروتيني ونقل الجزيئات الحيوية. بالإضافة إلى ذلك ، تم استخدام المحركات الدقيقة لحمل أو توجيه خلايا الحيوانات المنوية بهدف الإخصاب المساعد في الجسم الحي.

ومع ذلك ، على حد علمنا ، لم يتم الإبلاغ عن أي تطبيق سابق للحيوانات المنوية لتوصيل الدواء من قبل.

في هذا المشروع نقدم محركاً دقيقاً هجيناً منوياً للإيصال المستهدف للدواء. يشتمل هذا النظام على خلية حيوانات منوية متحركة تعمل كمصدر للدفع وناقل للأدوية وبنية مجهرية أنبوبية مغناطيسية مطبوعة ثلاثية الأبعاد (يُطلق علها "رباعي الأرجل") تتميز بأربعة أذرع تقوم بإطلاق الحيوانات المنوية في المكان عندما تكون على وشك التماس مع كرة الورم.

من خلال توفير آليات توجيه وإطلاق يمكن التحكم بها، يمكن لهذا المحرك الصغير أن يوصل الأدوية إلى الخلايا السرطانية علاوة على ذلك يجنب ايضاً تراكم الأدوية غير المرغوب بها في الأنسجة السليمة. يجمع هذا النظام بين العديد من الميزات المثيرة للاهتمام، وهي القدرة العالية على تحميل الدواء ، والدفع الذاتي ، والإطلاق الميكانيكي للحيوانات المنوية المحملة بالأدوية.

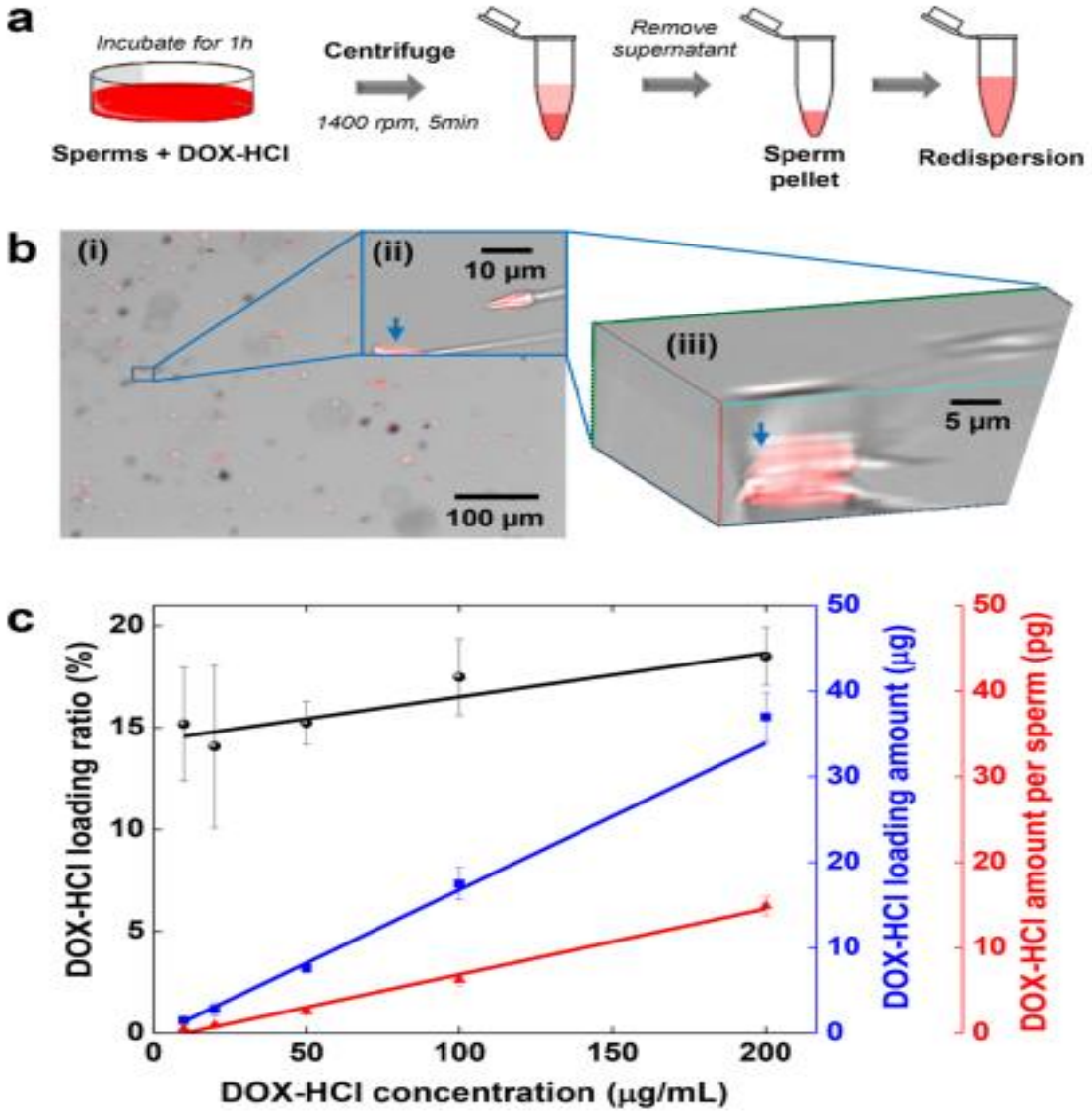
تحميل الدواء في الحيوانات المنوية

يوضح الشكل ١ كيفية تحميل الدواء في الحيوانات المنوية. تم استخدام هيدروكلوريد دوكسوروبيسين-DOX) (HClكدواء نموذجي لتقييم أداء تغليف وتحميل الدواء داخل الحيوانات المنوية. إن هيدروكلوريد دوكسوروبيسين يعتبر دواء معتمد على نطاق واسع مع مجموعة واسعة من التطبيقات في علاج السرطان منذ عام ١٩٧٤. يّستخدم شكله الدهني المسمى (Doxil) بشكل أساسي لعلاج سرطان الجهاز التناسلي الأنثوي.

في هذا البحث ، تم الحصول على الحيوانات المنوية المحملة بـ DOX-HCl عن طريق الحضن المشترك البسيطة لـ DOX-HCl مع الحيوانات المنوية البقرية. بعد التنقية، تمت إعادة انتشار العينة المنوية المحتضنة في وسط-SP)

(TALPالخاص بالحيوانات المنوية) تم تقييم قدرة تحميل الدواء بالحيوانات المنوية عن طريق الفحص المجهري الومضاني ، كما هو موضح في الشكل ب١ ، حيث يعرض DOX-HCl ومضاناً ذاتياً عند طول موجة ٤٧٠ نانومتر .

من هذه الصور ، تم كشف أن ٩٨ ٪ من خلايا الحيوانات المنوية (حوالي ٣٥٠٠ نطفة) تم تحميلها بـ .DOX-HCl تم العثور على DOX-HCl في الغالب في رأس الحيوانات المنوية ، كما يمكن ملاحظته في الشكل ١ ب.



الشكل ٣ تحميل الحيوانات المنوية بالأدوية الموجهة وتقييم فعالية التحميل.

تشير صورة مفصلة ثلاثية الأبعاد أعيد بناؤها، تم الحصول عليها من صور متراكبة لخلية منوية واحدة ، أن-DOX HClتم تحميله بشكل أساسي في السيتوبلازم ونواة الحيوانات المنوية (الشكل ١ ب). يمكن أن يعزى ذلك إلى امتصاص الدواء على الكروموسومات المكثفة عن طريق الارتباط بالجسيمات البروتينية البروتيازومات وتشتت الدواء في السيتوبلازم الذي يبقى في رأس الحيوان المنوي بعد النضج.

كتجربة تكميلية ، قمنا بتحميل الحيوانات المنوية بألبومين مصل الأبقار الموسوم بفلوريسين أيزوثيوسيانات اختصاراً (FITC-BSA) ، وهو نموذج للأدوية البروتينية كعنصر بديل. في هذه الحالة ، جمعت الحيوانات المنوية الدواء في رؤوسها وأجزاءها الوسطى وذيولها ، وهو ما يمكن أن يُعزى إلى قدرتها على امتصاص البروتينات يجب إجراء مزيد من الدراسات باستخدام الأدوية القائمة على البروتين من أجل تقييم توزيعها الحيوي وتأثيرها العلاجي لإجراء مقارنة نهائية مع DOX-HCl هيدروكلوريد دوكسوروبيسين ، والذي تم اختياره لإجراء مزيد من التجارب في هذه الدراسة.

يوضح الشكل(١ ج) خواص تحميل الدواء في المحلول بتركيز ٣ × ١٠٦ حيوانات منوية لكل مليلتر ، زادت كمية تحميل هيدروكلوريد دوكسوروبيسين بشكل خطي تقريبًا بتركيز DOX-HCl يتراوح من ١٠ إلى ٢٠٠ ميكروغرام / مل. وبالتالي ، تظل نسبة التحميل عند حوالي ١٥٪ وسطيا لجميع التركيزات. عند أقصى تركيز لـ DOX-HCl في تجاربنا ، كانت كمية التحميل تصل إلى ٣٧ ميكروغرام في ٥٠٠ ميكرولتر من محلول الحيوانات المنوية. تشير هذه الكمية إلى متوسط تغليف يبلغ ١٥ بيكوغرام من الدواء لكل خلية منوية واحدة.

أظهر بحث سابق تحميلاً ناجحاً لـ هيدروكلوريد دوكسوروبيسين في البالعات الخلوية ، حيث تم العثور على DOX داخل الخلايا، خاصة في النواة (٢,٥ بيكوغرام دواء لكل خلية، حجم الخلية تقريبًا ١٥-٢٠ ميكرومتر) ، بتركيز أعلى مقارنة بمحلول DOX المتبقي في وسط الزرع. لشرح خواص التحميل هذا ، أشار المؤلفون إلى نفاذية الخلايا البالعة المرتبطة بوساطة الأدينوزين ثلاثي الفوسفات (ATP) كآلية محتملة للتغليف الدوائي.

