



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
**Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών**

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
Εργαστήριο Φαρμακευτικής Τεχνολογίας

**Φαρμακευτική Νανοτεχνολογία: Μελέτη της
μορφολογίας χιμαιρικών συστημάτων
μεταφοράς φαρμακομορίων**

Αναστασία – Γεωργία Πίππα
Φαρμακοποιός, MSc

Αθήνα 2015

Αφιερώνεται με πολλή αγάπη στην οικογένειά μου,

Στους γονείς μου, Γιάννη και Νάντια

Και στην αδερφή μου, Ευαγγελία

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή κ. **Κωνσταντίνο Δεμέτσο**, καθηγητή Φαρμακευτικής Νανο-Τεχνολογίας στον οποίο χρωστώ την διαμόρφωση της επιστημονικής μου σκέψης και τη μύση μου στο χώρο της Φαρμακευτικής Νανοτεχνολογίας μέσα από τις πολυάριθμες γνώσεις που μου μετέδωσε, από τις προπτυχιακές σπουδές μου μέχρι και σήμερα. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την αδιάκοπη προσπάθειά του να με διδάσκει ως επιστήμονας και άνθρωπος, για το χρόνο που μου αφιέρωσε και τη συνεχή διάθεση να βρίσκεται δίπλα μου σε κάθε βήμα των σπουδών μου, σε κάθε δύσκολη απόφαση και σταυροδρόμι και να εγγυάται ότι «όλα θα πάνε καλά στο τέλος». *Τον ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ ΠΟΛΥ γιατί αποτελεί το σημείο εκκίνησης κάθε στόχου!*

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον Ερευνητή Α' του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ), κ. **Στέργιο Πίσπα**, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για την καθοριστική συμβολή του στην παρούσα διδακτορική διατριβή. Οι πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσε - στην άγνωστη μέχρι λίγα χρόνια - Επιστήμη των Πολυμερών, καθώς και η καθημερινή καθοδήγησή, η αμέριστη υποστήριξη και η πολύτιμη βοήθειά του δίδονταν πάντα με πολλή ευχάριστη διάθεση στο μέγιστο βαθμό. Επίσης, τον ευχαριστώ ιδιαίτερα γιατί σε μία εξαιρετικά δύσκολη εποχή εξασφάλισε τη χρηματοδότηση μου, μέσα από το ερευνητικό πρόγραμμα Nanomacro (στο οποίο είναι επιστημονικός υπεύθυνος) σε όλη τη διάρκεια της παρούσας διδακτορικής διατριβής. *Τον ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ ΠΟΛΥ!*

Ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή **Αριστείδη Δουκομετζίδη**, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για την καθοδήγησή του, τις πολύτιμες γνώσεις του και τη βοήθειά του στη διεξαγωγή της παρούσας διατριβής. Η συνεισφορά του ήταν καθοριστική στις μελέτες της μαθηματικής μονταολοποίησης και τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την πολύτιμη συμβολή του στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή της Φαρμακευτικής Πατρών κ. **Κωνσταντίνο Αυγουστάκη**, της Επίκουρη Καθηγήτρια της Φαρμακευτικής Αθηνών κ. **Μαριλένα Βλάχου-Κωνσταντινίδη**, τον καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. **Ερμή Ιατρού** και τον Επίκουρο Καθηγητή της Φαρμακευτικής Θεσσαλονίκης κ. **Δημήτριο Φατούρο** για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους και τα εποικοδομητικά σχόλιά τους για τη βελτίωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους του καθηγητές του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας της Φαρμακευτικής Αθηνών για τις γνώσεις και τη βοήθειά τους σε όλα τα χρόνια των σπουδών μου. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την κ. **Μαρία Βερτζώνη** για την πολύτιμη βοήθειά της και το ζεστό χαμόγελό της, όλα αυτά τα χρόνια.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους μεταδιδακτορικούς φοιτητές και υποψήφιους διαδάκτορες στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών για τη βοήθεια, το πολύ ευχάριστο και φιλικό κλίμα στο εργαστήριο του κ. Πίσπα, και συγκεκριμένα την **Αναστασία Μεριστούδη**, τη **Μαρία Καραγιάννη**, το **Γρηγόρη Μούντριχα**, το **Θεόδωρη Σκαλτσά** και τον **Νίκο Καρούση**. Ευχαριστώ και όλους του προ- και μετα-πτυχιακούς φοιτητές και υποψηφίους διδάκτορες του εργαστηρίου του κ. Δεμέτσο για τη συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την εταιρεία UNI-PHARMA S.A. και την κ. **Ιουλία Τσέτη**, Πρόεδρο & Δ/νουςα Σύμβουλο, για την υποτροφία "ΑΡΙΣΤΕΙΑ ΣΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ. ΥΠΟΤΡΟΦΙΑ ΚΛΕΩΝ ΤΣΕΤΗΣ" που απονεμήθηκε από την Ελληνική Φαρμακευτική Εταιρεία (ΕΦΕ), για την υποστήριξη και την ενίσχυση των νέων επιστημόνων.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στους φίλους μου και συνεργάτες, υποψήφιους διδάκτορες, **Αγγελική Σιαμίδα** και **Άλκη Παπαχρήστο** για την αγάπη τους και την άριστη συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια σε εργασίες που πραγματοποιούνταν παράλληλα με τη διδακτορική διατριβή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, **Γιάννη και Νάντια**, καθώς και την αδερφή μου **Ευαγγελία**, για την αγάπη και τη συμπαράσταση τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Τους αφιερώνω τη διδακτορική μου διατριβή με όλη μου την αγάπη!

Περιεχόμενα

•	Περίληψη	7
•	Abstract.....	9
•	Συνοτομογραφίες.....	10
1	Η Γεωμετρία των Μορφοκλασματικών Συνόλων στις Επιστήμες Υγείας.....	11
1.1	Εισαγωγικά στοιχεία.....	11
1.2	Η κλασματική διάσταση.....	15
1.2.1	Η εφαρμογή της γεωμετρίας των μορφοκλασματικών συνόλων στις φαρμακευτικές επιστήμες.....	20
1.3	Φαρμακευτική τεχνολογία.....	23
1.3.1	Χαρακτηρισμός δοσολογικών μορφών.....	23
1.3.2	Το μορφοκλασματικό ολόγραμμα της φαρμακευτικής νανοτεχνολογίας.....	25
1.4	Βιοφαρμακευτική και φαρμακοκινητική.....	48
1.4.1	Διάλυση και αποδέσμευση φαρμακομορίου.....	48
1.4.2	Απορρόφηση, διαθεσιμότητα, μεταβολισμός και απέκκριση φαρμακομορίου.....	50
1.5	Φαρμακολογία και βιοεπιστήμες.....	53
2	Συστήματα Μεταφοράς Φαρμακομορίων της Νανοτεχνολογίας.....	56
2.1	Εισαγωγικά στοιχεία.....	56
2.2	Φαρμακευτική νανοτεχνολογία.....	57
2.2.1	Συστήματα Μεταφοράς Φαρμακομορίων (Drug Delivery Systems)	61
3	Υλικά	78
4	Μέθοδοι	79
4.1	Παρασκευή λιποσωμάτων και χημικών λιποσωμάτων	79
4.1.1	Παρασκευή κατιονικών και ανιονικών λιποσωμάτων.....	79
4.1.2	Παρασκευή χημικών νανοφορέων σύστασης DPPC:PEO-b-PCL	79
4.1.3	Παρασκευή των MPOx και των MPOx:IND νανοδομών σε PBS.....	80
4.1.4	Παρασκευή των χημικών νανοφορέων σύστασης DPPC:MPOx-1.....	81
4.1.5	Παρασκευή των χημικών συστημάτων σύστασης DPPC:MPOx-1.....	82
4.2	Λυοφιλοποίηση των λιποσωματικών εναιωρημάτων.....	83
4.2.1	Ανασύσταση/Ανάκτηση των λυόφιλων λιποσωμάτων.....	83
4.3	Ποσοστό ενσωμάτωσης (Incorporation Efficiency)	84
4.4	Δυναμική και στατική σκέδαση	84
4.4.1	Δυναμική και Στατική Σκέδαση Φωτός.....	86

4.5	Ηλεκτροφορητική κινητικότητα- Ηλεκτροφορητική σκέδαση φωτός.....	89
4.6	Φθορισμομετρία (Fluorescence spectroscopy).....	90
	Οργανολογία φθορισμομετρίας.....	90
4.7	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης.....	91
4.7.1	Μετρήσεις SEM.....	94
4.8	Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης.....	95
4.8.1	Θερμοτροπικές μεταβολές σε διπλοστοιβάδες φωσφολιπιδίων χολίνης.....	97
4.8.2	Μετρήσεις DSC.....	98
4.8.3	Πειράματα DSC για τα χημικά συστήματα σύστασης DPPC:MPOx-1.....	98
4.9	Μαθηματική μοντελοποίηση.....	99
5	Κατιονικά και ανιονικά λιποσώματα.....	101
5.1	Η μορφολογία φορτισμένων λιποσωματικών φορέων με ανάλυση Μορφοκλασματικών Συνόλων.....	101
5.1.1	Εισαγωγικά στοιχεία.....	101
5.1.2	Μελέτες σταθερότητας.....	104
5.1.3	Επιδράσεις της συγκέντρωσης και της θερμοκρασίας.....	113
5.1.4	Η μικροπολικότητα και μικρορευστότητα των λιποσωματικών μεμβρανών..	122
5.2	Συμπεράσματα.....	124
6	DPPC:PEO-b-PCL χημικοί νανοφορείς: αυτό-συναρμολόγηση σε υδατικά και βιολογικά μέσα και ενσωμάτωση φαρμακομορίου.	127
6.1	Αυτο-συναρμολογούμενες νανοδομές.....	127
6.2	Φυσικοχημικός και μορφολογικός χαρακτηρισμός των χημικών νανοφορέων	131
6.2.1	Οι επιπτώσεις της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης στις χημικές νανοδομές.....	137
6.2.2	Η συμπεριφορά των χημικών νανοδομών σε όξινα διαλύματα: ο δυνητικός ρόλος της αποικοδομησιμότητας της πολυκαπρολακτόνης - PCL.....	140
6.2.3	Μικροπολικότητα και μικρορευστότητα εντός του μικροπεριβάλλοντος των χημικών νανοφορέων.....	142
6.2.4	Ενσωμάτωση της IND στους χημικούς νανοφορείς.....	144
6.2.5	Εκτίμηση της σταθερότητας χημικών νανοφορέων που παρασκευάστηκαν με διαφορετικό πρωτόκολλο.....	150
6.2.6	In vitro μελέτες αποδέσμευσης της IND από τους χημικούς νανοφορείς.	152
6.2.7	PEO-b-PCL μικκύλια σε υδατικά μέσα.....	154
6.3	Συμπεράσματα.....	154
7	Βαθμιδωτά συμπολυμερή κατά συστάδες ως νανοφορείς φαρμακομορίων.	156
7.1	Εισαγωγικά στοιχεία.....	156

7.1.1	Μελέτες αυτό-συναρμολόγησης και σταθερότητα των MPOx νανοφορέων.	158
7.1.2	Ενσωμάτωση IND στους MPOx νανοφορείς. Μελέτες σταθερότητας και αποδέσμευσης.....	162
7.2	Συμπεράσματα.....	169
8	DPPC/poly(2-methyl-2-oxazoline)-grad-poly(2-phenyl-2-oxazoline) χημικές νανοδομές ως δυνητικοί νανομεταφορείς φαρμακομορίων.	170
8.1	Εισαγωγικά στοιχεία.....	170
8.1.1	Φυσικοχημικός και Μορφολογικός Χαρακτηρισμός των χημικών νανοδομών.....	174
8.1.2	Επίδραση της θερμοκρασίας στη μορφολογία των χημικών λιποσωμάτων. 181	
8.1.3	Μικροπολικότητα και μικρορευστότητα των χημικών λιποσωματικών μεμβρανών.....	184
8.1.4	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των χημικών νανοδομών των χημικών νανοδομών με ενσωματωμένη IND.....	187
8.2	Συμπεράσματα.....	191
9	DPPC:MPOx-2 χημικά καινοτόμα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων της Νανοτεχνολογίας: Φυσικοχημικός και δομικός χαρακτηρισμός, σταθερότητα και μελέτη αποδέσμευσης φαρμακομορίου.....	193
9.1	Εισαγωγικά στοιχεία.....	193
9.1.1	Τα φυσικοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των DPPC:MPOx-2 χημικών νανοδομών.....	198
9.1.2	DPPC:MPOx-2 χημικά νανοςυστήματα ως θερμοαποκρινόμενες νανοδομές 203	
9.1.3	Η ενσωμάτωση της IND στους DPPC:MPOx-2 χημικούς νανοφορείς και η αποδέσμευσή της.....	206
9.2	Συμπεράσματα.....	212
10	Η απεικόνιση και η μορφοκλασματική μετρολογία των χημικών λιποσωματικών συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων της νανοτεχνολογίας: ο ρόλος της μακρομοριακής αρχιτεκτονικής του πολυμερικού ξενιστή.....	214
10.1	Εισαγωγικά στοιχεία.....	214
10.1.1	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και fractal μορφολογία των χημικών λιποσωμάτων	217
10.1.2	Η απεικόνιση των χημικών λιποσωμάτων.....	220
10.2	Συμπεράσματα.....	224
11	Η φυσικοχημική/θερμοδυναμική ισορροπία των καινοτόμων λιποσωματικών νανοφορέων.	226
11.1	Εισαγωγικά στοιχεία.....	226

11.1.1	Φυσικοχημικός, μορφολογικός και θερμοδυναμικός χαρακτηρισμός των λιποσωμιακών συστημάτων	228
11.2	Συμπεράσματα.....	237
12	Οι μετασταθείς φάσεις ως ρυθμιστές της βιοφυσικής συμπεριφοράς των λιποσωμιακών μεμβρανών: Ο ρόλος της βιομοριακής γλυπτικής του πολυμερικού ξενιστή.	240
12.1	Εισαγωγικά στοιχεία.....	240
12.1.1	Φυσικοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των συμβατικών, stealth και χημικών λιποσωμάτων.....	242
12.1.2	Τα θερμοτροπικά χαρακτηριστικά των συμβατικών, stealth και χημικών λιποσωμάτων	245
12.2	Συμπεράσματα.....	252
13	Η αλληλεξάρτηση μεταξύ του ρυθμού της αποδέσμευσης από χημικούς λιποσωμιακούς νανοφορείς και της κλασματικής διάστασής τους	255
13.1	Εισαγωγικά στοιχεία.....	255
13.1.1	Η θερμοτροπική συμπεριφορά των χημικών λιποσωμάτων.....	256
13.1.2	Φυσικοχημικός και μορφολογικός χαρακτηρισμό των χημικών λιποσωμάτων	260
13.1.3	In vitro αποδέσμευση της IND.....	261
13.1.4	Μαθηματική μοντελοποίηση.....	264
13.2	Συμπεράσματα.....	268
14	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	270
15	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	271
15.1	Η ισορροπία σχήματος/μορφολογίας: μελέτη των άορατων από το ανοσοποιητικό σύστημα λιποσωμάτων μέσω της μορφοκλασματικής ανάλυσης και ενσωμάτωση φαρμακομορίου.....	271
15.1.1	Εισαγωγικά στοιχεία	271
15.1.2	Υλικά και Μέθοδοι.....	273
15.2	Αποτελέσματα και Συζήτηση	274
15.2.1	Φυσικοχημικός και μορφολογικός χαρακτηρισμός των stealth λιποσωμάτων ..	274
15.2.2	Η επίδραση της θερμοκρασίας στη λιποσωμιακή μορφολογία.....	279
15.2.3	Μικροπολικότητα και μικρορευστότητα των stealth λιποσωμιακών μεμβρανών.	283
15.2.4	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και ενσωμάτωση της IND στα stealth λιποσώματα	284
15.3	Συμπεράσματα	288
16	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	290

• Περίληψη

Η μεταφορά φαρμακομορίων έχει προχωρήσει επιτυγχάνοντας τον αρχικό στόχο του ελέγχου του ρυθμού της αποδέσμευσης, περιλαμβάνοντας πλέον συστήματα, τα οποία έχουν σχεδιαστεί για την επίτευξη του χωρικού και του χρονικού ελέγχου του ρυθμού της αποδέσμευσης. Οι μελλοντικές γεννέες συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων θα περιλαμβάνουν «ευφυείς» λειτουργίες βιο-ανίχνευσης που θα επιτρέπουν τον *in vivo* έλεγχο της αποδέσμευσης του φαρμακομορίου. Εν κατακλείδει, πρόκειται για βιο-εμπνευσμένα καινοτόμα συστήματα μεταφοράς φαρμακομορίων, τα οποία είναι πολύπλοκες αυτό-συναρμολογούμενες νανοδομές ευμετάβλητης ύλης, οι οποίες δρουν διευκολύνοντας την ανάπτυξη καινοτόμων θεραπευτικών συσκευών με προστιθέμενη αξία και ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις με τη λειτουργικότητά τους, όπου οι περισσότερες αλληλεπιδράσεις και τα διεπιφανειακά φαινόμενα λαμβάνουν χώρα. Η ποσοτικοποίηση των μορφολογικών παραμέτρων απαιτεί ένα αναλυτικό εργαλείο που θα πρέπει με βάση τα πειραματικά δεδομένα να μπορεί να συσχετισθεί με τη σταθερότητά τους. Η μορφολογική ποσοτικοποίηση των καινοτόμων συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων της Νανοτεχνολογίας θα μπορεί να επιτευχθεί με βάση την ανάλυση των μορφοκλασματικών συνόλων. Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η χρήση της Γεωμετρίας των Μορφοκλασματικών Συνόλων στην ποσοτικοποίηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών μεικτών/χημικών νανοφορέων αλλά και φορτισμών λιποσωμάτων και πολυμερικών νανοφορέων. Επίσης, στόχος της μελέτης είναι η σύνδεση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των νανοφορέων με τις φυσικοχημικές ιδιότητές τους, τη σταθερότητά τους σε βάθος χρόνου, τη θερμοφωσκή τους συμπεριφορά, καθώς και τον εγκλωβισμό και την αποδέσμευση φαρμακομορίων.

Μεικτοί νανοφορείς φαρμακομορίων που αποτελούνται από συμπολυμερή κατά συστάδες και λιπίδια και μπορούν να θεωρηθούν ως νέα θεραπευτικά εργαλεία της νανοϊατρικής και μπορούν να αποδεσμεύουν το φαρμακομόριο σε συγκεκριμένους ιστούς και μπορούν να βελτιώσουν την φαρμακοκινητική / φαρμακοδυναμική συμπεριφορά καθώς και τη συνολική βιοδιαθεσιμότητά του εγκλωβισμένου φαρμακομορίου. Θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι ο σχεδιασμός και οι διαδικασίες

ανάπτυξης ενός νανοφορέα απαιτούν την προσεκτική επιλογή των κατάλληλων βιοϋλικών συμπεριλαμβανομένης και της επιλογής και των συμπολυμερών κατά συστάδες, προκειμένου να συμβάλλουν επαρκώς στην αποτελεσματικότητα του νανοφορέα. Ωστόσο, η βιο-εμπνευσμένη προσέγγιση για το σχεδιασμό αποτελεσματικών νανοφορέων φαίνεται να είναι μία πραγματική πρόκληση, όχι μόνο από επιστημονική και τεχνολογική, αλλά και από την προσέγγιση του ρυθμιστικού πλαισίου. Αυτοί οι προσανατολισμοί στρατηγικής επιστημονικής κατεύθυνσης, θα μπορούσαν να αποτελέσουν μία συμπληρωματική προσέγγιση για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη ασφαλών και αποτελεσματικών νέων φαρμάκων, με βάση τη Νανοτεχνολογία και τη χρήση της Γεωμετρίας των Μορφοκλασματικών Συνόλων.

• Abstract

Drug delivery has matured from its original goal of prolonging the duration of drug release; it now involves customized systems that are designed to achieve specific spatial and temporal control. Future generations of drug-delivery systems will incorporate “smart” biosensing functionalities that will enable unaided *in vivo* feedback control. In conclusion, bio-inspired delivery systems, especially chimeric aDDnSs, which are complex self-assembled soft nanostructures, act as facilitators for the development of innovative therapeutic devices, with added value and respond to the requirements of modern trends in the therapeutics. The morphology of drug nanocarriers correlates with their functionality, which is mainly shuttled on their surface where most of the interactions and interfacial phenomena occur. The quantification of their morphological fingerprint requires an analytical tool that should be established based on experimental data and can be correlated with their stability. The morphological quantification picture of the advanced Drug Delivery nano Systems (aDDnSs) could be achieved *via* fractal analysis. Mixed biocompatible block copolymer/lipid drug nanocarriers can be considered as new therapeutic outcomes in nanomedicine that could be able to deliver pharmacomolecules to specific tissues and can improve their pharmacokinetics/pharmacodynamics behavior and affect their total bioavailability. It should also be considered that the design and the development processes of a drug nanocarrier requires careful selection of appropriate biomaterials, including choice of the biocompatible block copolymers, in order to adequately contribute to aDDnSs effectiveness. However, this bio-inspired approach for designing effective aDDnSs seems to be a real challenge, not only for the scientific and technological point of view, but also for regulatory purposes. These strategic research orientations could be a complementary approach to produce safe and effective new medicines.

• Συντομογραφίες

DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine	διπαλμιτοϋλοφωσφατιδυλοχολίνης
DDS	Drug Delivery Systems	Συστήματα Μεταφοράς Φαρμακομορίων
aDDnS	advanced Drug Delivery nano Systems	Προχωρημένα Νάνο - Συστήματα Μεταφοράς Φαρμακομορίων
d_f	Fractal dimension	Κλασματική Διάσταση
d_s	Surface fractal	Κλασματική Επιφάνεια
FBS	Fetal bovine serum	Ορός Πλάσματος Βοοειδούς
DLCA	Diffusion-Limited Cluster Aggregation	Συσσωμάτωση Συμπλεγμάτων Περιορισμένη από τη Διάχυση
RLCA	Reaction-Limited Cluster Aggregation	Συσσωμάτωση Συμπλεγμάτων Περιορισμένη από την Αντίδραση
R_h	Hydrodynamic radius	Υδροδυναμική Ακτίνα
PD.I.	Polydispersity Index	Δείκτης Πολυδιασποράς
DLS	Dynamic Light Scattering	Δυναμική Σκέδαση Φωτός
SLS	Static Light Scattering	Στατική Σκέδαση Φωτός
RGD theory	Rayleigh – Gans – Debye theory	Θεωρία των Rayleigh – Gans – Debye
IND	indomethacin	ινδομεθακίνη
PEO-b-PCL	Poly(ethylene oxide)-block-poly(ε-caprolactone)	Πολυ(αιθυλενοξείδιο)-b-πολυ(ε-καπρολακτόνη)
MPOx	poly(2-methyl-2-oxazoline)-grad-poly(2-phenyl-2-oxazoline)	Πολυ(2-μεθυλο-2-οξαζολίνη)-grad-πολυ(2-φαινυλο-2-οξαζολίνη)

• ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1 Η Γεωμετρία των Μορφοκλασματικών Συνόλων στις Επιστήμες Υγείας

Η Γεωμετρία των Μορφοκλασματικών Συνόλων (Fractal Geometry)¹ έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την ποσοτικοποίηση της γεωμετρίας και της πολυπλοκότητας των φυσικών αντικειμένων αιχμαλωτίζοντας τη φαντασία της επιστημονικής κοινότητας. Η ανάπτυξη της κλασματικής διάστασης και η εφαρμογή της έχει σημαντικά αποτελέσματα σε μία πληθώρα βιοϊατρικών εφαρμογών. Στην εισαγωγή της παρούσας διατριβής θα παρουσιαστούν οι πολυάριθμες εφαρμογές της fractal γεωμετρίας στις φαρμακευτικές επιστήμες και η συμπίρευσή τους με τις πιο σημαντικές εξελίξεις στον τομέα των φαρμακευτικών επιστημών, από τη φαρμακευτική τεχνολογία και ειδικότερα τα συστήματα μεταφοράς φαρμακομορίων της Νανοεπιστήμης, ως τη Βιοφαρμακευτική και τη Φαρμακοκινητική. Επιπρόσθετα, η fractal κινητική, η οποία έχει εφαρμοστεί στην κινητική των ενζύμων, το μεταβολισμό των φαρμακομορίων και τη πρόσληψη, τη φαρμακοκινητική και τη φαρμακοδυναμική παρουσιάζονται εκτενώς. Επίσης, αναφέρονται τα πιθανά οφέλη από τη χρησιμοποίηση της fractal ανάλυσης, μαζί με τις προσεγγίσεις της μη γραμμικότητας (nonlinearity), της κλιμάκωσης (scaling), και της θεωρίας του Χάους ως εργαλεία μέτρησης και βαθμολόγησης για να ληφθούν πληροφορίες και πιο ρεαλιστικές περιγραφές των διαφορετικών κλάδων των φαρμακευτικών επιστημών. Συνακόλουθα, η fractal γεωμετρία είναι παρούσα και σε όλα τα πεδία της φαρμακευτικής έρευνας.

1.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Η δομική πολυπλοκότητα των περισσότερων δομών που συναντώνται στη φύση δεν μπορεί να περιγραφούν πλήρως από την ευκλείδεια γεωμετρία. Το ακανόνιστο σχήμα των κοινών αντικειμένων και υλικών με ανώμαλες επιφάνειες, καθώς επίσης και των κυττάρων των ζώντων οργανισμών θεωρούνται ως φυσικά πρότυπα που

¹ Στην συνέχεια θα γίνεται αναφορά στον αγγλικό ρόλο “fractal” και όχι στον αντίστοιχο ελληνικό, καθώς ο αγγλικός όρος είναι περισσότερο εύχρηστος.

χρειάζονται περεταίρω μελέτες και ολογραφικές προσεγγίσεις, προκειμένου για να αποκαλυφθεί και να κατανοηθεί η πολύπλοκη λειτουργικότητά τους. Η δομή συχνά υπακούει στην αρχή του αναλλοίωτου κάτω από αλλαγές της κλίμακας της μεγέθυνσης, η οποία μπορεί να αποτυπωθεί με τη fractal γεωμετρία. Η fractal γεωμετρία αποτελεί μία επέκταση της συμβατικής ευκλείδειας γεωμετρίας, η οποία επιτρέπει στις μετρήσεις να διαφοροποιούνται με έναν μη ακέραιο ή κλασματικό τρόπο, όταν η μονάδα μέτρησης αλλάζει. Αυτό το χαρακτηριστικό μπορεί να περιγραφεί εξ ορισμού με ένα κλασματικό αριθμό – την κλασματική διάσταση – για τη διάσταση του αντικειμένου. Η fractal ανάλυση έχει χρησιμοποιηθεί ως ένα χρήσιμο εργαλείο για την ποσοτικοποίηση της δομής μίας μεγάλης πληθώρας και ιδεατών αλλά και φυσικών αντικειμένων, που εκτείνονται από τα βασικά και τα εφαρμοσμένα μαθηματικά, τη φυσική και τη χημεία, έως τη βιολογία και την ιατρική. Ο Mandelbrot υπήρξε ο πρώτος που χρησιμοποίησε μαθηματικά μέσα για να περιγράψει τα ακανόνιστα σχήματα. Σε πολλά πεδία της έρευνας, όπως στη φυσική, τη χημεία και τη φυσιολογία, οι επιστήμονες έχουν αυξημένο ενδιαφέρον για τη μη γραμμική φύση των φαινομένων που ελέγχουν και διέπουν τις διαδικασίες, τη φυσική και τη φυσιολογική ετερογένεια που βρίσκονται οπουδήποτε οι ετερογενείς συνθήκες επικρατούν σε μεγάλο αριθμό φυσικών, φυσιολογικών, βιοφυσικών και βιοχημικών διαδικασιών. Η σύγχρονη επιστήμη έχει αποκαλύψει ότι ο πραγματικός κόσμος είναι μη γραμμικός και για το λόγο αυτό, οι τεχνικές της μη γραμμικής δυναμικής απαιτούνται για να αναλύσουν τα μη γραμμικά φαινόμενα. Παράλληλα, οι δομικές και λειτουργικές ετερογένειες μπορούν να περιγραφούν και να κατανοηθούν σε βάθος με τη χρήση της γεωμετρίας των fractals. Στην ουσία, τα fractals είναι πολύπλοκα γεωμετρικά σχήματα, και στην πραγματικότητα χρησιμοποιούνται πολύ πιο συχνά από ότι οι περισσότεροι άνθρωποι γνωρίζουν. Τα fractals χρησιμοποιούνται σε μία πληθώρα εφαρμογών, από τη συμπίεση στην ανάλυση εικόνας έως την κίνηση των σωματιδίων στη φυσική και στη βιολογία. Μέχρι την ανάπτυξη της fractal ανάλυσης, οι επιστήμονες ήταν σε θέση μόνο να παρατηρήσουν το μη γραμμικό δυναμικό χαρακτήρα των φυσικών δομών και διαδικασιών. Σήμερα, διαθέτουν μαθηματικά εργαλεία, τα οποία περιγράφουν, επεξηγούν και αιτιολογούν τις χαοτικές ιδιότητες της φύσης, όπως για παράδειγμα είναι ο καιρός και οι κύτοι της καρδιάς. Οι υπολογιστές έγιναν αναπόσπαστο κομμάτι αυτής της επιστημονικής επανάστασης, επιτρέποντας προσομοιώσεις με μη γραμμικά δυναμικά συστήματα και οπτικοποιώντας τα αποτελέσματα κατά τη διάρκεια του χρόνου, οι επιστήμονες πλέον είναι σε θέση

να παρακολουθούν τη χαοτική εξέλιξη ενός φυσικού φαινομένου στην οθόνη ενός υπολογιστή. Ιστορικά, οι μαθηματικές «παράξενες» δομές υπήρχαν και πριν τα fractals. Χαρακτηρίστηκαν ως «παθολογίες» καθώς δεν ταίριαζαν σε κανένα σχήμα/μοτίβο των ευκλείδειων σχημάτων και των ακανόνιστων γεωμετρικών αντικειμένων που προέκυψαν, αποκαλύπτοντας έναν κόσμο όπου τα μαθηματικά αντικείμενα (γραφικές αναπαραστάσεις των αλγοριθμικών διαδικασιών) αναπαριστούν το πραγματικό κόσμο. Αργότερα, ο Benoit Mandelbrot ήταν ο πρώτος μαθηματικός που διαμόρφωσε αυτή τη νέα επιστημονική θεωρία σε μία ανεξάρτητη αυτοτελή θεωρία, η οποία έγινε αμέσως η πιο δημοφιλής από τις ήδη υπάρχουσες. Εισηγάγε τον νεολογισμό fractal για να ενοποιήσει όλα αυτά τα παράξενα αντικείμενα σε έναν όρο. Επινόησε το νεολογισμό fractal, από το λατινικό επίθετο fractus. Το αντίστοιχο λατινικό ρήμα frangere σημαίνει «να κομματιαστεί», «να δημιουργήσει ακανόνιστα θραύσματα». Είναι επομένως λογικό και κατάλληλο για τις επιστημονικές ανάγκες ό,τι είναι απαραίτητη η επιπρόσθετη οφειλή του «κατακερματισμένου», καθώς fractus επίσης σημαίνει «ακανόνιστο», και τα δύο σημαίνουν fractal.

Η φαρμακευτική νανοτεχνολογία και η φαρμακοκινητική είναι οι σημαντικότεροι κλάδοι των φαρμακευτικών επιστημών ο οποίος συμπληρωματικά για την ανάπτυξη καινοτόμων φαρμάκων. Η προσέγγιση του Mandelbrot για να αποκαλύψει τη γεωμετρική πραγματικότητα των φυσικών αντικειμένων και τις συνακόλουθες μη γραμμικές διεργασίες σε νέες προσεγγίσεις στη φύση, υπήρξε έμπνευση για επιστήμη ως και σε άλλο φετομής όπς είναι η τεχνολογία της μεταφοράς φαρμακομορίων. Η προσέγγιση μέσα από την fractal γεωμετρία μπορεί να χαρακτηριστεί ως η οδηγούσα δύναμη για να αναπτυχθούν νέα μονοπάτια για την ανάπτυξη βιο-εμπνευσμένων συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων (όπως τα λιποσώματα, τα δένδριμερή, τα πολυμεροσώματα κ.ά.), τα οποία είναι fractal δομές (Πίνακας 1.1), τα οποία έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν τα φαρμακομόρια σε συγκεκριμένες περιοχές μέσα στον οργανισμό. Τα χαρακτηριστικά κατά τη σχεδίαση των νανοτεχνολογικών μορφοποιήσεων πρόσφατα έχουν σκιαγραφηθεί από τη fractal γεωμετρία, ενώ βιολογικά συστήματα γίνονται εύκολα κατανοητά όσον αφορά τη λειτουργία το με βάση την προσέγγιση των fractals. Επιπρόσθετα, η fractal κινητική περιγράφει την κινητική των ενζύμων, το μεταβολισμό και τις διαδικασίες πρόσληψης των φαρμακομορίων, καθώς και τη φαρμακοδυναμική και τη

φαρμακοκινητική τους. Οι έννοιες που περιγράφονται παραπάνω συνοψίζονται στον Πίνακα 1.1. Η θεωρία των μη γραμμικών δυναμικών συστημάτων (Θεωρία του Χάους), η οποία σχετίζεται με αιτιοκρατικά συστήματα και παρουσιάζουν μία περίπλοκη, που προσομοιάζει με τυχαία συμπεριφορά, έχει σχηματίζει μία διεπιστημονική περιοχή της έρευνας και επηρεάζει σχεδόν όλα τα πεδία της επιστήμης τα τελευταία τριάντα χρόνια. Αυτό αναφέρεται ως χαοτική συμπεριφορά, μία ειδική κατηγορία μίας μη γραμμικής δυναμικής, η οποία είναι ο επιστημονικός τομέας που σχετίζεται με την ανάλυση των δυναμικών συστημάτων.

Πίνακας 1.1: Fractals και fractal προσεγγίσεις στις φαρμακευτικές επιστήμες.

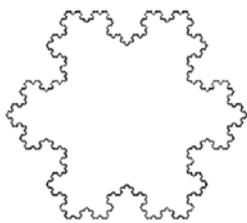
Προσδιοριστικό σημείο	Παραδείγματα
Γεωμετρία	Φλεβικά και αρτηριακά δίκτυα Δενδριμερή, λιποσώματα Φαρμακευτικά συστήματα
Δομή	Όγκος κατανομής Ήπαρ
Κινητική	Χρόνο-εξαρτώμενη κινητική Κλασματική κινητική
Δυναμική	Ελκυστής της δυναμικής της λειτουργίας της καρδιάς Ελκυστής της έκκρισης των ορμονών

1.2 Η κλασματική διάσταση

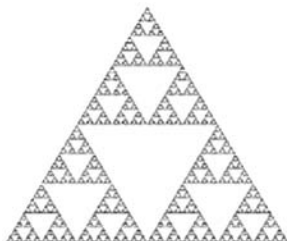
Η fractal γεωμετρία έχει αποκτήσει μία έννοια σύμβολο από την έμπνευσή της από τον Mandelbrot (1982) έως σήμερα. Η δημοφιλία της βασίζεται στην υπόσχεση που δίνει σε μία βαθύτερη κατανόηση των πολύπλοκων, χαοτικών και άτακτων συστημάτων, τα οποία δεν μπορούν να μοντελοποιηθούν με βάση τα συμβατικά γεωμετρικά πρότυπα. Στην Εικόνα 1.1, τα κλασσικά παραδείγματα των fractals παρουσιάζονται η νιφάδα του Κωχ, το τρίγωνο Sierpinski και το σύνολο Cantor.



a.



b.



c.

Εικόνα 1.1. Παραδείγματα fractals: **a.** Cantor's set **b.** νιφάδα του Koch και **c.** τρίγωνο Sierpinski.

Όπως ισχύει και για το χαρακτηρισμό των ευκλείδειων σωματιδίων, το ουσιαστικό χαρακτηριστικό γνώρισμα της fractal γεωμετρίας είναι η αναγνώριση της ακανόνιστης συμμετρίας (dilatational symmetry) και την αρχής του αναλλοίωτου της κλίμακας (scale invariance), ως ένα μέτρο για το χαρακτηρισμό των δομών και των μορφολογιών. Η μαθηματική έκφραση που ενσωματώνει τη βασική έννοια της fractal δομής των συσσωματωμάτων είναι πολύ απλή:

$$M \sim R^{d_f} \quad (1)$$

Όπου M είναι η μάζα των σωματιδίων, R είναι μία γραμμική μέτρηση του μεγέθους (μήκους) και d_f είναι η κλασματική διάσταση της μάζας, η οποία αποτελεί μία μέτρηση της κλιμάκωσης. Η έκφραση αυτή μπο ρεί να χρησιμο πο ιηθεί για να επικοινωνήσει μία πληθώρα διαφορετικών εννοιών: το M μπορεί να αναπαριστά τη μάζα και το R την ακτίνα ενός ειδικού συσσωματώματος, όπως αυτά της συλλογής των συσσωματωμάτων διαφορετικών μεγεθών και εμφανίζουν συνολικά κλασματική κλιμάκωση, ή σε μία κλίμακα αρκετά μικρότερη σε σύγκριση με ένα μεμονωμένο συσσωμάτωμα όπου το R μπορεί να αναπαριστά ένα σφαιρικό σύνορο με κέντρο ένα αρχικό σωματίδιο και το M τότε σημαίνει το ποσό της μάζας που περιέχεται σε αυτή τη σφαίρα. Η σταθερά της αναλογικότητας (constant of proportionality) θα είναι αρκετά διαφορετική, αλλά η κλασματική κλιμάκωση στις δύο περιπτώσεις είναι η ίδια (Chu and Liu, 2000; Bushell et al., 2002; Kamiya and Takahashi, 2007; Link et al., 2011).

Δεδο μένο υ ό τι το μεγαλύτερο μέρος της βιβλιογραφίας σχετικά με το θέμα αυτό ασχολείται με τη δομή των συσσωματωμάτων που σχηματίζονται από μονοδιάσπαρτα από σφαιρικά σωματίδια, η διάκριση μεταξύ της μάζας και του αριθμού γίνεται εξαιρετικά σπάνια. Είναι αρκετά σύνηθες ανάμεσα στους συγγραφείς να γράφουν την εξίσωση (1) από την άποψη του αριθμού των σωματιδίων N και αναφέρονται στην ποσότητα d_f ως κλασματική διάσταση της μάζας, αν και αυτό είναι μικρής σημειολογίας καθώς η κλασματική διάσταση της μάζας και η κλασματική διάσταση του αριθμού είναι ακριβώς η ίδια όταν τα σωματίδια είναι μονοδιάσπαρτα. Πιο συγκεκριμένα η εξίσωση (1) μπορεί να γραφεί στην περίπτωση της κλιμάκωσης του συνολικού συσσωματώματος, συνήθως όπως κάτωθι:

$$N = k_g \left(\frac{R_g}{r_0} \right)^{d_f} \quad (2)$$

Όπου R_g είναι η γεωμετρική ακτίνα του συσσωματώματος, r_0 είναι η ακτίνα του αρχικού σωματιδίου (από το οποίο ξεκίνησε η συσσωμάτωση) και το k_g αναφέρεται ως παράγοντας δομής (structure prefactor). Ο δείκτης g προστίθεται στον παράγοντα δομής για να τον συνδέσει σαφώς με το μέγεθος του γραμμικού συσσωματώματος και ορίζεται στην περίπτωση της γεωμετρικής ακτίνας, ως είναι η γεωμετρική ρίζα της μέσης από σωσης μεταξύ των στο χείων από το κέντρο μάζας. Εύκο λα μπο ρεί κάποιος να ορίσει το γραμμικό μέγεθος στην περίπτωση της «εξωτερικής ακτίνας»

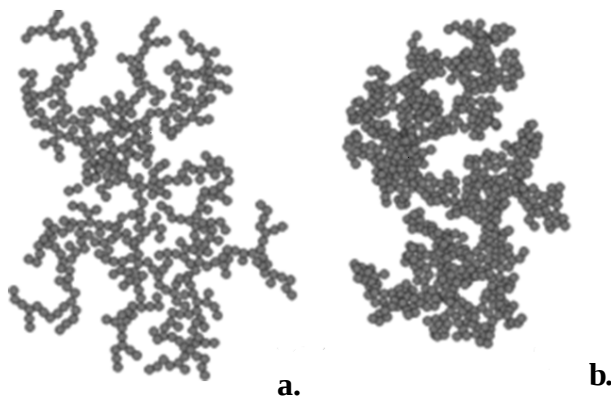
(‘external radius’) R_e και σχετίζεται με τον παράγοντα δομής k_g μέσω κάποιας εμπειρικής εξίσωσης ή με οποιοδήποτε άλλο γραμμικό μέτρο του μεγέθους.

Επιπρόσθετα, μία από τις απλούστερες διαδικασίες ανάπτυξης μη-ισορροπίας που δημιουργεί διακλαδισμένες και ανοικτές δομές σε κολλοειδή συστήματα χαρακτηρίζονται από μία κλασματική διάσταση (d_f), η οποία είναι ταυτόσημη με την κλασματική διάσταση της μάζας, διαφορετική από την ευκλείδεια διάσταση (d), είναι η διαδικασία της συσσωμάτωσης περιορισμένης ή ελεγχόμενης από τη διάχυση. (Diffusion-Controlled or Limited Aggregation process), η οποία εισήχθηκε από τους Witten και Sander (Witten and Sander, 1981) και η εναπόθεση ελεγχόμενη από τη διάχυση (Diffusion – Controlled Deposition), η οποία εισήχθηκε από τους Rácz και Vicsek (Racz and Vicsek, 1983). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι για τα προαναφερθέντα μοντέλα συσσωμάτωσης, κάθε σύγκρουση μεταξύ των σωματιδίων έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μίας μόνιμης επαφής και η κλασματική διάσταση είναι ανεξάρτητη από τη πιθανότητα προσκόλλησης (sticking probability) των σωματιδίων (Meakin 1986, 1983a,b). Από την άλλη πλευρά, αρκετοί μηχανισμοί συσσωμάτωσης έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία, όπως για παράδειγμα η βαλλιστική συσσωμάτωση (ballistic aggregation), η χημικώς περιορισμένη συσσωμάτωση (chemically limited aggregation) και η συσσωμάτωση με αναδιάρθρωση (aggregation with restructuring) εκτός από το μηχανισμό της συσσωμάτωσης περιορισμένης από τη διάχυση (Jullien, 1987). Οι Witten και Sander έχουν μελετήσει την κολλοειδή συσσωμάτωση από θεωρητική άποψη (Witten and Sander, 1981; Witten and Sander, 1983). Η συσσωμάτωση περιορισμένη από τη διάχυση είναι ένα μοντέλο όπου τα σωματίδια προστίθενται σε δεδομένο χρόνο για την ανάπτυξη του συσσωματώματος από τα σωματίδια με τυχαίες τροχές διαδρομής. Ο καθορισμός της κλασματικής διάστασης έχει πραγματοποιηθεί από αυτό το μοντέλο (Tang et al., 2000; Thill et al., 1998). Η συσσωμάτωση συμπλεγμάτων περιορισμένη από τη διάχυση βελτιώθηκε από τον Meakin (Meakin, 1983b) και από μία επέκταση της DLA. Σε αυτό το μοντέλο, η ανάπτυξη των συμπλεγμάτων είναι ελεγχόμενη από τη διάχυση, η πιθανότητα προσκόλλησης είναι ίση με τη μονάδα, όλες οι συγκρούσεις μεταξύ των σωματιδίων είναι αποτελεσματικές και τα συσσωματώματα είναι ανοικτά και διακλαδισμένα όσον αφορά την δομή τους. Η κλασματική διάσταση εκτιμήθηκε ίση με 1.8 σε τρεις διαστάσεις από υπολογιστικές προσομοιώσεις. Η DLCA είναι μία

διαδικασία γρήγορης συσσωμάτωσης, υπακούει στην παρακάτω ακολουθία της μέσης τιμής της γεωμετρικής ακτίνας R_g :

$$R_g \sim t^{1/d_f} \quad (3)$$

Όπου t είναι ο χρόνος και d_f είναι η κλασματική διάσταση (Forrest and Witten, 1979). Από την άλλη πλευρά, η συσσωμάτωση συμπλεγμάτων περιριμένη από την αντίδραση ή το μοντέλο του Eden είναι μία αργή διαδικασία συσσωμάτωσης. Το μοντέλο είναι ένα απλό πρότυπο ανάπτυξης των συμπλεγμάτων, σύμφωνα με το οποίο τα σωματίδια προστίθενται ένα κάθε φορά σε τυχαίες θέσεις αλλά παρακείμενες προς τις ήδη κατεχόμενες από σωματίδια θέσεις. Η ανάπτυξη περιορίζεται από την αντίδραση εξαιτίας της παρουσίας ενός ενεργειακού φραγμού της συσσωμάτωσης. Η πιθανότητα πρόσκλισης είναι μικρότερη της μοιάδας καθώς ένας μεγάλος αριθμός συγκρούσεων χρειάζεται πρωτότα σωματίδια συνδεθούν. Η κλασματική διάσταση εκτιμήθηκε να είναι ίση με 2. Από υπολογιστικές προσομοιώσεις και τα συσσωματώματα είναι περισσότερο συμπαγή και πυκνά σε σύγκριση με τα DLCA συμπλέγματα (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2. Παραδείγματα των **a.** DLCA και **b.** RLCA συσσωματωμάτων.

Η κινητική RLCA χαρακτηρίζεται από τον ακόλουθο μαθηματικό τύπο για τη μέση γεωμετρική ακτίνα, R_g :

$$R_g \sim e^{at} \quad (4)$$

Όπου α είναι μία σταθερά. Η τιμή α εξαρτάται από την πιθανότητα προσκόλλησης. Η κλασματική διάσταση της επιφανείας (d_s) και ο μαθηματικός τύπος της κλασματικής επιφάνειας γράφεται ως εξής:

$$d_f = 6 - d_s \quad (5)$$

Από πειραματικής άποψης είναι δύσκολο να βρεθούν φαινόμενα συσσωμάτωσης που να περιγράφονται από την έννοια των fractals επιφανείας. Ο Roldán-Vargas και οι συνεργάτες τους ανέφεραν την πρώτη πειραματική παρατήρηση της μετάβασης από τις fractal δομές επιφανείας στις fractal δομές της μάζας σε ένα εναιώρημα όπου λιπιδικά κυστίδια συσσωματώνονταν και παρουσίασαν λεπτομερή περιγραφή της δομής του έλκους και κινητικής της λιποσωματικής επιφάνειας, όπως διαμορφωνόταν από τη συσσωμάτωση που επαγόταν από ιόντα μαγνησίου (Roldán-Vargas et al., 2008). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι προαναφερθέντες μηχανισμοί συσσωμάτωσης είναι μη αναστρέψιμοι για υδατικά κολλοειδή συσσωματώματα και είναι καθολικοί στη φύση. Η «καθολικότητα» (“universality”) αυτών των φαινομένων της συσσωμάτωσης υποστηρίχθηκε από τον Lin και τους συνεργάτες τους (Lin et al., 1989).

Επιπρόσθετα, η κινητική σε περιβάλλοντα που προσομοιάζουν με fractals (fractal-like environment) (συχνά ονομάζεται fractal κινητική) χαρακτηρίζει διεργασίες που λαμβάνουν χώρα σε ή κοντά στα σύνορα fractal αντικειμένων. Στην κλασσική κινητική, σε ομοιογενή και καλά αναδευόμενα μέσα (homogeneous and well-stirred media), οι συντελεστές του ρυθμού (rate coefficients) είναι ανεξάρτητοι του χρόνου, ενώ στις τάξεις της αντίδρασης είναι ίσοι με την γραμμομετρική και εκφράζονται ως ακέραιοι αριθμοί (Kopelman, 1988). Όμως, η έννοια της κλασσικής κινητικής της αντίδρασης δεν είναι ικανοποιητική, όταν τα αντιδρώντα είναι χωρικά περιορισμένα (spatially constrained) σε μικροσκοπικό επίπεδο, για παράδειγμα από τοιχώματα του περιέκτη ή από σύνορα της φάσης του υλικού. Από την άλλη πλευρά, στη fractal κινητική, οι συντελεστές του ρυθμού είναι εξαρτώμενοι από το χρόνο και εκφράζονται με τον παρακάτω μαθηματικό τύπο:

$$k' = k * t^{-h} \quad (6)$$

Όπου k' είναι ο κλασματικός συντελεστής του ρυθμού (fractal rate coefficient), k είναι ο κλασσικός (συντελεστής του ρυθμού) (δηλαδή όταν $h=0$), t είναι ο χρόνος, h

είναι ένα στοιχείο ετερογένειας (heterogeneity component), το οποίο μπορεί να ερμηνευθεί ως απο έλεσμα των ακανόνιστων συνόρων του υλικού ή στα οποία τερματίζεται η αντίδραση.

Στην πραγματικότητα, τα fractal αντικείμενα διαθέτουν ιδιότητες πολλαπλών κλιμάκων (multiscale properties), δηλαδή συνεχίζουν να παρουσιάζουν λεπτομερή δομή σε ένα μεγάλο εύρος κλίμακας, όπως οι παραπάνω εξισώσεις περιγράφουν. Συνεπώς, οι ιδιότητες των πολλαπλών κλιμάκων των fractal αντικειμένων και των διαδικασιών εξαρτώνται από τα χωρικά και τα χρονικά χαρακτηριστικά της μέτρησης της κλίμακας που χρησιμοποιείται (το μέγεθος του χάρακα-ruler size) (Macheras and Iliadis, 2006). Οι φυσιολογικές συνέπειες των μαθηματικών εννοιών των fractals είναι σημαντικές καθώς fractal δομές, μορφολογίες, διαδικασίες και κινητικές είναι πανταχού παρούσες στη φαρμακευτική έρευνα. Θα πρέπει να τονιστεί ότι τα πραγματικά φυσικά αντικείμενα παρομοιάζουν μόνο σε μία δεδομένη περιοχή την αρχή του αναλλοίωτου της κλίμακας (scale-invariance), ενώ τα μαθηματικά fractals χαρακτηρίζονται από την αρχή του αναλλοίωτου στο άπειρο.

1.2.1 Η εφαρμογή της γεωμετρίας των μορφοκλασματικών συνόλων στις φαρμακευτικές επιστήμες

Η επέκταση των εννοιών της fractal γεωμετρίας στις επιστήμες της ζωής και των βιοεπιστημών οδήγησε σε σημαντική πρόοδο στην κατανόηση των πολύπλοκων λειτουργικών ιδιοτήτων και τα δομικά χαρακτηριστικά των κυττάρων και των ιστών κατά τη διάρκεια της οντογένεσης και της φυσιολογικής και της παθοφυσιολογικής διαδικασίας ανάπτυξης. Επιπρόσθετα, μία σειρά δημοσιεύσεων υποδεικνύει ότι η αρχή του αναλλοίωτου αποτελεί ένα κοινό χαρακτηριστικό όλων των βιολογικών συστημάτων, που ποικίλει από τους ιστούς που αναπτύσσονται σε καλλιεργούμενα κύτταρα, τον πυρήνα των κυττάρων και τη χρωματίνη (Mazzola, 2003; Kimori et al., 2011; Moreno et al., 2011; Mirny, 2011; Bancaud et al., 2012; Albrecht-Buehler, 2012). Η fractal ανάλυση μπορεί να χαρακτηρίσει τις φαινομενικά ακανόνιστες και πολύπλοκες δομές με μοναδικό όρο, μία παράμετρο, την κλασματική διάσταση, η οποία με τη σειρά της μπορεί να συσχετίσει την συνολική λειτουργική, παθολογική ή φυσιολογική κατάσταση του ιστού ή των υπό μελέτη κυττάρων. Για παράδειγμα, έχει

αποδειχθεί αναδρομικά ότι η σύνθετη κλασματική των κακοήθων κυττάρων, όπως απεικονίζονται στη μαστογραφία, η οποία είναι μικρότερη σε σύγκριση με αυτή των καλοήθων κυττάρων, γεγονός που υποδηλώνει τη δυναμική της ανάπτυξης στόχων για την κυτταρολογική διαγνωστική μέθοδο του καρκίνου του μαστού.

Στη συνέχεια αναφέρονται παραδείγματα που επεξηγούν την πρακτική αξία της fractal γεωμετρία, τη θεωρία της βελτιστοποίησης (percolation theory) και της θεωρίας του χάους στους διαφόρους κλάδους των φαρμακευτικών επιστημών. Σκοπός της παρούσας εργασίας δεν είναι να παρουσιαστεί μία πλήρης αναθεώρηση όλων των βιβλιογραφικών αναφορών στο θέμα αυτό. Η παρούσα μελέτη αποσκοπεί μόνο στην εστίαση του αναγνώστη στη χρησιμότητα των προαναφερθέντων όρων καθώς και στην εφαρμογή τους στον ευρύτερο τομέα των φαρμακευτικών επιστημών.

Από τα απλά άτομα και τα μόρια ως τα υψηλότερα οργανωμένα συστήματα της ζωής των πολυκύτταρων οργανισμών, η fractal γεωμετρία έχει βρει ευρεία εφαρμογή. Η εμφάνιση των περισσότερων υλικών είναι fractal, η ακανόνιστη μορφή της επιφανείας αλλά και ολόκληρης της δομής μπορούν να χαρακτηριστούν από μία μόνο παράμετρο, τη κλασματική διάσταση, d_f . Ο Avnir και οι συνεργάτες τους (1984), παραθέτει μία ευρεία συλλογή υλικών με κλασματικές διαστάσεις των $2 < d_f < 3$.

Σε εργαστηριακό επίπεδο, από την άλλη πλευρά, κάτω από πειραματικές συνθήκες, όμορφα πολυδιακλαδισμένα κρυσταλλικά συσσωματώματα («πολυκλασματικά» “multifractal”) μπορούν να ληφθούν. Η ανάπτυξη δενδριτικών κρυστάλλων περιορισμένη από τη διάχυση από υπέρκορα διαλύματα αποδίδει ακανόνιστα πρότυπα των εξαιρετικά ατελών κρυσταλλικών συστάδων με τη κλασματική γεωμετρία. Η fractal ανάλυση συχνά χρησιμοποιείται στην μελέτη της τραχύτητας φαρμακευτικών στερεών. Ο Thibert και οι συνεργάτες του (1988) συνέκρινε την κλασματική διάσταση μίας σειράς κοκκίων και εκδόχων που παρασκευάστηκαν από διαφορετικές τεχνικές, και βρήκε ότι υφίσταται στενή σχέση μεταξύ της φυσικής συμπεριφοράς αυτών των κοκκίων και της γεωμετρίας της επιφανείας τους. Η σύγκριση της κλασματικής διάστασης των κοκκίων και των εκδόχων που παρασκευάστηκαν από διαφορετικές τεχνικές αποκάλυψαν μία πιθανή συσχέτιση μεταξύ της φυσικής συμπεριφοράς αυτών των κοκκίων και της γεωμετρίας της επιφανείας τους (Brittain et al., 1991; Tromelin et al., 2001).

Από την άλλη, κάποιοι συγγραφείς (Koch, 1993) επέκριναν την μέθοδο εκτίμησης της κλασματικής διάστασης των ακανόνιστων σωματιδίων από φωτομικρογραφίες καθώς η εκτίμηση από την προβολή της διατομής σε εικόνα μπορεί να οδηγήσει σε παραπλανητική παρατήρηση, λόγω λανθασμένου προσανατολισμού των στερεών σωματιδίων, ενόσω ο Avenier και οι συνεργάτες του (1984) πρότειναν την εξέταση επιφανειών από την προσρόφηση αερίων.

Η διαδικασία της λυοφιλοποίησης έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως από τη φαρμακευτική βιομηχανία, καθώς και από τις βιομηχανίες τροφίμων και χημικών ώστε να ληφθούν προϊόντα με τη μορφή κόνεως (λυόφιλα προϊόντα) με δυνατότητα «στιγμιαίας διάλυσης» (“instant solubility”). Αυτό σημαίνει πως σπογγώδεις κόκκοι μπορούν εύκολα να διαλυθούν στο κατάλληλο υγρό. Τέτοια προϊόντα βρίσκονται τακτικά σε φαρμακευτικά σκευάσματα (όπως είναι τα εκχυλίσματα από τα φυτά), προΐνα διατροφής (όπως είναι ο στιγμιαίος καφές), κόνεις απορρυπαντικών και συναφών ειδών. Φαίνεται πιθανό πως η περιγραφή μέσω της fractal ανάλυσης των κόκκων της κόνεως είναι προγνωστική και της ροής και της ικανότητας συσκευασίας της κόνεως, για παράδειγμα στη δισκιοποιητική μηχανή, όπως και περιγραφή της βιοδιαθεσιμότητας του δραστικού συστατικού που έχει παραχθεί από μία λυόφιλη μορφοποίηση. Η διαθεσιμότητα του φαρμακομορίου στον οργανισμό του ασθενούς εξαρτάται από την αποσάθρωση και/ή από το ρυθμό της διάλυσης στα υγρά του σώματος, και αυτό μπορεί να τροποποιηθεί με τα συστήματα μεταφοράς φαρμακομορίων (Burnett et al., 2011).

Σφαιρικά συσσωματώματα, ιστορικά αναφερόμενα ως μικκύλια, κάποιες φορές δημιουργούν συμπλέγματα, τα οποία είναι fractal όσον αφορά τη γεωμετρική τους δομή. Για παράδειγμα, μικκύλια καζεΐνης που προκύπτουν από τη συμπύκνωση των πρωτεϊνών του γάλακτος όταν το γάλα θερμαίνεται, διαθέτουν δομή συσσωματώματος που προσομοιάζει με raspberry (Raspberry-like aggregates) στις ηλεκτρονικές μικρογραφίες με κλασματική διάσταση ίση με $d_f=1.86$. Η δομή των συσσωματωμάτων, των μικκυλιακών σωματιδίων καζεΐνης, τα οποία χαρακτηρίζονται ως υπο-μικκύλια (submicelles), μελετήθηκαν με σκέδαση φωτός και με μικροσκοπία ψυκτροτεμαχισμού. Βρέθηκε ότι τα συσσωματώματα είχαν αυτό-όμοια δομή με διάσταση 2 (Panouillé et al., 2005; de Kruif et al., 2012). Από την άλλη πλευρά, παρατηρήθηκαν συσσωματώματα των μικκυλίων της καζεΐνης με

ακανόνιστη σωματιδιακή δομή διαθέτοντας κλασματική διάσταση $d_f=2.3$ (Chardot et al., 2002; Panouillé et al., 2005; de Kruif et al., 2012).

1.3 Φαρμακευτική τεχνολογία

Η πιο ενδιαφέρουσα φαρμακευτική εφαρμογή της έννοιας των fractals είναι στη μορφοποίηση των φαρμακευτικών μορίων. Η fractal γεωμετρία μπορεί να προσδώσει νέα δεδομένα σε γνωστά προβλήματα της φαρμακευτικής τεχνολογίας (και της βιοφαρμακευτικής) και σε αυτές τις περιπτώσεις όπου οι κλασσικές προσεγγίσεις δεν μπορούν να οδηγήσουν στη βέλτιστη λύση του προβλήματος.

1.3.1 Χαρακτηρισμός δοσολογικών μορφών

Παραδείγματα για την επιτυχή εφαρμογή της fractal γεωμετρίας έχει παρουσιαστεί στους κλάδους του σχεδιασμού δοσολογικών μορφών, στο χαρακτηρισμό των δοσολογικών μορφών, σε μονάδες λειτουργίας της παραγωγής και στις ιδιότητες της αποδέσμευσης του φαρμακομορίου.

Για παράδειγμα, η παρουσία μία αυτό-όμοιας κατανομής μεγέθους σωματιδίων αποτελεί προϋπόθεση για μορφοκλασματικά μοτίβα στις φαρμακευτικές δοσολογικές μορφές. Τα fractals έχουν παρατηρηθεί σε κονιοποιημένα φαρμακευτικά μόρια, σε έκδοχα και σε μείγματα και των δύο, καθώς και σε ημίρρευστες δοσολογικές μορφές όπως είναι οι πηκτές και τα γαλακτώματα. Το όριο της διήθησης αλλάζει δραματικά τις ιδιότητες των δισκίων, όπως είναι η αντοχή στη σύνθλιψη (crushing strength), στο χρόνο αποσάθρωσης (disintegration time), το ρυθμό διάλυσης και άλλων. Η μελέτη αυτών των φαινομένων μπορεί να παρέχει ένα ενδιαφέρον νέο εργαλείο για το σχεδιασμό δοσολογικών μορφών με πιο ορθολογιστικό τρόπο, ειδικότερα για ταχείας και βραδείας αποδέσμευσης στερεές δοσολογικές μορφές. Ο Thibert και οι συνεργάτες του (1988) υποστήριξαν πως ο βαθμός με το οποίο μία κόνις μπορεί να συμπιεστεί, ο λόγος της συμπίεστότητας (compressibility ratio), για μία σειρά υλικών είναι μία συνάρτηση του αντίστοιχου παράγοντα τραχύτητας “a”, ο οποίος είναι ίσος με $1-d_f$. Βρέθηκε ότι ο λόγος της συμπίεστότητας δεν εξαρτάται από την

πραγματική πυκνότητα του υλικού, αλλά μάλλον από το μέγεθος του σωματιδίου και το σχήμα του (Thibert et al., 1988; Fini et al., 2008). Η διαδικασία της κοκκοποίησης στην παραγωγή ενός δισκίου είναι ξεκάθαρα ένας τρόπος για να αυξηθεί την κλασματική διάσταση των κοκκίων, σε σύγκριση με τους αρχικούς κρυστάλλους του φαρμακομορίου χωρίς την παρουσία των εκδόχων (Abdullah et al., 2013).

Μόλις το συστατικό με τη χαμηλότερη μηχανική σταθερότητα διηθείται στο σύστημα της κόπωσης, η σκληρότητα του δισκίου ελέγχεται ολκωτικά από αυτό το συστατικό. Αυτό το όριο της διήθησης είναι μία συνάρτηση της γεωμετρικής διευθέτησης των σωματιδίων στο συμπιεσμένο σύστημα της κόπωσης (Esquena et al., 2000). Η fractal γεωμετρία και η θεωρία της διήθησης επιτρέπουν μία αντίληψη στην φυσική της συμπίεσης των δισκίων καθώς και των ιδιοτήτων τους. Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα είναι ελπιδοφόρα και θα πρέπει να δοθεί επιπλέον προσοχή στην έρευνα σε αυτόν τον τομέα. Σύμφωνα με τους Janssen και Stenull (2000, 2009) τα συμπλέγματα που προκύπτουν από τη διήθηση είναι τυχαία fractals, των οποίων οι γεωμετρικές και οι ιδιότητες μεταφοράς μπορούν να χαρακτηριστούν με τη βοήθεια συναρτήσεων κατανομών πιθανοτήτων (probability distribution functions).

Το μέγεθος και των σχήμα των σωματιδίων γενικά συμβάλλουν στις μακροσκοπικές φαρμακευτικές ιδιότητες των δοσολογικών μορφών. Η επίδραση της μορφολογίας της επιφανείας του στεατικού οξέως στη λιπαντική αποτελεσματικότητα μία σειράς δειγμάτων έχει μελετηθεί, σημειώνοντας ότι ήταν καλό λιπαντικό μόνο σε στρογγυλοποιημένες νιφάδες αλλά όχι σε γωνιώδεις νιφάδες. Στερεές δοσολογικές μορφές με μία πορώδη δομή που μοιάζει με σπόρο συμπεριφέρεται όπως ένα πορώδες σύστημα κατά τη διήθησή του. Επιπρόσθετα, η κλασματική διάσταση μίας σειράς υλικών για δισκία έχουν μελετηθεί (με καφεΐνη σε αιθύλ-κελουλόζη), η οποία έγινε πορώδης κατά τη διάρκεια της αποδέσμευσης του φαρμακομορίου. Τα δεδομένα από της πίεσης διείσδυσης από την πορωδομετρία υδραργύρου (mercury porosimetry) που χρησιμοποιήθηκε για να προσδιοριστεί η διάμετρος των πόρων καθώς και η κατανομή του μεγέθους των πόρων για τα αποσπασμένα δισκία, ενώ ο σπóγγος Menger με ένα τρισδιάστατο δίκτυο με $d_f=2.72$ υπήρξε η μαθηματική βάση για τον υπολογισμό. Οι κλασματικές διαστάσεις του συστήματος πορώδους των αποσπασμένων δισκίων κυμαίνεται μεταξύ 2.670 και 2.837, και εξαρτάται από την κατανομή μεγέθους των σωματιδίων για τα υδατοδιαλυτά φαρμακομόρια και του κλάσματος του φαρμακομορίου που έχει αποδεσμευθεί, αντίστοιχα. Το σύστημα το

οποίο περιείχε ένα ευρύ φάσμα σωματιδίων απέφερε $d_f=2.734$ και ήταν πλησιέστερα στη διάσταση του σπόγγου του Menger. Οι ρεολογικές ιδιότητες των εναιωρημάτων σε βαρεία υγρή παραφίνη μελετήθηκαν σε διαφορετικούς τύπους μικροσφαριδίων έχοντας μία ποικιλία βαθμού της τραχύτητας της επιφάνειας (Nyström et al., 2010). Βρέθηκε ότι το ιξώδες των εναιωρημάτων αυξήθηκε όταν η επιφάνεια των σωματιδίων ήταν πιο τραχεία. Το αποτέλεσμα αποδίδεται στην αντίσταση στη ροή εξαιτίας της εσωτερικής τριβής μεταξύ των μικροσφαριδίων εντός του εναιωρήματος. Μία προσέγγιση βασίζεται στην θεωρία της διήθησης για τη μελέτη του ιξώδους των υπέρκορων εναιωρημάτων έχει προταθεί (Koch, 1993). Μία ρεολογική προσέγγιση, συγκεκριμένα η μορφοκλασματική προσέγγιση της κροΐδωσης ως ένα νέο αναλυτικό εργαλείο για τον πλήρη χαρακτηρισμό του φαρμακομορίου καθώς και της δομής των συσσωματωμένων σωματιδίων στο εναιώρημα έχει πρόσφατα εισαχθεί σε φαρμακευτικά εναιωρήματα λιπιδικής φύσης, που χρησιμοποιούνται για την πλήρωση καψουλών (de Kruijff et al., 2013). Η γεωμετρική κατανομή των αιωρούμενων σφαιρικών πληρωτικών μέσων, τα οποία σχηματίζουν μικροσκοπικά συμπλέγματα με μορφοκλασματική εμφάνιση είναι αντιπροσωπευτικά για τις χαρακτηριστικές ιδιότητες τέτοιων εναιωρημάτων.

1.3.2 Το μορφοκλασματικό ολόγραμμα της φαρμακευτικής νανοτεχνολογίας

1.3.2.1 Η αυτό-συναρμολόγηση των νανοϋλικών

Στις επιστήμες της ζωής, η γνώση του μηχανισμού αλληλεπίδρασης σε μικρές αποστάσεις μεταξύ των βιομόρων που έχουν εμβαιπτιστεί σε ένα διάλυμα ηλεκτρολύτη είναι πολύ σημαντική για την διασαφήνιση για των βιολογικών διαδικασιών που εμπλέκονται σε πολλά κυτταρικά φαινόμενα, όπως η μεμβρανική σύντηξη και αυτές οι διαδικασίες ανακλούν στη λειτουργικότητά τους. Επιπρόσθετα, η αυτό-συναρμολόγηση είναι η πιο ενδιαφέρουσα ιδιότητα από αυτές που προκύπτουν στη νάνο κλίμακα ή στο μεσοσκοπικό επίπεδο. Η μοριακή αυτό-συναρμολόγηση (molecular self-assembly) είναι μία στρατηγική νανοδόμησης σε μοριακό και υπερ-μοριακό σχεδιασμό, με έναν τρόπο που λειτουργεί συμπληρωματικά σε θέματα συνυπολογισμού για την επίτευξη της επιθυμητής δομής. Αυτός ο μηχανισμός δομησης επιφέρει πολλά και διαφορετικά πλεονεκτήματα:

υπερβαίνει τα πιο δύσκολα στάδια στην νανοδόμηση, δηλαδή αυτή που περιλαμβάνει την τροποποίηση της ύλης σε ατομικό επίπεδο, με έναν ξεκάθαρο τρόπο, και τείνει να παράγει σταθερές και σχετικά τέλειες δομές, αφού απαιτεί η δομές που προκύπτουν να είναι η θερμοδυναμικά πιο σταθερές (Whitesides and Grzybowski, 2007). Επιπρόσθετα, η ευμετάβλητη νανοτεχνολογία (soft nanotechnology) είναι σχετικά ένα νέο επιστημονικό και τεχνολογικό πεδίο που ασχολείται με τα ευμετάβλητα νανοϋλικά (soft nanomaterials) (Hamley, 2003; Nayak and Lyon, 2005; Whitesides and Lipomi, 2009). Αυτά τα υλικά έχουν μοναδικές λειτουργικές ιδιότητες με διαστάσεις στην νανο-κλίμακα, αν αξιοποιηθούν αποτελεσματικά, μπορούν να οδηγήσουν σε συστήματα μηχανικής με πολύ χρήσιμα χαρακτηριστικά. Από την άλλη πλευρά, τα βιοϋλικά είναι εξαιρετικής οργάνωσης από το μοριακό επίπεδο στη νάνο και μάκρο- κλίμα, συχνά με έναν ιεραρχικό τρόπο, με περίπλοκες νανο-αρχιτεκτονικές, οι οποίες δημιουργούν μία μυριάδα διαφορετικών λειτουργικών μαλακών και σκληρών ιστών. Τα περισσότερα από τα φυσικά αντικείμενα και τα συστήματα που συναντώνται στον πραγματικό κόσμο δομούνται με έναν ολοκληρωτικά μη αναστρέψιμο και άτακτο τρόπο. Στις μη αναστρέψιμες διαδικασίες, οι λεπτομέρειες του μηχανισμού ανάπτυξης φαίνεται να διαδραματίζουν έναν πρωταρχικό ρόλο στον καθορισμό των σχημάτων που προκύπτουν για τα αντικείμενα.

1.3.2.2 Η εφαρμογή της fractal γεωμετρίας στη φαρμακευτική νανοτεχνολογία

Οι φυσικές ιδιότητες της νανοκλίμακας είναι αρκετά διαφορετικές από αυτές της μακροσκοπικής κλίμακας δίδοντας νέες και πιο συναρπαστικές ιδιότητες για την ανάπτυξη καινοτόμων και χρήσιμων εφαρμογών. Από την άλλη πλευρά, η νανοτεχνολογία ουσιαστικά σχετίζεται με το πρόβλημα της πρόβλεψης των ιδιοτήτων της ύλης στη νανομετρική κλίμακα. Το πρόβλημα αυτό χαρακτηρίζεται από το επονομαζόμενο $(N+1)$ πρόβλημα: οι ιδιότητες του συστήματος με N σωματίδια είναι αρκετά διαφορετικές από τις ιδιότητες του συστήματος που αποτελείται από $(N+1)$ σωματίδια (Cerofini et al., 2008). Επιπρόσθετα, η νανοτεχνολογία είναι η τεχνολογία που αφορά διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στην κλίμακα μεγέθους που αφορά το ένα δισεκατομμυριοστό του μέτρου. Σύμφωνα με τον M. Saladin El Naschie (2006) η

νανοτεχνολογία είναι: «η τεχνολογία που εφαρμόζεται στην γκρίζα περιοχή μεταξύ της κλασσικής μηχανικής και της κβαντομηχανικής».

Η φαρμακευτική νανοτεχνολογία είναι ένας πολλά υποσχόμενος διεπιστημονικός τομέας που καλύπτει ζητήματα από την μοριακή βιολογία και τη βιοχημεία, την επιστήμη των κολλοειδών, και την ιατρική (Hughes, 2005; Marcato et Durán, 2008; Ravichandran, 2009; Mishra et al., 2010; Souza et al., 2010). Ένας από τους πιο ελπιδοφόρους τομείς της φαρμακευτικής νανοτεχνολογίας στη φαρμακευτική είναι οι νανοφορείς για τη μεταφορά φαρμακομορίων, όπως είναι τα λιποσώματα τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των βιο-κολλοειδών νανοσωματιδίων (Bangham et al., 1965; Gregoriadis et al., 1974). Μικρά μονοστοιβαδικά καθώς και μεγάλα πολυστοιβαδικά λιποσώματα, που αποτελούνται από φωσφολιπίδια και τα παράγωγά του, επηρεάζουν αξιωματικά τη δραστηριότητα των χημικών ουσιών που εγκλείονται σε αυτά τα κυστίδια. Τα παραπάνω μπορούν να περιγραφούν με τις εξισώσεις που αφορούν την κλασματική διάσταση του μέσου της αντίδρασης κατά τη διάρκεια μία μελέτης χρησιμοποιώντας την τεχνική της φωταύγειας (luminescence decay technique) σε διάφορους τύπους τέτοιων κυστιδίων. Το ιξώδες της υγρής φάσης, το οποίο μπορεί να αυξηθεί με την προθήκη χοληστερόλης, είναι μία κρίσιμη παράμετρος για τη χημική ικανότητα αντίδρασης των ενώσεων εγκλεισμού, καθώς αυξάνεται η ακαμψία των κυστιδίων πιθανότητα μειώνεται η πολυδιασπορά.

