الفصل الثالث عشر

تفكيك وإزالة المخاطر الحيوية باستخدام أنظمة النواقل المغناطيسية النانوية

Decorporation of Biohazards Utilizing Nanoscale Magnetic Carrier Systems

أكسل ج.روزنجارت، ومايكل د.كامنسكي

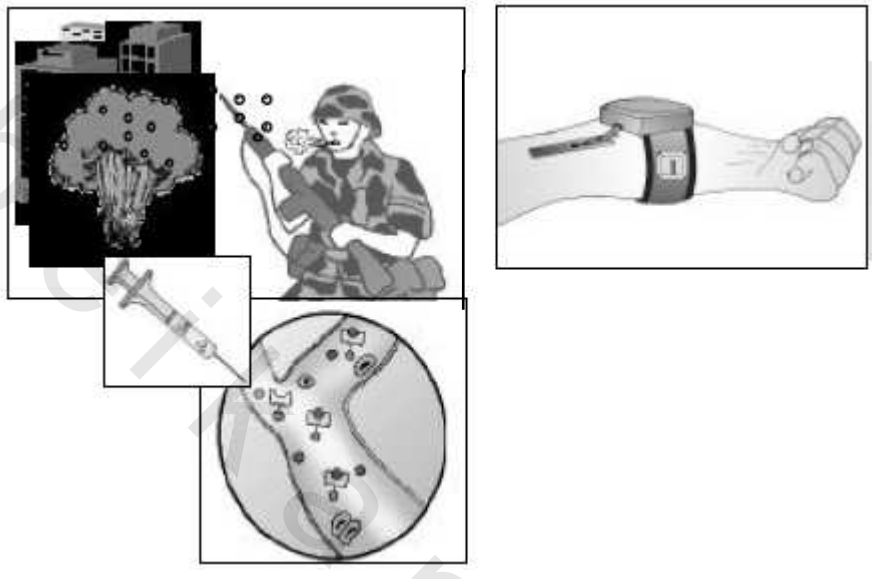
Axel J.Rosengart and Michael D. Kaminski

تنصل Disclaimer

لقد أُعد هذا التقرير كبيان برعاية إحدى وكالات حكومة الولايات المتحدة. ولا توجد أي ضمانات صريحة أو ضمنية، ولا أي مسؤولية، أو مسؤولية قانونية من حكومة الولايات المتحدة، ولا أي من وكالاتها، ولا من جامعة شيكاغو، ولا أي من موظفيها أو ضباطها عن دقة واكتمال، أو فائدة أي معلومات، وأجهزة، ومنتجات، أو عملية كُشفت، أو تُصرح بأن استخدامها لا ينتهك حقوق الملكية الخاصة. والإشارة هنا إلى أي منتج تجاري معين، أو عملية، أو منتج، أو خدمة باسم تجاري، وعلامة تجارية، ومُصنّع أو غير ذلك، لا تشكل بالضرورة، أو تدل على إقراره، أو التوصية به أو تفضيله من جانب حكومة الولايات المتحدة، أو أية وكالة تابعة لها. إن وجهات نظر وآراء مؤلفي الكتاب الموضحة هنا، لا تعكس بالضرورة وجهة نظر حكومة الولايات المتحدة، أو أي من وكالاتها، أو مختبر أرجون Argonne الوطني، أو جامعة شيكاغو.

١٣,١ مقدمة introduction

إننا نعمل على تطوير نظام متكامل ومبتكر، يستند على كرات نانوية فائقة البارامغناطيسية، متوافقة حيوياً؛ لتفكيك وإزالة المخاطر الحيوية المشعة والكيميائية والبيولوجية عن البشر بشكل سريع وانتقائي، ويستخدم النظام كرات نانوية مغناطيسية أساسها بوليمر، يتم حقنها مباشرة في مجرى الدم للبشر المعرضين للخطر الحيوي. إن تكوين الكرات النانوية المحقونة عبارة عن بوليمرات قابلة للتحلل الحيوي من حمض اللاكتيك أو جليكوليد-لاكتيد lactide-glycolide. ونظراً لأنه من المعروف جيداً ، أن الحقن النظامي من كرات البوليمر المجرد، سيؤدي إلى إزالة (تصفية) حيوية سريعة من قِبل الجهاز الشبكي البطاني، فيجب أن يكون السطح مقترنا بسلاسل طويلة من بولي إثيلين جلايكول، كما يجب أن تكون البلورات النانوية لأكسيد الحديد المغناطيسي مغلفة ضمن البوليمر. وتربط المستقبلات طرفياً إلى البولي إثيلين جليكول، أو تغلف داخل كرة البوليمر، اعتماداً على التطبيق. وإجمالاً، فالمكونات الكيميائية للكرات تمنحها لا سمية وتوافقا حيويا، وتجنب إزالة حيوية سريعة، واستقراراً حيوياً بشكل مؤقت. وحينما تحقن، تسري الكرات بحرية خلال مجرى الدم، وتأسر (تحصر) انتقائياً سموما يحملها الدم إلى مستقبلات محددة (انظر الشكل رقم ١٣,١). وبعد انقضاء فترة من الوقت مناسبة، (ربما أقل من ساعة)، تتم إزالة الكرات النانوية الحاملة للسموم من مجرى الدم البشري، باستخدام نظام أنابيب حلقي مغلق خارج الجسم، متصل بجهاز فاصل مغناطيسي مضغوط. وهذا الجهاز المحمول باليد، يُمرر الدم خلال قنوات مصممة؛ لتفادي تجلط الدم، ولتحسين ظروف التدفق الطبقي المناسب. والمغناطيس الدائم المحتوي ضمن الجهاز، يفصل الكرات مغناطيسياً من تيار الدم، وبعدئذ يتم إرجاع الدم المزال سميته في الجسم، ويتم تخزين جسيمات السموم المقيدة (المرتبطة) داخل الجهاز للتجربة الحيوية، والأدلة الجنائية الحيوية، أو التخلص منها.



الشكل رقم (١٣,١). الأداء التصوري لتقنية إزالة سموم السم الحيوي المقترحة. جندي مكشوف يتعاطى بنفسه جسيمات نانوية، وقام بربط شريط وحدة ترشيح مغناطيسية إلى الأوعية الدموية بذراعه لإزالة السم.

إذا نجح تطوير مثل هذا النظام، فسوف يقدم مجموعة المزايا الإستراتيجية التالية:

١- التميز والتحسين العلاجي: إن النظام مبتكر جداً، وسيقدم لأول مرة طريقة إزالة انتقائية وفعالة لمجموعة متنوعة من السموم الحيوية من البشر، مع الملوثات الداخلية. إن عملية إزالة السموم- لا ترتبط فقط بسموم الدم بمفرده - هي الأكثر أهمية أساساً؛ لأن (i) المخاطر الحيوية كثيرة ، فعلى سبيل المثال، لا يتم معادلة المواد الكيميائية والمشعة بفعالية عن طريق ترابط بسيط للسم، ومضاد التسمم داخل الجسم الحي. (ii) بقاء معقدات السم ومضاد التسمم داخل الجسم، قد يستحث أمراضا ثانوية، ومثال على ذلك: الفشل الكلوي من ترسب معقد مناعي، وارتداد تسمم الدم مرة، يكون من إطلاق التفكك والترسب في النسيج.

٢- التوافق الحيوي: كرات نانوية قابلة للتحلل الحيوي وغير سامة، تتكون من مغنيتيت (أو غيره من المواد المغناطيسية)، مغلفة ضمن بوليمر متوافق حيوياً؛ ولذلك لن يُشكِّل حقن الكرات المغناطيسية النانوية أي ضرر لهذا الجسم، مع وجود إزالة ناقصة لاحقة، أو عدم وجود إزالة.

٣- التنوع والتكرارية: إن التنوع العلاجي يكمن في عدد كبير من مضادات السموم الموجودة بالفعل والمصممة حديثاً، والأجسام المضادة، والليجاندات التي يمكن ربطها إلى جسيمات مغناطيسية نانوية متوافقة حيوياً. ويمكن علاج حالات التعرض المزمن أو التعرض بالدم المنخفض، إلا أن تراكيز سموم النسيج العالية، يمكن أن تعالج بالحقن المتكرر، وإزالة الجسيمات الحاملة للسم.

٤- قابلية حمل النظام وإدماجه: من المتوقع أن يكون إجمالي الكرات النانوية المحقونة للارتباط بالسم أقل من ٢ ملجم لكل كيلوجرام من وزن الجسم، ويمكن هندسة محقونات مضادة للتسمم مختلفة، وجهاز إزالة مغناطيسية فعلية؛ لكي يحمل باليد، ويُستخدم لمرة واحدة، ويكون معقماً مسبقاً، وتكون هذه الوحدة قابلة للاستخدام الشخصي أو بمساعدة شخص آخر.

إن الإدراك الطبي الحيوي المستقبلي لهذه التقنية، سيوسع النظام القابل للتطبيق أيضاً إلى (i) تشخيص الأمراض، ومثال على ذلك، تجربة حيوية سريعة لفحص كميات بالمليجرام من سموم مركزة مرتبطة بالكرات النانوية.(ii) معالجة الأمراض في البشر المعرضين لخطر حيوي، ومثال على ذلك، عزل تشكيلة واسعة من السموم المحمولة بالدم، والمخاطر الحيوية داخل الجسم، مع الإزالة اللاحقة من الجسم. ونظراً لأن الجسيمات النانوية ستكون مستقرة ضد التغليف لتسهيل البلع opsonization، وابتلاع الخلية البلعمية الكبيرة، فإنها تستطيع السريان داخل مجرى الدم لفترات ممتدة، وتسهّل استخدامها في الميدان، ومثال على ذلك، عناصر الجيش وأفراد

الاستجابة الأولى، أو تطبيقه كأداة فحص شاملة في إعداد الفرز (النخب) triage. والأهم من ذلك، إذا تم نجاح نظام إزالة السموم هذا، فسوف تقدم تقنية النانو خطة فريدة لمعالجة الأمراض الطبية الأخرى، مثل أمراض المناعة الذاتية، وتعاطي جرعات زائدة من الدواء، التي فيها مستقبلات أمراض معينة (الليجاندات، والخالبات chelators) التي تم تطويرها بالفعل، إلا أن الإزالة اللاحقة للمركب السام من مجرى الدم ليست ممكنة بعد.

سيقدم هذا الفصل استعراضاً موجزاً لتعريف القارئ بخلفية عن الهندسة الطبية الحيوية، والمواد الكيميائية ذات الصلة، وملخصا لجهودنا المتسلسلة والمتوازية الجارية حالياً لتأسيس نظام الإزالة هذا بنجاح. وفي مناقشتنا، سنركز على التشييد والاختبار داخل الجسم لكرات نانوية مغناطيسية قابلة للتحلل الحيوي ومستقرة حيوياً، وإدماج الليجاندات المرتبطة بالسم في الكرات النانوية المغناطيسية، وتطوير نموذج نظام عزل مغناطيسي أولي.

١٣,٢ الحاجة التقنية Technological Need

تتوفر حالياً عدة طرائق لإزالة سموم الدم، ويمكن تلخيص تلك الطرائق الأكثر أهمية من الناحية السريرية على النحو التالي.

ديلزة الدم وترشيح الدم Hemodialysis and hemofiltration: تطبق طريقة الانحدار التناضحي (الأسموزي) عبر غشاء شبه منفذ لديلزة / ترشيح المواد المحبة للماء خارج الدم. والقيود الرئيسة هي طول مدة الإجراء والسريان خارج الجسم لكميات الدم الكبيرة، والتي تتطلب منفذا شريانيا كبير الثقب، وإزالة مادة غير انتقائية، وفعالية محدودة للمواد المحبة للماء، ذات الوزن الجزيئي الأقل. ويقتصر استخدام هذه

الطريقة في الغالب على مرضى الفشل الكلوي، وفي بعض حالات التسمم المتعلقة بالأدوية.