في بحثنا ، تم استخدام هيدروكلوريد دوكسوروبيسين DOX-HCl لأن الخلايا تظهر امتصاصًا محسنًا لـ DOX-HCl الأيوني مقارنةً بدوكسوروبيسين الجزيئي DOX ، والذي يتم امتصاصه عادةً عن طريق الانتشار البسيط. يمكن أن يسمح ذلك باستخدام جرعات عالية من الأدوية المضادة للسرطان مع تقليل التأثيرات السمية الجهازية.

من أجل تحليل تأثير DOX-HCl على الحيوانات المنوية، تم إجراء اختبارين تكميليين:

- **تحليل حيوية (قابليتها للحياة) الحيوانات المنوية المحملة بـ DOX- HCl :** باستخدام مجموعة LIVE / DEADالتجارية. لم يلاحظ أي فرق كبير مقارنة بالحيوانات المنوية غير المحملة حيث أن أكثر من ٣٠٪ من الحيوانات المنوية كانت لا تزال حية في كلتا الحالتين بعد ٤ ساعات من الزرع في وسط SP-TALP
- **اختبار حركية الحيوانات المنوية:** كدراسة أكثر مباشرة لتحديد الحيوانات المنوية الأكثر ملاءمة للهدف المقصود وهو توصيل الدواء تم اختبار حركية الحيوانات المنوية لأنه لا يوفر فقط معلومات حول قابلية الحيوانات المنوية للحياة ولكن أيضًا حول قدرتها على نقل الدواء.

درس الاختبار التغيير الحركي للحيوانات المنوية بعد عملية تحميل DOX-HCl عند تركيز ١٠٠ ميكروغرام / مل. تم حضن عينة تحتوي على حيوانات منوية غير محملة في وسط SP-TALP بدون دواء تحت نفس ظروف الحضانة والتنقية. انخفضت حركات كل من عينات الحيوانات المنوية مع مرور الوقت بشكل مماثل.

في أول ٤ ساعات ، انخفضت نسبة الحيوانات المنوية المتحركة من ٥٦ إلى ٣٦ ٪ ، وهو ما يكفي للاقتران مع الحوامل المجهرية للتجارب اللاحقة.

بعد ٨ ساعات من الحضانة كانت حوالي ٢٥٪ من الحيوانات المنوية لا تزال متحركة في كلا المجموعتين. وبالتالي ، نقترح إجراء عملية توصيل الدواء في غضون ٨ ساعات بعد خطوة تحميل الدواء ، وهو ما يكفي للوصول إلى أي عضو في الجهاز التناسلي (كانت أقصى مسافة انتقال في تجاربنا حوالي ١٤٤ سم ، مع الأخذ في الاعتبار أن متوسط سرعة المحرك الهجين المنوي تبلغ ٥٠ ميكرومتر / ثانية). وبالتالي ، فإن تأثير DOX-HCl على حيوية الحيوانات المنوية ليس مهماً.

يمكن تفسير ذلك من خلال حقيقة أن DOX-HCl يقتل الخلايا السرطانية عن طريق التدخل في تركيبها الحيوي الجزيئي وعلى عكس الخلايا السرطانية، أنهت الحيوانات المنوية الناضجة معظم تركيبها الجزيئي بسبب افتقادها لنظام غشاء داخلي كامل.

ومع ذلك ، يتم توليد قوة الدفع في المتقدرات في الجزء الأوسط من الحيوانات المنوية. نظرًا لأن DOX-HCl يتداخل أيضًا مع التركيب الجزيئي في الميتوكوندريا ، فقد يثبط بالتالي استقلاب الطاقة في الحيوانات المنوية، وهو على الأرجح سبب الانخفاض الملحوظ في متوسط سرعة السباحة للحيوانات المنوية من ٧٣ ± ١٦ إلى ٥٧ ± ١٧ ميكرومتر / ثانية أثناء عملية التحميل (بمحلول DOX-HCl بتركيز ١٠٠ ميكروغرام / مل) ، والتي مع ذلك لا تزال سرعة مقبولة لخدمة الغرض المطلوب ، مع الأخذ في الاعتبار أيضًا أن السرعة انخفضت بشكل كبير عندما كان تركيز DOX-HCl أعلى من ١٠٠ ميكروغرام / مل ، استخدمنا تركيز ١٠٠ ميكروغرام / مل DOX-HCl لتحميل الحيوانات المنوية للتجارب اللاحقة.

ميزة أخرى للحيوانات المنوية هي نظام التمثيل الغذائي غير المكتمل ، حيث يمكن للحيوانات المنوية أن تحمي الدواء الموجود داخل الطبقة الدهنية الثنائية مثل الجسيم الشحمي ولكن لا تستقلبه مثل الخلايا الجذعية أو الخلايا الجسدية الأخرى.

أجري أيضًا اختبار لاستقرار التغليف. أظهرت النتائج أن أقل من ١٠٪ من الدواء قد تسرب إلى الوسط بعد ٨ ساعات . هذا يعني أن تغليف DOX-HCl بواسطة الحيوانات المنوية مستقر بدرجة كافية لتجارب توصيل الدواء اللاحقة.

الفعالية المضادة للأورام للحيوانات المنوية المحملة بالأدوية

خلايا هيلا HeLa ، المشتقة من خلايا سرطان عنق الرحم ، تمت تربيتها في الجسيمات الشبه الكروية كنموذج للورم ثلاثي الأبعاد لتقييم تأثير وقدرة الحيوانات المنوية المحملة بالعقاقير على قتل الخلايا السرطانية. من أجل تصوير توزيع الدواء في جسيم الورم الكروي استخدم أولاً ألبومين مصل الأبقار الموسوم بفلوريسين أيزوثيوسيانات FITC-BSA كنموذج للأدوية القائمة على البروتين. لاحظنا بعد الحضانة المشتركة للحيوانات

المنوية مع الأجسام الشبه الكروية المحملة بـ BSA لمدة ٢٤ ساعة،أنه تم العثور على الحيوانات المنوية ليس فقط في المحلول ولكن أيضاً في الأجسام الشبه الكروية، كما هو موضح في الصور المتراكبة، مما يدل على قدرة الحيوانات المنوية على اختراق الأنسجة. وفقًا لتحليل كمي باستخدام ImageJ ، زادت كثافة التألق الومضانية ، والتي تمثل الكمية الإجمالية لـ BSA ، بمقدار ١,٨ مرة مقارنة بالكمية في بداية التجربة.

ازدادت مساحة الانتشار المرصودة لـ FITC-BSA بمقدار ٧,٤ مرات. يشير هذا إلى أن الزيادة في منطقة الومضان لم تكن فقط لأن المزيد من الحيوانات المنوية سبحت في الكرة الكروية بمرور الوقت ولكن أيضاً بسبب نقل المزيد منFITC-BSA من الحيوانات المنوية إلى الجسيم كروي هيلا.

بعد ذلك ، من أجل تقييم الفعالية المضادة للأورام للحيوانات المنوية المحملة بالأدوية ، تم تحميلها بـDOX-HCl

تم التحقيق في فعالية قتل الخلايا لـ DOX-HCl من خلال الحضانة المشتركة للحيوانات المنوية المحملة ٨ × ١٠٤ حيوانات منوية في ١٠٠ ميكرولتر من SP- TALP مع الجسيمات الشبه الكروية هيلا. تمت زراعة الجسيمات الورمية الشبه الكروية بدون أي حيوانات منوية أو دواء ، مع حيوانات منوية غير محملة ، ومحلول DOX-HCl كتجارب ضابطة. كما ذكرنا سابقًا ، يمكن تحميل ٨ × ١٠٤ حيوان منوي في محلول ١٠٠ ميكرولتر بحد أقصى ١,٥ ميكروغرام من DOX- HCl. لذلك ، تم تحضير مجموعة التحكم باستخدام محلول DOX-HCl بنفس تركيز الدواء (١,٥ ميكروغرام DOX-HCl في ١٠٠ ميكرولتر من SP-TALP) لأغراض المقارنة.

يوضح (الشكل ٢ أ) نقل الدواء إلى جسم كروي بعد أكثر من ٧٢ ساعة من العلاج بالحيوانات المنوية المحملة بـ DOX-HCl يُظهر التألق الومضاني الأحمر متوسط كثافة ٣٦ صورة متراكبة تظهر وجود. DOX-HCl

تم العثور على DOX-HCl بشكل متزايد في وسط الشكل الكروي بمرور الوقت. بعد ٧٢ ساعة، انخفض حجم الجسيم الشبه الكروية بسبب موت الخلايا الناجم عن الأدوية. وبالتالي ، لوحظت أيضا مجموعات خلوية متفرقة وخلايا متمزقة في الوسط بعد ٧٢ ساعة (الشكل ٢ أ). تم إجراء تحليل حيوية الخلية عن طريق اختبار / LIVE DEAD الشكل ٢ ب ، ج.

في أول ٢٤ ساعة من الزرعة لم يكن هناك تغيير كبير في جميع المجموعات، بينما بعد ٤٨ ساعة ، أظهرت الحيوانات المنوية المحملة بـ هيدروكلوريد دوكسوروبيسينDOX-HCl تأثير قتل خلوي مماثل لتأثير المحلول الدوائية لنفس الدواء بنفس الكمية الدوائية. تم العثور على نسبة أقل من الخلايا الحية في العينة بعد العلاج بالحيوانات المنوية المحملة بـ هيدروكلوريد دوكسوروبيسين DOX-HCl 47 أو بالمحلول الدوائي ٤٥٪ مقارنة بمجموعة الاختبار الخاصة بالجسيمات الكروية ٦٨٪.