Νανοςυστήματα που παράγονται από το συνδυασμό των λιποσωμάτων και των δενδριμερών αποτελούν μία νέα κατηγορία ευμετάβλητων νανοφορέων μεταφοράς φαρμακομορίων (soft drug delivery nanocarriers) και πρόσφατα έχουν χαρακτηριστεί ως Ρυθμιζόμενα Λιποσωματικά Συστήματα Ελεγχόμενης Αποδέσμευσης (Modulatory Liposomal Controlled Released Systems- MLCRSs) (Papagiannaros et al., 2005; Demetzos 2010, a,b; Demetzos, 2011). Πρόσφατα αυτά τα συστήματα κατηγοριοποιήθηκαν σε υβριδικά (hybrid) και χιμαιρικά (chimeric) και χαρακτηρίστηκαν ως καινοτόμα συστήματα μεταφοράς φαρμακομορίων της νανοτεχνολογίας (advanced Drug Delivery nano Systems - aDDnSs) (Demetzos 2010, a,b; Demetzos, 2011; Gardikis et. al., 2010 a,b, 2011). Προκλινικές μελέτες έχουν αποδείξει πως τα aDDnSs μπορούν να επηρεάσουν τη φαρμακοκινητική καθώς και τις ιδιότητες ADME (Absorption, bioDistribution, Metabolism and Excretion) του ενσωματωμένου φαρμακομορίου Gardikis et. al., 2010a,b, 2011; Kontogiannopoulos et. al., 2012). Τα aDDnSs μπορούν να χαρακτηριστούν ως μεικτά νανοςυστήματα

εξαιτίας το συνδυασμο ύδιαφο ρτικής φύσης βιο-νανοϋλικών και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για βιομιμητική μεταφορά και παράδοση φαρμακομορίων (biomimetic delivery) (Balmert and Little, 2012). Το εξαιρετικό ενδιαφέρον σε τέτοια συστήματα πηγάζει από τις δυνατότητες για τη βασική κατανόηση των βιολογικών μοτίβων συμπεριφοράς τους, δεδομένου ότι τα βιολογικά συστήματα χρησιμοποιούν εκτενώς μεικτά υλικά για να δημιουργήσουν πολυλειτουργικές αυτό-συναρμολογούμενες νανοδομές (multi-functional self-assembled nanostructures) (Pispas and Sarantopoulou, 2007; Pispas, 2011a,b).

Η φαρμακευτική νανοτεχνολογία βασικά προσανατολίζεται στην περιοχή της μεταφοράς φαρμακομορίων, ειδικότερα στις κολλοειδείς διασπορές (Cerofini et al., 2008; de Villires, 2009; Mishra et al., 2010; Crommelin and Florence, 2013). Οι νανοφορείς έχουν τη δυνατότητα να παρέχουν αμέτρητες ευκαιρίες στον τομέα της μεταφοράς και παράδοσης φαρμακομορίων. Βελτιώνουν τη διαλυτότητα των υδρόφοβων βιοδραστικών συστατικών και αυξάνουν τη σταθερότητα των θεραπευτικών παραγόντων και των βιομορίων όπως είναι τα πεπτίδια. Βελτιώνουν τα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά των ενσωματωμένων βιομορίων, μειώνουν την τοξικότητα τους και βελτιώνουν το λόγο κινδύνου / οφέλους (risk-to-benefit ratio). Κολλοειδείς νανοφορείς, όπως είναι τα λιποσώματα, τα πολυμερικά νανοσωματίδια κ.ά., μπορούν να κατηγοριοποιηθούν στην πιο γενική κατηγορία της «ευμετάβλητης ύλης» (soft matter), η οποία περιλαμβάνει μία μεγάλη ποικιλία υλικών, τα οποία δεν μπορούν να κατηγορηθούν ως στερεά ή υγρά και μπορούν εύκολα να παραμορφωθούν, επειδή αποτελούνται από απλά μόρια που αναδιατάσσονται (Bonacucina et al., 2009). Στην πρόσφατη δημοσίευσή τους, ο Liu και οι συνεργάτες του (2012) τονίζουν την πρόσφατη πρόοδο που έχει συντελεστεί στο σχεδιασμό και στην παρασκευή νανοσωματιδίων με διάφορα σχήματα με μοναδικές ιδιότητες μεταφοράς φαρμακομορίων. Τα σχήματα αυτών των φορέων διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη διαδικασία μεταφοράς του θεραπευτικού παράγοντα, όπως και της πρόσληψης των σωματιδίων (particle adhesion), της βιοκατανομής (biodistribution) και της κυτταρικής εσωτερίκευσης (cell internalization) (Gaumet et al., 2008).

Στην πραγματικότητα, τα fractal αντικείμενα, τα συστήματα και οι διαδικασίες στο χρόνο διαθέτουν ιδιότητες πολλαπλών κλιμάκων ενώ αυτό-όμοια μοτίβα συχνά παρατηρούνται στη φύση, ειδικά στη νανοκλίμακα. Οι φυσιολογικές συνέπειες των

fractal εννοιών είναι ακόμα σοβαρότερες καθώς οι fractal δομές, τα συστήματα και οι διαδικασίες είναι πανταχού παρούσες στους έμβιους οργανισμούς, όπως ο πνεύμονας, νευρικά δίκτυα, η κινητική ιονικών διαύλων, η εσπειρωμένη δομή του εγκεφάλου, και η κατανομή της ροής του αίματος στα αιμοφόρα αγγεία. Εκτός τούτου, πολλές εφαρμογές των fractals υπάρχουν στην ποσοτικοποίηση της μορφολογίας των επιφανειών, όπως η επιφανειακή περιοχή ενός φαρμακομορίου και οι αντιδράσεις στην επιφάνεια των πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, η fractal γεωμετρία είναι ένα εργαλείο για την περιγραφή συστημάτων και συσκευών στο νανόκοσμο, και της κινητικής των φυσικών φαινομένων όπως της συσσωμάτωσης των λιποσωματικών και των πολυμερικών νανοσωματιδίων και της μεμβρανικής σύντηξης σε αυτή την κλίμακα μεγέθους (Lattuada et al., 2001, 2003a,b; Sabín et al., 2007a,b; Roldán-Vargas et al., 2008, 2009, Crivoi and Duan, 2012; Pippa et al., 2012a,b,c; Wu et al., 2012; Hadjide metriou et al., 2013; Gasilova et al., 2013; Meng et al., 2013). Ακόμη, η fractal ανάλυση έχει χρησιμοποιηθεί για να καθορίσει τη μορφολογία των κολλοειδών νανοδομών. Η μορφοκλασματική ανάπτυξη των συσσωματωμάτων των δενδριμερών PAMAM (poly(amidoamine)) έχει παρατηρηθεί εξαιτίας της διαδικασίας της αυτό-συναρμολόγησης τους (Metulio et al., 2004; Jasmine and Prasad, 2010), ενώ η διαδικασία της πολυμερικής ανάπτυξης και της κινητικής της συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων χρυσού έχουν περιγραφεί από την fractal γεωμετρία με στόχο την κατανόηση της φυσικής τους συμπεριφοράς (Ogasawara et al., 2000; Sotiriou et al., 2007; Kim et al., 2008). Η νανοτεχνολογία επιτρέπει σε επιστήμονες από διαφορετικά πεδία να διατυπώνουν εναλλακτικές υποθέσεις από τις πειραματικές παρατηρήσεις, οι οποίες οδηγούν σε πιο ρεαλιστικές εξηγήσεις σε σύγκριση με τις παραδοσιακές προσεγγίσεις, ειδικότερα στη νανοκλίμακα. Η μεταφορά βιομορίων μπορεί να βελτιωθεί από τα καινοτόμα συστήματα μεταφοράς φαρμακομορίων της νανοτεχνολογίας, όπως περιγράφηκε προηγουμένων, χρησιμοποιώντας θεραπευτικούς κολλοειδείς νανοφορείς, συμπεριλαμβανομένων των πολυμερικών νανοσωματιδίων, των μικκυλίων (Torchilin, 2007), των πολυμερικά μικκυλίων (Torchilin, 2004), των νανοσωλήνων (Li et al., 2010) και των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων, καθώς και των νανορομπότ (nanorobotics) (Kostarelos, 2010; Igbal et al., 2012).

Επιπλέον, θα πρέπει να σημειωθεί πως ο ορισμός της νανοτεχνολογίας βασίζεται στη διαστατικότητα (dimensionality) των νανοσωματιδίων και μπορεί να επηρεάσει τη

διαδικασία της παρασκευής τους καθώς οι κατασκευαστές τους θα πρέπει να υπακούσουν σε αυστηρά κριτήρια και νομοθεσία, για να διανέμουν τα προϊόντα τους στην αγορά (Wagner et al., 2006; Caruthers et al., 2007). Η οδηγούσα δύναμη για την παραγωγή καινοτόμων νανοδομημένων υλικών είναι η τεχνολογία (Wagner et al., 2006). Στη μεταφορά φαρμακομορίων, η ικανότητα των νανοσωματιδίων να ενσωματώνουν τα βιολογικά και να διασχίζουν της βιολογικές μεμβράνες ή να βελτιώνουν τη διαλυτότητα αδιάλυτων σε υδατικά μέσα φαρμακολογικά δραστικών μορίων, προσφέρει μία ελκυστική περιοχή έρευνας και ορίζει το «υλικό» και ιδιαίτερα το «βιοϋλικό». Αυτό είναι σημαντικό, όχι μόνο από επιστημονικής άποψης αλλά να εφαρμοστούν αποτελεσματικά στα νέα βιο-υλικά για μεταφορά φαρμακομορίων ή ως εμφυτεύματα με αύξηση της βιοσυμβατότητάς τους. Όμως, οι δομικές ιδιότητες και η αυτό-συναρμολόγηση των μορίων σε ατομικό επίπεδο σε δεδομένο μέσο με ανάλογες συνθήκες, υπερνικά τις συμβατικές αρχές και νόμους των μαθηματικών και στην φυσικής. Πιστεύουμε πως οι παραγωγοί μπορούν να ενστερνιστούν τις νέες ιδέες στον ορισμό των βιοϋλικών που μπορούν να προσφέρουν στις βιοϊατρικές ανάγκες, από τη μελέτη των μοναδικών ιδιοτήτων της νανοκλίμακας χρησιμοποιώντας νέα εργαλεία για την ανίχνευση των ιδιοτήτων τους.

1.3.2.3 Η μορφοκλασματική μορφολογία των νανοσωματιδίων

Η διαδικασία ανάπτυξης φαίνεται να είναι συμβατική όσον αφορά τις ιδιότητες των νανοσωματιδίων, οι οποίες απαιτούνται για να καλύψουν τα ρυθμιστικά κριτήρια που θα πρέπει να πληρούνται πριν την κυκλοφορία του προϊόντος στην αγορά. Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν και εφαρμόζονται διάφορες επικυρωμένες τεχνικές για το χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων όπως είναι τεχνικές σκέδασης φωτός, περίθλαση ακτίνων X, μικροσκοπικές τεχνικές (Πίνακας 1.2) μεταξύ των χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών τεχνικών, δεν υπάρχει ακόμα μία καθορισμένη μέθοδος ανάλυσης για το χαρακτηρισμό της μορφολογίας των νανοσωματιδίων.

Πίνακας 1.2: Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των νανοσυστημάτων. (de Villiers et al., 2009)

Παράμετρος	Μέθοδος
Μέγεθος σωματιδίου, κατανομή, και μορφολογία	Δυναμική σκέδαση φωτός Φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων Ηλεκτρονική μικροσκοπία
Επιφάνεια, Πορώδες	Προσρόφηση αερίου
Φορτίο επιφάνειας, υδροφιλικότητα	Ηλεκτροφόρηση
Ιδιότητες επιφάνειας	Static secondary ion mass spectroscopy Mössbauer spectroscopy
Ανάλυση στοιχείων επιφάνειας	X-ray φωτο-ηλεκτρονική φασματοσκοπία
Πυκνότητα	Πυκνόμετρο
Μοριακό βάρος	Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού
Καθαρότητα	Φασματοσκοπία, FTIR, NMR
Πολυμορφισμός, Κρυσταλλικότητα	Περίθλαση ακτίνων X Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης
Υπολείμματα διαλυτών	Αέριος χρωματογραφία
Αποδέσμευση φαρμακομορίου	Έλεγχος της αποδέσμευσης Θολερότητα

Θα πρέπει να σημειωθεί πως επικυρωμένες μετρήσεις και τεχνικές είναι σημαντικές για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των νανοσωματιδίων και των νανοφαρμακευτικών προϊόντων που αφορούν καινοτόμα ιατρικά σκευάσματα και πως τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους μπορεί να επηρεάσουν την ποιότητα του τελικού σκευάσματος. Όλα τα παραπάνω ζητήματα είναι κρίσιμα για την απόδειξη του ελέγχου της παραγωγικής διαδικασίας και για να αιτιολογήσουν την κινητική της αποδέσμευσης του φαρμακομορίου, καθώς και προσεγγίσεις που αφορούν τις μελέτες βιοϊσοδυναμίας. Από την ευκλείδεια άποψη, το προεπιλεγμένο σχήμα για τα νανοφαρμακευτικά προϊόντα θεωρείται πως είναι το σφαιρικό, αλλά κύλινδροι,

δίσκοι, σωλήνες, βελόνες και τυχαία σχήματα υπάρχουν. Από την άλλη πλευρά, η νανοτεχνολογία επιτρέπει στους επιστήμονες να σχεδιάσουν μία μεγάλη ποικιλία βιο-νάνο-μορίων με συγκεκριμένα φυσικά, χημικά και βιολογικά χαρακτηριστικά, καθένα με συγκεκριμένο μέγεθος, φορτίο, υδροφιλικότητα, σχήμα και ελαστικότητα. Επιπρόσθετα, σφαιρικά νανοσωματίδια έχουν οδηγήσει σε αξιοποιήσιμες γνώσεις όσον αφορά τη φυσική τους συμπεριφορά, αλλά αρκετά αντικείμενα που απαντώνται στη φύση είναι μη σφαιρικά, και βιολογικές διαδικασίες συμβαίνουν τυπικά κάτω από δυναμικές συνθήκες στις οποίες η κίνηση των σφαιρικών και των μη σφαιρικών κυστιδίων ή των υπερμοριακών συσσωματωμάτων διαφέρουν.

Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι ο έλεγχος των νανοδομημένων βιο-υλικών όπως τα λιποσώματα, τα πολυμερή, τα δενδριμερή, τα φουλλερένια και οι νανοσωλήνες είναι πολύ σύνθετος και χρειάζεται επιπλέον αναζήτηση από τις ρυθμιστικές αρχές, ενώ ο ρόλος των ειδημόνων στον τομέα της Φαρμακευτικής Νανοτεχνολογίας θεωρείται ως ο πλέον σημαντικός. Υπάρχουν αρκετά προόδια της νανοκίμακας στην αγορά εκτός των λιποσωμάτων, τα οποία θεωρούνται και τα πιο διαδομένα στην κλινική χρήση.

Από το συνδυασμό λιποσωμάτων με αμφίφιλα συμπολυμερή, πιο σταθερά συστήματα μπορούν να ληφθούν, συνήθως γνωστά ως αόρατα από το ανοσοποιητικό σύστημα ή στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα (Stealth or Sterically Stabilized liposomes) (Cattel et al., 2004; Immordino et al., 2006; Mufamadi et al., 2011; Pippa et al., 2013a,b,c). Αυτά τα συστήματα χαρακτηρίζονται ως μεικτά συστήματα και ανήκουν στα ρυθμιζόμενα λιποσωματικά συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης. Ο έλεγχος ποιότητας των προαναφερθέντων συστημάτων αποτελεί μία πρόκληση και νέες καινοτόμες προσεγγίσεις χρειάζονται με στόχο τη ταυτοποίηση της συμπεριφοράς τους και τη λειτουργικότητάς τους. Οι καθιερωμένες τεχνικές για τη μέτρηση του μεγέθους των σωματιδίων και της κατανομής μεγέθους των σωματιδίων, το φορτίο επιφανείας, η ακαμψία των διπλοστοιβάδων, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βιο-υλικών, οι συζεύξεις μεταξύ των πρωτεϊνών, για τη μελέτη της σταθερότητας σε διαφορετικά μέσα διασποράς και σε διαφορετικές θερμοκρασίες καθώς και το σχήμα, τα χαρακτηριστικά επιφανείας που βασίζονται στη χημεία τους, καθώς και στα χαρακτηριστικά θερμοδυναμικής και φυσικής θεωρούνται αρκετά πολύπλοκα συνθέτοντας ένα πολύπλοκο περιβάλλον και για τους παραγωγούς τους. Επιπρόσθετα, η χημική σύσταση, το μέγεθος και η κατανομή μεγέθους, η

τροποποίηση της επιφανείας (φορτίο επιφανείας και PEGylation) και σύνδεση με ομάδα στόχευσης είναι κρίσιμοι παράγοντες, οι οποίοι έχουν αποδειχτεί πως επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά ADME του νανοφορέα που βρίσκεται στη συστηματική κυκλοφορία (Owens and Peppas, 2006; Alexis et al., 2008; Amoozgar et al., 2012; Yoo et al., 2012). Σύμφωνα με την πρόσφατη βιβλιογραφία, οι μοριακές παράμετροι, όπως είναι το σχήμα και η ελαστικότητα των σωματιδίων, ειδικότερα η αλληλεξάρτηση του μεγέθους του και του σχήματος, επιδρά στις βιολογικές και στις φαρμακοκινητικές διεργασίες (Champion et al., 2006, 2007; Canelas et al., 2009; Tomalia, 2009; Longmire et al., 2011). Το σχήμα των νανοσυστημάτων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις θεραπευτικές διαδικασίες, όπως είναι η προσκόλληση των σωματιδίων στους βιολογικούς ιστούς και η βιοκατανομή (Liu et al., 2012). Οι αλληλεπιδράσεις των νανοσωματιδίων με τα κύτταρα είναι γνωστό ότι επηρεάζονται από το σχήμα των νανοφορέων (Gratton et al., 2008, Lacerda et al., 2008; Huang et al., 2010; Wang et al., 2011).

Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί πως ο έλεγχος της μορφολογίας των νανοσωματιδίων αποτελεί πλεονέκτημα για την αξιοποίηση της λειτουργικότητας του και των ιδιοτήτων του σε αρκετές νέες αναδυόμενες τεχνολογίες. Η fractal ανάλυση (χρησιμοποιώντας τεχνικές σκέδασης φωτός) έχει πρόσφατα χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει τη μορφολογία λιποσωματικών νανοσωματιδίων (Lattuada et al., 2001; Lattuada et al., 2003a,b; Sabín et al., 2007a,b; Roldán-Vargas et al., 2008, 2009; Pippa et al., 2012a,b,c) και έχει θεωρηθεί ως συμπληρωματική αναλυτική τεχνική για τον προσδιορισμό της κατανομής μεγέθους των σωματιδίων (Kanniah et al., 2012). Η fractal ανάλυση έχει επίσης χρησιμοποιηθεί στη μοριακή βιολογία (Minry, 2011; Bancaud et al., 2012) και στην εφαρμοσμένη χημεία (Harshe et al., 2010; Harshe and Lattuada, 2012; Schaeublin et al., 2012).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το σχήμα είναι εξαιρετικής σημασίας για το μηχανισμό εσωτερίκευσης του νανοσωματιδίου στο κύτταρο και την κινητική του θεραπευτικού παράγοντα (Champion and Mitragorti, 2006; Goldberg et al., 2007; Gratton et al., 2008). Αντίθετα, το σχήμα επηρεάζει τις βιολογικές διαδικασίες και τους μηχανισμούς αλλά δεν είναι πλήρως γνωστός ο τρόπος με τον οποίο αυτό γίνεται, ειδικότερα όσον αφορά τη νανοκλίμακα και εξαιτίας των παρελθόντων περιορισμών στον έλεγχο της παρασκευής των νανοσωματιδίων (Goldberg et al., 2007). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι συστήματα μεταφοράς φαρμακομορίων με ειδικό σχήμα

παρουσιάζοντες πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τα σφαιρικά (Wang et al., 2011). Επιπλέον, νηματοειδή νανοσωματίδια μπορούν να βοηθήσουν την πρόσληψη από τα μακροφάγα και μπορούν να διευκολύνουν την αγγειακή προσκόλληση (αφορά και τα μικροσωματίδια αυτή η παρατήρηση).

Όμως, είναι σαφές ότι το κανονιστικό πλαίσιο στη Ευρωπαϊκή Ένωση θεωρείται εξαιρετικά πολύπλοκη και χρειάζεται ειδικές ρυθμίσεις για να εξασφαλιστεί ότι το τελικό προϊόν συναντά τις απαιτήσεις που αφορούν τις παραμέτρους φαρμακοκινητικής (την αποδέσμευση του δραστικού συστατικού, την βιοκατανομή, τη συσσώρευση στους ιστούς, βιο-διάσπαση και την κάθαρση). Το ζήτημα των απαιτήσεων που αφορά με τις φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές των προϊόντων της νανοκλίμακας παραμένει ακόμα σε διαβούλευση. Η βιβλιογραφία επισημαίνει ότι οι όροι «μέγεθος» και «νανοϋλικό» θα πρέπει να ληφθούν υπόψη από τις κανονιστικές διατάξεις, όπως ορίζονται από τις επιστημονικές εργασίες και εκθέσεις (Vamvakas et al., 2011; Rowland et al., 2012). Υπάρχει ένας μεγάλος διαθέσιμων τεχνικών για το χαρακτηρισμό της δομής των συσσωματωμάτων που σχηματίστηκαν από σωματίδια που βρίσκονταν σε διασπορά ή απειώρηση σε μικρο- και νανο- κλίμακα και για το χαρακτηρισμό της κλασματικής διάστασης (Gregory, 2009).

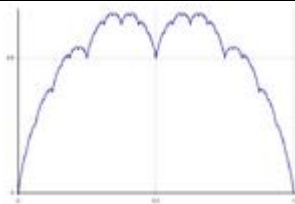
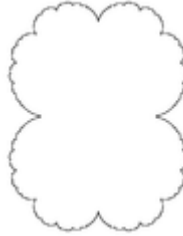
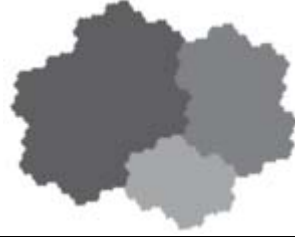
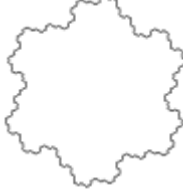
Πίνακας 1.3: Τεχνικές για τον καθορισμό της κλασματικής διάστασης.

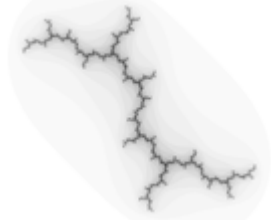
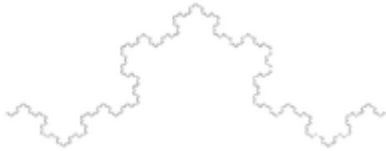
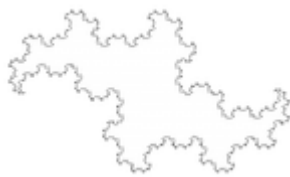
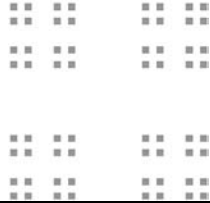
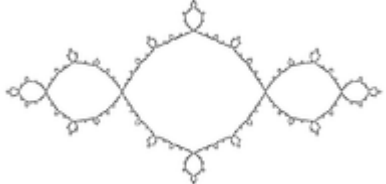
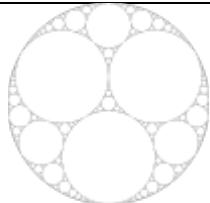
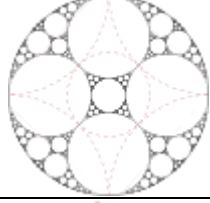
Τεχνική	Αναφορές
Στατική Σκέδαση Φωτός	Chu and Liu, 2000; Bushell et al., 2002; Gregory, 2009; Link et al., 2011
Μικρής γωνίας σκέδαση ακτίνων X	Chu and Liu, 2000; Bushell et al., 2002; Gregory, 2009; Link et al., 2011
Μικρής γωνίας σκέδαση νετρονίων	Chu and Liu, 2000; Bushell et al., 2002; Gregory, 2009; Link et al., 2011
Δυναμική Σκέδαση Φωτός	Chu and Liu, 2000; Bushell et al., 2002; Gregory, 2009; Link et al., 2011
Μεγάλης γωνίας περίθλαση ακτίνων X	Chu and Liu, 2000; Bushell et al., 2002; Gregory, 2009; Link et al., 2011
Μετρήσεις δυναμικής Ρεολογίας	Khan and Zoeller, 1993
Καθίζηση	Tang et al., 2000
Συνεστιακή Μικροσκοπία	Thill et al., 1998
Ηλεκτρονική Μικροσκοπία	Kimori et al., 2011; Iezzi et al., 2011

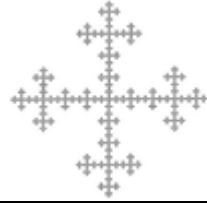
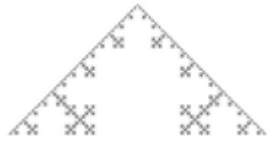
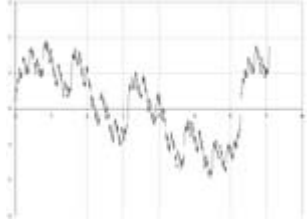
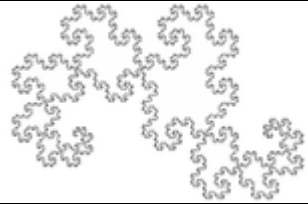
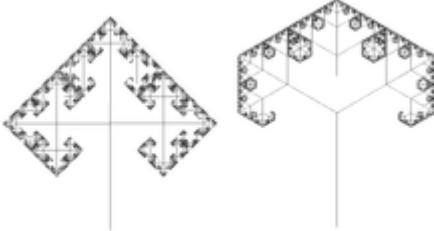
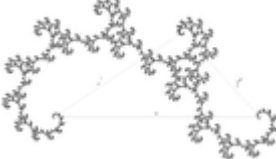
Η κατανομή μεγέθους των νανοσωματιδίων, ο φυσικοχημικός τους χαρακτηρισμός, η σταθερότητά τους σε διάφορα μέσα συμπεριλαμβανομένων και των βιολογικών, οι επιπτώσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα, και η γονιδοτοξικότητα (genotoxicity) θεωρούνται σημαντικές παράμετροι για να προταθούν κανονιστικές διατάξεις σχετικά με τα προϊόντα της νανοκλίμακας. Οι επιστημονικές προκλήσεις που προκύπτουν από τους περιορισμούς των ήδη υπάρχοντων μεθόδων ανάλυσης και την άγνωστη αξιοπιστία των νέων, εξαιτίας της διαφορετικής και μοναδικής συμπεριφοράς αυτών των νανোসυστημάτων σε βιολογικό υπόστρωμα. Περισσότερη επιστημονική έρευνα χρειάζεται για να παρέχει μία στέρεη βάση για την κατάλληλη αξιολόγηση της ποιότητας, της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας του αναδυόμενου τομέα της

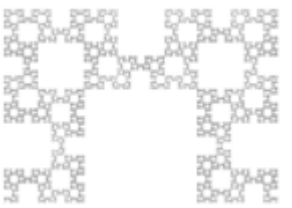
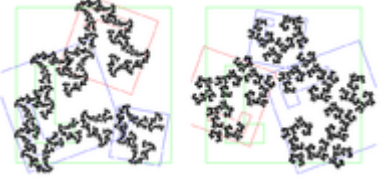
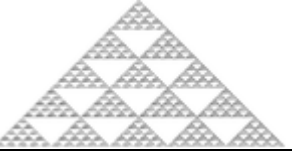
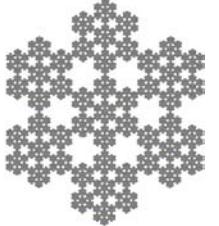
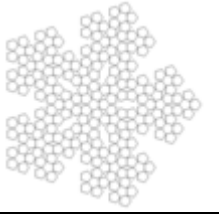
νανοϊατρικής. Ο ακριβής ρόλος της μορφολογίας και του σχήματος των νανοσωματιδίων που χρησιμοποιούνται στη μεταφορά φαρμακομορίων δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, πιθανότητα εξαιτίας της έλλειψης εύκολων μεθόδων και τεχνικών διαθέσιμων για τον έλεγχο του σχήματος των νανοσωματιδίων. Βέβαια, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το σχήμα, εκτός από την κατανομή μεγέθους και τη χημεία της επιφανείας, είναι χρήσιμο χαρακτηριστικό των νανοσωματιδίων. Το μέγεθος των σωματιδίων, μετράται απλά από την υδροδυναμική διάμετρο με βάση τις φανταστικές ευκλείδειες σφαίρες, και θα πρέπει να αναθεωρηθεί καθώς μη σφαιρικοί αλλά νανοφορείς με κλασματικές διαστάσεις έχουν αποδειχθεί ότι υπάρχουν με βάση τη βιβλιογραφία (Lattuada et al., 2001, 2003a,b; Sabín et al., 2007a,b; Roldán-Vargas et al., 2008, 2009, Pippa et al., 2012a,b,c). Ο χειρισμός των βιοφυσικών ιδιοτήτων των aDDnSs, ειδικά των χημικών συστημάτων, παρέχει έναν βελτιωμένο τρόπο ελέγχου της φαρμακοκινητικής και της φαρμακοδυναμικής του εγκλωβισμένου του φαρμακομορίου σε σύγκριση με το ελεύθερο φαρμακομόριο (Moghim and Szebeni, 2003; Allen et al., 2006). Έχει καθιερωθεί στη βιβλιογραφία ότι οι ρυθμιστικές θεωρήσεις είναι μεγάλης σημασίας με στόχο την παροχή αποδείξεων που αφορούν όχι μόνο το σχεδιασμό και την παρασκευή του συστήματος μεταφοράς φαρμακομορίου, αλλά επίσης και τα φυσικοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος (Chen, 2008). Από πειραματικής άποψης, η προσδιορισμένη κλασματική διάσταση απεικονίζει με περιεκτικό τρόπο την αυτό-συναρμολόγηση και τη μορφολογική πολυπλοκότητα των λιποσωματικών νανοφορέων (Pippa et al., 2012b,c). Επιπρόθετα, η κλασματική διάσταση κατέχει σημαντικό ρόλο στη διασαφήνιση των μορφολογικών χαρακτηριστικών, ενώ το μέγεθος και/ή η κατανομή μεγέθους των νανοσωματιδίων των νανοσωματιδίων δεν αλλάζει από την αλλαγή των κολλοειδών παραμέτρων, όπως της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης (González et al., 2002; Pippa et al., 2012b,c). Αυτό με τη σειρά του θα μπορούσε να είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την ανάπτυξη νανοφορέων για μεταφορά φαρμακομορίων και γονιδίων με πλήρη γνώση των δομικών και μορφολογικών τους χαρακτηριστικών. Οι τεχνικές για την εκτίμηση της κλασματικής διάστασης των νανοφορέων είναι αυτές που ήδη υπάρχουν στη βιβλιογραφία και συνοψίζονται στον Πίνακα 1.4.

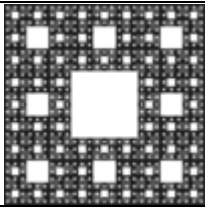
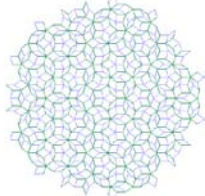
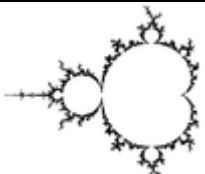
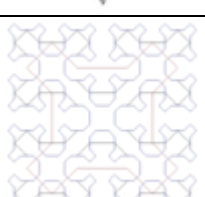
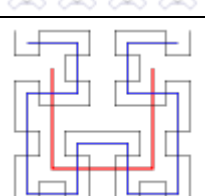
Πίνακας 1.4. Η κλασματική διάσταση **A.** σχημάτων και **B.** φυσικών αντικειμένων.

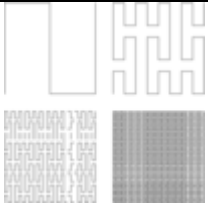
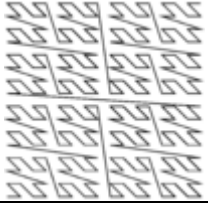
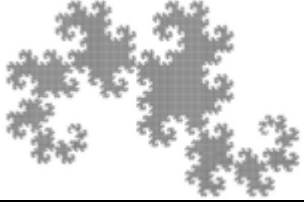
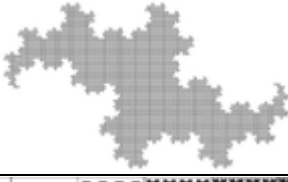
Διάσταση Hausdorf	Κλασματική διάσταση	Όνομα	Απεικόνιση
$\frac{\log 2}{\log 3}$	0.6309	Cantor set	
$\frac{\log 5}{\log 10}$	0.69897	Real numbers with even digits	
1	1	Smith–Volterra–Cantor set	
1	1.0000	Takagi or Blancmange curve	
Υπολογίστηκε	1.0812	Julia set $z^2 + 1/4$	
Λύση της: $2 a ^{3s} + a ^{4s} = 1$	1.0933	Boundary of the Rauzy fractal	
$2 \frac{\ln 3}{\ln 7}$	1.12915	contour of the Gosper island	

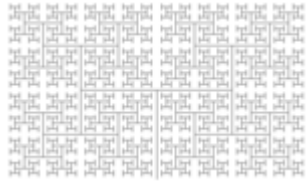
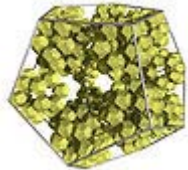
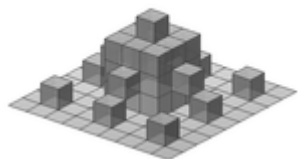
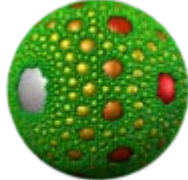
Μετρήθηκε (box counting)	1.2	Dendrite Julia set	
$3^{\frac{\log \phi}{\log (\frac{3 + \sqrt{13}}{2})}}$	1.2083	Fibonacci word fractal 60°	
$\frac{\log 4}{\log 3}$	1.2619	Koch curve	
$\frac{\log 4}{\log 3}$	1.2619	boundary of Terdragon curve	
$\frac{\log 4}{\log 3}$	1.2619	2D Cantor dust	
Υπολογίστηκε	1.2683	Julia set $z^2 - 1$	
Υπολογίστηκε	1.3057	Apollonian gasket	
Υπολογίστηκε	1.328	5 circles inversion fractal	
Υπολογίστηκε	1.3934	Douady rabbit	

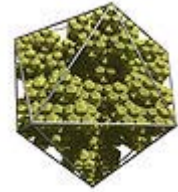
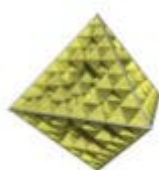
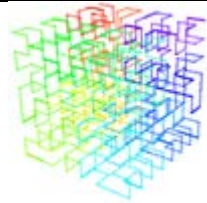
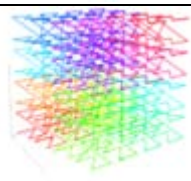
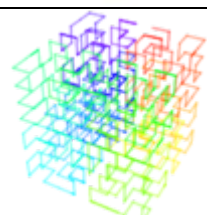
$\frac{\log 5}{\log 3}$	1.4649	Vicsek fractal	
$\frac{\log 5}{\log 3}$	1.4649	Quadratic von Koch curve (type 1)	
$2 - \frac{\log \sqrt{2}}{\log 2} = \frac{3}{2}$	1.5000	a Weierstrass function: $f(x) = \sum_{k=1}^{\infty} \frac{\sin(2^k x)}{\sqrt{2}^k}$	
$\frac{\log 8}{\log 4} = \frac{3}{2}$	1.5000	Quadratic von Koch curve (type 2)	
$\log \frac{1 + \sqrt[3]{73 - 6\sqrt{87}} + \sqrt[3]{3}}{\log 2}$	1.5236	Dragon curve boundary	
$\frac{\log 3}{\log 2}$	1.585	3-branches tree	
$\frac{\log 3}{\log 2}$	1.585	Sierpinski triangle	
$\frac{\log 3}{\log 2}$	1.585	Sierpinski arrowhead curve	
$\frac{\log \phi}{\log \sqrt{\phi}} = \phi$	1.61803	a golden dragon	

$1 + \frac{\log 3}{\log 2}$	1.6309	Pascal triangle modulo 3	
$3 \frac{\log \varphi}{\log (1 + \sqrt{2})}$	1.6379	Fibonacci word fractal	
$(1/3)^s + (1/2)^s + (2/3)^s = 1$	1.6402	Attractor of IFS with 3 similarities of ratios 1/3, 1/2 and 2/3	
$1 + \frac{\log 3}{\log 5}$	1.6826	Pascal triangle modulo 5	
$\frac{4 \log 2}{\log 5}$	1.7227	Pinwheel fractal	
$\frac{\log 7}{\log 3}$	1.7712	Hexaflake	
$\frac{\log 4}{\log 2(1 + \cos 85^\circ)}$	1.7848	Von Koch curve 85°	
$\frac{\log (3^{0.63} + 2^{0.63})}{\log 2}$	1.8272	A self-affine fractal set	
$\frac{\log 6}{\log (1 + \varphi)}$	1.8617	Pentaflake	

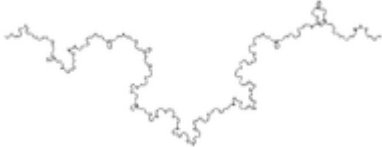
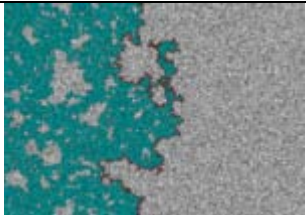
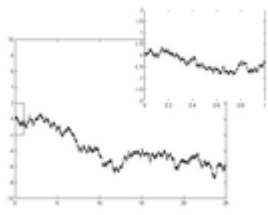
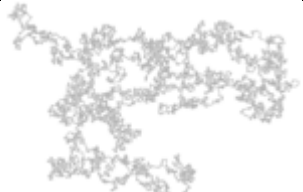
Λύση της: $6\left(\frac{1}{3}\right)^s + 5\left(\frac{1}{3\sqrt{3}}\right)^s = 1$	1.8687	Monkeys tree	
$\frac{\log 8}{\log 3}$	1.8928	Sierpinski carpet	
$\frac{\log 8}{\log 3}$	1.8928	3D Cantor dust	
Εκτιμήθηκε	1.9340	Boundary of the Lévy C curve	
	1.974	Penrose tiling	
2	2	Boundary of the Mandelbrot set	
2	2	Julia set	
2	2	Sierpinski curve	
2	2	Hilbert curve	

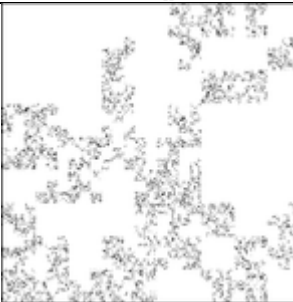
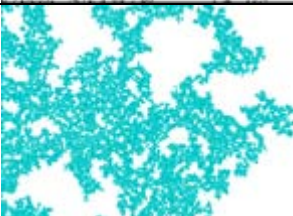
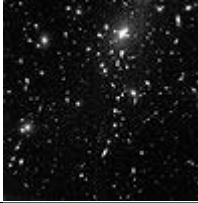
2	2	Peano curve	
2	2	Moore curve	
	2	Lebesgue curve or z-order curve	
2	2	Dragon curve	
	2	Terdragon curve	
2	2	T-Square	
2	2	Gosper curve	
Λύση της: $7(1/3)^s + 6(1/3\sqrt{2})^s$ $= 1$	2	Curve filling the Koch snowflake	
2	2	Sierpinski tetrahedron	

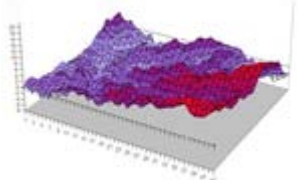
$\frac{\log 4}{\log 2} = 2$	2	H-fractal	
$\frac{\log 2}{\log (2/\sqrt{2})} = 2$	2	Pythagoras tree	
$\frac{\log 4}{\log 2} = 2$	2	2D Greek cross fractal	
	2.06	Lorenz attractor	
$\frac{\log 20}{\log (2 + \varphi)}$	2.3296	Dodecahedron fractal	
$\frac{\log 13}{\log 3}$	2.3347	3D quadratic Koch surface (type 1)	
	2.4739	Apollonian sphere packing	
$\frac{\log 32}{\log 4} = \frac{5}{2}$	2.50	3D quadratic Koch surface (type 2)	

$\frac{\log 16}{\log 3}$	2.5237	Cantor tesseract	no image available
$\frac{\log 12}{\log (1 + \varphi)}$	2.5819	Icosahedron fractal	
$\frac{\log 6}{\log 2}$	2.5849	3D Greek cross fractal	
$\frac{\log 6}{\log 2}$	2.5849	Octahedron fractal	
$\frac{\log 6}{\log 2}$	2.5849	von Koch surface	
$\frac{\log 20}{\log 3}$	2.7268	Menger sponge	
$\frac{\log 8}{\log 2} = 3$	3	3D Hilbert curve	
$\frac{\log 8}{\log 2} = 3$	3	3D Lebesgue curve	
$\frac{\log 8}{\log 2} = 3$	3	3D Moore curve	

B.

Διάσταση Hausdorf	Κλασματική διάσταση	Όνομα	Απεικόνιση
Μετρήθηκε	1.25	Ακτογραμμές της Μεγάλης Βρετανίας	
$\frac{\log 4}{\log 3}$	1.2619	von Koch curve	
$\frac{4}{3}$	1.33	Κίνηση Brown	
$\frac{4}{3}$	1.33	2D πολυμερές	
$\frac{4}{3}$	1.33	Percolation front in 2D, Corrosion front in 2D	
	1.40	Clusters of clusters 2D	
$2 - \frac{1}{2}$	1.5	Graph of a regular Brownian function	
Μετρήθηκε	1.52	Ακτογραμμές της Νορβηγίας	
Μετρήθηκε	1.55	Random walk	

$\frac{5}{3}$	1.66	3D πολυμερές	
	1.70	2D DLA σύμπλεγμα	
$\frac{\log(9 * 0.75)}{\log 3}$	1.7381	Fractal percolation with 75% probability	
$\frac{91}{48}$	1.8958	2D percolation cluster	
$\frac{\log 2}{\log \sqrt{2}} = 2$	2	Brownian motion	
Μετρήθηκε	περίπου 2	Κατανομή αστερών στο γαλάξια	
$\frac{\log 13}{\log 3}$	2.33	Κουνουπίδι	
	2.5	Μπάλες τσαλακωμένου χαρτιού	
	2.50	3D DLA σύμπλεγμα	

	2.50	Lichtenberg figure	
$3 - \frac{1}{2}$	2.5	regular Brownian surface	
Μετρήθηκε	2.52	3D percolation cluster	
Μετρήθηκε	2.66	Broccoli	
	2.79	Επιφάνεια του ανθρώπινου εγκεφάλου	
	2.97	Επιφάνεια πνεύμονα	
Υπολογίστηκε	3	Quantum string drifting randomly	
Υπολογίστηκε	$\in (0,2)$	Πολλαπλασιαστική αλληλουχία	

Επιπλέον, τα μικρογαλακτώματα έχουν αποκτήσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως συστήματα μεταφοράς φαρμακομορίων με ενδιαφέρουσες ιδιότητες. Τα σταγονίδια είναι τόσο μικρά που τα μικρογαλακτώματα εμφανίζονται μακροσκοπικά ως μονοφασικά συστήματα. Πρόσφατα, αναφέρθηκε πως αυθόρμητες μεταβολές της αγωγιμότητας, ο διηλεκτρικός εφesuχασμός και το δυναμικό ιξώδους των μικρογαλακτωμάτων μπορούν να ερμηνευθούν από τη θεωρία της διάχυσης, καθώς οι μεταβολές αυτών των ποσοτήτων επηρεάζονται από τη fractal δομή της διεσπαρμένης ύλης (Pinfield et al., 1997; Monoj et al., 2000; Hegelson et al., 2012). Ο Wu και οι συνεργάτες του (2005) υποστήριξαν ότι η διάχυση των πλoσωματιδιακών συμπλεγμάτων σε ενδοεπιφάνεια ελαίου-νερού είναι μία συνάρτηση του μεγέθους του συμπλέγματος και του ιξώδους της ελαιώδους φάσης και μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με την κλασματική διάσταση, ενώ είχε μελετηθεί και η κινητική της δημιουργίας τους, όπως είχε γίνει και για μεγαλύτερα κυστίδια.

1.4 Βιοφαρμακευτική και φαρμακοκινητική

Παραπλήσια στη φαρμακευτική τεχνολογία, η βιοφαρμακευτική, συμπεριλαμβανομένης και της φαρμακοκινητικής, εμφανίζεται η πιο πολλά υποσχόμενη περιοχή όπου τα fractals μπορούν να επιφέρουν πολλές καρποφόρες νέες εξελίξεις. Παρακάτω θα αναφερθούν κάποιες από τις εφαρμογές και τα πιθανά οφέλη από τη χρήση της fractal ανάλυσης μαζί με εκτιμήσεις της μη γραμμικότητας ως εργαλεία για λήψη πληροφοριών και πιο προεγγίσεων πιο κοντά στην πραγματικότητα που αφορούν τη διάλυση φαρμακομορίων και την αποδέσμευσή τους, καθώς και την απορρόφηση, διάθεση, μεταβολισμό και απέκκριση.

1.4.1 Διάλυση και αποδέσμευση φαρμακομορίου

Η βιοδιαθεσιμότητα (bioavailability) του φαρμακομορίου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη συμπεριφορά του κατά τη διάλυση του. Η διαδικασία της διάλυσης, και της *in vitro* και της *in vivo*, καθορίζεται από πολλές ιδιότητες του φαρμακομορίου, όπως η διαλυτότητα, τα χαρακτηριστικά της μορφοποίησης, όπως είναι το μέγεθος του

σωματιδίου, η κατανομή μεγέθους, το σχήμα και η μορφολογία του σωματιδίου, η περιοχή επιφανείας, ο βαθμός της πορώδους κ.ά. και τις συνθήκες του περιβάλλοντος όπως είναι το pH, η σύσταση, η ανάδευση και η κινητικότητα. Η κινητική της διάλυσης διέπεται από τον επανομαζόμενο νόμο της διάλυσης, όπως εκφράζεται από την εξίσωση των Noyes-Whitney ή την εξίσωση της κυβικής ρίζας των Hixson-Crowell και των τροποποιήσεων αυτών.

Οι Farin και Avnir (1992) εισήγαγαν την τραχύτητα της επιφανείας των σωματιδίων του φαρμακομορίου, η οποία είναι fractal σε πολλές περιπτώσεις, στις εξισώσεις των Noyes-Whitney and Hixson-Crowell. Η κλασσική σταθερά του σταθερού διάλυσης ισχύει μόνο για σωματίδια με λεία επιφάνεια. Τα σωματίδια με ακανόνιστη επιφάνεια, η οποία έχει μία χαρακτηριστική κλασματική διάσταση, δε ακολουθούν τις αρχικές εξισώσεις των Noyes-Whitney ή των Hixson-Crowell. Οι συγγραφείς έχουν παρουσιάσει ακριβείς εξισώσεις, που περιλαμβάνουν την κλασματική διάσταση, d_f , των σωματιδίων του φαρμακομορίου στην αρχική εξίσωση στο νόμο της διάλυσης (Fini et al., 1996; 1997, 2002; Tromelin et al., 1996). Η τροποποιημένη εξίσωση περιγράφει καλύτερα την κινητική της διάλυσης του φαρμακομορίου που βρίσκεται υπό τη μορφή κόκκων. Η γενική μορφή του νόμου της διάλυσης διαθέτει την ακόλουθη fractal μορφή:

$$-\frac{dw}{dt} = K \left(w_e^{d_f/a} - w_0 + w_t \right) \quad (7)$$

όπου w_e , w_0 και w_t είναι οι μάζες του φαρμακομορίου απαραίτητα για να κορέσει το διάλυμα, το αρχικό βάρος και το βάρος του διαλυμένου φαρμακομορίου μετά από χρόνο t (Fini et al., 1996; 1997, 2002; Tromelin et al., 1996).

Αργότερα, αρκετά άρθρα δημοσιεύτηκαν από την ομάδα του καθηγητή Μαχαίρα για τη μοντελοποίηση των στοχαστικών διαδικασιών του φαρμακομορίου, διάλυση και αποδέσμευση (Macheras et al., 1996; Macheras and Dokoumetzidis, 2000; Dokoumetzidis et al., 2005; 2007; 2010; Dokoumetzidis and Macheras, 2010). Η έννοια της fractal γεωμετρία μπορεί να εφαρμοστεί στην περιγραφή της πολυπλοκότητας της ετερογενούς φύσης των διαδικασιών του φαρμακομορίου στο ανθρώπινο σώμα και της διάλυσης των βιοδραστικών συστατικών (Dokoumetzidis et

al., 2004; Dokoumetzidis et al., 2008; Pereira 2010; Dokoumetzidis and Macheras, 2011).

Οι πρώτες μελέτες προσομοίωσης αναφέρθηκαν από τον Bunde και τους συνεργάτες του (1985). Εκτεταμένες τεχνικές προσομοίωσης για τη μελέτη της διάχυσης του Fick της αποδέσμευσης του φαρμακομορίου και σε ευκλείδειους και σε fractal χώρους εφαρμόστηκαν κάποια χρόνια αργότερα (Kosmidis et al., 2003a,b, 2006; Martínez et al., 2009). Αυτές οι μελέτες απέδειξαν ότι η κινητικής της αποδέσμευσης του φαρμακομορίου από ευκλείδεια και fractal υλικά μπορεί να περιγραφεί από την εξίσωση Weibull. Πιο σημαντικά, η τιμή του ν εκθέτη του ν χρο ν βρέθηκε να λειτουργεί ως ένδειξη του μηχανισμού της μεταφοράς του φαρμακομορίου διαμέσου της μήτρας (Papadopoulou et al., 2006). Εκτός τούτου, προσομοιώσεις Monte Carlo χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της διέλευσης, της διάλυσης και της πρόσληψης από ένα ετερογενές μοντέλο της γαστρεντερικής οδού (Kalampokis et al., 1999a,b). Αυτό το μοντέλο της από του στόματος απορρόφησης του φαρμακομορίου βασίστηκε στην τυχαία, δένδριτικού τύπου της εσωτερικής δομής που αναπαριστούν τις λάχνες του εντερικού σωλήνα, η εντερική διέλευση προσομοιάστηκε με δύο διαφορετικά μοντέλα διάχυσης (the blind ant and the myopic ant models).

1.4.2 Απορρόφηση, διαθεσιμότητα, μεταβολισμός και απέκκριση φαρμακομορίου

Η fractal γεωμετρία χρησιμοποιήθηκε για εξηγήσει μαθηματικά το αλλομετρικό μοντέλο των $3/4$ (West et al., 1997; 1999). Η μορφοκλασματική προσέγγιση προσφέρει τη δυνατότητα του καθορισμού της ανομοιογένειας της ηπατικής αιματικής ροής για την αιμάτωση του ήπατος και αξιολόγηση των λειτουργικών του επιπτώσεων (Weiss et al., 2012; Weiss, 2013). Σε αντίθεση με τη κλασσική φαρμακοκινητική στην οποία το διαμερισματικό σύστημα αποτελείται από έναν συγκεκριμένο αριθμό διαμερισμάτων, καθένα είναι ομοιογενές και καλά αναδεδυμένο και αλληλεπιδρά με τα εξωτερικά υλικά, τα βασικά υλικά και το φαρμακομόριο στο ανθρώπινο σώμα μεταφέρονται διαμέσου του χώρου των μορφοκλασματικών δικτύων των διακλαδισμένων σωλήνων, ενώ οι περιοχές της εσωτερικής επιφάνειας των οργανισμών για την ανταλλαγή υλικού λαμβάνει «την ανώτερη fractal τιμή»

(“maximally fractal”), εισάγοντας την τέταρτη διάσταση, η οποία επεξηγεί τον αλλομετρικό νόμο των $3/4$ (allometric law) (West et al., 1997; 1999). Πράγματι, για όλα τα είδη που μελετήθηκαν, συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων, το αρχείο καταγραφής του βασικού μεταβολισμού αναπαρίσταται γραφικά σε συνάρτηση με το σωματικό βάρος παράγει μία ευθεία με κλίση $3/4$. Ακόμη, η κάθαρση του φαρμάκου ως συνάρτηση του σωματικού βάρους βρέθηκε της να ακολουθεί το νόμο των $3/4$ (Anderson and Holford, 2009).

Ο μορφοκλασματικός όγκος κατανομής (fractal volume of drug distribution) κλιμακώνεται αναλογικά με τη μάζα και αυτό επιβεβαιώνει τη θεωρητικά αναμενόμενη σχέση μεταξύ του όγκου και της μάζας των θηλαστικών ειδών (Karalis et al. 2001). Η αποτελεσματική περιοχή ανταλλαγής στην εσωτερική δομή του σώματος συνδέεται με τον επονομαζόμενο «μορφοκλασματικό όγκο κατανομής του φαρμακομορίου» (“fractal volume of drug distribution”), ο οποίος έχει συσχετισθεί με την επιφάνεια του σώματος που χρησιμοποιείται για το σχεδιασμό της δοσολογικής μορφής (Laffon et al., 2006; Pereira, 2010). Η σχετική με τα προαναφερθέντα έννοια της «μορφοκλασματικής κάθαρσης» έχει επίσης αναπτυχθεί (Karalis and Macheras, 2002). Ειδικότερα στον τομέα της φαρμακοκινητικής, τα παραπάνω ήταν από τις πρώτες αναφορές της εφαρμογής της fractal γεωμετρίας (Macheras, 1995; 1996; Macheras and Argyrakis, 1997; Dokoumetzidis and Macheras, 2003). Αυτές οι αναφορές καταδεικνύουν είτε τη χρονική πορεία των φαρμακομορίων στα υγρά του σώματος και στους ιστούς δείχνουν ένα μορφοκλασματικό μοτίβο και τη fractal γεωμετρία του αγγειακού δένδρου που να χρησιμοποιηθεί για να αναπτύξει φυσιολογικά φαρμακοκινητικά μοντέλα.

Επιπρόσθετα, μία μορφοκλασματική προσέγγιση έχει προταθεί για την κινητική των ενζύμων. Η έννοια της κλασματικής διάστασης διευκρινίζει την κατανόηση φαινομένων που παρουσιάζουν κάποια απόκλιση από το κλασσικό μοντέλο Michaelis – Menten. Η fractal κινητική υποθέτει ότι ενζυματικές αντιδράσεις σε ετερογενή μέσα λαμβάνουν χώρα σε μη ευκλείδειο χώρο που χαρακτηρίζεται από μία συγκεκριμένη κλασματική διάσταση, αυτή η κλασματική διάσταση παρουσιάζει εξάρτηση από το χρόνο των κινητικών συντελεστών (Aranda et al., 2006; Macheras and Iliadis, 2006). Σε τέτοιες περιπτώσεις, ετερογενείς ή fractal κινητικές μπορούν να προκύψουν, οι κινητικοί συντελεστές γίνονται χρόνο-εξαρτώμενοι, και η τάξη της αντίδρασης δίδεται με κλασματικές δυνάμεις.

Η κατάλυση των ενζύμων μπορεί να ακολουθήσει πιο περίπλοκους μηχανισμούς οι οποίοι μπορούν να εκφραστούν με μαθηματικούς όρους από την εξίσωση Michaelis – Menten, που ισχύει σε ένα ευκλείδειο μέσο με μη –κλασματική κινητική ενέργειας. Η σταθερά της κινητικής, όμως, μπορεί να ακολουθήσει και fractal συμπεριφορά. Τότε έχει τη διάσταση της σταθερά το υ ρυθμο ύ πο λαπλασιασμένη με το ό ρ (συγκέντρωση)^{df-1}. Ο Fruite και οι συνεργάτες (2002) διερεύνησαν τις επιπτώσεις της fractal γεωμετρίας των βασικών οργάνων για την απομάκρυνση του φαρμακομορίου από το ήπαρ στα φαρμακοκινητικά δεδομένα ανάλυσης. Οι Marsh και Tuszyński (2006) απέδειξαν ότι μία σταθερή κατάσταση της fractal εκδοχής της εξίσωσης των Michaelis-Menten περιγράφει καλύτερα την απομάκρυνση του φαρμακομορίου mibefradil στους σκύλους.

Σύμφωνα με τον Kosmidis και τους συνεργάτες (2004), η τροποποιημένη εξίσωση των Michaelis-Menten μπορεί να περιγράψει τη φαρμακοκινητική της mibefradil καθώς μπορεί να συμβάλει στην ετερογένεια της ενζυματικής αντίδρασης σε χωρικά περιορισμένες συνθήκες. Η κινητική της δυναμικής ενέργειας (potential energy - U) κατά την αντίδραση δείχνει μία «τραχεία» εμφάνιση και γίνεται συνεχώς πιο δύσκολη να επιλυθεί, όταν ο μηχανισμός γίνεται περισσότερο πολύπλοκος. Η αρχική σταθερά της κινητικής (όπως αυτής της εξίσωσης Michaelis-Menten) αντικαθίσταται από την K^{eff} η οποία είναι κλασματική. Η εξίσωση που αντικαθιστά την αρχική εξίσωση Michaelis-Menten γράφεται ως εξής (Marsh and Tuszyński, 2006):

$$V = \frac{V_{\max}^{eff} [S]^{2-d_f}}{K_M^{eff} + [S]} \quad (8)$$

Επιπλέον, εκτός από τους χρονο-εξαρτώμενους συντελεστές μία εναλλακτική αναπαράσταση της κινητικής στα fractal μέσα δίδεται με κλασματικής τάξης διαφορικές εξισώσεις. Αυτές είναι διαφορικές εξισώσεις, όπου οι παράγωγοι είναι κλασματικής τάξης (για παράδειγμα παράγωγος βαθμού ½). Τα τελευταία βρίσκουν εφαρμογή στη φαρμακοκινητική και στη φαρμακοδυναμική, καθώς και στην πρόληψη φαρμακομύκων από το γαστρεντερικό σωλήνα (Dokoumetzidis and Macheras, 2009; Dokoumetzidis et al., 2010a,b; Verotta, 2010).

1.5 Φαρμακολογία και βιοεπιστήμες

Η fractal γεωμετρία ξεπερνά τους περιορισμούς της ευκλείδειας γεωμετρίας για κάποια αντικείμενα και η μέτρηση της κλασματικής διάστασης δίνει μία ένδειξη των ιδιοτήτων πλήρωσης του χώρου (Losa and Nonnenmacher, 1996; Cross 1997; Dey, 2005). Τα fractals και η μη-γραμμική δυναμική παρέχουν τρόπους για να χαρακτηρίσουν τις δυσλειτουργίες από μία νόσο και/ή την τοξικότητα, καθώς και κάποια φαινόμενα που συναντώνται στη φαρμακολογία. Για παράδειγμα, η μορφοκλασματική ανάλυση της διάστασης των αιμοφόρων αγγείων είναι ένα αποτελεσματικό εργαλείο, που επιτρέπει τη σύγκριση του σχήματος και της κατανομής των αγγείων στην επιφάνεια του σώματος (Jureczyszyn et al., 2012). Επίσης, η ισορροπία σε μία σταθεροποιημένη κατάσταση στα χαοτικά συστήματα συχνά παρουσιάζει μία μη περιοδική τροχιά της κλασματικής διάστασης, η οποία συχνά ονομάζεται παράξενος ελκυστής (strange attractor) (Πίνακες 1.1 και 1.4). Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τους συνήθεις τύπους της σταθεροποιημένης κατάστασης, η οποία μπορεί να είναι ένα σταθερό σημείο ή μία περιοδική τροχιά.

Οι μεμβρανικές επιφάνειες ποικίλων κυτταρικών τύπων έχουν οπτικοποιηθεί από ηλεκτρονικές μικρογραφίες και η κλασματική διάσταση αρκετών από αυτά έχουν υπολογιστεί. Οι τιμές κυμαίνονται μεταξύ $d_f=1.02$ και $d_f=1.34$ ανεξάρτητα από τη μεγέθυνση. Η κλασματική διάσταση έχει επίσης χρησιμοποιηθεί των υπερδομικών αλλαγών κατά την διάρκεια των αρχικών σταδίων της απόπτωσης (Smith et al., 1996; Pantic et al., 2012).

Η χαοτική δυναμική και η fractal γεωμετρία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δομή του εγκεφάλου και στη νευρωνική λειτουργία σε όλα τα επίπεδα της οργάνωσής του, από το μοριακό και κβαντικό επίπεδο έως την κεντρική γνωστική λειτουργία (Jelinek and Fernandez, 1998; Fernandez and Jelinek, 2001; Eke et al., 2002; King, 2010).

Επιπρόσθετα, η εφαρμογή της μη γραμμικής δυναμικής στην ηλεκτρική εγκεφαλική λειτουργία προσφέρει νέες πληροφορίες σχετικά με τη δυναμική των υποκείμενων νευρωνικών δικτύων και των υπάρχοντων εγκεφαλικών δυσλειτουργιών από την ποσοτική δυναμική ανάλυση (Mackey and AnDerHeiden, 1984; Stam et al., 1994; Milton and Black, 1995; Accardo et al., 1997; Jeong et al., 1998; Ehlers et al., 1998; Silva et al., 1999; Dokoumetzidis et al., 2001). Πολυάριθμες εφαρμογές της μη

γραμμικής δυναμικής και της θεωρίας του χάους στη φυσιολογία και στη φαρμακολογία της καρδιάς έχουν επίσης δημοσιευθεί (Garfinkel et al., 1992; Wangner and Rerson, 1998; Geneser et al., 2008; Swenson et al., 2011).

Ακόμη, μία από τις φυσιολογικές διαδικασίες όπου η μη γραμμική δυναμική πιστεύεται ότι έχει μεγάλη σημασία είναι η έκκριση των ορμονών (secretion of hormones) (Tolic et al., 2000; Topp et al., 2000; Dokoumetzidis et al., 2002; Ilias et al., 2002). Η εφαρμογή της μορφοκλασματικής ανάλυσης στον καρκίνο ως ένα μορφομετρικό εργαλείο (morphometric tool) για διαγνωστικούς και προγνωστικούς σκοπούς έχει αναφερθεί και καθιερωθεί στην πρόσφατη βιβλιογραφία (Baish and Jain, 2000; Brú et al., 2003; Janecka, 2007; Huang et al., 2007; McNally and Mazza, 2010; Tambasko et al., 2010; Streba et al., 2011).

Υφίσταται ένα ευρύ πεδίο, το οποίο κυμαίνεται από τις ατομικές αποστάσεις έως αυτές που βρίσκονται στα μακρομόρια και στα μεγάλα συσσωματώματα της ύλης όλων των ειδών. Η fractal γεωμετρία έχει εφαρμοστεί στην κατάλυση και στην ηλεκτροχημεία, όπου σχετίζονται με τις επιφάνειες οι οποίες είναι τραχείες, σε πολυμερή και σε κολλοειδή συσσωματώματα σε πορώδη μέσα. Χαοτικές χρονοσειρές έχουν επίσης μορφοκλασματικό πορτρέτο φάσης (fractal phase portraits). Κάποια από αυτά τα φαινόμενα που αφορούν το πεδίο των φαρμακευτικών επιστημών έχουν ήδη αναφερθεί στη βιβλιογραφία. Ο Aon και οι συνεργάτες του (2000) προσπάθησαν να αναλύσουν τη σχέση μεταξύ της δυναμικής των βιοχημικών αντιδράσεων (ειδικότερα με χαοτική δυναμική), και της γεωμετρίας του κυτταροπλάσματος (ειδικότερα της μορφοκλασματικής υπερδομής του), εξαιτίας της σημασίας τους και των συνεπειών τους της ρυθμικά επαναλαμβανόμενης δυναμικής συμπεριφοράς των κυττάρων. Σύμφωνα με τον Brodsky (2006), πρόσφατα δεδομένα που αφορούν τους κερκάρδιους ενδοκυττάριους ρυθμούς έχουν χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση των βιοχημικών μηχανισμών της άμεσης κυτταρικής επικοινωνίας των κυττάρων εξαιτίας της μορφοκλασματικής φύσης των κερκάρδιων ρυθμών και της αυτό-οργάνωσής τους. Η fractal γεωμετρία στις ενδοκυτταρικές μακρομοριακές δομές προτείνει ότι η χαοτική δυναμική λαμβάνει χώρα κατά την οργάνωσή τους. Οι μη γραμμικές αλληλεπιδράσεις μέσα και μεταξύ των χωρικών και χρονικών περιοχών σε ένα μεγάλο εύρος κλιμάκων που διέπουν τις αναδυόμενες ιδιότητες των περίπλοκων βιολογικών συστημάτων. Σε τέτοιες περιπτώσεις, ετερογενής και fractal κινητική έχει

διαπιστωθεί: οι συντελεστές ρυθμού γίνονται χρόνο-εξαρτώμενοι και οι τάξεις της αντίδρασης δίδονται από κλασματικούς εκθέτους.

Ο Aon και οι συνεργάτες του (2004) πότισαν τη σχέση μεταξύ των fractals και την κλιμάκωση στα κύτταρα και εξερεύνησαν τις κινητικές συνέπειες για τις βιοχημικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται σε fractal και ετερογενή μέσα και οφείλονται στη πρόταση ότι η αρχιτεκτονική του κυτοσκελετού οργανώνεται ως ένα πλέγμα που υφίσταται διήθηση, με συμπλέγματα που έχουν fractal μορφή. Μία σημαντική συνέπεια αυτής της χωροχρονικής οργάνωσης του κυτοπλάσματος είναι ότι οι ενζυμικές αντιδράσεις ακολουθούν κινητική Michaelis-Menten ή αλλοστερικού τύπου κινητική (allosteric type kinetics) με μεγαλύτερους ρυθμούς σε fractal μέσα σε σύγκριση με τα ευκλείδεια μέσα. Ως αποτέλεσμα, θα μπορούσε να επιτευχθεί ταχύτερη και μεγαλύτερη ενίσχυση της ενζυμικής δραστηριότητας (Aon et al., 2004).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα fractals είναι χρήσιμα για να περιγράψουν τη φυσική πραγματικότητα των φυσιολογικών συστημάτων, επειδή δεν είναι πραγματικά τυχαία όπως έχει αποδειχθεί από χωρικές και χρονικές συσχετίσεις. Η fractal ανάλυση έχει εισαχθεί από διαισθητική, οπτική και μαθητική προοπτική. Όπως συζητήθηκε εκτενώς παραπάνω, η fractal γεωμετρία έχει εφαρμοστεί ως ένα συχνός μαθηματικός φορμαλισμός σε αρκετές περιοχές της φαρμακευτικής και πρακτικής, από τη μορφοποίηση των φαρμακομορίων έως τις *in vitro* και *in vivo* μελέτες. Τα fractals είναι πανταχού παρόντα στις φαρμακευτικές επιστήμες.

2 Συστήματα Μεταφοράς Φαρμακομορίων της Νανοτεχνολογίας

2.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Σημαντική πρόοδος έχει επιτευχθεί στα φάρμακα που αναπτύσσονται με φορείς σε νανοκλίμακα καθώς και στα συστήματα μεταφοράς που χρησιμοποιούν διαφορετικές φυσικοχημικές τροποποιήσεις για να μεταβάλλουν το ρυθμό της μεταφοράς του φαρμάκου, και να βελτιώσουν τη φαρμακοκινητική του. Βιοσυμβατά νανοϋλικά έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί ως βιολογικοί δείκτες, σκιαγραφικά (παράγοντες αντίθεσης για την απεικόνιση, προϊόντα υγειονομικής φροντίδας (healthcare products), φαρμακευτικά προϊόντα, συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, καθώς επίσης και για τη διάγνωση και θεραπεία και διάγνωση διαφόρων τύπων νόσων. Η ταξινόμηση των συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων σε νανοκλίμακα είναι ένα κρίσιμο θέμα και θεμελιώδεις προσπάθειες στο ερευνητικό αντικείμενο είναι απύσυχες από τη βιβλιογραφία. Στο παρόν κεφάλαιο θα ασχοληθούμε με τη ταξινόμηση των Συστημάτων Μεταφοράς Φαρμάκων της Νανοκλίμακας [Drug Delivery nano Systems (DDnSs)] με τροποποιημένο ρυθμό αποδέσμευσης [Modulatory Controlled Release profile (MCR)] και θα υποδιωνόμαστε ως Τροποποιημένα Συστήματα Ελεγχόμενης Αποδέσμευσης της Νανοκλίμακας (Modulatory Controlled Release nano Systems) και θα συμβολίζονται με βάση το ακρωνύμιο στην αγγλική ορολογία, MCRnSs. Συμβατικά [Conventional (c)] και Προηγμένα [advanced (a)] DDnSs θα συμβολίζονται με βάση τα ακρωνύμια στην αγγλική ορολογία cDDnSs και aDDnSs, και θα αποτελούνται από ένα ή περισσότερα βιοϋλικά, αντίστοιχα. Η ταξινόμησή τους βασίζεται στα χαρακτηριστικά τους όπως: η λειτουργικότητα της επιφανείας τους [surface functionality (*f*)], τη φύση των βιοϋλικών (the nature of biomaterials) που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή τους και το είδος των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των βιοϋλικών. Τα aDDnSs μπορούν να ταξινομηθούν ως Υβριδικά [Hybridic (Hy-)] ή Χημικά [Chimeric (Chi-)] βασιζόμενοι στη φύση -ίδια ή διαφορετική αντιστοίχως- των βιοϋλικών και των ανόργανων υλικών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή τους. Η φύση των υλικών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή προηγμένων ιδιοτήτων βιοϋλικών είναι μεγάλης σημασίας, ενώ και η Φαρμακευτική Χημεία συμβάλλει δραστικά στην παρασκευή των aDDnSs (Δεμέτζος, 2014).

2.2 Φαρμακευτική νανοτεχνολογία

Η Νανοτεχνολογία ορίζεται ως η τεχνολογία της παρασκευής μικρών συσκευών και μηχανών σε μεσοσκόπική και μοριακή κλίμακα μεγέθου. Η Φαρμακευτική Νανοτεχνολογία και η Νανοϊατρική έχουν επεκταθεί σε νέες διαφορετικές κατευθύνσεις, η καθεμία από τις οποίες υποστηρίζει τη θεμελιώδη αντίληψη για την ικανότητα δόμησης υλικών, συσκευών και συστημάτων σε μοριακό επίπεδο που μπορούν να αποφέρουν τεράστια οφέλη στην έρευνα και ανάπτυξη συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων και διαγνωστικών μεθόδων. Η Φαρμακευτική Νανοτεχνολογία προσανατολίζεται στην κατεύθυνση της στοχευμένης μεταφοράς φαρμάκων, ειδικότερα στους κολλοειδείς νανοφορείς (colloidal nanocarriers), ενώ μπορεί να προσφέρει λύσεις και πλεονεκτήματα σε πολλά πεδία όπως:

1. Απεικόνιση και διάγνωση σε τέτοιο επίπεδο, που επιτρέπουν την πρόγνωση και διάγνωση του καρκίνου σε πολύ πρώιμα στάδια.
2. Συστήματα, τα οποία επιτρέπουν την αξιολόγηση της θεραπείας σε πραγματικό χρόνο και της αποτελεσματικότητας του δοσολογικού σχήματος.
3. Πολυλειτουργικά συστήματα στόχευσης (multifunctional targeting systems), τα οποία μπορούν να υπερνικήσουν τους βιολογικούς φραγμούς και να μεταφέρουν τα φάρμακα σε υψηλές τοπικές συγκεντρώσεις, μέσα το επιθυμητό χρονικό διάστημα, κατευθείαν στα καρκινικά κύτταρα και στους γειτονικούς ιστούς-στόχους, γεγονός που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη τους καρκίνου και των μεταστάσεών του.
4. Υλικά που βρίσκονται σε θέση να ανιχνεύσουν μοριακές αλλαγές και να προλάβουν την μετατροπή των προ-καρκινικών κυττάρων σε καρκινικά κύτταρα.
5. Την ανίχνευση νευρολογικών νόσων με στοχευμένους σκιαγραφικούς παράγοντες και διευκολύνουν τη μεταφορά στοχευμένων θεραπευτικών σχημάτων στο κεντρικό νευρικό σύστημα.
6. Συστήματα ανίχνευσης (detection systems), τα οποία αναγνωρίζουν μεταλλάξεις (mutations) που οδηγούν σε καρκίνο και γενετικούς βιοδείκτες, οι οποίοι αποδεικνύουν την προδιάθεση για την ανάπτυξη όγκων.