فصادة البلازما Plasmapheresis: تستخدم تبادل غير محدد من البلازما، (وهي عبارة عن دم خالٍ من الخلية) بالألبومين أو المحاليل الملحية خارج الجسم. وهذه الطريقة تزيل معظم طور سائل الدم؛ ولذا لا يمكن استخدامها إلا لفترة زمنية محدودة، وفي حالات سريرية خاصة، حيث تكون المادة السامة موجودة بتركيز وفير. وتقتصر منفعتها عموماً على أمراض المناعة الذاتية.

الامتصاص المناعي خارج الجسم Extracorporeal immunoabsorption: هو شكل مختلف لديلزة الدم، يتم فيه تعريض الدم المدار خارج الجسم لسطح تبادل أكبر مشبع بمواد ماصة مناعية، مثل (الأجسام المضادة). إنها طريقة إزالة أكثر تخصصية، إلا أنها أقل فعالية، وتتطلب دوران كميات دم كبيرة، وتقتصر على تفاعلات بين المستضد وجسم مضاد معين.

ويمكننا تنفيذ الحقن المباشر للخالبات والأجسام المضادة، التي فيها – على سبيل المثال– الأجسام المضادة المحقونة، تُعادل بعض أعمال المستضد المدار، مثل (الدواء أو تفاعلات سم بكتيرية). ومع ذلك، فلا يمكن في أغلب الأحيان تحقيق ربط المستضد بالكامل، كما يتطلب أيضاً جرعات عالية نسبياً من الأجسام المضادة؛ مما يزيد من خطر الحساسية (الحساسية المفرطة)، والآثار الجانبية الشاملة (الفشل الكلوي، .. إلخ). وعلاوة على ذلك، لا يتم إزالة معقد السم والجسم المضاد من الدم، ويستطيع السم المتبقي التفكك؛ مما يؤدي إلى ارتداد التسمم.

ومن الواضح، عدم وجود أي نظام كافٍ حالياً لإزالة السموم، ولا توجد أي علاجات، باستثناء الإجراءات المساعدة بالنسبة لغالبية حالات التعرض للخطر الحيوي. وفي توافق مع نظام إزالة السموم الحادة والمزمنة الأكثر نجاحا سريرياً– ديلزة

الدم- نفترض أن نظام إزالة سموم متعدد الاستعمال مبتكر، يجب أن يزيل عامل (عوامل) الضرر من تيار الدم. إن عزل خطر الدم الحيوي البسيط داخل تيار الدم، مثلما تحقق عن طريق ترابط الليجاند والسم، أو المستضد والجسم المضاد؛ سيحمي البشر بشكل غير كافٍ من التعرض للسموم الضارة. ويتمثل هذا بوضوح في (i) مناهج معالجة تستند فقط على ترابط المستضد والجسم المضاد داخل الجسم، والتي تكون فيها المعالجة الآمنة للجسم المضاد صعبة؛ بسبب انخفاض ألفة الجسم المضاد، والآثار الجانبية الشاملة، (أي أمراض المعقد الوسيط المستضد، والجسم المضاد، والفشل الكلوي... إلخ)، وإنتاج مضاد للأجسام المضادة، وكل القيود المتأصلة، إذا كانت هناك حاجة لحقن أجسام مضادة أعلى أو متكررة. (ii) حالات التعرض لسموم كيميائية ومشعة، حيث لا يغير ارتباط الليجاند بالسم من الفعالية السمية، ومسار المرض الطبيعي المستحث بعوامل الضرر.

وعلى أية حال، وخلافاً لديلزة الدم التقليدية وغيرها، وأنظمة إزالة السموم الأقل شيوعاً، فإن النظام المستند على الكرات النانوية له مزايا مهمة، مثل:

- *التخصصية:* سيتم فقط إزالة المواد المرتبطة على وجه الخصوص إلى سطح الليجاند والجسيم النانوي.
- *الإزالة: توجد* عدة مزايا مهمة:

- يصبح تفكك معقدات مضاد التسمم والسم المتكونة بالفعل أقل أهمية، كما تتم إزالة المركبات باستمرار من الجسم.
- تتم إزالة مخازن الدم السامة الفعالة بشكل دائم، وبالتالي، يتم إطلاق سموم مرتبطة بالغشاء، والنسيج، والبروتين الإضافي، باستمرار كسم حر داخل تيار الدم، وترتبط في نهاية المطاف بالكرات النانوية (مخازن الجسم السمية متناقصة).

- يسمح التحديد الكمي (تكميم) للسموم المزالة بـ (i) تقدير مباشر لكفاءة إزالة السم. (ii) تقدير واضح لمدة العلاج المطلوبة. (iii) تعريف (تمييز) مختبري أكثر لأصل الخطر الحيوي (الأدلة الجنائية). (iv) تحسين تصميم مضاد التسمم... إلخ.

- *الترابط الكمي*: يتم تسهيل ترابط السم الكمي بواسطة سعة ترابط مضاد التسمم والجسيمات النانوية الكبيرة، ويصبح هذا مفيداً بشكل خاص، عندما تتوفر فقط ألفة منخفضة لمضادات التسمم.
- *اللا سمية*: يتم *أيض* الجسيمات النانوية المتبقية داخل الجسم فسيولوجياً دون تأثيرات مناوئة.
- *كفاءة الإزالة*: ستسمح انحدارات المجال المغناطيسي القوية بإزالة محصول عال من مركبات السم، ومضاد التسمم من أول تمريره.
- *ملاءمة الاستخدام*: خطوتا إزالة السموم، مبسطتان للاستخدام الشامل من قبل الدليل المرئي لا الشفهي. حقن الكرات النانوية متبوعاً بإدخال الإبرة البسيط من وحدة الترشيح؛ وتصاميم أساسها مستشفى كبيرة المقياس أو محمولة مصغرة.
- *أمان الاستخدام*: لا يوجد خطر انتقال المرض، (كما في العلاج بالأجسام المضادة، ونقل الدم....إلخ)، ولا يوجد فقدان للدم؛ ولا حلقة مغلقة، ولا تمييع دم مسبق (بإعطاء دواء الهيبارين المميع للدم)، ولا تعقيم مسبق، ونظام يُستخدم لمرة واحدة يتفادى تلوث الدم، ويسمح بالاستخدام الشخصي، أو من قِبل شخص مساعد بواسطة موظفين غير طبيين، وحفظ سم العينة.
- *التكرارية*: يمكن بسهولة معالجة تكرار التعرض للمخاطر الحيوية، أو إعادة تراكم السم من مخازن نسيج الجسم بجلسات إزالة السموم المتكررة.

وإذا نجح مثل هذا النظام، فإن التقدم الأكثر وضوحاً وإثارة، هو تقديم نظام معالجة وكشف حيوي محمول يدوياً قوي، والذي يمكن أن يوفر متعدد الحليلة multianalyte، مركز لفحص حيوي عال الحساسية. وعلى هذا النحو، يكون من الممكن تحديد وجود أعراض مسبقة داخل الجسم لمسببات الأمراض، وذلك من خلال عزل انتقائي عال، وفصل مساعد مغناطيسياً بدون آثار جانبية ضارة على الخلايا والأنسجة السليمة المحيطة.

إن التقنية مبتكرة بشكل جذري، ولكن المكونات لها بعض أعمال سابقة، كما وصف أعلاه. ونسعى لمكاملة (لدمج) التقنية المعروفة بالتطورات ووضع إستراتيجيات تصميم مبتكرة في مختبراتنا لهندسة نظام إزالة سموم قوي. وحتى في أبسط أشكاله، فإن نظام إزالة السموم داخل الجسم باستخدام الكرات النانوية المستقرة حيوياً، سيمتلك مقياسا من التطبيقات المتنوعة؛ مما يجعله جذابا للعديد من التطبيقات العسكرية أو المدنية.

١٣,٣ الأساس التقني Technical Basis

تظهر عدة أسئلة عند أول استقصاء لمفهوم التقنية عن مدى جدواها وقابليتها للتطبيق، ويتم معالجة هذه الأمور أدناه مباشرة.

١٣,٣,١ الاختلاف بين عزل وتوصيل العقاقير باستخدام الكرات النانوية والميكروية

Difference Between Drug Sequestration and Drug Delivery Using Nanospheres and Microspheres

هناك العديد من الأمثلة للبحث والتطوير في أنظمة الكرات النانوية والميكروية؛ لتحقيق هدف توصيل العقاقير، ونوجه نظر القارئ إلى مراجع: ديفيز Davis [1]، ودوجلاس Douglas وآخرين [2]، وبحث هافلي Häfeli [3]، ولوبي Lübbe وآخرين [4]. في بادئ الأمر، يُعد استقصاء توصيل العقاقير وإزالتها باستخدام

الجسيمات النانوية بحثا موازيا. وعلى أية حال، فهناك اختلافات مهمة في تطوير هذين النظامين (الجدول رقم ١٣,١). أولاً: يجب أن تُحسِّن أنظمة توصيل العقاقير التغليف لمادة العقار ضمن الجسيم النانوي. وعلى هذا النحو، فأفضل تركيب للاستخدام، هو جسيمات بمساحة سطح أعلى إلى الحجم. وتتطلب إزالة العقاقير العكس- نسب الحجم إلى مساحة السطح عالية- من أجل زيادة الوظيفة السطحية (السعة) للكرات النانوية لإزالة السم. أيضاً لا تتطلب أنظمة توصيل العقاقير غالباً أزمنة سريان طويلة في الجسم، وبالتالي قد لا تستلزم خواص سطحية قوية لتفادي التغليف لتسهيل البلعمة. وفي عملية إزالة السموم وإزالة العقاقير، سيتطلب دوران الكرات النانوية في تيار الدم عدة دورات من أجل زيادة أسر (حصر) السموم لأقصى حد، والسماح بإزالتها. وبعد ذلك يمكن أن يترافق السطح بحرية؛ لأن العقار يكون مغلفا داخل مصفوفة الكرات الميكروية لأنظمة توصيل العقاقير. وفي المقابل ستتطلب الكرات النانوية لإزالة السم أن يكون السطح مترافقا بليجاندات تثبيت (تحقيق الاستقرار)، وليجاندات لعزل السموم. والسبب في ذلك، هو تحقيق أقصى قدر من الحركية لإزالة السم، والمعروف بالتأثير السطحي. وأخيراً، فأنظمة توصيل العقاقير في أغلب الأحيان ليست مغناطيسية، ويتم الاعتماد بدلاً من ذلك على ليجاندات سطحية؛ للربط إلى مواقع النسيج. ويجب أن تزيد الأنظمة المغناطيسية العزم المغناطيسي للجسيمات إلى أقصى حد؛ من أجل تخفيض الانحدار، والمجال المغناطيسي المطبق خارجياً إلى أدنى حد. وبالنسبة لإزالة العقاقير، فيكون المكون المغناطيسي، هو المهم للترشيح، ولكن يمكن تعديله اعتماداً على تصميم نظام الترشيح المغناطيسي؛ ولذلك يمكن أن تصنع غرفة ترشيح بنسبة طول إلى عرض (بنسبة باعية) عالية؛ لإنتاج معدلات تدفق الدم، التي تتراوح بين <١ سم ث$^{-١}$ إلى >١٠٠ سم ث$^{-١}$، اعتماداً على كفاءات الأسر (الحصر) الفعلية. وبسبب تعددية الاستعمال في تصميم نظام الترشيح، نتصور أن يكون العزم

المغناطيسي للجزيئات أقل بكثير مما هو مطلوب بأنظمة توصيل العقاقير المغناطيسية (<١٠ وحدة إلكترومغناطيسية (emu) جم$^{-١}$، في مقابل > ٣٠ وحدة إلكترومغناطيسية جم$^{-١}$ في أنظمة توصيل العقاقير).