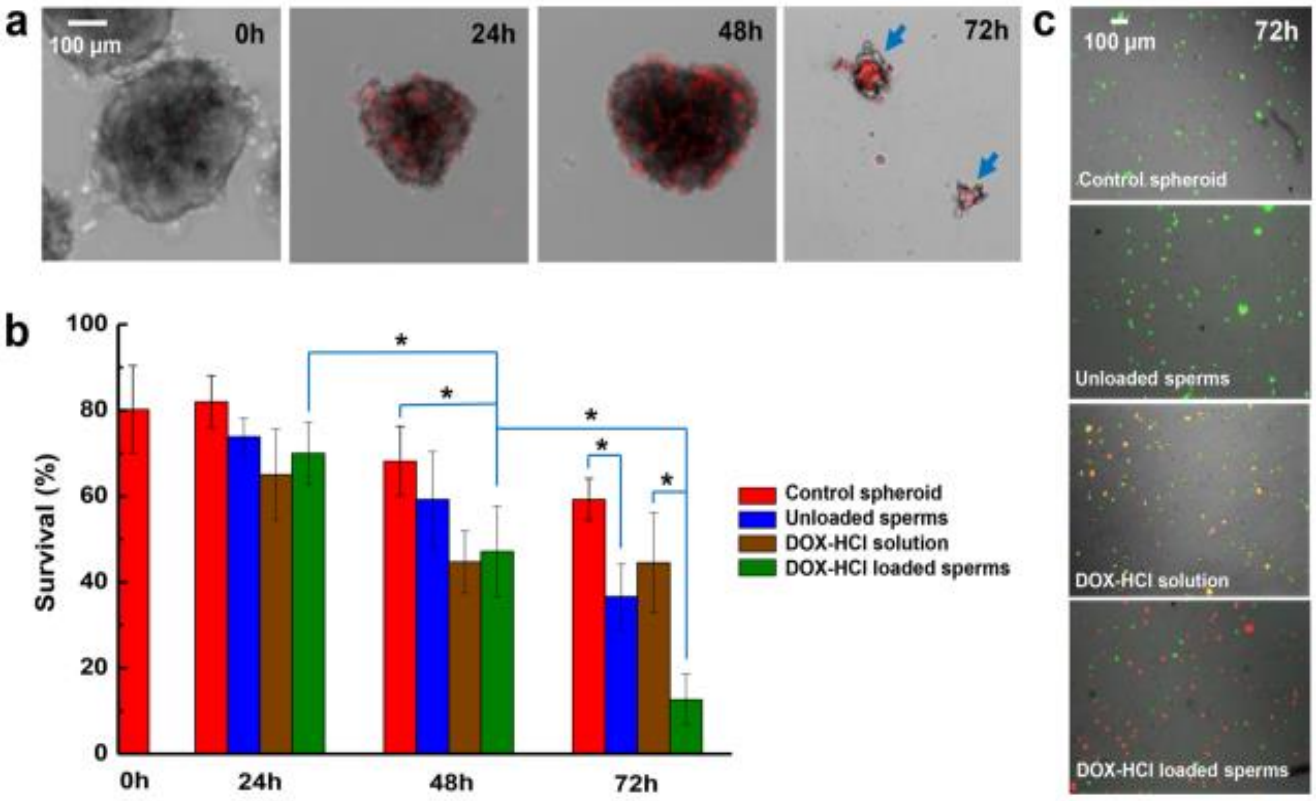
بعد ٧٢ ساعة ، لم يتم العثور على انخفاض كبير في حيوية الخلية المنوية في عينات الاختبار الخاصة بالجسيمات الكروية ومحلول DOX-HCl. في المقابل، أظهرت عينة الحيوانات المنوية المحملة بـ DOX-HCl أقل نسبة من الخلايا الحية (١٣٪) بين جميع المجموعات. أظهرت الحيوانات المنوية غير المحملة تأثيراً سلبياً على الأجسام الشبه الكروية الورمية هيلا HeLa كما كانت نسبة الخلايا الحية ٣٧٪ فقط ، وربما يرجع ذلك إلى التفكك الكروي الناجم عن اصطدام الحيوانات المنوية وتفاعل الهيالورونيداز. الهيالورونيداز هي إنزيمات تنتجها الحيوانات المنوية لتحفيز تحلل حمض الهيالورونيك المشكل للمصفوفة خارج الخلوية للخلايا الركامية المحيطة بالبويضات.

ومع ذلك ، فمن المعروف أيضًا أن حمض الهيالورونيك يلعب دورًا مهمًا في انتشار وهجرة أنسجة الورم. لذلك، فإن الحركة و الهيالورونيداز التي تستخدمها الحيوانات المنوية تسمح لها بالتغلغل بعمق في الجسيم الكروي الورمي الذي لايساهم فقط بتفككه ولكن أيضًا يحقق تطبيق فعال للدواء في الموقع.

تمت زراعة الأجسام الشبه الكروية هيلا لمدة ٣ أيام قبل العلاج. أثناء زراعة الخلايا في المختبر ، تحافظ الأجسام الشبه الكروية هيلا على التوازن بين تكاثر الخلايا والموت. مع نمو الجسيم الكروي ، يزداد عدد الخلايا الحية والميتة.

يحدث هذا بشكل خاص في النواة المتنخرة للكرات الورمية ، حيث لا يمكن أن تصل العناصر الغذائية من الوسط إلى الخلايا الداخلية. نظراً لأن الالتقاط الخلوي لـ DOX-HCl في طور المحلول يتم بسرعة بواسطة طبقة الخلية الخارجية من الأجسام الشبه الكروية ، فقد لوحظ تأثير واضح لمجموعة محلول DOX-HCl في أول ٤٨ ساعة. ومع ذلك، عند تمدده في الوسط الخلوي لم يكن محلول DOX-HCl على ما يبدو كافياً للحث على موت المزيد من

الخلايا من ٤٨ إلى ٧٢ ساعة (الشكل ٢ ب ، ج). يتجلى في هذا ميزة نظام توصيل الحيوانات المنوية المهجنة في حال التطبيق في الجسم الحي: القدرة على تجنب تمدد الدواء في سوائل الجسم. من خلال الجمع بين تغليف الدواء وقدرات اختراق الأنسجة، وفعالية القتل الخلوي للدواء ،قد كان من الممكن تحقيق فعالية قتل بنسبة ٩٠ ٪ تقريبًا بعد ٧٢ ساعة من العلاج بخلايا الحيوانات المنوية المحملة بـ DOX-HCl (الشكل ٢ ب ، ج).



الشكل ٢. الفعالية المضادة للأورام للحيو انات المنوية المحملة بالأدوية

نقل الحيوانات المنوية وتوصيل الأدوية

من أجل إثبات التطبيق المحتمل للحيوانات المنوية لتوصيل الأدوية المستهدفة ، تم تصنيع بنية مجهرية رباعية الأرجل لتوجيه الحيوانات المنوية وإطلاقها موضعياً. تم تصميم رباعي الأرجل ليكون له جسم أنبوبي وأربعة أذرع مقوسة مرنة. تبرز هذه الأذرع من إحدى فتحات الأنبوب الصغير بطريقة منحنية. تظهر أبعاد البنية المجهرية في **الشكل ٣ أ**.

عند أضيق نقطة بين الأذرع الأربعة ، تبلغ أقصى مسافة ٤,٣ ميكرومتر. في التجارب الأولية ، تم تحسين أبعاد الهيكل وفقًا لأبعاد خلية الحيوانات المنوية (بالنسبة للتجارب الموضحة في هذا البحث ، تم اختيار خلايا الحيوانات المنوية البقري لشكلها الشبيه بالمجداف المماثل للحيوانات المنوية البشرية)، والتي يكون رأسها، في المتوسط ، عرض ٤,٥ ميكرومتر، وسمك ١ ميكرومتر، وطوله ١٠ ميكرومتر. لذلك ، يمكن أسر الحيوانات المنوية لدفع البنية المجهرية. بمجرد أن تصطدم الذراعين بحاجز كبير ، مثل كتلة الخلايا ، فإنها تنحني وبالتالي توسع المسافة بين الذراعين ، مما يسمح لخلية الحيوانات المنوية بالهروب من الأنبوب في هذه العملية **(الشكل ٣ ب)**.

تم تصميم وتصنيع الهيكل البوليمري بواسطة الطباعة النانوية ثلاثية الأبعاد ثنائية الفوتون. ثم تم طلاء الهيكل المجهرية رباعي الأرجل بشكل غير متماثل بـ ١٠ نانومتر من الحديد بزاوية ميل ١٥ درجة لإنشاء "محور سهل" مغناطيسي. تم ترسيب طبقة إضافية من ٢ نانومتر من التيتانيوم لتحسين التوافق الحيوي للمركب. تم إجراء محاكاة محدودة للعناصر للتحقق من قدرة الانحناء لهندسة رباعي الأرجل. عن طريق الحساب ، عندما تم تطبيق قوة تبلغ حوالي ١٢٨ (بيكونيوتون) pN وهو متوسط قوة الحيوانات المنوية التي تم الحصول عليها في الأدب الطبي على أحد الذراعين ، كان الإزاحة الناتجة ١١٦ نانومتر، وهو ما يكفي لإطلاق الحيوانات المنوية. ستزيد الإزاحة حتى ٤٠٧ نانومتر عندما تكون القوة المطبقة ٤٥٠ pN ، والتي يمكن أن تتولد عن طريق حيوان منوي مفرط النشاط (والذي يُظهر سعة حركة ذيل أكبر ونمط ضربات غير متناظر).

تم تنشيط خلايا الحيوانات المنوية بشكل مفرط في المختبر عن طريق إضافة هرمون البروجسترون إلى وسط الحيوانات المنوية. تم ثني الأذرع لكنها عادت إلى وضعها الأصلي بدون تلف.