7. Ερευνητικά εργαλεία (research tools) που προσφέρουν την ευκαιρία να αναγνωρίζουν γρήγορα νέους στόχους για την κλινική έρευνα και να προβλέψουν την αντοχή στα φάρμακα.
8. Συστήματα μεταφοράς φαρμάκων σε νανοκλίμακα για φυτοθεραπεία διαθέτο ν δυναμική για μελλο ν ική εφαρμοή ή για να βελτιώσο ν την φαρμακολογική δράση και να ξεπεράσουν προβλήματα που σχετίζονται με τα βιοδραστικά συστατικά των φυτών (όπως διαλυτότητα και τοξικότητα)
9. Η νανο ϵ χνο λ γ α προ ϕ έρει εναλλακτικές ο δ ϵ για τη χο ρ ήγηση της ινσουλίνης, αλλά και άλλων πρωτεϊνών με θεραπευτικό ενδιαφέρον.
10. Εφαρμογές στην Οδοντιατρική.

Η Νανοϊατρική προσφέρει δυνατότητα μεταφοράς φαρμάκων και βιοδραστικών συστατικών στον ανθρώπινο οργανισμό, τα οποία προηγουμένως είχαν αποτύχει να αναπτυχθούν σε μικροκλίμακα, εξαιτίας των ειδικών βιολογικών φραγμών που θα έπρεπε να υπερνικήσουν. Στη νανοκλίμακα, οι φυσικές, οι χημικές και κατά επέκταση και οι βιολογικές ιδιότητες των υλικών διαφέρουν θεμελιωδώς και με αξιοποιήσιμο τρόπο. Η Βιονανοτεχνολογία (Bionanotechnology) επιχειρεί να εκμεταλλευτεί αυτές τις διαφοροποιήσεις των ιδιοτήτων λόγω της μικρότερης κλίμακας για να δημιουργήσει νέα βιοϊατρικά ερευνητικά εργαλεία, διαγνωστικές δοκιμές και συστήματα μεταφοράς φαρμάκων.

Η Φαρμακευτική Νανοτεχνολογία παρουσιάζει δυναμική για τη δημιουργία περισσότερο αποτελεσματικών και ασφαλών φαρμάκων με τη χρήση των προηγμένων συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων της Νανοτεχνολογίας, ειδικότερα των χημικών νανοφορέων (Hughes, 2005; Ravichandran, 2009; Mishra et al., 2010; Souza et al., 2010; Demetrios 2010, a,b; Gardikis et. al., 2010; Gardikis et. al., 2011; Kontogiannopoulos et. al., 2011). Τα λιποσώματα αποτελούν μία από τις πιο μελετημένες κατηγορίες των aDDnSs και έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί για τον εγκλεισμό θεραπευτικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένης μία μεγάλης ποικιλίας φαρμακομορίων και βιοϋλικών όπως πεπτιδίων και ολιγονουκλεοτιδίων. Η ανακάλυψη των λιποσωμάτων πραγματοποιήθηκε από τον Bangham το 1965 και ο Γρηγοριάδης πρότεινε τη χρήση τους ως μεταφορέων φαρμακομορίων το 1974 (Bangham et al., 1965; Gregoriadis et al., 1974). Σήμερα, σύνθετες λιποσωμιακές

τεχνολογίες σχεδιάζουν πολυλειτουργικούς λιποσωμιακούς φορείς για στοχευμένη μεταφορά φαρμακομορίων (Mufamadi et al., 2011).

Κολλοειδείς νανοφορείς συμπεριλαμβανομένων των λιποσωμάτων και των πολυμερικών νανοσωματιδίων μπορούν να ταξινομηθούν σε μια πιο γενική κατηγορία αυτή της «ευμετάβλητης ύλης» (“soft matter”), η οποία περιλαμβάνει ένα μεγάλο εύρος υλικών, τα οποία δεν μπορούν να χαρακτηρισθούν ως στερεά ή υγρά και που μπορούν να παραμορφωθούν με ευκολία εξαιτίας της εύκολης αναδιαμόρφωσης των μορίων τους/των δομικών τους μονάδων με αποτέλεσμα να αποκτούν ικανότητα αυτό-συναρμολόγησης (Pispas and Sarantopoulou, 2007; Bonacucina et al., 2009; Pispas, 2011,a,b). Επιπρόσθετα, η αυτό-συναρμολόγηση είναι μία από τις πιο ενδιαφέρουσες ιδιότητες, η οποία χαρακτηρίζει το νανομετρικό και το μεσοσκοπικό επίπεδο της ύλης (Whitesides and Grzybowski, 2007). Τα λιποσώματα θεωρούνται σφαιρικές δομές, οι οποίες αποτελούνται από μία ή πολλαπλές ομόκεντρες διπλοστοιβάδες που προκύπτουν από την αυτό-συναρμολόγηση των αμφιφίλων μορίων, κυρίως των φωσφολιπιδίων, σε ένα υδατικό μέσο διασποράς.

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των λιπιδικών κολλοειδών φορέων, όπως είναι τα λιποσώματα, οι ίδιες είναι αυτές που διέπουν τους τύπους των φαρμακευτικών και βιοϊατρικών εφαρμογών. Ένα ιδανικό λιποσωμιακό σύστημα μεταφοράς φαρμακομορίων θα πρέπει να διαθέτει τα εξής χαρακτηριστικά: να είναι σταθερό φυσικοχημικά, μακράς-κυκλοφορίας (long-circulating), να συσσωρεύεται σε μία θέση-στόχο και να αποδεσμεύει το φαρμακομόριο με ελεγχόμενο τρόπο. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο «συμβατικό λιπό σωμα» (“conventional liposome”) αναφέρεται στα λιποσώματα που αποτελούνται από μία ποικιλία διαφορετικών λιπιδικών συστάσεων, αλλά τυπικά η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη σύσταση είναι αυτή που περιλαμβάνει τη φωσφατιδυλοχολίνη (phosphatidylcholine -PC) και τη χοληστερόλη. Τα συμβατικά λιποσώματα είναι γενικά ασταθή θερμοδυναμικά και κινητικά. Τα συμβατικά λιποσώματα χωρίς την ύπαρξη ηλεκτροστατικών απώσεων συσσωματώνονται και για αυτό το λόγο χαρακτηρίζονται ως θερμοδυναμικά ασταθή. Το μέγεθος η κατανομή μεγεθών και το ζ-δυναμικό των λιποσωμάτων είναι σημαντικά βιοφυσικά χαρακτηριστικά τα οποία υποδεικνύουν τις φυσικές τους

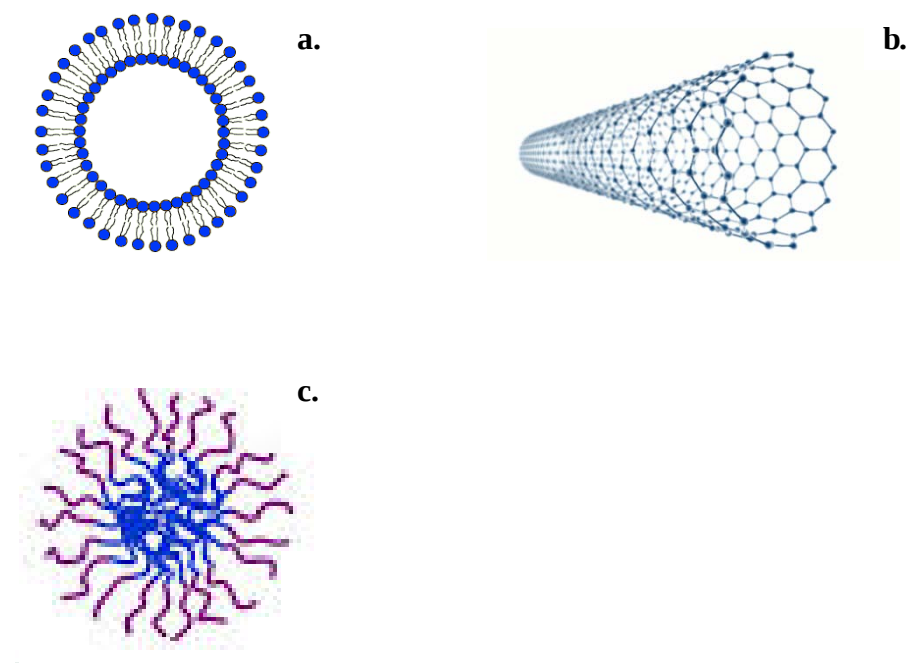
ιδιότητες, που είναι κρίσιμης σημασίας για την αποδοχή τους για φαρμακευτικές εφαρμογές (Heutault et al., 2003).

Επιπλέον, τα fractals είναι ακανόνιστα αντικείμενα τα οποία «αψηφούν» τα συμβατικά πρότυπα μέτρησης, όπως το μήκος, και αρκετά συχνά χαρακτηρίζονται από κλασματική διάσταση (fractional dimension). Η μαθηματική προσέγγιση της κλασματικής διάστασης παρέχει χρήσιμα «εργαλεία» για μία πληθώρα επιστημονικών κλάδων. Ο μορφοκλασματικός χαρακτήρας μπορεί να αναλυθεί ποσοτικά από τον υπολογισμό τυπικών ποσοτήτων, όπως της γεωμετρικής ακτίνας (the radius of gyration) R_g ενός συσσωματώματος, η οποία είναι η τυπική απόκλιση των σωματιδίων από το κέντρο βάρους και μελετάται η εξάρτησή του από το συνολικό αριθμό των σωματιδίων N :

$$N \propto R^{d_f}$$

όπου d_f είναι η κλασματική διάσταση. Μελέτες κολλοειδούς συσσωμάτωσης χρησιμοποιώντας λιποσώματα, έχουν ήδη αξιολογηθεί χρησιμοποιώντας την προσέγγιση της Γεωμετρίας των fractals (Roldán-Vargas et al., 2008; Roldán-Vargas et al., 2009; Sabín et al., 2007a,b). Επιπρόσθετα, η επέκταση της DLVO θεωρίας έχει χρησιμοποιηθεί ως ο φορμαλισμός για τη βιοφυσική περιγραφή της φαινομενολογικής συμπεριφοράς των λιποσωμάτων (Derjaguin and Landau, 1941; Verwey and Overbeek 1948; Sabín et al., 2005; Sabín et al., 2006; Sabín et al., 2007a,b; Roldán-Vargas et al., 2009). Η Συσσωμάτωση Συμπλεγμάτων περιορισμένη από τη διάχυση [Diffusion-limited cluster aggregation - (DLCA)] και η Συσσωμάτωση Συμπλεγμάτων περιορισμένη από την αντίδραση reaction-limited cluster aggregation (RLCA) είναι δύο θεωρίες, οι οποίες περιγράφουν το μηχανισμό της συσσωμάτωσης. Η κλασματική διάσταση έχει εκτιμηθεί ότι ισούται με 1.8 και 2.1 για τα DLCA και τα RLCA συσσωματώματα, αντιστοίχως. (Sabín et al., 2005; Sabín et al., 2006; Sabín et al., 2007a,b; Roldán-Vargas et al., 2009). Η «καθολικότητα» (“universality”) αυτών των φαινομένων συσσωμάτωσης και των δύο περιορισμών θεωριών αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Lin και στους συνεργάτες του (Lin et al., 1989). Έπειτα, από πειραματικής άποψης υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός διαθέσιμων τεχνικών για τον χαρακτηρισμό της δομής των σχηματισμένων συσσωματωμάτων από εναιωρήματα και διασπορές σωματιδίων σε μικρο- και νανοκλίμακα και για τον προσδιορισμό της κλασματικής τους διάστασης και κατά

συνέπεια και της μορφολογίας τους (Gregory, 2009). Οι τεχνικές σκέδασης του φωτός παρέχουν τη μεγαλύτερη δυναμική γιατί αποτελούν ένα εύκολο εργαλείο για την *in situ* διασαφήνιση και χαρακτηρισμό της μορφολογίας των νανοσωματιδίων σε διαλύματα.



Εικόνα 2.1. Παραδείγματα συμβατικών συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων της νανοκλίμακας (cDDnSs). **a.** Λιποσώματα **b.** Νανοςωλήνες και **c.** Μικήλλια

2.2.1 Συστήματα Μεταφοράς Φαρμακομορίων (Drug Delivery Systems)

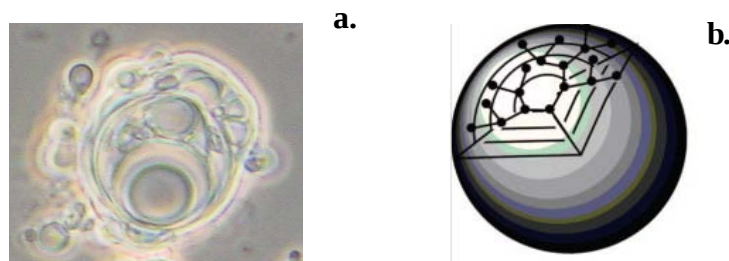
Σύμφωνα με την πρόσφατη βιβλιογραφία, ένα σύστημα μεταφοράς φαρμάκων ορίζεται ως μία τεχνολογική μορφή ή μία συσκευή που επιτρέπει την εισαγωγή ενός θεραπευτικού παράγοντα στο σώμα και βελτιώνει την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια ελέγχοντας το ρυθμό, το χρόνο, και τον τόπο της αποδέσμευσης των φαρμάκων στον οργανισμό. Τα οφέλη από την παραγωγή συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων σε νανοκλίμακα βασίζονται όχι μόνο στις ιδιότητές τους εξαιτίας του μεγέθους τους, αλλά και την ικανότητά τους να ελέγχουν τα ακόλουθα:

1. Στόχευση σε ιστούς και όργανα
2. Βιοχημική προστασία του φαρμακομορίου με αυξημένη σταθερότητα και χαμηλότερη τοξικότητα
3. Απουσία ανεπιθύμητων αλληλεπιδράσεων με το βιολογικό περιβάλλον
4. Μεγάλος χρόνος κυκλοφορίας
5. Βιοαποικοδόμηση (Biodegradability)
6. Εύκολη και χαμηλού κόστους παραγωγή
7. Μεγάλη διάρκεια αποθήκευσης

Είναι σημαντικό να σημειώσουμε ότι σε επίπεδο νανοκλίμακας, τα αποτελέσματα και οι ιδιότητες των βιοϋλικών είναι πολύ σημαντικά εξαιτίας:

1. Του λόγου επιφανείας προς όγκο, ο οποίος είναι μεγαλύτερος σε σύγκριση με τα συστήματα της μακροσκοπικής κλίμακας.
2. Τα κβαντικά φαινόμενα (the quantum effects). Η ηλεκτρονική δομή των νανოსωματιδίων είναι πολύ διακριτή και δεν μπορεί να αλληλεπικαλυφθεί, όπως γίνεται με τα μακροσκοπικά υλικά.

Η Φαρμακοκινητική Ανάλυση, η οποία βασίζεται στην έννοια της κάθαρσης (clearance) παρέχει ποσοτικές πληροφορίες που αφορούν την βιοκατανομή (biodistribution), η οποία σχετίζεται με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του συστήματος μεταφοράς, και ειδικότερα αυτών που βρίσκονται σε νανοκλίμακα. Διάφορα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων των λιποσωμάτων, των δενδριμερών και των πολυμεροσωμάτων και ειδικότερων φορέων φαρμάκων έχουν σχεδιαστεί και αναπτυχθεί μέχρι σήμερα. Η μεταφορά των δραστικών συστατικών ή των υποψηφίων φαρμάκων μπορεί να βελτιωθεί με τα προηγμένα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, όπως προηγουμένως περιγράφηκε, χρησιμοποιώντας θεραπευτικούς κολλοειδείς νανομεταφορείς (therapeutic colloidal nanocarriers) και/ή ανόργανα υλικά, συμπεριλαμβανομένων των πολυμερικών νανოსωματιδίων, μικκυλίων, και νανოსωλήνων (nanotubes).



Εικόνα 2.2. Παραδείγματα προηγμένων συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων της νανοκλίμακας (aDDnSs). **a.** Λιποσώματα σε Λιποσώματα (LiLs) και **b.** Δενδριμερή εγγλωβισμένα σε λιποσώματα (chi-aDDnSs).

Τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, όπως τα λιποσώματα και τα δενδριμερή αποτελούν ένα σημαντικό μέρος της Φαρμακευτικής Νανοτεχνολογίας. Η ανακάλυψη των λιποσωμάτων πραγματοποιήθηκε από τον Bangham το 1965 και ο Gregoriadis πρότεινε τη χρήση τους ως οχήματα μεταφοράς φαρμάκων το 1974. Τα λιποσώματα έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί στον εγκλωβισμό θεραπευτικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένων μίας μεγάλης ποικιλίας φαρμακομορίων και βιοϋλικών όπως πεπτιδίων και ολιγονουκλεοτιδίων. Επιπρόσθετα, τα λιποσωμιακά σκευάσματα συχνά προτείνονται για τη βελτίωση της θεραπευτικής δράσης των φαρμάκων, ειδικό περα για τα φάρμακα αυτά που χρησιμοποιούνται εναντίον του σε σκοπό να μειώσουν την τοξικότητα και να αυξήσουν την αποτελεσματικότητά τους, αλλά και να βελτιώσουν τη φαρμακοκινητική τους.

Αμφίφιλα συμπολυμερή κατά συστάδες (amphiphilic block copolymers) αποτελούνται από δύο τεμάχια με διαφορετική συμπεριφορά κατά τη διάλυσή τους στο ύδωρ, ένα υδρόφοβο και το άλλο υδρόφιλο, είναι εκτενώς μελετημένα. Ασύμμετρα αμφίφιλα συμπολυμερή κατά συστάδες (asymmetric amphiphilic block copolymers) που αυτό-συναρμολογούνται σε υδατικά μέσα, σχηματίζουν έναν πυρήνα-κέλυφος μικυλλιακής δομής και μορφολογίας (core-shell micellar structures and morphologies), με μεσοσκοπική ή νανοσκοπική τάξη μεγέθους (από 10-100 nm). Ο πυρήνας σχηματίζεται στο εσωτερικό του σωματιδίου και δημιουργείται από τη συσσωμάτωση του μη διαλυτού τμήματος και το στέμμα (corona), που είναι εκτεθειμένη στο υδατικό μέσο, δημιουργείται από τα διαλυτά τμήματα. Αρκετές διαφορετικές μορφολογίες που δημιουργούνται λόγω της συσσωμάτωσης έχουν παρατηρηθεί και εξαρτώνται από τη σύσταση του συμπολύμερου και των

φυσικοχημικών ιδιοτήτων της διασποράς. Οι προαναφερθείσες εφαρμογές των συμπολυμερών κατά συστάδες στην Νανοϊατρική και στη Φαρμακευτική οδηγεί σε μια βαθύτερη κατανόηση των ιδιοτήτων της αυτό-συναρμολόγησής τους, οι οποίες με ένα σημαντικό τρόπο ορίζουν και τη δυναμική της εφαρμογής τους. Για παράδειγμα, η ιδιότητα της αυτό-συναρμολόγησης της δομής που εμφανίζεται στη νανοκλίμακα επιτρέπει εύκολα την κυτταρική πρόσληψη (cellular uptake), ενώ η λεπτομερής χημική δομή του συμπολυμερούς και η μορφολογία των νανοδομών που δημιουργούνται στο διάλυμα ορίζουν την ικανότητα εγκλωβισμού του φαρμάκου και την καταλληλότητα κατά επέκταση της πολυμερικής νανοδομής για χρήση στη Φαρμακευτική Νανοτεχνολογία.

Η ιστορία των δενδριμερών ξεκίνησε πριν από περίπου 30 χρόνια, και σήμερα υπάρχουν πολλά νανοσωματίδια που μοιράζονται μία παρόμοια δομή. Τα δενδριμερή είναι αρκετά διαφορετικά από τα κλασσικά γραμμικά πολυμερή. Σε γενικές γραμμές, οι δομές τους αποτελούνται από κλάδους (branches) που προέρχονται/εκφύονται από έναν πυρήνα (core), μαζί με έναν καλά καθορισμένο αριθμό δραστικών ομάδων στην επιφάνειά τους. Οι μοναδικές δομικές τους ιδιότητες παρέχουν τη δυνατότητα εφαρμογής τους στα πεδία της Νανοηλεκτρονικής και των αισθητήρων, ή και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως φορείς βιοδραστικών συστατικών, φαρμάκων, αλλά και διαγνωστικών παραγόντων. Η δενδριτική μακρομοριακή δομή (dendritic macromolecular structure) αποτελείται από έναν κεντρικό πυρήνα (central core), μονάδες διακλάδωσης (κλάδους - branching units) και τερματικές λειτουργικές ομάδες (terminal functional groups), οι οποίες μπορούν να τροποποιηθούν. Εξαιτίας της διακριτής αρχιτεκτονικής τους/λόγω της ακριβούς δομής τους, τα δενδριμερή προσφέρουν ένα πλεονέκτημα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα κατά κύριο λόγο πολυδιάσπαρτα νανοσωματίδια και αυτό επιτρέπει έναν πιο ενδεδειγμένο έλεγχο των φαρμακοδυναμικών χαρακτηριστικών τους, ενώ ως μεταφορείς μπορούν να εγκλωβίσουν τα βιοδραστικά συστατικά ή με ομοιοπολική ή με μη ομοιοπολική σύνδεση στην περιφέρειά τους. Επίσης, προσφέρουν πιθανά πλεονεκτήματα, όπως την παράταση του χρόνου κυκλοφορίας του φαρμάκου (prolongation of drug circulation time), προστασία του φαρμάκου από το περιβάλλον (protection of a drug from its surroundings), αύξηση της σταθερότητας του φαρμάκου (και πιθανώς και της αποτελεσματικότητάς του) καθώς και ικανότητα στόχευσης στον πάσχοντα ιστό.

Υπάρχουν δύο γνωστές στρατηγικές για τη σύνθεση των δένδριμερών, η αποκλίνουσα στρατηγική (divergent strategy) που εισήχθη από τους Vogtle, Tomalia και Newkome και της συγκλίνουσας συνθετικής μεθόδου (convergent synthetic path) που προτάθηκε από τους Hawker και Frechet.

Τα πολυμεροσώματα (polymersomes) αποτελούν μία από τις πιο ενδιαφέρουσες κατηγορίες δομών που αυτό-συναρμολογούνται και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μεταφορά φαρμάκων. Η σταθερότητα και η ικανότητά τους να εγκλωβίζουν και υδρόφιλα αλλά και να ενσωματώνουν και υδρόφοβα μόρια, τα καθιστά εξαιρετικά υποψήφια συστήματα για τη μεταφορά φαρμάκων. Απαιτούν όμως ειδικές φυσικοχημικές παραμέτρους για το σχηματισμό τους, πιο συγκεκριμένα ειδικό λόγο υδρόφιλου προς υδρόφοβο τμήμα ενός συμπολυμερούς κατά συστάδες για να σχηματίζουν μορφολογίες κυστιδίων (vesicular morphologies). Διαφορετικά αμφίφιλα συμπολυμερή, καθώς οι δομές τους επιδεικνύουν διαφορές στην απαίτηση του λόγου του υδρόφιλου προς το υδρόφοβο κομμάτι/τμήμα για να σχηματίζουν πολυμεροσώματα με διάφορους τύπους μορφολογιών. Από βιοφυσικής άποψης, τα πολυμεροσώματα, καθώς επίσης και τα λιποσώματα, μπορούν να θεωρηθούν ως πολύ ενδιαφέροντα συστήματα προσομοίωσης των βιολογικών μεμβρανών (membrane mimics), ενώ οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μπορούν να ενσωματωθούν σε ένα τέτοιο βιομimetικό σύστημα με μεθόδους ανασύστασης (reconstitution methods), οδηγώντας στα επονομαζόμενα πρωτεοπολυμεροσώματα (proteopolymersomes). Από την άλλη πλευρά, τα αμφίφιλα συμπολυμερή κατά συστάδες έχουν ευρέως μελετηθεί για βιοϊατρική και φαρμακευτική εφαρμογή, από την προηγμένη τεχνολογία της τροποποιημένης αποδέσμευσης (sustained-release advanced technologies), στη μίμηση των βιολογικών μεμβρανών και στη μεταφορά φαρμάκων.

Τα στερεά λιπιδικά νανοσωματίδια (Solid lipid nanoparticles - SLN) που εμφανίστηκαν στη βιβλιογραφία το 1991 αποτελούν εναλλακτικά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων σε σχέση με το κλασικό λιπιδικό νανοσφαιρίδιο, όπως τα γαλακτώματα, τα λιποσώματα και τα πολυμερικά σωματίδια. Τα στερεά λιπιδικά νανοσωματίδια και η νεότερη κατηγορία των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων (nanostructured lipid carriers - NLC) συνδυάζουν πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τα «παραδοσιακά» συστήματα (ικανότητα φόρτωσης και αποδέσμευσης φαρμάκων με εξειδικευμένους μηχανισμούς αποδέσμευσης) και επίσης διαθέτουν

μερικά από τα κυριότερα μειονεκτήματά τους. Μπορούν να χαρακτηριστούν ως ασφαλείς νανοφορείς εξαιτίας της ολοκληρωτικής τους βιοαποικοδόμησης και της βιοσυμβατής χημικής τους φύσης.

Επιπλέον, οι νανογέλες (nanogels) είναι διογκωμένα νανομεγέθη δίκτυα (swollen nanosized networks) που υφίστανται από υδρόφιλες ή αμφίφιλες πολυμερικές αλυσίδες. Οι νανογέλες μπορούν να μεταφέρουν και να προστατεύουν φάρμακα (και θεραπευτικά νουκλεοτίδια) και ρυθμίζουν την αποδέσμευσή τους όπως με την ενσωμάτωση υψηλής συγγένειας λειτουργικές ομάδες, ερεθίσματα που ανταποκρίνονται σε διαμορφώσεις και βιοαποικοδομήσιμους δεσμούς μέσα στο πολυμερικό δίκτυο. Ομοίως με άλλα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων σε νανοκλίμακα, οι νανογέλες μπορούν εύκολα να χορηγηθούν σε υγρή φαρμακοτεχνολογική μορφή για παρεντερική μεταφορά φαρμάκων. Το μέγεθος της νανοκλίμακας προσδίδει στις νανογέλες μία υψηλή ειδική επιφάνεια, η οποία είναι διαθέσιμη για βιο-σύζευξη (bioconjugation) του δραστικού παράγοντα στόχευσης και των μακρομορίων. Η αποδέσμευση, η βιοκατανομή, και η κάθαρση μπορούν να τροποποιηθούν της προσαρμογής του μεγέθους σε μεγάλο βαθμό.

Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση ανόργανων νανοσωματιδίων (inorganic nanoparticles), τα οποία πρόσφατα χαρακτηρίστηκαν ως αυτο-θεραπευτικά (self-therapeutics), στην ιατρική οφείλεται στο μοναδικό μέγεθος, το σχήμα και στην μορφολογία τους που εξαρτώνται από τις οπτικο-ηλεκτρονικές τους ιδιότητες. Τα νανοσωματίδια χρυσού και λευκοχρύσου πλατίνα αναπτύχθηκαν για θεραπευτικές εφαρμογές, όσον αφορά τον καρκίνο από την άποψη ότι τα νανοσωματίδια χρησιμοποιήθηκαν που χρησιμοποιούνται ως οχήματα για τη μεταφορά φαρμάκων αλλά και θεραπευτικοί παράγοντες.

Τα μεταλλικά νανοκελύφη (metal nanoshells) είναι επίσης μια νέα κατηγορία των νανοσωματιδίων με εξαιρετικά ρυθμιζόμενες οπτικές ιδιότητες, που συχνά αποτελούνται από χρυσό για βιοϊατρικές εφαρμογές. Οι δυνατότητες για ταυτόχρονη θεραπεία και απεικόνιση των νανοκελύφων χρυσού, σφαιρικών νανοσωματιδίων με πυρήνες διοξείδιο του πυριτίου και κελύφη χρυσού, έχουν προσελκύσει τεράστια προσοχή κατά τη διάρκεια των τελευταίων δύο δεκαετιών και έχουν αναδειχθεί ως

ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για τη θεραπεία του καρκίνου και ένα εξάρτημα για βιο-απεικόνιση.

Η χρήση του κβαντικών νανοκουκκίδων (ή των νανοκρυστάλλων) [semiconductor quantum dots (or semiconductor nanocrystals) (QDs)], οι οποίες συντίθενται από μεταλλικά ιόντα και κolloειδείς σταθεροποιητές, για βιολογική επισήμανση και απεικόνιση, και σε ιατρικές εφαρμογές, συνεχίζει να αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου. Τρέχουσες και προβλεπόμενες εφαρμογές περιλαμβάνουν τη χρήση τους σαν φθορίζουσες ετικέτες για την κυτταρική επισήμανση, ενδοκυτταρικούς αισθητήρες, για παράγοντες απεικόνισης βαθέων ιστών και καρκινικών όγκων (deep-tissue and tumor imaging agents), ευαισθητοποιητές για φωτοδυναμική θεραπεία (sensitizers for photodynamic therapy), λόγω της χημείας της επιφανείας τους η χρήση τους επεκτείνεται και σε βιολογικές εφαρμογές, λόγω της μειωμένης κυτταροτοξικότητάς τους και, πιο πρόσφατα, το ενδιαφέρον πυροδοτήθηκε από τη χρήση τους ως φορείς για τη μελέτη νανοσωματιδίων με τη μεσολάβηση συστημάτων χορήγησης φαρμάκων (nanoparticle-mediated drug delivery).

Σύμφωνα με την πρόσφατη βιβλιογραφία, οι νανοσφαίρες (nanospheres) έχουν ήδη εισαχθεί ως μια ευέλικτη πλατφόρμα που μπορεί να ενσωματώσει τα αντικαρκινικά φάρμακα και στοχεύσει σε συγκεκριμένες εφαρμογές που έχουν τη δυνατότητα να συνδυαστούν με την αναδυόμενη κλινικά μέθοδο της στοχευμένης θεραπείας. Ανοικτού τύπου, πολλαπλών τοιχωμάτων νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs), με μαγνητικά νανοσωματίδια έγκλειστα μέσα σε «τοιχώματα» γραφίτη είχαν κατασκευαστεί για τη βιοϊατρική και φαρμακευτική εφαρμογή τους. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχει μια πληθώρα των νανοφορέων, αλλά η πλειοψηφία από αυτούς που χρησιμοποιούνται για φαρμακευτικές εφαρμογές έχουν ήδη αναφερθεί.

2.2.1.1 Προηγμένα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων της νανοτεχνολογίας και μία πρόταση για την ταξινόμησή τους.

Οι ιδιότητες ενός ιδανικού συστήματος μεταφοράς φαρμάκων ή ενός βιοιατρικού φορέα (biomedical vector) είναι ο δομικός έλεγχος του μεγέθους και το υ

σχήματος/μορφολογίας, η βιοσυμβατότητα, η έλλειψη τοξικότητας, οι ακριβείς δομικές και χημικές τροποποιήσεις του, η νανομετρική του κλίμακα, η ικανότητα φόρτωσης και αποδέσμευσης του φαρμάκου. Από φαρμακοκινητικής άποψης, ένα ιδανικό σύστημα μεταφοράς φαρμάκων είναι η καλώς ορισμένη επιφανειακή του λειτουργικότητα για την στόχευσή του σε ειδικά κύτταρα. Η κατάλληλη κυτταρική προσκόλληση, η ενδοκυττάρωση, και η ενδοκυττάρια διακίνηση του νανοσωματιδιακού συστήματος μπορεί να επιτρέψει τη μεταφορά του φαρμάκου ή του απεικονιστικού παράγοντα στο κυτταρόπλασμα ή τον πυρήνα. Η αποδεκτή αποδόμηση, απέκκριση ή η βιοαποικοδόμηση καθώς και η αποδέσμευση φαρμάκου είναι μερικά από τα πλεονεκτήματα των νανοφορέων.

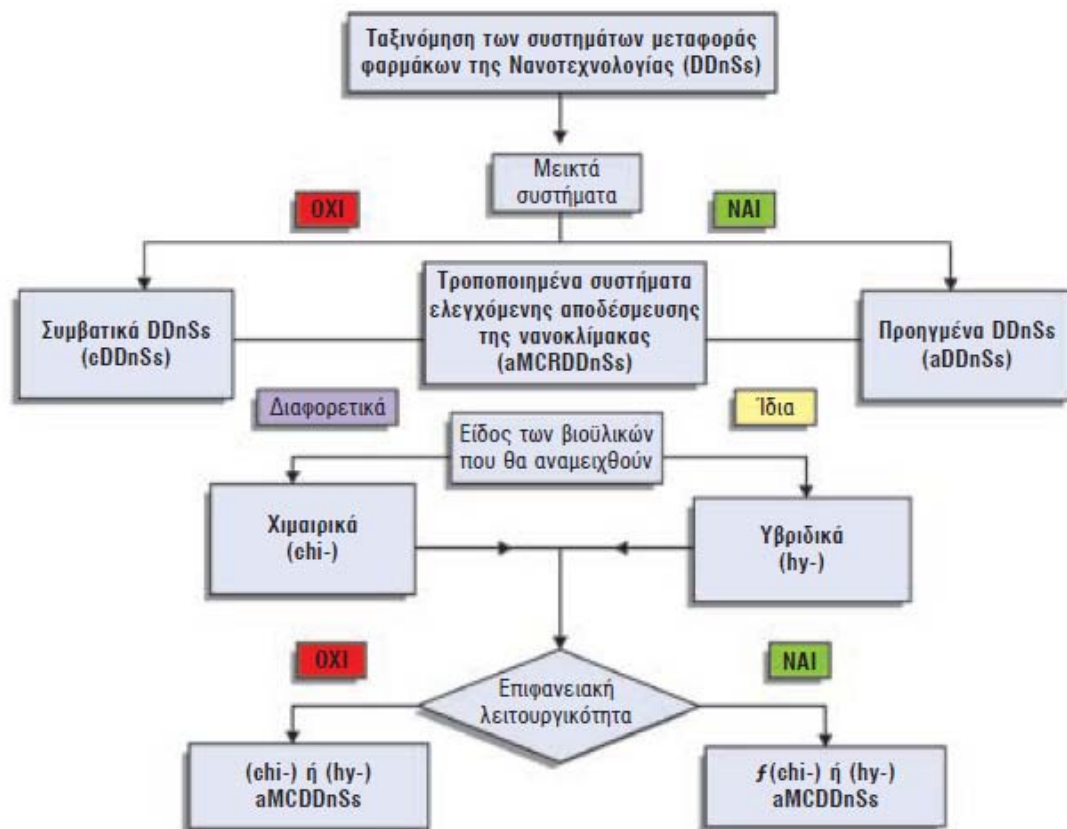
Τα σημαντικότερα πλεονεκτημάτων των συστημάτων αυτών είναι η δυνατότητα ελέγχου του μεγέθους, της δομής και της μορφολογίας τους, καθώς και της δυνατότητας ενσωμάτωσης πολλαπλών λειτουργικών ιδιοτήτων σε μία ενιαία νανοσυσκευή ή σε ένα ενιαίο νανοςύστημα. Επομένως, γίνεται έλεγχος των κολλοειδών ιδιότητες σε διάφορα μέσα διασποράς, με τη βοήθεια μιας μεγάλης ποικιλίας των φυσικοχημικών παραμέτρων, όπως χημική σύνθεση, η συγκέντρωση και η θερμοκρασία.

Ένα Τροποποιημένο Λιποσωμιακό Σύστημα Ελεγχόμενης Αποδέσμευσης [**M**odulatory **L**iposomal **C**ontrolled **R**elease **S**ystem (**MLCRS**)] που συνδυάζει τη λιποσωμιακή και τη δενδριτική τεχνολογία, έχει εγκλωβίσει το αντικαρκινικό φάρμακο, δοξοροβικίνη (doxorubicin) έχει πρόσφατα δημοσιευθεί, ενώ σκεύασμα Δενδριμερών εγκλωβισμένων σε Λιποσώματα (**D**endrimers **l**ocked-into **L**iposomal- **D**locked-in **L**) είναι ένας νέος όρος στη μεταφορά φαρμάκων και θεωρείται μία νέα τάξη των **MLCRSs**. Ακολουθήσαμε την παραπάνω έννοια, χρησιμοποιώντας ακρωνύμια, ώστε να επιτύχουμε μία εξειδικευμένη περιγραφή των **MCRnSs**.

Πρόσφατα από το εργαστήριο της Φαρμακευτικής Νανοτεχνολογίας, προτάθηκε η ταξινόμηση των **MLCRS** νανοφορέων σε *υβριδικούς* (*Hybridic*) και χημικούς (*chimeric*) και χαρακτηρίζονται ως προηγμένα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων σε νανοκλίμακα [**a**dvanced **D**rug **D**elivery **n**ano **S**ystems (**aDDnSs**)]. Προκλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα **aDDnSs** μπορούν να τροποποιήσουν το φαρμακοκινητικό προφίλ του ενσωματωμένου βιοδραστικού μορίου και συνεπώς τροποποιούν το προφίλ της βιοκατανομής και απέκκρισής του. Τα **aDDnSs** μπορούν να χαρακτηριστούν ως

μεικτά νανοςυστήματα (mixed nanosystems) εξαιτίας του συνδυασμού διαφορετικών στη φύση βιο-νανο-υλικών και χρησιμοποιούνται για βιομιμητική μεταφορά φαρμάκων (biomimetic delivery). Το ενδιαφέρον σε τέτοια συστήματα πηγάζει από τις δυνατότητες για τη βασική κατανόηση των μοτίβων της βιολογικής συμπεριφοράς, δεδομένου ότι τα βιολογικά συστήματα χρησιμοποιούν ευρέως μεικτά υλικά για τη δημιουργία πολυ-λειτουργικών αυτο-συναρμολογούμενων νανοδομών.

Κατά την άποψη μας και ανάλογα με τη σημασία για την παραγωγή νέων συστημάτων χορήγησης φαρμάκων με ελεγχόμενο τρόπο αποδέσμευσης, είναι σημαντικό να προταθεί ένα σύστημα ταξινόμησης που μπορεί να διευκολύνει την περιγραφή τους και να εναρμονίσει την κατηγοριοποίηση MCRnSs (Σχήμα 2.1.).



Σχήμα 2.1. Διάγραμμα ροής της κατηγοριοποίησης των νανοςυστημάτων μεταφοράς βιοδραστικών μορίων (Drug Delivery nano-Systems).

Ωστόσο, με βάση τις θεμελιώδεις έρευνες σχετικά με την κατάταξη των συστημάτων χορήγησης φαρμάκων στη νανοκλίμακα λείπουν από τη βιβλιογραφία. Τα MCRnSs έχουν ταξινομηθεί με τη χρήση νέων όρων, όπως: συμβατικά (conventional - cDDnSs) και προηγμένα (advanced-aDDnSs). Η φύση των χρησιμοποιούμενων βιοϋλικών αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την ταξινόμηση των συστημάτων. Στην πρώτη περίπτωση, που τα βιοϋλικά είναι ίδια φύσης, το σύστημα θα πρέπει να οριστεί ως υβριδικό (Hy-), ενώ στη δεύτερη περίπτωση, ως χημικό (Chi-), από την αρχαία ελληνική μυθολογία. Μερικά παραδείγματα aDDnSs παρατίθενται στον Πίνακα 2.1

Πίνακας 2.1. Παραδείγματα aDDnSs.

Σύστημα	Φάρμακο/Βιοδραστικό Συστατικό	Βιοϋλικά/Ανόργανα υλικά	Αναφορές
Λιποσώματα μέσα σε Λιποσώματα (LiLs)	Λεοπρολίδιο	Λιπίδια	Saroglou et al., 2006
MLCRs/ Chi-aDDnSs	Δοξορουβικίνη	Λιπίδια/Δενδριμερή	Gardikis et al., 2010
MLCRs/ Chi-aDDnSs	Αντικαρκινικό φάρμακο	Υπερμαγνητικά νανοσωματίδια / pH-ευαίσθητα πολυμερή	Yang et al., 2012
Chi-aDDnSs	Πακλιταξέλη	Πολυμερή (ABA-type copolymers, PEG)	Bushman et al., 2013
Chi-aDDnSs	Ινδομεθακίνη	Λιπίδια/ Πολυμερή	Pippa et al., 2013b

Τα **cDDnSs** μπορούν να χαρακτηριστούν με βάση τη λειτουργικότητά τους (παρατεταμένης κυκλοφορίας, αόρατα από το ανοσοποιητικό σύστημα, κλπ.) ως **f** MCRnS (από τον αγγλικό όρο functionality) ή απλά MCRnS, αν δεν υπάρχει λειτουργικότητα (no functionality). Η φύση του βιοϋλικού που χρησιμοποιείται (X_i), μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί στο ακρωνύμιο. Όμως, τα **cDDnSs** μπορούν να ταξινομηθούν ως **f** MX_i CRnS ή MX_i CRnS με $X_i \{i = 1, 2, 3 \dots n\}$ να υποδηλώνει τη φύση των υλικών που χρησιμοποιούνται [όπως $X_1=L$ (Lipid-Λιπίδιο), $X_2=P$ (Polymer-Πολυμερές), $X_3=I$ (Inorganic-Ανόργανο)]. Τα **aDDnSs** μπορούν να χαρακτηριστούν ως μεικτά νανοσυστήματα εξαιτίας του συνδυασμού διαφορετικών στη φύση βιοϋλικών και ανόργανων υλικών, $X_i \{i = 1, 2, 3 \dots n\}$ υποδηλώνει το πρώτο μέρος του συστήματος, [όπως $X_1=L$ (Lipid-Λιπίδιο), $X_2=P$ (Polymer-Πολυμερές), $X_3=I$ (Inorganic-Ανόργανο)], ενώ το δεύτερο μέρος υποδηλώνεται με $y_j \{j = 1, 2, 3 \dots m\}$,

[όπου $y_1 = L$ (Lipid-Λιπίδιο), $y_2 = P$ (Polymer-Πολυμερές), $y_3 = I$ (Inorganic-Ανόργανο)]. Στην πρόσφατη βιβλιογραφία, μεικτά νανοσυστήματα συνδυάζουν βιοϋλικά και ανόργανα υλικά έχουν εισαχθεί για βιοϊατρικές εφαρμογές. Το εξωτερικό και/η το εσωτερικό μέρος του συστήματος θα μπορούσε να καθοριστεί με τη χρήση αναλυτικών τεχνικών, χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών. Όμως, τα εξωτερικά και τα εσωτερικά τμήματα του συστήματος θα πρέπει να αναγράφονται και στο ακρωνύμιο με κεφαλαία και μικρά γράμματα, αντίστοιχα. Τότε τα ακρωνύμια αναθεωρούνται ως εξής: $fHy-MX_iCRnS$ ή $Hy-MX_iCRnS$ (χωρίς επιφανειακή λειτουργικότητα) και $fChi-MX_i(y_j)CRnS$ ή $Chi-MX_i(y_j)CRnS$ (χωρίς επιφανειακή λειτουργικότητα). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βιοϋλικών επηρεάζουν σημαντικά τη σταθερότητα, την ικανότητα φόρτωσης του φορέα, και την ελεγχόμενη αποδέσμευση του φαρμάκου θα πρέπει επίσης να περιλαμβάνεται στο ακρωνύμιο. Το I_z $\{z = 0,1,2,3,...n\}$ υποδηλώνει το είδος των αλληλεπιδράσεων, $z = 0$: αλληλεπιδράσεις δεν υπάρχουν, $z = 1$: ηλεκτροστατικές (e), $z = 2$: υδροφοβικές (h), $z = 3$: υδρογονικοί δεσμοί (hyd). Τα προαναφερθέντα ακρωνύμια τελικά αλλάζουν σε $fHy-MX_iCRnS-I_z$ ή $Hy-MX_iCRnS-I_z$ και $fChi-MX_i(y_j)CRnS-I_z$ ή $Chi-MX_i(y_j)CRnS-I_z$.

2.2.1.1.1 Παραδείγματα προηγμένων συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων της Νανοτεχνολογίας.

Ένας μεγάλος αριθμός των δημοσιευμένων εργασιών ασχολήθηκε με την ενσωμάτωση των φαρμάκων σε φορείς. Το κύριο μειονέκτημα πολλών βιοδραστικών ενώσεων που παρεμποδίζει την κλινική εφαρμογή τους είναι κακή διαλυτότητα στο νερό, η οποία οδηγεί σε χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα. Μικκυλιακοί φορείς που αποτελούνται από συνθετικά συμπολυμερή κατά συστάδες χρησιμοποιούνται ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων για τη διευκόλυνση των *in vitro* και *in vivo* μελετών. Πρόσφατα συντέθηκε ένα αμφίφιλο συμπολυμερές κατά συστάδες με λειτουργικές ομάδες β-λακτάμης και το χαρακτηριστικό πολυ (ισοπρένιο-b-αιθυλενοξείδιο), τα οποία είναι σχεδιασμένο για να παρασκευαστούν μικκύλια ώστε να χρησιμοποιηθούν ως φορείς της βιοδραστικής ένωσης, κουρκουμίνη. Η *in vitro* κυτταροτοξική δραστηριότητα των τελικών μικκυλιακών σκευασμάτων, με ή χωρίς κουρκουμίνη μελετήθηκε έναντι μιας ομάδας καρκινικών κυτταρικών του παχέος

εντέρου σε σύγκριση με την δραστηριότητα της ελεύθερης κουρκουμίνης ενάντια στην ίδια κυτταρική σειρά. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι η αύξηση της λιπόφιλης αλυσίδας των μικκυλίων, οδήγησε σε υψηλότερη αποτελεσματικότητα ενσωμάτωσης με συνακόλουθη μείωση του ρυθμού αποδέσμευσης της κουρκουμίνης. Οι κυτταροτοξικές μελέτες έναντι των κυτταρικών σειρών του ορθοκολικού καρκίνου αποκάλυψε ότι η κουρκουμίνη εγλωβισμένη σε μικκύλια έδειξε παρόμοια ή ελαφρώς υψηλότερη δραστηριότητα από την ελεύθερη κουρκουμίνη. Η συνθετική στρατηγική για την παραγωγή του προδρόμου πολυ (ισοπρένιο-b-αιθυλενοξειδίου) του αμφίφιλου συμπολυμερούς δύο συστάδων και της σύνθεσης της β-λακτάμης που περιέχουν τα συμπολυμερή από πολυ (ισοπρένιο-b-αιθυλενοξειδίου) συμπολυμερή δύο συστάδων, καθώς και τα μοριακά χαρακτηριστικά των ενεργοποιημένων συμπολυμερών β-λακτάμης δημοσιεύθηκε πρόσφατα. Λόγω του μεγάλου ενδιαφέροντος για την αποδέσμευση του φαρμάκου, που αποτελείται από φορείς νέων βιοϋλικών όπως συμπολυμερών ή νέων συνθετικών δενδριμερών (δηλ. G1, G2), που μπορούν να αναμιχθούν με τα λιποσώματα και μπορούν να παράξουν aDDnSs, τα οποία μπορούν να ταξινομηθούν σύμφωνα με την προτεινόμενη ταξινόμηση.

Το πρώτο παράδειγμα αφορά ένα aDDnS που ανήκει στην κατηγορία των MCRnSs δημοσιεύθηκε και ορίζονται ως Λιποσώματα σε Λιποσώματα (LiLs). Αυτή η εργασία έχει γίνει από την ερευνητική ομάδα μας, προκειμένου να παραχθεί ένα σύστημα για να ενσωματώσει λεοπρολίδη για τον έλεγχο της αποδέσμευσης του φαρμάκου από τα λιποσωματικά κυστίδια. Ο όρος υβριδικό (Hy-) θεωρείται πλέον ως πρόσφορος, δεδομένου ότι τα βιοϋλικά (λιπίδια) που χρησιμοποιούνται, είναι της ίδιας φύσεως και μπορούν να προσφέρουν μια διαφορετική επίδραση στο σύστημα. Το δεύτερο παράδειγμα αφορά ένα χημικό aDDnS, το οποίο αποτελείται από δύο διαφορετικά σε βιοϋλικά [δηλ. τα λιπίδια (λιποσώματα) και τα πολυμερή (κατηγορία των δενδριμερών)]. Το αντικαρκινικό φάρμακο δοξορουβικίνη είχε ενσωματωθεί στο δενδριμερές PAMAM 4ης γενιάς σε γραμμομοριακή αναλογία δοξορουβικίνης προς PAMAM 3:1. Τα λιποσώματα που αποτελούνται από HEPC : Eggphosphatidylcholine : στεαρυλαμίνης (HEPC:EPC:SA) 10:10:0.1 (μοριακή αναλογία), και Eggphosphatidylcholine:Stearylamin (EPC:SA) 10:0.1 (μοριακή αναλογία) και ενσωματώνεται το σύμπλοκο της δοξορουβικίνης - PAMAM (3:1 μοριακή αναλογία). Το σύστημα που ενσωματώνεται σε λιποσώματα σύστασης HEPC:EPC:SA 10:10:0.1 (μοριακή αναλογία), έδειξε μια παρατεταμένη

αποδέσμευση της δοξορουβικίνης (doxorubicin) που είναι ζωτικής σημασίας για τη μείωση των ανεπιθύμητων ενεργειών της και την αύξηση του θεραπευτικού δείκτη της. Τα ευρήματα αυτά ήταν πολύ κοντά σε εκείνα που δημοσιεύθηκαν για το όξινο φάρμακο methotrexate, όπου υπο σήριξε ό τ η αποδέσμευση μειώθηκε από τη δένδριτική-λιποσωμιακή μορφή. Σε μια πρόσφατα δημοσιευμένη εργασία από την ομάδα μας τα νέα συνθετικά γενιάς 1^{ης} και 2^{ης} πολυαιθέρα - πολυεστέρα δένδριμερή (G1 και G2) ενσωματώθηκαν σε λιποσώματα που αποτελούνται από Dioleicphosphatidylcholine / Dipalmitoylphosphatidylglycerol (DOPC/DPPG). Το αντικαρκινικό φάρμακο δοξορουβικίνη εγκλωβίστηκε σε καθαρά λιποσώματα ή μέσα στο μικτό σύστημα απο ελείται από DOPC / DPPG λιποσώματα και συνθετικά πολυμερή (δένδριμερή). Η αλληλεπίδραση μεταξύ των λιπιδίων και των δένδριμερών ήταν εντροπικής φύσης, όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα θερμικής ανάλυσης, που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανώς δεν υπάρχει σχηματισμός δεσμού μεταξύ των λιπιδίων και δένδριμερών, αλλά και οι αλληλεπιδράσεις είναι στερεοχημικής φύσης και ευνοούνται στο εσωτερικό των ακυλικών αλυσίδων. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις εντοπίστηκαν από με Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης. Το σύστημα μπορεί να χαρακτηριστεί ως χημικό λόγω της διαφορετικής φύσεως των βιοϋλικών που χρησιμοποιούνται και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως Chi- MCRnS. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα χημικά νανοσωματίδια παρουσίασαν υψηλά επίπεδα εγκλωβισμού του φαρμάκου, πιο αργό και ελεγχόμενο ρυθμό αποδέσμευσης in vitro σε σύγκριση με τα καθαρά λιποσώματα.

Όλα τα προαναφερθέντα συστήματα ανήκουν στα Βιο-εμπνευσμένα συστήματα (Πίνακας 2.2).

Πίνακας 2.2: Βιο-εμπνευσμένα συστήματα.

Στρατηγικές	Βασικά χαρακτηριστικά/Δυνατότητες	Εφαρμογές	Σύγχρονο Καθεστώς	Προκλήσεις ή/και περιορισμοί
Συστήματα που μιμούνται τους Ιούς (Virus mimetics)				
Ανασυνδυασμένα Βακτήρια	Τροπισμός του όγκου Έλλειψη παθογονικότητας	Χορήγηση Εμβολίου	Κλινικές Φάσεις (Φάση I)	Ανησυχίες για την ασφάλεια που συνδέονται με εξασθενημένα βακτήρια (επαναφορά της λοιμογόνου δράσεως)
Microbots	Νανοδομημένα φέρουν στην επιφάνεια των βακτηρίων Ούτε βακτηριακή διάσπαση ούτε γενετική τροποποίηση απαιτείται	Gene or protein delivery	Προκλινικά	Ανησυχίες για την ασφάλεια που συνδέονται με εξασθενημένα βακτήρια (επαναφορά της λοιμογόνου δράσεως) Εφαρμογή σε πραγματικές μοντέλα ασθενειών Σκοπιμότητας με βιοσυμβατά νανοδομημένα
Βακτηριακά Φαντάσματα (Bacterial ghosts)	Ακέραιες επιφανειακές ιδιότητες Μεγάλη ικανότητα φόρτωσης φαρμάκου Φυσικός τροπισμός σε διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένων και των όγκων Σημαντική ασφάλεια και χαμηλό κόστος παραγωγής	Μεταφορά φαρμάκων ή DNA Χορήγηση εμβολίων	Προκλινικά	Ελλιπή <i>in vivo</i> δεδομένα
Ιοί (Viruses)				
Ίικοί Φορείς (Viral Vectors)	Αντικατάσταση με το υλικό γενετικό υλικό με επιθυμητό Επωφεληθείτε από την ικανότητα μεταγωγής και αυτο-αναπαραγωγή των ιών Μακροπρόθεσμη έκφραση των γονιδίων στόχων Μεταφορά νανοδομημένα	Γονιδιακή Θεραπεία και/ή Απεικόνιση	Κλινικές Φάσεις (Φάση I και III)	Ανησυχίες για την ασφάλεια (επαναφορά της λοιμογόνου δράσεως) Περιορισμένη ικανότητα στόχευσης (εκτός στόχου επιπτώσεις) Περιορισμένη ικανότητα φόρτωσης
Σωματίδια που ομοιάζουν τους ιούς (Virus-like particles)	Αυτό-συναρμολογούμενα σωματίδια που δημιουργούνται από ιικά καψίδια Αναπτύσσονται εύκολα σε χαμηλό κόστος Διατηρήστε αντιγονικότητα Φόρτωσης	Μεταφορά φαρμάκων ή DNA Χορήγηση εμβολίων	Gardasil (Merck) και Cervarix (GlaxoSmith Kline))	Πιθανή ανοσογονικότητα

	φαρμάκου δυνατότητες Φυσικό τροπισμό και ικανότητα στόχευσης με περαιτέρω τροποποίηση			
Virosomes	Εύκολα να παραχθούν με χαμηλή τοξικότητα Ανοσοενισχυτική δραστηριότητα	Μεταφορά φαρμάκων ή DNA Χορήγηση εμβολίων	(Epxal (Crucell), Invivac (Solvay influenza) και Inflexal V (Crucell)	Πιθανή ανοσογονικότητα
Ευκαρυωτικά κύτταρα (Eukaryotic cells)				
Ερυθροκύτταρα Red Blood Cells	Παρατεταμένη κυκλοφορία (~ 120 ημερών) Μεγάλος όγκος για την ενθυλάκωση των φαρμάκων Δυνατότητα να μεταφέρουν τα νανοσωματίδια και θρομβολυτικά	Μεταφορά φαρμάκων	Προκλινικά	Δύσκολο να διατηρηθεί η ακεραιότητά τους Περιορισμένη ικανότητα στόχευσης
Μακροφάγα Macrophages	Ικανότητα να φαγοκυτταρώνουν νανοσωματίδια	Φορείς Φαρμάκων – «Δούρειος Ίππος»	Προκλινικά	Δύσκολο να συλλεχθούν Δύσκολο να διατηρηθεί η ακεραιότητά τους
Λεμφοκύτταρα Lymphocytes	Ικανότητα να μεταφέρουν σωματίδια ποικίλου μεγέθους	‘Cellular backpack’ Adoptive T cell therapy of cancer	Προκλινικά	Δύσκολο να συλλεχθούν Δύσκολο να διατηρηθεί η ακεραιότητά τους
Βλαστικά κύτταρα Stem cells	Μεταφορά γονιδίων Ικανότητα να φαγοκυτταρώνουν νανοσωματίδια	Θεραπεία καρκίνου	Προκλινικά	Δύσκολο να συλλεχθούν Δύσκολο να διατηρηθεί η ακεραιότητά τους
Παθογόνα που μιμούνται εμβόλια Pathogen mimetic vaccines				
Μηχανισμός αναγνώρισης προτύπων Pattern recognition mechanisms	Ικανότητα για την τόνωση του ανοσοποιητικού κύτταρα χρησιμοποιώντας σήματα κινδύνου από παθογόνους οργανισμούς μέσω των μηχανισμών αναγνώρισης προτύπων	Χορήγηση εμβολίων	Προκλινικά	Περιορισμένα στη χορήγηση εμβολίων
Ιομιμικά (Virus mimetics)				
pH-ευαίσθητες νανογέλες pH-sensitive nanogels	Δομή παρόμοια του καψιδίου pH-ευαίσθητη αναστρέψιμη διάγκωση που ακολουθείται από αποδέσμευση του φαρμάκου και ενδοσωμική διαφυγή	Στόχευση σε όγκους	<i>In vitro</i>	Ευάλωτα στην ανοσολογική αναγνώριση <i>In vivo</i> αξιολόγηση είναι απαιτούμενη

	Ικανότητα να μεταναστεύσουν σε γειτονικά κύτταρα			
Filomicells	Ευέλικτο και σε σχήμα νήματος μικκύλια Παρατεταμένος χρόνος κυκλοφορίας στο αίμα (πάνω από μία εβδομάδα)	Στόχευση σε όγκους	Προκλινικά	Απαιτείται PK/PD διερεύνηση της δράσης τους
Cell mimetics				
Συνθετικά Ερυθροκύτταρα Synthetic Red Blood Cells	Ικανότητα να μιμούνται το σχήμα και τις ιδιότητες των ερυθροκυττάρων Ικανότητα να μεταφέρουν φάρμακα Ικανότητα να μεταφέρουν οξυγόνο	Μεταφορά φαρμάκων Τεχνητός φραγμός αίματος	Προκλινικά	Ευάλωτα στην ανοσολογική αναγνώριση Λεπτομερής <i>In vivo</i> αξιολόγηση είναι απαιτούμενη
Self-marker CD47	Παρατεταμένος χρόνος κυκλοφορίας στο αίμα	Evasion of RES	<i>In vitro</i>	Περιορισμένες πηγές
Διαμερισματοποίηση (Compartmentalization)				
Vesosomes	Λιποσώματα μέσα σε ένα λιποσώμα: διακριτά εσωτερικά διαμερίσματα που διαχωρίζονται από την εξωτερική μεμβράνη Προφύλ παρατεταμένης αποδέσμευσης	Μεταφορά φαρμάκων	Προκλινικά	Ευάλωτα στην ανοσολογική αναγνώριση Λεπτομερής <i>In vivo</i> αξιολόγηση είναι απαιτούμενη
Νανοκύτταρα (Nanocells)	Πολυμερικά νανοσωματίδια μέσα σε κυστίδια λιπιδίων Διπλό σύστημα αποδέσμευσης του φαρμάκου: ταχεία αποδέσμευση ενός φαρμάκου από το στρώμα λιπιδίου και παρατεταμένη αποδέσμευση του άλλου φαρμάκου από τα άλλα πολυμερικά νανοσωματίδια	Θεραπεία του καρκίνου	Προκλινικά	Ευάλωτα στην ανοσολογική αναγνώριση

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών και της μορφολογίας μέσω της κλασματικής τους διάστασης χιμαιρικών συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων της νανοτεχνολογίας. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν συμβατικά λιποσώματα (ανιονικά και κατιοντικά) καθώς και χιμαιρικά συστήματα, τα οποία αποτελούνταν από λιπίδια και συμπολυμερή. Επίσης, μελετήθηκε η μεταβολή των φυσικοχημικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών των παρασκευασθέντων λιποσωμάτων με την αλλαγή της συγκέντρωσης και της θερμοκρασίας. Ακόμη, διερευνήθηκε η μεταβολή των μορφολογικών χαρακτηριστικών με την εισαγωγή / φόρτωση φαρμακομορίου στους νανοφορείς, καθώς και η αλλαγή της μορφολογίας των νανοφορέων κατά την αποδέσμευση του φαρμακομορίου. Επιπρόσθετα, έγινε σύνδεση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των νανοφορέων με τη θερμοτροπική συμπεριφορά της λιποσωματικής μεμβράνης.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3 Υλικά

Για την παρασκευή των λιποσωμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα λιπίδια 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (DPPG) και 1,2-dioleoyl-3-dimethylammonium-propane (DODAP). (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA). Χλωροφόρμιο (Sigma – Aldrich Chemical Co.) ήταν ο οργανικός διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε. Η ενυδάτωση των λιποσωμάτων πραγματοποιήθηκε με νερό καθαρότητας HPLC (PROTMPS Labconco System) και η ανάκτηση των λιποσωματικών πλακουντιών με ορό πλάσματος βοοειδούς (Fetal Bovine Serum-FBS) (Gibco® invitrogenTM). Χρησιμοποιήθηκε το συμπολυμερές κατά συστάδες [poly(ethylene oxide)-b-poly(ε-caprolactone) (PEO-b-PCL)]. Το τμήμα του συμπολυμερούς PEO-b-PCL παρασκευάστηκε με πολυμερισμό ανοίγματος δακτυλίου (ring opening polymerization) του μονομερούς της ε-καπρολακτόνης (ε-caprolactone monomer) χρησιμοποιώντας monohydroxy terminated PEG (Sigma–Aldrich Chemical Co.) ($M_n=5,000$) ως μακροαπαρχητή (the macroinitiator) and οκτοϊκός κασσίτερος (stannous octoate) ως καταλύτης. Το συμπολυμερές χαρακτηρίστηκε με SEC και ¹H-NMR και βρέθηκε να έχει τα ακόλουθα μοριακά χαρακτηριστικά: $M_w=7,500$, $M_w/M_n=1.18$, 30 wt% PCL (υδρόφοβο συστατικό). Το MPOx-1 βαθμιδωτό συμπολυμερές κατά συστάδες παρασκευάστηκε με κατιονικό πολυμερισμό (Milonaki et al., 2012).

Χρησιμοποιήθηκαν τα βαθμιδωτά συμπολυμερή κατά συστάδες Πολυ(2-μεθυλο-2-οξαζολίνη)-grad-πολυ(2-φαινυλο-2-οξαζολίνη) [poly(2-methyl-2-oxazoline)-grad-poly(2-phenyl-2-oxazoline)] (MPOx)]. Το MPOx-1 βαθμιδωτό συμπολυμερές κατά συστάδες χαρακτηρίστηκε από με SEC και ¹H-NMR και βρέθηκε να έχει τα ακόλουθα μοριακά χαρακτηριστικά: $M_w=5,200$, $M_w/M_n=1.14$, 28 wt% φαινυλο-οξαζολίνη phenyloxazoline (PhOxz, υδρόφοβο συστατικό). Το MPOx-2 βαθμιδωτό συμπολυμερές κατά συστάδες παρασκευάστηκε με κατιονικό πολυμερισμό (Milonaki et al., 2012). Το βαθμιδωτό συμπολυμερές κατά συστάδες χαρακτηρίστηκε από με SEC και ¹H-NMR και βρέθηκε να έχει τα ακόλουθα μοριακά χαρακτηριστικά: $M_w=3,300$, $M_w/M_n=1.26$, 39 wt% φαινυλο-οξαζολίνη phenyloxazoline (PhOxz, υδρόφοβο συστατικό). Το αμφίφιλο αυτό βαθμιδωτό συμπολυμερές κατά συστάδες

αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία ότι σχηματίζει πολυμεροσώματα (Milonaki et al., 2012). Η ινδο μεθακίνη παρασχέθηκε από την Fluka και χρησιμοποιήθηκε όπως λήφθηκε.

4 Μέθοδοι

4.1 Παρασκευή λιποσωμάτων και χημικών λιποσωμάτων

4.1.1 Παρασκευή κατιονικών και ανιονικών λιποσωμάτων

Δύο διαφορετικοί λιποσωμιακοί φορείς παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο ενυδάτωσης του λεπτού λιπιδικού υμενίου (thin-film hydration method), ένας φορέας με σύσταση DPPC:DPPG (9:1 μοριακός λόγος) και ένας άλλος φορέας με σύσταση DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος). Κατάλληλες ποσότητες των DPPC:DPPG και DPPC:DODAP φωσφολιπιδικών μειγμάτων (9:1 μοριακός λόγος) διαλύθηκαν σε μείγμα χλωροφορμίου / μεθανόλης (9:1 v/v), τότε μεταφέρθηκαν σε σφαιρική φιάλη, για την εξάτμιση των οργανικών διαλυτών σε περιστροφική συσκευή εξάτμισης υπό κενό. Ο διαλύτης εξατμίζεται αργά σε περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό κενό μέχρι το σχηματισμό ομοιογενούς υμενίου. Το σχηματιζόμενο υμένιο αφήνεται σε ξηραντήρα κενού το ελάχιστο για 24 ώρες για την απομάκρυνση πιθανών ιχνών διαλυτών. Το λιπιδικό υμένιο ενυδατώνεται με διάλυμα σουκρόζης 150mM. Η ενυδάτωση πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο πάνω από τη θερμοκρασία μετάβασης των λιπιδίων (41°C για τα λιπίδια DPPC) με αργή περιστροφή της φιάλης για μία ώρα. Στη συνέχεια τα σχηματιζόμενα πολυστοιβαδικά λιποσώματα (multilamellar vesicles -MLVs) αφήνονται σε ηρεμία για 30 λεπτά πριν υποβληθούν σε δύο κύκλους υπερήχησης των 5 λεπτών με διακοπή 5 λεπτών στο ενδιάμεσο χρησιμοποιώντας αισθητήρα υπερήχησης (πλάτος ταλάντωσης 100%, διάρκεια παλμού 0.7 sec). Τα μικρά μονοστοιβαδικά λιποσώματα (small unilamellar vesicles- SUVs) που σχηματίζονται με υπερήχηση αφήνονται σε ηρεμία για 30 λεπτά. Ακολουθεί φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των σχηματισθέντων λιποσωμάτων.

4.1.2 Παρασκευή χημικών νανοφορέων σύστασης DPPC:PEO-b-PCL.

Διαφορετικοί χημικοί λιποσωμιακοί φορείς παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο ενυδάτωσης του λεπτού λιπιδικού υμενίου (thin-film hydration method). Κατάλληλες

ποσότητες των DPPC:PEO-b-PCL (9:0.1, 9:0.5, and 9:1 molar ratios) φωσφολιπιδικών/πολυμερικών μειγμάτων (9:1 μοριακός λόγος) διαλύθηκαν σε μείγμα χλωροφορμίου / μεθανόλης (9:1 v/v), τότε μεταφέρθηκαν σε σφαιρική φιάλη, για την εξάτμιση των οργανικών διαλυτών σε συσκευή εξάτμισης υπό κενό. Ο διαλύτης εξατμίζεται αργά σε περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό κενό μέχρι το σχηματισμό ομοιογενούς υμενίου. Το σχηματιζόμενο υμένιο αφήνεται σε ξηραντήρα κενού το ελάχιστον για 24 ώρες για την απομάκρυνση πιθανών ιχνών διαλυτών. Το λιπιδικό υμένιο ενυδατώνεται με νερό HPLC-καθαρότητας και PBS, αντίστοιχα. Η ενυδάτωση πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο πάνω από τη θερμοκρασία μετάβασης των λιπιδίων (41°C για τα λιπίδια DPPC) με αργή περιστροφή της φιάλης για μία ώρα. Στη συνέχεια οι σχηματισθείσες νανοδομές αφήνονται σε ηρεμία για 30 λεπτά πριν υποβληθούν σε δύο κύκλους υπερήχησης των 3 και 2 λεπτών με διακοπή 3 λεπτών στο ενδιάμεσο χρησιμοποιώντας αισθητήρα υπερήχησης (πλάτος ταλάντωσης 100%, διάρκεια παλμού 0.7 sec). Οι νανοδομές που σχηματίζονται με υπερήχηση αφήνονται σε ηρεμία για 30 λεπτά. Οι χημικές νανοδομές που περιείχαν το φαρμακομόριο παρασκευάστηκαν με την διάλυση της IND στο αρχικό μείγμα λιπιδίου/συμπολυμερούς στους ακόλουθους μοριακούς λόγους: DPPC:PEO-b-PCL:IND 9:0.1:1, DPPC:PEO-b-PCL:IND 9:0.5:1 and DPPC:PEO-b-PCL:IND 9:1:1. Η επίδραση της ενσωμάτωσης της IND στα μεικτά λιποσωμιακά παρασκευάσματα εκτιμήθηκε με μέτρηση της κατανομής του μεγέθους και ζ-δυναμικού των χημικών νανοφορέων. Η μέση υδροδυναμική διάμετρος χρησιμοποιήθηκε για το χαρακτηρισμό των χημικών εναιωρημάτων αμέσως μετά την παρασκευή τους ($t=0$ days), καθώς και για την παρακολούθηση της φυσικής σταθερότητάς τους με την πάροδο του χρόνου.

4.1.3 Παρασκευή των MPOx και των MPOx:IND νανοδομών σε PBS

Η μέθοδος ενυδάτωσης του λεπτού υμενίου ακολουθήθηκε για το σχηματισμό των νανοφορέων στην παρούσα μελέτη, η οποία είναι μία σαφώς διαφορετική μέθοδος από το πρωτόκολλο της απευθείας διάλυσης των βαθμιδωτών συμπολυμερών κατά συστάδες στο νερό, όπως σε προηγούμενη μελέτη (Milonaki et al., 2012). Κατάλληλες ποσότητες των MPOx-a, MPOx-1, MPOx-2 και MPOx-a/-1/-2:IND (9:1

και 9:2 μοριακοί λόγοι, στην περίπτωση των νανοδομών πολυμερούς/φαρμακομορίου) διαλύθηκαν σε μείγμα χλωροφορμίου / μεθανόλης (9:1 v/v), τότε μεταφέρθηκαν σε σφαιρική φιάλη, για την εξάτμιση των οργανικών διαλυτών σε συσκευή εξάτμισης υπό κενό. Ο διαλύτης εξατμίζεται αργά σε περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό κενό μέχρι το σχηματισμό ομοιογενούς υμενίου. Το σχηματιζόμενο υμένιο αφήνεται σε ξηραντήρα κενού τουλάχιστον για 24 ώρες για την απομάκρυνση πιθανών ιχνών διαλυτών. Το υμένιο ενυδατώνεται με PBS. Η ενυδάτωση πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο πάνω στο 4°C με αργή περιστροφή της φιάλης για μία ώρα. Στη συνέχεια οι σχηματισθείσες νανοδομές αφήνονται σε ηρεμία για 30 λεπτά πριν υποβληθούν σε δύο κύκλους υπερήχησης των 3 και 3 λεπτών με διακοπή 3 λεπτών στο ενδιάμεσο χρησιμοποιώντας αισθητήρα υπερήχησης (πλάτος ταλάντωσης 100%, διάρκεια παλμού 0.7 sec). Οι νανοδομές που σχηματίζονται με υπερήχηση αφήνονται σε ηρεμία για 30 λεπτά. Η μέση υδροδυναμική διάμετρος χρησιμοποιήθηκε για το χαρακτηρισμό των νανοδομών αμέσως μετά την παρασκευή, καθώς επίσης και η κλασματική διάσταση και το ζ-δυναμικό.