الجدول رقم (١٣,١). المقارنة بين نظام توصيل العقاقير وإزالة السموم المفترض، المستند على الجسيمات المغناطيسية النانوية.

الخاصية	توصيل العقاقير	إزالة السموم
الحجم	مساحة سطح إلى حجم عالية	الحجم إلى مساحة السطح عال
العزم المغناطيسي	>٣٠ وحدة إلكترومغناطيسية/جم	<١٠ وحدة إلكترومغناطيسية/جم
الوظيفة السطحية	ليس ضرورياً	مستقر ضد التغليف لتسهيل البلعمة، مضاد السموم مثبت على السطح
زمن الدوران (السريان)	دقائق	> ساعة

emu: وحدة إلكترومغناطيسية.

١٣,٣,٢ سلامة الأوعية الدموية من الكرات النانوية

Vascular Survival of Nanospheres

لقد كان هناك عمل أولي يدرس حركية عقاقير الجسيمات ضمن مجموعتنا، ومن قِبل الآخرين. يتم إزالة الجسيمات بدون خصائص السطح المناسبة فوراً (خلال دقائق) من قِبل النظام الشبكي البطاني (الكبد والطحال...إلخ) [5]، وسوف تسبب الجزيئات الكبيرة جداً انسداد الشعيرات الدموية، وتتسبب في آثار سلبية خطيرة، والموت بعد الحقن النظامي في الحيوان ([6]. لم يتم نشر البيانات المتحصل عليها في تجاربنا على قرد باستخدام كرات ميكروية أساسها سليلوز متوافرة تجارياً). ومع ذلك، فإن النجاح في أنظمة الجسيمات النانوية والليبوسوم يُحدد (يميز) أهمية مشتقات البولي إثيلين جليكول (PEG) المحبة للماء في إطالة البقاء داخل الأوعية [7, 8]. إن الجسيمات

المغلفة بسلاسل البولي إثيلين جليكول PEG، تعرض استقرار شحنة وفراغي (قرب التعادل)، وتمنع تكوين الجسم المضاد، والتغليف لتسهيل البلعمة، والبلعمة [8, 9]. وقد كشفت التحقيقات عن أن أزمنة دوران الدم للجسيمات، تزداد كلما ازداد الوزن الجزيئي للبولي إثيلين جليكول PEG المرتبط تساهمياً. وبعد مرور خمس ساعات من الحقن النظامي، تم احتجاز الثلث فقط من الكرات النانوية (١٤٠نانومتر) لبولي (حمض جليكوليك-مشترك-اللاكتيك)، المترافق بالبولي إثيلين جليكول- PEG ٢٠ كيلو دالتون في الكبد، بالمقارنة إلى الجزيئات غير المغلفة [8]. ولقد لُخِّصت إطالة مماثلة من قبل آلن Allen وآخرين [10,11]، وتم وصفها من قِبل لي Li وآخرين [7] ، ودان Dunn وآخرين [12]. وعلى أية حال، فالآليات المضبوطة لتجنب الخلية البلعمية الكبيرة (البلعم) غير معلومة، وتوجد تناقضات فيما يتعلق بأفضل طول للبولي إثيلين جليكول PEG أوالمشتق. وقد أثبتت الأدلة الأكثر حداثة، أن عمر النصف ٢٠ ساعة للدوران، يجسد التقدم الكبير الذي أحرزه العلماء في هذا المجال [13].

١٣,٣,٣ سمية المكوِّنات Toxicity of Components

لقد تم وصف الكرات الميكروية والنانوية البوليمرية غير السامة في البحوث، وتشمل فئة من البوليمرات الحيوية الطبيعية والمشيدة. ولا تقتصر البوليمرات الحيوية على بولي (حمض اللاكتيك)، وبولي (حمض الجليكوليك- مشترك- الاكتيك)، وبولي (إثيلين جلايكول)، وبولي (كابرولاكتون)، والألبومين، والديكستران فقط. وتتحلل البوليمرات الحيوية كيميائيا بمعدلات تعتمد على حجم الجسيم، وخواص السطح، وكثافة الترابط العرضي، والوزن الجزيئي للبوليمر [14]. وقد قُيِّمت السمية الحادة لعدة بوليمرات حيوية [15]، ولم تشر إلى أي آثار مرضّية بسبب البوليمرات. وبدلاً من ذلك، يتم تحلل وأيض البوليمرات إلى شظايا غير ضارة [16]. وتم الموافقة على البولي (حمض اللاكتيك)، وبولي (حمض الجليكوليك-مشترك-اللاكتيك)،

وبولي (الكابرولاكتون) من قِبل إدارة الأغذية والعقاقير FDA للحقن في عدة أشكال. ومن عملنا الخاص، لم تحدد أي تغييرات سمية مبكراً (التغيرات النسيجية، والتخثر، والاستنزاف) من فحوص نسيجية للرئة، والكبد، والدماغ، والطحال لسلسلة من القردة والجرذان، التي عرضت إلى حُقن نظامية من الجسيمات المغناطيسية، كما لم تلاحظ أي عوائق شعرية في أعضاء الحيوان المفحوص بعد تعديل حجم الجسيم، وطريقة الحقن.

إن وجود الجسيمات المغناطيسية مدمجة ضمن المصفوفة البوليمرية، يقدم مصدراً ثانياً للسمية المحتملة. ومع ذلك، فلقد أظهرت الدراسات [17, 18] أنه على المدى الطويل، يتم أيض بلورات المغنيتيت جزئياً، وتتزايد مخازن بروتين الفريتين ferritin الكبدي والطحالي، وتدمج جزئياً في خلايا الدم الحمراء. وهكذا بشرط أن تكون الجرعة المحقونة من الحديد المغناطيسي دون عتبة الجرعة السامة، أي أنها آمنة (عتبة الجرعة السامة تكون ١٠ ملجم كجم$^{-1}$ من وزن الجسم، أو ٧٥٠ ملج في الرجل القياسي [16]. وكذلك تكون مستويات المصل الطبيعية في الدم ٨٠-١٨٠ ميكروجرام ديسي لتر$^{-1}$، ومستويات العمل >٥٠٠ ميكروجرام ديسي لتر$^{-1}$). وتشير تقديراتنا إلى أنه سيتم حقن حوالي ١٠٠ ملجم من الجسيمات النانوية؛ لعلاج جسم معرض لخطر حيوي نموذجي، وجزء منها سيكون متكونا من الحديد، (إذا تم تحميل ٥٠٪ من الجسيمات النانوية بحديد عنصري، إذًا قد يتعرض المريض إلى ٥٠ ملجم من الحديد غير المرتبط أو الحر). وليس هذا فقط ، وإنما الكمية من المغنيتيت المحقونة أصغر بكثير من الجرعة المؤدية إلى تأثيرات الحديد السامة، ولكن الأكثر أهمية أن نظامنا لإزالة السموم، سيتخلص من معظم المغنيتيت المحقون كجزء من عملية إزالة السموم؛ ولذلك سيكون تخزين الجسم مقتصراً فقط على طريق ترسيب بسيط. وتمت الموافقة على أكسيد الحديد فائق البارامغناطيسية من قِبل إدارة الأغذية والعقاقير للحقن.

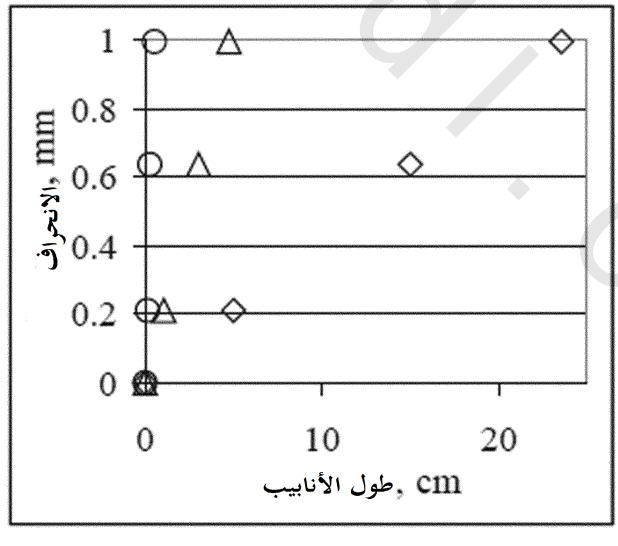
١٣,٣,٤ الترشيح المغناطيسي للكرات النانوية من الدورة الدموية

Magnetic Filtration of Nanospheres from Circulation

إن الوحدات الفاصلة المغناطيسية للاستخدام الصناعي متوافرة تجارياً، واستخدمت لبحوث متنوعة تتعلق بالفصل المناعي [23-19]. ومع ذلك فلم يتم تصميم فاصل مغناطيسي مناسب لتطبيقنا إزالة الكرات النانوية من مجرى الدم. واستناداً على أداء الفواصل التجارية وتحقيقاتنا التمهيدية، سنقوم بتطبيق هندسة بسيطة من الناحية الفنية، لتصميم أول نموذج بدائي لفواصل طبية حيوية. يستخدم نظام "ترشيحنا" المقترح مغنطيسات دائمة صغيرة مرتبطة بجسم نظام قسطرة حلقي مغلق متخصص. إن التصميم الفعلي للجهاز، هو جزء من البحث المقترح، مثل عدة خيارات معقولة، تحقق شروطا محددة مسبقاً. والشائع عند كل خيارات التصميم، أنه سيتم تحويل الدم من الجسم إلى مصفوفة من أنابيب التدفق الصغيرة جداً (قطرها ببضعة مئات من الميكرومترات). وستغطس الأنابيب في انحدار مجال مغناطيسي؛ مما يسبب انحراف الكرات النانوية المغناطيسية وتجمعها نحو جدار الأنبوب. وسيتم تعريف الهندسة الميكروية لنظام الأنابيب (من حيث الحجم، والمادة، والطلاء، والطول، والشكل...إلخ)، في بحثنا لتقليل التفاعلات مع تخثر الدم (أي: الجلطة)، وخلايا الدم (أي: التدمير). وبالإضافة إلى ذلك، سُتحدد تحليلاتنا إستراتيجيات التصميم المختلفة لأنماط العملية المختلفة، (مثال على ذلك، في الميدان مقابل وحدة قائمة)، ومستوى تدريب المُستخِدم، (مثال على ذلك: مُستخدِم مساعد مقابل استخدام شخصي).

ويمكن أن يُوضح الفصل المغناطيسي بتجربتنا البسيطة التالية. تم احتواء معلق من الكرات النانوية أحادية التشتت (الانتشار)، بقطر ٤٠٠ نانومتر (العزم المقاس ٥٠ وحدة إلكترومغناطيسية جم$^{-١}$، ρ = ١,٤ جم سم$^{-١}$)، في محلول ملحي ٠,٩٪، في قنينة قطرها ٠,٦ سم. ووضع مغناطيس متوفر تجارياً محمول يدوياً (٠,٤ تسلا عند السطح)، مقابل الجدار الخارجي للقنينة، وانحرفت كل الجسيمات سريعاً إلى الجدار

الداخلي القريب من سطح المغناطيس في غضون ٣ ثوان. وبافتراض أن سرعة الجسيم ثابتة (هنا ٠,٦ سم لكل ٣ ثوان) داخل السائل المحتوى، نرسم مسارات الجسيمات تحت شروط التدفق (الشكل رقم ١٣,٢). ويقدر الرسم طول الأنابيب اللازم؛ لكي يحرف الجسيمات المتدفقة في سرعات ٥٠، و١٠ و ١ سم ث$^{-1}$ في أنابيب قطرها ١ملم. أما بالنسبة لسرعات التدفق السريعة، فسيتطلب أنبوب بطول > ٢٠ سم مغموس في المجال المغناطيسي لفصل الجسيمات من التدفق. وعلى أية حال، تم تحقيق ذلك بسهولة مع تصميمات أنابيب التدفق الميكروية بالنسبة لمعدلات التدفق ١٠ سم ث$^{-1}$، وكان طول الأنابيب الضروري، هو ٥ سم فقط تقريباً. وفي تصميمنا، ستستخدم أنابيب تدفق متعددة لتعويض الانخفاض في معدلات تدفق الدم الحجمية لكل أنبوب، وتخفض هبوط الضغط عبر الجهاز. وستسهل الأنابيب ذات القطر الأصغر عملية الفصل، وتختزل كثيراً طول الأنبوب اللازم للفصل الفعال.