عندما يصل الحيوان المنوي إلى رباعي الأرجل ، يصبح محاصرًا ميكانيكيًا داخل تجويف الجسم الأنبوبي ويبدأ في دفع رباعي الأرجل للأمام ،الجسم الأنبوبي لرباعي الأرجل أطول بمقدار ٢ ميكرومتر فقط من رأس الحيوانات المنوية، وبالتالي لا يزال بإمكان ذيل الحيوانات المنوية أن ينبض بحرية خارج الأنبوب لتوفير دفع قوي.

بالمقارنة مع الحيوانات المنوية الحرة ، انخفض متوسط سرعة السباحة لمحركات الحيوانات المنوية الهجينة بنسبة ٤٣٪ من ٧٣ ± ١٦ إلى ٤١ ± ١٠ ميكرومتر / ثانية (بمعدل ١٥ عينة من المحركات المهجنة للحيوانات المنوية). تم إجراء جميع القياسات في وسط SP-TALP في درجة حرارة الغرفة. على الرغم من التباين بين عينات الحيوانات المنوية المختلفة، يُعتقد أن السبب الرئيسي لانخفاض السرعة هو زيادة سحب السوائل التي تسببها المادة الاصطناعية والبنية المعقدة لرباعي الأرجل.

يتيح الطلاء المعدني الموزع بشكل غير متماثل توجيه المحركات الدقيقة الهجينة للحيوانات المنوية الفردية باستخدام مجال مغناطيسي خارجي وحتى توجيه مجموعة منهم في وقت واحد، تم إقران أكثر من ٥٠ رباعيات الأرجل بالحيوانات المنوية خلال ساعة واحدة من الحضانة ، من ٦٤٨ رباعيات الأطراف التي تم استخدامها في بداية التجربة. يُظهر الفيديو المرفق بالمقال إحدى مناطق المراقبة، حيث تم توجيه مجموعة من المحركات الدقيقة المهجنة للحيوانات المنوية بمجال مغناطيسي خارجي يوضح الشكل ٣ ب مسارًا مستطيلًا لمحرك هجين للحيوانات المنوية.

تم توجيه المحرك الهجين بسهولة عن طريق تغيير اتجاه المغناطيس الخارجي. بعد الاقتران برباعي الأرجل ، لا يزال الحيوان المنوي يدور عندما يتحرك المحرك الهجين للأمام بسبب الحركة الحلزونية للحيوانات المنوية ، مما يعني أن رباعي الأرجل لا يغير الحركة المميزة للحيوانات المنوية المقترنة. يظهر **الشكل ٣ ج** أيضًا التوجيه الرأسي لرباعي الأرجل. تم توجيه محرك هجين الحيوانات المنوية للسباحة عمودياً خارج مستوى المراقبة ببساطة عن طريق إمالة المغناطيس الخارجي عمودياً. قبل بدء التجارب على خلايا الحيوانات المنوية، تمت معالجة رباعيات الأرجل بمحلولPluronic F-127 لتقليل الالتصاق غير المرغوب فيه بين غشاء الحيوانات المنوية وسطح رباعي الأرجل.

ظهرت حركة الحيوانات المنوية - رباعي الأرجل بدون التصاق حيث تدور خلية الحيوانات المنوية داخل رباعي الأرجل.

في وضع عدم الالتصاق ، تسبح الحيوانات المنوية على الفور عندما تصطدم ذراع رباعي الأرجل بعقبة. ومع ذلك ، تم العثور على غالبية رباعيات الأرجل تدور مع الحيوانات المنوية الملتقطة إما بسبب التفاعل السطحي بين غشاء الحيوانات المنوية وسطح المادة أو القفل الميكانيكي لرأس الحيوانات المنوية داخل الهيكل **(الشكل ٣ ج ، د)**. في هذه الحالات ، يستغرق الأمر دائمًا عدة ثوانٍ من لحظة اصطدام رباعي الأرجل بجدار حتى الإطلاق الكامل للحيوانات المنوية الموجودة والتي وجدنا أنها مفيدة في إطلاق الحيوانات المنوية على وجه التحديد عندما تصل الحيوانات المنوية إلى الهدف المقصود وتضرب لوقت أطول.

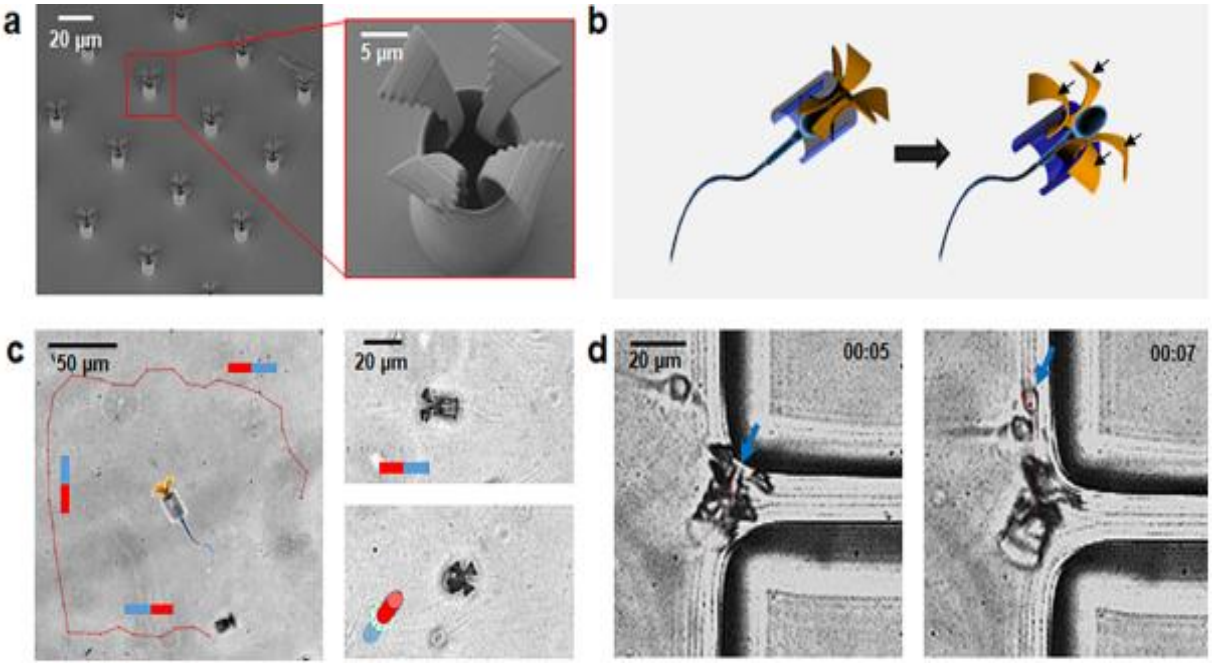
تم تصنيع قنوات الموائع الدقيقة Polydimethilsiloxane (PDMS) كمنصة للتحقيق في آلية إطلاق الحيوانات المنوية. حدث إطلاق الحيوانات المنوية في كلتا الحالتين عندما اصطدم ذراعان بزاوية أو عندما اصطدمت أربعة أذرع بحاجز، بينما كانت عمليات الإطلاق مختلفة.

عندما تلامس المحركات مع الحواجز المستهدفة ، فإنها تدور لفترة من الوقت في المكان بعد توقف السباحة الأمامية. يتوقف دوران مركب الحيوانات المنوية - رباعي الأرجل بشكل أسرع عندما اصطدم ذراعان بزاوية بسبب الفجوة الهندسية بين الذراعين والتي تعلق بسهولة في الزاوية. بمجرد توقف الدوران ، هربت خلية الحيوانات المنوية عندما فتحت ذراعي رباعي الأرجل (تم إطلاقها في حوالي ٧ ثوانٍ). عندما اصطدمت أربعة أذرع بالحائط، لم يتم إيقاف الدوران لأن الأذرع لم يتم قفلها او لم تعلق في هذه الحالة.

وبالتالي ، استغرق إطلاق الحيوانات المنوية وقتًا أطول عندما تم ثني أربعة أذرع على الحائط (حوالي ١٢ ثانية). في كلتا الحالتين ، تم دفع رباعيات الأرجل للخلف بحوالي ٣ ميكرومتر بعد هروب الحيوانات المنوية. سبب هذا الارتداد هو مرونة أذرع رباعي الأرجل التي تعود إلى شكلها الأصلي بمجرد توقف الدفع بعد إطلاق الحيوانات المنوية. على الرغم من وجود تنوع كبير في أبعاد الحيوانات المنوية في الأبقار ، وسلوكيات السباحة ، ورباعي الأرجل المُصنَّعة داخل العينة ، فقد تبين أن أكثر من ٣/٢ من المحركات المزدوجة تطلق خلايا الحيوانات المنوية بنجاح.

يعتمد أداء التحرير الذي يتم تشغيله ميكانيكياً على مرونة أذرع رباعي الأرجل وقوة الحيوانات المنوية. إن التشوه المحسوب البالغ ٤٠٧ نانومتر الذي حصلنا عليه من عمليات المحاكاة يمكن مقارنته بهياكل أخرى مماثلة في الأدب الطبي. على سبيل المثال ، حزمة النطاق المجهري ، والذي تم تصنيعها أيضًا بواسطة الطباعة الحجرية ثنائية الفوتون ، انثنت بحوالي ٥ ميكرومتر عند تطبيق قوة pN٦٨ . وقد ثبت أيضًا أن نوع المونومر ومعايير الارتباط التصالبي تساهم في مرونة المواد البوليمرية الحساسة للضوء.