4.1.4 Παρασκευή των χημικών νανοφορέων σύστασης DPPC:MPOx-1

Διαφορετικοί χημικοί λιποσωμιακοί φορείς παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο ενυδάτωσης του λεπτού λιπιδικού υμενίου (thin-film hydration method). Κατάλληλες ποσότητες των DPPC:MPOx-1 (9:0.1, 9:0.5, 9:1, 9:2 και 9:3 μοριακοί λόγοι) φωσφολιπιδικών/πολυμερικών μειγμάτων (9:1 μοριακός λόγος) διαλύθηκαν σε μείγμα χλωροφορμίου / μεθανόλης (9:1 v/v), τότε μεταφέρθηκαν σε σφαιρική φιάλη, για την εξάτμιση των οργανικών διαλυτών σε συσκευή εξάτμισης υπό κενό. Ο διαλύτης εξατμίζεται αργά σε περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό κενό μέχρι το σχηματισμό ομοιογενούς υμενίου. Το σχηματιζόμενο υμένιο αφήνεται σε ξηραντήρα κενού τουλάχιστον για 24 ώρες για την απομάκρυνση πιθανών ιχνών διαλυτών. Το λιπιδικό υμένιο ενυδατώνεται με νερό HPLC-καθαρότητας και PBS, αντίστοιχα. Η ενυδάτωση πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο πάνω από τη θερμοκρασία μετάβασης των λιπιδίων (41°C για τα λιπίδια DPPC) με αργή περιστροφή της φιάλης για μία ώρα. Στη συνέχεια οι σχηματισθείσες νανοδομές αφήνονται σε ηρεμία για 30 λεπτά

πριν υποβληθούν σε δύο κύκλους υπερήχησης των 3 και 2 λεπτών με διακοπή 3 λεπτών στο ενδιάμεσο χρησιμοποιώντας αισθητήρα υπερήχησης (πλάτος ταλάντωσης 100%, διάρκεια παλμού 0.7 sec). Οι νανοδομές που σχηματίζονται με υπερήχηση αφήνονται σε ηρεμία για 30 λεπτά. Οι χιμαιρικές νανοδομές που περιείχαν το φαρμακομόριο παρασκευάστηκαν με την διάλυση της IND στο αρχικό μείγμα λιπιδίου/βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες στους ακόλουθους μοριακούς λόγους: DPPC:MPOx-1:IND 9:0.1:1, DPPC:MPOx-1:IND 9:0.5:1, DPPC:MPOx-1:IND 9:1:1, DPPC:MPOx-1:IND 9:2:1 and DPPC:MPOx-1:IND 9:3:1. Η επίδραση της ενσωμάτωσης της IND στα μεικτά λιποσωμιακά παρασκευάσματα εκτιμήθηκε με μέτρηση της κατανομής του μεγέθους και ζ-δυναμικού των χιμαιρικών νανοφορέων. Η μέση υδροδυναμική διάμετρος χρησιμοποιήθηκε για το χαρακτηρισμό των χιμαιρικών εναιωρημάτων αμέσως μετά την παρασκευή τους ($t=0$ days), καθώς και για την παρακολούθηση της φυσικής σταθερότητάς τους με την πάροδο του χρόνου.

4.1.5 Παρασκευή των χιμαιρικών συστημάτων σύστασης DPPC:MPOx-2

Διαφορετικοί χιμαιρικοί λιποσωμιακοί φορείς παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο ενυδάτωσης του λεπτού λιπιδικού υμενίου (thin-film hydration method). Κατάλληλες ποσότητες των DPPC:MPOx-2 (9:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9 και 0:9 μοριακοί λόγοι) φωσφολιπιδικών/πολυμερικών μειγμάτων διαλύθηκαν σε μείγμα χλωροφορμίου / μεθανόλης (9:1 v/v), τότε μεταφέρθηκαν σε σφαιρική φιάλη, για την εξάτμιση των οργανικών διαλυτών σε συσκευή εξάτμισης υπό κενό. Ο διαλύτης εξατμίζεται αργά σε περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό κενό μέχρι το σχηματισμό ομοιογενούς υμενίου. Το σχηματιζόμενο υμένιο αφήνεται σε ξηραντήρα κενού το ελάχιστον για 24 ώρες για την απομάκρυνση πιθανών ιχνών διαλυτών. Το λιπιδικό υμένιο ενυδατώνεται με PBS αντίστοιχα. Η ενυδάτωση πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο πάνω από τη θερμοκρασία μετάβασης των λιπιδίων (41°C για τα λιπίδια DPPC) με αργή περιστροφή της φιάλης για μία ώρα. Στη συνέχεια οι σχηματισθείσες νανοδομές αφήνονται σε ηρεμία για 30 λεπτά πριν υποβληθούν σε δύο κύκλους υπερήχησης των 3 και 2 λεπτών με διακοπή 3 λεπτών στο ενδιάμεσο χρησιμοποιώντας αισθητήρα υπερήχησης (πλάτος ταλάντωσης 100%, διάρκεια παλμού 0.7 sec). Οι νανοδομές που σχηματίζονται με υπερήχηση αφήνονται σε

ηρεμία για 30 λεπτά. Οι χημικές νανοδομές που περιείχαν το φαρμακομόριο παρασκευάστηκαν με την διάλυση της IND στο αρχικό μείγμα λιπιδίου/βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες στους ακόλουθους μοριακούς λόγους: DPPC:MPOx-2:IND 9:1:1, DPPC:MPOx-2:IND 1:9:1, DPPC:MPOx-2:IND 5:5:1, και MPOx-2:IND 9:1. Η επίδραση της ενσωμάτωσης της IND στα μεικτά λιποσωμιακά παρασκευάσματα εκτιμήθηκε με μέτρηση της κατανομής του μεγέθους και ζυγιστικού των χημικών νανοφορέων. Η μέση υδροδυναμική διάμετρος χρησιμοποιήθηκε για το χαρακτηρισμό των χημικών εναιωρημάτων αμέσως μετά την παρασκευή τους ($t=0$ days).

4.2 Λυοφιλοποίηση των λιποσωμιακών εναιωρημάτων

Η λυοφιλοποίηση είναι ένας τρόπος για να βελτιωθεί η σταθερότητα κατά την αποθήκευση λιποσωμιακών συσκευασμάτων και μπορεί να επιλύσει προβλήματα μακροχρόνιας σταθερότητας. Τα λιποσώματα ψύχθηκαν στους -80°C για 12 περίπου ώρες και ύστερα υπέστησαν τη διαδικασία της λυοφιλοποίησης για να επιτευχθεί σταθερότητα που αφορά τα θερμοδυναμικώς ασταθή λιποσωμιακά εναιωρήματα. Η λυοφιλοποίηση επιτεύχθηκε με τη χρήση λυοφιλοποιητή (TELESTAR^{Q7} Cryodos-50, Spain) κάτω από τις ακόλουθες συνθήκες: θερμοκρασία συμπυκνωτή -50°C , κενό vacuum 8.2×10^{-2} mb) (Armstrong et al., 2002; Wang et al., 2009). Τα λυοφιλοποιημένα/λυόφιλα λιποσωμιακά εναιωρήματα αποθηκεύτηκαν στους 4°C .

4.2.1 Ανασύσταση/Ανάκτηση των λυόφιλων λιποσωμάτων

Τα λυοφιλοποιημένα λιποσώματα ανακτήθηκαν με την προθήκη ύδατος HPCL-καθαρότητας ($\text{pH}=5.5$), με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffer saline (PBS) ($\text{pH}=7.4$, $I=0.154\text{M}$) ή βόειο ορό πλάσματος (fetal bovine serum- FBS) σε όγκο ίσο με τον αρχικό υπό ήπια ανάδευση. Κάθε δείγμα αφέθηκε σε ηρεμία για 30 λεπτά και ακολούθησε περιδίνηση, και μία περίοδος ηρεμίας 15 λεπτών.

4.3 Ποσοστό ενσωμάτωσης (Incorporation Efficiency)

Τα λυόφιλα λιποσώματα ανασυστάθηκαν με χλωροφόρμιο έως του αρχικού όγκου της του παρασκευάσματος με ήπια ανάδευση. Κάθε δείγμα αφέθηκε σε ηρεμία για 30 λεπτά μετά από περιδίνηση, και για ένα διάστημα εφησυχασμού των 15 λεπτών. Το ποσοστό της ενσωμάτωσης της IND στους ανασυσταθέντες χιμαιρικούς νανοφορείς εκτιμήθηκε φασματοφωτομετρικά με τη χρήση του φασματοφωτομέτρου Stat Fax® 4200, Microplate Reader, NEOGEN® Corporation. Η απορρόφηση του φαρμάκου μετρήθηκε στα 492nm. Το ποσοστό της ενσωμάτωσης της IND στους χιμαιρικούς νανοφορείς υπολογίστηκε μετά από ποσοτικοποίηση. Η IND που δεν είχε ενσωματωθεί στους χιμαιρικούς νανοφορείς διαχωρίστηκε από τους χιμαιρικούς νανοφορείς με στήλη μοριακού αποκλεισμού αποτελούμενη από Sephadex G75. Το ποσοστό της ενσωμάτωσης (Incorporation efficiency -IE) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$\%IE = \frac{IND \text{ (after column)}}{IND \text{ (initial)}} \times 100 \quad (4.1)$$

Όπου:

%IE: ποσοστό της ενσωμάτωσης (Incorporation efficiency -IE)

IND after column: η συγκέντρωση της ινδομεθακίνης μετά τη στήλη μοριακού αποκλεισμού

IND initial: η αρχική συγκέντρωση της ινδομεθακίνης

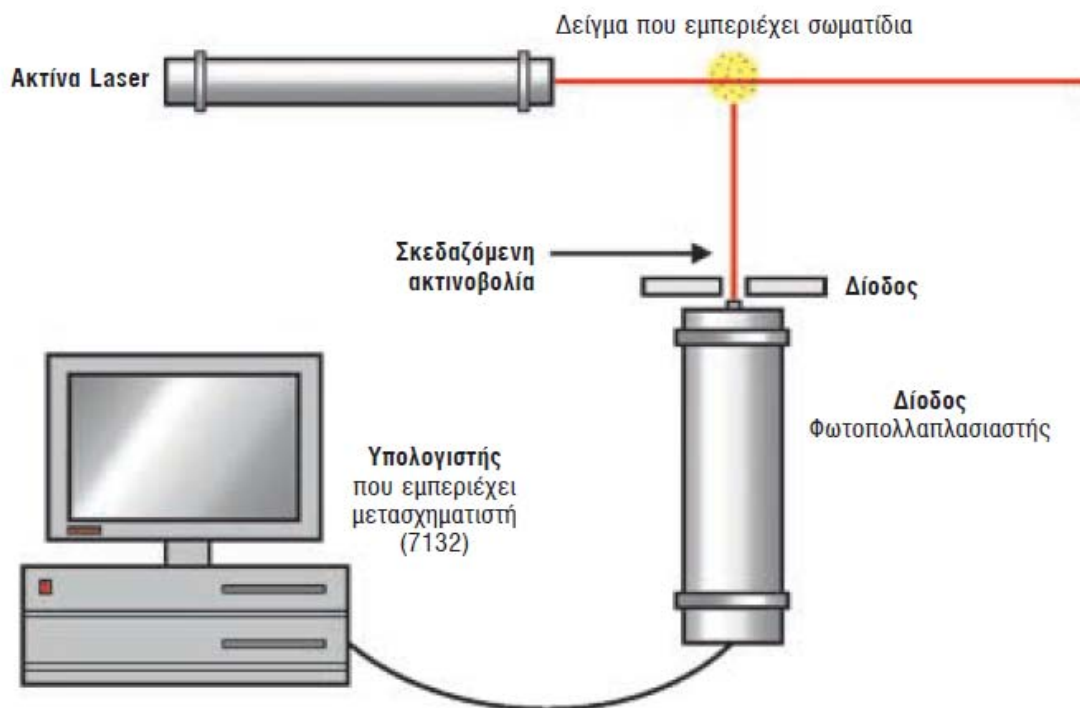
Η συγκέντρωση της IND υπολογίστηκε με τη βοήθεια της ακόλουθης καμπύλης αναφοράς σε χλωροφόρμιο:

$$IND \text{ concentration (mg/ml)} = \frac{\text{absorbance} + 0.0567}{0.0667} \quad (R^2 = 0.9985) \quad (4.2)$$

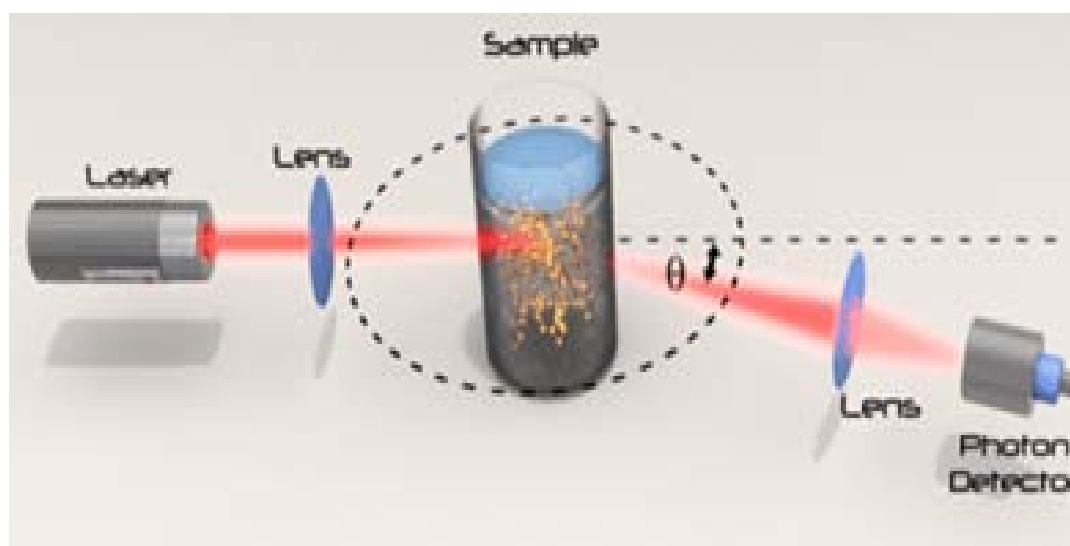
4.4 Δυναμική και στατική σκέδαση

Η υδροδυναμική ακτίνα (hydrodynamic radius (R_h)) των λιποσωμάτων και ο δείκτης πολυδιασποράς (polydispersity index (PD.I.)) μετρήθηκαν με Δυναμική Σκέδαση Φωτός (dynamic light scattering (DLS)) και η κλασματική διάσταση (fractal dimension- d_f) προσδιορίστηκε με Στατική Σκέδαση Φωτός (static light scattering - SLS). Οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις υπολογίστηκαν από τρία ανεξάρτητα

δείγματα. Για τη Δυναμική και τη Στατική Σκέδαση Φωτός χρησιμοποιήθηκε ένα όργανο με Συμπαγές Σύστημα Γωνιόμετρο (AVL/CGS-3 Compact Goniometer System (ALV GmbH, Germany)), εξοπλισμένο με cylindrical JDS Uniphase 22mV He-Ne laser, operating at 632.8 nm, and an Avalanche photodiode detector.



Σχήμα 4.1. Σχηματική παρουσίαση του οργάνου της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός.



Σχήμα 4.2. Σχηματική παρουσίαση του οργάνου της Στατικής Σκέδασης Φωτός.

4.4.1 Δυναμική και Στατική Σκέδαση Φωτός

Όργανο Σκέδασης Φωτός (Light scattering system)

Εταιρεία: ALV GmbH, Germany

Γωνιόμετρο: AVL/CGS-3 Compact Goniometer System (ALV GmbH, Germany). Το όργανο διαθέτει ένα JDS Uniphase 22mW He-Ne laser που λειτουργεί στα 632,8 nm Έχει προτεινόμενη ακτίνα σκέδασης Γ έως 152° . Περιλαμβάνεται μειωτήρας με δυνατότητα ελάττωσης της ακτινοβολίας κατά 0,1%, 0,31%, 1%, 3,1%, 10%, 31% και 100%. Για τη βαθμονόμηση του οργάνου χρησιμοποιήθηκε τολουόλιο.

Ψηφιακός συσχετιστής: ALV-5000/EPP multi-tau με 288 κανάλια, που στο καθένα απ' αυτά αποθηκεύονται οι παλμοί (φωτόνια που φτάνουν στον ανιχνευτή) που αντιστοιχούν σε ορισμένη χρονική περίοδο (αυτό αφορά μόνο τη δυναμική σκέδαση).



Εικόνα 4.1 : Όργανο Δυναμικής και Στατικής Σκέδασης Φωτός.

Λογισμικό εξισώσεων συσχέτισης: CONTIN και με τη μέθοδο cumulant που παρέχει την υδροδυναμική ακτίνα με τη βοήθεια της σχέσης Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta_0 R_h} \quad (4.3)$$

Όπου R_h , η υδροδυναμική ακτίνα, k η σταθερά Boltzmann, T η απόλυτη θερμοκρασία, η_0 το ιξώδες και D ο συντελεστής διάχυσης.

Το μέγεθος εξάγεται από τις εξισώσεις συσχέτισης με τη χρήση διαφόρων αλγόριθμων. Με τη μέθοδο των Cumulants υπολογίζεται το μέσο μέγεθος και ο δείκτης πολυδιασποράς. Με τη μέθοδο CONTIN προσδιορίζεται η κατανομή μεγεθών.

Για μη σφαιρικά σωματίδια, η υδροδυναμική τους διάμετρος είναι η διάμετρος μιας ιδανικής σφαίρας που έχει την ίδια ταχύτητα μεταφορικής διάχυσης με το προς μελέτη σωματίδιο.

Γωνίες μετρήσεων για δυναμική σκέδαση: 45°, 90°, 135°

Γωνίες μετρήσεων για στατική σκέδαση: 30°-150°

Σκέδαση Φωτός (Light Scattering) για την Μορφοκλασματική διάσταση.

Η στατική σκέδαση του φωτός (Static Light Scattering) έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί σε πειραματικές μελέτες συσσωμάτωσης για να υπολογιστεί η μορφοκλασματική διάσταση των συμπλεγμάτων. Στην στατική σκέδαση του φωτός (Static Light Scattering), μία δέσμη φωτός κατευθύνεται στο δείγμα και η ένταση της σκεδαζόμενης ακτίνας (scattered intensity) μετريέται ως συνάρτηση της ποσότητας του διανύσματος της σκέδασης (the magnitude of scattered vector) q :

$$q = \frac{4\pi n_0 \sin \frac{\theta}{2}}{\lambda_0} \quad (4.4)$$

όπου n_0 ο δείκτης διάθλασης του μέσου διασποράς, θ είναι η γωνία σκέδασης, και λ_0 το μήκος κύματος του συνεπαγόμενου φωτός.

Αν τα ξεχωριστά σωματίδια σε ένα μορφοκλασματικό συσσωμάτωμα είναι σε μονοδιασπορά, η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (the scattered intensity) $I(q)$ που προκύπτει από το συσσωμάτωμα γράφεται :

$$I(q) \sim P(q)S(q) \quad (4.5)$$

Όπου το $P(q)$ σχετίζεται με το σχήμα του κάθε σωματιδίου και $S(q)$ είναι ο παράγοντας διασωματιδιακής δομής (the interparticle structure factor), ο οποίος αναπαριστά τις συσχετίσεις μεταξύ άμεσων σωματιδίων εσωτερικά ενός συσσωματώματος, υποθέτοντας ότι δεν υπάρχουν συσχετίσεις μεταξύ των συσσωματωμάτων μεταξύ τους. Άρα, αυτό περιγράφει τη χωρική ταξινόμηση των σωματιδίων σε ένα συσσωμάτωμα,

Σε μεγάλες τιμές q , $nS(q)$ είναι κατά προσέγγιση ίση με τη μονάδα. Η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (scattered intensity) τότε υπερσχύει από τον παράγοντα

κάθε χωριστού σχηματισμού σωματιδίου ν και μόνο το σκεδασμένο εξαιτίας των ξεχωριστών σωματιδίων έχει παρατηρηθεί. Στις τιμές q , σε μικρές παρομοιάζεται/προσεγγίζει με το $1/r_0$, αλλά στις μεγάλες παρομοιάζεται/προσεγγίζει με το $1/R_g$, r_0 είναι η ακτίνα του μονομερούς και R_g η ακτίνα του συσσωματώματος (δηλαδή $1/R_g \ll q \ll 1/r_0$) $P(q) \approx 1$ και $S(q)$ μειώνεται σύμφωνα με:

$$S(q) \sim q^{-d_f} \quad (4.6)$$

Υπό τον όρο ότι R_g είναι αρκετά μεγαλύτερη από την r_0 , η εξίσωση:

$$I(q) \sim P(q)S(q) \quad (4.7)$$

Γράφεται σύμφωνα με το γνωστό νόμο της εξίσωσης της σκέδασης:

$$I(q) \sim S(q) \sim q^{-d_f} \quad (4.8)$$

Όπου d_f είναι η κλασματική διάσταση των σωματιδίων (των λιποσωμάτων) με $1 \leq d_f \leq 3$ ($d_f=3$ αντιστοιχεί στο όριο μίας συμπαγούς Ευκλείδειας σφαίρας). Η παραπάνω εξίσωση είναι η κλασσική εξίσωση για τον υπολογισμό της κλασματικής διάστασης από την αρνητική κλίση της γραμμικής περιοχής του διαγράμματος των λογαρίθμων του I vs. q ($\log - \log I$ vs. q). Το αποτέλεσμα αυτό που εξάγεται είναι απολύτως έγκυρο υπό την προϋπόθεση ότι οι δομές που προσδιορίζονται είναι πολύ μικρότερες από το συνολικό μέγεθος του συσσωματώματος και πολύ μεγαλύτερα από τα μικρής εμβέλειας ευκλείδειες δομές που προκαλούνται από το «πακετάρισμα» των σωματιδίων (than the short range non-fractal structures induced by packing of the particles) $1/R_g \ll q \ll 1/r_0$. Αξιολόγηση της συμπεριφοράς στην περίπτωση του προσδιορισμού της κινητικής της συσσωμάτωσης με τεχνικές σκέδασης του φωτός περιλαμβάνει τη μορφοκλασματική ανάλυση της κινητικής της συσσωμάτωσης, η οποία είναι αξιόπιστη όταν $qR_g \gg 1$, με την προϋπόθεση ότι το R_g είναι πολύ μεγαλύτερο από το r_0 . Ο λόγος R_g/R_h , ο οποίος είναι μία πολύ σημαντική παράμετρος για την κατανόηση της διαμόρφωσης (conformation) των νανοσωματιδίων σε ένα διάλυμα ή σε ένα εναίωρημα, επίσης, προσδιορίστηκε. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι όταν η γεωμετρική ακτίνα (R_g - radius of gyration), η οποία είναι η μέση απόσταση του πρωταρχικού σωματιδίου από το κέντρο μάζας του συσσωματώματος και η υδροδυναμική ακτίνα (R_h - hydrodynamic radius), η οποία είναι η ακτίνα μίας ιδανικής σφαίρας με το ίδιο συντελεστή διάχυσης με αυτόν του πραγματικού

σωματιδίου και προκύπτει από το νόμο του Stokes. Έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι ο λόγος R_g/R_h λαμβάνει την τιμή 0.775 για μία σκληρή συμπαγή σφαίρα, 1.0 για κυστίδια με λεπτά τοιχώματα και τιμές από 1.3 ως 1.5 αποδεικνύουν μία τυχαία περιέλιξη (ανοχή/χαλαρή) δομής, όπως στην περίπτωση των μακρομοριακών αλυσίδων ενός πολυμερούς (Burchard, 1983).

Το εύρος της γωνίας σκέδασης ήταν $30^\circ < \theta < 150^\circ$ και το εύρος του διανύσματος του κύματος του φωτός χρησιμοποιείται για να υπολογίσει την μορφοκλασματική διάσταση ήταν $3 \cdot 10^{-6} < q < 10^{-7} \text{ m}^{-1}$ (σε θερμοκρασία $298.15 \pm 0.01 \text{ K}$).

Η μορφοκλασματική διάσταση της επιφάνειας (d_s) υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$d_s = 6 - d_f \quad (4.9)$$

ο οποίος συναντάται στη βιβλιογραφία (Roldán-Vargas et al., 2008; Roldán-Vargas et al., 2009).

4.5 Ηλεκτροφορητική κινητικότητα- Ηλεκτροφορητική σκέδαση φωτός.

Οι τιμές του ζ-δυναμικού διαδραματίζουν έναν πολύ σημαντικό ρόλο για την κολλειοδή σταθερότητα. Το ζ-δυναμικό μπορεί πολύ εύκολα να προσδιοριστεί / να μετρηθεί με Μικροηλεκτροφόρηση (Delgado et al., 2007). Το ζ-δυναμικό των λιποσωμάτων μετρήθηκε με τη χρήση του οργάνου Zetasizer 3000HAS, Malvern Instruments, Malvern, UK. Τα δείγματα των λιποσωμάτων αραιώθηκαν με νερό HPLC-καθαρότητας και το ζ-δυναμικό μετρήθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25°C) στα 633nm.

Το ζ-δυναμικό υπολογίζεται από την ηλεκτροφορητική κινητικότητα, μ_E , χρησιμοποιώντας τη διόρθωση του Henry στην εξίσωση Smoluchowski:

$$\zeta = \frac{3\mu_E n}{2\varepsilon_0 \varepsilon_r f(\kappa a)} \quad (4.10)$$

Όπου ϵ_0 η διαπερατότητα του κενού, ϵ_r η σχετική διαπερατότητα, a η ακτίνα του σωματιδίου, κ το μήκος Debye, και η το ιξώδες του υδάτος. Η συνάρτηση $f(\kappa a)$ εξαρτάται από το σχήμα των σωματιδίων. Εφόσον $\kappa a > 1$:

$$f(\kappa a) = 1,5 + \frac{9}{2(\kappa a)} + \frac{75}{2(\kappa a)^2} \quad (4.11)$$

Η παραπάνω εξίσωση αναφέρεται στα λιποσωμιακά εναιωρήματα της παρούσας μελέτης.

4.6 Φθορισμομετρία (Fluorescence spectroscopy)

Χρησιμοποιήθηκε το όργανο Fluorolog-3, model FL3-21, Jobin Yvon-Spex σε θερμοκρασία δωματίου (25° C). Το μήκος κύματος για τη διέγερση ήταν $\lambda = 335 \text{ nm}$ και τα φάσματα εκπομπής λήφθηκαν στη περιοχή 350-600 nm με 1 nm σφάλμα με χρόνο ολοκλήρωσης 0.5 s. Η σχισμή που περνά η ακτίνα έχει πλάτος 1 nm και στη διέγερση και στην εκπομπή. Υπολογίστηκαν οι λόγοι I_1/I_3 και I_E/I_M (όπου I_1 και I_3 είναι οι εντάσεις της πρώτης και της τρίτης κορυφής του φάσματος φθορισμού του πυρενίου στα 372 nm και 383 nm αντίστοιχα και I_E στα 480nm και I_M στα 372nm).

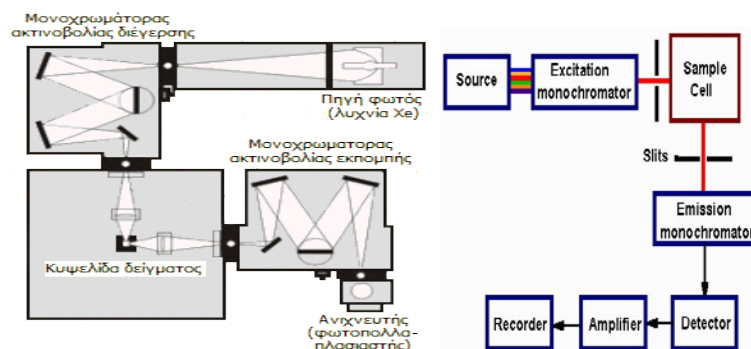
Οργανολογία φθορισμομετρίας.

Τα όργανα που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της έντασης του φθορισμού ενός διαλύματος φθορίζουσας ουσίας τυπικά διαθέτουν:

- 1) Μια πηγή ακτινοβολίας διέγερσης (συνήθως μια πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας υψηλής έντασης, όπως λυχνία ξένου).
- 2) Έναν επιλογέα του μήκους κύματος της διεγείρουσας ακτινοβολίας (μονοχρωμάτορας ή απλά έγχρωμα φίλτρα).
- 3) Μια μονάδα τοποθέτησης της κυψελίδας με το μετρούμενο διάλυμα.
- 4) Έναν επιλογέα του μήκους κύματος της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας (μονοχρωμάτορας ή απλά έγχρωμα φίλτρα).
- 5) Έναν ανιχνευτή οπτικής ακτινοβολίας (π.χ. φωτοπολλαπλασιαστής).

- 6) Ηλεκτρονικό ενισχυτή του σήματος του ανιχνευτή και όργανο παρουσίασης της μετρούμενης έντασης.

Χαρακτηριστικό κατασκευαστικό γνώρισμα όλων των φθορισμομέτρων είναι ότι η παρακολούθηση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας (δηλ. του φθορισμού) πραγματοποιείται υπό γωνία 90° σε σχέση με την ακτινοβολία διέγερσης, έτσι ώστε να μην παρενοχλεί η ακτινοβολία αυτή τη μέτρηση.



Εικόνα 4.3: Διάταξη Φθορισμομέτρου.

Τα λιποσώματα μετρήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25°C) και στους 45°C. Οι λόγοι I_1/I_3 και I_E/I_M (όπου I_1 και I_3 είναι οι εντάσεις της πρώτης και της τρίτης κορυφής του φάσματος φθορισμού του πυρενίου στα 372 nm και 383 nm αντίστοιχα και I_E στα 480nm και I_M στα 372nm, επίσης) είναι ενδεικτικοί της μικρο-πολικότητας (micro polarity) και του μικροϊξώδους / μικρορευστότητας (microviscosity/microfluidity) της λιπιδικής μεμβράνης, αντίστοιχα. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του λόγου I_1/I_3 τόσο μεγαλύτερη είναι η μικροπολικότητα του περιβάλλοντος της λιπιδικής μεμβράνης. Ο λόγος I_E/I_M είναι ανάλογος με τη συχνότητα των συγκρούσεων των μορίων του πυρενίου, δηλαδή με την ικανότητά του να σχηματίζει συσσωματώματα (excimer). Μεγαλύτερη τιμή του λόγου I_E/I_M είναι ενδεικτική μεγαλύτερης μικρορευστότητας (μικρότερου μικροϊξώδους) της λιποσωματικής μεμβράνης.

4.7 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης

Η Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) είναι μία από τις σύγχρονες και ευέλικτες μεθόδους ανάλυσης της μικροδομής μεγάλου αριθμού υλικών. Η ικανότητα των οπτικών μικροσκοπίων περιορίζεται λόγω της φύσης του φωτός σε επίπεδα μεγενθύνσεων έως 1000x και σε διακριτική ικανότητα έως 0.2 μm. Στις αρχές της δεκαετίας του '30 υπήρχε ήδη η ανάγκη για εξέταση του εσωτερικού του κυττάρου (πυρήνας, μιτοχόνδρια κλπ.) που απαιτούσε μεγενθύνσεις μεγαλύτερες του 10,000 x. Η απαίτηση αυτή οδήγησε στην ανακάλυψη και εφαρμογή των ηλεκτρονικών μικροσκοπίων. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης ή διαπερατότητας (TEM, Transmission Electron Microscope) ήταν το πρώτο είδος ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και στη συνέχεια ακολούθησε το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM, Scanning Electron Microscope). Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης είναι ένα όργανο που λειτουργεί όπως περίπου και ένα οπτικό μικροσκόπιο μόνο που χρησιμοποιεί δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας αντί για φως, για να εξετάσει αντικείμενα σε λεπτομερή κλίμακα. Τα ηλεκτρόνια λόγω της κυματικής τους φύσης μπορούν να εστιαστούν όπως και τα φωτεινά κύματα αλλά σε πολύ μικρότερη επιφάνεια (π.χ. κόκκος υλικού). Η δέσμη ηλεκτρονίων σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος με το οποίον αλληλεπιδρά. Από την αλληλεπίδραση αυτή προκύπτουν πληροφορίες σε σχέση με τα άτομα των στοιχείων που απαρτίζουν το εξεταζόμενο υλικό. Από τα άτομα των στοιχείων εκπέμπονται κυρίως δευτερογενή (secondary) και οπισθοσκεδαζόμενα (backscattered) ηλεκτρόνια καθώς και ακτίνες X. Η ένταση των εκπεμπόμενων ηλεκτρονίων επηρεάζεται από τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας. Έτσι το SEM δίνει πληροφορίες που αφορούν κυρίως στη μορφολογία και στη σύσταση της επιφανείας. Εφαρμόζοντας ένα σύστημα ανίχνευσης της διασποράς των ενεργειών των ακτίνων X που δημιουργούνται στην επιφάνεια από την προσπίπτουσα δέσμη, μπορεί να γίνει ημιποσοτική στοιχειακή ανάλυση του υλικού. Επομένως το SEM χρησιμοποιείται για την εξέταση μικροδομής στερεών δειγμάτων και για να δίνει εικόνες υψηλού βαθμού διεύθυνσης.

Η λειτουργία του SEM στηρίζεται στις αλληλεπιδράσεις του προς εξέταση δείγματος και της προσπίπτουσας σε αυτό δέσμης ηλεκτρονίων. Οι βασικές διατάξεις που υπάρχουν στο μικροσκόπιο είναι το σύστημα παραγωγής δέσμης ηλεκτρονίων, το σύστημα κατεύθυνσης της δέσμης, το σύστημα πληροφοριών και τέλος το σύστημα κενού.

Τα βασικά στάδια λειτουργίας ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου είναι:

- 1) Σχηματίζεται μία δέσμη ηλεκτρονίων από την πηγή η οποία επιταχύνεται προς το δείγμα μέσω ενός θετικού ηλεκτρικού δυναμικού
- 2) Χρησιμοποιώντας μεταλλικά ανοίγματα, ηλεκτρομαγνητικούς φακούς και πηνία σάρωσης, επιτυγχάνεται μία λεπτή εστιασμένη μονοχρωματική δέσμη η οποία σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος
- 3) Οι αλληλεπιδράσεις δέσμης δείγματος καταγράφονται από τους ανιχνευτές και μετατρέπονται σε εικόνα.

Τα παραπάνω στάδια ισχύουν για όλους τους τύπους ηλεκτρονικών μικροσκοπίων.

Τα ηλεκτρόνια παράγονται από ένα νήμα βολφραμίου (υπάρχουν και άλλα υλικά), το οποίο λειτουργεί σαν κάθοδος.

Μέσα από το νήμα περνάει ρεύμα (filament current). Καθώς το ρεύμα αυξάνεται, εκπέμπονται ηλεκτρόνια τα οποία κατευθύνονται προς την άνοδο στην οποία εφαρμόζεται ένα δυναμικό 1-30 KV (accelerating voltage). Η άνοδος που είναι θετική όπως και το κύκλωμα δημιουργεί ισχυρές ηλεκτρικές δυνάμεις στα ηλεκτρόνια. Αποτέλεσμα αυτού είναι ότι η άνοδος κατευθύνει και επιταχύνει τα ηλεκτρόνια, ελέγχει δηλαδή την ενέργειά τους.

Καθώς αυξάνεται το ρεύμα του νήματος, φθάνει σε ένα σημείο που δεν εκπέμπονται πλέον νέα ηλεκτρόνια. Αυτή η κατάσταση ονομάζεται κορεσμός του νήματος (filament saturation). Αν το ρεύμα του νήματος αυξηθεί επιπλέον, έχουμε υπερθέρμανση και εξάχνωση του βολφραμίου, δηλαδή το νήμα καίγεται. Ακόμα όμως και στο σημείο κορεσμού, μέρος του βολφραμίου εξαχνώνεται και γι' αυτό με την πάροδο του χρόνου το νήμα λεπταίνει.

Ο αριθμός ηλεκτρονίων στην δέσμη ορίζεται σαν ρεύμα εκπομπής (emission current – 100 μΑ). Καθορίζεται από την απόσταση ανάμεσα στην άκρη του νήματος (filament tip) και του ανοίγματος που υπάρχει στο καπάκι (Wehnelt cap aperture). Όσο πιο κοντά είναι τόσο περισσότερα ηλεκτρόνια έλκονται και τόσο μεγαλύτερο γίνεται το ρεύμα εκπομπής.

Τα ηλεκτρόνια επιταχύνονται από την άνοδο και περνούν μέσα από ένα ηλεκτρομαγνητικό φακό συμπίκνωσης (condenser lens) που τα μετατρέπει σε δέσμη (Στάδιο απομεγέθυνσης). Η ισχύς αυτού του φακού καθορίζει την διάμετρο της δέσμης (spot size).

Άλλοι ηλεκτρομαγνητικοί φακοί ελέγχουν την εστίαση της δέσμης πάνω στην επιφάνεια του δείγματος. Τα παρακάτω σχήματα παρουσιάζουν δύο διαφορετικές συνθήκες εστίασης της δέσμης των ηλεκτρονίων: σε μικρή απόσταση εργασίας από το δείγμα (αριστερά) και σε μεγαλύτερη (δεξιά). Και στις δύο περιπτώσεις χρησιμοποιούνται ίδιοι φακοί και με το ίδιο μέγεθος διαφράγματος. Όμως, καθώς μετακινείται το δείγμα μακριά από τους φακούς παρατηρούνται τα εξής:

- Η απόσταση εργασίας S αυξάνει
- Η απομεγέθυνση ελαττώνεται
- Το μέγεθος του σημείου αυξάνει
- Η γωνία απόκλισης α ελαττώνεται

Η ελάττωση της απομεγέθυνσης συμβαίνει όταν ελαττώνεται το ρεύμα των φακών, που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του μήκους εστίασης f των φακών. Η ανάλυση του δείγματος ελαττώνεται με την αύξηση της απόστασης εργασίας, επειδή αυξάνεται το μέγεθος του σημείου. Αντίστροφα, το βάθος του πεδίου αυξάνει με την αύξηση της απόστασης εργασίας, επειδή η γωνία απόκλισης είναι μικρότερη.

Κατά την χρήση του SEM, η στήλη πρέπει να βρίσκεται υπό κενό για να μπορεί να παραχθεί και διατηρηθεί σταθερή η ακτίνα των ηλεκτρονίων. Ειδικά τα ηλεκτρόνια συγκρούονται με τα μόρια του αέρα και απορροφώνται. Το κενό επιτυγχάνεται με την χρήση δύο αντλιών και είναι της τάξης των $2 \cdot 10^{-3}$ Pa.

4.7.1 Μετρήσεις SEM

Για τις απεικονίσεις SEM, μία σταγόνα των λιποσωμιακών διασπορών προστέθηκε στις αποξηραμένες πλακέτες πυριτίου οι οποίες είχαν προηγουμένα καθαριστεί με ακετόνη. Μετά από 10 λεπτά, η περίσσεια του διαλύτη απομακρύνθηκε προσεκτικά με μία λωρίδα χάρτινου φίλτρου και τα δείγματα αφήνονται να στεγνώσουν στο αέρα. Η συγκέντρωση των δειγμάτων ήταν τυπικά περίπου 1×10^{-4} g/ml. Τα δείγματα των μεικτών λιποσωμάτων βομβαρδίστηκαν με χρυσό (πάχους 18 nm). Η μορφολογία των νανοσωματιδίων διερευνήθηκε από ένα πεδίο εκπομπής ηλεκτρονίων με μικροσκόπιο (EVO MA 10 SEM, Carl ZEISS) χρησιμοποιώντας τη λειτουργία του υψηλού κενού. Το μικροσκόπιο ήταν ακουστικά και θερμικά μονωμένο. Εικόνες

υψηλής ανάλυσης ελήφθησαν σε διαφορετικές περιοχές σάρωσης σε τάση 15.01kV με μία μεγέθυνση εικόνας των x14–30K.

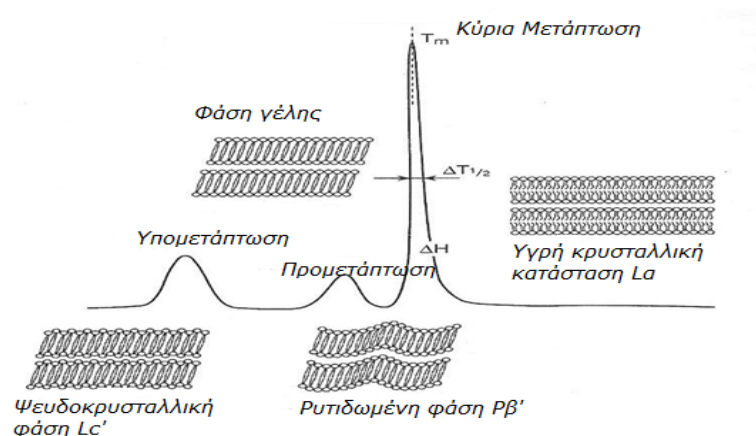
4.8 Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης

Το υπό μελέτη δείγμα καθώς και το δείγμα αναφοράς στο οποίο επιτελούνται δεν επιτελούνται θερμικά φαινόμενα στο προεπιλεγμένο εύρος θερμοκρασιών, θερμαίνονται ταυτόχρονα με τον ίδιο ρυθμό. Η θερμοκρασία τόσο του υπό μελέτη δείγματος όσο και του δείγματος αναφοράς αυξάνεται γραμμικά με το χρόνο και η διαφορά της μεταξύ της θερμοκρασίας ίση με μηδέν. Αν το υπό μελέτη δείγμα υπόκειται σε θερμικά φαινόμενα, το σύστημα ελέγχου ευαισθητοποιείται και παρέχει μεγαλύτερη ή μικρότερη θερμότητα στο υπό μελέτη δείγμα προκειμένου να διατηρηθεί η θερμοκρασία του ισοδύναμη με την αντίστοιχη του δείγματος αναφοράς. Η παράμετρος που καταγράφεται από το θερμιδόμετρο είναι η διαφορική θερμότητα ως συνάρτηση της θερμοκρασίας. Η διαφορά στην ενέργεια που παρέχεται στο σύστημα υπό μορφή θερμότητας στη μονάδα του χρόνου (dt/dt) είναι ανάλογη με τη θερμοχωρητικότητα του δείγματος προς ανάλυση. Όταν συμβαίνει ένα θερμικό φαινόμενο η διαφορική θερμότητα η οποία καταγράφεται συναρτήσει της θερμοκρασίας παίρνει τη μορφή μία καμπύλης η οποία έχει στραμμένα τα κοίλα προς τα κάτω ή προς τα άνω ανάλογα αν το φαινόμενο είναι ενδόθερμο ή εξώθερμο αντίστοιχα, ενώ μπορεί να ισχύει και το αντίθετο ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο όργανο και το πακέτο λογισμικού. Οι καμπύλες που καταγράφονται αποτελούν το αντίστοιχο θερμόγραμμα του υπό μελέτη δείγματος. Η ενθαλπία της μετάβασης (ΔH) από τη μία κατάσταση στην άλλη αποτελεί το ποσό της ενέργειας που μεταφέρεται ως θερμότητα υπό σταθερή πίεση και συνδέεται με τη θερμοχωρητικότητα του συστήματος (C_p). Υπολογίζεται δε από το ολοκλήρωμα της καμπύλης που προκύπτει από τη διαφορική θερμότητα συναρτήσει της θερμοκρασίας και καταγράφεται από το θερμιδόμετρο: $\Delta H = C_p dT$. Εκτός από την ενθαλπία μετάβασης (ΔH), η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης επιτρέπει τον προσδιορισμό σημαντικών θερμοδυναμικών παραμέτρων. Η μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια του Gibbs μίας διεργασίας αντιστοιχεί στην εξίσωση $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, όπου ΔH η μεταβολή στην ενθαλπία και

ΔS η μεταβολή στην εντροπία αντίστοιχα, που επιτελείται κατά τη διεργασία. Όταν η ελεύθερη ενέργεια Gibbs ΔG λαμβάνει μηδενική τιμή το σύστημα απαντάται ως μίγμα δύο ισοδύναμων καταστάσεων. Η θερμοκρασία όπου οι δύο καταστάσεις είναι ισοδύναμες αποτελεί τη θερμοκρασία T_m . Στη θερμοκρασία αυτή, εφόσον η ελεύθερη ενέργεια Gibbs ΔG μεταξύ των δύο καταστάσεων έχει μηδενική τιμή, ισχύει $T_m = \Delta H / \Delta S$. Η θερμοκρασία μετάβασης T_m αποτελεί τη θερμοκρασία όπου το σύστημα εμφανίζει τη μέγιστη θερμοχωρητικότητα. Σε μεταβάσεις φάσεων οι οποίες επάγουν συμμετρικές καμπύλες, η αντίστοιχη θερμοκρασία μετάβασης T_m αντιπροσωπεύει τη θερμοκρασία στην οποία το φαινόμενο έχει ολοκληρωθεί στο μισό. Ωστόσο, σε καμπύλες οι οποίες χαρακτηρίζονται από ασυμμετρία, η θερμοκρασία T_m δεν αντιστοιχεί στο μέσο σημείο της μετάβασης φάσης, αλλά αντί αυτού χρησιμοποιείται ο όρος $T_{1/2}$ ο οποίος αποτελεί την πραγματική θερμοκρασία στην οποία το φαινόμενο έχει ολοκληρωθεί κατά το ήμισυ. Το σχήμα της καμπύλης της διαφορικής θερμότητας συναρτήσει της θερμοκρασίας παρέχει σημαντικές πληροφορίες σχετικές με τη μετάβαση που επιτελείται. Το εύρος θερμοκρασίας που αντιστοιχεί στο ήμισυ του ύψους της καμπύλης σχετίζεται με την καθαρότητα του συστήματος καθώς και τη φύση της συνεργασιμότητας της μετάβασης. Η παρουσία πρόσθετων γενικά έχει ως αποτέλεσμα τη διαπλάτυνση της καμπύλης μετάβασης και το σχήμα της κορυφής (π.χ. ασυμμετρία, πολλαπλότητα) και το αποτέλεσμα είναι ενδεικτικό του είδους αλληλεπίδρασης του πρόσθετου με το υπό μελέτη σύστημα. Συνήθως η μετάβαση φάσεων σε μία διπλο σφαιρίδα περιλαμβάνει αλληλουχία ενδιάμεσων καταστάσεων μέχρι να μεταπέσει από τη μία κατάσταση στην άλλη. Οι ενδιάμεσες αυτές καταστάσεις οφείλονται στο σχηματισμό περιοχών συνύπαρξης φωσφολιπιδίων σε διαφορετικές φάσεις εξαιτίας της πλάγιας μετατόπισής τους στη διπλο σφαιρίδα ή και διαφορετικής σύστασης παρουσία ενός προσθέτου. Ο αριθμός των φωσφολιπιδίων που απαντώνται στην κάθε φάση καθώς και η διασπορά των φάσεων που συνυπάρχουν στη διπλο σφαιρίδα καθορίζουν το εύρος της συνολικής μετάβασης το οποίο εκφράζεται σε όρους συνεργασιμότητας. Η συνεργασιμότητα της μετάβασης εκφράζεται συνήθως αριθμητικά ως το εύρος στη θερμοκρασία που αντιστοιχεί στο μισό ύψος της καμπύλης και χαρακτηρίζεται ως $\Delta T_{1/2}$. Η εκκίνηση του θερμικού φαινομένου αποτελεί τη θερμοκρασία στην οποία η προέκταση της ευθείας γραμμής βάσης τέμνεται με την προέκταση της ευθείας από την κορυφή της καμπύλης η οποία αντιστοιχεί στο T_m προς τη γραμμή βάσης και χαρακτηρίζεται ως T_{onset} .

4.8.1 Θερμοτροπικές μεταβολές σε διπλοστοιβάδες φωσφολιπιδίων χολίνης

Η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης αποτελεί μία θερμοδυναμική τεχνική η οποία χρησιμοποιείται εκτεταμένα στη μελέτη της θερμοτροπικής συμπεριφοράς λιπιδίων σε μοντέλα και βιολογικά συστήματα. Οι διπλοστοιβάδες φωσφολιπιδίων υπόκεινται σε θερμικές μεταβολές οι οποίες περιλαμβάνουν μεταβάσεις από την κατάσταση τάξης στην κατάσταση αταξίας και οι οποίες χαρακτηρίζουν αντίστοιχα τις κρυσταλλικές δομές της διπλοστοιβάδας. Οι θερμοτροπικές ιδιότητες σε διπλοστοιβάδες που σχηματίζονται από φωσφολιπίδια χολίνης έχουν μελετηθεί εκτενώς και αποτελούν το συνηθέστερο μοντέλο στη μελέτη αλληλεπίδρασης βιοδραστικών μορίων σε μεμβράνες. Οι φωσφατιδυλοχολίνες χαρακτηρίζονται από πλούσιο πολυμορφισμό και υπόκεινται σε μεταβάσεις μεταξύ των φάσεών τους, η ύπαρξη των οποίων εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Ένα τυπικό θερμόγραμμα το οποίο αντιστοιχεί σε μεταβάσεις φάσεων διπλοστοιβάδας αποτελούμενης από διπαλμιτόϋλοφωσφατιδυλοχολίνη [DPPC, C(16):C(16)PC] όπου διακρίνονται τρεις ενδόθερμες μεταβάσεις. Η κορυφή μικρής ενθαλπίας μετάβασης η οποία παρατηρείται στις χαμηλότερες θερμοκρασίες αντιστοιχεί σε μετάβαση φάσεων γνωστή ως υπομετάπτωση (subtransition). Η κορυφή, επίσης μικρής ενθαλπίας μετάβασης, σε ενδιάμεσες θερμοκρασίες είναι γνωστή ως προμετάπτωση (pretransition), ενώ η κορυφή υψηλής ενθαλπίας μετάβασης αποτελεί την κύρια μετάπτωση (main transition).



Εικόνα 4.4 Τυπικό θερμόγραμμα διπάλμιτικής φωσφατιδυλοχολίνης (DPPC). Μεταβολές της ενδόθερμης διαδικασίας μεταβολής κρυσταλλικής φάσης του φωσφολιπιδίου διπάλμιτική φωσφατιδυλοχολίνη (DPPC).

4.8.2 Μετρήσεις DSC

Τα πειράματα της Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC) πραγματοποιήθηκαν σε ένα 822^e Mettler-Toledo (Schwerzenbach, Ελβετία), το οποίο βαθμονομήθηκε με καθαρό Ίνδιο (pure indium) ($T_m=156.6\text{ }^{\circ}\text{C}$). Σφραγισμένα χωνευτήρια αλουμινίου 40μl χρησιμοποιήθηκαν για την εισαγωγή των δειγμάτων. Τα δείγματα που μελετήθηκαν ήταν λιποσώματα σύστασης DPPC, DPPC:cholesterol (9:1 μοριακός λόγος), DPPC:PAPAM G4 (9:1 μοριακός λόγος) και DPPC:MPOx-2 (9:1 μοριακός λόγος) με συγκέντρωση 30mg/ml (με αναφορά στο σύνολο της διασποράς) για το συνολικό λιπιδικό περιεχόμενο. Ένα άδειο σφραγισμένο χωνευτήριο αλουμινίου χρησιμοποιήθηκε ως αναφορά. Πριν τις μετρήσεις, τα χωνευτήρια υποβλήθηκαν σε μία θερμική καταπόνηση σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία μετάβασης των DPPC λιπιδίων για να εξασφαλισθεί η ισορροπία. Όλα τα δείγματα σαρώθηκαν επανειλημμένα μέχρι να ληφθούν ιδανικά θερμογράμματα. Δύο κύκλοι ψύξης θέρμανσης πραγματοποιήθηκαν; από 10 στους 60°C με 20°C/min και 2°C/min ρυθμό σάρωσης αντίστοιχα. Ο δεύτερος κύκλος θέρμανσης λήφθηκε υπόψη για την εξαγωγή συμπερασμάτων. Οι μεταβολές της ενθαλπίας και η χαρακτηριστική θερμοκρασία μετάβασης φάσης υπολογίστηκε με το λογισμικό Mettler-Toledo STAR^e.

4.8.3 Πειράματα DSC για τα χημικά συστήματα σύστασης DPPC:MPOx-1

Τα πειράματα της Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC) πραγματοποιήθηκαν σε ένα 822^e Mettler-Toledo (Schwerzenbach, Ελβετία), το οποίο βαθμονομήθηκε με καθαρό Ίνδιο (pure indium) ($T_m=156.6\text{ }^{\circ}\text{C}$). Σφραγισμένα χωνευτήρια αλουμινίου 40μl χρησιμοποιήθηκαν για την εισαγωγή των δειγμάτων. Τα δείγματα που μελετήθηκαν ήταν λιποσώματα DPPC:MPOx-1 σε μοριακούς λόγους 9:0, 9:0.1, 9:0.5, 9:1 και 9:3 με συγκέντρωση 30mg/ml (με αναφορά στο σύνολο της διασποράς) για το συνολικό λιπιδικό περιεχόμενο. Ένα άδειο σφραγισμένο χωνευτήριο

αλουμινίου χρησιμοποιήθηκε ως αναφορά. Πριν τις μετρήσεις, τα χωνευτήρια υποβλήθηκαν σε μία θερμική καταπόνηση σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία μετάβασης των DPPC λιπιδίων για να εξασφαλισθεί η ισορροπία. Όλα τα δείγματα σαρώθηκαν επανειλημμένα μέχρι να ληφθούν ιδανικά θερμογράμματα. Δύο κύκλοι ψύξης θέρμανσης πραγματοποιήθηκαν; από 10 στους 60°C με 20°C/min και 2°C/min ρυθμό σάρωσης αντίστοιχα. Ο δεύτερος κύκλος θέρμανσης λήφθηκε υπόψη για την εξαγωγή συμπερασμάτων. Οι μεταβολές της ενθαλπίας και η χαρακτηριστική θερμοκρασία μετάβασης φάσης υπολογίστηκε με το λογισμικό Mettler-Toledo STAR^e.

4.9 Μαθηματική μοντελοποίηση

Τρία μαθηματικά μοντέλα χρησιμοποιήθηκαν για να περιγράψουν διαφορετικά σύνολα δεδομένων, και συγκεκριμένα οι εξισώσεις equations (Weibull, 1951), η power law (Peppas, 1985; Ritger and Peppas, 1987) και μια παραλλαγή του τελευταίου τμήματος της εξίσωσης power law. Και στις τρεις εξισώσεις συμπεριλήφθηκε ένας επιπρόσθετος παράγοντας C_0 που υπολόγιζε την αρχική ταχεία έξοδο/ αποδέσμευση του φαρμακομορίου από το φορέα (<2 mins). Οι εξισώσεις Weibull μπορούν να γραφούν όπως παρακάτω:

$$F = C_0 + C_1 (1 - e^{-b_1 t^{a_1}}) \quad (4.12)$$

όπου F είναι το ποσοστό της ποσότητας της ενσωματωμένης IND που αποδεσμεύτηκε, ενώ b_1 είναι μία παράμετρος της κλίμακας (scale parameter) και a_1 είναι μία παράμετρος σχήματος (shape parameter).

Η εξίσωση power law που χρησιμοποιήθηκε μπορεί να γραφτεί ως:

$$F = C_0 + K_1 t^{n_1} \quad (4.13)$$

όπου K_1 είναι μία σταθερά που αντανακλά τα δομικά και τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά των συστήματος μεταφοράς εκφρασμένο σε μονάδες χρόνου^{-n₁} (constant reflecting the structural and geometric characteristic of the delivery system expressed in time^{-n₁} units) και n_1 είναι ο εκθέτης της αποδέσμευσης, η τιμή του οποίου σχετίζεται με τον υποκείμενο μηχανισμό της αποδέσμευσης του

φαρμακομορίου (release exponent the value of which is related to the underlying mechanism(s) of drug release) (Peppas, 1985; Ritger and Peppas, 1987).

Όπως προναφέρθηκε, μία παραλλαγή της εξίσωσης (4.13) με το άθροισμα 2 power law όρων χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει τα πρότυπα της αποδέσμευσης που φαίνεται να παρουσιάζει δύο ξεχωριστές φάσεις, οι οποίες είναι:

$$F = \begin{cases} C_0 + K_1 t^{n_1} & \text{αν } t < T \\ C_0 + K_1 T^{n_1} + K_2 t^{n_2} & \text{αν } t > T \end{cases} \quad (4.14)$$

όπου T είναι ο χρόνος κατά τον οποίο αλλάζει η κινητική.

Η λειτουργία lsqnonlin στο MATLAB® χρησιμοποιήθηκε για να προσαρμοστούν τα προτεινόμενα μαθηματικά μοντέλα στα πειραματικά δεδομένα της αποδέσμευσης της IND από τα DPPC:MPOx-1 (σε διαφορετικούς μοριακούς λόγους) χημικά λιποσώματα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5 Κατιονικά και ανιονικά λιποσώματα

5.1 Η μορφολογία φορτισμένων λιποσωματικών φορέων με ανάλυση Μορφοκλασματικών Συνόλων

5.1.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Τα κατιονικά λιποσώματα έχουν χρησιμοποιηθεί σε ευρεία κλίμακα για μεταφορά γονιδίων τις δύο προηγούμενες δεκαετίες (Ruozzi et al., 2003). Το θετικό φορτίο πάνω στην λιποσωματική επιφάνεια διαδραματίζει ένα καθοριστικό ρόλο διότι επιτρέπει την εγκαθίδρυση ισχυρών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της λιποσωματικής διπλοστοιβάδας και των αρνητικά φορτισμένων ολιγονουκλεοτιδίων (DNA και/ή RNA). Οι μεταφορείς siRNA περιλαμβάνουν επίσης τα λιποσωματικά κυστίδια (Wu and McMillan, 2009; Kapoor et al., 2012). Τα λιπίδια μπορούν απευθείας να συμπλέκονται με τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεοτίδια με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της θετικά φορτισμένης πολικής κεφαλής του λιπιδίου και της αρνητικά φορτισμένης φωσφορικής ομάδας του DNA και/ή του RNA βελτιώνοντας το *in vivo* της συγκράτησης/παγίδευσης στο «έξυπνο» σύστημα μεταφοράς (“smart” delivery system). Τα λιπιδικά συμπλέγματα (lipoplexes) είναι συστήματα που αποτελούνται από κατιονικά λιπίδια και DNA και η λιποσωματική μορφομετατροπή (liposomal transfection) ονομάζεται λιποδιαμόλυνση (lipofection). Οι αλληλεπιδράσεις των κατιονικών λιποσωμάτων με πρότυπα κυτταρικών μεμβρανών έχουν ήδη μελετηθεί (Bonicelli et al., 2011). Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις στην επιφάνεια της λιπιδικής μεμβράνης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σύνδεση των πρωτεϊνών το υπλάσματος με τη λιποσωματική μεμβράνη/διπλοστοιβάδα και επηρεάζει τη βιοκατανομή των λιποσωμάτων. Ο ρόλος των πρωτεϊνών το υπλάσματος στην υπαγόρευση και στο νκαθισμό της βιοκατανομής των κατιονικών λιποσωμάτων έχουν μελετηθεί εκτενώς από την Carpiotti και τους συνεργάτες της το 2012. Η χρησιμοποίηση ενός λιπιδίου «βοηθού» (“helper” lipid) αποτελεί ζήτημα μείζονος σημασίας, επειδή επηρεάζει τη δομή και τη φυσικοχημική συμπεριφορά των θετικά φορτισμένων λιποσωμάτων (Hirsch-Lerner et al., 2005). Λιπίδια –συνεργάτες (co-lipids), όπως η χοληστερόλη και η dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) βοηθούν το σχηματισμό των κατιονικών

συμπλεγμάτων (lipoplexes) για μεταφορά γενετικού υλικού. Η αποτελεσματικότητα της λιποδιαμόλυνσης των κατιονικών συμπλεγμάτων ποικίλει δραστικά και εξαρτάται από τη χημεία του κατιονικού λιπιδίου, τις φυσικοχημικές ιδιότητες του λιπιδίου «βοηθού» και το λόγο του φορτίου για να σχηματιστεί ένα σύμπλεγμα νουκλεοτιδίου-λιπιδίων (Wang et al., 2012). Η ανοσογονικότητα των μη ιικών φορέων (immunogenicity of non-viral vectors) συμπεριλαμβανομένων των lipoplexes και των polyplexes είναι σχετικά χαμηλή. Από τη άλλη πλευρά, διλήμματα έχο^ν ήδη εκφραστεί για το σχεδιασμό πολυλειτουργικών μεταφορέων. Το «πολυκατιονικό δίλημμα» (“polycation dilemma”) παρουσιάστηκε από τον Wang και τους συνεργάτες τους (2012) για να περιγράψει τις αντικρουόμενες επιδράσεις του πολυκατιόντος για τη δημιουργία lipoplexes και polyplexes και την βιολογική τους συμπεριφορά in vivo, καθώς και τη φαρμακοκνητική του. Η PEG-υλίωση (PEG-ylation) των lipoplexes είναι μία από τις λύσεις για το πολυκατιονικό δίλημμα (Wang et al., 2012). Η χρήση των λιπιδίων τιτλοδότησης (titration lipids) όπως του DODAP είναι μία εναλλακτική τακτική για την επίλυση του «πολυκατιονικού διλήμματος» (Wang et al., 2012). Η βιολογική δραστηριότητα των κατιονικών λιποσωμάτων γενικά σχετίζεται στενά με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους. Η επίδραση της μοριακής δομής του κατιονικού αμφίφιλου και της λιπιδικής σύνθεσης στη θερμοτροπική συμπεριφορά και στη κατανομή μεγέθους των λιποσωμάτων έχει μελετηθεί από τον Barenholtz και τους συνεργάτες του (2011). Η ενδοεισχώρηση / ενδοεπιχώρηση (interdigitation) στους λιποσωματικούς φορείς των κατιονικών αμφίφιλων και φωσφατιδυλοχολίνης έχει ήδη παρατηρηθεί (Ryhänen et al., 2005). Η κατευθυντήρια/κινητήρια (driving force) δύναμη για την ενδοεισχώρηση / ενδοεπιχώρηση (interdigitation) είναι η ηλεκτροστατική άπωση (Ryhänen et al., 2005). Ο Cinnelli και οι συνεργάτες του (2007) διερεύνησαν την επίδραση του κατιονικού λιπιδίου στην αυτό-συναρμολόγηση, τη θερμοτροπική συμπεριφορά φάσης και στη δομική διοργάνωση του DPPC σε υδατικό μέσο.

Οι Xu και Anchordoquy (2008) έχουν αποδείξει ότι τα κατιονικά λιποσώματα που διαθέτουν χοληστερόλη παρουσιάζουν υψηλότερα αποτελέσματα διαμόλυνσης σε ορό πλάσματος, επειδή στους τομείς που καταλαμβάνει η χοληστερόλη στη λιποσωματική διπλοστοιβάδα του συμπλέγματος λιπιδίου-DNA δε συνδέονται πρωτεΐνες, και αυτό διευκολύνει επίσης και τη μεμβρανική σύντηξη. Η παρούσα χοληστερόλης αυξάνει σημαντικά τη συνοχή της λιποσωματικής διπλοστοιβάδας,

προάγει την ύπαρξη της φάσης της υγρής κρυσταλλικής κατάστασης, μειώνει τη μεμβρανική διαπερατότητα, αυξάνει το «πακετάρισμα» των κατιονικών λιποσωμιακών μεμβρανών (increases the bilayer packing of cationic liposomal membranes) και δεν αλλάζει τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των λιποσωμάτων στο FBS (Tierney et al., 2005; Benatti et al., 2008; Pippa et al., 2012). Για αυτούς τους λόγους, η χρήση της χοληστερόλης είναι μία εναλλακτική τακτική με δυναμική για την PEG-υλίωση, εξαιτίας της αντίστασης των λιποσωμιακών φορέων στη συσσωμάτωση που προκαλείται από τις πρωτεΐνες του ορού (Crook et al., 1998; Birchall et al., 1999; Nchinda et al., 2002; Zhang and Anchordoquy, 2004).

Το DODAP είναι ένα αμινολιπίδιο (aminolipid) και φέρει ένα titratable ιόν υδρογόνου στην πολική ομάδα της κεφαλής τους. Η αμινομάδα του DODAP έχει ένα $pK_a \sim 8.5$ έτσι ώστε το λιπίδιο να εμφανίζει κάποια θετικά φορτία ακόμα και στο φυσιολογικό ουδέτερο pH, αλλά αποκτά αυξημένα θετικά φορτία, όταν το pH γίνεται όξινο. Δεδομένου ότι το DODAP εμφανίζει ένα χαμηλό θετικό φορτίο σε ουδέτερο pH, η κινητήριος δύναμη για την ενσωμάτωση ολιγονουκλεοτιδίων σε λιποσώματα που διαθέτουν DODAP είναι πιθανώς pH-εξαρτώμενη (pH-dependent) (Mitrakos and Macdonald, 1996, 1997; Miller et al., 1998; Tamaddon et al., 2007; Herrington and Altin, 2009). Εξαιτίας του γεγονότος ότι το DODAP εμφανίζει χαμηλό θετικό φορτίο σε ουδέτερο pH, ερευνήσαμε τα φυσικοχημικά και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των DPPC:DODAP (9:1 μοριακό λόγο) σε pH=7.4.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της σταθερότητας των φορτισμένων λιποσωμιακών φορέων που αποτελούνται από DPPC:DPPG ή DPPC:DODAP, ο καθορισμός της κλασματικής τους διάστασης και της κλασματικής τους επιφάνειας, ο προσδιορισμός των φυσικοχημικών τους χαρακτηριστικών σε διαφορετικά μέσα διασποράς, της ανίχνευση της εξάρτησης της κλασματικής διάστασης από τη συγκέντρωση και τη θερμοκρασία και την ποσοτικοποίηση της κινητικής της συσσωμάτωσης των κατιονικών λιποσωμάτων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Η Δυναμική, η Στατική και η Ηλεκτροφωρητική Σκέδαση του Φωτός καθώς και η Φθορισμομετρία χρησιμοποιήθηκαν για να διασαφηνίσουν την εσωτερική δομή και το μικροπεριβάλλον και τις φυσικοχημικές παραμέτρους των φορτισμένων λιποσωμιακών φορέων σε διαφορετικά μέσα, τη μελέτη σταθερότητας, καθώς και την ανταπόκριση στις δομικές αλλαγές της συγκέντρωσης και της θερμοκρασίας. Αυτή η έρευνα αποτελεί συνέχεια της προηγούμενης εργασίας των συγγραφέων για τη

διασαφήνιση της δομής και της μορφολογίας των λιποσωμιακών φορέων με στόχο τον ορθολογικό σχεδιασμό συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων της Νανοτεχνολογίας βασισμένο στα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους (Pipra et al., 2012a).

5.1.2 Μελέτες σταθερότητας

5.1.2.1 Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των DPPC:DPPG και DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος) πριν τη λυοφιλοποίηση παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1.

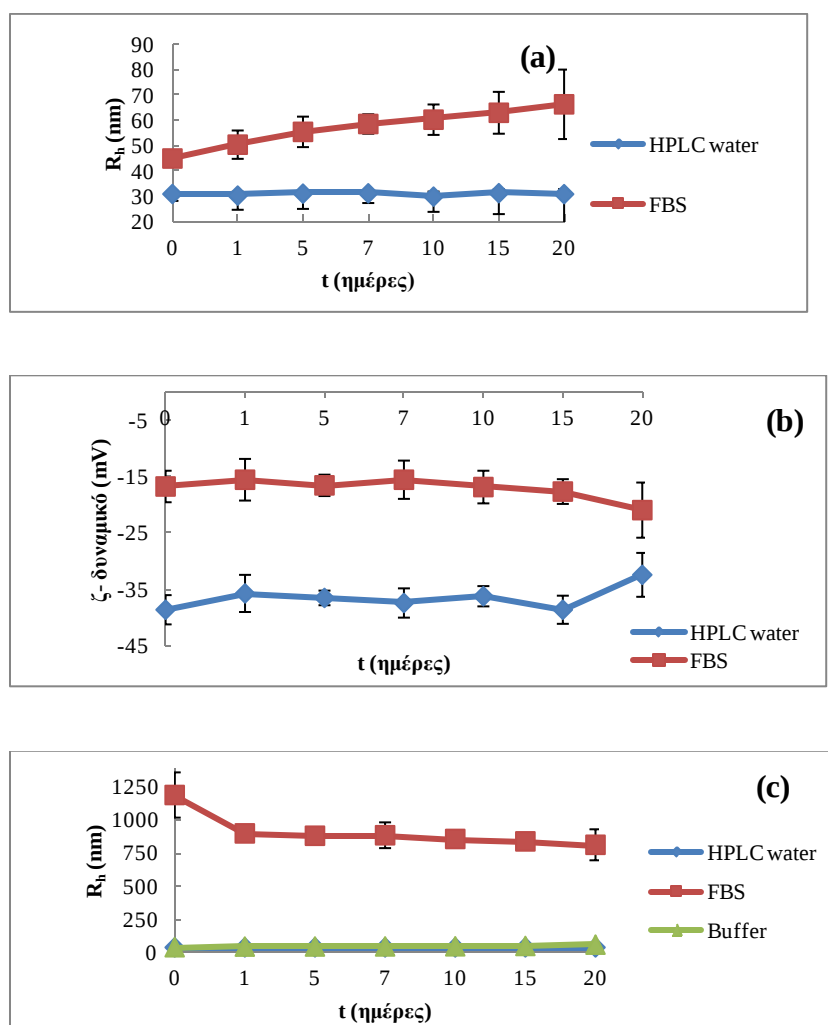
Πίνακας 5.1: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των φορτισμένων λιποσωμάτων πριν τη λυοφιλοποίηση (μέσο διασποράς λιποσωμάτων: διάλυμα σουκρόζης 150mM).

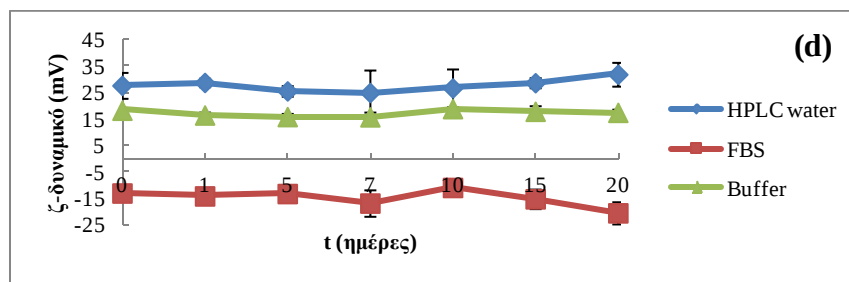
Σύσταση Λιποσωμάτων	R_h (nm)	PD.I.	ζ-δυναμικό (mV)
DPPC:DPPG (9:1 μοριακός λόγος)	31.15 ± 2.24	0.301 ± 0.011	-27.4 ± 3.96
DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος)	39.10 ± 3.30	0.241 ± 0.043	35.07 ± 2.5

Οι τιμές PD.I. αποδεικνύουν μονοδιάσπαρτο λιποσωμιακό σκέυασμα. Τα λιποσώματα στα όποια είχε ενσωματωθεί το κατιονικό λιπίδιο είναι 10nm μεγαλύτερα σε σύγκριση με τα ανιονικά λιποσώματα. Το λιποσωμιακό σκέυασμα σύστασης DPPC:DPPG (9:1 μοριακός λόγος) παρουσιάζουν αρνητικό ζ-δυναμικό που σχετίζεται με την ενσωμάτωση του αρνητικά φορτισμένου φωσφολιπίδιου DPPG. Επιπρόσθετα, θετικές τιμές ζ-δυναμικού παραλήφθηκαν για τα λιποσώματα σύστασης DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος), όπως αναμένεται, εξαιτίας της ενσωμάτωσης του DODAP στη λιπιδική διπλοστοιβάδα. Η σουκρόζη, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως κρυοπροστατευτικό και λυοπροστατευτικό, επηρεάζει τη

σταθερότητα των λιποσωμιακών συστημάτων, καθώς τα μόρια της σουκρόζης τοποθετούνται στη μεμβρανική επιφάνεια και επηρεάζουν την ενυδάτωση αντικαθιστώντας κάποια μόρια ύδατος (Kiselev et al., 2003).

Η ανασύσταση επετεύχθη με την προσθήκη ύδατος HPLC-καθαρότητας, PBS και FBS. Μέγεθος, πολυδιασπορά και ζ-δυναμικό μετρήθηκαν για 20 ημέρες για τον προσδιορισμό των λιποσωμιακών χαρακτηριστικών σε δύο διαφορετικά υδατικά μέσα και σε βιολογικό μέσο διασποράς. Η φυσική κατάσταση των λιποσωμιακών διασπορών μπορεί να ελεγχθεί από τη μέτρηση της κατανομή του μεγέθους. Το ζ-δυναμικό είναι μία άλλη σημαντική παράμετρος, η οποία δίνει μία ένδειξη που αφορά το επιφανειακό φορτίο των λιποσωμάτων. Όλα τα λιποσωμιακά συστήματα στο νερό HPLC-καθαρότητας βρέθηκαν να διατηρούν τα αρχικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους (μέγεθος και ζ-δυναμικό) το λιγότερο για τη χρονική περίοδο την οποία μελετήθηκαν (Εικόνα 5.1).