الشكل رقم (١٣,٢). يعرض النموذج المبسط مسار الجسيم النانوي، بسرعات تدفق متنوعة (◇ = ٥٠ سم ث$^{-1}$، Δ = ١٠ سم ث$^{-1}$، ○ = ١ سم ث$^{-1}$). يجب أن تنحرف الجسيمات ١ ملم، لتصل إلى جدار الوعاء.

١٣,٤ المواصفات التقنية Technology Specifications

إن البؤر الرئيسة، هي: (i) تطوير الكرات النانوية المغناطيسية المستقرة حيوياً، التي تدور (تسري) بحرية في تيار الدم. (ii) تصميم نموذج الكرات النانوية المقترنة بمضاد التسمم القابل للتحلل الحيوي. (iii) البرهنة على عزل السم داخل الجسم وخارجه باستخدام نموذج، وزوج مستقبل- هدف بيولوجي. (iv) التصميم، والتصنيع، ووصف الدمج (الاكتناز)، وجهاز خارج الجسم لفصل الكرات النانوية مغناطيسياً من الدم بسرعة.

توفر أحدث الكرات النانوية المغناطيسية المتوافقة حيوياً، وأجهزة الفصل المغناطيسية بالفعل بيانات أولية واعدة عن التقنيات الأساسية اللازمة لتحقيق مكونات نظام إزالة السموم. ومع ذلك يجب التغلب على تحديات علمية كبيرة؛ لتحديد وظيفة وكفاءة نظامنا لإزالة السموم السريعة. وسنقوم بوصف الخلفية والمتطلبات الواسعة لكل إنجاز من الإنجازات التقنية الأربعة الضرورية المذكورة أعلاه.

١٣,٤,١ تطوير الكرات النانوية المغناطيسية المستقرة حيوياً

Development of Biostabilized, Magnetic Nanospheres

يتم استخدام كرات ميكروية ونانوية أساسها بوليمري أساساً كناقلات عقاقير للهدف، أو لتوصيل عقار مستديم. وقد تم تكريس عدة مقالات لتلخيص تطبيق الكرات المحملة بالعقار [27-24]، وتقنية الناقل المغناطيسي [28]، وحالة تقنية بالاستهداف المغناطيسي من ناقلات مغناطيسية [29]. وفي الحقيقة، يتم عقد مؤتمر دولي بصفة منتظمة لمناقشة التقدم في مجال التطبيقات الطبية للناقلات المغناطيسية [http://www.magneticmicrosphere.com]، وقد تزايد عدد الحاضرين لهذا المؤتمر سريعاً.

ولتقنية إزالة السموم، نحتاج لتشييد الكرات النانوية مع (i) حجم مثالي لتجنب عرقلة تدفق الدم الشعري وإزالة وعائية فورية. (ii) انتظام حجم كافٍ لتسهيل النمذجة، ومراقبة وضمان الجودة.(iii) خواص سطحية مثالية لإطالة الدوران في الأوعية الدموية. وبشكل محدد، يجب أن تكون الكرات النانوية أجزاء وحيدة، ما بين ١٠٠ و ٥٠٠٠ نانومتر. وإذا كانت الأجزاء ثنائية النموذج أو متعددة النموذج مشيدة، إذًا يجب أن تكون أقطار الأجزاء الوحيدة مختلفة بما فيه الكفاية ؛ للسماح لطريقة فصل فيزيائية ما، مثل (الترشيح). كما يجب أن تكون شحنة السطح متعادلة أو سلبية طفيفاً (أقل من ١٠ ملي فولت، مقاسة بجهد زيتا) ؛ نتيجة لربط البولي إثيلين جلايكول بالسطح ؛ من أجل زيادة زمن دوران الدم، وتقليل الإزالة الحيوية عن طريق التغليف لتسهيل البلعمة والبلعمة.

١٣,٤,١,١ حجم الكرة النانوية Nanosphere Size

تقدم البحوث مقالات عديدة تصف التشييد لكرات ميكروية ونانوية، مكونة من بوليمرات طبيعية ومشيدة (اصطناعية). ولقد تم فحص العديد من أنواع البوليمرات للتطبيقات المحتملة داخل الجسم. والبوليمرات الأكثر مناقشة إلى حد بعيد، هي بولي (حمض اللاكتيك)، والمونومرات الكبيرة بولي (حمض الجليكوليك- مشترك- اللاكتيك). وهناك وفرة من الأدب أكثر بكثير من أن نعددها، تصف طرائق التشييد، وتغليف (كبسلة) العقار، وحركية الإطلاق، والاستقرار الحيوي، والخواص داخل الجسم، مثل ابتلاع الخلية البلعمية الكبيرة، والتحلل الحيوي، وتخلص العضو منها. وتحتوي مجلة الإطلاق المتحكم فيه *Journal of Controlled Release* على العديد من البحوث كل عام فيما يتعلق بمادة البحث.

إن طريقة تشكيل الكرات النانوية واضحة ومباشرة، حيث يُذاب البوليمر في مذيبات عضوية متطايرة، وتضاف إلى محلول مائي، وتحرّك (تُقلب) بشدة، حتى

يتكوَّن مستحلب من القطرات الزيتية. وتُعزز خافضات التوتر السطحي في المحلول من استقرار المستحلب، حتى يذوب المذيب العضوي المتطاير في المحلول ويتبخر، تاركاً كرة متصلبة (متماسكة) من البوليمر. وتحتوي الكرات المغناطيسية على مساحيق مغناطيسية إضافية في المحلول العضوي، ويعتمد حجم الكرات على بارامترات العملية. وقد تم تلخيص بعض بارامترات في الجدول رقم (١٣,٢).

هناك نوع شائع لتركيب البوليمر، هو البولي ستيرين، وتم تشكيل كرات البولي ستيرين بطريقة مختلفة تماماً، تسمى البلمرة في مستحلب [30]، ولن نذكر المزيد إلا القول بأنها موحدة في الحجم مع الكيمياء السطحية والوظيفية المشهورة. إن هذه الطريقة غير مناسبة للاستخدام داخل الجسم؛ نظراً لسمية البولي ستيرين، ولكن خواصها الموحدة، تجعلها أنظمة نموذجية جذابة أثناء دراسات إمكانية التنفيذ.

ويكون وضع الحدود بالإزالة الفيزيائية لجسيمات متدفقة في الدم واسعا نوعاً ما. ولزيادة كثافة المستقبل السطحي لأقصى حد، نسعى لعمل جسيمات بنسب مساحة سطحية عالية بما فيه الكافية إلى الحجم، على أن تناقش في المقطع التالي. إن كرات نانوية بنسبة مساحة سطحية عالية إلى الحجم، تعني إمكانية استخدام جسيم أصغر أو ذاك الأقل <١٠٠ نانومتر. وعلى أية حال، فكلما خُفِّض حجم الكرة النانوية، أصبح الحفاظ على محتوى المغنيتيت أو العزم المغناطيسي أكثر صعوبة. وبعبارة أخرى، يهبط العزم المغناطيسي بمعدل أسرع مما هو متوقع، استناداً على التخفيض في حجم الجسيم، كما خُفِّض القطر. لقد حققنا نجاحاً في فصل جسيمات البولي ستيرين النانوية المغناطيسية بحجم ٤٠٠نانومتر من الدم (مغنطة نوعية = ٥٠ وحدة إلكترومغناطيسية جم$^{-1}$)، وبالتالي فإننا نفترض أن الجسيم النانوي بحجم من ١٠٠-٤٠٠ نانومتر، سيكون الأمثل في هذا البرنامج. وهناك متطلب موازٍ بأن حجم الجسيم، لا يكون موزعا على نطاق واسع (متعدد التشتت عالٍ). والسبب في ذلك يكون لتسهيل نمذجة

النظام، ولضمان القدرة على التنبؤ بخواص الجسيم، مثل العزم المغناطيسي، ومساحة السطح، وكثافة المستقبل لكل حجم دفعة، وشحنة السطح.... إلخ.

الجدول رقم (١٣,٢). بعض البارامترات العملية في تشييد الكرات الميكروية والنانوية المغناطيسية.

البوليمرات	بولي (D-لاكتيد) ، وبولي (L-لاكتيد) ، وبولي (D,L -لاكتيد)، بولي (حمض جليكوليك-مشترك-لاكتيك)، وبوليمرات وبوليمرات مشتركة مرتبطة إلى بولي إثيلين جلايكول، بولي (كابرولاكتون)
مخفضات التوتر السطحي	بولي (كحول الفينيل) ، بولوكسامير، بولي اثيلين جلايكول، توكوفيرول بولي اثيلين جلايكول سكسينات، كبريتات دوديكيل الصوديوم
المواد العضوية المتطايرة	ثنائي كلورو الميثان، والكلوروفورم، والأسيتون ، وخلات الإثيل
سرعة الخلط	١٠٠٠- ٢٠٠٠٠ دورة في الدقيقة، ١٥-٩٥ وات في الصوتنة (تعريض لموجات فوق صوتية)
طريقة الخلط	عملية تجانس (مجانسة) عالية السرعة، تعريض للموجات فوق الصوتية بموجات فوق صوتية، ريشة أو محراك خلط، قضيب تحريك مغناطيسي
البوليمر/نسبة المذيب العضوي	١-٠٪
الزيت/نسبة الماء	١-١٠٪
زمن الخلط	من عدة ثوان إلى دقائق اعتماداً على طريقة تشكيل المستحلب الأولي، عدة ساعات لتتصلب
الوزن الجزيئي للبوليمر	٢-٣٠٠ كيلو دالتون
الوزن الجزيئي لمخفض التوتر السطحي	PVA (بولي كحول الفينيل) ١٠-١٥٠ كيلو دالتون
تركيز مخفض التوتر السطحي	٠,١-١٠٪ بولي(كحول الفينيل) PVA
الطور المغناطيسي	مغنيتيت Fe_2O_3، ماجيميت γ-Fe_2O_3، حديد مثبط ، وكوبالت مثبط
درجة الحرارة	مجهول، قد تخفض

openkandil.com

١٣,٤,١,٢ خواص السطح Surface Properties

أصبح الارتباط التساهمي من المركبات النشطة بيولوجياً إلى البوليمرات والكرات البوليمرية أحد طرائق التعديل والتحكم في التوزيع الحيوي، وحركية العقار، وسمية هذه المركبات في كثير من الأحيان [31]. وإحدى المواد البوليمرية الأكثر شيوعاً المستخدمة لهذا الغرض، هي البولي إثيلين جلايكول (PEG). إنها تمتلك مجموعة من الخواص المثالية التالية: الذوبانية الممتازة في المحاليل المائية [32]، كما أنها ذات استمناع (استمناعية) واستضداد منخفض للغاية [33]، وتتميز أيضا بأنها غير سامة، ومصدقة من قِبل إدارة الأغذية والعقاقير للاستخدام الداخلي في البشر [34]. ويقدم جريف Gref [27] مناقشة ممتازة على كيمياء البولي إثيلين جلايكول PEG الحيوية وتفاعل البروتين.