وبالتالي ، من أجل تجنب أحداث الإطلاق العرضي، لم نختار مادة بوليمر أكثر نعومة ولكن قمنا بتحسين طاقة الليزر (حوالي ٥ ميغاواط) التي قامت بتهيئة الارتباط المتصالب بدلاً من ذلك. في المحاكاة التي أجريناها ، كانت القوة المطبقة وفقًا لقوة الدفع القصوى للحيوان المنوي في سائل منخفض اللزوجة (٢,٢٩ × ١٠−٣ باسكال / ثانية). بالإضافة إلى ذلك، يمكن للحيوانات المنوية أن تولد قوة أكبرعند دفع رأس الحيوان المنوي ضد عقبة، كما تم الذكر سابقًا. علاوة على ذلك ، يمكن أن تزيد قوة الحيوانات المنوية بمقدار ٢٠ مرة عندما تكون الحيوانات المنوية شديدة النشاط وتسبح في السائل اللزج المرن للجهاز التناسلي الأنثوي.



الشكل ٣. تصنيع بنية مجهرية رباعية الأرجل لنقل الحيوانات المنوية.

تم إجراء تجارب توصيل الدواء في المختبر أيضاً في قناة الموائع الدقيقة (ميكروفلويديك) (الشكل ٤ أ) للتحقيق في التطبيق المحتمل للمحركات الدقيقة المهجنة المنوية لإيصال الدواء. من أجل مراقبة إطلاق الحيوانات المنوية بالتفصيل، تم توجيه المحركات الدقيقة المهجنة أولاً إلى مجموعات خلايا هيلا باستخدام الحقول المغناطيسية الخارجية الشكل ٤.

يوضح الشكل ٤ ب مثالاً على كيفية إطلاق خلية منوية مقترنة على كتلة الخلية والتصاقها بإحدى خلاياه. لوحظت آلية إطلاق الحيوانات المنوية نفسها مع المحركات الدقيقة المهجنة للحيوانات المنوية المحملة بـ DOX-HCl والتي استهدفت الأجسام الشبه الكروية HeLa الكثيفة.

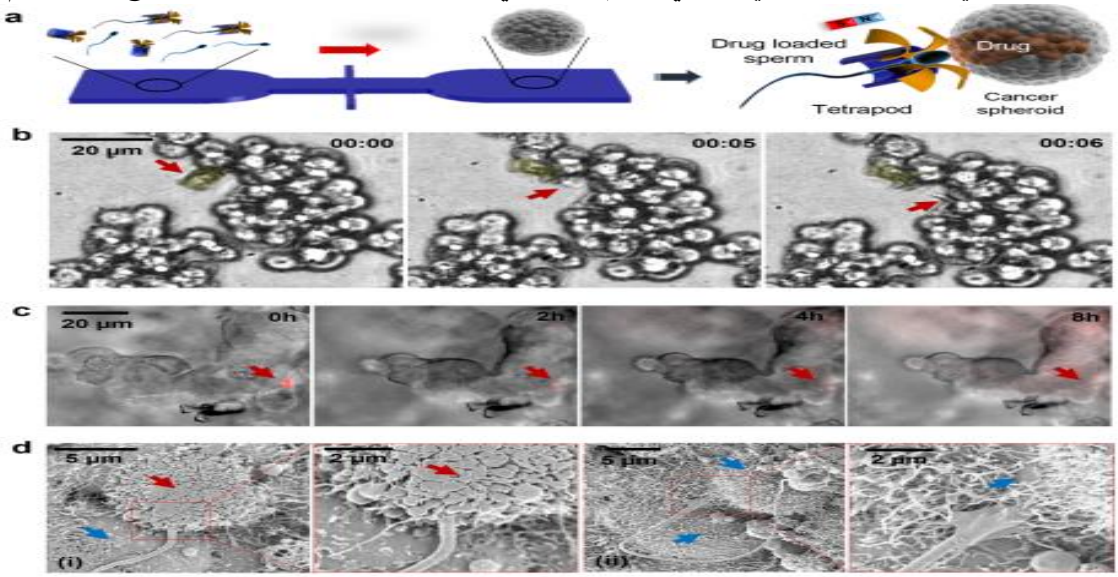
أظهرت التجارب حيواناً منوياً تم توجيهه وإطلاقه في خلية هيلا، مخترقا لها في هذه العملية. في هذه الحالة تم تأكيد حركة الحيوانات المنوية المحملة بالدواء قبل الاقتران مع رباعيات الأرجل.

تجربة أخرى تعرض نقل خلية حيوانات منوية محملة بـ DOX-HCl من خلال قناة موائع جزيئية يظهر إطلاقها في ورم كروي. كانت المسافة المقطوعة في هذه التجربة حوالي ١,٨ سم ،واستغرقت الرحلة حوالي ٨ دقائق. تم إطلاق خلية الحيوانات المنوية عندما اصطدمت أذرع رباعي الأرجل بالحد الخارجي للورم ثم استمرت في السباحة عبره حتى تلتصق بإحدى الخلايا.

يوضح الشكل ٤ ج نقل وإطلاق DOX-HCl الذي تم توصيله على مدى ٨ ساعات. انخفضت شدة التألق المقاسة للحيوانات المنوية المحملة بالدواء ، بينما انتشرت إشارة التألق فوق الكرة الكروية بمرور الوقت. يشير هذا إلى أن DOX-HCl قد تم إطلاقه من خلية الحيوانات المنوية إلى الجسم كروي. بعد ٨ ساعات، شهدت خلية هيلا المستهدفة انكماشاً كبيراً في جسم الخلية (انخفض الحجم بنحو ٤٠٪) ، وهو ما يُعرف بأنه علامة على المرحلة الأولى من موت الخلايا المبرمج.

يوضح الشكل ٤ د مسح صور المجهر الإلكتروني للاندماج الغشائي للحيوانات المنوية وخلايا هيلا. خدم الجسيم الكروي ل هيلا HeLa spheroid الذي عولج بالحيوانات المنوية غير المحملة كعينة تحكم في هذه التجربة. بعد أربع وعشرين ساعة من حدث إطلاق الحيوانات المنوية ،تم دمج الجزء الأمامي من رأس الحيوانات المنوية مع خلية هيلا المستهدفة ، بينما بقي الجزء الأوسط والسياط بالخارج. لوحظ وجود فقاعات وحويصلات على خلية هيلا التي اندمجت مع الحيوانات المنوية المحملة بدوكسوروبيسين هيدروكلوريد DOX-HCl، مما يشير إلى موتها عن طريق موت الخلايا المبرمج (الشكل ٤ د (١). الخلايا المندمجة مع الحيوانات المنوية غير المحملة لا تظهر مثل هذه الفقاعات (الشكل ٤ د (٢) وبالتالي يفترض أنها لا تزال على قيد الحياة ، تمامًا مثل الخلايا غير المندمجة. في الأدبيات الطبية، تم الإبلاغ عن هذا التفاعل بين الحيوانات المنوية والخلايا الجسدية يعزى إلى قدرة الاندماج الجسدي للخلايا المنوية أثناء تفاعل الجسيم الطرفي (ألاكروسوم).

لذلك ، من خلال الاستفادة من هذه القدرة على اندماج خلايا الحيوانات المنوية ، فإن النقل المباشر للدواء من الحيوانات المنوية إلى الخلايا السرطانية يقلل من تخفيف الأدوية في الوسط خارج الخلوي أو سوائل الجسم. في المرحلة الحالية ، يبدو أن الجرعة التي حملها حيوان منوي واحد ، وتوزيع الدواء الناتج الذي يمكن ملاحظته في مكان قريب بعد اختراق الورم ، لم يكن كافيين للحث على موت الخلية للكروي بأكمله. هذا يجعل التحقيق في النقل الحيوانات المنوية العديد أمراً ضرورياً، والذي سيتم متابعته في الدراسات المستقبلية لتحقيق علاج فعال للورم.



الشكل ٤. توصيل الدواء إلى كتلة هيلا الكروية بواسطة النطاف الهجينة.

الاستنتاجات

باختصار ، لقد تم اقتراح نظام لإيصال الدواء يعتمد على المحركات الدقيقة المهجنة للحيوانات المنوية. في مثل هذا التجمع، يتم استخدام الحيوانات المنوية كناقلات للأدوية لعلاج السرطان المحتمل في الجهاز التناسلي الأنثوي ، حيث يمكن للحيوانات المنوية أن تسبح في ورم كروي وتندمج مع الخلايا الجسدية، تنقل الدواء بكفاءة إلى الخلية المستهدفة / الورم في العملية.

علاوة على ذلك ، تعمل خلية الحيوانات المنوية كمصدر للدفع، بينما يتم استخدام بنية مجهرية مغناطيسية لتوجيه وإطلاق الحيوانات المنوية: عندما تصطدم أذرع البنية المجهرية بخلايا هيلا ، فإنها تنحني وبالتالي تفتح طريقة لتحرير خلية الحيوانات المنوية. في هذا العمل، تم استخدام الحيوانات المنوية البقرية كخلايا نموذجية لتحميل عقار دوكسوروبيسين هيدروكلوريد DOX-HCl لعلاج الأجسام الشبه الكروية لخلايا هيلا المستزرعة في المختبر.

تم توزيع DOX-HCl موضعياً في الأجسام الشبه الكروية ، مما أظهر فعالية أعلى في قتل خلايا الورم (٨٧ ٪) خلال أول ٧٢ ساعة ، مقارنة بمحلول الدواء البسيط (٥٥ ٪) بنفس الجرعة. أظهرت الحيوانات المنوية أيضًا قدرة عالية على تغليف الدواء حوالي ١٥ بيكوغرام لكل حيوان منوي. علاوة على ذلك ، كانت الحيوانات المنوية قادرة على السباحة لمسافات أطول في ظل ظروف فسيولوجية بطريقة فعالة ليس فقط بسبب ضربات السوط ولكن أيضاً بسبب الكيمياء الحيوية للأغشية. يمكن أن تظل الحيوانات المنوية تعمل في جسم الإنسان لفترة أطول مقارنة بالخلايا الأجنبية الأخرى بسبب قدرتها على تثبيط الاستجابة المناعية ومن خلال إظهارها لبروتينات معينة وبروستوما على غشاءها. هذا يجعل هذا النظام أكثر توافقاً مع الجسم المضيف. بالمقارنة مع المحركات الدقيقة الاصطناعية البحتة أو ناقلات أخرى ، يمكن للمحرك الدقيق الهجين للحيوانات المنوية المقترح هنا تغليف تركيزات عالية من الدواء داخل غشاء الحيوانات المنوية وبالتالي حمايته من التخفيف في سوائل الجسم وتدهور الإنزيم.