Εικόνα 5.1. Μελέτες σταθερότητας των DPPC:DPPG (9:1 μοριακός λόγος) και DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος) λιποσωμάτων. (a) R_h (b) ζ-δυναμικό των DPPC:DPPG (9:1 μοριακός λόγος) λιποσωμάτων. (c) R_h (d) ζ-δυναμικό των DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος) λιποσωμάτων. Μέσος όρος τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, SD<10% .

Η ανασύσταση στο PBS είχε ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση του ζ-δυναμικού σε λιγότερο θετικές τιμές για τα λιποσώματα σύστασης DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος). Η κινητική της συσσωμάτωσης για τα λιποσώματα DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος) στο PBS περιγράφεται με την εξίσωση:

$$R_h(t) = 1.9942t + 39.653 \quad (r^2 = 0.7381) \quad (5.1)$$

η οποία αποδεικνύει μηδενολογική κινητική. Το φαινόμενο της συσσωμάτωσης των DPPC:DODAP λιποσωμάτων λαμβάνει χώρα εξαιτίας της έλλειψης ισχυρών ηλεκτροστατικών απώσεων, διότι οι τιμές του ζ-δυναμικού των DPPC:DODAP λιποσωμάτων στο PBS μειώθηκαν σε σύγκριση με αυτές στο νερό HPLC-καθαρότητας. Οι φυσικές αλλαγές δύναται να προκύψουν εξαιτίας της εξάλειψης ή της απουσίας ηλεκτρικού φορτίου στην επιφάνεια των λιποσωματικών νανοσωματιδίων. Το ηλεκτρικό φορτίο προκαλεί μία ηλεκτροστατική άπωση, η οποία αποτρέπει φαινόμενα συσσωμάτωσης και σύντηξης των διπλοστοιβάδων. Στη διεθνή βιβλιογραφία, έχει αναφερθεί ο βαθμός της σταθεροποίησης της λιποσωματικής μεμβράνης, ο οποίος εξαρτάται από τη συγκέντρωση και τη χημεία του κατιονικού ξενιστή για τα κατιονικά λιποσώματα (Mahato, 2005; Angelini et al., 2011). Υψηλές απόλυτες τιμές του ζ-δυναμικού υποδεικνύουν αυξημένη σταθερότητα του λιποσωματικού εναιωρήματος, εξαιτίας της αποτροπής της συσσωμάτωσης και της

σύντηξης των μεμβρανών (Heutault et al., 2003). Η λιποσωμιακή σταθερότητα υποδεικνύει πως η ηλεκτροστατική άπωση είναι υπεύθυνη για την αποτροπή της συσσωμάτωσης εξαιτίας των van der Waals αλληλεπιδράσεων, οι οποίες προβλέπονται από την κλασσική θεωρία DLVO (classical DLVO theory) (Derjaguin and Landau, 1941; Verwey and Overbeek 1948).

Είναι σημαντικό να χαρακτηρίζονται / να ταυτοποιούνται οι φυσικοχημικές ιδιότητες των λιποσωμάτων, ειδικότερα σε FBS διότι η αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες του βιολογικού μέσου αναμένεται να διαφοροποιήσουν τις ιδιότητες των λιποσωμάτων, επηρεάζοντας κατά αυτόν τον τρόπο τη φυσικοχημική σταθερότητα και τις ιδιότητες κάθαρσης στο βιολογικό μέσο. Συσσωμάτωση των ανασυσταθέντων λιποσωμάτων σύστασης DPPC:DPPG (9:1 μοριακός λόγος) παρατηρήθηκε στο FBS, καθώς η υδροδυναμική ακτίνα (R_h) αυξήθηκε από 4.5nm την ημέρα της ανασύστασης του λιποσωμιακού πλακουντίου (liposomal cake) σε 6.5nm μετά από 20 ημέρες και παράλληλα παρατηρήθηκε αύξηση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (scattered intensity). Η αύξηση του μεγέθου του συσσωματώματος (όπως καθορίστηκε από την R_h) εξαιτίας της συσσωμάτωσης των λιποσωμάτων σύστασης DPPC:DPPG (9:1 μοριακός λόγος) με τα συστατικά του ορού του πλάσματος στο βιολογικό μέσο διασποράς αναπαρίσταται με την εξίσωση:

$$R_h(t) = 3.37t + 43.69 \quad (r^2 = 0.967) \quad (5.2)$$

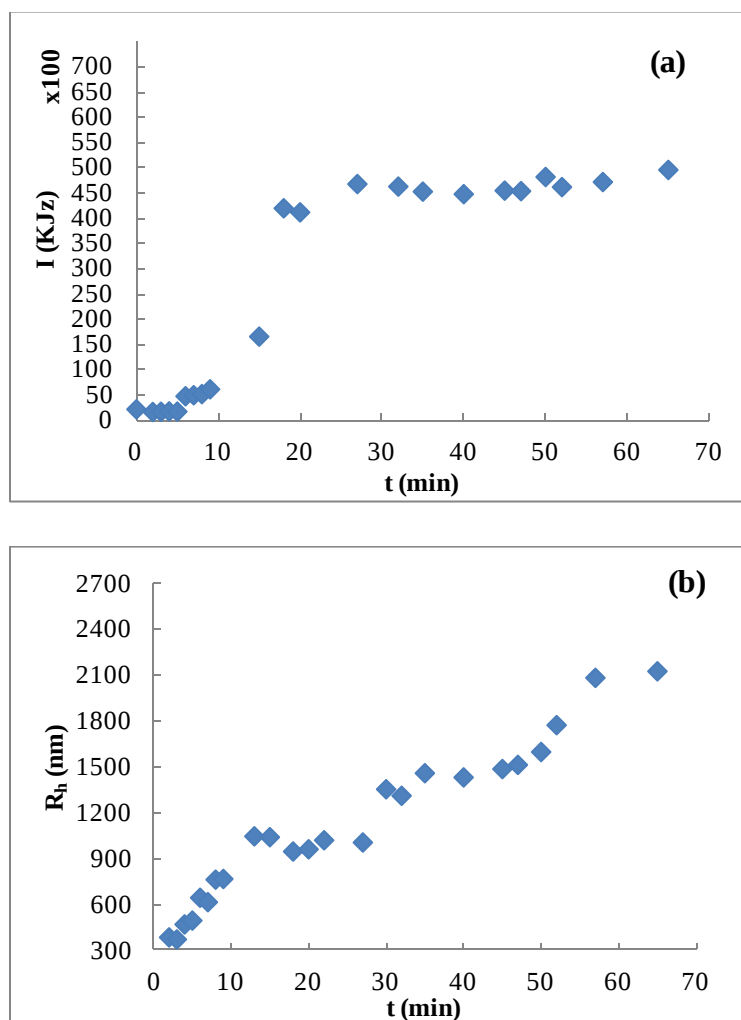
η οποία αποδεικνύει μηδενολογική κινητική. Το μέγεθος των ανασυσταθέντων DPPC:DPPG (9:1 μοριακός λόγος) λιποσωμάτων στο FBS αυξήθηκε περίπου 15nm εξαιτίας της πρωτεϊνικής σύνδεσης (protein binding), η οποία μπορεί να τροποποιήσει το αποτελεσματικό μέγεθος των νανοσωματιδίων the nanoparticle's effective size (Arnida Janát-Amsbury et al., 2011). Η ανασύσταση στο FBS προκάλεσε μία μετατόπιση του ζ-δυναμικού σε λιγότερο αρνητικές τιμές, όπως έχει παρατηρηθεί ήδη στη διεθνή βιβλιογραφία (Arnida Janát-Amsbury et al., 2011).

Για τα λιποσώματα σύστασης DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος) παρατηρήθηκε φυσικοχημική σταθερότητα στο FBS (Εικόνα 5.1). Η αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες του ορού είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση του μεγέθου των λιποσωμάτων σύστασης DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος). Μετά την ανασύσταση των κατιονικών λιποσωμάτων στο βιολογικό μέσο διασποράς, σχηματισμός μεγαλύτερου μεγέθους νανοσωματιδίων πραγματοποιήθηκε, προφανώς

εξαιτίας της οψωνινοποίησης (opsonization), η οποία από ελπίδα ένα κρίσιμο φαινόμενο για την αναγνώριση των νανοσωματιδίων από τα κύτταρα του συστήματος των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων cells of mononuclear phagocyte system (Semple et al., 1998; Dimitrova et al., 2000). Ο σχηματισμός του «πρωτεϊνικού στέμματος» (“protein corona”) πάνω στην επιφάνεια των κατιονικών λιποσωμάτων μπορεί να προκαλέσει ταχεία κάθαρση του φορέα από την αιματική κυκλοφορία (Semple et al., 1998; Capriotti et al., 2012). Η κινητική της επαγόμενης από τις πρωτεΐνες συσσωμάτωσης (the protein-induced aggregation kinetics) των λιποσωμάτων σύστασης DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος) παρουσία των πρωτεϊνών του πλάσματος περιγράφεται από την εξίσωση:

$$R_h(t) = 26.516t + 420.73 \quad (r^2 = 0.9326) \quad (5.3)$$

η οποία επίσης συσχετίζεται με κινητική μηδενικής τάξης. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κατιονικών λιποσωμάτων που εισέρχονται στο ανθρώπινο οργανισμό και οι πρωτεΐνες του πλάσματος διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο για τη βιοκατανομή (biodistribution) και την απέκκριση (elimination) τους. Για το λόγο αυτό, οι μελέτες για την κινητική της πρωτεϊνικής σύνδεσης των κατιονικών λιποσωμάτων είναι απαραίτητες, ώστε να κρίνουν αν τα λιποσώματα έχουν σχεδιαστεί επαρκώς για συστήματα μεταφοράς φαρμακομορίων ή γονιδίων. Από την άλλη πλευρά, η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από τα συσσωματώματα δεν άλλαξε δραστικά κατά τα πρώτα πέντε λεπτά της πρωτεϊνικής σύνδεσης, ενώ η υδροδυναμική ακτίνα αυξάνεται σημαντικά. Εν συνεχεία, υπάρχει μία σημαντική αύξηση στην ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από τα συμπλέγματα λιποσωμάτων – πρωτεϊνών (protein-liposome clusters) μέχρι να επιτευχθεί ένα plateau. Αλλαγές στην ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας μπορούν να συσχετισθούν με αλλαγές στη μάζα των συστατικών της βίο - κολλοειδούς διασποράς (λιποσώματα και συμπλέγματα με συστατικά του FBS) ή/και μεταβολές στις σχετικές ποσότητες των υπερμοριακών συσσωματωμάτων (supramolecular aggregates) (Εικόνα 5.2).



Εικόνα 5.2. (a) Ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας στις 9 θ και (b) R_h vs. χρόνος για τα DPPC:DODAP λιποσώματα που έχουν ανασυσταθεί σε νερό HPLC-καθαρότητας και διαλύθηκαν σε FBS (η λιποσωματική συγκέντρωση παραμένει σταθερή και ίση με 5×10^{-2} mg/ml).

Τα αποτελέσματα φαίνεται να δείχνουν επίσης μία αλλαγή στην εσωτερική δομή των λιποσωμάτων σύστασης DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος), που οφείλεται στην αλληλεπίδραση (πιθανή προφόψη και ενσωμάτωση) των πρωτεϊνών του πλάσματος και την τελική συσσωμάτωσή τους στην επιφάνεια των λιποσωμάτων. Φαινομενικά, στα πρώτα στάδια της προφόψης των πρωτεϊνών που λαμβάνει

χώρα στην επιφάνεια των λιποσωμάτων, ακολουθείται από μία μέτρια και στη συνέχεια από μία εκτεταμένη συσσωμάτωση. Στα τελευταία στάδια μία διόγκωση των νανοδομών (swelling of the nanostructures) φαίνεται να πραγματοποιείται, χωρίς αισθητή/σημαντική αλλαγή της μάζας τους. Η επαγόμενη από τις πρωτεΐνες συσσωμάτωση (the protein-induced aggregation) των κατιονικών λιποσωματικών φορέων αποτελεί πιθανή εξήγηση για την φαινομενολογία αυτή. Η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών οι οποίες συνδέονται με τα κατιονικά λιποσώματα στο αίμα του ανθρώπινου οργανισμού έχουν ήδη αναφερθεί από δημοσίευση της ερευνητικής εργασίας της Capriotti και των συνεργατών της (2012).

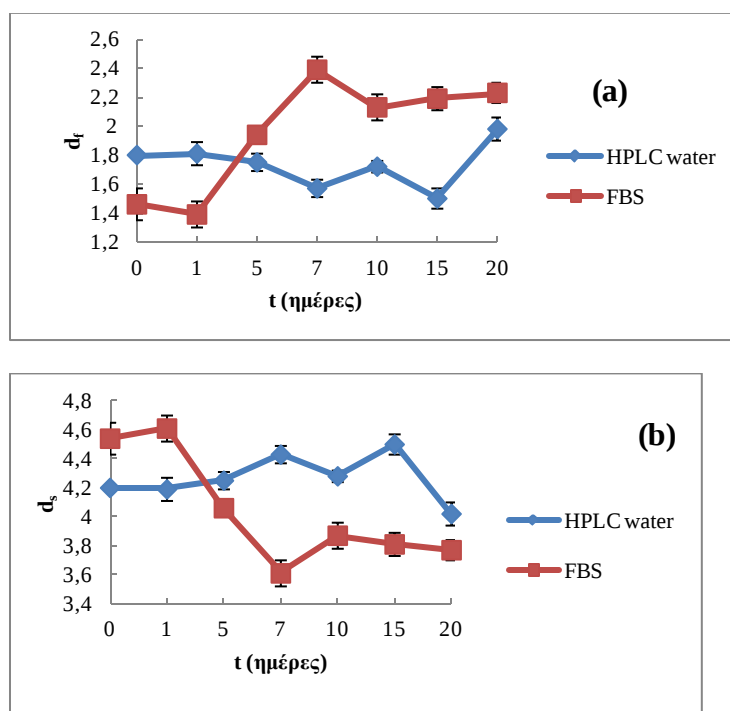
Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις στις επιφάνειες των λιπιδικών μεμβρανών διαδραματίζουν πρωτεύοντα ρόλο στη σύνδεση των πρωτεϊνών στην επιφάνεια των λιποσωμάτων. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στις τιμές του ζ-δυναμικού μεταξύ ανιόντων και κατιονικών λιποσωμάτων που έχουν ανασυσταθεί με τη χρήση FBS. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αυτή η παρατήρηση υποδηλώνει ότι η προσρόφηση της αλβουμίνης, της κυριότερης πρωτεΐνης του FBS, δεν μπορεί να εξηγηθεί με βάση τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις μεταξύ των λιποσωματικών επιφανειών και της αλβουμίνης (Law et al., 1986; Yokouchi et al., 2000, Tsunoda et al., 2001, Sabín et al., 2009). Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις είναι η κυρίαρχες για τη σύνδεση της αλβουμίνης με τις αρνητικά φορτισμένες λιποσωματικές διπλοστοιβάδες (Tsunoda et al., 2001). Για το λόγο αυτό, οι προβλέψεις της επέκτασης της DLVO θεωρίας (ή όπως αλλιώς αναφέρεται της τροποποιημένης DLVO θεωρίας) [extended or modified DLVO theory] έρχονται σε συμφωνία με της περιγραφή της κολλοειδούς συμπεριφοράς των λιποσωμάτων που έχουν ανασυσταθεί σε FBS (Ohki and Ohshima, 1999; Ohki and Arnold, 2000). Τα υπερμοριακά συσσωματώματα (supramolecular aggregates) των κατιονικών DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος) με τις πρωτεΐνες του πλάσματος παρέμειναν σταθερά για 20 ημέρες.

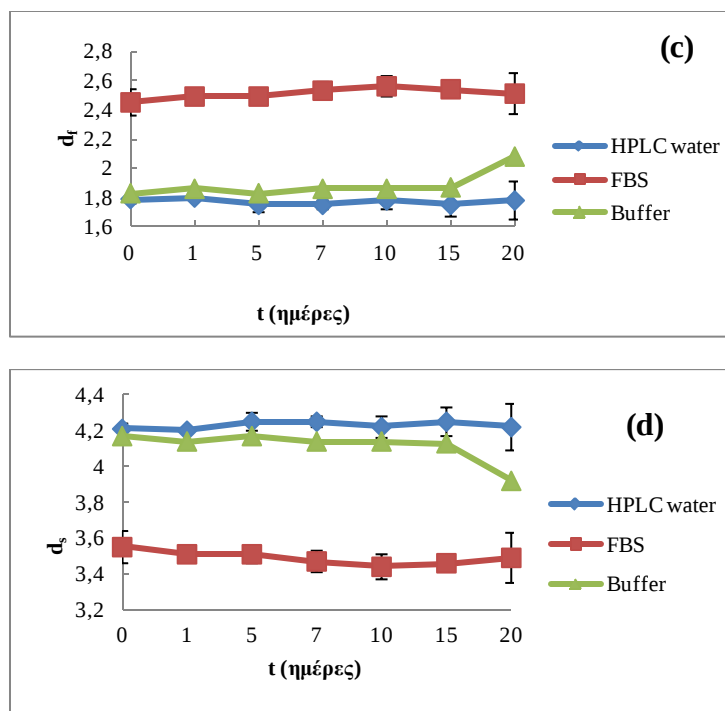
Ο λόγος R_g/R_h επηρεάζεται από το σχήμα των σωματιδίων σε ένα διάλυμα και αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μία πρόχειρη εκτίμηση της μορφολογίας του σωματιδίου. Τα παραπάνω βασίζονται στο γεγονός ότι η γεωμετρική ακτίνα (R_g) είναι το μέτρο της κατανομής της πυκνότητας της μάζας γύρω από το κέντρο της μάζας του σωματιδίου, ενώ η υδροδυναμική ακτίνα (R_h) ορίζει τις εξωτερικές διαστάσεις του σωματιδίου. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο λόγος R_g/R_h λαμβάνει την τιμή 0.775 για συμπαγή ομοιόμορφη σφαίρα (hard uniform sphere) και την τιμή 1.0

για κυστίδια με λεπτά τοιχώματα (vesicles with thin walls), ενώ οι τιμές 1.3-1.5 υποδεικνύουν μία τυχαία περιέλιξη (χαλαρή δομή), όπως στην περίπτωση των μακρομοριακών αλυσίδων (random coil (loose) conformation in the case of macromolecular chains) (Burchard, 1983). Ο λόγος R_g/R_h ισούται με 1.50 για τα λιποσώματα που έχουν ανασυσταθεί στο νερό HPLC-καθαρότητας. Επιπλέον, ο λόγος R_g/R_h είναι ίσος με 0.79 σε θερμοκρασία 45°C, υποδεικνύοντας επίσης μία μεταβολή στην εσωτερική μορφολογία των κατιονικών λιποσωμάτων από πεπλατυσμένα κυστίδια σε πιο συμπαγή σφαιρικά σωματίδια. Η αφυδάτωση της λιποσωματικής επιφάνειας καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία συμβάλει σημαντικά στην παρατηρούμενη αυτή συμπεριφορά.

5.1.2.2 Μορφοκλασματική Ανάλυση

Η κλασματική διάσταση (d_f) βρέθηκε ίση με 1.8 για τα λιποσώματα σύστασης DPPC:DPPG (9:1 μοριακός λόγος) και DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος) που ανασυστάθηκαν σε νερό HPLC καθαρότητας. Επίσης, η κλασματική διάσταση (d_f) βρέθηκε ίση με 1.8 για τα λιποσώματα σύστασης DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος) στο PBS. Η μορφολογία των φορτισμένων λιποσωματικών συστημάτων δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά στα δύο υδατικά μέσα (Εικόνα 5.3).





Εικόνα 5.3. Μελέτες σταθερότητας για τα λιποσωμιακά συστήματα χρησιμοποιώντας της μορφοκλασματική προσέγγιση (a) d_f των DPPC:DPPG (9:1 μοριακός λόγος) λιποσωμάτων (b) d_s των DPPC:DPPG (9:1 μοριακός λόγος) λιποσωμάτων (c) d_f των DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος) λιποσωμάτων (d) d_s των DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος) λιποσωμάτων. Μέσος όρος τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, $SD < 10\%$.

Μία μείωση της κλασματικής διάστασης από 1.8 σε 1.4 παρατηρήθηκε για τα λιποσώματα σύστασης DPPC:DPPG (9:1 μοριακός λόγος) στο FBS. Στη βιβλιογραφία, έχει αναφερθεί πως μείωση της τιμής της κλασματικής διάστασης λαμβάνει χώρα καθώς η ιονική ισχύς του μέσου διασποράς αυξάνεται εξαιτίας των οσμωτικών δυνάμεων (Sabín et al., 2007b). Οι τιμές d_f δε μεταβλήθηκαν κατά τη διάρκεια των 20 ημερών της μελέτης σταθερότητας για τα λιποσώματα που ανασυστάθηκαν σε νερό HPLC-καθαρότητας και σε PBS (Εικόνα 5.3). Αντίθετα, μία αύξηση της κλασματικής διάστασης από 1.8 σε 2.5 παρατηρήθηκε για τα λιποσώματα σύστασης DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος) στο FBS. Η κλασματική διάσταση είναι συνάρτηση του μεγέθους των σωματιδίων και σχετίζεται με τη μορφολογική πολυπλοκότητα (morphological complexity) των λιποσωμιακών συστημάτων. Η δομική πολυπλοκότητα (structural complexity) των κατιονικών λιποσωμάτων στο βιολογικό μέσο διασποράς θα μπορούσε να είναι η πιθανή εξήγηση για την αύξηση της κλασματικής διάστασης εξαιτίας της προσρόφησης των συστατικών του FBS πάνω

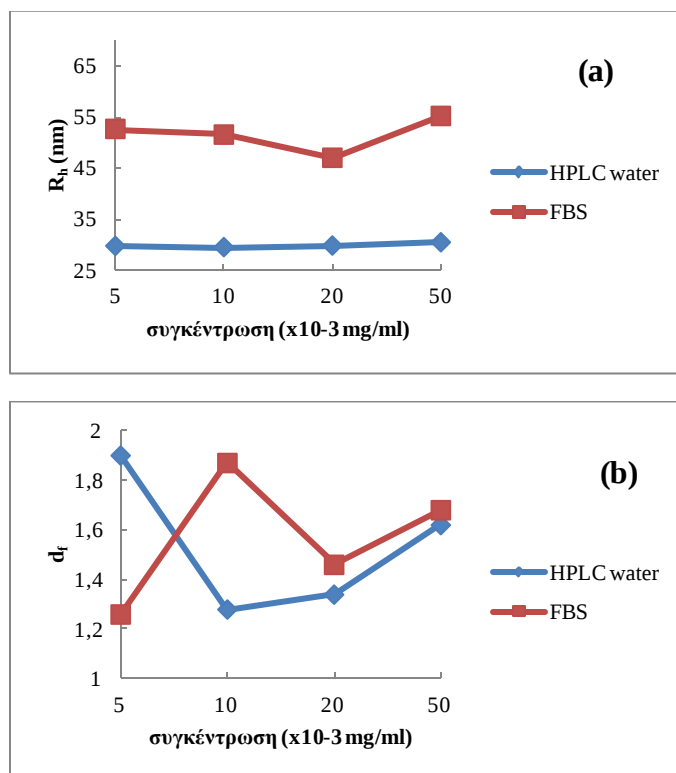
στην επιφάνεια των λιποσωμάτων (Εικόνα 5.3). Οι τιμές της κλασματικής διάστασης της επιφάνειας για τα υπό μελέτη συστήματα υπολογίστηκε από την εξίσωση:

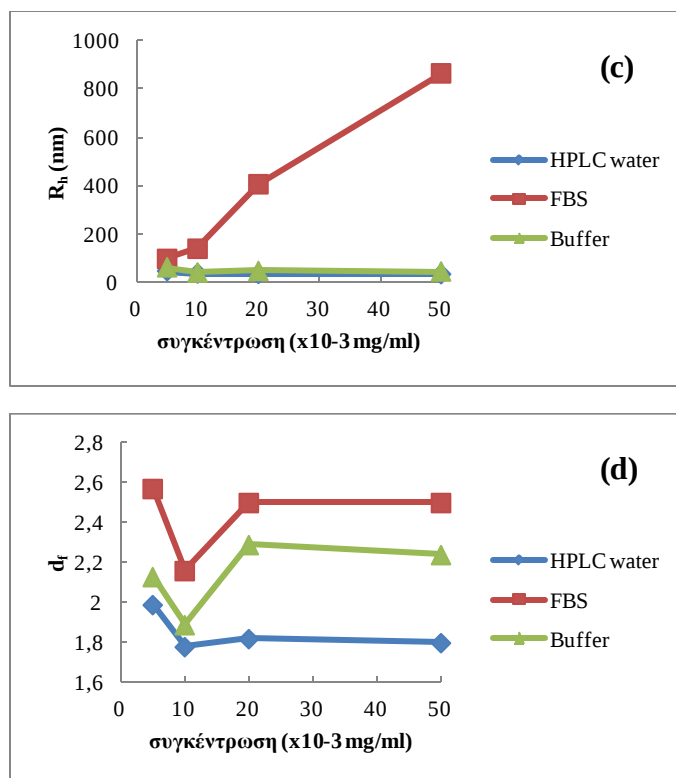
$$d_f = 6 - d_s$$

όπου d_s είναι η κλασματική διάσταση της επιφάνειας (surface fractal dimension) (Roldán-Vargas et al., 2008; Roldán-Vargas et al., 2009).

5.1.3 Επιδράσεις της συγκέντρωσης και της θερμοκρασίας.

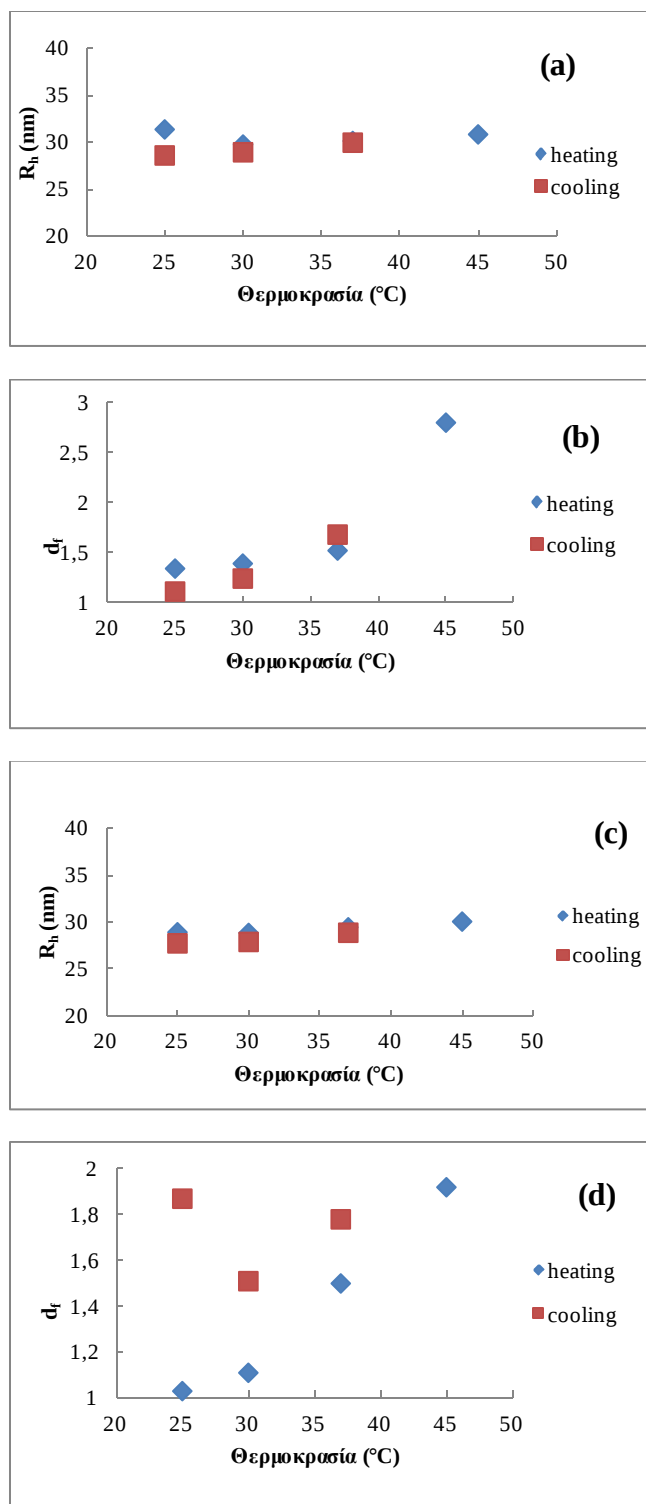
Σε προηγούμενη εργασία μας, δείξαμε πως η κλασματική διάσταση διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο για τη διασαφήνιση των μορφολογικών χαρακτηριστικών κατά τη διάρκεια της μεταβολής των φυσικοχημικών παραμέτρων ενός λιποσωματικού εναιωρήματος, όπως των αλλαγών στη συγκέντρωση και στη θερμοκρασία (Pirra et al., 2012). Η υδροδυναμική ακτίνα είναι ανεξάρτητη από τις μεταβολές της συγκέντρωσης για τα ανασυσταθέντα λιποσωματικά εναιωρήματα σύστασης DPPC:DPPG (9:1 μοριακός λόγος) και DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος) στα υδατικά μέσα (Εικόνα 5.4).





Εικόνα 5.4. (a) R_h , και (b) d_f vs. συγκέντρωση των DPPC:DPPG (9:1 μοριακός λόγος) λιποσωμάτων (c) R_h , και (d) d_f vs. συγκέντρωση των DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος) λιποσωμάτων.

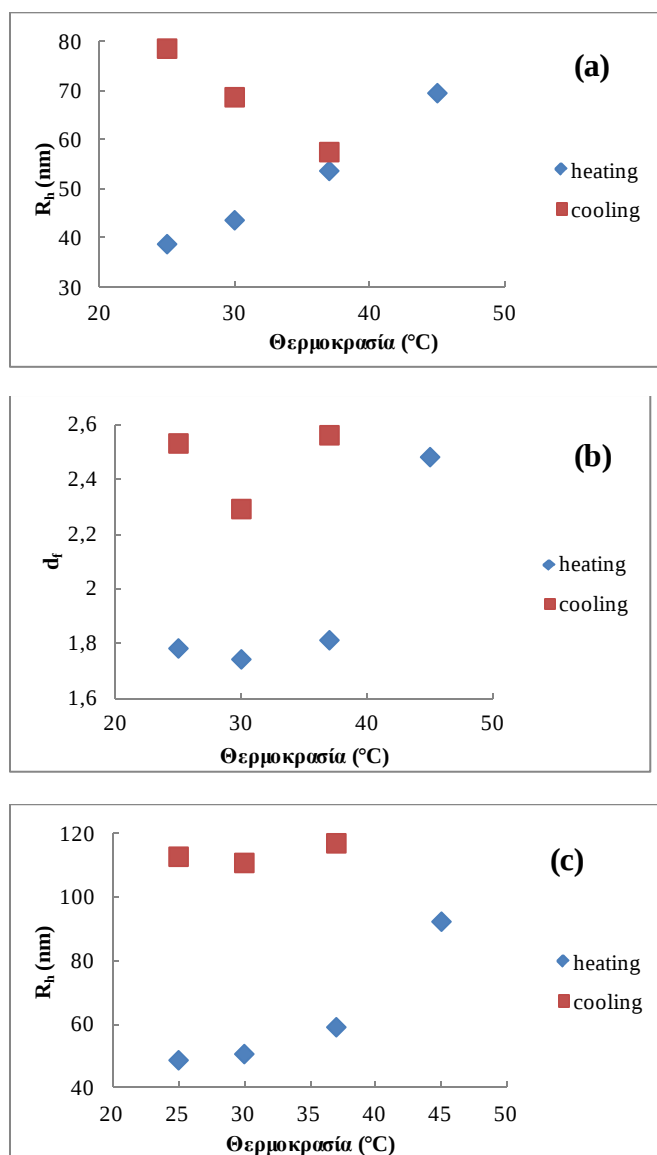
Η υδροδυναμική ακτίνα εξαρτάται από τις μεταβολές της συγκέντρωσης με γραμμικό τρόπο για τα λιποσώματα σύστασης DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος) που έχουν ανασυσταθεί σε FBS, ενώ η υδροδυναμική ακτίνα των ανιονικών λιποσωμάτων παραμένει ουσιαστικά σταθερή στο ίδιο μέσο διασποράς (FBS). Θα πρέπει να σημειωθεί πως στην υψηλότερη συγκέντρωση ο λιποσωματικός πληθυσμός στα δύο μέσα διασποράς εμφανίζεται περισσότερο ετερογενής. Ενώσω το μέγεθος των ανιονικών λιποσωμάτων δε μεταβλήθηκε σημαντικά από την αύξηση της συγκέντρωσης, οι κλασματικές διαστάσεις που προσδιορίστηκαν δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο νερό HPLC-καθαρότητας και στο FBS (Εικόνα 5.5).

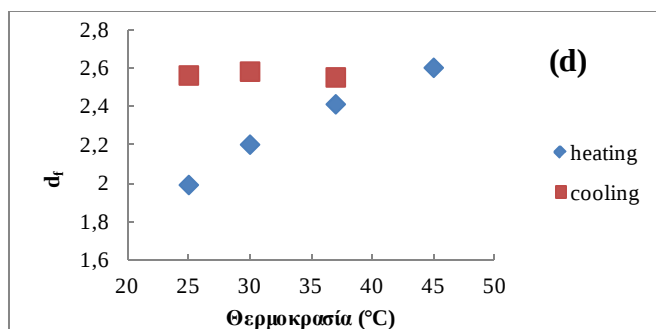


Εικόνα 5.5. (a) R_h και (b) D_f vs. θερμοκρασία των DPPC:DPPG (9:1 μοριακός λόγος) λιποσωμάτων που έχουν ανασυσταθεί με νερό HPLC καθαρότητας (η λιποσωματική συγκέντρωση παραμένει σταθερή και ίση με 1×10^{-2} mg/ml). (c) R_h και (d) D_f vs. θερμοκρασία των DPPC:DPPG (9:1 μοριακός λόγος) λιποσωμάτων που έχουν ανασυσταθεί με νερό HPLC καθαρότητας (η λιποσωματική συγκέντρωση παραμένει σταθερή και ίση με 5×10^{-3} mg/ml).

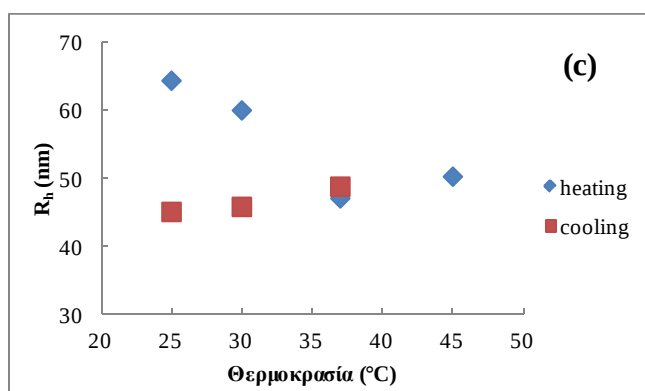
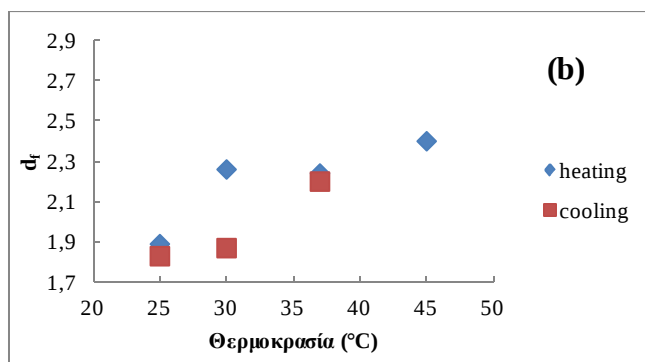
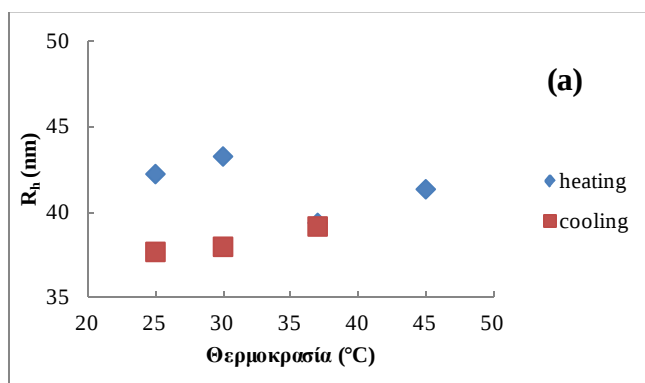
Για τα λιποσώματα σύστασης, DPPC:DPPG (9:1 μοριακός λόγος), οι κλασματικές διαστάσεις διαφοροποιούνται με αντίθετο τρόπο στα δύο μέσα διασποράς. Αντίθετα, θα πρέπει να σημειωθεί πως το μέσο διασποράς επηρεάζει τις αλλαγές στη μορφολογία με το ίδιο τρόπο στα τρία διαφορετικά μέσα διασποράς για τα κατιονικά λιποσώματα.

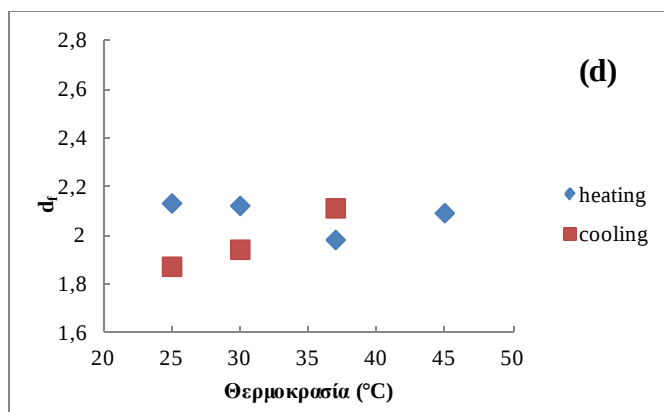
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο ρυθμός της συσσωμάτωσης των λιποσωμάτων που προκλούνται από τις πρωτεΐνες (protein-induced liposome aggregation) εξαρτάται σε έντονο από τη θερμοκρασία στην οποία λαμβάνει χώρα το φαινόμενο αυτό (Dimitrova et al., 2000). Μελετήσαμε την εξάρτηση των φυσικοχημικών παραμέτρων από τη θερμοκρασία για τα φορτισμένα λιποσώματα στη διαδικασία της θέρμανσης και της ψύξης στα δύο μέσα διασποράς (Εικόνες 5.6, 5.7, 5.8 και 5.9).



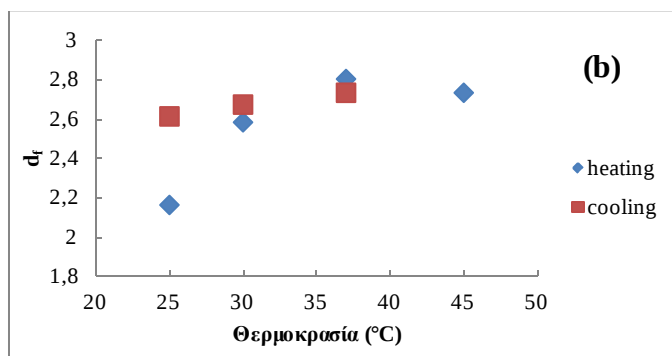
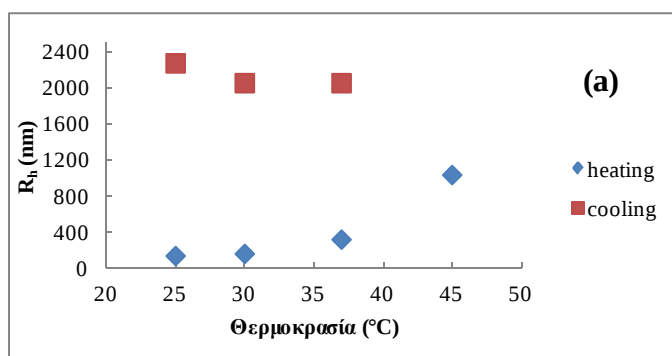


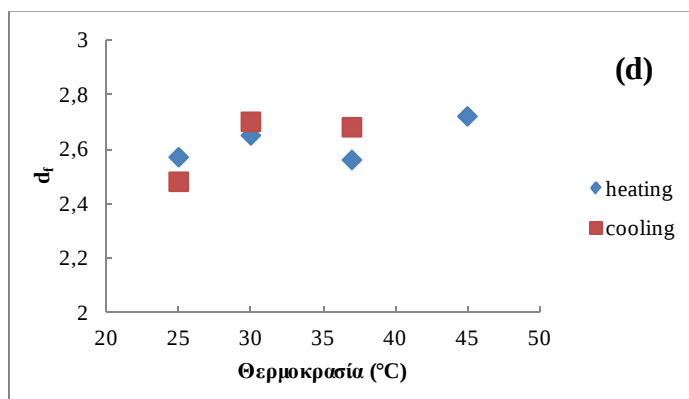
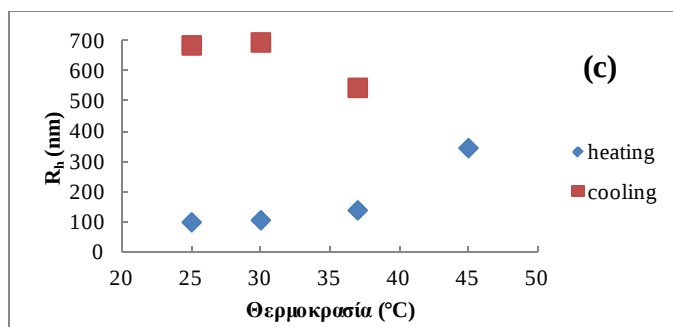
Εικόνα 5.6. (a) R_h και (b) d_f vs. θερμοκρασία των DPPC: DODAP (9:1 μοριακός λόγος) λιποσωμάτων που έχουν ανασυσταθεί με νερό HPLC καθαρότητας (η λιποσωματική συγκέντρωση παραμένει σταθερή και ίση με 1×10^{-2} mg/ml). (c) R_h και (d) d_f vs. θερμοκρασία των DPPC: DODAP (9:1 μοριακός λόγος) λιποσωμάτων που έχουν ανασυσταθεί με νερό HPLC καθαρότητας (η λιποσωματική συγκέντρωση παραμένει σταθερή και ίση με 5×10^{-3} mg/ml).



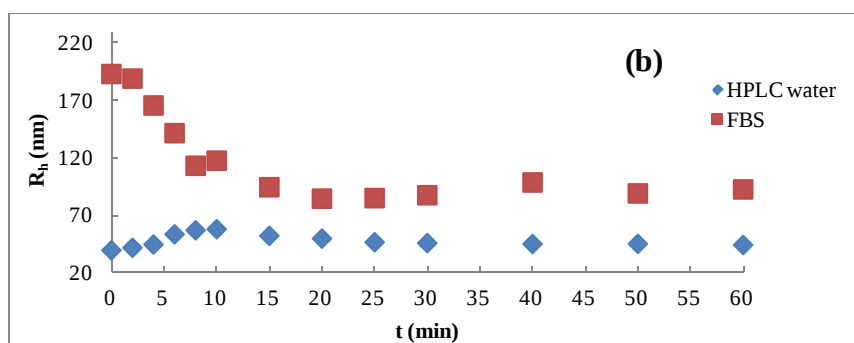
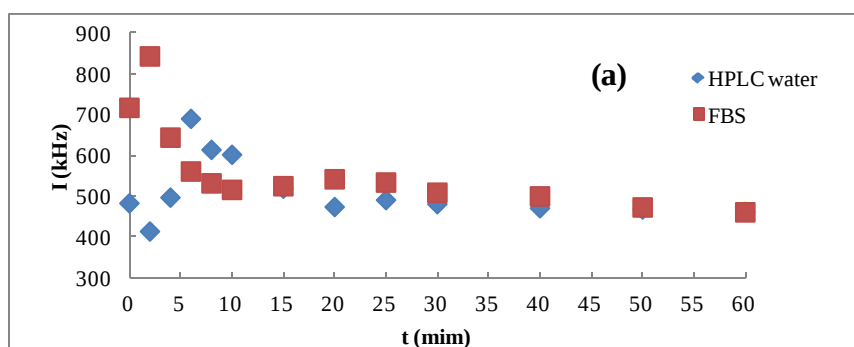


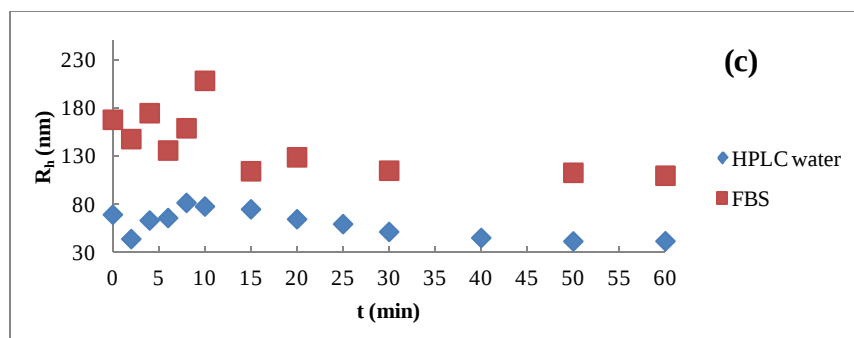
Εικόνα 5.7. (a) R_h και (b) d_f vs. θερμοκρασία των DPPC: DODAP (9:1 μοριακός λόγος) λιποσωμάτων που έχουν ανασυσταθεί με PBS (η λιποσωματική συγκέντρωση παραμένει σταθερή και ίση με 1×10^{-2} mg/ml). (c) R_h και (d) d_f vs. θερμοκρασία των DPPC: DODAP (9:1 μοριακός λόγος) λιποσωμάτων που έχουν ανασυσταθεί με PBS (η λιποσωματική συγκέντρωση παραμένει σταθερή και ίση με 5×10^{-3} mg/ml).





Εικόνα 5.8. (a) R_h και (b) d_f vs. θερμοκρασία των DPPC: DODAP (9:1 μοριακός λόγος) λιποσωμάτων που έχουν ανασυσταθεί με FBS (η λιποσωματική συγκέντρωση παραμένει σταθερή και ίση με 1×10^{-2} mg/ml). (c) R_h και (d) d_f vs. θερμοκρασία των DPPC: DODAP (9:1 μοριακός λόγος) λιποσωμάτων που έχουν ανασυσταθεί με FBS (η λιποσωματική συγκέντρωση παραμένει σταθερή και ίση με 5×10^{-3} mg/ml).





Εικόνα 5.9. (α) Ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας στις 90° και (β) R_h vs. χρόνος για τα DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος) λιποσώματα μετά από θερμικό άλμα από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος στους 45°C (η λιποσωματική συγκέντρωση παραμένει σταθερή και ίση με $1 \times 10^{-2} \text{ mg/ml}$). (γ) R_h vs. χρόνος για τα DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος) λιποσώματα μετά από θερμικό άλμα από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος στους 45°C (η λιποσωματική συγκέντρωση παραμένει σταθερή και ίση με $5 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$).

Η υδροδυναμική ακτίνα των λιποσωμάτων σύστασης DPPC:DPPG (9:1 μοριακός λόγος) που έχουν ανασυσταθεί με νερό HPLC-καθαρότητας δεν άλλαξε κατά τη διαδικασία της θέρμανσης στους 45°C , ενώ υδροδυναμική ακτίνα των λιποσωμάτων σύστασης DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος) που έχουν ανασυσταθεί στο νερό HPLC-καθαρότητα αυξήθηκε και παρέμεινε στην μεγαλύτερη τιμή της κατά τη διάρκεια της ψύξης στο 25°C . Οι τιμές d_f αυξήθηκαν κατά τη διάρκεια της θέρμανσης, ειδικότερα στην υψηλότερη συγκέντρωση που μελετήθηκε για τα λιποσώματα σύστασης DPPC:DPPG (9:1 μοριακός λόγος) και DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος) που ανασυστάθηκαν με νερό HPLC-καθαρότητας. Η R_h των λιποσωμάτων σύστασης DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος) στο PBS μειώθηκε και παρέμεινε στη χαμηλότερη τιμή και κατά τη διάρκεια της ψύξης στους 25°C . Οι τιμές d_f αυξήθηκαν κατά τη διάρκεια της θέρμανσης και δεν παρουσίασαν καμία στατιστική σημαντική διαφορά μεταξύ της υψηλότερης και της χαμηλότερης συγκέντρωσης, αντίστοιχα. Αντίθετα, η αύξηση των τιμών d_f είναι μικρότερη κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της θέρμανσης για τα λιποσώματα σύστασης DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος) που ανασυστάθηκαν με FBS, και αυτό αναφέρεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία (δηλαδή η μορφοκλασματική μορφολογία κατιονικών λιποσωματικών νανοφορέων που έχουν ανασυσταθεί σε FBS, κατά τη διάρκεια των διαδικασιών της ψύξης και της θέρμανσης (Εικόνες 5.7 και 5.8). Οι μορφολογικές αλλαγές κατά τη διάρκεια των διαδικασιών της ψύξης και της

θέρμανσης είναι μία ένδειξη της παρουσίας μικροπεριοχών ετερογενούς δομής στην επιφάνεια των λιποσωμιακών συστημάτων (heterogeneous microdomain structure on the surface of the liposomal system) (Vogt et al., 2010). Σύμφωνα με τον Shimanoushi και τους συνεργάτες του (2011), η λιποσωμιακή μεμβρανική επιφάνεια γίνεται περισσότερο υδρόφοβη σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από τη θερμοκρασία της κύριας μετάβασης φάσης των DPPC λιπιδίων ($T > T_m = 41^\circ\text{C}$) και η κυρτότητα (curvature) των διπλοστοιβάδων αναμένεται να είναι μεγαλύτερη. Επιπρόσθετα, παρατηρείται μία αύξηση της κινητικότητας των πολικών κεφαλών όταν τα λιπίδια είναι στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση (Shimanoushi et al., 2011). Η αύξηση των τιμών της κλασματικής διάστασης αποτελούν μία πρώτη ένδειξη αυτών των θερμικών φαινομένων που λαμβάνουν χώρας και της θερμοδυναμικής της λιποσωμιακής μεμβράνης και προσφέρει μία ποσοτικοποίηση της «θερμοϊστορίας» (“thermal history”) των λιποσωμιακών φορέων.

Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα των λιποσωμιακών συστημάτων είναι η δυνατότητα ελέγχου της δομής και του μεγέθους τους, ακόμα και των κolloειδών τους ιδιοτήτων, με τη βοήθεια μίας μεγάλης ποικιλίας φυσικοχημικών παραμέτρων. Ίσως, η πιο σημαντική από τις προαναφερθείσες κolloειδείς ιδιότητες είναι η θερμοκρασία. Επίσης, έχει μεγάλο ενδιαφέρον να εξετάζεται η σταθερότητα και/ή απόκριση των κατιονικών λιποσωμάτων σε απότομες μεταβολές της θερμοκρασίας στα δύο μέσα διασποράς. Το σχήμα απεικονίζει τη συμπεριφορά της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας στις 90° μοίρες κατά τη διάρκεια ενός «θερμικού άλματος» (“thermal jump”) από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος (25°C) στους 45°C (Εικόνα 5.9). Αυτοί οι τύποι των πειραμάτων προσομοιάζουν την ανταπόκριση μίας λιπιδικής φαρμακοτεχνολογικής μορφής μετά την έγχυσή της σε κατάσταση πυρετού ή συνθηκών φλεγμονής. Η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από τα λιποσωμιακά συμπλέγματα με τα συστατικά του ορού του πλάσματος δεν εξαρτώνται ισχυρά από τη θερμοκρασία. Ως εκ τούτου, μπορεί να υποθεθεί πως δεν υπάρχουν σημαντικές μεταβολές στη μάζα των συσσωματωμάτων που δημιουργούνται σε αυτό το θερμοκρασιακό εύρος. Η R_h παραμένει αμετάβλητη για τα λιποσώματα σύστασης DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος) που ανασυστάθηκαν με FBS και μειώθηκε για αυτά που ανασυστάθηκαν με νερό HPLC-καθαρότητας, αντίστοιχα. Θα πρέπει να σημειωθεί πως μία σταθεροποίηση επιτεύχθηκε λαμβάνοντας ένα plateau για τη μετρούμενη ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας και οι υδροδυναμικές ακτίνες των λιποσωμιακών

φορέων, ξεκινώντας περίπου 7 λεπτά μετά το «θερμοκρασιακό άλμα», μπορεί να σχετίζονται με την εξαφάνιση των θερμικών φαινομένων. Ο λόγος για αυτό μπορεί να είναι οι διαφορετικές θερμικές συμπεριφορές σε σχέση με τα πειράματα όπου η μεταβολή της θερμοκρασίας πραγματοποιείται σταδιακά. Η τελευταία παρατήρηση προδίδει μία άλλη ένδειξη ότι η επίδραση της θερμοκρασίας στην αυτό-συναρμολόγηση (self-assembly) των δομών που δημιουργούνται από τα λιποσώματα σύστασης DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος) είναι ιδιαίτερης προσοχής, όταν τα κατιονικά λιποσώματα χρησιμοποιούνται ως φορείς για μεταφορά γενετικού υλικού.

5.1.4 Η μικροπολικότητα και μικρορευστότητα των λιποσωματικών μεμβρανών

Η Φθορισμομετρία έχει χρησιμοποιηθεί σε μία προσπάθεια να εξαχθούν πληροφορίες σχετικά με την εσωτερική νανοδόμηση και το μικροπεριβάλλον των λιποσωματικών φορέων σε υδατικά και βιολογικά μέσα διασποράς. Οι αλλαγές που συμβαίνουν στη δομή της λιπιδικής/λιποσωματικής διπλοστοιβάδας παρακολουθούνται με τις μετρήσεις της φθορισμομετρίας στα δύο μέσα στα οποία έχει ενσωματωθεί πυρενίο (pyrene). Ο λόγος I_1/I_3 στο φάσμα εκπομπής του πυρενίου χρησιμοποιείται για μέτρηση της πολικότητας του περιβάλλοντος του παράγοντα επισημάνσεως του πυρενίου (pyrene probe). Η μικροπολικότητα της υδρογονανθρακικής περιοχής των λιπαρών αλυσίδων των DPPC:DPPG και DPPC:DODAP λιποσωματικών διπλοστοιβάδων δε μεταβλήθηκε σημαντικά στο βιολογικό μέσο σε σύγκριση με το νερό-HPLC καθαρότητας, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.2.

Πίνακας 5.2: Οι λόγοι της έντασης φθορισμού του πυρενίου I_1/I_3 (ενδεικτικός της μικροπολικότητας) και I_E/I_M (ενδεικτικός της μικρορευστότητας) για τις φορτισμένες λιποσωμιακές διπλοστοιβάδες.

Ανασύσταση σε:	Νερό HPLC καθαρότητας		FBS		FBS		Νερό HPLC καθαρότητας ^a		FBS ^a	
Διάλυση σε:	Νερό HPLC καθαρότητας		Νερό HPLC καθαρότητας		FBS		Νερό HPLC καθαρότητας		Νερό HPLC καθαρότητας	
Λιποσωμιακή σύσταση	I_1/I_3	I_E/I_M	I_1/I_3	I_E/I_M	I_1/I_3	I_E/I_M	I_1/I_3	I_E/I_M	I_1/I_3	I_E/I_M
DPPC:DPPG (9:1 μοριακός λόγος)	1.33	0.90	1.36	0.28	1.22	Μη δημιουργία εξαμερούς	-	-	-	-
DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος)	1.29	0.27	1.29	0.38	1.27	0.07	1.15	0.38	1.27	0.83

^a μέτρηση στους 45°C

Επιπλέον, η μικρορευστότητα των υδρογονανθρακικών περιοχών των DPPC:DPPG και DPPC:DODAP λιποσωμιακών μεμβρανών μειώθηκε στο FBS, προφανώς λόγω της προσρόφησης των πρωτεϊνών. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αλβουμίνη βόειου ορού είναι πιθανότερο να αλληλεπιδράσει με τη λιποσωμιακή μεμβράνη με την υψηλότερη υδροφοβικότητα και η διαπερατότητα μπορεί να αυξηθεί με τη δημιουργία προσωρινών διάκενων (temporary gaps) και την ύπαρξη διαχωρισμού φάσεων στις λιπιδικές μεμβράνες (phase separation in the lipid membranes) (Yokouchi et al., 2001; Tsunoda et al., 2001, Hioki et al., 2010). Υποδεικνύεται ότι η προσρόφηση πρωτεϊνών, ιδιαιτέρως της αλβουμίνης, στους φορείς φαρμακομορίων βασισμένων στην τεχνολογία των λιποσωμάτων, επιφέρει μεταβολές στα επιφανειακά χαρακτηριστικά της μεμβράνης και πιθανώς προκαλεί την αποδέσμευση του ενσωματωμένου φαρμακομορίου κατά τη διάρκεια της κυκλοφορίας των λιποσωμάτων στην αιματική ροή (Hioki et al., 2010). Το μικροϊξώδες (microviscosity) αυξήθηκε στο FBS για τα δύο φορτισμένα λιποσωμιακά συστήματα

(όπως αποδεικνύουν οι τιμές I_E/I_M). Η τελευταία παρατήρηση είναι αποτέλεσμα του περιορισμού της μετάβασης από τη φάση γέλης στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση (Tsunoda et al., 2001). Το μικροϊξώδες των κατιονικών λιποσωμάτων αυξήθηκε στους 45°C. Εναλλακτικά, η αύξηση της δημιουργίας του εξαμερούς σε μεγαλύτερη θερμοκρασία μπορεί να οφείλεται στην ενσωμάτωση του πυρενίου σε μεγαλύτερο βαθμό στα λιποσώματα σύστασης DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος). Αυτές οι παρατηρήσεις σχετίζονται με τη συνάθροιση των μορίων του πυρενίου στις υδρόφοβες περιοχές (δηλαδή στη λιποσωμιακή διπλοστοιβάδα) στην περίπτωση των κατιονικών λιποσωμάτων. Η συνάθροιση αυτή των μορίων του πυρενίου έχει ως συνέπεια χωρικούς περιορισμούς (spatial constraints), λόγω του μικρού πλάτους της μεμβράνης στους 45°C, και/ή μία συνέπεια του μεγάλου ιξώδους στην υδρόφιλη λιποσωμιακή διπλοστοιβάδα, κάτι που επίσης σχετίζεται με την συμπλοκοποίηση/ενσωμάτωση των πρωτεϊνών.

5.2 Συμπεράσματα

Λιποσώματα σύστασης DPPC:DPPG (9:1 μοριακός λόγος) και DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος) σε νερό HPLC-καθαρότητας βρέθηκαν να διατηρούν τα αρχικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά στους (μέγεθος και ζ-δυναμικό) τουλάχιστον για το χρονικό διάστημα το οποίο μελετήθηκαν. Η σταθερότητα των λιποσωμάτων υποδεικνύει ότι η ηλεκτροστατική άπωση είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση των λιποσωμάτων σε απαιώρηση, ώστε να αποφευχθεί η συσσωμάτωση ή η σύντηξη (aggregation or fusion). Οι υψηλές τιμές του ζ-δυναμικού αποδεικνύουν την ύπαρξη ισχυρής ηλεκτροστατικής άπωσης. Η ανασύσταση σε PBS προκάλεσε μετατόπιση του ζ-δυναμικού σε λιγότερο θετικές τιμές για τα λιποσώματα σύστασης DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος). Από την άλλη πλευρά, συσσωμάτωση παρατηρήθηκε για τα λιποσώματα σύστασης DPPC:DPPG (9:1 μοριακός λόγος) τα οποία ανασυστάθηκαν σε FBS. Η πρωτοταξική κινητική περιγράφει τη συσσωμάτωση που επάγεται από τις πρωτεΐνες για τα κατιονικά λιποσώματα με τα συστατικά του ορού του πλάσματος. Οι λόγοι R_g/R_h υποδεικνύουν μία αλλαγή της φαινόμενης μορφολογίας των λιποσωμάτων στα δύο μέσα διασποράς εξαιτίας της πρωτεϊνικής σύνδεσης στο FBS. Η μορφολογία και οι δομικές ιδιότητες των δύο λιποσωμιακών σκευασμάτων στο υδατικό μέσο διασποράς είναι αρκετά διαφορετικές

από αυτές στο FBS, όπως υποδεικνύεται από τη μορφοκλασματική ανάλυση, ειδικότερα για τα κατιονικά λιποσώματα. Το μέγεθος εξαρτάται γραμμικά από τις αλλαγές της συγκέντρωσης για τα λιποσώματα σύστασης DPPC:DODAP (9:1 μοριακός λόγος) που ανασυστάθηκαν στο FBS, ενώ η υδροδυναμική ακτίνα των ανιονικών λιποσωμάτων παραμένει σταθερή. Η θερμοκρασιακή εξάρτηση των φυσικοχημικών παραμέτρων των λιποσωμάτων κατά τις διαδικασίες της θέρμανσης και της ψύξης επίσης μελετήθηκαν. Τα νανοσυστήματα δεν είναι πλήρως αναστρέψιμα. Θα πρέπει να σημειωθεί πως η μορφολογική έλλειψη αναστρεψιμότητας (morphological irreversibility) είναι πιο εμφανής στις φυσικοχημικές αλλαγές που πραγματοποιούνται στα ανασυσταθέντα λιποσώματα στο βιολογικό μέσο. Η μικροπολικότητα για τις φορτισμένες λιποσωμιακές μεμβράνες είναι μικρότερη στο FBS, ενώ η μικρορευστότητα μεγαλύτερη. Το μικροϊξώδες των κατιονικών λιποσωμάτων αυξήθηκε επίσης κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της θέρμανσης. Τέλος, αυτά τα ευρήματα μπορούν να γενικευθούν σε μία προαίρεση για την καλύτερη κατανόηση και έλεγχο της σταθερότητας και της ανταπόκρισης των φορτισμένων λιποσωμάτων στις αλλαγές της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης σε δύο μέσα διασποράς. Είναι υψίστης σημασίας να ταυτοποιηθούν τυχόντα κενά στην επιστημονική κατανόηση της συμπεριφοράς των λιποσωμάτων και να διευκολυνθεί η καλύτερη κατανόηση των φαρμακευτικών χαρακτηριστικών των λιποσωμιακών φορέων για το σχεδιασμό των κολλοειδών νανοφορέων, ειδικότερα για μεταφορά γονιδίων. Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει γίνει πλήρως αποδεκτό, πως οι ρυθμιστικές / κανονιστικές εκτιμήσεις είναι ιδιαίτερης σημασίας με στόχο την παροχή αποδείξεων που φορούν όχι μόνο το σχεδιασμό και την παρασκευή λιποσωμιακών συστημάτων αλλά και τα φυσικοχημικά και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά στο τελικό σκεύασμα (Chen, 2008). Εν κατακλείδι, η πειραματικά προσδιορισμένη κλασματική διάσταση απεικονίζει / επεξηγεί με περιεκτικό τρόπο την αυτό-συναρμολόγηση και τη μορφολογική πολυπλοκότητα των φορτισμένων λιποσωμιακών φορέων. Αυτό το γεγονός, θα μπορούσε να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για την ανάπτυξη καινοτόμων νανοφορέων για τη μεταφορά φαρμάκων ή γονιδίων με πλήρη γνώση και κατανόηση των δομικών τους χαρακτηριστικών. Τελικά, μπορούμε να υποστηρίξουμε την άποψη ότι η μορφοκλασματική προσέγγιση που αφορά τη μορφολογία των μεταφορέων των φαρμάκων θα μπορούσε να θεωρηθεί ως μία μέθοδος μορφολογικής ανάλυσης, η

οποία θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη από τις ρυθμιστικές αρχές, προκειμένου να εμπλουτιστούν οι οδηγίες σχετικά με τη διαδικασία έγκρισης καινοτόμων φαρμάκων.

6 DPPC:PEO-b-PCL χημικοί νανοφορείς: αυτό-συναρμολόγηση σε υδατικά και βιολογικά μέσα και ενσωμάτωση φαρμακομορίου.

6.1 Αυτό-συναρμολογούμενες νανοδομές

Η ιδιότητα της αυτό-συναρμολόγησης (Self-assembly) είναι μία από τις πιο ενδιαφέρουσες πτυχές για τη μελέτη των αμφίφιλων μορίων που προκύπτουν σε νανοσκοπικό και σε μεσοσκοπικό επίπεδο (nano-scale or mesoscopic level) (Whitesides and Grzybowski, 2007; Bonacucina et al., 2009). Τα αμφίφιλα συμπολυμερή κατά συστάδες (amphiphilic block copolymers) και επιφανειοδραστικά που δημιουργούν κυστίδια (vesicle forming surfactants), συμπεριλαμβανομένων και των λιπιδίων έχουν προσελκύσει μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια εξαιτίας της ενδιαφέρουσας λειτουργικής συμπεριφοράς και αυτό-συναρμολόγησης σε υδατικά μέσα διασποράς, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μίας πληθώρας νανοδομών. Τέτοιες αυτό-συναρμολογούμενες νανοδομές παρουσιάζουν δυναμικές εφαρμογές στη Φαρμακευτική Νανοτεχνολογία, διότι αποτελούνται από βιοσυμβατά υλικά που μπορούν να αποδειχθούν χρήσιμα για την αύξηση της υδατικής διαλυτότητας αρκετών υδρόφοβων φαρμακομορίων καθώς και για την στοχευμένη μεταφορά τους (Pispas and Sarantopoulou, 2007; Pispas, 2011a,b). Ο συνδυασμός των συμπολυμερών κατά συστάδες με τα λιπίδια έχει ως αποτέλεσμα υπερμοριακών νανοδομών (nano-scale supramolecular structures), οι οποίες συνδυάζουν τις βιοφυσικές ιδιότητες και των δύο τύπων των βιοϋλικών και οι οποίες αυτό-συναρμολογούνται μέσω περισσότερων από μία τύπων αλληλεπιδράσεων (Tribet and Vial, 2008). Η (biomimicry) βιομίμηση είναι μία επιπλέον ενδιαφέρουσα ιδιότητα αυτών των νανοδομών και ως εκ τούτου μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο για τη διερεύνηση της λειτουργικότητας των μεμβρανών των θηλαστικών (Yaroslavon et al., 2006).

Πολύαριθμες μελέτες έχουν δείξει πως είναι δυνατό να επιτευχθεί η προσρόφιση ή η διείσδυση (adsorption or penetration) πολλαπλών κατά συστάδες πάνω σε σχηματισμένα λιπιδώματα ή σε αυτό-συναρμολογούμενες υπερμοριακές δομές (self-assembled superstructures) σε υδατικά μέσα (Stoenescu et al., 2004; Leiske et al., 2011; Nam et al., 2011). Επιπρόσθετα, οι αλληλεπιδράσεις και ο μηχανισμός παρεμβολής μεταξύ λιπιδίων και συμπολυμερών κατά συστάδες είναι εξαιρετικής

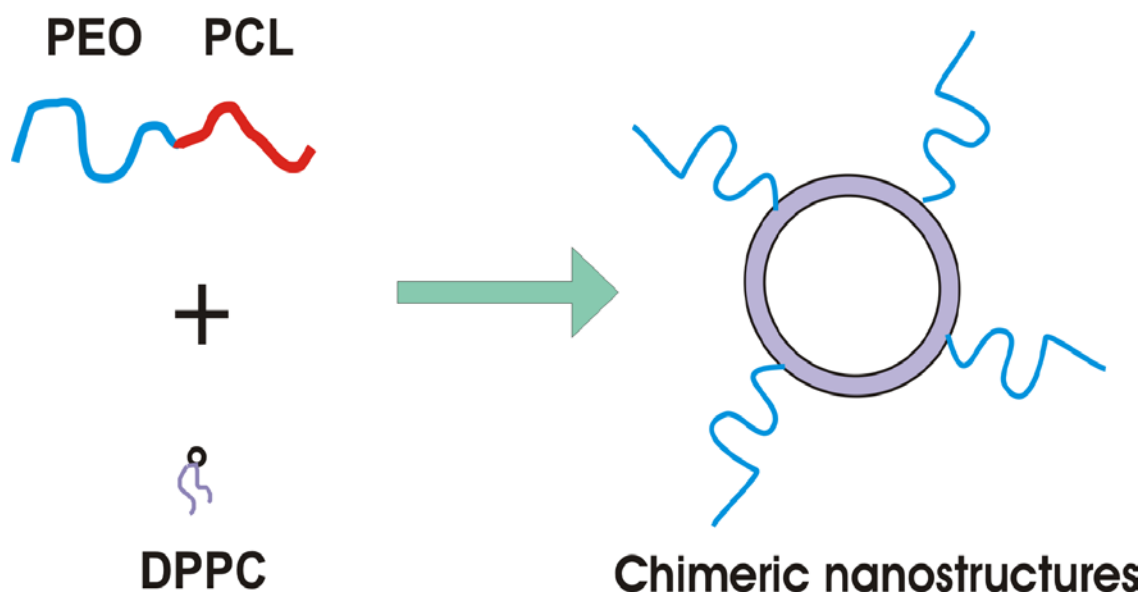
σημασίας λόγω των φαρμακευτικών εφαρμογών τους (Firestone and Seifert, 2005; Ruyschaert et al., 2005; Antunes et al., 2009; Amado et al., 2009; Kita-Tokarczyk et al., 2009; Nam et al., 2011). Η θερμοδυναμική συμπεριφορά τους, ειδικότερα η κύρια μετάβαση φάσης, και οι συνέπειες όσον αφορά τις θερμοδυναμικές τους ιδιότητες και την οργάνωση του συστήματος της μεικτής λιποσωματικής διπλοστοιβάδας έχει ήδη μελετηθεί εκτενώς, προκειμένου να σχεδιαστούν συστήματα μεταφοράς φαρμακομορίων (Baekmark et al., 1997; Ishøy and Mortensen, 2005). Τα φαινόμενα διαχωρισμού φάσεων (phase separation phenomena), η πλάγια διάχυση (lateral diffusivity) και η ενδοεισχώρηση (interdigitation) των συμπολυμερών στα κυστίδια και στα μεικτά λιπιδικά συστήματα είναι θεμελιώδη ζητήματα που συνδέονται στενά με την οργάνωση και τις ιδιότητες των διπλοστοιβάδων και των μεμβρανών (Baekmark et al., 1997; Firestone et al., 2003; Battaglia and Ryan, 2005).

Συνδυάζοντας λιποσώματα με αμφίφιλα συμπολυμερή, δημιουργούνται νανοσυστήματα πιο σταθερά, συνήθως γνωστά ως «Αόρατα Λιποσώματα» ή «Στερεοχημικά Σταθεροποιημένα Λιποσώματα» (Stealth or Sterically Stabilized liposomes). Η τεχνολογία των «αόρατων λιποσωμάτων» επιτυγχάνεται τροποποιώντας την επιφάνεια της λιποσωματικής μεμβράνης μέσω της κατασκευής λιπιδίων συζευγμένων με υδρόφιλα πολυμερή, όπως είναι η πολυαιθυλενογλυκόλη (polyethylene glycol - PEG), η οποία είναι το ευρέως χρησιμοποιούμενο πολυμερές, διότι ελαττώνει την πρόσληψη των νανοσυστημάτων από τα μονοκύτταρα και για αυτό αυξάνεται η κυκλοφορία στην αιματική ροή με την αύξηση της συγκέντρωσης των PEG-υλιωμένων λιπιδίων. Η έλλειψη τοξικότητας (nontoxicity), η υψηλή βιοσυμβατότητα (high biocompatibility), η χαμηλή ανοσογονικότητα και αντιγονικότητα (low immunogenicity and antigenicity) των «αόρατων» νανοφορέων προκαλούν το ενδιαφέρον για κλινικές εφαρμογές. Τα λιποσώματα που σταθεροποιούνται από πολυμερή (Polymer-stabilized liposomes) χρησιμοποιούνται συχνά ως συστήματα μεταφοράς φαρμακομορίων ώστε να αυξηθούν το χρόνο ημιζωής τους στη συστηματική κυκλοφορία. Είναι σε γενικές γραμμές δεδομένο πως η ανθεκτικότητα στα μακροφάγα (macrophage-resistant property) των στερεοχημικά σταθεροποιημένων νανοφορέων επιτυγχάνεται εξαιτίας της αποτροπής της επιφανειακής οπωνινοποίησης και της προσρόφησης των πρωτεϊνών (surface opsonization and protein adsorption). Η μεγάλη κατηγορία των συμπολυμερών κατά τρισυστάδες με μεσαίο υδροφιλό τμήμα το

πολυπροπυλενοξείδιο [(poly(propylene oxide) - (PPO)] και τελικά τμήματα πολυαιθυλενοξείδιο [poly(ethylene oxide) - (PEO)] είναι μία εναλλακτική λύση για τα PEG-υλιωμένα λιπίδια όσον αφορά τη στερεοχημική σταθεροποίηση και λόγω της εύκολης εμπορικής διαθεσιμότητάς τους και του χαμηλού κόστους τους.