وقد اقترح جيون واندرادي Jeon and Andrade [35] نموذجا رياضيا يأخذ في الحسبان أربعة أنواع من التفاعلات بين البروتين وركيزة كارهة للماء. وقد ذكرا بأن أفضل الظروف التي عثروا عليها لتنافر البروتين، كانت طول سلسلة البولي إثيلين جلايكول PEG الطويلة، وكثافة السطح. وإذا كانت D، هي المسافة من مكان التثبيت (المرسى) إلى الركيزة لسلسلتين من سلاسل البولي إثيلين جلايكول PEG، المرتبطة (المرفقة) طرفياً، فينبغي أن تكون المسافة D حوالي ١ نانومتر في حالة البروتينات الصغيرة (قطرها حوالي ٤ نانومتر)، بينما يجب أن تكون المسافة D ، حوالي ١,٥ نانومتر في حالة البروتينات الأكبر (٦–٨ نانومتر)، [35].

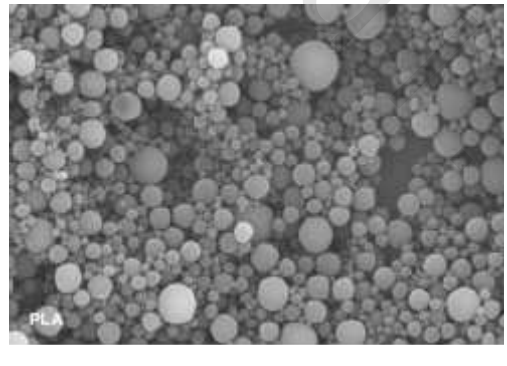
يتمثل التحدي لبرنامجنا في تحديد طول سلسلة البولي إثيلين جلايكول PEG الصحيح، وتغطية السطح لزيادة عمر النصف للدوران ؛ لكي يسمح بالترابط إلى السم داخل الجسم، وبإزالة الكرات النانوية المحملة بالسم. ويأتي البولي إثيلين جلايكول PEG في أشكال متنوعة، كذلك يمكن أن يصنع بشكل خطي أو متفرع، وبوزن جزيئي

مختلف (طول السلسلة)، واستبدال جزئي، مثل (بوليمرات الوحدة المشتركة من البولي إثيلين جلايكول- البولي بروبيلين جلايكول). ويحتوي الأدب على تناقضات فيما يتعلق بالاختيار الأفضل لطول السلسلة، كما تشير نماذج الكمبيوتر [38-35] إلى فروق غير ملحوظة، ولكنها مهمة فعلاً لتوضيح سلوك البولي إثيلين جلايكول PEG نحو امتصاص البروتين. ودراسة واحدة [8] تستنتج أن كرات البولي ستيرين النانوية بسلاسل البولي إثيلين جلايكول PEG أطول، تلك الأكبر من ١٠٠٠٠ دالتون، تبقى لمدة أطول في الجرذان، ولكنها لا تظهر دليلا مباشرا على تغطية السطح. وقد ركزت دراسة أخرى [12] على عرض أهمية كثافة تغطية السطح، ولكن لم يتم مقارنة هذه النتائج مع تلك، كدالة في طول البولي إثيلين جلايكول PEG. والأهم من ذلك، فإن سلسلة البولي إثيلين جلايكول PEG الطويلة فراغياً، قد تتداخل مع بعضها بعضا أثناء إجراء الربط السطحي، أو أثناء البلمرة المشتركة. وبالتالي قد لا يستطيع السطح استيعاب سلسلة البولي إثيلين جلايكول PEG الطويلة؛ لتغطية السطح ١٠٠٪ ، واللازمة لتجنب التغليف لتسهيل البلعمة. وتُشير دراسة أخرى [39] إلى أنه لم يتم تحسين البقاء الوعائي عن طريق إقران سلاسل أطول من ٥٠٠٠ دالتون، إلا أن ياماواكا Yamoaka وآخرين [13] فندوا هذا النقص المقترح للتبعية. وتستلزم هذه التناقضات دراسات تأكيدية وتكميلية.

١٣,٤,١,٣ التحلل الحيوي Biodegradability

إننا نكيف البارامترات الموجودة لإطالة البقاء الوعائي لجسيمات نانوية نموذجية أساسها البولي ستيرين (طول سلسلة البولي إثيلين جلايكول PEG، وكثافة سطح البولي إثيلين جلايكول PEG، وكثافة موقع المستقبل، والحركية الحيوية)، إلى كرات مغناطيسية نانوية قابلة للتحلل الحيوي. وهناك العديد من البوليمرات الحيوية يمكن الاختيار من بينها؛ لتشييد الجسيمات النانوية. وهناك مجموعة كبيرة من البيانات

على بولي (حمض اللاكتيك) (PLA)، وبوليمرات بولي (حمض الجليكوليك- مشترك- اللاكتتك) (PLGA). وقد وصف جريف وآخرون [40] كيفية تشييد الجسيمات النانوية من PLGA-PEG <١٥٠ نانومتر باستخدام تقنية تبخير مذيب الزيت في الماء، ووصف لي وآخرون [7] طريقة مماثلة. ووصف هافلي وآخرون [3] طريقة الزيت في الماء؛ لتشييد كرات بولي حمض اللاكتيك PLA الميكروية < ٣ ميكرومتر، وقد بيَّن عملنا أن هذه الطريقة يمكن أن تُنتج كرات نانوية بتشتت متعدد، أقل من ٩٠٠ نانومتر إلى ٣٠٠٠ نانومتر (الشكل رقم ١٣,٣). ووصف موسكيرا Mosqueira وآخرون [41] تحضير جسيمات الـ PLA-PEG النانوية، بطول سلسلة ومحتوى من الـ PEG متغير. وقد وصف هافلي وآخرون [3] دمج المغنيتيت في جسيمات الـ PLA أو الـ PLGA فقط؛ لذا يجب علينا أن نفهم كيف يؤثر المغنيتيت على الحجم والكيمياء للكرات القابلة للتحلل الحيوي، وخاصة الكرات الأقل من الميكرون.



الشكل رقم (١٣,٣). كرات بولي (حمض اللاكتيك) الميكروية. لاحظ التفاوت في قطر الكرة.

١٣,٤,١,٤ المستقبلات السطحية Surface Receptors

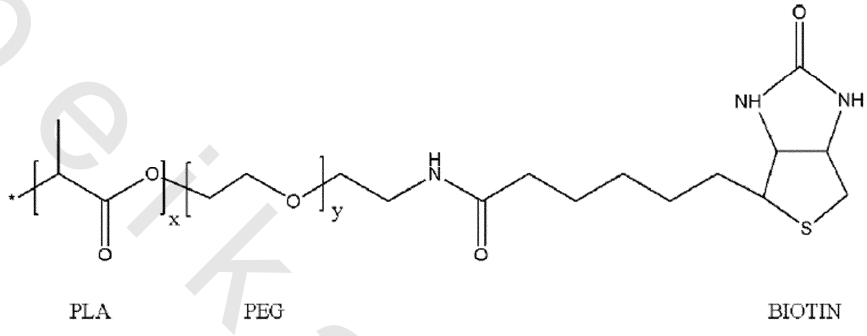
يجب أن تمتلك الكرات النانوية (i) مساحة سطحية كبيرة، ومواقع وظيفية سطحية لربط المستقبلات السطحية، مثل (الأجسام المضادة، وعوامل التخالب

للنويدات المشعة، أو ليجاندات للسموم الكيميائية) بعدد كافٍ؛ لتخفيض أو لإزالة تركيز السموم تماماً من الدم. (ii) تحديد موضع مثل هذه المستقبلات السطحية، حيث يمكنها التفاعل بسهولة مع الدم، ولكن لا تُسهِّل امتصاص البروتين على سطح الجسيمات. يرتبط المعيار الأول بتصميم حجم الكرة النانوية؛ نظراً لارتباط قطر الجسيم أساساً بالمساحة السطحية. ونقدم مثالاً عاماً على تقدير كثافة موقع مستقبل الهدف. ولمحاكاة عامل التعرض لعصيات الجمرة الخبيثة الفئة A، نحقن ٠,٦ ميكروجرام من العامل القاتل (LF) في الجرذان (٣٠٠ جرام وزن، ٢٥ مل حجم الدم)، والذي يؤدي إلى تركيز الدم LF من ٢٤ نانوجراما مل$^{-١}$ أو ٧,٥ بيكومول pmol لكل جرذ (وزن جزيئي٨٠–٩٠ كيلو دالتون). واستخدمنا في مختبرنا كرات نانوية لها سعة مستقبل سطح على الأقل ١ ميكرومكافئ ملجم$^{-١}$ أو ١ ميكرومول ملجم$^{-١}$ لليجاندات أحادية التكافؤ، ومن ثم فإن الحقن المتوقع لـ١٠ ملجم من جزيئات النانوية في الجرذان، سيكون لديها سعة لمنع إعاقة فراغية ١٠ ميكرومول. وهذه القيمة تكون في حدود مليون($١٠^{٦}$) مرة أكبر من السعة النظرية الضرورية اللازمة لربط السم LF كمياً في الدم. وبافتراض أن الإعاقة الفراغية المقدمة بالبروتين LF ٨٠ إلى ٩٠ كيلو دالتون (صور مسقّطة قطرها ١٥ نانومتر) على جسيمات نانوية مغناطيسية بحجم ٤٠٠ نانومتر (حقن ١٠ ملجم)، فيمكننا أن نتوقع سعة ترابط لبروتين LF، تساوي ٠,٧ نانومول– ما زال العامل ١٠٠ أكبر من اللازم للإزالة الكمية لـ LF من الدم؛ ولذلك يكون الهدف الحفاظ على هذا النظام من كثافة موقع المستقبل (١ ميكرومكافيء ملجم$^{-١}$) أثناء تشييد الكرات النانوية القابلة للتحلل من بوليمرات مشتركة أساسها الـ PEG.