كما أن قدرة الحيوانات المنوية على الاندماج مع الخلايا الجسدية تمثل خاصية فريدة لإيصال الدواء موضعياً إلى الخلايا السرطانية. بعد تحميل الدواء، يستمر نشاط الدواء وحركة الحيوانات المنوية عند مستوى عالٍ بسبب التمثيل الغذائي غير المكتمل للخلية المنوية والذي يحميها من الأثر داخل الخلوي للدواء.

لا تتمتع هذه المحركات الدقيقة المهجنة بالحيوانات المنوية بإمكانية تطبيق محتملة لعلاج سرطان الجهاز التناسلي للمرأة فحسب ، بل أيضًا لعلاج أمراض أخرى في الجهاز التناسلي الأنثوي مثل التهاب بطانة الرحم أو الحمل خارج الرحم. علاوة على ذلك ، يمكن تصميمها لنقل الجينات أو الرنا المرسال أو عوامل التصوير التبايني أو غيرها من المواد ذات الأهمية للتطبيقات الطبية الحيوية المتنوعة.

على الرغم من أنه لا تزال هناك بعض التحديات التي يجب التغلب عليها قبل أن يتم تطبيق هذا النظام في البيئات الحية، مثل مسألة التصوير، والتحلل الحيوي للجزء الاصطناعي، والتفاعلات المناعية غير المرغوب فيها، والجرعات الخاضعة للرقابة ، قد يمكن تطبيق أنظمة المحركات الهجينة في التشخيص والعلاج *In situ* في الموقع في المستقبل القريب.

تقنيات العمل ومواده

- **تصنيع منصة قنوات الموائع الدقيقة الميكروفلويديك**

تم تصنيع قنوات الموائع الدقيقة بواسطة الطباعة الحجرية اللينة. حتى وقت قصير ، تم تغليف رقاقة السيليكون بمقاوم الضوء السلبي (SÜSS Microtec) SU-8 ومزخرفاً بالطباعة الحجرية بدون قناع (μPG 501 Maskless Aligner، Heidelberg Instruments بعد ذلك ، تم سكب خليط من PDMS وعامل المعالجة Dow Corning Corp على القالب الذي تم الحصول عليه ومعالجته عند ٧٥ درجة مئوية لمدة ساعتين. تم تصميم القنوات بعمق ٢٠٠ ميكرومتر وطول ٣ سم.

تم ثقب خزانين عند المدخل والمخرج بعد تقشير قناة PDMS من القالب. أخيراً ، لإكمال تصنيع القناة ، تم ربط قناة PDMS وركيزة زجاجية نظيفة مادياً بعد تعرضها لبلازما الأكسجين لمدة ٣٠ ثانية تقريباً. لمعالجة سطح القناة

الداخلية ، تم ملء القنوات بمحلولPluronic F-127 ، مقدار ١٠ميكروغرام / مل في ماء مقطرSigma-Aldrich ، Germany وحضنت لمدة ساعة واحدة عند ٣٧ درجة مئوية. تم استخدام Pluronic F-127 سابقاً لصد خلايا الحيوانات المنوية ، مما يجعلها مناسبة لتقليل الالتصاق بين الحيوانات المنوية والقناة وأسطح المكونات الاصطناعية. بعد هذا العلاج ، تم شطف القنوات بالماء ووسط الحيوانات المنوية SP-TALP .

- **تصنيع رباعي الأرجل**

تم تصنيع مصفوفات من رباعيات الأرجل البوليمرية بواسطة الطباعة الحجرية بالليزر ثلاثية الأبعاد

(Photonic Professional GT, Nanoscribe GmbH)

باختصار ، تم إسقاط مقاوم الضوء الليثوغرافي بالليزر

(IP-Dip, Nanoscribe GmbH)

على ركائز زجاجية نظيفة (٢٥ × ٢٥ مم ٢) كأساس لمادة البوليمر للكتابة بالليزر. تم بعد ذلك بلمرة مقاوم الضوء ذو النغمة السلبية على وجه التحديد في مواضع التعرض المبرمجة مسبقًا عن طريق امتصاص الفوتونين (الطول الموجي بالليزر ٧٨٠ نانومتر). تمت برمجة تصميم مصفوفات رباعي الأرجل باستخدام برنامج Nanoscribe . GmbH Describe Software

تم بعد ذلك تجفيف العينات في مجفف نقطة حرجة (CPD ، Autosamdri-931 ، Tousimis Research) Corporationبعد ٢٠ دقيقة من التطوير في mr-Dev

في شركة (Micro Resist Technology GmbH) و ٣ دقائق من الغسيل في كحول الأيزوبروبيل. تم طلاء العينات المجففة بـ ١٠ نانومتر الحديد و ٢ نانومتر تايتنيوم بنقاوة عالية (٩٩,٩٩٥٪) عن طريق تبخير الحزمة الإلكترونية

500 e-beam, Moorfield Nanotechnology Limited). (Edwards

لإنشاء محور مغناطيسي سهل ، تم إمالة حامل العينة بزاوية ٧٥ درجة أثناء عملية الترسيب. تم أيضًا غمر العينات المطلية بالمعادن في محلول Pluronic F-127 لمدة ساعة واحدة عند ٣٧ درجة مئوية وشطفها بالماء و SP-TALP لإجراء تجارب لاحقة لتجنب الالتصاق غير النوعي بالخلايا المستهدفة. تم تقييم جودة طباعة رباعي الأرجل عن طريق المسح المجهري الإلكتروني

Carl Zeiss Microscopy GmbH ، Zeiss NVision 40

تم تثبيت العينات على كعب معدني وتغليفها بـ ١٠ نانومتر من البلاتين. تم إجراء التصوير على مسافة عمل تبلغ ٥ مم في وضع التصوير الإلكتروني الثانوي بجهد عمل ٢ كيلو فولت.

تم إجراء تحليل العناصر المحدود لتشوه الذراع باستخدام برنامج Autodesk Inventor ،معامل يونغ المطبق ونسبة بواسون هي ٠,١٥ جيجا باسكال و ٠,٤٥ على التوالي . تم حساب العلاقة بين الانحراف والحمل الموزع وفقًا لمعادلة أويلر-برنولي

حيث تمثل ω و q الانحراف والحمل الموزع ، على التوالي ، تصف x اتجاه الذراع ، و E هي معامل يونج للمادة ، و I هي اللحظة الثانية لمساحة المقطع العرضي للذراع. لذراع مع تحميل على طول المحورz

- **خلايا هيلا الأجسام الشبه الكروية**

تمت زراعة خلايا هيلا في دورق ملتصق بسعة ٢٥ مل لمدة أسبوعين بعد الحصول عليها. لتحضير الأجسام الشبه الكروية للورم ، تم حضن الخلايا أولاً في ٢ مل من التربسين EDTA / لمدة ١٠ دقائق ليتم بعدها فصلها عن الركيزة. بعد التخفيف في ٨ مل من الوسط ، تم بعد ذلك تطبيق طرد للمعلق الخلوي عند ١٠٠٠ دورة في الدقيقة لمدة ٣,٥ دقيقة لإزالة الوسط. ثم تم تعليق مضغوطات الخلية في ١ مل من الوسط. بعد الحساب ، تم تعليق ٣ × ١٠٥ خلية في ٣ مل من الوسط وتم زرعها في طبق زرعة كروي

(Cellstar Cell-Repellent Surface, Greiner bio-one)

بعد ٣ أيام من النضج ، تم نقل المحلول الكروي إلى فلاكونة سعة ١٥ مل واحتضانه لمدة ٥ دقائق لفصل الرواسب الخلوية. أخيرًا ، تم تعليق الحبيبات السفلية للأجسام الكروية في ٣ مل من وسط جديد في طبق زرعة كروي للتجارب اللاحقة.

- **تحضير خلايا الحيوانات المنوية المحملة بالأدوية**

تم استعادة خلايا الحيوانات المنوية من الأبقار عن طريق إذابة قوارير الحيوانات المنوية المحفوظة بالتبريد بسرعة في حمام مائي عند ٣٨ درجة مئوية لمدة دقيقتين وغسلها باستخدام

BoviPure 100 / BoviDilute (40%/80%)

بعد ٥ دقائق من الطرد المركزي عند قوة ٣٠٠ غرام في الوضع الناعم soft Mode ، تم تعليق الحيوانات المنوية في ١ مل من محلول SP-TALP للاستخدام اللاحق. تم حساب تركيز الحيوانات المنوية باستخدام غرفة عد الخلايا.

تم تحضير محلول واحد مجم / مل من FITC-BSA و DOX-HCl في وسط SP-TALP وتخزينه في ظروف مظلمة عند ٤ درجات مئوية كمحلول عياري. لتحضيرعينة الحيوانات المنوية المحملة بـ DOX / BSA ، تم حضن خليط من محلول الحيوانات المنوية ومحلول FITC-BSA أو DOX-HCl بتركيزات محددة في جو مرطب بنسبة ثنائي اكسيد الكربون ٥ ٪ في الهواء عند ٣٧ درجة مئوية لمدة ساعة واحدة. بعد غسل العينة مرتين باستخدام SP-TALP بالطرد المركزي عند ٣٠٠ غرام لمدة ٥ دقائق ، تمت إعادة بعثرة حبيبة الحيوانات المنوية المحملة بالدواء في SP-TALP مع البروجسترون (٢٠ نانوغرام / مل) وتخزينها في الحاضنة تحت ظروف مظلمة للاستعمال لاحقًا. من المهم ملاحظة أنه كان من المقرر استخدام العينات في غضون ٤ ساعات لضمان حركة الحيوانات المنوية.