Ο έλεγχος της μορφολογίας των νανοφορέων φαρμακομορίων είναι βασικής σημασίας για την αξιοποίηση της λειτουργικότητας τους και των ιδιοτήτων τους για αρκετές αναδυόμενες τεχνολογίες. Για παράδειγμα, η μορφολογία των λιποσωμάτων είναι κρίσιμη για τις βιολογικές αλληλεπιδράσεις, όπως είναι η πρωτεϊνική σύνδεση. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις λιποσωμάτων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος είναι η επιφανειακή επικάλυψη, το επιφανειακό φορτίο και η λιπιδική ποσότητα/δόση (surface coating, surface charge and lipid dose), τα οποία επηρεάζουν τη μορφολογία και τη δομή της επιφάνειας των λιποσωμάτων. Τα πολυμερή επάγουν σημαντικές μορφολογικές διαταραχές όταν συμπεριλαμβάνονται σε λιπιδικά μείγματα που χρησιμοποιούνται για τη παρασκευή λιποσωματικών διπλοστοιβάδων. Σύμφωνα με την πρόσφατα δημοσιευμένη βιβλιογραφία, ο διαχωρισμός της μεμβράνης σε περιοχές πλούσιες σε πολυμερή και σε περιοχές πλούσιες σε λιπίδια (demixing of lipid-rich and polymer-rich membrane domains) εντός του ίδιου κυστιδίου έχει ήδη αποδειχθεί και αυτές οι μορφολογικές και δομικές διαφορές έχουν επεξηγηθεί υπό το πρίσμα των πιθανών προκυπτουσών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των περιοχών αυτών μέσα στη μεικτή λιποσωματική μεμβράνη. Η μορφή και το σχήμα αυτών των συστημάτων σχετίζονται άμεσα με την κολλοειδή τους συμπεριφορά. Επικυρωμένες αξιολογήσεις είναι σημαντικές για την παρακολούθηση και την ποσοτικοποίηση των νανοφαρμακευτικών προϊόντων (nanopharmaceuticals), των συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων ή των βιολογικά δραστικών προϊόντων, και πως τα βιοφυσικά χαρακτηριστικά και η δομή μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητα του τελικού σκευάσματος στην κλινική πράξη.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη νέων χημικών νανოსυστημάτων που αποτελούνται από dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) και poly(ethylene oxide)-block-poly(ε-caprolactone) (PEO-b-PCL) και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καινοτόμα χημικά συστήματα μεταφοράς φαρμακομορίων της Νανοτεχνολογίας [advanced chimeric Drug Delivery nano Systems (chi-aDDnSs)].



Σχήμα 6.1. Η δομή και οι ιδιότητες ενσωμάτωσης ενός νέου αυτό-συναρμολογούμενου νανοφορέα που αποτελείται από βιοσυμβατό συμπολυμερές κατά συστάδες PEO-b-PCL και λιπίδια.

Εικόνα 6.1. Χημική δομή του λιπιδίου DPPC (αριστερά) και του συμπολυμερούς κατά συστάδες, PEO-b-PCL (δεξιά), που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία.

Τεχνικές σκέδασης του φωτός συμπεριλαμβανομένων της Στατικής, της Δυναμικής και της Ηλεκτροφορητικής Σκέδασης του Φωτός, χρησιμοποιήθηκαν για να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με τη δομή, τη μορφολογία, το μέγεθος, το ζ-δυναμικό των νανοδομών που σχηματίζονται, ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του πολυμερικού συστατικού. Η Φθορισμομετρία χρησιμοποιήθηκε στην προσπάθεια να εξαχθούν πληροφορίες σχετικά με την εσωτερική νανοδόμηση και το μικροπεριβάλλον των μεικτών λιποσωματικών συστημάτων σε υδατικά μέσα. Ο σχηματισμός των νανοδομών θα συζητηθεί με γνώμονα τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και τη μορφολογία των νανোসυστημάτων, χρησιμοποιώντας τη μορφοκλασματική ανάλυση, σε διαφορετικά μέσα διασποράς (νερό HPLC-καθαρότητας, PBS και FBS). Η σταθερότητα των νανোসυστημάτων σε βάθος χρόνου επίσης μελετήθηκε καθώς και η εξάρτηση της κατανομής του μεγέθους και της κλασματικής διάστασης από τη θερμοκρασία και τη συγκέντρωση των συστημάτων σε υδατικά μέσα. Τέλος αποδείχθηκε πως η ενσωμάτωση του αμφίφιλου μορίου της ινδομεθακίνης (indomethacin - IND) είναι δυνατή και εξαρτάται από το λόγο των συστατικών του μεικτού λιποσωματικού συστήματος.

6.2 Φυσικοχημικός και μορφολογικός χαρακτηρισμός των χιμαιρικών νανοφορέων

Τα φυσικοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των DPPC:PEO-b-PCL χιμαιρικών νανοφορέων (9:0.1, 9:0.5 και 9:1 μοριακοί λόγοι) στα δύο υδατικά μέσα και στο FBS παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.1.

Πίνακας 6.1. Τα φυσικοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των χημικών νανοφορέων σε διαφορετικά μέσα διασποράς. Για την περίπτωση του FBS, τα χημικά λιποσώματα αραιώθηκαν σε FBS μετά την ενυδάτωσή τους με (*) νερό HPLC καθαρότητας και (**) PBS.

Δείγμα	Μέσο διασποράς	$R_h(\text{nm})^a$	PD.I. ^a	ζ-δυναμικό (mV)	d_f^b	R_g/R_h^b
DPPC λιποσώματα	HPLC-grade water	62.5	0.61	1.0	2.5 ₁	
DPPC:PEO-b-PCL (9:0.1 μοριακός λόγος)	HPLC-grade water	44.8	0.35	-0.9	2.4 ₂	0.99
DPPC:PEO-b-PCL (9:0.5 μοριακός λόγος)	HPLC-grade water	40.6	0.25	-8.6	2.5 ₆	1.02
DPPC:PEO-b-PCL (9:1 μοριακός λόγος)	HPLC-grade water	41.2	0.27	-9.3	1.8 ₃	1.04
DPPC λιποσώματα	PBS	95.8	0.70	0.7	2.5 ₅	
DPPC:PEO-b-PCL (9:0.1 μοριακός λόγος)	PBS	46.9	0.32	0.3	2.4 ₈	0.99
DPPC:PEO-b-PCL (9:0.5 μοριακός λόγος)	PBS	44.8	0.28	0.1	2.5 ₈	1.24
DPPC:PEO-b-PCL (9:1 μοριακός λόγος)	PBS	44.7	0.31	-3.4	1.8 ₄	1.00
DPPC:PEO-b-PCL (9:0.1 μοριακός λόγος)	FBS ^(*)	466.3	0.55	-4.3	2.5 ₆	
DPPC:PEO-b-PCL (9:0.5 μοριακός λόγος)	FBS ^(*)	290.1	0.55	-9.3	2.5 ₁	
DPPC:PEO-b-PCL (9:1 μοριακός λόγος)	FBS ^(*)	210.0	0.56	-16.1	2.5 ₄	

DPPC:PEO-b-PCL (9:0.1 μοριακός λόγος)	FBS ^(**)	619.0	0.51	-2.1	2.7 ₈	
DPPC:PEO-b-PCL (9:0.5 μοριακός λόγος)	FBS ^(**)	499.7	0.54	-4.4	2.5 ₄	
DPPC:PEO-b-PCL (9:1 μοριακός λόγος)	FBS ^(**)	539.0	0.55	-4.7	2.4 ₈	

^a Από DLS με τη μέθοδο των cumulants στις 90°, ^b από το SLS

Θα πρέπει να σημειωθεί πως το pH και η ιονική ισχύς προσομοιάζουν τις υδροδυναμικές συνθήκες που συναντώνται στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι τιμές του δείκτη πολυδιασποράς αποδεικνύουν σκευάσματα αρκούντως μονοδιάσπαρτα στα συστήματα με τις μεγαλύτερες μοριακές αναλογίες του συμπολυμερούς. Οι χημικοί νανοφορείς στους οποίους έχουν ενσωματωθεί οι πολυμερικές αλυσίδες PEO-b-PCL είναι μικρότερου μεγέθους σε σύγκριση με τα συμβατικά DPPC λιπώματα στα δύο υδατικά μέσα διασποράς. Η ενσωμάτωση 10% (μοριακός λόγος) του PEO-b-PCL οδηγεί σε χημικές νανοδομές μικρότερου μεγέθους. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στις στερικές απώσεις λόγω της αγκυροβόλησης των αλυσίδων του PEO-b-PCL επί των λιπιδωσικών διπλοστοιβάδων (the anchoring of the PEO-b-PCL chains on the lipid bilayers). Οι τιμές του δείκτη πολυδιασποράς μειώθηκαν σημαντικά από την ενσωμάτωση του συμπολυμερούς στα λιπώματα. Η κατανομή μεγέθους είναι στενότερη στο νερό HPLC-καθαρότητας σε σύγκριση με το PBS (Πίνακας 6.1). Λαμβάνοντας υπόψη τη μεγαλύτερη ιονική ισχύ στο PBS μπορεί να υποθεθεί πως η παραπάνω παρατήρηση οφείλεται στη διαφορετική κατάσταση επιδιалύτωσης των PEO πολυμερικών αλυσίδων, όταν ιόντα είναι παρόντα μέσα στο διάλυμα (όπως στην περίπτωση του PBS). Άλλη εξήγηση βασίζεται στις αλλαγές της δύναμης ενυδάτωσης του νερού εξαιτίας της παρουσίας των ιόντων μέσα στο PBS, καθώς και στο συντονισμό των ιόντων αυτών, το ελάχιστο εν μέρει, με τις PEO πολυμερικές αλυσίδες, φαινόμενο που τις καθιστά περισσότερο υδρόφιλες, βελτιώνοντας τα χαρακτηριστικά της ενυδάτωσής τους. Οι άορατοι λιπιδωσικοί φορείς που ενσωματώνουν PEG-υλιωμένα λιπίδια εμφανίζουν παρόμοια φυσικοχημική συμπεριφορά σε υδατικά μέσα διασποράς εξαιτίας της κατάστασης επιδιалύτωσης και των στερεοχημικών επιδράσεων των πολυμερικών αλυσίδων της

πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG). Το ζ-δυναμικό είναι ένα άλλος σημαντικός παράγοντας που παρέχει πληροφόρηση σχετικά με το επιφανειακό φορτίο των λιποσωμιακών νανοδομών. Οι χημικοί νανοφορείς παρουσιάζουν αρνητικό ζ-δυναμικό σε νερό HPLC-καθαρότητας (Πίνακας 6.1). Η ανασύσταση με PBS είχε ως αποτέλεσμα την μετατόπιση του ζ-δυναμικού σε λιγότερο αρνητικές τιμές για τα μεικτά λιποσώματα, πιθανώς λόγω της υψηλότερης ιονικής ισχύος του PBS και της ρυθμιστικότητάς του. Από την άλλη πλευρά, το ζ-δυναμικό των DPPC λιποσωμάτων στα δύο μέσα διασποράς λαμβάνει τιμές κοντά στο μηδέν, λόγω της έλλειψης καθαρού/μόνιμου φορτίου επί της λιποσωμιακής επιφάνειας (Πίνακας 6.1).

Ο λόγος R_g/R_h είναι μία άλλη σημαντική παράμετρος για την κατανόηση της δομής των λιποσωμιακών νανοσωματιδίων σε κατάσταση διασποράς, και επίσης προσδιορίστηκε για τα παρασκευασθέντα χημικά συστήματα. Έχει αναφερθεί ότι ο λόγος R_g/R_h λαμβάνει τις τιμές 0.775 όταν πρόκειται για συμπαγή σφαίρα και 1.0 στην περίπτωση των κυστιδίων με λεπτά τοιχώματα, ενώ οι τιμές από 1.3 έως 1.5 υποδηλώνουν δομή τυχαίας περιέλιξης (ανοχή / χαλαρή δομή) όπως στην περίπτωση των μακρομοριακών αλυσίδων. Οι προσδιοριζόμενες τιμές R_g/R_h παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.1. Αυτός ο λόγος παρουσιάζει ευαισθησία όσον αφορά το σχήμα των σωματιδίων σε διάλυμα ή σε διασπορά και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μία «πρόχειρη» εκτίμηση της εσωτερικής μορφολογίας των νανοσωματιδίων. Οι τιμές R_g/R_h είναι κοντά στη μορφή για το χημικό νανοφορείς, υποδεικνύοντας μία μορφολογία που προσομοιάζει τα κυστίδια. Ο λόγος R_g/R_h παραμένει ανεπηρέαστος από την αύξηση του PEO-b-PCL συστατικού ή την αλλαγή του υδατικού μέσου διασποράς.

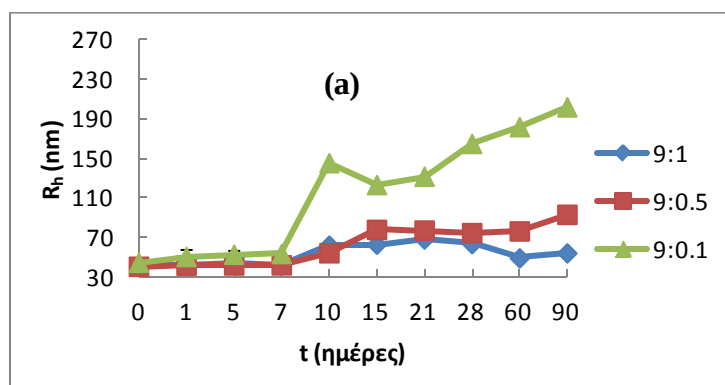
Είναι μεγάλης σημασίας να προσδιορίζουμε τις φυσικοχημικές ιδιότητες των χημικών νανοφορέων, ιδιαίτερα σε FBS, καθώς οι πρωτεΐνες του βιολογικού μέσου αναμένεται να διαφοροποιήσουν τις ιδιότητες των νανοδομών, εξαιτίας των πιθανών αλληλεπιδράσεων και της προσρόφησης, που επηρεάζουν της σταθερότητα και την κάθαρση των χημικών νανοφορέων στο βιολογικό μέσο. Οι χημικοί νανοφορείς ενυδατώθηκαν με νερό HPLC καθαρότητας και PBS και ακολούθως κατάλληλες ποσότητες αραιώθηκαν σε FBS, ώστε να διερευνηθούν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των νανοφορέων σε συνθήκες πλάσματος. Η αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος αύξησε σημαντικά το μέγεθος των χημικών νανοφορέων

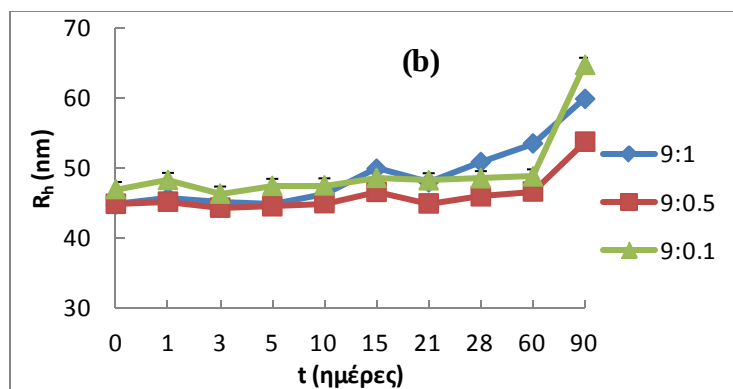
(Πίνακας 6.1). Μετά τη διαλυτοποίηση των χημικών νανοσυστημάτων στο FBS, πραγματοποιήθηκε σχηματισμός νανοσωματιδίων μεγαλύτερου μεγέθους, προφανώς λόγω οψωνινοποίησης (opsonization), η οποία αποτελεί ένα κρίσιμο φαινόμενο για την αναγνώρισή τους από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Η αύξηση είναι μεγαλύτερη για τα νανοσυστήματα, τα οποία ενυδατώθηκαν στο PBS, πιθανότατα λόγω της κατάστασης της επιδιαλύτωσης του υδροφιλού μέρους των νανοφορέων (Πίνακας 6.1). Από την άλλη πλευρά, η αύξηση της υδροδυναμικής ακτίνας είναι μικρότερη στην υψηλότερη μοριακή αναλογία του συστατικού PEO-b-PCL για τα υδατικά μέσα διασποράς. Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει ότι η ύπαρξη του συμπολυμερούς στη λιπιδική διπλοστοιβάδα διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο για τις ιδιότητες του νανοφορέα, που αφορούν την παρατεταμένη κυκλοφορία του και την αποφυγή του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο πληθυσμός των νανοφορέων έγινε περισσότερο ετερογενής, όπως αποδεικνύεται από τις αυξημένες τιμές της πολυδιασποράς, λόγω του σχηματισμού υπερμοριακών συσσωματωμάτων των αρχικών χημικών νανοδομών με τις πρωτεΐνες και τα υπόλοιπα συστατικά του ορού του πλάσματος (Πίνακας 6.1). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές του ζ-δυναμικού μεταξύ των υδατικών μέσων διασποράς και του FBS, όπως παρατηρήθηκε (Πίνακας 6.1). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αυτή η παρατήρηση υποδηλώνει ότι η προσρόφηση της αλβουμίνης, της κυριότερης πρωτεΐνης του FBS, δεν μπορεί να εξηγηθεί με βάση τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις μεταξύ των λιποσωματικών επιφανειών και της αλβουμίνης. Οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις είναι επίσης η αιτία για τη σύνδεση της αλβουμίνης στην επιφάνεια των λιποσωμάτων.

Η κλασματική διάσταση (d_f) βρέθηκε ίση με 2.5 για τα συμβατικά DPPC λιποσώματα στα δύο μέσα διασποράς. Μείωση των τιμών d_f παρατηρήθηκε για τους DPPC:PEO-b-PCL (9:1 μοριακός λόγος) νανοφορείς στα υδατικά μέσα διασποράς. Η κλασματική διάσταση βρέθηκε να είναι ίση με 1.8 για τους χημικούς νανοφορείς σύστασης DPPC:PEO-b-PCL (9:1 μοριακός λόγος). Αυτή η παρατήρηση υποδηλώνει ότι οι πολυμερικές αλυσίδες προκαλούν σημαντικές μορφολογικές διαταράξεις (significant morphological perturbations), όταν συμπεριλαμβάνονται στα λιπιδικά μείγματα για την παρασκευή λιποσωματικών διπλοστοιβάδων. Από την άλλη πλευρά, μία αύξηση της κλασματικής διάστασης παρατηρήθηκε για τους χημικούς νανοφορείς σύστασης DPPC:PEO-b-PCL (9:0.1 και 9:1.0 μοριακοί λόγοι) στο FBS. Η

κλασματική διάσταση είναι συνάρτηση του μεγέθους των σωματιδίων και σχετίζεται με τη μορφολογική πολυπλοκότητα των υπερμοριακών συσσωματωμάτων των αρχικών χιμαιρικών νανοφορέων με τα συστατικά του ορού.

Η κολλοειδής σταθερότητα σε βάθος χρόνου των αρχικά σχηματισθέντων χιμαιρικών νανοδόμων επίσης μελετήθηκε. Η φυσική σταθερότητα σε βάθος χρόνου του συνόλου των λιποσωματικών νανοσυστημάτων αξιολογήθηκε με τη μέτρηση του μεγέθους των χιμαιρικών νανοφορέων για χρονική περίοδο 90 ημερών. Όλοι οι χιμαιρικοί νανοφορείς στο νερό HPLC καθαρότητας διατήρησαν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους το λιγότερο για μία εβδομάδα (Εικόνα 6.2(a)). Η σταθερότητα των χιμαιρικών νανοφορέων υποδηλώνει ότι η στερεοχημική άπωση είναι υπεύθυνη για την αποφυγή της συσσωμάτωσης, εξαιτίας των van der Waals ελκτικών αλληλεπιδράσεων και της απουσίας ηλεκτροστατικών απώσεων, όπως ακριβώς προβλέπεται από την κλασσική DLVO θεωρία. Συσσωμάτωση των χιμαιρικών νανοφορέων σύστασης DPPC:PEO-b-PCL (9:0.1 μοριακός λόγος) παρατηρήθηκε σε νερό HPLC καθαρότητας διότι η υδροδυναμική ακτίνα αυξήθηκε από τα 45 nm την ημέρα της παρασκευής των νανοφορέων στα 170 nm μετά από ένα μήνα (Εικόνα 6.2(a)). Η διαμορφωτική διάταξη (conformational arrangement) προφανώς, καθώς και η κατάσταση της επιδιάλυψης της πολυμερικής αλυσίδας στα διαφορετικά υδατικά μέσα επηρεάζει τη σταθερότητα των νανοσυστημάτων, όπως αποδεικνύεται από τις μελέτες σταθερότητας των παρόντων χιμαιρικών νανοδομών (Εικόνα 6.2).

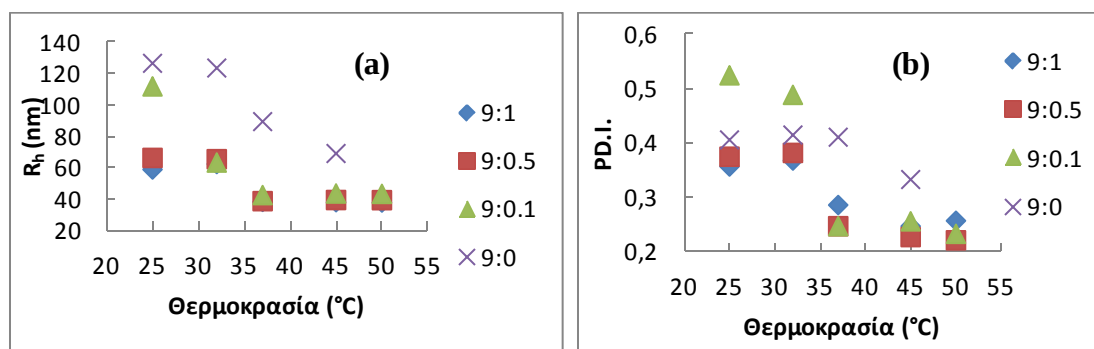


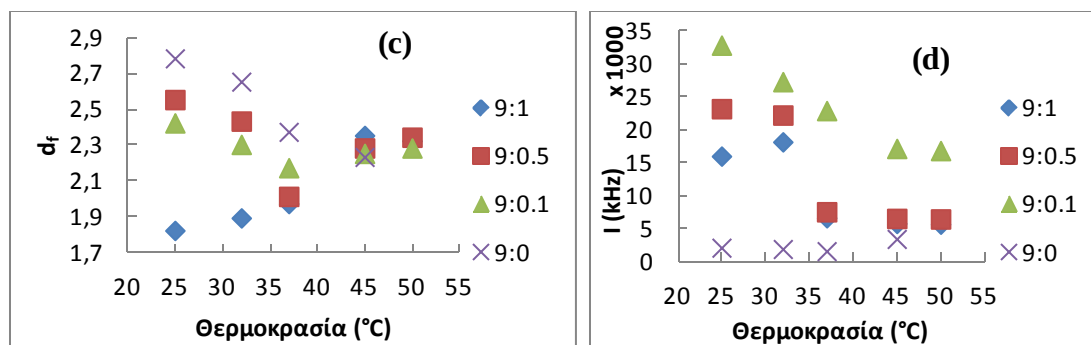


Εικόνα 6.2. Μελέτες σταθερότητας των χημικών λιποσωματικών συστημάτων σε (a) νερό HPLC καθαρότητας και σε (b) PBS.

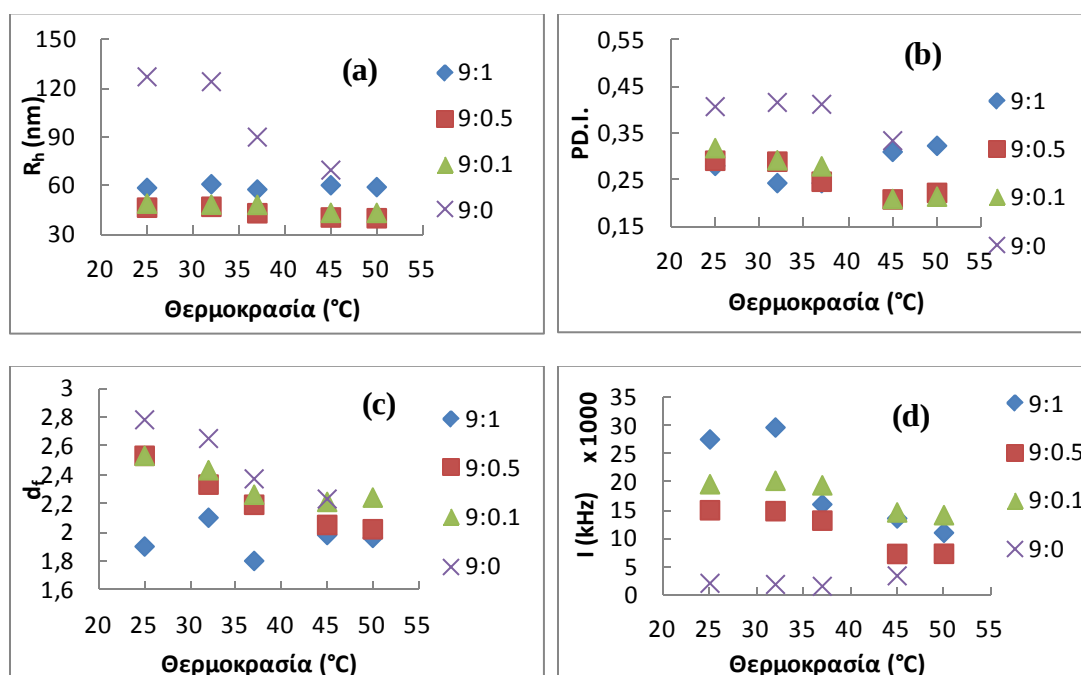
6.2.1 Οι επιπτώσεις της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης στις χημικές νανοδομές.

Τα τροποποιημένα με πολυμερή θερμοευαίσθητα λιποσώματα (Thermosensitive polymer-modified liposomes) θεωρούνται μία πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για τη στοχευμένη μεταφορά φαρμακομορίων και για τη βελτίωση της κινητικής αποδέσμευσής τους από το φορέα. Λαμβάνοντας αυτό υπόψη, διερευνήσαμε την εξάρτηση των φυσικοχημικών παραμέτρων των χημικών νανοφορέων από τη θερμοκρασία στα δύο υδατικά μέσα διασποράς (Εικόνες 6.3 και 6.4).





Εικόνα 6.3. (a) R_h (b) PD.I. (c) d_f (d) I vs. θερμοκρασία για τα χημαιρικά λιποσώματα σε νερό HPLC καθαρότητας (η συγκέντρωση των χημαιρικών λιποσωμάτων είναι σταθερή και ίση με 5×10^{-2} mg/ml).



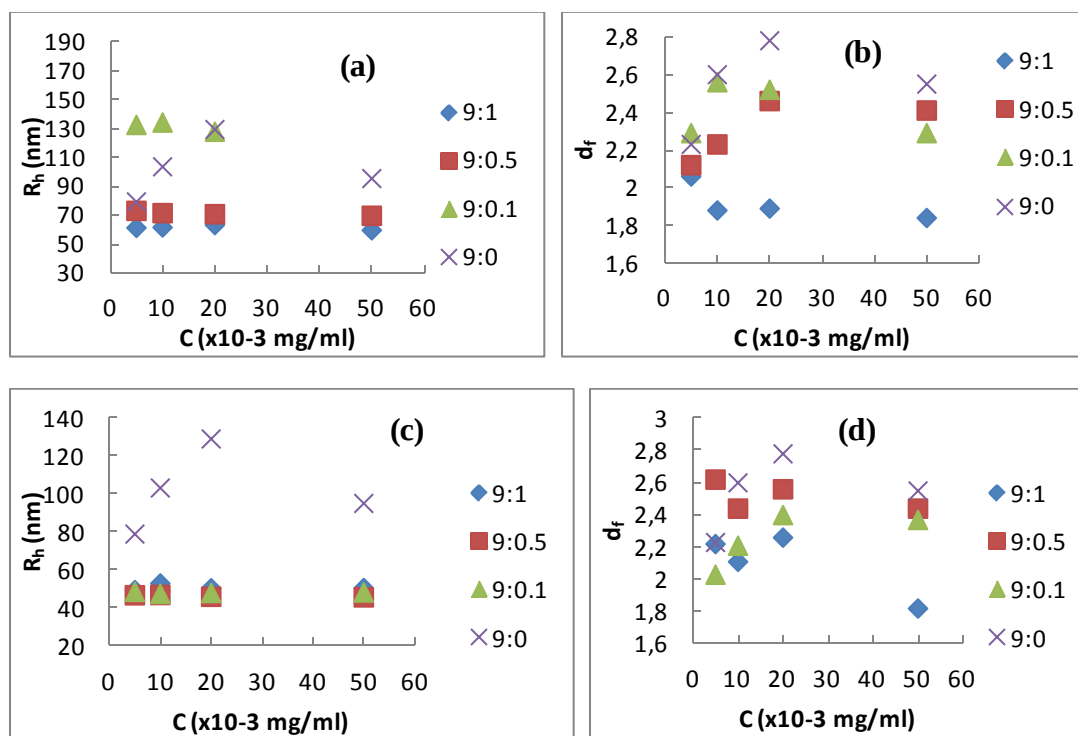
Εικόνα 6.4. (a) R_h (b) PD.I. (c) d_f (d) I vs. θερμοκρασία για τα χημαιρικά λιποσώματα σε PBS (η συγκέντρωση των χημαιρικών λιποσωμάτων είναι σταθερή και ίση με 5×10^{-2} mg/ml).

Αυτοί οι τύποι των πειραμάτων προσομοιάζουν επίσης την απόκριση των χημαιρικών νανοφορέων μετά από χορήγησή τους σε εμπύρετες ή φλεγμονώδεις καταστάσεις, αν και το θερμοκρασιακό εύρος το οποίο μελετήθηκε είναι ευρύτερο από το φυσιολογικό ή παθολογικό που απαντάται στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι υδροδυναμικές ακτίνες των χημαιρικών νανοσυστημάτων στο νερό HPLC-καθαρότητας μειώθηκαν κατά τη διαδικασία της θέρμανσης στους 50°C (Εικόνα 6.3(a)). Ο πληθυσμός των χημαιρικών νανοφορέων έγινε περισσότερο ομοιογενές

κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της θέρμανσης στους 50°C (η πολυδιασπορά μειώθηκε) (Εικόνα 6.3(b)). Οι τιμές της κλασματικής διάστασης (d_f) αυξήθηκαν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της θέρμανσης μόνο για τους χιμαιρικούς νανοφορείς σύστασης DPPC:PEO-b-PCL (9:1 μοριακός λόγος). Αυτές οι μικρότερες τιμές της κλασματικής διάστασης για τα άλλα χιμαιρικά συστήματα είναι σε συμφωνία με την θεώρηση της ακανόνιστης επιφάνειας και της μεγαλύτερης κυρτότητας για τις μεικτές λιποσωμιακές διπλοστοιβάδες. Η R_h παραμένει σταθερή για τα χιμαιρικά λιποσώματα στο PBS κατά τη διαδικασία της θέρμανσης στους 50°C (Εικόνα 6.4(a)), ενώ οι τιμές d_f μειώθηκαν (Εικόνα 6.4(c)). Στη μεγαλύτερη θερμοκρασία ο πληθυσμός των χιμαιρικών νανοφορέων εμφανίστηκε περισσότερο ομοιογενής και στο PBS, επίσης (Εικόνα 6.4(b)). Θα πρέπει να σημειωθεί πως ενώ το μέσο μέγεθος των διαφορετικών χιμαιρικών νανοφορέων δε διαφοροποιήθηκε σημαντικά μέσα στο PBS, οι τιμές της κλασματικής διάστασης που προσδιορίστηκαν φανέρωσαν κάποιες διαφορές που σχετίζονται πιθανότατα με αλλαγές στη μορφολογία των χιμαιρικών νανοφορέων. Η κλασματική διάσταση προσφέρει μία ποσοτικοποίηση των αλλαγών της μορφολογίας των νανοφορέων σε διαφορετικές θερμοδυναμικές συνθήκες, αποκαλύπτοντας διαφορές που οι τιμές R_h από μόνες τους δε φανερώνουν, ειδικότερα στο PBS (Εικόνα 6.4). Η μάζα των χιμαιρικών επίσης μειώθηκε στα δύο μέσα διασποράς (Εικόνες 6.3(d) και 4(d)) σε θερμοκρασιακό εύρος από 25°C σε 50°C , όπως υποδεικνύεται από την μείωση των τιμών της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (αναλογικά σχετίζονται με τη μάζα των αυτό-συναρμολογούμενων νανοδομών). Με άλλα λόγια, η μείωση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας ίσως είναι αποτέλεσμα της σημαντικής μείωσης της μάζας των αρχικών χιμαιρικών νανοδομών. Για τα συμβατικά DPPC λιποσώματα, η μάζα παραμένει σχεδόν αμετάβλητη σε θερμοκρασιακό εύρος από 25°C σε 45°C (θερμοκρασία μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία της κύριας μετάβασης των DPPC λιπιδίων, $T_m=41^{\circ}\text{C}$ για τα DPPC λιπίδια), διότι η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από τις λιποσωμιακές διασπορές παραμένει σχεδόν αμετάβλητη (εντός του πειραματικού σφάλματος) στα δύο υδατικά μέσα διασποράς (Εικόνες 6.3(d) και 6.4(d)). Αυτή παρατήρηση υποδηλώνει ότι οι χιμαιρικές νανοδομές μεταβάλλουν τη μορφολογία τους σε συνθήκες αυξημένης θερμοκρασίας.

Μετά την αραίωση των αρχικών λιποσωμιακών σκευασμάτων, για να προσομοιωθεί η διαδικασία της χορήγησης στον ανθρώπινο οργανισμό, παρατηρήθηκε ότι η R_h είναι

ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση στις περισσότερες περιπτώσεις για τους χιμαιρικούς νανοφορείς DPPC:PEO-b-PCL στα υδατικά μέσα διασποράς (Εικόνες 6.5(a) και 6.5(c)). Από την άλλη πλευρά, οι τιμές d_f δείχνουν να διαφοροποιούνται σε κάποιες περιπτώσεις (Εικόνες 6.5(b) και 6.5(d)). Οι τιμές της κλασματικής διάστασης που υποδιορίστηκαν υποδεικνύουν κάποιες διαφορές στα κολλοειδή χαρακτηριστικά των χιμαιρικών νανοδομών και στα δύο μέσα διασποράς.



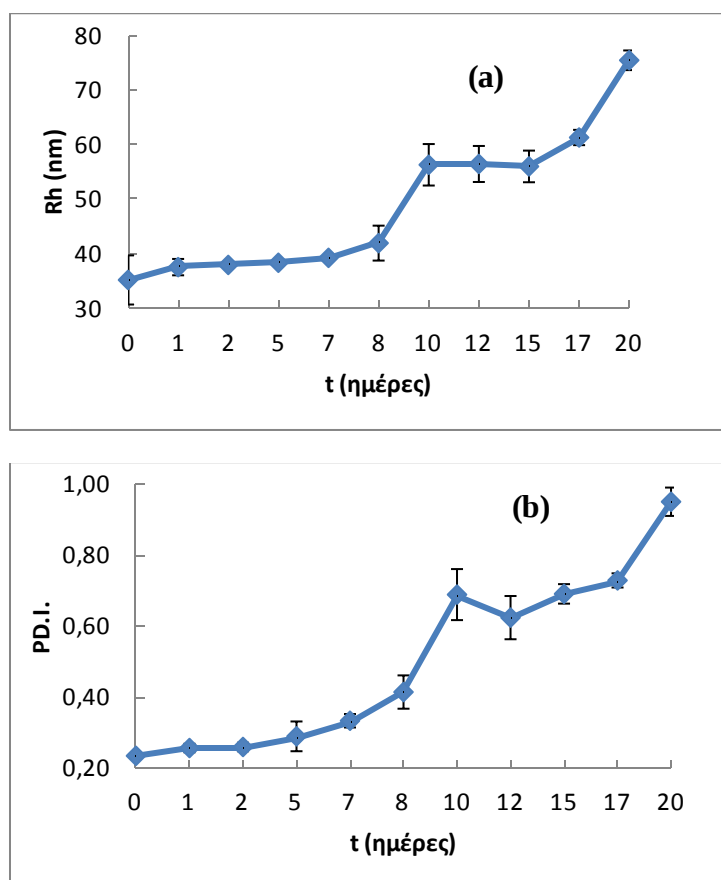
Εικόνα 6.5. (a) R_h και (b) d_f vs. συγκέντρωση για τα χιμαιρικά λιποσώματα σε νερό HPLC καθαρότητας. (c) R_h και (d) d_f vs. συγκέντρωση για τα χιμαιρικά λιποσώματα σε PBS.

6.2.2 Η συμπεριφορά των χιμαιρικών νανοδομών σε όξινα διαλύματα: ο δυνητικός ρόλος της αποικοδομησιμότητας της πολυκαπρολακτόνης - PCL

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται μέχρι στιγμής σε PEO-b-PCL συμπολυμερή κατά συστάδες δείχνουν ότι είναι δυνατό να παρασκευαστούν σταθερές υδατικές διασπορές μονοδιάσπαρτων μικυλλιακών νανοσωματιδίων. Η δομή, η μορφολογία και η συμπεριφορά αυτών των αυτό-συναρμολογούμενων συμπολυμερικών νανοσωματιδίων έχουν ήδη μελετηθεί σε υδατικά διαλύματα. Αλλαγές στο pH οδηγούν σε μορφολογικούς μετασχηματισμούς των μικυλλίων που αποτελούνται από

PEO-b-PCL σε υδατικά διαλύματα και αυτά τα μικύλλια είναι σταθερά σε ουδέτερα και σε όξινα διαλύματα. Από την άλλη πλευρά, φορτισμένα φαρμακομορία αποκρινόμενοι στις αλλαγές του pH παρουσιάζουν κάποια πλεονεκτήματα που αφορούν τη φόρτωσή καθώς και την ελεγχόμενη αποδέσμευση του κατάλληλου φαρμακομορίου. Σε αυτό το σημείο, μελετήσαμε τη σταθερότητα του χιμαιρικού συστήματος σύστασης DPPC:PEO-b-PCL (9:1 μοριακός λόγος) σε όξινο pH. Το pH της χιμαιρικής διασποράς ρυθμίστηκε να είναι ίσο με 4.5 με την προσθήκη HCl. Όπως προαναφέρθηκε, οι χιμαιρικοί νανοφορείς σύστασης DPPC:PEO-b-PCL (9:1 μοριακός λόγος) στο PBS παρουσίασαν εξαιρετική φυσικοχημική σταθερότητα σε ουδέτερο pH (Εικόνα 6.2(b)). Όμως, το μέσο μέγεθος των χιμαιρικών νανοφορέων στην όξινη διασπορά σταδιακά γινόταν μεγαλύτερο σε χρονικό διάστημα μίας εβδομάδας (Εικόνα 6.6(a)). Οι λόγοι για την αύξηση του μεγέθους δεν είναι ακόμα απόλυτα ξεκάθαροι. Πιστεύουμε ότι η παρατηρηθείσα φαινομενολογία δεν έχει παρουσιασθεί ακόμη εκτενώς στη βιβλιογραφία. Επιπλέον μελέτες απαιτούνται, αλλά μια αρχική υπόθεση μπορεί να οδηγήσει στο η λ ν της παρατηρούμενης συμπεριφοράς. Η φαινομενολογία αυτή μπορεί να επεξηγηθεί από τη σταδιακή αποικοδόμηση της πολυμερικής αλυσίδας (gradual degradation of the polymeric chain) (υδρόλυση του αγκυροβολημένου τμήματος της πολυκαπρολακτόνης) σε όξινο μέσο διασποράς. Σε pH=4.50, οι χιμαιρικοί νανοφορείς συσσωματώνονται πιθανότατα λόγω της απουσίας των στερικών απώσεων, καθώς εξαιτίας της αποικοδόμησης της αλυσίδας της πολυκαπρολακτόνης οι νανοδομές «χάνουν» την κορόνα της PEO και για αυτό οι νανοδομές γίνονται περισσότερο ετερογενείς (Εικόνα 6.6(b)). Οι τιμές του ζ-δυναμικού είναι ανεξάρτητες από το μέσο διασποράς κατά τη διάρκεια της μελέτης της σταθερότητας. Επιπρόσθετα, η τιμή d_f του χιμαιρικού νανοφορέα σύστασης DPPC:PEO-b-PCL (9:1 μοριακός λόγος) σε όξινο διάλυμα αυξήθηκε από 1.88 (t=0days) σε 2.30 (t=20days) κατά τη διάρκεια της μελέτης σταθερότητας. Επιπλέον, η παρατηρούμενη αύξηση στην ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι αποτέλεσμα της σημαντικής αύξησης της μάζας των αρχικών αυτό-συναρμολογούμενων χιμαιρικών νανοδομών σε όξινο μέσο διασποράς εξαιτίας της συσσωμάτωσης. Η τελευταία παρατήρηση υποδεικνύει πως η αλλαγή της μορφολογίας των χιμαιρικών νανοδομών εξαιτίας της αποικοδόμησης της σταθεροποιητικής πολυμερικής αλυσίδας (stabilizing polymer chain) και της συνακόλουθης προκαλούμενης συσσωμάτωσης. Η αποικοδόμηση του PEO-b-PCL συμπολυμερούς κατά συστάδες είναι ιδιαίτερης σημασίας καθώς οδηγεί στη

σταδιακή αποσύνθεση/ αποδόμηση του χημικού νανοφορέα και σε μία ελεγχόμενη και στοχευμένη αποδέσμευση του ενσωματωμένου φαρμακομορίου στους καρκινικούς όγκους.



Εικόνα 6.6. Μελέτη σταθερότητας του DPPC:PEO-b-PCL (9:1 μοριακός λόγος) χημικού νανοφορέα σε HCl (pH=4.5). (a) R_h και (b) PD.I. των εναιωρημάτων του χημικού νανοφορέα.

6.2.3 Μικροπολικότητα και μικρορευστότητα εντός του μικροπεριβάλλοντος των χημικών νανοφορέων.

Η Φθορισμομετρία έχει χρησιμοποιηθεί στην προσπάθεια να καταγραφούν κάποιες ποιοτικές πληροφορίες σχετικά με την εσωτερική νανοδόμηση και το περιβάλλον των χημικών αυτό-συναρμολογούμενων δομών σε νερό HPLC καθαρότητας και σε PBS. Οι μεταβολές που πραγματοποιούνται στο τμήμα της λιποσωμιακής διπλοστοιβάδας και του υδρόφοβου PCL τμήματος του συμπολυμερούς παρακολούθηθηκαν με μετρήσεις φθορισμομετρίας των ενσωματωμένου πυρενίου στα δύο υδατικά μέσα διασποράς. Το πυρένιο χρησιμοποιήθηκε ως υδρόφοβος

ιχνηλάτης, και ενσωματώθηκε στην υδρόφοβη μεικτή λιποσωματική μεμβράνη. Η μικροπολικότητα των υδροφοβικών περιοχών των DPPC λιποσωμάτων επίσης προσδιορίστηκε για συγκριτικούς λόγους. Για τους χημικούς νανοφορείς DPPC:PEO-b-PCL, η μικροπολικότητα αυξήθηκε με την αύξηση του συμπολυμερούς κατά συστάδες στο νανοςύστημα, και για τα δύο υδατικά μέσα διασποράς (Πίνακας 6.2).

Πίνακας 6.2. Οι λόγοι της έντασης φθορισμού του πυρενίου I_1/I_3 (ενδεικτικός της μικροπολικότητας) και I_E/I_M (ενδεικτικός της μικρορευσιμότητας) με ιχνηλάτη το ενσωματωμένο πυρένιο για τα DPPC λιποσώματα και για τους DPPC:PEO-b-PCL χημικούς νανοφορείς.

Σύσταση	Νερό		PBS	
	I_1/I_3	I_{ex}/I_m	I_1/I_3	I_{ex}/I_m
DPPC λιποσώματα	1.36	0.76	1.35	0.36
DPPC:PEO-b-PCL (9:0.1 μοριακός λόγος)	1.29	0.14	1.38	0.02
DPPC:PEO-b-PCL (9:0.5 μοριακός λόγος)	1.47	0.10	1.55	0.55
DPPC:PEO-b-PCL (9:1 μοριακός λόγος)	1.53	0.70	1.59	0.11

Σε μοριακό λόγο 9:0.1 δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές σε σύγκριση με τα συμβατικά DPPC λιποσώματα, αποδεικνύοντας ότι μία ορισμένη ποσότητα του συμπολυμερούς κατά συστάδες απαιτείται για να προκαλέσει αλλαγές στην μικροπολικότητα. Οι αλλαγές στη μικροπολικότητα θα πρέπει να αποδοθούν στην ενσωμάτωση του περισσότερου πολικού τμήματος PCL (εξαιτίας της παρουσίας εστερικών ομάδων) εντός της περιοχής των υδρογονανθρακικών αλυσίδων των λιπιδικών διπλοστοιβάδων, καθώς και των πιθανών αλλαγών της δομής των διπλοστοιβάδων.

Οι αλλαγές της μικρο ρυστότητας (όπως υπο δυνάμει οι τιμές I_E/I_M) δεν παρουσιάζουν μία συγκεκριμένη τάση. Μία μείωση της μικρο ρυστότητας (μείωση των τιμών I_E/I_M) αναμένεται καθώς οι αλυσίδες των πολυμερών κατά συστάδες ενσωματώνονται στη λιπιδική μεμβράνη, αλλά οι μετρήσεις των πειραμάτων της Φθορισμομετρίας χρησιμοποιώντας το πυρένιο ως ιχνηλάτη δεν είναι αρκετά ευαίσθητες για να τις παρατηρήσουμε. Υπάρχει πιθανότητα η μικρο ρυστότητα (ή αλλαγές του ιξώδους) στην υδροφóbη περιοχή των χημικών δομών να μην παρουσιάζουν τάση και να εξαρτώνται από έναν σύνθετο τρόπο ενσωμάτωσης της πολυμερικής αλυσίδας, το διαχωρισμό των νανοφάσεων και την περιο ρσμένη κινητικότητα των συστατικών.

6.2.4 Ενσωμάτωση της IND στους χημικούς νανοφορείς

Έχοντας διαμορφώσει μία ολοκληρωμένη εικόνα όσον αφορά τη συμπεριφορά της αυτό-συναρμολόγησης των χημικών νανοφορέων σε υδατικά μέσα διασποράς και σε FBS, αποφασίστηκε να διερευνήσουμε τις πιθανότητες ενσωμάτωσης της IND στα χημικά λιποσώματα, ώστε να βελτιώσουμε την φαρμακοκινητική αυτού του λιπόφιλου φαρμακομορίου. Η ινδομεθακίνη ανήκει στην κατηγορία των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμακομορίων (nonsteroidal anti-inflammatory drugs - NSAIDs), τα οποία είναι ιδιαίτερος αποτελεσματικά στη θεραπεία μίας ευρείας κλίμακας νόσων και εμφανίζονται ως πολλά υποσχόμενοι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες στην πρόληψη του καρκίνου (Soh et al., 2003; Xu, 2002; Rao and Reddy, 2004). Από την άλλη πλευρά, η μακροχρόνια χρήσης του έχει ως αποτέλεσμα εμφάνιση γαστρεντερικής τοξικότητας. Από την οπτική γωνία της απαιτούμενης μείωσης των ανεπιθύμητων ενεργειών των σκευασμάτων της IND, η ενσωμάτωση σε νανοφορείς, συμπεριλαμβανομένων των μικκυλίων και των λιποσωμάτων, μοιάζει να είναι μία ελκυστική προσέγγιση όσον αφορά τη Φαρμακευτική Νανοτεχνολογία (Soehngen et al., 1988; Chen et al., 2007; Milonaki et al., 2011; Jaafar-Maalej et al., 2011; Lim et al., 2012; Sugihara et al., 2012).

Η IND είναι ένα υδρόφοβο φαρμακομόριο και όπως όλα τα NSAIDs αλληλεπιδρά ισχυρά με τις λιπιδικές μεμβράνες και η ενσωμάτωσή της σε λιποσωμιακό ή τροποποιεί την κυτταρική της πρόσληψη, ευνοώντας την επιλεκτική συσσώρευση

στις κυτταρικές μεμβράνες και λόγω αυτού το υφαινόμενο έχει καταδειχθεί η παρατεταμένη αποδέσμευσή της (Giraud et al., 1999; Lichtenberger et al., 1995 and 2006, Chen et al., 2007; Zhou and Paphael, 2005; Lúcio et al., 2008; Nunes et al., 2011).

Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα της μεθόδου παρασκευής, η λιπιδική σύνθεση, υοφορτίο και η χοληστερόλη στην ενσωμάτωση της IND στους λιποσωματικούς νανοφορείς και στα μικκύλια, καθώς και η αποδέσμευση σε *in vivo* πειράματα έχει ήδη μελετηθεί. Η IND έχει χρησιμοποιηθεί και ως φαρμακομόριο-πρότυπο για τη διερεύνηση της διαφοροποίησης των ιδιοτήτων των χημικών νανοφορέων καθώς και της δομής τους, ως αποτέλεσμα της ενσωμάτωσης ενός υδρόφοβου θεραπευτικού παράγοντα (Srinath et al., 2000a,b; Palakurthi et al., 2005; Jaafar-Maalej et al., 2011).

Οι τιμές του μεγέθους της κατανομής μεγέθους, του ζ-δυναμικού και της κλασματικής διάστασης των χημικών νανοφορέων μετά την ενσωμάτωση της IND παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.3.

Πίνακας 6.3. Τα φυσικοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά καθώς και το ποσοστό ενσωμάτωσης του φαρμακομορίου για DPPC:PEO-b-PCL:IND χημικών νανοφορέων στα διαφορετικά υδατικά μέσα διασποράς.

Σύσταση	Μέσο διασποράς	R_h (nm) ^a	PD.I. ^a	d_f ^b	ζ-δυναμικό (mV)	% Ποσοστό ενσωμάτωσης ^c
DPPC:PEO-b-PCL:IND (9:0.1:1 μοριακός λόγος)	HPLC-grade water	32.5	0.22	2.5 ₆	-4.1	10.2
DPPC:PEO-b-PCL:IND (9:0.5:1 μοριακός λόγος)	HPLC-grade water	34.1	0.41	2.4 ₆	-1.4	11.5
DPPC:PEO-b-PCL:IND (9:1:1 μοριακός λόγος)	HPLC-grade water	38.4	0.33	1.9 ₀	-15.3	13.5
DPPC:PEO-b-PCL:IND (9:0.1:1 μοριακός λόγος)	PBS	44.2	0.27	1.9 ₆	-6.8	13.2
DPPC:PEO-b-PCL:IND (9:0.5:1 μοριακός λόγος)	PBS	39.7	0.25	1.9 ₉	-1.8	22.6
DPPC:PEO-b-PCL:IND (9:1:1 μοριακός λόγος)	PBS	38.8	0.29	1.9 ₁	-3.1	30.5

^a Από DLS με τη μέθοδο των cumulants στις 90°, ^b από το SLS

^c με UV-Vis φασματοσκοπία χρησιμοποιώντας την καμπύλη αναφοράς.

Η ενσωμάτωση της IND οδήγησε σε μείωση του μεγέθους των χημικών νανοφορέων. Οι τιμές του ζ-δυναμικού δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μετά την ενσωμάτωση της IND (Πίνακας 6.3). Από την άλλη πλευρά, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των χημικών νανοφορέων άλλαξαν σημαντικά μετά την ενσωμάτωση της IND, ιδιαίτερα μέσα στο PBS. Οι τιμές d_f των χημικών νανοφορέων σύστασης DPPC:PEO-b-PCL:IND με μοριακό λόγο 9:0.1:1 και 9:0.5:1 σε PBS, μειώθηκαν μετά την ενσωμάτωση του φαρμακομορίου από 2.48 σε 1.96 και 2.58 σε 1.99, αντίστοιχα (Πίνακας 6.3). Πιθανότητα λόγω του αμφίφιλου χαρακτήρα της, η IND μεταβάλλει χωροχρονική συμπεριφορά της λιποσωμιακής φάσης (spatiotemporal liposomal phase behavior) και οι παρούσες παρατηρήσεις παρέχουν πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις χημικού νανοφορέα/φαρμάκου.

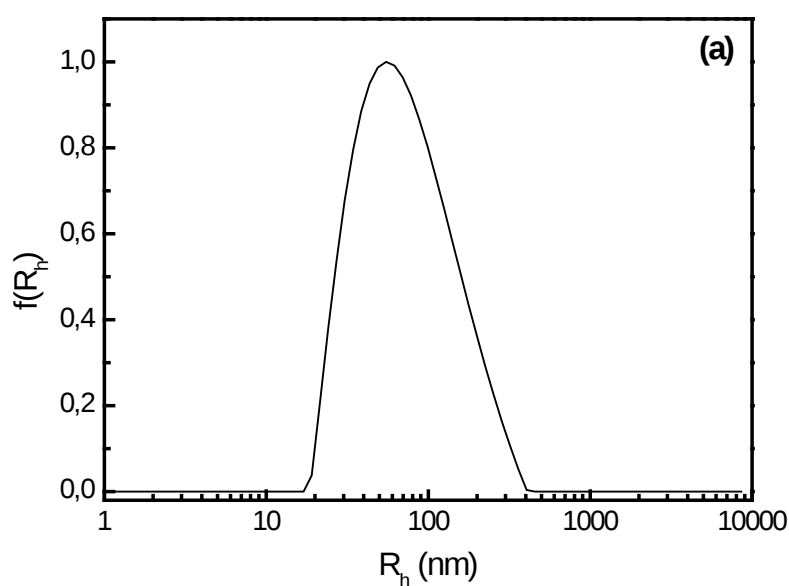
Η ενσωμάτωση του φαρμακομορίου ήταν 13.5% και 30.5% για τους χημικούς φορείς σύστασης DPPC:PEO-b-PCL:IND (9:1:1 μοριακός λόγος) σε νερό HPLC καθαρότητας και σε PBS, αντίστοιχα (Πίνακας 6.3). Το ποσοστό ενσωμάτωσης για τους χημικούς φορείς της IND αυξήθηκε με την αύξηση του πολυμερικού συστατικού PEO-b-PCL και στα δύο μέσα διασποράς, διότι το μικροπεριβάλλον έγινε περισσότερο πολικό σύμφωνα με τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από τη φθορισμομετρία και συζητήθηκαν παραπάνω (Πίνακες 6.2 και 6.3). Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, η παρούσα είναι από τις πρώτες αναφορές που αφορούν την ενσωμάτωση της IND σε χημικούς νανοφορείς λιπιδικής/ πολυμερικής σύστασης που εμφανίζουν ιδιότητες στερεοχημικής σταθεροποίησης και αποφυγής του ανοσοποιητικού συστήματος.

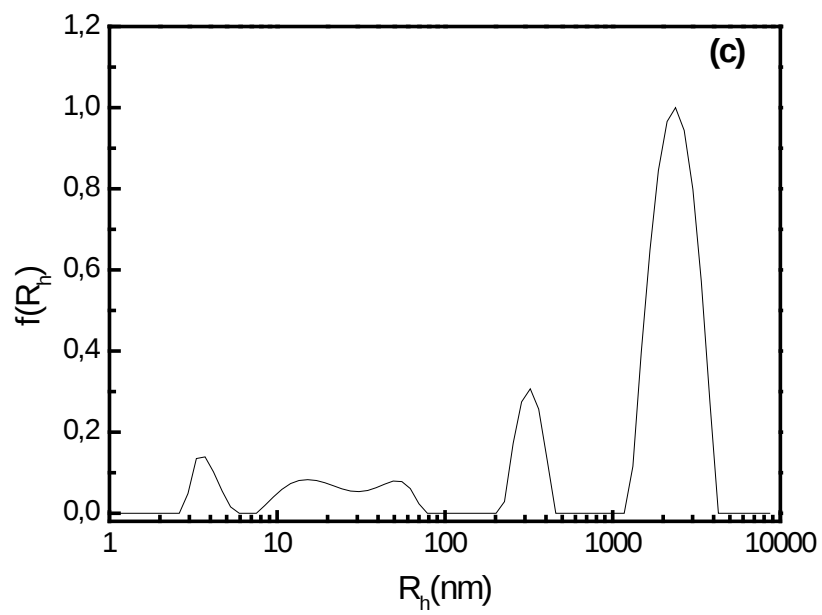
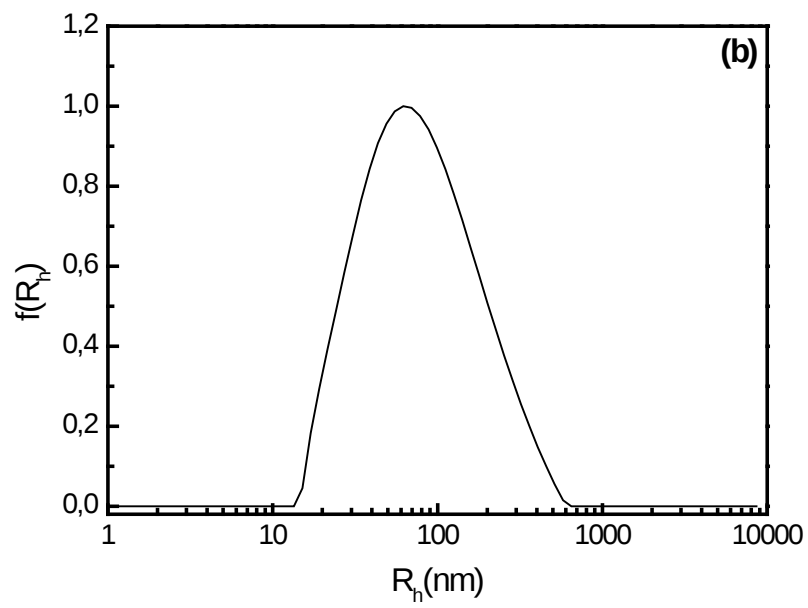
Επιπρόσθετα, θα πρέπει να σημειωθεί πως το ποσοστό ενσωμάτωσης της IND αυξήθηκε στα συστήματα που είχαν διασπαρεί στο PBS σε σύγκριση με το νερό HPLC-καθαρότητας (Πίνακας 6.3). Σε pH=7.4 (PBS), η IND είναι αρνητικά φορτισμένη και ως εκ τούτου οι αρνητικά φορτισμένες ομάδες του φαρμάκου αλληλεπιδρούν μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με τις θετικά φορτισμένες ομάδες της χολίνης του DPPC, η οποία πιθανότατα μεταβάλλει τον προσανατολισμό των πολικών κεφαλών των λιπιδίων. Αυτές οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις πιθανότατα είναι η κινητήριος δύναμη για την αύξηση των ποσοστών ενσωμάτωσης της IND μέσα στο PBS. Τα NSAIDs δεν διεισδύουν βαθιά μέσα στη λιποσωμιακή

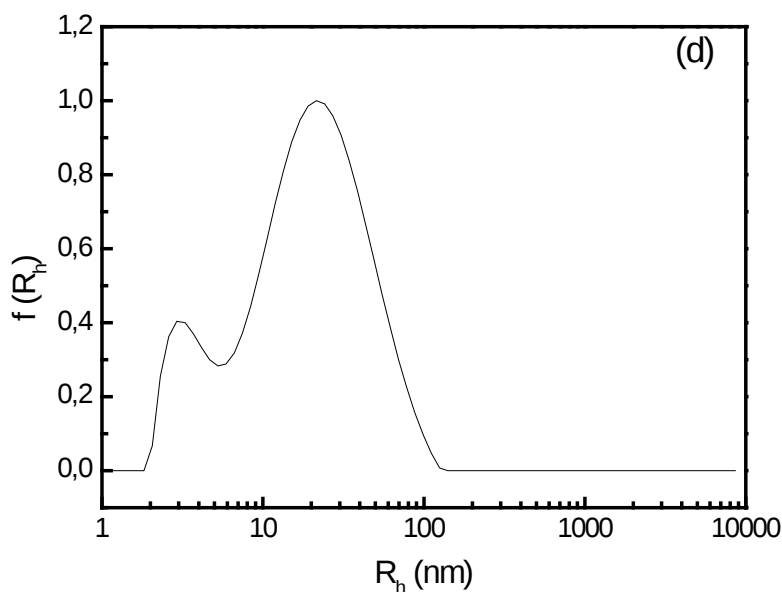
διπλοστοιβάδα, αλλά χωροθετούνται κοντά στην περιοχή των πολικών κεφαλών. Σε pH 5.5 (νερό HPLC-καθαρότητας), η IND εξακολουθεί να βρίσκεται στην περιοχή της αλυσίδας πλησιέστερα προς τις πολικές κεφαλές, αν και διεισδύει βαθύτερα στις λιπιδικές διπλοστοιβάδες σε σύγκριση με το ουδέτερο pH και το PBS. Αυτές οι διαπιστώσεις αξιοποιούνται για την καλύτερη κατανόηση των αλληλεπιδράσεων φορέα – φαρμάκου ελέγχοντας την ενσωμάτωση του φαρμάκου στους χιμαιρικούς νανοφορείς.

Η μελέτη σταθερότητας σε συνάρτηση με το χρόνο για όλα τα παρασκευασθέντα συστήματα που περιέχουν IND διεξήχθη με μέτρηση του μεγέθους και της κατανομής μεγέθους των χιμαιρικών νανοφορέων για μία χρονική περίοδο 20 ημερών. Όλα τα χιμαιρικά νανοσυστήματα που περιείχαν την IND σε νερό HPLC καθαρότητα βρέθηκε να διατηρούν τα αρχικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους το λιγότερο για δύο εβδομάδες. (Εικόνα 6.7(a)). Αντίθετα, μία μικρή αύξηση του R_h παρατηρήθηκε για τα χιμαιρικά νανοσυστήματα που περιείχαν αυτό το αμφίφιλο φαρμακομόριο στο PBS, ειδικότερα στη χαμηλότερη συγκέντρωση του συμπολυμερούς κατά συστάδες.

R_h κατανομές για τους χιμαιρικούς νανοφορείς DPPC:PEO-b-PCL (9:1 μοριακός λόγος) σε διαφορετικά μέσα διασποράς.







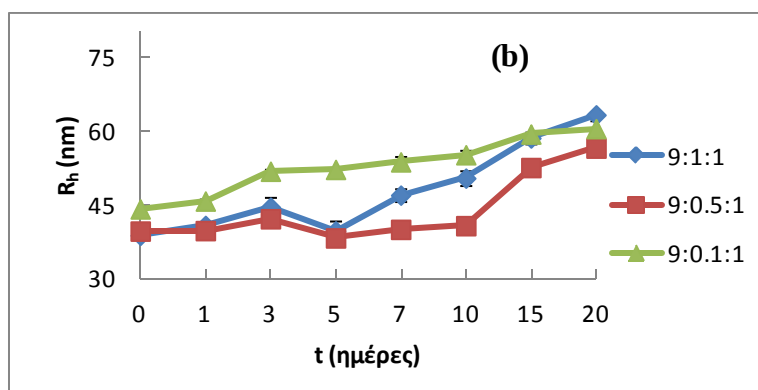
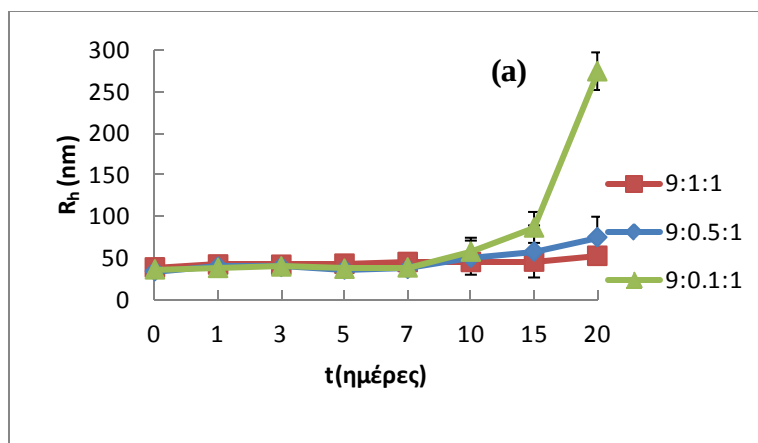
Εικόνα 6.7. Κατανομές των υδροδυναμικών ακτινών για τους DPPC:PEO-b-PCL (9:1 μοριακός λόγος) χημικούς νανοφορείς σε (a) PBS (b) νερό HPLCκαθαρότητας (c) FBS στους 25°C, υπό γωνία $\theta=90^\circ$ και σε συγκέντρωση $c=5 \times 10^{-3}$ mg/mL και για (d) τα συστατικά του FBS. Οι κατανομές των R_h αναλύθηκαν με CONTIN software.

Η τελευταία παρατήρηση ευθέως αποδεικνύει πως τα συσσωματώματα των χημικών νανοφορέων που δημιουργούνται στο PBS δημιουργούνται λόγω των αλλαγών στις δυνάμεις ενυδάτωσης του νερού ή παροστίων, και των υψηλότερων ποσών της IND που ενσωματώνονται στη μικτή λιπιδική/πολυμερική μεμβράνη, τα οποία αυξάνουν τις van der Waals ελκτικές αλληλεπιδράσεις. Το μέσο διασποράς και ο μοριακός λόγος του PEO-b-PCL διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην σταθερότητα των χημικών νανοσυστημάτων στα οποία έχει ενσωματωθεί η IND. Οι DPPC:PEO-b-PCL:IND χημικοί νανοφορείς φαίνεται να είναι αποτελεσματικά νανοσυστήματα για την ενσωμάτωση της IND, ειδικότερα εκείνα που διαθέτουν το μεγαλύτερο μοριακό λόγο του συμπολυμερούς κατά συστάδες.

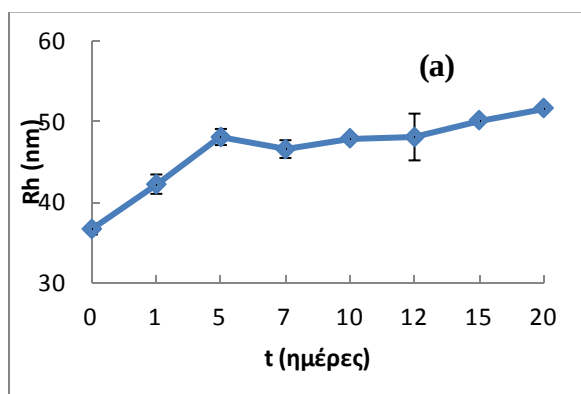
6.2.5 Εκτίμηση της σταθερότητας χιμαιρικών νανοφορέων που παρασκευάστηκαν με διαφορετικό πρωτόκολλο.

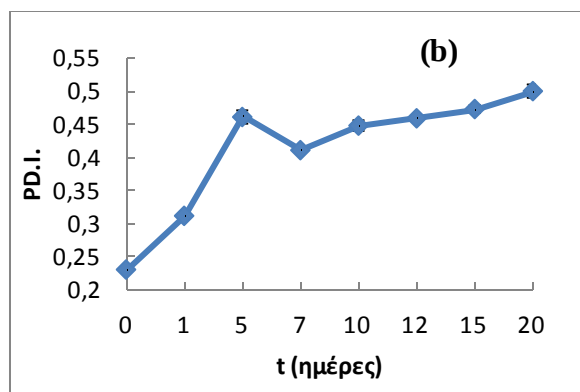
Σε αυτό το μέρος της μελέτης μας, διερευνήσαμε τη σταθερότητα χιμαιρικού νανোসυστήματος που λήφθηκε ακολουθώντας ένα διαφορετικό πρωτόκολλο παρασκευής. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι υδροδυναμικές ακτίνες των χιμαιρικών συστημάτων σε νερό HPLC καθαρότητας μειώθηκαν κατά τη διαδικασία της θέρμανσης στους 50°C και ο πληθυσμός έγινε περισσότερο ομοιογενής. Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει πως η θερμοϊστορία των χιμαιρικών νανοδομών, όπως αυτή προσδιορίζεται από το πρωτόκολλο παρασκευής, μπορεί να επηρεάσει τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και τη κολλοειδή συμπεριφορά τους. Για να εξακριβώσουμε τα παραπάνω και να αντλήσουμε πληροφορίες σχετικά με τη θερμοϊστορία, παρασκευάσαμε χιμαιρικούς νανοφορείς χρησιμοποιώντας πρωτόκολλο διαφορετικό από αυτό που περιγράφηκε προηγουμένως.

Το πρωτόκολλο παρασκευής διαφέρει σε σύγκριση με αυτό του περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος και είναι το ακόλουθο: Μετά το πέρας του χρόνου εφesuχασμού των μικρών μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων που προέκυψαν από την υπερήχηση, η διασπορά του χιμαιρικού νανοφορέα θερμάνθηκε για 3 ώρες στους 50°C. Με το παρόν πρωτόκολλο, οι σχηματισθέντες χιμαιρικοί νανοφορείς είναι περίπου 5nm μικρότεροι και δείχνουν μία ανάλογη φυσικοχημική συμπεριφορά και σταθερότητα σε σύγκριση με αυτούς συζητήθηκαν παραπάνω (Εικόνα 6.2 και 6.7(a)). Όμως, ο πληθυσμός των προφάτως παρασκευασθέντων χιμαιρικών νανοφορέων έγινε περισσότερο ετερογενής κατά τη διάρκεια της μελέτης σταθερότητας. Αυτή η παρατήρηση είναι μία πρώτη ένδειξη ότι η νέα διασπορά του χιμαιρικού νανοφορέα είναι αρκετά διαφορετική, ειδικότερα όσον αφορά την κολλοειδή σταθερότητα και την αλλαγή του μεγέθους του με την πάροδο του χρόνου. Ως εκ τούτου, το πρωτόκολλο παρασκευής μπορεί να επηρεάσει τις ιδιότητες των χιμαιρικών νανοδομών σε βάθος χρόνου σε σημαντικό βαθμό.



Εικόνα 6.7. Μελέτη σταθερότητας των χιμαιρικών νανοφορέων που περιέχουν IND σε (a) νερό HPLC καθαρότητας και (b) PBS.





Εικόνα 6.8. Μελέτες σταθερότητας για τους DPPC:PEO-b-PCL (9:1 μοριακός λόγος) χημικούς νανοφορείς σε νερό HPLC καθαρότητας που παρασκευάστηκαν με διαφορετικό πρωτόκολλο παρασκευής (a) R_h και (b) PD.I. των χημικών λιποσωμιακών εναιωρημάτων vs. χρόνος.

Πίνακας 6.4. Τα φυσικοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των PEO-b-PCL νανοφορέων σε υδατικά μέσα διασποράς.

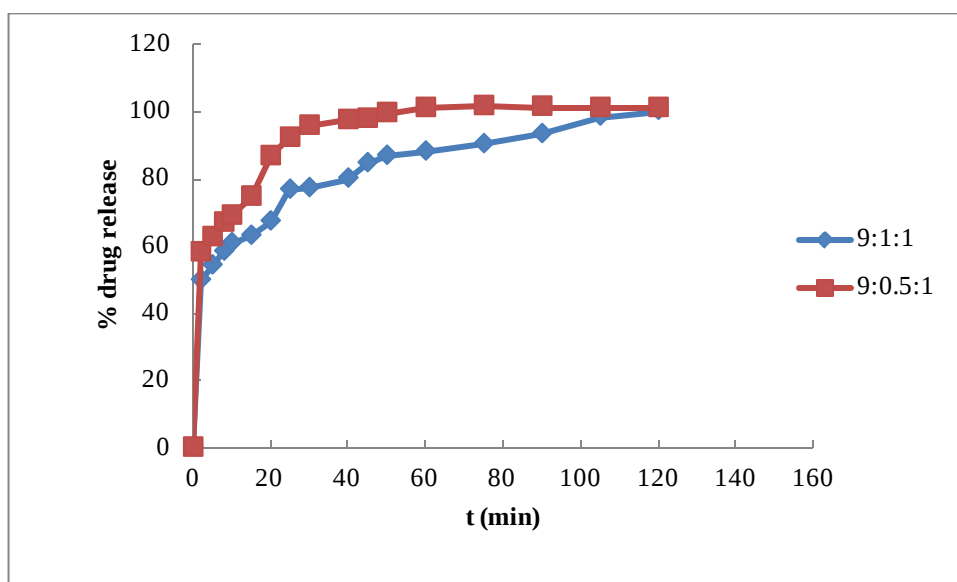
Δείγμα	Μέσο Διασποράς	R_h (nm)	PD.I.	ζ-δυναμικό (mV)
PEO-b-PCL	Νερό HPLC- καθαρότητας	19.9	0.20	-2.0
PEO-b-PCL	PBS	18.6	0.23	-3.9

6.2.6 In vitro μελέτες αποδέσμευσης της IND από τους χημικούς νανοφορείς

Η κινητική της αποδέσμευσης της IND από τους χημικούς νανοφορείς σύστασης DPPC:PEO-b-PCL (9:0.5:1 και 9:1:1 μοριακοί λόγοι) μελετήθηκε σε PBS στους 37°C. Οι χημικοί νανοφορείς με ενσωματωμένη την IND (1ml σε κάθε δείγμα) τοποθετήθηκαν σε σάκο ι διαπίδυσης (molecular weight cut off 12,000; Sigma-Aldrich). Οι σάκοι διαπίδυσης εισήχθησαν σε 1 ml PBS σε ανακινούμενο υδατόλουτρο στους 37°C. Κλάσματα του δείγματος ελήφθησαν από το εξωτερικό διάλυμα σε συγκεκριμένα χρονικά και ο ληφθείς όγκος αντικαταστάθηκε

προκειμένου να διατηρηθούν οι συνθήκες δεξαμενής. Το ποσό της IND που αποδεσμευόταν στους διαφόρους χρόνους μέχρι τις 3 ώρες, προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά σε $\lambda_{\max} = 492 \text{ nm}$.