وهناك خياران لربط الأجسام المضادة أو الليجاندات المخلبية إلى السطح: (i) ربطها مباشرة إلى سطح الجسيم باستخدام مجموعات وظيفية قصيرة السلسلة، مثل جسور الكربوكسيل والأيبوكسي. (ii) ربطها إلى البولي إثيلين جلايكول PEG، أو

سلاسل مشتقات البولي إثيلين جلايكول PEG الممتدة على سطح الجسيم. إن أوجه القصور في الإجراء الأول، هي أن مجموعات المستقبل قد تكون معاقة فراغياً من مواجهة السموم الموجودة في المحلول؛ نتيجة لتجاور سلاسل البولي إثيلين جلايكول PEG الطويلة. كذلك وبما أن المستقبلات ستكون مرتبطة مباشرة إلى السطح، فإنها ستتنافس مع بوليمرات الإثيلين جلايكول PEGs لتغطية السطح. ويحدد هذا الشرط أصلاً الكثافة السطحية للبولي إثيلين جلايكول PEG ، ويسهل عملية التغليف؛ لتسهيل البلعمة والإزالة البلعمية للكرات النانوية داخل الجسم؛ ولذا يبدو الخيار (ii) الاختيار الأكثر ملاءمة. ولقد ثبت من خلال أبحاثنا وأبحاث الآخرين، أن المجموعات الطرفية لسلاسل البولي إثيلين جلايكول PEG، يمكننا تنشيطها وربطها تساهمياً إلى مجموعات وظيفية أخرى. وقد أظهرت أبحاثنا أننا يمكنا أن نربط الأستربتافيدين بالمجموعات الطرفية للبولي إثيلين جلايكول PEG (٣٠٠ و ٢٠٠٠ دالتون). وعلى أية حال، نعتقد أنه قد يكون من الصعب سد النهايات النشطة للبولي إثيلين جلايكول PEG تماماً أثناء خطوة الارتباط بالمستقبل. وقد يؤدي هذا إلى سطح مشحون ومغلف؛ وزيادة تسهيل البلعمة. وبدلاً من ذلك، نتبع الطريقة التي استخدمت بوليمر مشترك الوحدة لصنع كرات نانوية، مثل (البولي إثيلين جلايكول- البولي حمض اللاكتيك PLA-PEG)، التي تحتوي على مجموعة طرفية مناسبة للارتباط المباشر بالمستقبل. وعلى سبيل المثال، شيدنا البوليمر المشترك بيوتين- بولي إثيلين جلايكول PEG- بولي حمض اللاكتيك-PLA (الشكل رقم ١٣,٤)، اعتماداً على طريقة سالم Salem وآخرين [42]. وتم ربط الأستربتافيدين بعد التحضين في محلول صاد [43]، وبالمثل يمكن ربط الأجسام المضادة ذات البيوتين مباشرة إلى الأستربتافيدين [44] ، أو أثناء تشييد بوليمر مشترك الوحدة، من خلال استبدال الجسم المضاد ذي البيوتين للبيوتين. وعلى الرغم من أن الدراسات الأولية واعدة، فما تزال هناك قيود

تحتاج إلى معالجة، بما في ذلك كفاءة ترافق الأجسام المضادة، وتأثير ترافق بوليمرات الإثيلين جلايكول PEGs على دوران الكرات النانوية داخل الجسم.



الشكل رقم (١٣,٤). بوليمر مشترك الوحدة قابل للتحلل الحيوي بمجموعة طرفية ذات بيوتين.

إن النظام النموذجي الذي شرحناه في التجارب الأولية، هو زوج الأستربتافيدين- البيوتين. وعلى أية حال، يوفر هذا النظام الحد الأدنى في تحديد أزمنة المكوث اللازمة لتدفق الكرات النانوية، (أي مقدار الزمن، أو حجوم الدم التي يجب أن تُعرّض للكرات النانوية؛ لضمان إزالة السموم). وسيركز نظام المتابعة في البحث اللاحق على الأنظمة الأكثر واقعية، التي تعرض ثوابت ترابط أضعف. وستقدم أنظمة جسم مضاد- مستضد هذه توقعا واقعيا لهذا النظام، اعتماداً على كثافات موقع المستقبل المُتممّة والبقاء الوعائي؛ ولذلك فإن الهدف، هو تحديد ما إذا كان من الممكن تمييز الجسيمات النانوية المغناطيسية المرشحة (المنتخبة) وظيفياً بأجسام مرشحها المضادة الخاصة أم لا، وتبقى كفاءة أسر (احتجاز) الجسم المضاد- المستضد مستقرة عند تطبيقها على ظروف الحيوانات الحية، وهذا من شأنه ضمان إمكانية إزالة السموم والمستضد من دم الحيوان.

إن الأمر المتأصل مع التحدي البحثي لكثافة موقع المستقبل، يتمثل في تحديد مدى ملاءمة الأجسام المضادة الحالية لتحقيق أقصى قدر من الكثافة السطحية.

والأجسام المضادة عبارة عن جزيئات كبيرة جداً (من عشرات إلى مئات الكيلو دالتون)، ولكن مكوناتها النشطة يمكن أن تكون صغيرة جداً. وبالتالي يكون من المهم التقييم كمياً ما إذا كانت شظايا الأجسام المضادة يمكنها تحسين كثافة موقع المستقبل القابلة للتحقيق (نتيجة للتأثيرات الفراغية)، مع المحافظة على خصوصيته واستقراره. وبعبارة أخرى، فإن تطوير تقنية يمكن الاعتماد عليها لتطوير مستقبلات للتطبيق المستقبلي؛ لتقنية الجسيمات النانوية يعد أمرا بالغ الأهمية، وشرطاً إلزامياً لتحقيق الأمثلية لكثافة المستقبل (أي تحقيق أقصى حد لسعة المستقبل، مع تقليل التغليف لتسهيل البلعمة، وخطر الابتلاع لأدنى حد). والأهم، فمن المحتمل أن تكون تلك المحاولة لتحسين سعة المستقبل بالأجسام المضادة التقليدية غير مفيدة؛ نظراً لعدم إمكانية صنع النظام بالأجسام المضادة التقليدية. ومن المعقول أن التخفيض في حجم الجسم المضاد أو الشظية اللازمة لتحقيق الترابط الانتقائي بالسم، يُحسّن ناتج تصنيع الأجسام المضادة.

السمة المهمة من التقنية المقترحة، هي إمكانية الارتباط العام لتشكيلة من مضادات السموم إلى ركيزة الجسيمات النانوية. وعلى سبيل المثال، فمن خلال اقتران الاستربتافيدين إلى مجموعات طرفية من بوليمرات الإثيلين جلايكول PEGs، يمتلك المرء طريقة عامة لربط الأجسام المضادة ذوات البيوتين إلى سطح الجسيمات النانوية. ونسعى لوصف طرائق ارتباط عام لليجاندات سموم كيميائية وسموم إشعاعية، ونركز بدايةً على مستقبل الأستربتافيدين لأهداف ذوات البيوتين. وسيتم نقل التصاميم الناجحة من نظام عزل بروتين ذي البيوتين- الأستربتافيدين إلى نظام مستضد، الجسم المضاد ذو البيتوين الأكثر واقعية؛ لتحديد حركية الربط داخل الجسم وخارجه. وإذا تم الحصول على نتائج مشجعة، فسوف نختبر قدرة الكرات النانوية المغناطيسية على استنفاذ المستضدات في المخاليط المعقدة، مثل دم الجرذان. والنتائج الإيجابية تعمل

كمقدمة لتطوير نماذج حيوانية، كجزء من الاختبار اللاحق. ونلاحظ نجاح شكاكار Sakhalkar وآخرين [44] في ربط انتقائي لأهداف داخل الجسم، مع تركيب كرات نانوية مماثلة.

١٣,٤,٢ الترشيح المغناطيسي للكرات النانوية المغناطيسية المرتبطة بالسم

Magnetic Filtration of Toxin-Bound Magnetic Nanospheres

لقد صممنا وحدة ترشيح مغناطيسي خارج الجسم- نظام قسطرة خارجي صغير- والتي (i) تسمح بدوران الدم يشبه الديلزة خلال أنابيب محددة جيداً، أو نظام قنوات ميكروية، حتى لا تولد جلطات دم أو تُحدث تخثراً. (ii) ستسمح بالإزالة الكمية للكرات النانوية المرتبطة بالسموم من الدورة الدموية بحرية، عن طريق تطبيق المغناطيسات الدائمة المحمولة باليد. (iii) يمكن حملها بسهولة وتطبيقها في الميدان، (أي الجهاز بكامل محمول باليد).(iv) مصمم للتشغيل من قِبل أفراد غير طبيين أو مساعدي طبيب متدربين، (وسيتم تطوير كل التصاميم).

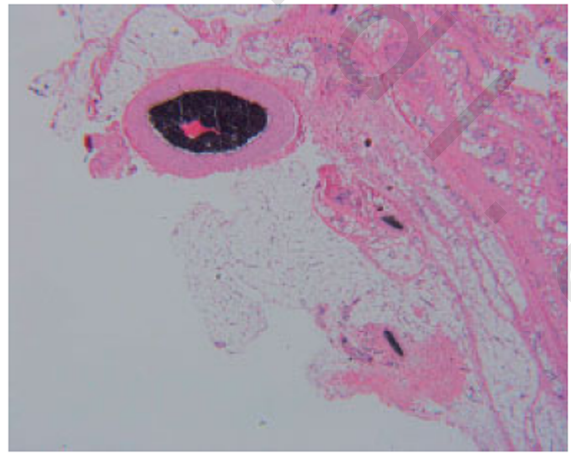
إن المعرفة الحالية لأجهزة نضح الدم وتدفقه كافية لتطوير مثل جهاز الترشيح هذا بدون اكتشاف علمي إضافي. ويقدم بحثنا الخاص دليلاً على ترشيح الجسيم في تيار دم عالي السرعة، باستخدام مغناطيس دائم صغير (الشكل رقم ١٣,٥). وبالتالي فسلسلة من التجارب المدبرة بعناية تستخدم التقنية الحالية، يجب أن تكون ناجحة لإنتاج الجهاز. ومن المتوقع أن يعتمد الجهاز على:

١-القدرة على فصل الجسيمات بنجاح من الدم. ويتطلب هذا مجالا مغناطيسيا كافياً؛ لسحب الجسيمات نحو الجدار، واحتجازها هناك تحت تدفق القص.

٢-ستكون هناك حاجة لمعدل تدفق على الأقل ١٠٠-٢٠٠ مل دقيقة$^{-1}$؛ لتطهير الجسم الكلي. ويمكن الحصول بسهولة على معدلات تدفق أقل من ثقب كبير وريدي في مستوى منتصف الذراع، وأي مضخة سيفون (ممص) يدوية بسيطة،

ستضمن معدل تدفق مضبوط (مناسب). ويتم تحقيق معدلات التدفق الأعلى من إجراء ثقب شرياني فخذي عموماً بإبرة ثنائية الثقب [تجويف ثنائي (مصب ومخرج التدفق)، يتفادى قسطرة تثقب الأوعية الدموية مرة ثانية]. وينبغي أن يكون الشخص الفني المدرب قادرًا على تنفيذ مثل هذا الإجراء.

٣-منع تخثر الدم موضعياً في غرفة النضح، بإذابة الهيبارين من جدران الأنابيب في السوائل المتدفقة، والتي ينبغي أن تتيح منع تخثر الدم موضعياً بشكل كافٍ، وبدون حثه نظامياً. وستبقى معدلات القص والإجهاد (التوتر) في المستويات المتوافقة بتقليل كل من تشكيل الجلطة وتخثر الدم في تصميم المجال المغناطيسي، بحيث تكون إزالة الجسيمات أو "الترشيح" كميّة وعالية الكفاءة، وتصغير طول الجهاز وحجمه ووزنه. وسيتضمن التصميم جهازاً لترشيح الجلطة عند منفذ عودة الدم.



الشكل رقم (١٣,٥). باثولوجيا (علم أمراض) الجسيمات المغناطيسية (الأسود، حجم القمة = ١٠٥ سم ث$^{-1}$) باستخدام مغناطيس دائم ٢٠ ملم موضوع على بعد ٨-١٠ ملم من الشريان.