- **تقييم كفاءة تحميل الدواء**

تم تقييم نجاح إجراء تحميل الدواء من خلال تحديد كفاءة التغليف. تم تحضير خلايا الحيوانات المنوية المحملة بـ DOX-HClكما هو مذكور سابقاً بتركيز ٣ 106 x حيوان منوي / مل. تم تحضير عينات محلول DOX-HCl كسلسلة من التركيزات بـ ١٠ و ٢٠ و ٥٠ و ١٠٠ و ٢٠٠ ميكروغرام / مل .

تم تحضير الحيوانات المنوية المحملة بـ FITC-BSA بمحلول FITC-BSA بتركيز ١٠٠ ميكروغرام / مل. بعد حضانة الحيوانات المنوية في هذه المحاليل ، تم جمع المادة الطافية بعد الطرد المركزي وتصفيتها من خلال غشاء بحجم مسام ٢ ميكرومتر. أعيد تعليق الحيوانات المنوية بعد تنقيتها كما ذكرنا من قبل. تم التقاط الصور الومضانية بطول موجة يبلغ ٤٧٠ نانومتر.

تم تحديد تركيز DOX-HCl بمطياف فلورة في وضع FL-RL ، وتم حساب الوزن الإجمالي. تم استخدام محلول-SP TALPكعنصر تحكم فارغ لجميع القياسات. تم تحديد تركيز DOX-HCl المتبقي عن طريق قياس المادة الطافية لكل عينة بعد الطرد المركزي.

تم حساب كفاءة التغليف من خلال نسبة الدواء المغلف إلى الكمية الإجمالية للدواء المستخدم: تم تحديد كمية تحميل الدواء بالفرق بين الكمية الأولية لـ DOX-HCl قبل الحضانة والكمية المتبقية في المادة الطافية بعد الحضانة المشتركة ، والتي تم تحديدها كميا من خلال إشارات الفلورة الخاصة بكل منهما.

تم إجراء اختبار ثبات التغليف عن طريق حساب نسبة الإطلاق التراكمي لـ DOX-HCl من الحيوانات المنوية إلى وسط SP-TALP

باختصار ، تم تحضين الحيوانات المنوية المحملة بالأدوية في SP-TALP في مكان مظلم تحت جو رطب بدرجة حرارة ٣٧ مئوية وتركيز ثنائي اكسيد الكربون ٥٪ .في كل نقطة زمنية ، تم اجراء طرد مركزي للعينات وتم جمع ٠,٥ مل من المادة الطافية واستبدالها بـ ٠,٥ مل من. SP-TALP

عند ٩٦ ساعة ، تمت معالجة العينات باستخدام مزيج تربسين مع حمض الأسيتيك الإيثيلي الديناميني

EDTA-trypsin لمدة ٣ دقائق لإطلاق كل الأدوية في المحلول. تم استخدام مطياف ومضان في وضع FL-RL ، لتحديد تركيز DOX-HCl للمادة الطافية. تم حساب نسبة الإطلاق التراكمي كنسبة كمية الدواء المتراكمة إلى الكمية الإجمالية منه. تم الحصول على البيانات من أربع عينات. تم استخدام SP-TALP كعنصر تحكم فارغ.

- **تقييم قابلية الحياة الحيوانات المنوية المحملة بـ DOX-HCl**

تم تحضير الحيوانات المنوية المحملة بـ DOX-HCl كما هو مذكور من قبل عن طريق احتضان الحيوانات المنوية (٨ × ١٠٥ حيوانات منوية في ١ مل) مع DOX-HCl بتركيز ١٠٠ ميكروغرام / مل.

بعد التنقية ، تم تحضين الحيوانات المنوية في جو رطب بنسبة ثنائي كربون في الهواء ٥% عند ٣٧ درجة مئوية. بعد ساعة واحدة وبعد ٤ ساعات ، تم تحليل الحيوانات المنوية المحملة بالدواء بواسطة الفحص المجهري الفلوري ، باستخدام مجموعة صلاحية تجارية..(LIVE / DEAD (ThermoFisher

باختصار ، تم تحضين محاليل الحيوانات المنوية (١٠٦ حيوان منوي) بـ ٥ ميكرولتر من المكون المخفف SYBR) A (14تركيز ١٠٪ لمدة ١٠ دقائق و ٥ ميكرولتر من المكون) B بيوديد البروبيديوم) لمدة ٥ دقائق. بعد الغسيل ، تم إجراء تحليل للحيوانات المنوية بطول موجة ومضان يبلغ ٤٧٠ نانومتر لتصوير الحيوانات المنوية الحية. تم استخدام أربع عينات من كل مجموعة تحتوي على ١٠٤ حيوان منوي لكل عينة.

- **تقييم حركة الحيوانات المنوية المحملة بـDOX-HCl**

تم تحضير الحيوانات المنوية المحملة بـ DOX-HCl كما ذكر من قبل. تم التعامل مع الحيوانات المنوية غير المحملة بنفس طريقة العينة الضابطة. بعد التنقية ، تم تحضين الحيوانات المنوية في SP-TALP في جو رطب بنسبة ثنائي أوكسيد كربون في الهواء ٥% عند ٣٧ درجة مئوية. في نقاط زمنية معينة على طول ٣٦ ساعة ، تم استخراج ١٠٠ ميكرولتر من الحيوانات المنوية (١٠٤ لكل عينة) من طبق بتري وإضافتها إلى غرفة العد لدراسة الحركة. تم استخدام نظام تحليل الحيوانات المنوية بمساعدة الكمبيوتر.(AndroVision, Minitube GmbH)

تم تحضير أربع عينات لكل مجموعة. تم عد عشرة حقول (حوالي ٥٠٠ حيوان منوي) من كل عينة في كل نقطة زمنية.

- **تقييم الفعالية المضادة للأورام للحيوانات المنوية المحملة بـ DOX-HCl**

تم تحضير الحيوانات المنوية المحملة بـ DOX-HCl كما هو مذكور من قبل عن طريق احتضان الحيوانات المنوية (٨ × ١٠٥ حيوانات منوية في ١ مل) مع DOX-HCl بتركيز ١٠٠ ميكروغرام / مل. بعد التنقية ، تمت إضافة ١٠٠ ميكرولتر من محلول الحيوانات المنوية (٨ × ١٠٤ حيوانات منوية) إلى معلق كروي هيلا (٤ مل) وحضنت في جو رطب بنسبة ٥٪ من ثاني أكسيد الكربون في الهواء عند ٣٧ درجة مئوية.

تم تحضير عينة التحكم للكروي بإضافة ١٠٠ ميكرولتر من SP-TALP ، بينما تم تحضير عينة التحكم المنوية الفارغة أو (Blank) بإضافة ١٠٠ ميكرولتر من محلول الحيوانات المنوية الفارغ (٨ × ١٠٤ حيوان منوي). وفقًا لنسبة تحميل دوكسوروبيسين هيدروكلوريد ١٥% يمكن بحد أقصى تحميل ١٥ ميكروغرام من 100 DOX-HCl ميكرولتر على الحيوانات المنوية في ١ مل من المحلول.

لذلك ، تم تحضير محلول التحكم الدوائي عن طريق احتضان الأجسام الشبه الكروية هيلا بـ ١٠٠ ميكرولتر من محلول DOX-HCl بتركيز ١٥ ميكروغرام / مل. تم استخدام مجموعة اختبار الحياتية LIVE / DEAD (ThermoFisher)لتلوين الخلايا وتحليل قابلية الخلية للبقاء. باختصار ، تم غسل الأجسام الشبه الكروية HeLa وهضمها عن طريق خليط تربسين مع حمض الأسيتيك الإيثيلي الديامينيEDTA-trypsin

وتحويله الى معلق أحادي الخلية في نقاط زمنية معينة. بعد ذلك ، تم تحضين الخلايا بـ ١ ميكرولتر من المكون A (SYBR 14)لمدة ١٠ دقائق و ٥ ميكرولتر من المكون) B يوديد البروبيديوم) لمدة ٥ دقائق. تم إجراء عد الخلايا تحت الومضان بطول موجة ٤٧٠ نانومتر للخلايا الحية و ٥٤٠ نانومتر للخلايا الميتة ٤ عينات لكل مجموعة ، ١٠٤ خلية لكل عينة.

- **تقييم عملية نقل الحيو انات المنوية**

تم استخدام رقائق ميكروفلويديك القائمة على بوليديميثيل سيلوكسان PDMS لتقييم اقتران الحيوانات المنوية ورباعي الأرجل، والتوجيه المغناطيسي لمحركات الحيوانات المنوية الهجينة، وإطلاق الحيوانات المنوية بواسطة وظيفة الزناد الميكانيكية.

تضمنت الرقاقة قناة بعرض ٥٠٠ ميكرومتر حيث أن اقتران رباعي الأرجل مع الحيوانات المنوية والتوجيه حدث ولكن أيضا تعثر في ثلاثة أشكال مختلفة أثناء إطلاق الحيوانات المنوية. تم تحضير وعلاج رباعيات الأرجل وقنوات PDMS والحيوانات المنوية كما ذكر من قبل. بعد ذلك ، تم فصل مجموعة من رباعيات الأرجل (إجمالي ١٢٩٦ جهازاً) عن الركيزة عن طريق الخدش الميكانيكي وتبعثرت في ٥٠ ميكرولتر من وسط النطاف.SP-TALP

لتقييم أداء المحرك الهجين للحيوانات المنوية، تم إدخال ٥٠ ميكرولتر من خليط من أجزاء متساوية من محلول الحيوانات المنوية (٣ × ١٠٥ لكل مل) ومعلق رباعي الأرجل حوالي ٧٥٠ في ٢٥ ميكرولتر من SP-TALP في القناة .