Η *in vitro* αποδέσμευση της IND από τους χημικούς νανοφορείς παρουσιάζεται στην Εικόνα 6.9.



Εικόνα 6.9. Αποδέσμευση της IND από τους DPPC:PEO-b-PCL: IND (9:0.5:1 και 9:1:1 μοριακός λόγος) χημικών νανοφορείς (κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος $\pm$ S.D. των $n = 3$ ανεξάρτητων πειραμάτων).

Παρατηρήθηκε ότι η *in vitro* αποδέσμευση του φαρμακομορίου από τους παρασκευασθέντες χημικούς νανοφορείς είναι αρκετά γρήγορη ειδικότερα για τους νανοφορείς με το μικρότερο ποσοστό του συμπολυμερούς κατά συστάδες. Αυτή η φαινομενολογία θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως παράγοντας ελέγχου για την παρασκευή και την ανάπτυξη των χημικών νανοφορέων με το επιθυμητό ρυθμό αποδέσμευσης, διαμορφώνοντας το ρυθμό αποδέσμευσης της IND από το λόγο των συστατικών, βελτιώνοντας το θεραπευτικό δείκτη και τελικά μειώνοντας τις ανεπιθύμητες ενέργειες. Ο συνδυασμός των συμπολυμερών κατά συστάδες με τα λιποσώματα για την ανάπτυξη ενός νέου χημικού νανοφορέα εμφανίζεται να έχει πολλές ελπιδοφόρες προοπτικές, και αυτό οφείλεται ως επί το πλείστον το γεγονός ότι το συμπολυμερές κατά συστάδες δρα ως ρυθμιστής της αποδέσμευσης της IND. Αν και ο ακριβής μηχανισμός με βάση τον οποίο πραγματοποιείται η ρύθμιση της

αποδέσμευσης, τα αρχικά αποτελέσματα που παρουσιάζονται εδώ υπόσχονται την ανάπτυξη χιμαιρικών νανοσυστημάτων που βασίζονται στα αμφιφιλικά συμπολυμερή κατά συστάδες και στα λιπίδια.

6.2.7 PEO-b-PCL μικκύλια σε υδατικά μέσα

Κατάλληλες ποσότητες του συμπολυμερούς κατά συστάδες PEO-b-PCL διαλύθηκαν σε μείγμα χλωροφορμίου / μεθανόλης (9:1 v/v), τότε μεταφέρθηκαν σε σφαιρική φιάλη, για την εξάτμιση των οργανικών διαλυτών σε συσκευή εξάτμισης υπό κενό. Ο διαλύτης εξατμίζεται αργά σε περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό κενό μέχρι το σχηματισμό ομοιογενούς υμενίου. Το σχηματιζόμενο υμένιο αφήνεται σε ξηραντήρα κενού το υλάχιστον για 24 ώρες για την απομάκρυνση πιθανών ιχνών διαλυτών. Το λιπιδικό υμένιο ενυδατώνεται με νερό HPLC-καθαρότητας και PBS, αντίστοιχα. Η ενυδάτωση πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 45°C με αργή περιστροφή της φιάλης για μία ώρα. Στη συνέχεια οι σχηματισθείσες νανοδομές αφήνονται σε ηρεμία για 30 λεπτά πριν υποβληθούν σε δύο κύκλους υπερήχησης των 3 και 2 λεπτών με διακοπή 3 λεπτών στο ενδιάμεσο χρησιμοποιώντας αισθητήρα υπερήχησης (πλάτος ταλάντωσης 100%, διάρκεια παλμού 0.7 sec). Οι νανοδομές που σχηματίζονται με υπερήχηση αφήνονται σε ηρεμία για 30 λεπτά. Η μέση υδροδυναμική διάμετρος και το ζ-δυναμικό χρησιμοποιήθηκαν για το χαρακτηρισμό των πολυμερικών εναιωρημάτων αμέσως μετά την παρασκευή τους (t=0days).

6.3 Συμπεράσματα

Μεικτοί (χιμαιρικοί) νανοφορείς, αποτελούμενοι από το λιπίδιο DPPC και από το συμπολυμερές κατά συστάδες PEO-b-PCL, παρασκευάστηκαν με επιτυχία σε υδατικό και βιολογικό μέσο διασποράς. Οι χιμαιρικοί νανοφορείς με ενσωματωμένο το συμπολυμερές κατά συστάδες PEO-b-PCL είναι μικρότερου μεγέθους σε σύγκριση με τα συμβατικά DPPC λιποσώματα και η ενσωμάτωση 10% σε μοριακό λόγο του PEO-b-PCL οδήγησε στο σχηματισμό νανοδομών μικρότερου μεγέθους σε νερό HPLC-καθαρότητας και PBS σε σύγκριση με όλα τα παρασκευασθέντα χιμαιρικά νανοσυστήματα. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των χιμαιρικών

νανοφορέων σε βιολογικό μέσο διασποράς (FBS) υποδεικνύουν ότι το PEO-b-PCL προσδίδει ιδιότητες αποφυγής του ανοσοποιητικού συστήματος, ειδικότερα στην υψηλότερη περιεκτικότητα το υ συμπο λμερο υ. Μία μείωση των τιμών της κλασματικής διάστασης παρατηρήθηκε για τους χημικούς νανοφορείς σύστασης DPPC:PEO-b-PCL (9:1 μο ρακό ς λό ο υ σε σύγκριση με το υ συμβατικό υ λιποσωμιακούς νανοφορείς στα υδατικά μέσα διασποράς. Αντιθέτως, μία αύξηση των κλασματικών διαστάσεων παρατηρήθηκε για τα DPPC:PEO-b-PCL υπερμοριακά συσσωματώματα με τα συστατικά του πλάσματος στο FBS. Όλοι οι χημικοί νανοφορείς στο PBS βρέθηκαν να διατηρούν τα αρχικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους για δύο μήνες. Οι υδροδυναμικές ακτίνες των χημικών νανοσυστημάτων στο νερό HPLC καθαρότητας μειώθηκαν κατά τη διαδικασία της θέρμανσης στους 50°C, ενώ βρέθηκαν να είναι ανεξάρτητες από τις μεταβολές της συγκέντρωσης. Ενώ το μέσο μέγεθος των διαφορετικών χημικών νανοφορέων δεν μεταβλήθηκε σημαντικά στο PBS, οι κλασματικές διαστάσεις κατέδειξαν διαφοροποιήσεις που σχετίζονται με αλλαγές στην μορφολογία των αυτό-συναρμολογούμενων συστημάτων. Το μέγεθος των χημικών νανοδομών σταδιακά αυξήθηκε σε μία περίο ο μίας εβδο άδας εξαιτίας της υδρό υσης το υ αγκυροβολημένου τμήματος της πολυκαπρολακτόνης, υποδεικνύοντας συσσωμάτωση και σταδιακή αποσύνθεση του αρχικού χημικού νανοφορέα. Η μικροπολικότητα των υδροφοβικών περιοχών των χημικών νανοφορέων αυξήθηκε με την αύξηση του ποσοστού των πολυμερικών αλυσίδων. Η ενσωμάτωση της IND επιτεύχθηκε σε αυτούς τους νανοφορείς σε τέτοιο βαθμό που εξαρτάται από το λόγο λιπιδίου/πολυμερούς, το pH και την ιονική ισχύ του μέσου διασποράς. Η παρούσα μελέτη έδειξε πως υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός παραμέτρων, οι οποίοι θα πρέπει να συνυπολογιστούν για να διαφοροποιηθεί η μορφολογία των χημικών νανο φ ρών και αυτό είναι επωφελές για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη νανοφορέων για ελεγχόμενη και στοχευμένη μεταφορά φαρμακομορίων. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αποδέσμευσης της IND από τους χημικούς νανοφορείς έδειξαν ότι ο ρυθμός εξόδου του φαρμακομορίου εξαρτάται από την αναλογία των συστατικών. Ως εκ τούτου, αυτοί οι χημικοί νανοφορείς μπορούν να επηρεάσουν τη φαρμακοκινητική του ενσωματωμένου φαρμακομορίου και συνεπώς να μεταβάλλουν τις ιδιότητες της απορρόφησης, βιοκατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης συγκριτικά με τις συμβατικές φαρμακοτεχνικές μορφές.

7 Βαθμιδωτά συμπολυμερή κατά συστάδες ως νανοφορείς φαρμακομορίων.

7.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Στην παρούσα μελέτη μελετήσαμε τη συμπεριφορά αυτό-συναρμολόγησης και τη σταθερότητα νανοδομών που σχηματίστηκαν από το poly(2-methyl-2-oxazoline)-grad-poly(2-phenyl-2-oxazoline) (MPOx) βαθμιδωτό συμπολυμερές κατά συστάδες σε PBS. Τα δείγματα του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες που μελετήθηκαν (υποδηλώνονται ως -0, -1, και -2) διαθέτουν διαφορετικά μοριακά χαρακτηριστικά. Μία πληθώρα τεχνικών σκέδασης του φωτός (στατική, δυναμική και ηλεκτροφορητική) χρησιμοποιήθηκαν ώστε να εξαχθούν πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των νανοσυστημάτων που σχηματίστηκαν ως συνάρτηση των χαρακτηριστικών του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες. Ο αμφίφιλος χαρακτήρας και η κολλοειδής σταθερότητα των νανοφορέων δείχνουν ότι αυτές οι νανοδομές μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αποτελεσματικοί νανοφορείς υδρόφοβων φαρμάκων. Η ενσωμάτωση της IND οδήγησε σε μείωση του μεγέθους των MPOx-0 και των MPOx-1 νανοφορέων. Παρατηρήθηκε ότι η *in vitro* αποδέσμευση της IND από τους παρασκευασθέντες MPOx-2:IND (9:1 και 9:2 μοριακός λόγος) είναι αρκετά αργή, ενώ οι MPOx-0 και οι MPOx-1 νανοφορείς αποδέσμευαν την IND άμεσα.

(a)

(b)



Εικόνα 7.1. (a) Χημική δομή και (b) μακρομοριακή αρχιτεκτονική των βαθμιδωτών συμπολυμερών κατά συστάδες MPOx, που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη.

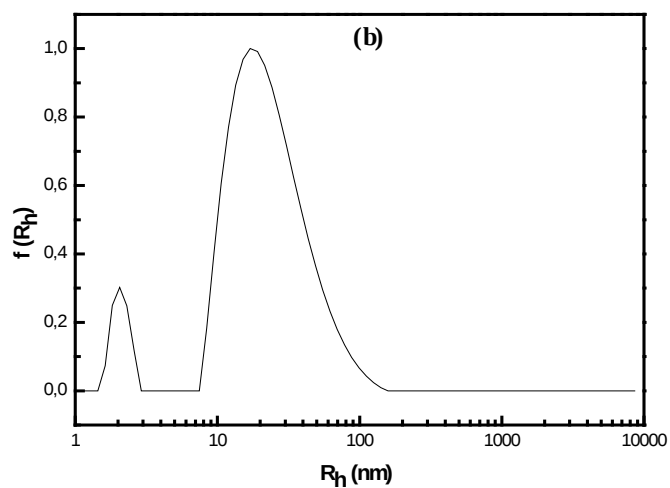
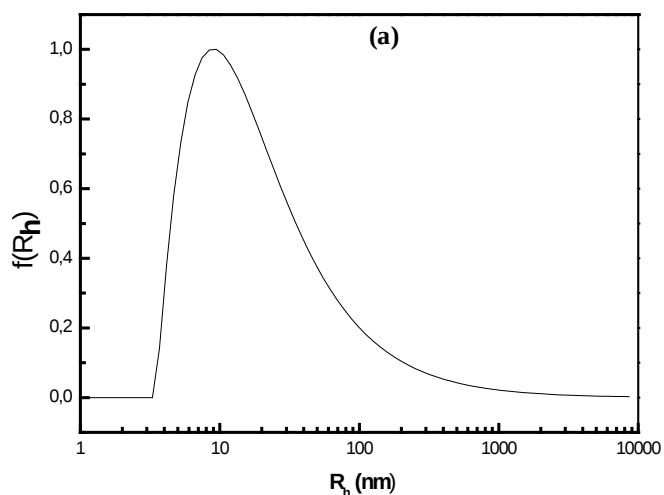
Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη νανοσυστημάτων που αποτελούνται από το αμφίφιλο poly(2-methyl-2-oxazoline)-grad-poly(2-phenyl-2-oxazoline) (MPOx) βαθμιδωτό συμπολυμερές κατά συστάδες με διαφορετικές συστάσεις. Τα νανοσυστήματα παρασκευάστηκαν χρησιμοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας σαφώς διαφορετικό πρωτόκολλο σε σύγκριση με προηγούμενες εργασίες, το οποίο οδήγησε σε διαφορετικές νανοδομές όσον αφορά τα δομικά χαρακτηριστικά τους. Το MPOx βαθμιδωτό συμπολυμερές κατά συστάδες συντέθηκε με κατιονικό πολυμερισμό. Προσδιορίστηκαν τα φυσικοχημικά και δομικά χαρακτηριστικά (ζ-δυναμικό, δείκτης πολυδιασποράς, μέγεθος/σχήμα και μορφολογία) των παρασκευασθέντων νανοδομών σε PBS, ένα μέσο διασποράς που προσομοιάζει τα βιολογικά υγρά, εφαρμόζοντας ένα πρωτόκολλο που περιλαμβάνει την ενυδάτωση του λεπτού υμενίου απουσία και παρουσία του υδρόφοβου φαρμάκου. Στόχο αποτέλεσε η αξιολόγηση της ικανότητας του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες να λειτουργήσει ως σύστημα μεταφοράς φαρμακομορίων. Για αυτό το λόγο, μελετήθηκαν οι νανο-αυτό-συναρμολογούμενες νανοδομές που σχηματίστηκαν από την ενσωμάτωση της IND και η κινητική της αποδέσμευσης, αξιολογώντας παράλληλα συσχετίσεις με τη μοριακή αρχιτεκτονική των βαθμιδωτών συμπολυμερών κατά συστάδες.

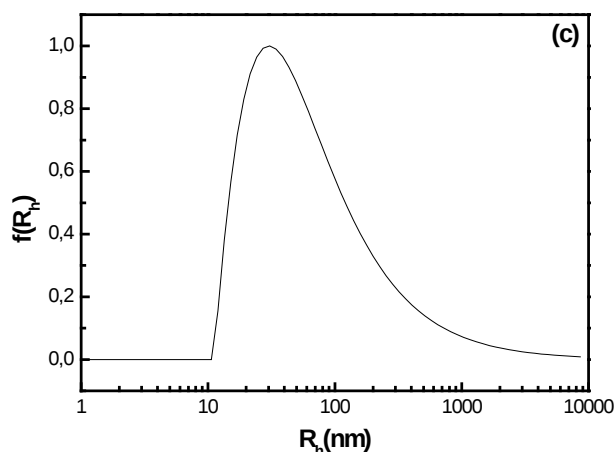
Πίνακας 7.1. Μοριακά χαρακτηριστικά των poly(2-methyl-2-oxazoline-grad-2-phenyl-2-oxazoline) βαθμιδωτών συμπολυμερών κατά συστάδες.

Δείγμα	M_w	M_w/M_n	% wt PhOx
MPOx-0	3,200	1.15	10
MPOx-1	5,200	1.14	28
MPOx-2	3,300	1.26	38

7.1.1 Μελέτες αυτό-συναρμολόγησης και σταθερότητα των MPOx νανοφορέων.

Τα φυσικοχημικά και δομικά χαρακτηριστικά των MPOx-0, MPOx-1 και MPOx-2 νανοδομών σε υδατικά και βιολογικά μέσα παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.2 και οι κατανομές της R_h για τις νανοδομές στο PBS παρουσιάζονται στην Εικόνα 7.2.





Εικόνα 7.2. Οι κατανομές της υδροδυναμικής ακτίνας για τα (a) MPOx-0, (b) MPOx-1 και (c) MPOx-2 νανοσωματίδια σε PBS στους 25°C, σε γωνία σκέδασης $\theta=90^\circ$ ($c=5 \times 10^{-3}$ mg/mL).

Η μέση υδροδυναμική ακτίνα των κενών MPOx-1 νανοφορέων βρέθηκε ίση με 40 nm και ο πληθυσμός των νανοσωματιδίων αρκετά πολυδιάσπαρτος ($PD.I.=0.51$). Οι τιμές του ζ-δυναμικού των MPOx-0 νανοςυστημάτων στο PBS κοντά στο μηδέν (+2.1 mV), εξαιτίας της έλλειψης φορτίου στην επιφάνεια των νανοδίων. Η κλασματική διάσταση βρέθηκε ίση με 2.50 και ο λόγος της γεωμετρικής προς την υδροδυναμική ακτίνα, R_g/R_h , βρέθηκε ίση με 0.81, αποδεικνύοντας σφαιρικά σωματίδια. Η μέση υδροδυναμική διάμετρος των κενών MPOx-0 νανοφορέων βρέθηκε περίπου ίση με 52 nm, με θετικές τιμές ζ-δυναμικού και λίγο χαμηλότερη πολυδιασπορά (Πίνακας 7.2).

Πίνακας 7.2. Τα φυσικοχημικά και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των MPOx νανοςυστημάτων σε διαφορετικά συστήματα διασποράς.

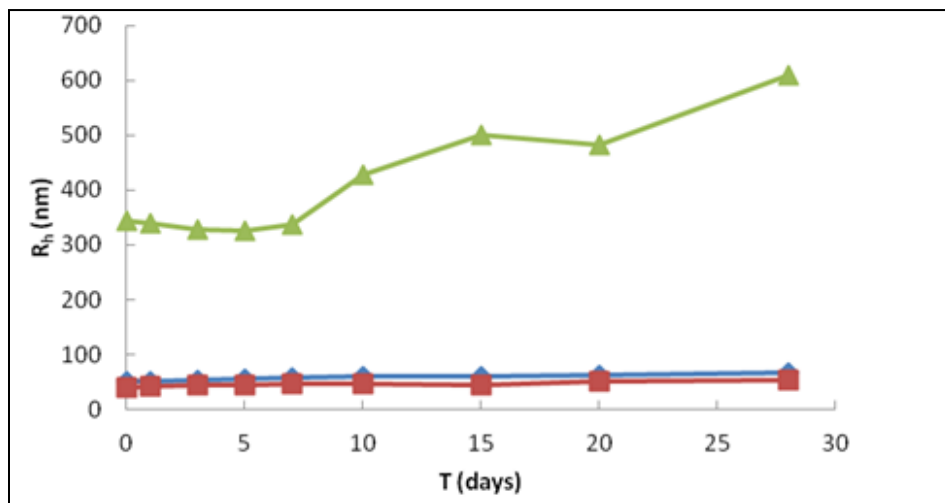
Δείγμα	Μέσο διασποράς	R_h (nm)	PD.I.	ζ-δυναμικό (mV)	d_f	R_g/R_h
MPOx-0	PBS	51.9	0.43	+5.1	(2.43)	0.74
MPOx-1	PBS	40.0	0.51	+2.1	(2.50)	0.81
MPOx-2	PBS	344.1	0.50	-17.1	2.49	0.84
MPOx-0	PBS-FBS 10%	354.3	0.49	-15.4	-	-
MPOx-1	PBS-FBS 10%	324.8	0.48	-12.8	-	-
MPOx-2	PBS-FBS 10%	482.9	0.60	-9.8	-	-

Από την άλλη πλευρά, θα πρέπει να σημειωθεί πως οι MPOx-2 νανοφορείς σε PBS παρουσίασαν τη μεγαλύτερη Rh από τους MPOx-0 και MPOx-1 νανοφορείς (Πίνακας 7.2), ενώ τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως παρουσιάζονται από το d_f , δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των παρασκευασθέντων νανοφορέων. Επιπρόσθετα, το ζ-δυναμικό των MPOx νανοφορέων παρουσίασε θετικές τιμές. Η φθορισμομετρία χρησιμοποιήθηκε για να εξαχθούν χρήσιμες πληροφορίες για το εσωτερικό μικροπεριβάλλον των MPOx βαθμιδωτών συμπολυμερικών νανοδομών. Στο PBS, ο λόγος I_1/I_3 βρέθηκε ίσος με 1.6 και 1.7 για τους MPOx-2 και MPOx-0 νανοφορείς, αντίστοιχα. Αυτές οι τιμές αποδεικνύουν ένα πολικό περιβάλλον στο εσωτερικό των συμπολυμερικών νανοφορέων.

Με βάση τα προαναφερθέντα αποτελέσματα, και λαμβάνοντας υπόψη τα μοριακά χαρακτηριστικά των βαθμιδωτών συμπολυμερών και το λόγο υδρόφοβου / υδρόφιλου τμήματος, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι τα δείγματα των MPOx-0 και -1 σχηματίζουν σφαιρικά παρά ανοιχτής δομής μικκύλια όπως είναι τα συσσωματώματα, όπως επίσης αποδεικνύεται από το πολικό μικροπεριβάλλον αυτών των νανοφορέων (Πίνακας 7.4). Η ασυμμετρία της δομής τους υποβοηθά αυτή την κατεύθυνση της αυτο-συναρμολόγησης στο διάλυμα. Το δείγμα του MPOx-2 πιθανότατα δημιουργεί σφαιρικά μικκύλια, καθώς το μεγάλο μέγεθος και ο λόγος R_g/R_h υποδεικνύουν. Η μεγάλη πολυδιασπορά των νανοδομών μπορεί να αποδοθεί στη βαθμιδωτή δομή των συμπολυμερών, η οποία δημιουργεί κάποιους χωρικούς περιορισμούς στη ρύθμιση των μακρομορίων σε καλύτερες καθορισμένες νανοδομές. Είναι επίσης ενδιαφέρον να αναφερθεί πως το συγκεκριμένο πρωτότυπο παρασκευής, μέσω του σχηματισμού λεπτού υμενίου που ακολουθείται από ενυδάτωση, συνήθως οδηγεί στην παρασκευή πολυμεροσωμάτων (και λιποσωμάτων από λιπίδια). Τα συγκεκριμένα βαθμιδωτά συμπολυμερή κατά συστάδες δε σχηματίζουν κυστίδια (με βάση τις προσδιορισμένες τιμές R_g/R_h για τα συσσωματώματα). Φαίνεται πως σε όλα τα παραπάνω συνεισφέρει και το PBS (το μέσο διασποράς), όπως συζητήθηκε προηγουμένως.

Η φυσική σταθερότητα σε βάθος χρόνου των πολυμερικών νανοφορέων μελετήθηκε με τη μέτρηση του μεγέθους και της κατανομή μεγέθους για μία χρονική περίοδο 28 ημερών. Τα συσσωματώματα του MPOx-2 βρέθηκαν να διατηρούν τα αρχικά φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά τουλάχιστον για τρεις εβδομάδες (Εικόνα 7.3)

στο διάλυμα του PBS, ενώ η R_h των MPOx-1 νανοσυστημάτων αυξήθηκε περίπου 20nm κατά τη διάρκεια ενός μήνα (Εικόνα 7.3).



Εικόνα 7.3. Μελέτες σταθερότητας των (a) MPOx-0 (μπλε γραμμή) (b) MPOx-1 (κόκκινη γραμμή) και (c) MPOx-2 (πράσινη γραμμή) νανοδομών σε PBS.

Η παρατηρούμενη κολλοειδής σταθερότητα υποδεικνύει πως η στερική άπωση είναι υπεύθυνη ώστε να αποφεύγεται η συσσωμάτωση των πολυμερικών φορέων, εξαιτίας των ελκτικών van der Waals αλληλεπιδράσεων, λόγω της έλλειψης ηλεκτροστατικής άπωσης, ειδικότερα για ου MPOx-1 νανοφορείς. Προφανώς, η κορώνα που σχηματίζεται από το υδρό φλο τμήμα 2-methyl-2-oxazoline των βαθμιδωτών συμπολυμερών σταθεροποιεί τις νανοδομές.

Είναι εξαιρετικής σημασίας να προσδιορίζονται οι φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοδομών στον βαθμιδωτών συμπολυμερών κατά συστάδες, ειδικότερα μέσα στο FBS εξαιτίας των αλληλεπιδράσεων με τις πρωτεΐνες το υ μέσο υ διασπο ράς αναμένεται να διαφοροποιήσει τα φυσικοχημικά/δομικά χαρακτηριστικά τους, και κατά αυτό τον τρόπο να επιδράσει στην σταθερότητα και στις ιδιότητες καθαυτης όταν χορηγηθεί στον ανθρώπινο οργανισμό. Μία αύξηση του μεγέθους (όπως ορίζεται από την R_h) εξαιτίας της συσσωμάτωσης των MPOx νανοσωματιδίων με τα συστατικά του ορού του πλάσματος στο βιολογικό μέσο παρατηρήθηκε (Πίνακας 7.2). Σχηματισμός μεγαλύτερου μεγέθους υπερμοριακών συσσωματωμάτων πραγματοποιήθηκε, προφανώς λόγω της οψωνινοποίησης (της προσρόφησης

πρωτεϊνών), το οποίο αποτελεί ένα κρίσιμο φαινόμενο για την αναγνώρισή τους από τα κύτταρα του συστήματος των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων, διότι ο σχηματισμός της «πρωτεϊνικής κορώνας» πάνω στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων που μπορεί να προκαλέσει ταχεία κάθαρση του φορέα από τη συστηματική κυκλοφορία. Η αύξηση του μεγέθους είναι λιγότερο σημαντική στην περίπτωση των MPOx-2 αυτό-συναρμολογούμενων δομών στο βιολογικό μέσο και αυτό μπορεί να υποδηλώσει μία διαφορά στη δομή των νανοσωματιδίων σε σύγκριση με αυτή των MPOx-0 και MPOx-1. Η παρουσία των συστατικών του πλάσματος προκαλεί μία μετατόπιση του ζ-δυναμικού σε περισσότερο αρνητικές τιμές, ειδικότερα για τα MPOx-0 και MPOx-1 νανοσωματίδια στο PBS-FBS 10%, επιβεβαιώνοντας την προσρόφηση των πρωτεϊνών στην επιφάνεια των νανο-αυτό-συναρμολογούμενων δομών. Όμως, το μέγεθος των σωματιδίων παραμένει στη νανομετρική κλίμακα και δεν παρατηρήθηκε καθίζηση.

7.1.2 Ενσωμάτωση IND στους MPOx νανοφορείς. Μελέτες σταθερότητας και αποδέσμευσης

Το υδρόφοβο φαρμακομόριο ινδομεθακίνη (IND) ενσωματώθηκε με επιτυχία στους νανοφορείς των βαθμιδωτών συμπολυμερών κατά συστάδες και οι ιδιότητες των μεικτών συσσωματωμάτων μελετήθηκαν σε σύγκριση με το κενό υψφορείς. Η χημική δομή, ο αμφίφιλος χαρακτήρας και η βιοσυμβατότητα του MPOx του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες καθιστούν τα βιοϋλικά αυτά ιδανικά για την ενσωμάτωση της IND, επειδή το αντιφλεγμονώδες φάρμακο αποτελείται από αρωματικούς δακτυλίους και περιέχει αμινομάδες όμοιες τα MPOx βαθμιδωτά συμπολυμερή κατά συστάδες (Εικόνα 7.1). Όπως παρουσιάζεται στο πειραματικό μέρος, η IND ενσωματώθηκε στους MPOx νανοφορείς σε δύο διαφορετικές αναλογίες (συμπολυμερές: IND= 9:1 και 9:2 μοριακός λόγος). Το μέγεθος, η κατανομή μεγέθους, οι τιμές του ζ-δυναμικού και της κλασματικής διάστασης των νανοφορέων μετά την ενσωμάτωση της IND παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Η ενσωμάτωση της IND σε χαμηλότερο μοριακό λόγο οδήγησε σε μία μείωση του μεγέθους των MPOx-0 και MPOx-1 νανοφορέων, εξαιτίας του γεγονότος ότι η υδροδυναμική ακτίνα των MPOx-1/-2:IND νανοσωματιδίων βρέθηκε ίση με 200 nm (Πίνακας 7.3) και αυτό υποδεικνύει ότι αυτό το λιπόφιλο φάρμακο μεταβάλλει τα

δομικά χαρακτηριστικά των μεικτών αυτό-συναρμολογούμενων δομών συμπολυμερούς/φαρμακομορίου, από την τροποποίηση της οργάνωσης των πολυμερικών συστατικών. Από την άλλη πλευρά, η ενσωμάτωση της IND οδήγησε σε αύξηση του μεγέθους των MPOx-2 νανοφορέων σε 9:1 μοριακό λόγο (Πίνακες 7.2 και 7.3).

Αυτό μπορεί να αποτλεί μία ένδειξη της αύξησης του ήδη υψηλού υδρόφιλου χαρακτήρα των MPOx-2 νανο-αυτοσυναρμολογούμενων δομών εξαιτίας των μορίων του υδρόφοβου φαρμάκου μέσα στο συσσωμάτωμα. Μία αναστροφή του ζ-δυναμικού σε θετικές τιμές παρατηρήθηκε για του MPOx-2 νανοφορείς (Πίνακες 7.2 και 7.3). Αντίθετα, οι MPOx-2 νανοφορείς μειώθηκαν σημαντικά όταν η IND ενσωματώθηκε σε μοριακό λόγο 9:2 (Πίνακες 7.2 και 7.3). Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των νανοφορέων μεταβλήθηκαν σημαντικά μετά την ενσωμάτωση της IND, όπως μπορεί να αποκαλυφθεί από τις τιμές d_f , οι οποίες υποδεικνύουν μία περισσότερο ανοικτή δομή για τους μεικτά συσσωματώματα συμπολυμερούς/φαρμάκου. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο μερικό αμφίφιλο χαρακτήρα της IND εξαιτίας της παρουσίας της καρβοξυλο-ομάδας $-\text{COOH}$. Τα πολυμερικά νανোসωματίδια που εμπεριέχουν IND έχουν επίσης χαμηλότερη πολυδιασπορά ($\text{PDI} \sim 0.33$). Η ενσωμάτωση του φαρμακομορίου εκτιμήθηκε στο 30% για τους MPOx-1/-2 και στο 20% για τους MPOx-0 νανοφορείς. Αυτή η διαφορά στο ποσοστό της ενσωμάτωσης θα πρέπει να συσχετισθεί με το υψηλότερο ποσοστό του υδρόφοβου συστατικού των MPOx-1/-2 βαθμιδωτών συμπολυμερών κατά συστάδες. Το ποσοστό ενσωμάτωσης αυξήθηκε σημαντικά για τους MPOx-1/-2 νανοφορείς στη μεγαλύτερη μοριακή αναλογία της IND (Πίνακας 7.3).

Πίνακας 7.3. Τα φυσικοχημικά και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά καθώς και το ποσοστό ενσωμάτωσης of MPOx:IND νανοσυστημάτων σε διαφορετικά συστήματα διασποράς.

Σύσταση	Μέσο διασποράς	R_h (nm)	PD.I.	d_f	R_g/R_h	ζ -δυναμικό (mV)	% Ποσοστό ενσωμάτωσης
MPOx-0:IND (9:1 μοριακός λόγος)	PBS	22.6	0.50	(1.94)	-	+4.2	20.1
MPOx-1:IND (9:1 μοριακός λόγος)	PBS	22.4	0.33	(1.87)	-	+2.6	29.2
MPOx-2:IND (9:1 μοριακός λόγος)	PBS	458.2	0.45	1.91	0.64	+9.1	27.8
MPOx-0:IND (9:2 μοριακός λόγος)	PBS	35.9	0.45	(2.04)	-	+2.2	24.8
MPOx-1:IND (9:2 μοριακός λόγος)	PBS	26.7	0.28	(2.29)	0.27	+2.4	32.9
MPOx-2:IND (9:2 μοριακός λόγος)	PBS	75.4	0.29	2.27	0.49	+7.2	41.2
MPOx-0:IND (9:1 μοριακός λόγος)	PBS-FBS 10%	291.3	0.41	-	-	-15.0	-
MPOx-1:IND (9:1 μοριακός λόγος)	PBS-FBS 10%	308.2	0.40	-	-	-14.8	-
MPOx-2:IND (9:1 μοριακός λόγος)	PBS-FBS 10%	605.2	0.62	-	-	-12.9	-
MPOx-0:IND (9:2 μοριακός λόγος)	PBS-FBS 10%	448.5	0.54	-	-	-12.0	-
MPOx-1:IND (9:2 μοριακός λόγος)	PBS-FBS 10%	196.2	0.58	-	-	-11.0	-
MPOx-2:IND (9:2 μοριακός λόγος)	PBS-FBS 10%	155.5	0.51	-	-	-7.2	-

Το μέγεθος των MPOx νανοφορέων στους οποίους έχει ενσωματωθεί η IND σε PBS-FBS 10% αυξήθηκε και το επιφανειακό τους φορτίο έγινε περισσότερο αρνητικό (Πίνακας 7.3,) δείχνοντας την ύπαρξη μίας σημαντικής αλληλεπίδρασης των νανοδομών με τις πρωτεΐνες του ορού του πλάσματος. Από την άλλη πλευρά, θα πρέπει να σημειωθεί ότι ένας μεγάλος αριθμός αναφορών ότι τα stealth νανοσωματίδια (δηλαδή των εμβολιασμένων με πολυμερή λιποσωμάτων) δεν

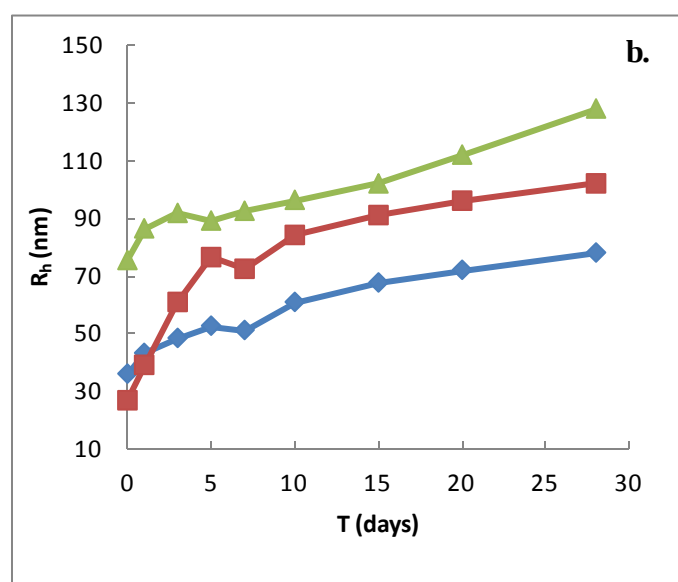
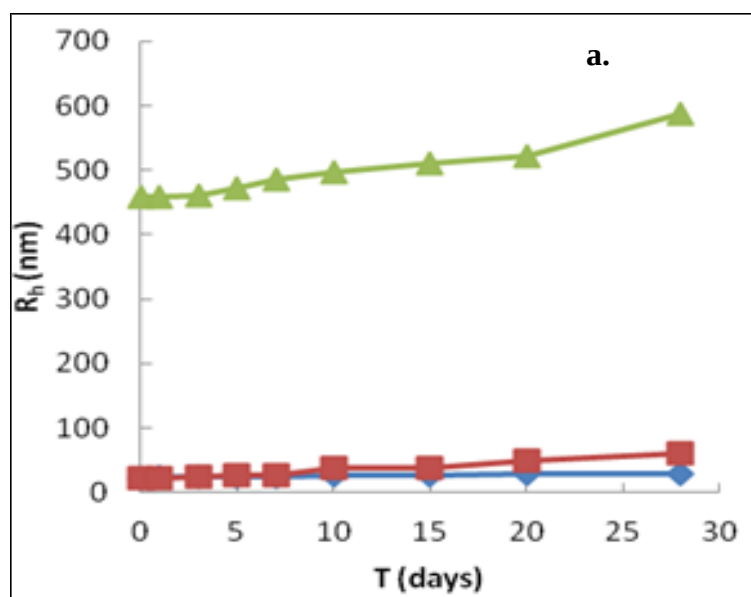
απο φύγο Ψ εξ ο λ κήρο υ τη φαγο ιπτάρωση και της αλληλεπιδράσεις με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Σε κάθε περίπτωση το μέγεθος των νανοσυστημάτων παραμένει στη νανομετρική κλίμακα. Αυτές υπερμοριακές νανοδομές δεν είναι φυσικο χημικά σταθερές σε βάθος χρόνου καθώς καθίζηση παρατηρήθηκε σε δύο ώρες, μετά τη διαλυτοποίηση των MPOx:IND νανοδομών σε δύο διαφορετικούς μοριακούς λόγους στο PBS-FBS 10% (Πίνακας 7.3).

Αλλαγές στη μικροπολικότητα αναμένονταν εξαιτίας της ενσωμάτωσης της IND, αλλά κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε. Οι τιμές I_1/I_3 έδειξαν πολύ μικρές διαφοροποιήσεις χωρίς να υπάρχει μία σαφής τάση στη μεταβολή των τιμών (Πίνακας 7.4).

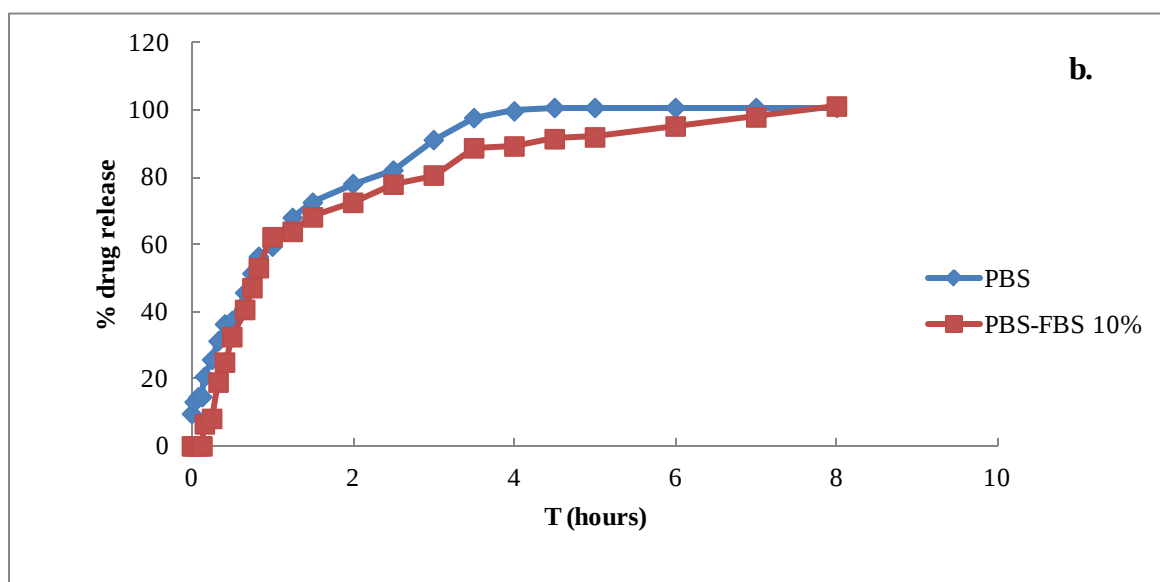
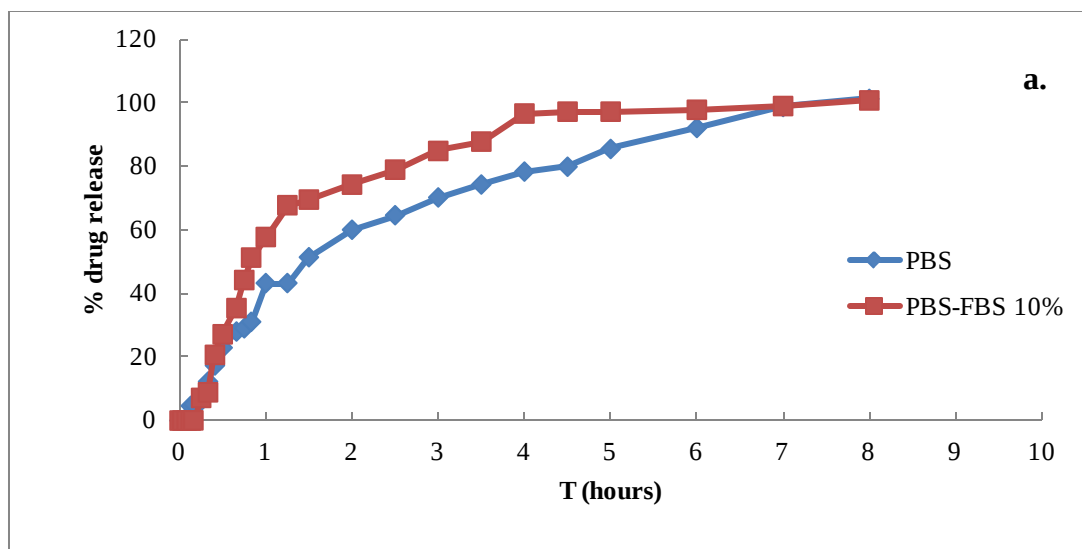
Πίνακας 7.4: Οι λόγοι της έντασης φθορισμού του πυρενίου I_1/I_3 (ένδειξη της μικροπολικότητας) και I_E/I_M (ένδειξη της μικρορευστότητας) των νανοδομών των βαθμιδωτών συμπολυμερών κατά συστάδες.

Σύσταση	I_1/I_3	I_E/I_M
MPOx-0	1.74	0.25
MPOx-1	1.78	0.16
MPOx-2	1.62	0.40
MPOx-0:IND (9:1 μοριακός λόγος)	1.75	0.04
MPOx-1:IND (9:1 μοριακός λόγος)	1.79	0.09
MPOx-2:IND (9:1 μοριακός λόγος)	1.56	0.76
MPOx-0:IND (9:2 μοριακός λόγος)	0.90	1.12
MPOx-1:IND (9:2 μοριακός λόγος)	1.66	0.08
MPOx-2:IND (9:2 μοριακός λόγος)	1.70	0.07

Η κολλοειδής σταθερότητα σε βάθος χρόνου των αρχικά σχηματιζόμενων νανοδομών με ενσωματωμένη την IND στο PBS επίσης μελετήθηκε. Γενικά, ο έλεγχος του μεγέθους και της κατανομής μεγέθους είναι μεγάλης σημασίας για τα παρασκευασθέντα νανοσυστήματα, εξαιτίας του γεγονότος ότι το μέγεθος των νανοσωματιδίων μπορεί να τροποποίηση τη βιολογική σταθερότητα, τη φαρμακοκινητική του ενσωματωμένου φαρμακομορίου και το μηχανισμό σύλληψης από τα μακροφάγα. Η φυσική σταθερότητα σε βάθος χρόνου για όλα τα νανοσυστήματα προοδίστηκε από τη μέτρηση του μεγέθους και της κατανομής μεγέθους για μία χρονική περίοδο 28 ημερών. Για όλα τα νανοσυστήματα βρέθηκε πως διατήρησαν τα αρχικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους (μέγεθος και κατανομή μεγέθους) το λιγότερο για μία βδομάδα μετά την παρασκευή τους (Εικόνα 7.4). Η ενσωμάτωση του μεγαλύτερου μοριακού λίγου της IND οδήγησε στη μείωση της φυσικοχημικής σταθερότητας των νανοφορέων (Εικόνα 7.4(b)).



Εικόνα 7. 4. Μελέτη σταθερότητας των (a) MPOx-0:IND (μπλε γραμμή) (b) MPOx-1:IND (κόκκινη γραμμή) και (c) MPOx-2:IND (μπλε γραμμή) **a.** 9:1 και **b.** 9:2 μοριακός λόγος των νανοδομών σε PBS.



Εικόνα 7.5. Αθροιστική αποδέσμευση του φαρμακομορίου από τους νανοφορείς σύστασης MPOx-2:IND **a.** 9:1 και **b.** 9:2 μοριακός λόγος στους 37°C σε PBS και σε PBS-FBS 10% (κάθε τιμή αναπαριστά το μέσο όρο $\pm$ S.D. των $n = 3$ ανεξάρτητων πειραμάτων).

Παρατηρήθηκε ότι η *in vitro* αποδέσμευση της IND από τους παρασκευασθέντες νανοφορείς σύστασης MPOx-2:IND (9:1 μοριακός λόγος) στο PBS είναι αρκετά αργή (Εικόνα 5(a)), ενώ για τους νανοφορείς MPOx-0/-1 η αποδέσμευση της IND είναι αρκετά ταχεία (σε λιγότερο από 5 και 15 λεπτά για τους μοριακούς λόγους 9:1 και 9:2, αντίστοιχα). Από την άλλη πλευρά, η *in vitro* αποδέσμευση της IND από τους παρασκευασθέντες νανοφορείς σύστασης MPOx-2:IND σε PBS-FBS 10% (στοιχεία 9:1 και 9:2 μοριακού λόγου) είναι γρηγορότερη σε σύγκριση με την

περίπτωση του υδατικού μέσου (Εικόνες 7.5(a) και (b)), πιθανότητα εξαιτίας των δομικών αλλαγών των πολυμερικών σωματιδίων που προκλήθηκαν από τη σύνδεση της αλβουμίνης. Θα πρέπει να σημειωθεί πως η *in vitro* αποδέσμευση της IND από τους παρασκευασθέντες νανοφορείς σύστασης MPOx-2:IND (9:2 μοριακός λόγος) είναι ταχύτερη σε σύγκριση με το υ νανο φο ρεύς σύστασης MPOx-2:IND με τη χαμηλότερη μοριακή αναλογία του φαρμακομορίου (Εικόνα 7.5). Αυτή η παρατήρηση υπο δικνύει πως τα διαφο ρτικά φυσικο χημικά και μο ρο λ ο γικά χαρακτηριστικά των νανοφορέων που σχηματίζονται από βαθμιδωτά συμπολυμερή κατά συστάδες κάτω από διαφορετικές συνθήκες επηρεάζουν σημαντικά την κινητική της απο δέσμευσης το υ ενσωματωμένο υ φαρμάκο υ Σύμφωνα με την πρό φρατη βιβλιογραφία, η οδηγούσα δύναμη για την αποδέσμευση ενός βιοδραστικού μορίου είναι η συγκέντρωση το υ βαθμιδωτο ύ συμπο λυμερο ύ κατά συστάδες. Η αποδέσμευση του φαρμακομορίου επηρεάζεται επίσης από τη σύσταση το υ συμπολυμερούς και το μέσο, στο οποία πραγματοποιείται η αποδέσμευση.

7.2 Συμπεράσματα

Νανοφορείς που παρασκευάστηκαν από αμφίφιλα βαθμιδωτά συμπολυμερή κατά συστάδες σύστασης poly(2-methyl-2-oxazoline)-grad-poly(2-phenyl-2-oxazoline) αναπτύχθηκαν στην παρο ύα μελέτη. Η φυσικο χημική συμπεριφο ρ των νανο φο ρών, καθώς και η ενσωμάτωση το υ φαρμακο μ ο υ καθώς και η αποδέσμευση του, βρέθηκαν να εξαρτώνται από τη μοριακή δομή του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες καθώς και του περιβάλλοντος μέσου διασποράς. Τα παρόντα αποτελέσματα διασαφηνίζουν αρκετά ζητήματα που αφορούν τις ιδιότητες της αυτό-συναρμο δ ησης των κενών συστημάτων, αλλά και αυτών πο υ ενσωμάτωσαν το υδρόφοβο φαρμακομόριο, και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κατευθυντήριες γραμμές για την παραγωγή καινοτόμων νανოსυστημάτων βασισμένων σε αυτά τα συμπολυμερή.

8 DPPC/poly(2-methyl-2-oxazoline)-grad-poly(2-phenyl-2-oxazoline) χημικές νανοδομές ως δυνητικοί νανομεταφορείς φαρμακομορίων.

8.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Η Φαρμακευτική Νανοτεχνολογία αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο διεπιστημονικό πεδίο, το οποίο καλύπτει θεματολογία από τα πεδία της Μοριακής Βιολογίας και τη Βιοχημείας, της επιστήμης των Κolloειδών Συστημάτων και της Ιατρικής (Mishra, et al., 2010). Όπως προαναφέρθηκε, τα λιποσώματα είναι σφαιρικά νανοσωματίδια βιολογικού ενδιαφέροντος, τα οποία αυθόρμητα δημιουργούν σφαιρικές νανοδομές που αποτελούνται από κυρτές λιπιδικές διπλοστοιβάδες, οι οποίες εγκλωβίζουν μέρος του διαλύτη στο εσωτερικό τους, και τα μεγέθη τους ποικίλουν από 20nm σε μερικά μm (Bangham et al., 1965; Gregoriadis et al., 1974). Μεταφορείς φαρμακομορίων που δημιουργούνται από το συνδυασμό λιποσωμάτων και πολυμερών, καθώς και δενδριμερών, είναι μία νέα κατηγορία σύνθετων ευμετάβλητων νανοδομών (complex soft nanostructures) και πρόσφατα έχουν χαρακτηριστεί ως Ρυθμιζόμενα Λιποσωματικά Συστήματα Ελεγχόμενης Αποδέσμευσης [Modulatory Liposomal Controlled Released Systems (MLCRSs)] (Papagiannaros et al., 2005; Gardikis et al., 2010). Αυτά τα καινοτόμα συστήματα μεταφοράς φαρμακομορίων μπορούν να χαρακτηριστούν ως χημικά νανοςυστήματα εξαιτίας του συνδυασμού των βιονανοϋλικών διαφορετικής χημείας και ιδιοτήτων και χρησιμοποιούνται για βιομιμητική μεταφορά φαρμακομορίων (biomimetic drug delivery) (Balmert and Little, 2012). Το ενδιαφέρον για αυτά τα συστήματα πηγάζει από τη δυνατότητα για βασική κατανόηση των βιολογικών προτύπων συμπεριφοράς, καθώς τα βιολογικά συστήματα χρησιμοποιούν εκτενώς μείγματα βιοϋλικών για να δημιουργήσουν πολύ-λειτουργικές αυτό-συναρμολογούμενες νανοδομές (multi-functional self-assembled nanostructures) (Pispas, 2011a,b).

Τα «αόρατα» λιποσώματα (stealth liposomes) παρασκευάζονται με την τροποποίηση της λιποσωματικής μεμβράνης μέσω της δημιουργίας ενός προϊόντος σύζευξης πολυμερούς-λιπιδίου, όπως αυτά που βασίζονται στην πολυαιθυλενογλυκόλη [polyethylene glycol (PEG)], και επηρεάζουν της φαρμακοκινητικές ιδιότητες του ενσωματωμένου φαρμακομορίου (Mufamadi et al., 2011). Αν και η πολυαιθυλενογλυκόλη έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την επιφανειακή τροποποίηση των λιποσωμάτων και για την προστασία από τη φαγοκυττάρωση αρκετών νανοφορέων, πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν πως η PEGυλίωση ανέστειλε σε

σημαντικό βαθμό την κυτταρική πρόσληψη και τη ενδοσωμική διαφυγή (cellular uptake and endosomal escape), το οποίο είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική απώλεια της δράσης του συστήματος μεταφοράς του φαρμακομορίου (Owens and Peppas, 2006; Ishida and Kiwada, 2008).

Μορφολογικά παράμετροι, όπως το σχήμα και η ελαστικότητα των νανοφορέων, ειδικότερα η αλληλεξάρτηση του μεγέθους και του σχήματος των σωματιδίων, επιδρούν στις βιολογικές και στις φαρμακοκινητικές ιδιότητες του νανοσωματιδίου (Champion et al., 2007; Canelas et al., 2009; Longmire et al., 2011; Liu et al., 2012). Η μορφολογία των πολυμερικών και των λιποσωμιακών νανοσυστημάτων έχει περιγραφεί από την Μορφοκλασματική Γεωμετρία (Lattuada et al., 2003a,b; Sabín et al., 2007a,b; Roldán-Vargas et al., 2008, 2009; Pippa et al., 2012a,b). Η μορφοκλασματική ανάλυση της μορφολογίας των νανοσωματιδίων μπορεί να προσδώσει επιπλέον πληροφορίες σχετικά με την κατανομή μεγέθους των σωματιδίων και αυτό θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως συμπληρωματική ανάλυση της αρχικής κατανομής μεγέθους των σωματιδίων (Kanniah et al., 2012). Επιπρόσθετα, η έννοια της Γεωμετρίας των Μορφοκλασματικών Συστημάτων έχει χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει την πολυπλοκότητα της ετερογενούς φύσης των διαδικασιών που υφίσταται το φαρμακομόριο στο ανθρώπινο σώμα καθώς και τη διάλυση των βιοδραστικών συστατικών και των φαρμακομορίων (Pereira, 2010; Dokoumetzidis and Macheras, 2011).

Από την άλλη πλευρά, αμφίφιλα συμπολυμερή έχουν μελετηθεί εκτενώς για βιοϊατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές που ποικίλουν από την παρατεταμένη αποδέσμευση φαρμακομορίων από πολυμερικές μήτρες ως την μίμηση βιολογικών μεμβρανών για την μεταφορά φαρμακομορίων (Rösler et al., 2001; Adams et al., 2003; Taubert et al., 2004; Xiong et al., 2011; Kataoka et al., 2012). Το κυριότερο πλεονέκτημα αυτών των συστημάτων είναι η δυνατότητα για έλεγχο του μεγέθους, της δομής και της μορφολογίας των νάνο-αυτό-συναρμολογούμενων δομών και ως εκ τούτου των κολλοειδών ιδιοτήτων του συστήματος σε διαφορετικά μέσα διασποράς, με τη βοήθεια μιας μεγάλης ποικιλίας παραμέτρων, όπως η χημική σύσταση, η συγκέντρωση και η θερμοκρασία (Pispas and Sarantopoulou, 2007; Pispas, 2011a,b; Pippa et al., 2012; Xiong et al., 2011; Kataoka et al., 2012). Μεικτά κυστίδια χαρακτηρίζονται ως αυτό-συναρμολογούμενες διπλοστοιβαδικές δομές με μοναδικές

ιδιότητες, όπως η τροποποίηση της πλάγιας διάχυσης των επιφανειοδραστικών/λιπιδίων (modulation of the lateral diffusivity of surfactants/lipids), της πλάγιας διάχυσης (lateral segregation), του σχηματισμού νανοπόρων και ερεθισμάτων που ανταποκρίνονται στη διάρρηξη της μεμβράνης (formation of nanopores or stimuli responsive disruption of the membrane) με δυναμική εφαρμογή στην προηγμένη έρευνα της φαρμακευτικής τεχνολογίας (Tribet and Vial, 2008; Antunes et al., 2009).

Τα συμπολυμερή κατά συστάδες έχουν βρει ευρεία εφαρμογή στην έρευνα που σχετίζεται με τη μεταφορά φαρμακομορίων (Amado et al., 2009; Xiong et al., 2011; Kataoka et al., 1993, 2012). Μολονότι τα Pluronics, που αποτελούνται από τμήματα πολυαιθυλενοξειδίου και πολυπροπυλενοξειδίου [poly(ethylene oxide) and poly(propylene oxide) blocks] είναι τα πιο ευρέως μελετημένα αμφίφιλα συμπολυμερή κατά συστάδες, οι πολυοξαζολίνες [poly(2-oxazoline)s] παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα για βιοϊατρικές εφαρμογές, ειδικότερα στις θεραπευτικές προεγγίσεις που βασίζονται στη μεταφορά φαρμακομορίων με πολυμερή (Adams and Schubert, 2007; Hoogenboom, 2009; Knop et al., 2010; Barz et al., 2011; Luxenhofer et al., 2012; Sedlacek et al., 2012). Επιπρόσθετα, οι πολυοξαζολίνες και τα συμπολυμερή τους έχουν χαρακτηριστεί ως βιο-εμπνευσμένα υλικά εξαιτίας της ψευδο πεπτιδικής φύσης του τμήματος της οξζολίνης, ενώ η poly(2-methyl-2-oxazoline) έχει προταθεί ως εναλλακτική προσέγγιση της PEGυλίωσης εξαιτίας της βιοσυμβατότητας και των stealth ιδιοτήτων αλλά και εξαιτίας της συμπεριφοράς της όσον αφορά την επιδιалύτωση και την αυτό-συναρμολογήσή της, που έχουν μελετηθεί εκτενώς (Hoogenboom et al., 2007, 2008a, Kempe et al., 2009; Schlaad et al., 2010; Barz et al., 2011; Dasa and Hong, 2011; Lambermont-Thijs et al., 2011). Επιπρόσθετα, πολυμερή της οικογένειας των πολυοξαζολινών, ως τροποποιητές της λιποσωμιακής επιφάνειας, είναι επαρκή για την εξασφάλιση της μακράς κυκλοφορίας και των stealth ιδιοτήτων για λιποσώματα, τα οποία χορηγούνται σε αρουραίους (Woodle et al., 1994; Zalipsky et al., 1996). Σύμφωνα με τον Hoogenboom και τους συνεργάτες του (2008b), η χρήση υδατικών μειγμάτων από αυτά τα βαθμιδωτά συμπολυμερή κατά συστάδες μπορούν να αξιοποιηθούν για την εφαρμογή τους για τη δημιουργία σκευασμάτων, εξαιτίας της χαμηλής τοξικότητάς τους αλλά και για τη δημιουργία πολυμερικών αισθητήρων. Μεικτές (χημικές) νανοδομές αποτελούμενες από συμπολυμερή κατά συστάδες και λιπίδια έχουν προσελκύσει το

ενδιαφέρον λόγω των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους και της αυτό-συναρμολογήσής τους, καθώς και ως νανομεταφορείς φαρμακομορίων (Pispas, 2011a,b).

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη καινοτόμων χημικών νανοσυστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων βασιζόμενα στην ταυτόχρονη συναρμολόγηση της dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and poly(2-methyl-2-oxazoline)-grad-poly(2-phenyl-2-oxazoline) (MPOx-1), σε διαφορετικούς μοριακούς λόγους.

(a)

(b)

Εικόνα 8.1. Χημικές δομές των (a) DPPC λιπιδίου και (b) του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες τύπου MPOx.

Αυτό το νανοςύστημα χαρακτηρίζεται ως χιμαιρικό (από τη Χίμαιρα ένα φανταστικό πλάσμα της αρχαίας ελληνικής μυθολογίας), εξαιτίας της διαφορετικής φύσης των βιοϋλικών που χρησιμοποιήθηκαν. Το αρχικό ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στον καθορισμό των φυσικοχημικών και δομικών χαρακτηριστικών των χιμαιρικών νανοδομών σε διαφορετικά μέσα διασποράς (νερό HPLC-καθαρότητας και ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών –PBS) και της εξάρτησης της κατανομής μεγέθους και της κλασματικής διάστασης από τη συγκέντρωση και τη θερμοκρασία για τα νανοςυστήματα σε υδατικά μέσα διασποράς. Επίσης, μελετήθηκαν οι χιμαιρικές νανοδομές που σχηματίστηκαν από την ενσωμάτωσης της IND, ως ένα παράδειγμα πως τα σχηματιζόμενα νανοςυστήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως νανομεταφορείς φαρμακομορίων. Πρόκειται από τις πρώτες αναφορές στη βιβλιογραφία που αφορούν την παρασκευή χιμαιρικών νανοςυστημάτων που αποτελούνται από DPPC και MPOx-1, όπου τα δύο συστατικά αυτό-συναρμολογούνται, οδηγώντας στο σχηματισμό χιμαιρικών νανοφορέων. Χρησιμοποιήθηκαν αρκετές *in situ* τεχνικές για το χαρακτηρισμό των νανοςυστημάτων όπως η Δυναμική, η Στατική και η Ηλεκτροφορητική σκέδαση του Φωτός ώστε να διασαφηνιστεί η μορφολογία και οι ιδιότητες των αυτό-συναρμολογούμενων χιμαιρικών νανοφορέων, σε συνδυασμό με τη φθορισμομετρία, σε μία προσπάθεια για να εξαχθούν πληροφορίες για την εσωτερική νανοδόμηση και το μικροπεριβάλλον των χιμαιρικών νανοδομών σε υδατικά μέσα διασποράς.

8.1.1 Φυσικοχημικός και Μορφολογικός Χαρακτηρισμός των χιμαιρικών νανοδομών.

Τα φυσικοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των DPPC:MPOx-1 χιμαιρικών νανοδομών (9:0.1, 9:0.5, 9:1, 9:2 και 9:3 μοριακοί λόγοι) σε νερό-HPLC καθαρότητας και σε PBS παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.1.

Πίνακας 8.1. Τα φυσικοχημικά και δομικά χαρακτηριστικά των χημικών DPPC:MPOx-1 νανοφορέων σε διαφορετικά μέσα διασποράς.

Δείγμα	Μέσο διασποράς	R _h (nm)	PD.I.	ζ-δυναμικό (mV)	d _f	R _g /R _h
DPPC liposomes	HPCL-grade water	62.5	0.61	1.0	2.5 ₁	0.99
DPPC:MPOx-1 (9:0.1)	HPCL-grade water	66.0	0.53	0.9	2.4 ₅	0.23
DPPC:MPOx-1 (9:0.5)	HPCL-grade water	60.4	0.60	2.5	2.3 ₈	0.21
DPPC:MPOx-1 (9:1)	HPCL-grade water	61.8	0.60	3.7	2.3 ₇	0.75
DPPC:MPOx-1 (9:2)	HPCL-grade water	50.3	0.49	1.1	2.0 ₈	0.93
DPPC:MPOx-1 (9:3)	HPCL-grade water	55.8	0.59	0.7	2.1 ₆	0.92
DPPC liposomes	PBS	95.9	0.70	0.7	2.5 ₅	1.24
DPPC:MPOx-1 (9:0.1)	PBS	55.3	0.59	0	2.4 ₁	0.68
DPPC:MPOx-1 (9:0.5)	PBS	61.6	0.63	0.9	2.3 ₁	0.19
DPPC:MPOx-1 (9:1)	PBS	75.4	0.68	1.5	2.4 ₅	0.71
DPPC:MPOx-1 (9:2)	PBS	54.0	0.51	-3.1	2.0 ₈	0.93
DPPC:MPOx-1 (9:3)	PBS	52.3	0.51	-3.5	2.0 ₈	0.93
DPPC:MPOx-1 (9:0.1)	PBS-FBS 10%	264.0	0.51	-11.7	(2.6 ₃)	-
DPPC:MPOx-1 (9:0.5)	PBS-FBS 10%	353.9	0.51	-9.2	(2.4 ₆)	-
DPPC:MPOx-1 (9:1)	PBS-FBS 10%	202.9	0.58	-9.9	(2.3 ₂)	-
DPPC:MPOx-1 (9:2)	PBS-FBS 10%	166.2	0.52	-11.5	(2.5 ₅)	-
DPPC:MPOx-1 (9:3)	PBS-FBS 10%	170.2	0.57	-10.6	(2.5 ₆)	-
DPPC:MPOx-1 (9:0.1)	FBS	721.5	0.52	-13.4	(2.6 ₇)	-
DPPC:MPOx-1 (9:0.5)	FBS	426.8	0.53	-13.1	(2.7 ₀)	-
DPPC:MPOx-1 (9:1)	FBS	457.7	0.54	-14.0	(2.6 ₃)	-
DPPC:MPOx-1 (9:2)	FBS	471.1	0.56	-11.2	(2.5 ₈)	-
DPPC:MPOx-1 (9:3)	FBS	593.9	0.56	-12.4	(2.5 ₇)	-

Θα πρέπει να σημειωθεί πως το PBS επιλέχθηκε ως μέσο διασποράς επειδή το pH και η ιονική του ισχύς προσομοιάζουν τις υδροδυναμικές συνθήκες του αίματος. Οι νανοδομές που σχηματίστηκαν από την ταυτόχρονη οργάνωση των DPPC λιπιδίων και του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες εμφανίζουν πολυδιάσπαρτη κατανομή μεγέθους. Νανοδομές που αποτελούνται από MPOx-1 και DPPC σε διαφορετικούς μοριακούς λόγους παρουσιάζουν παρόμοια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (μέγεθος και κατανομή μεγέθους, Πίνακας 8.1). Οι τιμές R_g/R_h επίσης υπολογιστήκαν. Στην παρούσα περίπτωση, οι τιμές R_g/R_h είναι κοντά στη μονάδα για τους χημικούς νανοφορείς σύστασης DPPC/MPOx-1, ειδικότερα για τους μοριακούς λόγους 9:2 και 9:3, και αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν μία πολύ καθορισμένη –σφαιρική δομή (μοιάζει με κυστίδιο) για τα αυτό-συναρμολογούμενα νανοδομές, στα δύο υδατικά μέσα διασποράς. Από την άλλη πλευρά, οι τιμές R_g/R_h υποδεικνύουν ανοιχτές δομές για τα DPPC/MPOx-1 χημικά υπερμοριακά συσσωματώματα στη χαμηλότερη αναλογία του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες, ενώ οι τιμές R_g/R_h για τα νανοδομές σύστασης DPPC:MPOx-1 (9:1 μοριακός λόγος) υποδεικνύουν μία σφαιρική μορφολογία. Μη κυστιδικής φύσης σφαιρικά συσσωματώματα λιπιδίου/βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες μπορούν να σχηματιστούν σε αυτή την περίπτωση.

Οι διαφορές στη δομή των DPPC:MPOx-1 χημικών νανοδομών σε νερό HPLC καθαρότητας και σε PBS θα πρέπει να αποδοθεί στην ενσωμάτωση των μεγάλων συμπολυμερικών αλυσίδων, οι οποίες έχουν βαθμιδωτή σύσταση και αποτελούνται από υδρόφιλα (MeOx: υδρόφιλο τμήμα) και υδρόφοβα (PhOx: υδρόφοβο τμήμα) τμήματα. Στερεοταξικές απαιτήσεις (Steric requirements) των συμπολυμερικών αλυσίδων καθώς και η αμφιφιλικότητα (amphiphilicity) είναι οι κυρίαρχοι παράγοντες που καθορίζουν τη δομή αυτών των χημικών νανοδομών. Λαμβάνοντας υπόψη τη μεγαλύτερη ιονική ισχύ του PBS, η οποία μπορεί να προκαλεί διαφορές στην επιδιαλύτωση των πολυμερικών αλυσίδων (όταν τα ιόντα είναι παρόντα στο διάλυμα). Μία άλλη παράμετρος η οποία θα πρέπει να εξεταστεί είναι οι δυνάμεις ενυδάτωσης, εξαιτίας των ιόντων του PBS, καθώς κατά ελάχιστο εν μέρει, ο συντονισμός αυτών των ιόντων με τις πολυμερικές αλυσίδες, κάτι που τις καθιστά περισσότερο υδρόφιλες, επηρεάζουν το πολυμερικό τμήμα που

«αγκιστρώνεται» στο τμήμα της λιπιδικής διπλοστοιβάδας της σχηματιζόμενης νανοδομής (Hoogenboom et al., 2005,2009; Milonaki et al., 2011).

Το ζ-δυναμικό είναι μία άλλη παράμετρος, η οποία δίνει μία ένδειξη που αφορά το επιφανειακό φορτίο των νανοσωματιδίων/νανο-αυτό συναρμολογούμενων δομών. Οι τιμές του ζ-δυναμικού των DPPC:MPOx-1 νανοδομών σε νερό HPLC καθαρότητας και σε PBS βρέθηκαν να είναι κοντά στο μηδέν, εξαιτίας της έλλειψης μόχμου φορτίου και στα δύο συστατικά και συνεπώς και στην επιφάνεια των χιμαιρικών νανοδομών (Πίνακας 8.1).

Επίσης, μελετήθηκε η μορφή των νανοδρών με βάση την κλασματική διάσταση (d_f), που προτίθεται με στατική σκέδαση φωτός. Αν και τα νανοσυστήματα που αναπτύχθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι πολυδιάσπαρτα όσον αφορά το μέγεθός τους, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε ακόμη αυτή την παράμετρο για να εξαγάγουμε πληροφορίες σχετικά με τις αλλαγές της μορφολογίας καθώς η πολυδιασπορά αναμένεται να επηρεάζει τις κλασματικές διαστάσεις αυτών των νανοσυστημάτων κατά παρόμοιο τρόπο (καθώς ο δείκτης πολυδιασποράς κυμαίνεται από 0.4-0.6). Οι τιμές d_f βρέθηκαν να είναι περίπου ίσες με 2.5 για τα συμβατικά DPPC λιποσώματα στα δύο υδατικά μέσα διασποράς. Μία μείωση των τιμών d_f παρατηρήθηκε για τις DPPC:MPOx-1 χιμαιρικές νανοδομές σε νερό HPLC καθαρότητας, ειδικότερα στους μοριακούς λόγους 9:2 και 9:3 (Πίνακας 8.1). Η μορφολογία των χιμαιρικών λιποσωμάτων σε νερό HPLC καθαρότητας και σε PBS παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση καθώς ο λόγος του MPOx-1 αυξάνεται (Πίνακας 8.1). Η κλασματική διάσταση (d_f) βρέθηκε κοντά στο 2 για τους DPPC:MPOx-1 νανοφορείς σε νερό HPLC καθαρότητας στην υψηλότερη συγκέντρωση του πολυμερικού συστατικού. Αυτή η παρατήρηση αποδεικνύει πως οι πολυμερικές αλυσίδες προκαλούν δομικές και μορφολογικές διαταράξεις όταν συμπεριλαμβάνονται τα λιπιδικά μείγματα που χρησιμοποιούνται για την Παρασκευή λιποσωματικών μεμβρανών. Η μοριακή αρχιτεκτονική του MPOx-1 βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για αυτή τη φαινομενολογία. Η βαθμιδωτή συμπολυμερική αλυσίδα αναμένεται να παρουσιάζει πολλαπλά σημεία εισόδου και εξόδου στη λιπιδική μεμβράνη, σε αντίθεση με τα παράγωγα λιπιδίου-υδρόφιλου πολυμερούς και των αμφίφιλων συμπολυμερών κατά

συστάδες, όπου του υδροφοβικό τμήμα ενσωματώνεται στην λιπιδική μεμβράνη και το υδρόφιλο τμήμα αγκιστρώνεται πάνω στη μεμβράνη (Σχήμα 8.1).