تعتمد سمات التصميم الأخرى على الدراسات المستقبلية، باستخدام نموذج غرفة المجال المغناطيسي الأولي. وبالتأكيد ستختلف الخواص الفيزيائية المتأصلة كل الاختلاف عن جهاز الترشيح المغناطيسي اللازم لاستيعاب مختلف التطبيقات الطبية الحيوية وتطبيقات المُستخدِم ولا يمكن توقع خصائص التصميم هذه مسبقاً على أساس نظري بحت. ومع ذلك ستصبح النمذجة الواقعية لإستراتيجيات التصميم المستقبلية المتنوعة ممكنة، إذا تم توصيف النموذج الأولي لجهاز الفصل، واختبار أدائه في الحيوانات الحية والمتطوعين الأصحاء. ومن ثم يمكن الإجابة على الأسئلة الإستراتيجية المهمة عن التصميم بشكل كافٍ، والأمثلة على ذلك كما يلي:

١- ما أساليب النفوذ الوعائية الأكثر جدوى (شرياني، ثنائي وريدي، وريدي؟) والموقع: (المرفقية، العضدية، الفخذية؟) لاستخدام سهل وسريع (ذاتي مقابل مساعد؟)

٢- ما القسطرة المثلى (وحيد مقابل التجويف الثنائي، حجم إدخال القنية (الإقناء)؟) ونظام أنابيب (التغليف، والمرونة، ونظام المرشح، التفرع؟)؛ لسريان الدم دون عائق، ولتفادي تجلط الدم؟

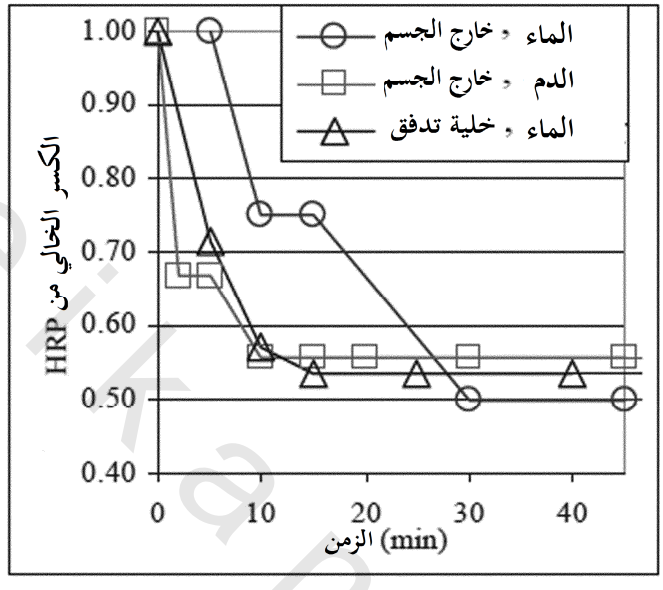
٣- ما تصميم الجهاز المغناطيسي الأكثر ملاءمة (مغناطيس واحد/ وحدة قسطرة أو "الأداة الإضافية على" تصميم الأنابيب؟)، والذي يسمح بتثبيت وقابلية نقل سهلة؟

وسيتم تصميم نموذجنا الأول لنظام إزالة السموم لاستعمال منفذ وريدي آمن وعملي في مناطق منتصف الذراع الداخلية (المرفقية)، لإنسان معرض عن طريق إدخال إبرة ثنائية التجويف (تطبيق شخصي أو بمساعد) عيار ١٤ 14-gauge، التي يمكن أن يؤديها بسهولة من قِبل أفراد متدربين غير طبيين. وباستخدام هذا المنهج، وتقدير دقيق لمعدلات تدفق الدم العملية المنخفضة في حوالي ٤٠ مل دقيقة[-١]،

سيسمح بدوران دم الجسم الكلي (المقدر بـ ٦ لتر) ، مع إزالة السموم في حوالي ١٥٠ دقيقة. وستسمح تغييرات (اختلافات) هذا المنهج بإزالة أسرع للسموم – على سبيل المثال– يمكن أن يخفض منفذ إبرة شريان فخذي تطبيقي مساعد في موقع الأربية groin زمن الإزالة بمعامل من ٨–١٠ ، وترسيخ تصفية (تطهير) الدم خلال ١٥ دقيقة تقريباً. ويمكن أن تفرض إستراتيجيات تصميم الجهاز والمنفذ الوعائي الأكثر تعقيداً، عندما يتم التعامل مع البشر المعرضين في الوحدات الطبية أو المستشفيات.

١٣,٥ التقدم التقني Technical Progress

هذا البرنامج في مراحله الأولى، ونحن نسعى لإثبات صحة مبدأ التجارب. ويجرى عزل الإنزيم ذي البيوتين خارج الجسم من سوائل بسيطة ودم الجرذان الكامل تحت ظروف التدفق الديناميكي (الديناميي) والساكن. وكانت الجسيمات مكونة من ماجيميت بلوري نانوي (γ-Fe_2O_3)، مغلفة في كرات البولي سترين النانوية. وتم اختبار العديد من التغيّرات، بما في ذلك أطوال البولي إثيلين جلايكول PEG المتنوعة (بوزن جزيئي من ٣٣٠–٦٠٠٠)، وحجوم الجسيم (٢٥٠–٣٠٠٠ نانومتر). وكان المستقبل النموذجي الأستربتافيدين، إما مرتبطاً بمجموعة طرفية كربوكسيلية للبولي إثيلين جلايكول PEG وإما مرتبطاً مباشرة بسطح الجسيم النانوي. واستخدم بيروكسيديز الفجل (HRP) ذي البيوتين كنموذج "للسم". وتشير النتائج (الشكل رقم ١٣,٦) إلى تخفيض الإنزيم الحر إلى مستويات بحد أقصى ٥٠٪ تقريباً في الدم في كل الاختبارات، وتم الوصول إلى حالة الاتزان في غضون ٢٠–٣٠ دقيقة. ولقد حققنا مؤخراً فصل بيروكسيديز الفجل HRP ذي البيوتين بنسبة ٧٢٪ من محلول ملحي في دم جرذ كامل، تم تمييعه مسبقاً [43].

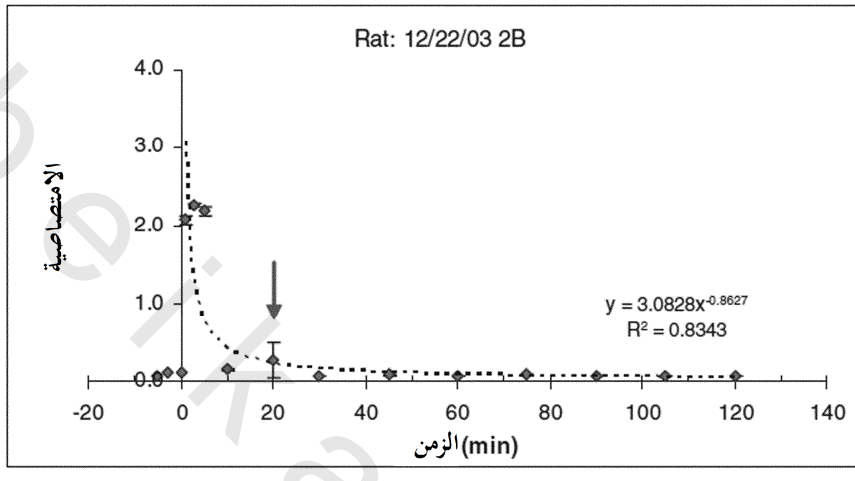


الشكل رقم (١٣,٦). مستويات "سم" بيروكسيديز الفجل (HRP) في الماء والدم بعد حقن بيروكسيديز الفجل HRP والكرات النانوية.

لقد شيدنا كرات أستربتافيدين- بيوتين- بولي إثيلين جلايكول PEG- بولي حمض اللاكتيك PLA ميكروية ونانوية قابلة للتحلل الحيوي، وحققنا فصل بيروكسيديز الفجل HRP ذي البيوتين، بنسبة تصل إلى ٤٢٪ من محلول ملحي طبيعي (٠,٢٥ ملجم كرات نانوية لكل مل من دم الجرذ المُميَّع مسبقاً، ٠,٣٧٥ ميكروجرام بيروكسيديز الفجل HRP مل$^{-١}$ دم [43]). إن شحنة السطح تكون متعادلة في الرقم الهيدروجيني من ٤ إلى ٩؛ مما يجعلها من الرتبة الأولى، ومناسبة للتجارب داخل الجسم. وقد غلفنا الرودامين-B rhodamine-B، وقمنا بقياس حدود الكشف في دم الجرذ الكامل، فوجدنا أن مستويات الإشارة إلى الضوضاء مناسبة للتكميم.

تتضمن التجارب داخل الجسم المؤداة على فئران مولدة منعزلة (متقاعدة) (i) تصميم حلقة مغلقة، ووحدة إعادة دوران للدم قابلة لضبط التدفق، تسمح بدوران الدم والعيننة (أخذ العينات) على مدى عدة ساعات في الحيوان الحي. (ii) الدراسات الحركية لعدة كرات نانوية مغناطيسية مرشحة، والسموم. (iii) تجارب الترشيح المغناطيسية الأولى. وفي التحقيقات الأخيرة، تم تحقيق دوران دم خارج الجسم مستمر عن طريق إقناء الشريان السباتي– الوداجي، ودعم المضخة الخارجية بترشيح الكرات النانوية المغناطيسية، باستخدام أنابيب حلقية مغلقة بقطر ١ ملم، ومغناطيس NdFeB وحيد (٠,٤ تسلا عند السطح، وقطر ١٨ مم) (الشكل رقم ١٣,٧). ورصدت تجارب النموذج الإجرائي عمر النصف ($t_{1/2}$) لدوران بيروكسيديز الفجل HRP ذي البيوتين في نموذج الجرذ (الشكل رقم ١٣,٨)، وتبين انخفاض مستويات بيروكسيديز الفجل HRP على الفور ($t_{1/2}$= ١٥–٢٠ دقيقة)، وأن أي علامة دوران أطول ستكون مفيدة. وما تزال النتائج التجريبية على عزل السموم وعلم أمراض الجرذان معلقة.

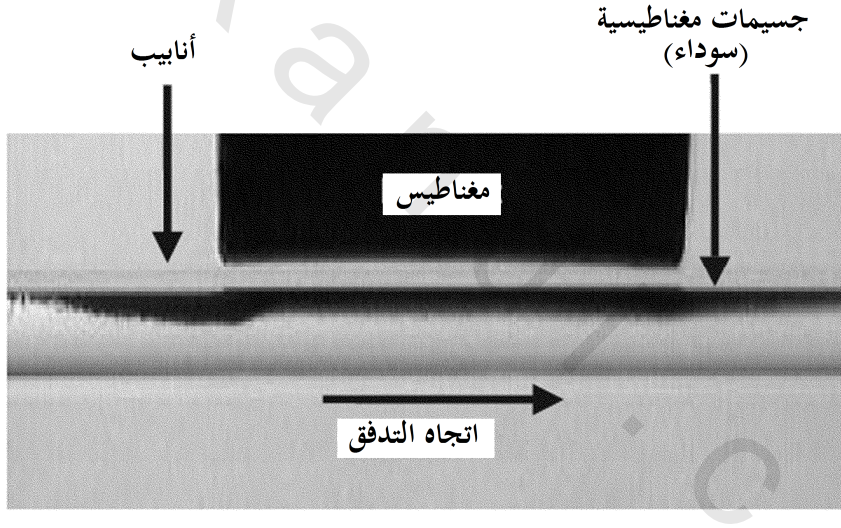
الشكل رقم (١٣,٧). دوران الدم المستمر خارج الجسم في الجرذ.



الشكل رقم (١٣,٨). إزالة بيروكسيديز الفجل HRP ذي البيوتين في نموذج الجرذ خلال الدوران الطبيعي [34].