تم تسجيل مقاطع الفيديو في الوقت الفعلي للعينات تحت المجهرZEISS Axio Scope. A1 ، Carl Zeiss Microscopy GmbH بكاميرا عالية السرعةPhantom Miro eX4 ، Vision Research Inc بمعدل ٣٠ إطاراً في الثانية.

تم الحفاظ على درجة حرارة العمل عند ٣٨ درجة مئوية للحفاظ على حركة عينة الحيوانات المنوية المعنية. بعد الاقتران، تم توجيه محرك الحيوانات المنوية الهجين ببساطة عن طريق تدوير مغناطيس دائم، وتم تسجيل التغييرات الاتجاهية الناتجة لتقييم أداء التوجيه. كانت مسافة التشغيل بين المغناطيس والعينة حوالي ١٠ سم، مما أدى إلى مجال مغناطيسي فعال يبلغ حوالي ٥ طن متري. تم تقييم إطلاق الحيوانات المنوية من خلال توجيه المحرك المقترن الى عوائق مختلفة.

- **تقييم إيصال الحيوانات المنوية المحملة بالأدوية نحو الأورام الشبه الكروية**

يوضح الشكل ٤ أ شريحة ميكروفلويديك التي تم تصميمها لتجارب توصيل الدواء. تم تصميم الرقاقة بحيث تحتوي على منطقة معايرة واسعة (حيث تتزاوج الحيوانات المنوية مع رباعيات الأرجل) ، ومنطقة معالجة (حيث يوجد الورم كروي الشكل) ، ومنطقة عنق مقيدة في الوسط لمنع دخول خلايا الحيوانات المنوية غير المقترنة إلى منطقة معالجة.

تم تحضير الحيوانات المنوية المحملة بالأدوية كما ذكرنا سابقًا وتمت مراقبتها تحت مجهر الومضان باستخدام ضوء إثارة بطول موجة يبلغ ٤٧٠ نانومتر . بعد معالجة الرقاقة باستخدام Pluronic F-127 و SP-TALP ، تم وضع الوسط الخاص لخلية هيلا أولاً في الشريحة كبيئة تجريبية.

ثم تم إدخال الجسيم الكروي HeLa spheroid في الرقاقة من الطرف الأيسر ، ثم تم إدخال ٥ ميكرولتر من معليق رباعي الأرجل (حوالي ٣٠٠ رباعي الأرجل) و ٥ ميكرولتر من محلول الحيوانات المنوية المحملة بالدواء (٣ × ١٠٥ / مل) من الطرف الأيمن. تم تسجيل مقاطع الفيديو في الوقت الفعلي لعملية النقل تحت المجهر المذكور أعلاه بمعدل ٣٠ إطارًا / ثانية.

بتوجيه من مغناطيس خارجي على مسافة ١٠ سم ، تم توجيه المحركات المهجنة للحيوانات المنوية إلى الجسيم الكروي المستهدف ، وتم إطلاق الحيوانات المنوية المحملة بالمخدرات في الجسيم. بعد ذلك ، تم تحضين النظام بأكمله في ظروف زراعة الخلايا المناسبة (٥٪ ثنائي اوكسيد الكربون في الهواء عند ٣٧ درجة مئوية). في نقاط زمنية ثابتة ، تم التقاط صور z-stack للأجسام الشبه الكروية المضمنة في الحيوانات المنوية تحت مجهر التألق المذكور أعلاه. تم إصلاح وقت التعرض لقناة الفلورسنت لجميع الصور عند ٨٠٠ مللي ثانية. تم تنفيذ التحليل الكمي اللاحق للصور متعددة القنوات باستخدام تقنية ImageJ

- **توصيف المجهر الإلكتروني الماسح SEM لاندماج الحيوانات المنوية مع خلايا هيلا**

تم تحضير عينات المجهر الإلكتروني الماسح في ٢٤ ساعة بعد أن سبحت الحيوانات المنوية في الأجسام الشبه الكروية. تم نقل الأجسام الشبه الكروية على أغطية وتثبيتها في ٢,٥٪ من جلوتار الدهيد في محلول ملحي مخزّن من الفوسفات PBS لمدة ٨ ساعات.

بعد ذلك ، تم غسل العينات الثابتة باستخدام المحلول الملحي المخزّن وتجفيفها في سلسلة تصاعدية من محاليل كحول الأيزوبروبيل وتنشيفها باستخدام تجفيف النقطة الحرجة CPD ثم تم تغليف العينات بـ ٢٠ نانومتر من البلاتين وفحصها بالمجهر الإلكتروني الماسح .DSM-960

المراجع

Justine M. Z. van Tongeren, S. F.-I.-L.-R. (2020). The Development of Practice Recommendations for Drug-Disease Interactions by Literature Review and Expert Opinion. Front. Pharmacol, 11:707.

Kitney, L. C. (2020). Developing synthetic biology for industrial biotechnology applications. Biochemical Society Transactions, 48: 113–122.

Friis, M. B.; Friborg, C. R.; Schneider, L.; Lambert, I. H.; Christensen, S. T.; Hoffmann, E. K. Cell Shrinkage as a Signal to Apoptosis in NIH 3T3 Fibroblasts. J. Physiol. 2005, 567, 427−443.

Bendich, A.; Borenfreund, E.; Sternberg, S. S. Penetration of Somatic Mammalian Cells by Sperm. Science 1974, 183, 857−859.

Rooney, I. A.; Oglesby, T. J.; Atkinson, J. P. Complement in Human Reproduction: Activation and Control. Immunol. Res. 1993,n12, 276−294.

Kelly, R. W.; Holland, P.; Skibinski, G.; Harrison, C.; McMillan, L.; Hargreave, T.; James, K. Extracellular Organelles (Prostasomes) Are Immunosuppressive Components of Human Semen. Clin. Exp. Immunol. 1991, 86, 550−556.

Medina-Sa´nchez, M.; Schmidt, O. G. Medical Microbots Need Better Imaging and Control. Nature 2017, 545, 406−408.

Bu¨ckmann, T.; Kadic, M.; Schittny, R.; Wegener, M. Mechanical Metamaterials with Anisotropic and Negative Effective Mass-Density Tensor Made from One Constituent Material. Phys. Status Solidi B 2015, 252, 1671−1674.

Park, S.; Gao, X. Bernoulli−Euler Beam Model Based on a Modified Couple Stress Theory. J. Micromech. Microeng. 2006, 16, 2355−2359.

Ishimoto, K.; Gaffney, E. A. Mechanical Tuning of Mammalian Sperm Behaviour by Hyperactivation, Rheology and Substrate Adhesion: A Numerical Exploration. J. R. Soc., Interface 2016, 13, 20160633.

Uhler, M. L.; Leungt, A.; Chan, S. Y.; Wang, C. Direct Effects of Progesterone and Antiprogesterone on Human Sperm Hyperactivated Motility and Acrosome Reaction. Fertil. Steril. 1992, 58, 1191−1198.

Magdanz, V.; Medina-Sa´nchez, M.; Chen, Y.; Guix, M.; Schmidt, O. G. How to Improve Spermbot Performance. Adv. Funct. Mater. 2015, 25, 2763−2770.

Jikeli, J. F.; Alvarez, L.; Friedrich, B. M.; Wilson, L. G.; Pascal, R.; Colin, R.; Pichlo, M.; Rennhack, A.; Brenker, C.; Kaupp, U. B. Sperm Navigation Along Helical Paths in 3D Chemoattractant Landscapes. Nat. Commun. 2015, 6, 7985.

Frimat, J. P.; Bronkhorst, M.; de Wagenaar, B.; Bomer, J. G.; van der Heijden, F.; van den Berg, A.; Segerink, L. I. Make It Spin: Individual Trapping of Sperm for Analysis and Recovery Using Micro- Contact Printing. Lab Chip 2014, 14, 2635–2641.

Sun, H.-B.; Kawata, S. Two-Photon Photopolymerization and 3d Lithographic Microfabrication. Adv. Polym. Sci. 2006, 170, 169– 274.

Ha, C. W.; Yang, D.-Y. Rotational Elastic Micro Joint Based on Helix-Augmented Cross-Spring Design for Large Angular Movement. Opt. Express 2014, 22, 20789–20797.

Ishijima, S. Dynamics of Flagellar Force Generated by a Hyperactivated Spermatozoon. Reproduction 2011, 142, 409–415.

Nosrati, R.; Graham, P. J.; Liu, Q.; Sinton, D. Predominance of Sperm Motion in Corners. Sci. Rep. 2016, 6, 26669.

Gwatkin, R.; Andersen, O. Effect of Glycosidase Inhibitors on the Capacitation of Hamster Spermatozoa by Cumulus Cells In Vitro. Reproduction 1973, 35, 565–567.

Liu, N.; Gao, F.; Han, Z.; Xu, X.; Underhill, C. B.; Zhang, L. Hyaluronan Synthase 3 Overexpression Promotes the Growth of TSU Prostate Cancer Cells. Cancer Res. 2001, 61, 5207–5214.

Grimes, D. R.; Kelly, C.; Bloch, K.; Partridge, M. A Method for Estimating the Oxygen Consumption Rate in Multicellular Tumour Spheroids. J. R. Soc., Interface 2014, 11, 20131124.

Gravance, C. G.; Vishwanath, R.; Pitt, C.; Garner, D. L.; Casey, P. J. Effects of Cryopreservation on Bull Sperm Head Morphometry. J. Androl. 1998, 19, 704–709.

Van Dilla, M. A.; Gledhill, B. L.; Lake, S.; Dean, P. N.; Gray, J. W.; Kachel, V.; Barlogie, B.; Gohde, W. Measurement of Mammalian Sperm Deoxyribonucleic Acid by Flow Cytometry. Problems and Approaches. J. Histochem. Cytochem. 1977, 25, 763–773.