ومن أجل تطوير المرشح المغناطيسي، استخدمنا ديناميكا الموائع الحسابية، ونماذج المجال المغناطيسي الحسابية المطورة من قِبل وزارة الطاقة للتنبؤ بكفاءة أسر (احتجاز) الجسيمات الميكروية المغناطيسية المارة خلال منحنى المجال المغناطيسي البسيط. ويوفر هذا التصميم الحالة الأبسط لتصميم مرشح (الشكل رقم ١٣,٩)، وتوضح أن الكرات الميكروية بقطر متوسط ٧ ميكرومتر (مغنطة نوعية = ٢٠ وحدة إلكترومغناطيسية /جم)، يمكن أن تفصل بكفاءة تصل إلى ٥٠٪ ، بتمرير (باجتياز) واحد في قناة ٢×٢ ملم. ويتنبأ النموذج أيضاً بأن تغيير ١ ميكرومتر في قطر الجسيم، يعطي تغييرا في كفاءة الأسر يصل إلى ١٠٪. وإذا افترضنا بأننا لا نستطيع تحقيق زيادة كبيرة في المجال المغناطيسي المحيط، وانحدارات المجال عبر مقطع صغير من الأنبوب، إذًا يجب علينا تصميم مرشح ذي ثلاثة اعتبارات من أجل تحقيق أسر >٩٩٪ من الكرات النانوية الدوارة (قطر ١٠٠–٢٠٠ نانومتر) بتمرير واحد. أولاً: يجب تخفيض قطر

الأنبوب لتقليل طول المسار النصف قطري (المسار الشعاعي) (بفرض أنابيب مستديرة)، والذي يجب أن تجتازه الكرات للوصول إلى جدار الأنبوب. إن قطر الأنبوب المخفض، ينتج زيادة مصاحبة في سرعة التدفق. ولتخفيض سرعة التدفق، يجب علينا زيادة عدد الأنابيب ثانية في المرشح؛ لخلق حزمة من الأنابيب الصغيرة. وأخيراً، نستطيع تصميم مثل هذا المرشح، الذي تمر فيه الأنابيب مرات متعددة خلال المجال المغناطيسي. وسيتم نمذجة (صياغة) مميزات التصميم هذا ومقارنتها إلى التجارب.



الشكل رقم (١٣,٩). أسر مغناطيسي لجسيمات مغناطيسية ميكروية في أنبوب تحت التدفق الطبقي (الصفحي) (مغناطيس NdFeB، ٠.٤ تسلا عند السطح، وسرعة السائل الملحي = ٤٠ سم ث$^{-1}$).

References المراجع

1 S. S. Davis, Biomedical applications of nanotechnology–implications for drug targeting and gene therapy, *Trends in Biotechnology* 1997, 15, 217–224.

2 S. J. Douglas, S. S. Davis, L. Illum, Nano-particles in drug delivery, CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1987, 3, 233–261.

3 U. O. Häfeli, S. M. Sweeney, B. A. Beresford, E. H. Sim, R. M. Macklis, Magnetically directed poly(lactic acid) 90Y-microcapsules: novel agents for targeted intracavitary radiotherapy, *Journal of Biomedical Materials Research*, 1994, 28, 901–908.

4 A.S. Lübbe, C. Bergemann, W. Huhnt, T. Fricke, H. Riess, J. W. Brock, D. Huhn, Clinical experiences with magnetic drug targeting: a phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors, *Cancer Research*, 1996, 56, 4694–4701.

5 H. Yoshioka, Surface modification of haemoglobin- containing liposomes with polyethylene glycol prevents liposome aggregation in blood plasma, *Biomaterials*, 1991, 12, 861–864.

6 J.D. Slack, M. Kanke, G. H. Simmons, P. P. DeLuca, Acute hemodynamic effects and blood pool kinetics of polystyrene microspheres following intravenous administration, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1981,70, 660–664.

7 Y.-P. Li, Y. Y. Pei, X. Y. Zhang, Z. H. Gu, Z. H. Zhou, W. F. Yuan, J. J. Zhou, J. H. Zhu, X. J. Gao, PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats, *Journal of Controlled Release*, 2001, 71, 203–211.

8 R. Gref, Y. Minamitake, T. M. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin, R. Langer, Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres, *Science*, 1994, 263, 1600–1603.

9 S.K. Huang, E. Mayhew, S. Gilani, D. D. Lasic, F. J. Martin, D. Papahadjopoulos, Pharmacokinetics and therapeutics of sterically stabilized liposomes in mice bearing C-26 colon carcinoima, *Cancer Research*, 1992, 52, 6774–6781.

10 T. M. Allen, C. B.Hansen, D. E. L. Demenezes, Pharmacokinetics of long-circulating liposomes, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1995, 16, 267–284.

11 T. M. Allen, E. H. Moase, Therapeutic opportunities for targeted liposomal drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1996, 21, 117–133.

12 S. E. Dunn, A. Brindley, S. S. Davis, M. C. Davies, L. Illum, Polystyrene-poly(ethylene glycol) (PS-PEG2000) particles as model systems for site specific drug delivery. 2. The effect of PEG surface density on the in vitro cell interaction and in vivo biodistribution, *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1016–1022.

13 T. Yamaoka, Y. Tabata, Y. Ikada, Comparison of body distribution of poly(vinyl alcohol) with other water-soluble polymers after intravenous administration, *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1995, 47, 479.

14 R. Arshady and M. Monshipouri, Targeted delivery of microparticulate carriers, in R. Arshady (ed.) Microspheres microcapsules and liposomes, vol. 2, London, Citus Books, 1999, pp. 403–432.

15 U. O. Häfeli and G. J. Pauer, In vitro and in vivo toxicity of magnetic microspheres, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 1999, 194, 76–82.
16 B. Erbas, M. T. Ercan, B. Caner, Biodistribution and localization of radiolabeled microparticles, in R. Arshady (ed.) Microspheres Microcapsules and Liposomes Series, vol. 3, London, Citus Books, 2001, pp. 249–280.
17 E. Okon, D. Pouliquen, P. Okon, Z. V. Kovaleva, T. P. Stepanova, S. G. Lavit, B. N. Kudryavtsev, P. Jallet, Biodegradation of magnetite dextran nanoparticles in the rat – a histologic and biophysical study, *Laboratory Investigation*, 1994, 71, 895–903.
18 D. Pouliquen, J. J. Le Jeune, R. Perdrisot, A. Ermias, P. Jallet, Iron oxide nano-particles for use as an MRI contrast agent: pharmacokinetics and metabolism, *Magnetic Resonance Imaging*, 1991, 9, 275–283.
19 Z. Tang, H. T. Karnes, Heterogeneous postcolumn immunoreaction detection using magnetized beads and a laboratory-constructed electromagnetic separator, *Biomedical Chromatography*, 2003, 17, 118–125.
20 G. A. Martin-Henao, M. Picon, B. Amill, S. Querol, J. R. Gonzalez, C. Martinez, R. Martino, C. Ferra, S. Brunet, A. Granena, J. Sierra, J. Garcia, Isolation of CD34+ progenitor cells from peripheral blood by use of an automated immunomagnetic selection system: factors affecting the results, *Transfusion*, 2000, 40, 35–43.
21 M. Berger, J. Castelino, R. Huang, M. Shah, R. H. Austin, Design of a microfabricated magnetic cell separator, *Electrophoresis*, 2001, 22, 3883–3892.
22 L. Sun, M. Zborowski, L. R. Moore, J. J. Chalmers, Continuous, flow-through immunomagnetic cell sorting in a quadrupole field, *Cytometry*, 1998, 33, 469–475.
23 A. J. Richards, O. S. Roath, R. J. Smith, J. H. Watson, High purity, recovery, and selection of human blood cells with a novel high gradient magnetic separator, *Journal of Hematotherapy*, 1996, 5, 415–426.
24 M. Downbrow (ed.), Microcapsules and nano-particles in medicine and pharmacy, Boca Raton, CRC Press, 1992.
25 R. Arshady (ed.), Microspheres, microcapsules, and liposomes, Vol. 1–3, London, Citus Books, 1999.
26 U. Edlund, A. C. Albertsson, Degradable polymer microsphere for controlled drug delivery, *Advances in Polymer Science*, 2002, 157, 67–112.
27 R. Gref, Surface-engineered nano-particles as drug carriers, in M.-I. Baraton (ed.) Synthesis, functionalization and surface treatment of nano-particles, Stevenson Ranch, CA, *American Scientific Publishers*, 2003, 234–257.
28 U. O. Hafeli, W. Schutt, J. Teller, and M. Zborowski, Scientific and clinical applications of magnetic carriers, New York, Plenum Press, 1997.
29 M. D. Kaminski, A. Ghebremeskel, L. Nunez, K. Kasza, F. Chang, T. Chien, P. Fischer, J. Eastman, A. J. Rosengart, R. L. McDonald, Y. Xie, L. M. Johns, P. Pytel, U. O. Hafeli, Magnetically responsive microparticles for targeted drug and radionuclide delivery: a review of recent progress and future challenges, Argonne National Laboratory Report ANL-03/28, 2003.

30 A. Brindley, M. C. Davies, R. A. P. Lynn, S. S. Davis, J. Hearn, J. F. Watts, The surface characterization of model charged and sterically stabilized polymer colloids by SSIMS and XPS, *Polymer*, 1992, 33, 1112–1115.
31 R. Duncan and J. Kopecek, Soluble synthetic polymers as potential drug carriers, *Advances in Polymer Science*, 1984, 57, 51–101.
32 S. N. J. Pang, Final report on the safety assessment of polyethylene glycols (PEGs)-6, -8, -32, -75, -150, 14M, -20M, *Journal of the American College of Toxicology*, 1993, 12, 429–457.
33 S. Dreborg, and E. B. Akerblom, Immunotherapy with monomethoxypoly-ethylene glycol modified allergens, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 6, 315–365.
34 J. Harris, Laboratory synthesis of polyethylene glycol derivatives, *Journal of Macromolecular Science, Part C–Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics*, 1985, C25, 325–373.
35 S. I. Jeon and J. D. Andrade, Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide: II. Effect of protein size, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1991, 142, 159–166.
36 V. P. Torchilin and V. S. Trubetskoy, Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating?, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1995, 16, 141–155.
37 V. P. Torchilin, V. G. Omelyanenko, M. I. Papisov, A. A. Bogbanov Jr., V. S. Trubetskoy, J. N. Herron, C. A. Gentry, Poly(ethylene glycol) on the liposome surface: on the mechanism of polymer-coated liposome longevity, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1994, 1195, 11–20.
38 I. Szleifer, Protein adsorption on surfaces with grafted polymers: a theoretical approach, *Biophysical Journal*, 1997, 72, 595–612.
39 T. M. Allen, C. Hansen, F. Martin, C. Redemann, A. Yau-Young, Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1991, 1066, 29–36.
40 R. Gref, A. Domb, P. Quellec, T. Blunk, R. H. Muller, J. M. Verbavatz, R. Langer, The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nano-spheres, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1995, 16, 215–233.
41 V. C. F. Mosqueira, P. Legrand, J. L. Morgat, M. Vert, E. Mysiakine, R. Gref, J. P. Devissaguet, G. Barratt, Biodistribution of long-circulating PEG-grafted nanocapsules in mice: effects of PEG chain length and density, *Pharmaceutical Research*, 2001, 18, 1411–1419.
42 A. K. Salem, S. M. Cannizzaro, M. C. Davies, S. J. B. Tendler, C. J. Roberts, P. M. Williams, K. M. Shakesheff, Synthesis and characterization of a degradable poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) copolymer with biotinylatedend groups, *Biomacromolecules*, 2001, 2, 575–580.
43 C. J. Mertz, M. D. Kaminski, Y. Xie, M. R. Finck, S. G. Guy, A.J. Rosengart, In vitro studies of functionalized magnetic nano-spheres for selective removal of a

stimulant biotoxin, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, accepted August 2004.

44 H. S. Sakhalkar, M. K. Dalal, A. K. Salem, R. Ansari, J. Fu, M. F. Kiani, D. T. Kurjiaka, J. Hanes, K. M. Shakesheff, D. J. Goetz, Leukocyte-inspired biodegradable particles that selectively and avidly adhere to inflamed endothelium in vitro and in vivo, *Proceedings of the National Academy of Scinces of the United States of America*, 2003, 100, 15895–15900.

obeikandl.com