Σχήμα 8.1. Η βιομοριακή γλυπτική της DPPC/MPOx-1 χημικής μεμβράνης. (MeOx: μπλε, PhOx: πράσινο)

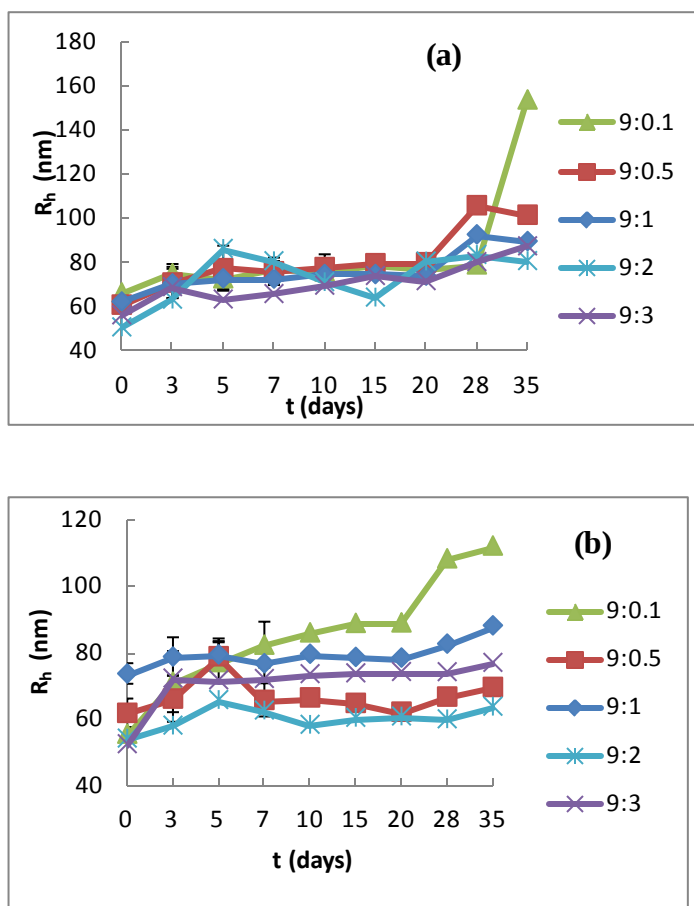
Στο Σχήμα 8.1, τα μόρια του MPOx-1 είναι αγκυροβολημένα και στην εσωτερική και στην εξωτερική επιφάνεια του λιποσώματος. Κατά τη γνώμη μας, το βαθμιδωτό συμπολυμερές κατά συστάδες, τα οποία είναι αγκυροβολημένα στην εξωτερική επιφάνεια του νανοφορέα, είναι υπεύθυνα για τη βιολογική σταθερότητα και τις ιδιότητες αποφυγής του ανοσοποιητικού συστήματος για τους παραγόμενους νανοφορείς. Υποστηρίζεται πως το βαθμιδωτό συμπολυμερές κατά συστάδες αγκυροβολείται στην εξωτερική επιφάνεια της νανοδομής καθώς αυτή η διαμόρφωση αποδεικνύει τη φυσικοχημική και βιολογική σταθερότητα των χημικών νανοδομών. Από την άλλη πλευρά, θα πρέπει να αναγνωριστεί ότι υπάρχει πλήθος δυνατών διαμορφώσεων. Τα μόρια MPOx-1 μπορούν να αγκυροβοληθούν και στην εσωτερική επιφάνεια. Αυτή η διευθέτηση της αλυσίδας του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες μπορεί να έχει πολλαπλές συνέπειες στη δομή και στις ιδιότητες της μεμβράνης αλλά και της χημικής νανοδομής στο σύνολό της, καθώς τα παρόντα αποτελέσματα αποδεικνύουν.

Είναι σημαντικό να χαρακτηρίζουμε τις φυσικοχημικές ιδιότητες των λιποσωμάτων αλλά και των υπολοίπων νανοδομών σε βιολογικά μέσα, όπως είναι το FBS, καθώς οι αλληλεπιδράσεις με τις πρωτεΐνες του μέσου αναμένεται να διαφοροποιήσουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοδομών, και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να επηρεάζεται η σταθερότητα και ιδιότητες καθαρισμού. Το μέγεθος των DPPC:MPOx-1 νανοφορέων σε PBS-FBS10% αυξήθηκε ειδικότερα στη χαμηλότερη συγκέντρωση του πολυμερικού συστατικού (Πίνακας 8.1). Αυτή η παρατήρηση αποδεικνύει ότι το MPOx-1 προσδίδει ιδιότητες που καθιστούν το νανοφορέα «αόρατο» από το ανοσοποιητικό σύστημα και σταθερότητα στη λιπιδική διπλοστοιβάδα, ειδικότερα

στην υψηλότερη αναλογία (Tribet and Vial, 2008; Antunes et al., 2009; Arnida, Janát-Amsbury et al., 2011). Το μέγεθος των DPPC:MPOx-1 νανοφορέων σε FBS αυξήθηκε σημαντικά και παρατηρήθηκε μετατόπιση του ζ-δυναμικού σε αρνητικές τιμές (Πίνακας 8.1), πιθανότατα λόγω της πρωτεϊνικής σύνδεσης, η οποία αλλάζει το μέγεθος των νανοσωματιδίων και των επιφανειακών του ιδιοτήτων (η κυριότερη πρωτεΐνη του FBS είναι η αλβουμίνη, η οποία φέρει αρνητικό φορτίο σε φυσιολογικές συνθήκες) (Kataoka et al., 1993). Όμως, παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για «αόρατους» από το ανοσοποιητικό σύστημα νανοφορείς, υποδεικνύοντας ότι μία αύξηση του μεγέθους πάντα λαμβάνει χώρα κάτω από ανάλογες πειραματικές συνθήκες (Tribet and Vial, 2008; Antunes et al., 2009). Από την άλλη πλευρά, μία αύξηση της κλασματικής διάστασης παρατηρήθηκε για τους DPPC:MPOx-1 χιμαιρικούς νανοφορείς σε FBS (Πίνακας 8.1), αντανακλώντας μία διαφοροποίηση της μορφολογίας των νανοδομών (αν και οι τιμές αυτές θα πρέπει να αξιολογούνται με ιδιαίτερη προσοχή δεδομένου ότι υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός διαφορετικών συστατικών στα ελαιώματα του FBS). Με βάση την παρατηρούμενη αύξηση του μεγέθους, το φαινόμενο της συσσωμάτωσης των αρχικών χιμαιρικών νανοδομών θα πρέπει να λαμβάνει χώρα, ως αποτέλεσμα της πρωτεϊνικής σύνδεσης. Επιπρόσθετα, θα πρέπει να σημειωθεί πως ένας μεγάλος αριθμός αναφορών υποδεικνύει ότι τα λιπώματα που έχον υποστεί πολυμερικό εμβολιασμό δεν αποφεύγουν εντελώς τη φαγοκυττάρωση από το Δικτυοενδοθηλιακό Σύστημα και τις αλληλεπιδράσεις με τις πρωτεΐνες του πλάσματος (Moghimi and Szebeni, 2003; Immordino et al., 2006). Η αλλαγή των τιμών της κλασματικής διάστασης αποδεικνύει το σχηματισμό περισσότερο συμπαγών σφαιρικής δομής λιπιδικών/ πολυμερικών/ πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων. Θα πρέπει να σημειωθεί πως εξαιτίας της έλλειψης φορτίου για τις DPPC:MPOx-1 χιμαιρικές νανοδομές, οι αλληλεπιδράσεις με την αλβουμίνη είναι κατά κύριο λόγο υδροφοβικές παρά ηλεκτροστατικής φύσης.

Η κolloειδής σταθερότητα σε βάθος χρόνου των αρχικών σχηματιζόμενων χιμαιρικών νανοδομών σε νερό HPLC καθαρότητας και σε PBS μελετήθηκε. Γενικά, ο έλεγχος του μεγέθους και της κατανομής μεγεθών είναι μεγάλης σημασίας για τα παρασκευασθέντα λιποσωμιακά ελαιώματα, διότι το μέγεθος του λιποσωμάτων μπορεί να ρυθμίσει τη βιολογική σταθερότητα, το ιδιότητες απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και κάθαρσης του εγκλωβισμένου φαρμάκου και το μηχανισμό ενσωμάτωσης από τα μακροφάγα κύτταρα (Kataoka et al., 1993; Amado

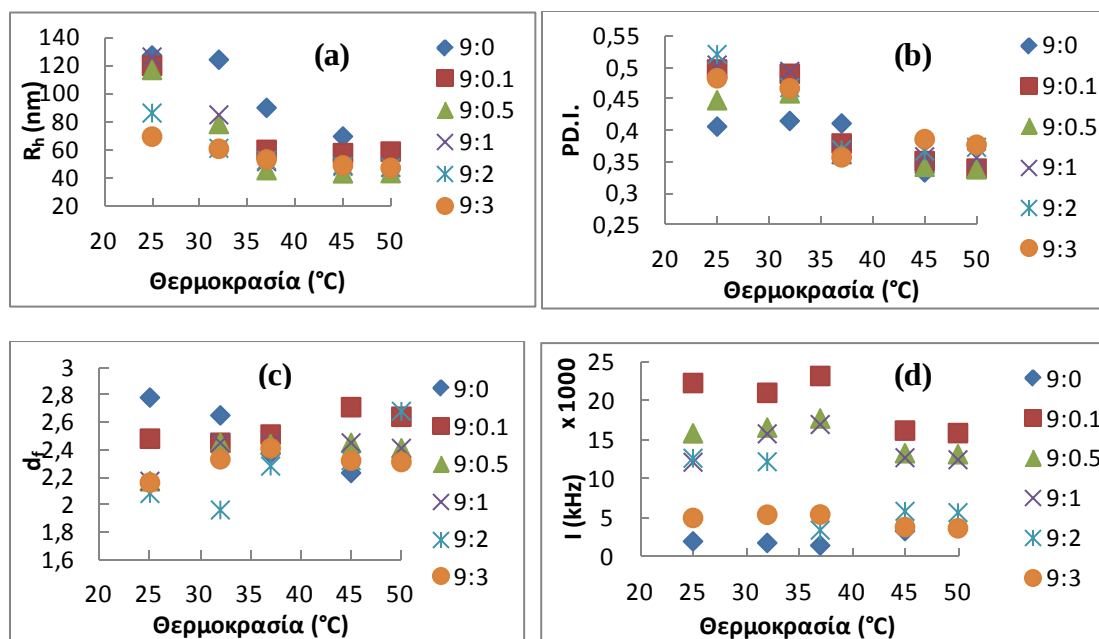
et al., 2009). Η φυσική σταθερότητα με την πάροδο του χρόνου για όλα τα χιμαιρικά συστήματα αξιολογήθηκε από τη μέτρηση του μεγέθους και της κατανομής μεγεθών για μία χρονική περίοδο 35 ημερών. Όλα τα χιμαιρικά συστήματα στο PBS, εκτός από το DPPC:MPOx-1 (9:0.1 μοριακός λόγος) βρέθηκε να διατηρεί τα αρχικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του (μέγεθος και κατανομή μεγέθους) το λιγότερο για δύο εβδομάδες μετά την παρασκευή τους (Εικόνα 8.2(b)). Αυτό υποδεικνύει την επίδραση του πολυμερικού συστατικού στη δομική σταθερότητα των χιμαιρικών νανοσυστημάτων σε φυσιολογικές συνθήκες. Η παρουσία αυξανόμενου ποσοστού MPOx-1 βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες σταθεροποιεί τη νανοδομή σε σύγκριση με τα DPPC λιποσώματα. Τα χιμαιρικά νανοσυστήματα σε νερό HPLC καθαρότητας βρέθηκαν να διατηρούν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους για μία εβδομάδα (Εικόνα 8.2(a)). Η παρατηρούμενη κολλοειδής σταθερότητα αποδεικνύει πως η στερική άπωση είναι η αιτία για την αποφυγή της συσσωμάτωσης λόγω των van der Waals ελκτικών αλληλεπιδράσεων, εξαιτίας της έλλειψης ηλεκτροστατικών απώσεων, όπως προ βέπεται από την κλασική DLVO θεωρία (Derjaguin and Landau, 1941). Αυτές οι παρατηρήσεις αποδεικνύουν ότι οι χιμαιρικές νανοδομές είναι επίσης στερεοχημικά σταθεροποιημένοι νανοφορείς, παρά τη διαφορετική μοριακή αρχιτεκτονική του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες σε σύγκριση με τα συνήθη χρησιμοποιούμενα συμπολυμερή κατά συστάδες και τα συμπλέγματα λιπιδίου πολυμερούς.



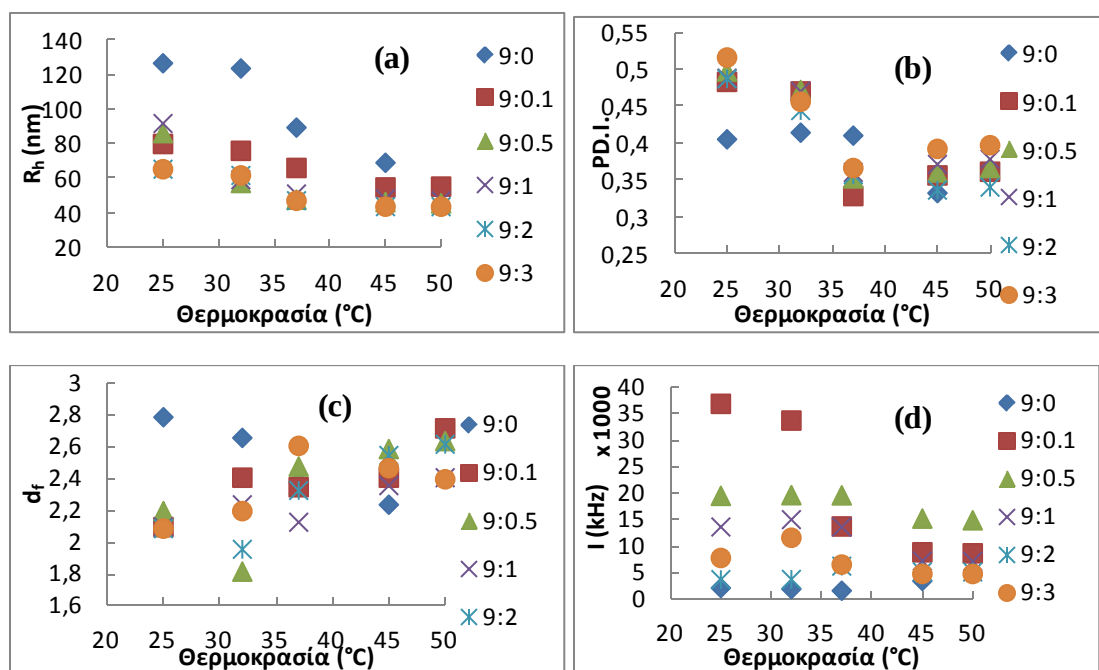
Εικόνα 8.2. Μελέτη σταθερότητας των χημικών νανοσυστημάτων σε (a) νερό HPLC καθαρότητας και σε (b) PBS.

8.1.2 Επίδραση της θερμοκρασίας στη μορφολογία των χημικών λιποσωμάτων.

Τα λιποσώματα που έχουν τροποποιηθεί με θερμοευαίσθητα πολυμερή (thermosensitive polymer-modified liposomes) θεωρούνται μία πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για τοποειδική μεταφορά φαρμάκων και βελτιώνουν τις ADME ιδιότητες και τις φαρμακοκινητικές παραμέτρους (Kono et al., 1999a,b; Kono, 2001). Λαμβάνοντας τα παραπάνω υπόψη, διερευνήσαμε την εξάρτηση των δομικών παραμέτρων των χημικών νανοφορέων από τη θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της θέρμανσης στα δύο υδατικά μέσα διασποράς (Εικόνες 8.3 και 8.4).



Εικόνα 8.3. (a) R_h , (b) PDI, (c) d_f και (d) I vs. της θερμοκρασίας για τους χημικούς νανοφορείς σε νερό HPLC καθαρότητας (η συγκέντρωση των χημικών νανοφορέων είναι σταθερή και ίση με 5×10^{-2} mg/ml).



Εικόνα 8.4. (a) R_h , (b) PDI, (c) d_f και (d) I vs. της θερμοκρασίας για τους χημικούς νανοφορείς σε PBS (η συγκέντρωση των χημικών νανοφορέων είναι σταθερή και ίση με 5×10^{-2} mg/ml).

Αυτοί οι τύποι των πειραμάτων προσομοιάζουν την ανταπόκριση των χιμαιρικών νανοφύλλων μετά την έγχυσή τους σε εμπύρετες καταστάσεις ή φλεγμαίνουσες περιοχές (αν και το θερμοκρασιακό εύρος που διερευνήθηκε είναι αρκετά μεγαλύτερο από τις φυσιολογικές συνθήκες του ανθρώπινου σώματος). Οι υδροδυναμικές ακτίνες των χιμαιρικών νανοσυστημάτων σε νερό HPLC καθαρότητας μειώθηκε κατά τη διάρκεια της θέρμανσης στους 50°C (επίσης μειώθηκε και η πολυδιασπορά) (Εικόνα 3b). Οι τιμές της κλασματικής διάστασης (d_f) αυξήθηκαν κατά τη διάρκεια της θέρμανσης μόνο για τους χιμαιρικούς νανοφορείς σύστασης DPPC:MPOx-1 (9:1 μοριακός λόγος). Οι R_h μειώθηκαν για τις χιμαιρικές νανοδομές στο PBS κατά τη διάρκεια της θέρμανσης στο 50°C (Εικόνα 8.4(a)), ενώ οι τιμές d_f μειώθηκαν (Εικόνα 8.4(c)). Στην υψηλή θερμοκρασία ο πληθυσμός των χιμαιρικών νανοφορέων έγινε επίσης περισσότερο ομοιογενής στο PBS (Εικόνα 4b). Η μάζα των χιμαιρικών νανοφορέων επίσης μειώθηκε στα δύο μέσα διασποράς (Εικόνες 8.3(d), 8.4(d)) στο θερμοκρασιακό εύρος 25-50°C, όπως υποδεικνύεται από τη μείωση των τιμών της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (η οποία είναι ανάλογη με τη μάζα των νανο-αυτό-συναρμολογούμενων δομών), ειδικότερα στο PBS.

Αντίθετα, για τα λιποσώματα DPPC, η R_h μειώθηκε σταδιακά στο θερμοκρασιακό εύρος 25-45°C (θερμοκρασία μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία της κύριας μετάβασης για τα DPPC λιπίδια, $T_m=41^\circ\text{C}$ για DPPC λιπίδια), ενώ η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από το λιποσωματικό εναιώρημα παρέμεινε ανεπηρέαστη και τα δύο υδατικά μέσα διασποράς (Εικόνες 8.3(d), 8.4(d)). Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει ότι οι χιμαιρικές νανοδομές διαφοροποιούν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους κάτω από συνθήκες αυξημένης θερμοκρασίας και αυτό μπορεί να θεωρηθεί ως απόδειξη πως οι νανοφορείς είναι θερμοαποκρινόμενοι (thermoresponsive). Η κύρια επίδραση της θερμοκρασίας φαίνεται να είναι η μείωση της μάζας των νανοφορέων, ίσως μέσω κάποιας αναδιάρθρωσης των νανοδομών. Αυτή η διαδικασία θα πρέπει να σχετίζεται με τη θερμοκρασία της κύριας μετάβασης των DPPC λιπιδίων, η οποία διαφοροποιείται λόγω της ύπαρξης των τμημάτων του πολυμερούς που βρίσκονται ενσωματωμένα μέσα στη λιπιδική διπλοστοιβάδα. Η μείωση της μάζας επίσης οδηγεί σε μία μείωση του μεγέθους. Η θέρμανση φαίνεται να έχει ως αποτέλεσμα περισσότερο συμπαγείς δομές όπως αποδεικνύει και η αύξηση του d_f .

8.1.3 Μικροπολικότητα και μικρορευστότητα των χημικών λιποσωμιακών μεμβρανών.

Η Φθορισμομετρία χρησιμοποιήθηκε σε μία προσπάθεια να εξάγουμε ποιοτικές πληροφορίες σχετικά με την εσωτερική νανοδόμηση και το μικροπεριβάλλον των χημικών λιπιδικών/ βαθμιδωτών συμπολυμερικών νανοφορέων σε νερό HPLC καθαρότητας και σε PBS. Οι μεταβολές που επέρχονται στις αμφίφιλες νανοδομές παρακολούθηθηκαν με μετρήσεις φθορισμομετρίας με ενσωματωμένο πυρένιο στα δύο υδατικά μέσα διασποράς. Το πυρένιο χρησιμοποιήθηκε ως υδρόφοβος ανιχνευτής, ο οποίος ενσωματώνεται στα υδρόφοβα μέρη των μικτών λιπιδικών / συμπολυμερικών νανοδομών. Η μικροπολικότητα των υδρόφοβων περιοχών των DPPC λιποσωμάτων επίσης προσδιορίστηκε για συγκριτικούς λόγους. Για τους DPPC:MPOx-1 χημικούς νανοφορείς η μικροπολικότητα δεν άλλαξε σημαντικά καθώς το συστατικό MPOx-1 αυξήθηκε στα νανοδομήματα, και για τα δύο υδατικά μέσα διασποράς (Πίνακας 8.2) Αυτό μπορεί να συσχετισθεί με τον τρόπο με τον οποίο τα τμήματα της φαίνυλο-οξολίνης (phenyloxazoline segments) ενσωματώνονται στις περιοχές των λιπιδικών ουρών, φαινόμενο το οποίο δημιουργεί μικρές αλλαγές στη μικροπολικότητα. Είναι ενδιαφέρον πως η μικροπολικότητα μειώνεται στα δύο μέσα διασποράς στους 50 °C (Πίνακας 8.2), πιθανώς επειδή οι νανοδομές γίνονται περισσότερο υδρόφοβες σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από την T_m των DPPC λιπιδίων (Shimouchi et al., 2011). Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει ότι οι μεικτές μεμβράνες (τουλάχιστον στην υψηλή συγκέντρωση του συστατικού MPOx-1) διαφοροποιούν τα χαρακτηριστικά του μικροπεριβάλλοντός τους κάτω από συνθήκες αυξημένης θερμοκρασίας.

Πίνακας 8.2. Οι λόγοι της έντασης φθορισμού του πυρενίου I_1/I_3 (ένδειξη της μικροπολικότητας) και I_E/I_M (ένδειξη της μικρορευστότητας) για τους DPPC:MPO_x-1 νανοφορείς.

Σύσταση	Θερμοκρασία	Νερό HPLC		PBS	
		I_1/I_3	I_{ex}/I_m	I_1/I_3	I_{ex}/I_m
DPPC:MPO _x -1 liposomes	25°C	1.36	0.76	1.35	0.36
DPPC:MPO _x -1 (9:0.1)	25°C	1.32	0.43	1.29	0.40
DPPC:MPO _x -1 (9:0.5)	25°C	1.34	0.42	1.36	0.25
DPPC:MPO _x -1 (9:1)	25°C	1.40	0.27	1.36	0.48
DPPC:MPO _x -1 (9:2)	25°C	1.36	0.04	1.38	0.07
DPPC:MPO _x -1 (9:3)	25°C	1.48	0.23	1.48	0.15
DPPC:MPO _x -1 (9:0.1)	50°C	1.11	0.64	1.12	0.54
DPPC:MPO _x -1 (9:0.5)	50°C	1.14	0.80	1.12	0.55
DPPC:MPO _x -1 (9:1)	50°C	1.19	0.63	1.19	0.87
DPPC:MPO _x -1 (9:2)	50°C	1.13	0.08	1.16	0.28
DPPC:MPO _x -1 (9:3)	50°C	1.28	0.64	1.22	0.39

Ο σχηματισμός excimers μειώνεται καθώς το συστατικό MPO_x-1 αυξάνεται στο νερό HPLC καθαρότητα, ενώ συγκεκριμένες τάσεις είναι δύσκολο να παρατηρηθούν στην περίπτωση των εναιωρημάτων στο PBS. Αυτή η φαινομενολογία μπορεί να αποδοθεί στη συγκέντρωση των μορίων του πυρενίου στις υδρόφους περιοχές κυρίως στα συστήματα με χαμηλή συγκέντρωση του συμπολυμερούς, και αυτή η συνάθροιση

αμβλύνεται με την παρουσία περισσότερων αλυσίδων MPOx-1 (το πυρένιο είναι καλύτερα διεσπαρμένο στα τελευταία αυτά συστήματα). Αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν τα αποτελέσματα της ενσωμάτωσης της συμπολυμερικής αλυσίδας στις διπλοστοιβάδες DPPC. Σε κάθε περίπτωση, η συνάθροιση πιθανότατα σχετίζεται με χωρικούς περιορισμούς (spatial constraints) ή εναλλακτικά, αποτελεί μία συνεπεία του μεγάλου ιξώδους εντός της διπλοστοιβάδας της χημικής μεμβράνης, ειδικότερα στην υψηλότερη θερμοκρασία και στο PBS.

Το P₃P είναι ένα ανιχνευτής με μεγαλύτερες μοριακές διαστάσεις σε σύγκριση με το πυρένιο, ευαίσθητο στο μικροϊξώδες των νανοδομών, αλλά αυτό μπορεί να ενσωματωθεί στις χημικές DPPC:MPOx-1 λιποσωματικές διπλοστοιβάδες, όπως αποδεικνύεται από το φάσμα που λήφθηκε. Η παρουσία μίας σημαντικής κορυφής excimer σε σύγκριση με την πρώτη κορυφή υποδεικνύει σημαντική εσωτερική κινητικότητα του ανιχνευτή στα υδρόφοβα μέρη των χημικών νανοφορέων. Η μικρορευστότητα είναι μεγαλύτερη στη χαμηλότερη συγκέντρωση του MPOx-1 (Πίνακας 8.3).

Σύσταση	Νερό HPLC	PBS
	I_{ex}/I_m	I_{ex}/I_m
DPPC:MPOx-1 (9:0.1)	0.75	0.99
DPPC:MPOx-1 (9:0.5)	0.17	0.32
DPPC:MPOx-1 (9:1)	0.19	0.19
DPPC:MPOx-1 (9:2)	0.10	0.21
DPPC:MPOx-1 (9:3)	0.25	0.13

Πίνακας 8.3. Ο λόγος της έντασης φθορισμού του P₃P I_E/I_M (ένδειξη της μικρορευστότητας) για τους DPPC:MPOx-1 νανοφορείς.

Αυτό σχετίζεται με το γεγονός ότι η ενσωμάτωση του MPOx-1 μέσα στη λιπιδική περιοχή θα διαταράξει τη διεύθυνση της οδού μέσα στη μεκτική διπλοσποϊβάδα, μέσω των απαιτήσεων για χωρική αναδιαμόρφωση της αλυσίδας του συμπολυμερούς. Τα αποτελέσματα από τη φθορισμομετρία που αναφέρθηκαν μέχρι στιγμής δείχνουν την ικανότητα των σχηματισμένων νανοδομών να φιλοξενήσουν υδρόφοβα συστατικά. Αυτή η παρατήρηση είναι σημαντική για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη aDDnSs για την ενσωμάτωση και τη μεταφορά υδρόφοβων φαρμακομορίων.

8.1.4 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των χιμαιρικών νανοδομών των χιμαιρικών νανοδομών με ενσωματωμένη IND.

Έχοντας μία λεπτομερή εικόνα σχετικά με τη συμπεριφορά της αυτό-συναρμολόγησης των διαφορετικών χιμαιρικών νανοφορέων στα υδατικά εναιωρήματα, αποφασίστηκε να μελετήσουμε τη δυνατότητα για ενσωμάτωση της IND στους DPPC:MPOx-1 χιμαιρικούς νανοφορείς για να βελτιώσουμε τη φαρμακοκινητική αυτού του αμφίφιλου φαρμακομορίου. Η IND ανήκει στα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα. Επιπρόσθετα, για την απαιτούμενη μείωση των ανεπιθύμητων ενεργειών των σκευασμάτων της IND, η ενσωμάτωση σε νανοφορείς, συμπεριλαμβανομένων των μικκυλίων και των λιποσωμάτων, φαίνεται να είναι μία ελκυστική προσέγγιση για τη Φαρμακευτική Νανοτεχνολογία, εξαιτίας των επιπτώσεων της μακροχρόνιας χρήσης των NSAIDs στη γαστρεντερική τοξικότητα (Milonaki et al., 2011; Sugihara et al., 2012).

Η IND, που ενσωματώθηκε στους χιμαιρικούς νανοφορείς, χρησιμοποιήθηκε ως ένα συστατικό-πρότυπο για τη διερεύνηση των διαφοροποιήσεων των ιδιοτήτων των χιμαιρικών νανοφορέων καθώς και της μορφολογίας τους, ως αποτέλεσμα της ενσωμάτωσης ενός αμφίφιλου φαρμακομορίου. Το μέγεθος και η κατανομή μεγεθών των χιμαιρικών νανοφορέων, οι τιμές του ζ-δυναμικού και της κλασματικής διάστασης μετά την ενσωμάτωση της IND παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.4.

Πίνακας 8.4. Φυσικοχημικά και δομικά χαρακτηριστικά των χημικών νανοφορέων σε διαφορετικά υδατικά μέσα διασποράς μετά την ενσωμάτωση της IND, καθώς και το ποσοστό ενσωμάτωσης του φαρμακομορίου.

Σύσταση	Μέσο διασποράς	R_h (nm)	PD.I.	d_f	ζ -δυναμικό (mV)	% Ποσοστό ενσωμάτωσης
DPPC:MPOx-1:IND (9:0.1:1)	HPLC-grade water	99.5	0.67	2.2 ₈	-0.4	13.2
DPPC:MPOx-1:IND (9:0.5:1)	HPLC-grade water	67.1	0.45	2.5 ₆	-0.2	13.7
DPPC:MPOx-1:IND (9:1:1)	HPLC-grade water	58.4	0.35	2.1 ₂	-8.5	8.3
DPPC:MPOx-1:IND (9:2:1)	HPLC-grade water	78.0	0.42	2.0 ₇	+0.1	7.6
DPPC:MPOx-1:IND (9:3:1)	HPLC-grade water	80.3	0.38	2.2 ₉	-1.1	13.6
DPPC:MPOx-1:IND (9:0.1:1)	PBS	205.4	0.55	2.3 ₈	+0.3	11.1
DPPC:MPOx-1:IND (9:0.5:1)	PBS	75.0	0.59	2.3 ₇	-3.1	18.7
DPPC:MPOx-1:IND (9:1:1)	PBS	60.4	0.52	2.2 ₆	-2.6	22.9
DPPC:MPOx-1:IND (9:2:1)	PBS	61.8	0.53	2.1 ₈	-1.0	13.8
DPPC:MPOx-1:IND (9:3:1)	PBS	65.5	0.48	2.4 ₇	-1.1	10.8

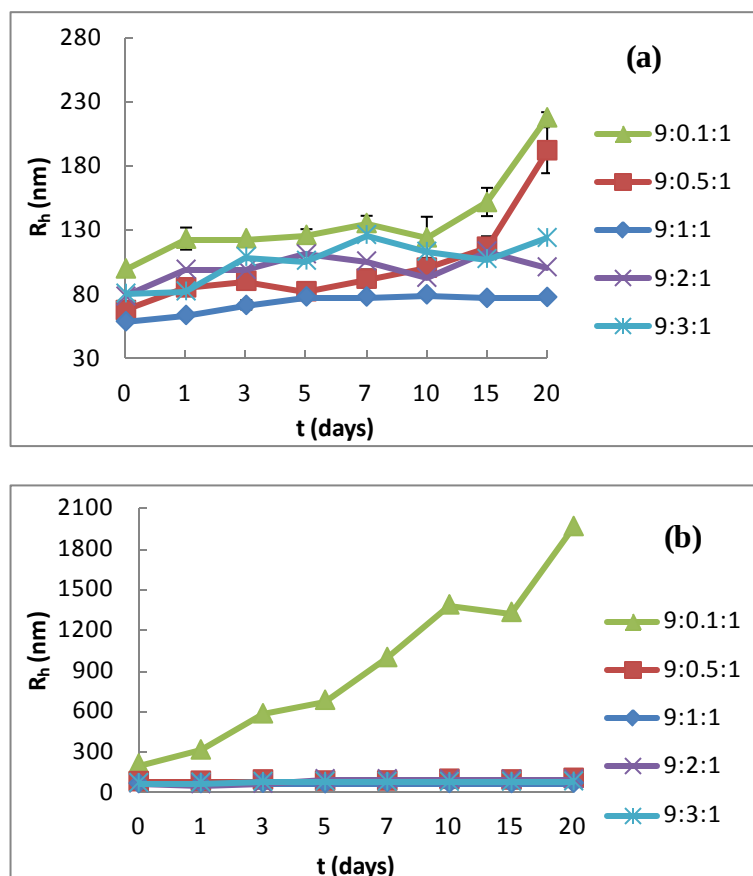
Η ενσωμάτωση της IND οδήγησε σε αύξηση του μεγέθους των χημικών νανοφορέων. Οι τιμές του ζ -δυναμικού δεν παρουσίασαν καμία σημαντική διαφοροποίηση μετά την ενσωμάτωση της IND (Πίνακας 8.4). Αντίθετα, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως αυτά περιγράφονται από τις τιμές d_f , των χημικών νανοφορέων παρουσιάζουν κάποιες αλλαγές μετά την ενσωμάτωση της IND, την περίπτωση των εναιωρημάτων του PBS και της υψηλότερης συγκέντρωσης του πολυμερικού συστατικού. Πιθανότατα εξαιτίας του αμφίφιλου χαρακτήρα της IND (λόγω των πολικών ομάδων στο φαρμακομόριο) διαφοροποιεί τη συμπεριφορά της φάσης της χημικής λιποσωματικής μεμβράνης. Οι παρούσες παρατηρήσεις παρέχουν κάποιες επιπρόσθετες πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ

χημικών νανοφορέων και IND όσον αφορά τη μορφολογία (Lúcio et al., 2008; Nunes et al., 2011).

Το ποσοστό ενσωμάτωσης ήταν περίπου μεταξύ 8 και 14% για τους χημικούς νανοφορείς σε νερό HPLC καθαρότητας και περίπου μεταξύ 11 και 23% στο PBS, αντίστοιχα (Πίνακας 8.4). Προφανώς, η ενσωμάτωση της IND στους χημικούς νανοφορείς αυξήθηκε στο PBS σε σύγκριση με το νερό HPLC καθαρότητας (Πίνακας 4). Για τους νανοφορείς DPPC:MPOx-1:IND 9:1:1 στο PBS το ποσοστό της ενσωμάτωσης φαίνεται να είναι μεγαλύτερο. Με βάση τις γνώσεις μας, είναι από τις πρώτες αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία ενσωμάτωσης της IND σε μεικτούς νανοφορείς που αποτελούνται από λιπίδια και βαθμιδωτά συμπολυμερή κατά συστάδες. Θα πρέπει να σημειωθεί πως η IND έχει μερικώς αμφιφιλικό χαρακτήρα και όπως όλα τα NSAIDs αλληλεπιδρά ισχυρά με τις βιολογικές μεμβράνες (Schlaad et al., 2010; Sedlacek et al., 2012). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, στο ουδέτερο pH του PBS, η IND είναι αρνητικά φορτισμένη και οι αρνητικά φορτισμένες ομάδες του φαρμακομορίου είναι αυτές που αλληλεπιδρούν μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων με τις θετικά φορτισμένες ομάδες της χολίνης του DPPC, η οποία πιθανότητα αλλάζει τον προσανατολισμό των λιπιδικών κεφαλών (Lúcio et al., 2008; Nunes et al., 2011). Αυτές οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις είναι η οδηγία δύναμη για τα αυξημένα ποσοστά ενσωμάτωσης της IND στο PBS. Τα NSAIDs δεν διεισδύουν βαθιά μέσα στη λιπιδική διπλοστοιβάδα, αλλά τοποθετούνται κοντά στην περιοχή των πολικών κεφαλών. Από την άλλη πλευρά, σε pH~5.5 (νερό HPLC καθαρότητας) συνεχίζει να τοποθετείται στην περιοχή κοντά στην πολική κεφαλή, αν και διεισδύει βαθύτερα σε σύγκριση με το ουδέτερο pH στο PBS (Lúcio et al., 2008; Nunes et al., 2011).

Η μελέτη σταθερότητας σε συνάρτηση με το χρόνο για όλα τα νανοςυστήματα στα οποία είχε ενσωματωθεί η IND πραγματοποιήθηκε από τη μέτρηση του μεγέθους του νανοφορέα καθώς και της κατανομής των μεγεθών για μία χρονική περίοδο ως 20 ημέρες. Όλα τα νανοςυστήματα στα οποία είχε ενσωματωθεί η IND μέσα στο νερό HPLC καθαρότητας βρέθηκαν να διατηρούν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους το λιγότερο για μία εβδομάδα (Εικόνα 8.5(a)). Αντίθετα, συσσωμάτωση των νανοφορέων παρατηρήθηκε για τα χημικά νανοςυστήματα σύστασης DPPC:MPOx-1 (9:0.1 μοριακός λόγος) που είχαν ενσωματώσει το φαρμακομόριο

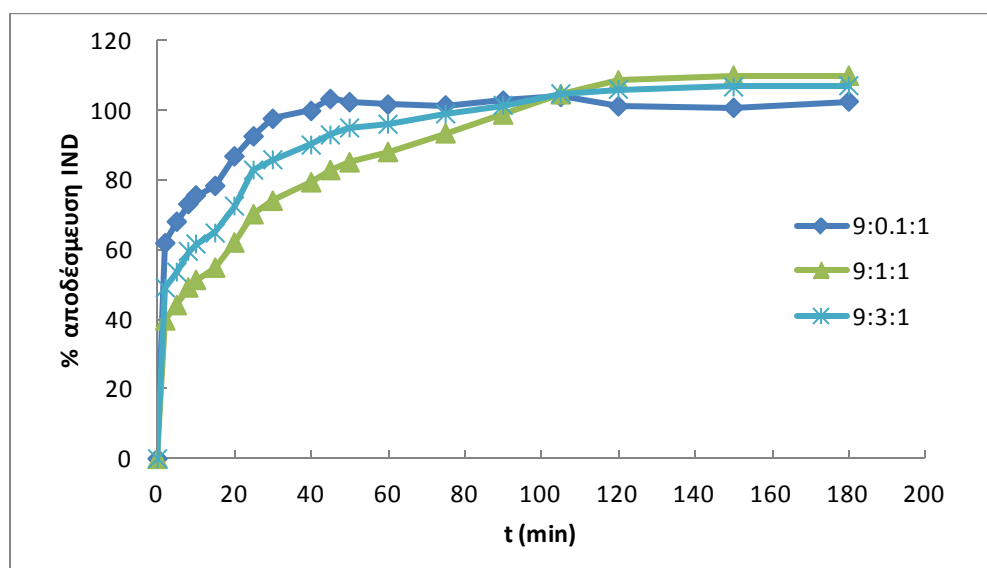
στο PBS (Εικόνα 8.5(a)). Συνολικά, το μέσο διασποράς και ο μοριακός λόγος του πολυμερικού συστατικού διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο για τη σταθερότητα των χημικών νανοσυστημάτων, νανοφορέων της IND. Τα χημικά νανοσυστήματα σύστασης DPPC:MPOx-1 φαίνεται να είναι αποτελεσματικοί νανοφορείς για την ενσωμάτωση της IND.



Εικόνα 8.5. Μελέτη σταθερότητας των χημικών νανοφορέων με ενσωματωμένη IND σε (a) νερό HPLC καθαρότητας και σε (b) PBS.

Η *in vitro* αποδέσμευση της IND από τους χημικούς νανοφορείς παρουσιάζεται στην Εικόνα 8.6. Παρατηρήθηκε πως η *in vitro* αποδέσμευση από τις παρασκευασθείσες χημικές νανοδομές είναι αρκετά ταχεία, ειδικά για τους μεικτούς νανοφορείς που παρασκευάστηκαν με το χαμηλότερο ποσοστό του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες (Εικόνα 8.6). Αυτή η φαινομενολογία θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως παράγοντας ελέγχου για την παρασκευή και ανάπτυξη χημικών νανοσυστημάτων με επιθυμητό ρυθμό αποδέσμευσης της IND, ο οποίος θα βελτιώνει το θεραπευτικό δείκτη της και θα μειώνει τις ανεπιθύμητες δράσεις της.

Σε αυτό τον ερευνητικό προσανατολισμό, ο συνδυασμός βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες με λιπίδια για την ανάπτυξη ενός καινοτόμου χημικού νανοφορέα εμφανίζεται πολλά υποσχόμενος, εξαιτίας του γεγονότος ότι το πολυμερές λειτουργεί ως ρυθμιστής της αποδέσμευσης της IND. Αν και ο ακριβής μηχανισμός της τροποποίησης της αποδέσμευσης είναι υπό διερεύνηση, οι παρούσες μελέτες ρίχνουν φως στις φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών αυτών των νανοσυστημάτων που αποτελούνται από διαφορετικά βιοϋλικά.



Εικόνα 8.6. Αθροιστική αποδέσμευση του φαρμακομορίου από τους νανοφορείς σύστασης DPPC:MPOx-1: IND 9:0.1:1, 9:1:1 και 9:3:1 μοριακός λόγος (κάθε τιμή αναπαριστά το μέσο όρο $\pm$ S.D. των $n = 3$ ανεξάρτητων πειραμάτων).

8.2 Συμπεράσματα

Χημικοί νανοφορείς που αποτελούνται από DPPC και MPOx-1 βαθμιδωτό συμπολυμερές κατά συστάδες παρασκευάστηκαν με επιτυχία σε υδατικά και βιολογικά μέσα. Η φυσικοχημική συμπεριφορά των χημικών νανοδομών βρέθηκε πως εξαρτάται από το μοριακό λόγο των συστατικών, τη θερμοκρασία και το μέσο διασποράς. Συμπεραίνεται ότι η ενσωμάτωση του MPOx-1 βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες μέσα στη λιπιδική περιοχή αυξάνει τη σταθερότητα των αρχικών λιποσωματικών κυστιδίων. Οι νανοφορείς που αποτελούνται από DPPC

και MPOx-1 παρουσίασαν παρόμοιο μέγεθος σε νερό HPLC καθαρότητας και σε PBS. Η μορφολογία των χιμαιρικών λιποσωμιακών νανοφορέων σε νερό HPLC καθαρότητας και σε PBS παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση καθώς ο μοριακός λόγος του MPOx-1 αυξάνεται. Οι τιμές d_f αυξήθηκαν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της θέρμανσης μόνο για τους χιμαιρικούς νανοφορείς σύστασης DPPC:MPOx-1 (9:1 μοριακός λόγος), ενώ οι R_h μειώθηκαν για τους χιμαιρικούς νανοφορείς στο PBS κατά τη διαδικασία της θέρμανσης στους 50°C. Η μικροπολικότητα των χιμαιρικών νανοδομών παρέμεινε ανεπηρέαστη με την αύξηση του συστατικού MPOx-1 και μειώθηκε στους 50°C στα δύο υδατικά μέσα διασποράς. Η ενσωμάτωση της IND επιτεύχθηκε σε αυτούς τους χιμαιρικούς νανοφορείς λόγω της διεύρυνσης της αναλογίας λιπιδίου/βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες και του μέσου διασποράς. Οι παρούσες μελέτες δείχνουν πως υφίσταται ένας σημαντικός αριθμός παραμέτρων, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ώστε να μεταβληθεί η δομή και οι ιδιότητες των chi-aDDnSs, γεγονός που αποτελεί πλεονέκτημα για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη «ευφυών» νανοφορέων για μεταφορά φαρμακομορίων. Τα προκύπτοντα αποτελέσματα υπογραμμίζουν την ύπαρξη ελέγχου της κολλοειδούς συμπεριφοράς και της μορφολογίας των χιμαιρικών νανοφορέων σε διαφορετικά μέσα διασποράς και συνθήκες.

9 DPPC:MPOx-2 χημικά καινοτόμα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων της Νανοτεχνολογίας: Φυσικοχημικός και δομικός χαρακτηρισμός, σταθερότητα και μελέτης αποδέσμευσης φαρμακομορίου.

9.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Η ευμετάβλητη νανοτεχνολογία (soft Nanotechnology) είναι ένας σχετικά νέος επιστημονικός και τεχνολογικός τομέας (Hamley, 2003; Nayak and Lyon, 2005; Whitesides and Lipomi, 2009). Η φαρμακευτική νανοτεχνολογία έχει επιφέρει μία πληθώρα νέων δυνατοτήτων στη βιοϊατρική ανακάλυψη και κλινική πρακτική εξαιτίας των φορέων της νανοκλίμακας, οι οποίοι έχουν φέρει «επανάσταση» στη μεταφορά φαρμακομορίων (Hughes, 2005; Ravichandran, 2009; Mishra et al., 2010; Souza et al., 2010). Η σημασία της νανοτεχνολογίας στη μεταφορά φαρμάκων βασίζεται στην ικανότητα διαχείρισης των ιδιοτήτων των υπερμοριακών αυτό-συναρμολογούμενων νανοδομών για να σχεδιαστούν και να παραχθούν νανοδομές με προγραμματισμένες λειτουργίες (Whitesides and Grzybowski, 2007).

Κατά τις τελευταίες δεκαετίες τα λιποσώματα έχουν αποδειχθεί ως οι αρχετυπικοί φορείς της νανοκλίμακας και αποτελούν τη περισσότερο μελετημένοι κατηγορία κολλοειδών νανοφορέων (Bangham et al., 1965; Gregoriadis et al., 1974). Από την άλλη πλευρά, τα πολυμεροσώματα είναι μία κατηγορία τεχνητών κυστιδίων τα οποία παρασκευάζονται από συμμετρικά αμφίφιλα συμπολυμερή κατά συστάδες. Τα πολυμεροσώματα διαθέτουν μεμβράνη πάχους 3-4nm και αποτελούνται από αμφίφιλα συμπολυμερή κατά συστάδες με σχετικά μεγάλο μοριακό βάρος (Discher and Eisenberg, 2002; Le Meins et al., 2011; Meng and Zhong, 2011; Lee and Feijen, 2012; Thompson et al., 2012). Από βιοφυσικής άποψης τα πολυμεροσώματα, όπως και τα λιποσώματα, μπορούν να θεωρηθούν ως ενδιαφέροντες μιμητές των κυτταρικών μεμβρανών (Le Meins et al., 2011). Η δομή τους, ως κλειστές διπλοστιβάδες είναι το πρώτο βήμα προς τη διαμερισματοποίηση (compartmentalization), η οποία είναι μία βασική αρχιτεκτονική απαίτηση για την αναπαραγωγή των φυσικών περιβαλλόντων των ζώντων κυττάρων. Το πιο ενδιαφέρον είναι πως οι μεμβρανικές πρωτεΐνες μπορούν να ενσωματωθούν σε αυτές τις βιομιμητικές μεμβράνες με μεθόδους ανασύστασης (reconstitution methods),

οδηγώντας στα επονομαζόμενα πρωτεοπολυμεροσώματα proteopolymersomes (Nallani et al., 2011).

Επιπρόθετα, η εφαρμογή των πολυμερών στην ιατρική ως συστατικών των νανοφορέων των φαρμακομορίων θεωρείται απαραίτητη για την παραγωγή και την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών σκευασμάτων εναντίον των νόσων του ανθρώπου. Αμφίφιλα συμπολυμερή κατά συστάδες και επιφανειοδραστικά που σχηματίζουν κυστίδια έχουν προσελκύσει μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια εξαιτίας της ενδιαφέρουσας συμπεριφοράς της αυτό-συναρμολόγησης σε υδατικά μέσα, η οποία έχει ως αποτέλεσμα μία πληθώρα νανοσυστημάτων με δυναμική στην χρήση τους στη μεταφορά φαρμακομορίων (Pispas and Sarantopoulou, 2007; Pispas 2011a,b). Το λιποπολυμερή (lipopolymers) αυτό-συναρμολογούνται σε βιοσυμβατές νανοδομές από πολυλειτουργικά βιοϋλικά τα οποία προσφέρουν δυναμικές και ελκυστικές εφαρμογές στη μεταφορά φαρμακομορίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων, στη νανοϊατρική και στη διαγνωστική, επίσης (Liu et al., 2007; Shi et al., 2010; Angelova et al., 2011). Τα αμφίφιλα συμπολυμερή κατά συστάδες είναι σε θέση να σχηματίσουν μία ποικιλία διαφορετικών νανοδομημένων μορφολογιών για φαρμακευτικές εφαρμογές (Letchford and Burn, 2007). Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει αποδείξει ότι είναι δυνατό να επιτευχθεί η προσρόφηση ή η διείδυση των συμπολυμερών κατά συστάδες στα προσχηματισμένα λιποσώματα ή στις αυτό-συναρμολογούμενες υπερδομές σε υδατικά μέσα (Stoenescu et al., 2004; Leiske et al., 2011; Nam et al., 2011). Οι αλληλεπιδράσεις και ο μηχανισμός παρεμβολής μεταξύ των λιπιδίων και των συμπολυμερών κατά συστάδες είναι ιδιάζουσας σημασίας εξαιτίας των φαρμακευτικών εφαρμογών (Firestone and Seifert, 2005; Ruyschaert et al., 2005; Amado et al., 2009; Antunes et al., 2009; Kita – Tokarczyk et al., 2009; Leiske et al., 2011; Nam et al., 2011).

Επιπλέον, ρυθμιζόμενα συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμακομορίων της νανοτεχνολογίας [Modulatory Controlled Release Drug Delivery nano Systems (MCRDDnSs)] θεωρούνται ως ο πλέον κατάλληλος αυτό-συναρμολογούμενος νανοφορέας οι οποίοι αποτελούνται από περισσότερα από ένα βιοϋλικά, όπως λιπίδια που παράγουν λιποσώματα και πολυμερή, δενδριμερή ή δενδριτικές δομές, η οποίες μπορούν να αναμειχθούν ώστε να παράξουν νέα και αποτελεσματικά συστήματα μεταφοράς φαρμακομορίων με μοναδικές βιοφυσικές ιδιότητες και ελεγχόμενο τρόπο αποδέσμευσης του φαρμακομορίου. Τέτοια aDDnSs με ρυθμιζόμενο τρόπο

αποδέσμευσης του φαρμακομορίου, μπορούν να χαρακτηριστούν ως καινοτόμα συστήματα μεταφοράς φαρμακομορίων της νανοτεχνολογίας και θα μπορούσαν να κατηγοριοποιηθούν ως υβριδικά ή χημικά με βάση τη φύση των υλικών που αναμειγνύονται και είναι η ίδια ή διαφορετική, αντίστοιχα (Demetzos, 2010a,b; Gardikis et al., 2011; Du et al., 2012; Kaditi et al., 2012). Αυτοί οι νανοφορείς μπορούν να χαρακτηριστούν και ως μεικτά νανোসυστήματα εξαιτίας του συνδυασμού των διαφορετικών στη φύση βιοϋλικών και χρησιμοποιούνται για βιομηχανική μεταφορά φαρμακομορίων. Το πιο ενδιαφέρον σε αυτά τα συστήματα πηγάζει από τις δυνατότητες για τη βασική κατανόηση των βιολογικών μοτίβων συμπεριφοράς, δεδομένου ότι τα βιολογικά συστήματα χρησιμοποιούν επίσης σε μεγάλο βαθμό μεικτά υλικά προκειμένου να δημιουργήσουν «ευφυείς» αυτό-συναρμολογούμενες νανοδομές (Demetzos, 2010a,b).

Αν και τα Pluronics, τα οποία αποτελούνται από τμήματα poly(ethylene oxide) και poly(propylene oxide) είναι τα πιο ευρέως μελετημένα αμφίφιλα συμπολυμερή κατά συστάδες, οι poly(2-oxazoline)s παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα για κλινικές εφαρμογές (Adams and Schubert, 2007; Hoogenboom, 2009; Knop et al., 2010; Barz et al., 2011). Επιπρόσθετα, οι poly(2-oxazoline)s και τα συμπολυμερή της χαρακτηρίζονται ως βιοαπνευσμένα υλικά λόγω της ψευδο πεπτιδικής φύσης των τμημάτων της οξαζολίνης, ενώ η poly(2-methyl-2-oxazoline) έχει προταθεί ως εναλλακτικό της PEG όσον αφορά την βιοσυμβατότητά της και τις stealth ιδιότητές της (Kempe et al., 2009; Schlaad et al., 2010; Barz et al., 2011; Lambermont-Thijs et al., 2011, Bauer et al. 2013). Ακόμη, τα πολυμερή της οικογένειας των poly(2-oxazoline), ως τροποποιητές της λιποσωματικής επιφανείας, είναι αποτελεσματικά να προσδώσουν ιδιότητες για μακράς κυκλοφορίας και αποφυγής του ανοσοποιητικού συστήματος σε λιπώματα που χορηγήθηκαν σε πειραματό ζώα (Woodle et al., 1994; Zalipsky et al., 1996).

Ο έλεγχος της μορφολογίας των νανοσωματιδίων είναι καίριας σημασίας για την αξιοποίηση της λειτουργικότητας και των ιδιοτήτων σε πολλές αναδυόμενες (Henry, 2005). Η μορφολογία των νανοσωματιδίων είναι κρίσιμος παράγοντας για τις βιολογικές αλληλεπιδράσεις, όπως είναι η πρωτεϊνική σύνδεση (Semple et al., 1998). Τα πολυμερή προκαλούν σημαντικές μορφολογικές διαταραχές όταν εισάγονται σε λιπιδικά μείγματα που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή λιποσωμάτων. Σύμφωνα με τη πρόσφατη βιβλιογραφία, ο διαχωρισμός περιχών στη διπλοσβάδα σε

περιοχές πλούσιες σε λιπίδια και σε περιοχές πλούσιες σε πολυμερή στο ίδιο κυστίδιο έχει πειραματικά αποδειχθεί ότι υφίσταται και αυτές οι μορφολογικές και δομικές διαφορές έχουν εξηγηθεί ως πιθανό αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των προαναφερθέντων αλληλεπιδράσεων μέσα στη μεικτή λιποσωματική μεμβράνη (Nam et al., 2011). Η μορφολογία και το σχήμα αυτών των συστημάτων σχετίζεται ευθέως με την κολλοειδή τους συμπεριφορά (Pippa et al. 2012a,b). Έγκυρες και επικυρωμένες διαδικασίες αξιολόγησης είναι σημαντικές για να ανιχνεύσουν και να ποσοτικοποιήσουν τα νανοφαρμακευτικά προϊόντα (nanopharmaceuticals), συστήματα μεταφοράς φαρμάκων ή βιοφαρμακευτικών προϊόντων, πως τα βιοφυσικά χαρακτηριστικά και η δομή μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητα των προϊόντων αυτών στην κλινική πράξη (Chen, 2008).

Ο σκοπός αυτής της μελέτης είναι ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη καινοτόμων χιμαιρικών συστημάτων μεταφοράς της νανοτεχνολογίας τα οποία αποτελούνται από DPPC και MPOx-2 (Το MPOx-2 διαθέτει μεγαλύτερο ποσοστό υδρόφοβου τμήματος σε σχέση με το MPOx-1) σε διαφορετικούς μοριακούς λόγους. Το αρχικό ενδιαφέρον εστιάστηκε στο καθορισμό των φυσικοχημικών και δομικών χαρακτηριστικών (όπως ζ-δυναμικό, δείκτης πολυδιασποράς, μέγεθος/σχήμα και μορφολογία) των παρασκευασθέντων χιμαιρικών νανοδομών που αποτελούνται από διαφορετικές αναλογίες DPPC:MPOx-2 σε PBS καθώς επίσης και της επίδρασης της θερμοκρασίας στο μέγεθος/σχήμα, στην κατανομή μεγέθους και στην κλασματική διάσταση. Μελετήθηκαν επίσης και οι χιμαιρικές νανοδομές μετά την ενσωμάτωσης της IND και η αποδέσμευση του φαρμακομορίου αυτού, η οποία συσχετίστηκε με τα δομικά χαρακτηριστικά των νανοφορέων.

(a)

(b)

(c)



Εικόνα 9.1. Χημικές δομές του (a) DPPC λιπιδίου και (b) του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες MPOx-2, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, (c) η μοριακή αρχιτεκτονική του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες MPOx-2.

9.1.1 Τα φυσικοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των DPPC:MPOx-2 χημικών νανοδομών

Τα φυσικοχημικά και δομικά χαρακτηριστικά των DPPC:MPOx-2 χημικών νανοδομών στο PBS παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.1. Θα πρέπει να σημειωθεί πως αυτό το PBS επιλέχθηκε ως υδατικό μέσω διότι το pH (~7.4) και η ιονική ισχύς του PBS προσομοιάζουν τις συνθήκες του ανθρώπινου σώματος. Οι νανοδομές που σχηματίζονται από το συνδυασμό των ιδιοτήτων της αυτό-συναρμολόγησης του λιπιδίου και του MPOx-2 βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες είναι πολυδιάσπαρτα όσον αφορά την κατανομή του μεγέθους τους. Οι νανοδομές στις οποίες έχει ενσωματωθεί το MPOx-2 και τα συμβατικά DPPC λιποσώματα δεν παρουσιάζουν τα ίδια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (μέγεθος και κατανομή μεγέθους) στο PBS (Πίνακας 9.1).

Πίνακας 9.1. Τα φυσικοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των χιμαιρικών νανοσυστημάτων DPPC:MPOx-2.

Σύσταση	R_h (nm)	PD.I.	ζ -δυναμικό (mV)	d_f
DPPC λιποσώματα	95.9±7.6	0.50±0.01	+0.7±0.1	2.55±0.1
DPPC:MPOx-2 (9:1 μοριακός λόγος)	96.6±7.9	0.59±0.02	+5.1±2.3	2.32±0.0
DPPC:MPOx-2 (8:2 μοριακός λόγος)	139.6±20.5	0.54±0.04	+8.7±1.6	2.45±0.1
DPPC:MPOx-2 (7:3 μοριακός λόγος)	152.9±6.2	0.52±0.05	+6.4±1.6	2.08±0.1
DPPC:MPOx-2 (6:4 μοριακός λόγος)	141.7±4.3	0.58±0.04	+2.8±1.2	2.17±0.1
DPPC:MPOx-2 (5:5 μοριακός λόγος)	116.2±2.1	0.47±0.02	-5.8±1.2	2.21±0.1
DPPC:MPOx-2 (4:6 μοριακός λόγος)	98.5±1.4	0.41±0.03	+2.7±1.4	2.27±0.1
DPPC:MPOx-2 (3:7 μοριακός λόγος)	127.4±8.1	0.52±0.05	-0.8±0.6	2.07±0.1
DPPC:MPOx-2 (2:8 μοριακός λόγος)	80.1±6.8	0.55±0.03	+10.9±2.1	2.28±0.1
DPPC:MPOx-2 (1:9 μοριακός λόγος)	270.2±11.7	0.50±0.02	+5.2±0.5	2.18±0.1
MPOx-2 πολυμεροσώματα	344.1±12.6	0.50±0.04	-17.1±1.4	2.49±0.1

Επιπρόσθετα, για την πλειονότητα των χιμαιρικών νανοφορέων, η ενσωμάτωση του MPOx-2 οδηγεί σε νανο-αυτο-συναρμολογούμενες δομές (που αποδίδονται προσωρινά ως μεικτά / χιμαιρικά κυστίδια) μεγαλύτερου μεγέθους στο PBS. Από την άλλη πλευρά, θα πρέπει να σημειωθεί πως το νανοςύστημα σύστασης DPPC:MPOx-2 (8:2 μοριακός λόγος) στο PBS παρουσιάζει την μικρότερη υδροδυναμική ακτίνα R_h σε σύγκριση με όλα τα παρασκευασθέντα νανοσυστήματα. Επιπλέον, οι χιμαιρικοί λιποσωματικοί νανοφορείς δεν έχουν σαφή τάση όσον αφορά την κατανομή του μεγέθους τους (Πίνακας 9.1). Τα δύο συστατικά που χρησιμοποιούνται στην παρούσα

μελέτη έχουν σημαντικές διαφορές όσον αφορά τα μοριακά βάρη τους, το λόγο υδρόφιλου/υδρόφοβου τμήματος, τις ιδιότητες αυτό-συναρμολόγησης και τα χαρακτηριστικά βιοσυμβατότητα / βιοαποικοδομησιμότητας. Αυτές οι διαφορές στη χημική δομή και στη λειτουργικότητα υποστηρίζω, κατά τη γνώμη μας, αυτή τη φαινομενολογία των αρκετά διαφορετικών φυσικοχημικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών για τα μεικτά νανοσυστήματα.

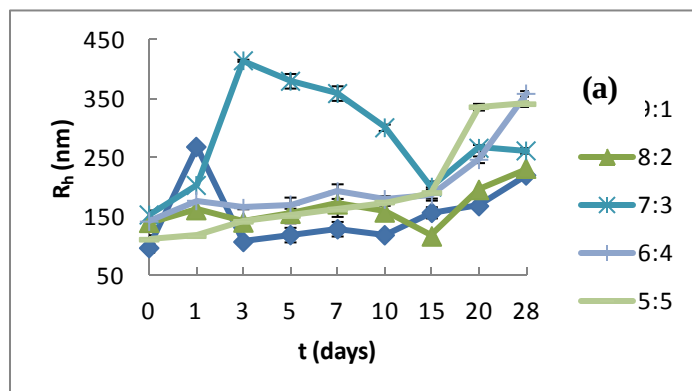
Το ζ-δυναμικό είναι μία άλλη σημαντική παράμετρος, η οποία δίνει μία ένδειξη όσον αφορά το φορτίο επιφανείας των λιποσωματικών νανοφορέων. Το ζ-δυναμικό των DPPC λιποσωμάτων βρέθηκε να είναι ίσο με το μηδέν, εξαιτίας της έλλειψης φορτίου στη λιποσωματική επιφάνεια. Οι δομικές και οι μορφολογικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της διαδικασίας σχηματισμού των χιμαιρικών νανοδομών είχε ως αποτέλεσμα μία πολύ μικρή αλλαγή στις τιμές του ζ-δυναμικού σε σύγκριση με το ζ-δυναμικό των συμβατικών DPPC λιποσωμάτων (Πίνακας 9.1), πιθανότητα εξαιτίας της ιδιότητας του ρυθμιστικού διαλύματος PBS, να «καλύπτει» το αποτελεσματικό φορτίο των νανοδομών (ιονική ισχύς $I=0.154M$). Αντίθετα, το ζ-δυναμικό των MPOx-2 κυστιδίων παρουσίασε τις πιο αρνητικές τιμές (Πίνακας 9.1).

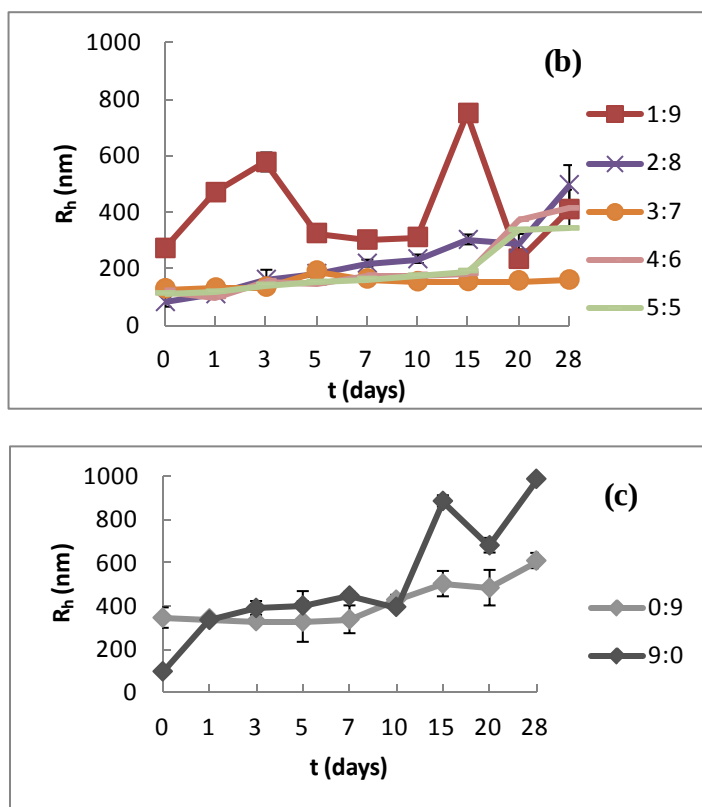
Η κλασματική διάσταση d_f (αναπαριστά μία παράμετρο για την ποσοτικοποίηση της μορφολογίας των νανοδομών) βρέθηκε ίση με 2.5 για τα συμβατικά λιποσώματα σύστασης DPPC και για τα MPOx-2 πολυμεροσώματα. Μία μείωση των τιμών d_f παρατηρήθηκε για τα χιμαιρικά λιποσώματα στο PBS, ειδικότερα στους μοριακούς λόγους 7:3 και 6:4 (Πίνακας 9.1). Η μορφολογία (d_f) των χιμαιρικών λιποσωματικών συστημάτων στο PBS παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση καθώς ο μοριακός λόγος του MPOx-2 άλλαξε (Πίνακας 9.1). Η κλασματική διάσταση (d_f) βρέθηκε να είναι ίση με 2 για το η DPPC:MPOx-2 νανοφορείς στο PBS στις υψηλότερες αναλογίες του πολυμερικού συστατικού (DPPC:MPOx-2 3:7 και 2:8 μοριακοί λόγοι). Αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν πως οι πολυμερικές αλυσίδες προκαλούν κάποιες μορφολογικές αναδιατάξεις όταν συμπεριλαμβάνονται στα λιπιδικά μείγματα που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή λιποσωμάτων (Firestone and Seifert, 2005; Li et al., 2012). Η βιομοριακή γλυπτική του MPOx-2 βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες διαδραματίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην προαναφερθείσα φαινομενολογία. Η βαθμιδωτή πολυμερική αλυσίδα αναμένεται να διαθέτει πολλαπλά σημεία εισόδου και εξόδου στη λιπιδική μεμβράνη, σε αντίθεση με τις συζεύξεις λιπιδίων-υδρόφιλων πολυμερών και των αμφίφιλων

συμπολυμερών κατά συστάδες, όπου το υδρόφοβο τμήμα ενσωματώνεται εντός της λιπιδικής μεμβράνης και η υδρόφιλη πολυμερική αλυσίδα αγκυροβολείται πάνω στη μεμβράνη (Σχήμα 9.1). Αυτή η διάταξη της βαθμιδωτής συμπολυμερικής αλυσίδας έχει πολλαπλές συνέπειες στη δομή και στις ιδιότητες της μεμβράνης αυτής καθεαυτής αλλά και ο ρόλος της χημικής νανοδομής, όπως δείχνουν τα προαναφερθέντα αποτελέσματα. Στο Σχήμα 9.1, τα μόρια του MPOx-2 απεικονίζονται να είναι αγκυροβολημένα στην εξωτερική επιφάνεια του χημικού νανοφορέα. Το πιο πιθανό είναι πως οι πολυμερικές αλυσίδες μπορούν επίσης να αγκυροβοληθούν και στην εσωτερική επιφάνεια. Κατά τη γνώμη μας, τα μόρια του MPOx-2, τα οποία είναι αγκυροβολημένα στην εξωτερική επιφάνεια των νανοφορέων, είναι υπεύθυνα για τη στερική σταθεροποίηση των παρασκευασθέντων νανοφορέων καθώς και για τις αλληλεπιδράσεις τους με το περιβάλλον.

Σχήμα 9.1. Η βιομοριακή γλυπτική της DPPC/MPOx-2 χημικής μεμβράνης. (MeOx:πρασινό, PhOx: κίτρινο)

Η φυσική σταθερότητα σε βάθος χρόνου για όλα τα χημικά νανοσυστήματα εκτιμήθηκε με τη μέτρηση του μεγέθους και της κατανομής μεγέθους για χρονική περίοδο 28 ημερών. Όλα τα χημικά νανοσυστήματα στο PBS, εκτός από το DPPC:MPOx-2 (9:1 και 1:9 μοριακό λόγο) βρέθηκαν να διατηρούν τα αρχικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους (μέγεθος και κατανομή μεγέθους) κατά ελάχιστο για δύο εβδομάδες μετά την παρασκευή τους (Εικόνα 9.2(a) και (b)).





Εικόνα 9.2. Μελέτη σταθερότητας (a) των DPPC:MPOx-2 νανοσυστημάτων και (b), των DPPC λιποσωμάτων και των MPOx-2 πολυμεροσωμάτων σε PBS (c). Μέσο όρος τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, SD<10%.

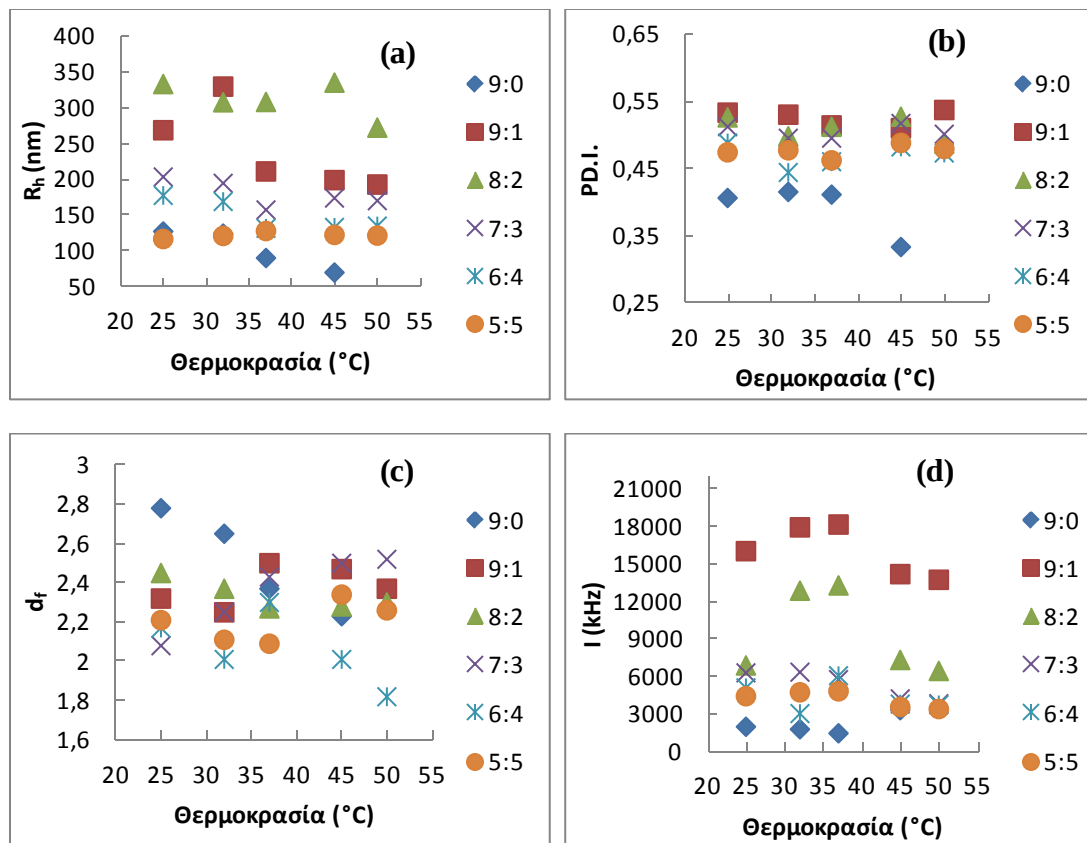
Αυτό είναι μία ένδειξη της επίπτωσης του βαθμιδωτού ή συμπολυμερούς κατά συστάδες στις χιμαιρικές νανοδομές σε φυσικές συνθήκες. Η παρουσία αυξημένων ποσοτήτων του MPOx-2 συμπολυμερούς κατά συστάδες σταθεροποιεί τις αυτό-συναρμολογούμενες δομές σε μεγαλύτερο βαθμό σε σύγκριση με τα συμβατικά DPPC λιποσώματα. Η παρατηρούμενη κolloειδής σταθερότητα υποδεικνύει ότι οι στερικές απώσεις θα πρέπει να είναι υπεύθυνες για να διατηρούν τους χιμαιρικούς νανοφορείς σε απαιώρηση, αποφεύγοντας τις ελκτικές δυνάμεις van der Waals, εξαιτίας της απουσίας των ηλεκτροστατικών απώσεων, οι οποίες προβλέπονται από την κλασική DLVO θεωρία (Derjaguin and Landau, 1941; Verwey and Overbeek, 1948). Αυτές οι παρατηρήσεις αποτελούν ένδειξη ότι οι χιμαιρικές νανοδομές είναι στερεοχημικά σταθεροποιημένοι νανοφορείς, παρά της διαφορετικής μοριακής αρχιτεκτονικής του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες σε σύγκριση με τις συζεύξεις λιπιδίου – πολυμερούς και των αμφίφιλων συμπολυμερών κατά συστάδες. Σύσσωμάτωση των συμβατικών DPPC λιποσωμάτων παρατηρήθηκε εξαιτίας του

γεγονότος ότι τα λιποσωμιακά εναιωρήματα δεν είναι θερμοδυναμικά σταθερά, ενώ τα MPOx-2 πολυμεροσώματα βρέθηκαν να διατηρούν τα αρχικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους κατά ελάχιστο για τρεις εβδομάδες (Εικόνα 9.1(c)). Στην περίπτωση των πολυμεροσωμάτων, η μορφή μάζα και η πολυδιασπορά του υδρόφιλου τμήματος διαδραματίζει εξέχοντα ρόλο στο μέγεθος και την κατανομή μεγεθών του κυστιδίου (Lee and Feijen, 2012). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, έχει αποδειχθεί πως η ενέργεια της κυρτότητας των κυστιδίων (curvature energy of the vesicles) μειώνεται με το διαχωρισμό των υδρόφιλων αλυσίδων, η εσωτερική επιφάνεια εμπλουτίζεται με τις μικρότερες σε μήκος αλυσίδες, ενώ η εξωτερική εμπλουτίζεται με τις μεγαλύτερες σε μήκος (Le Meins et al., 2011).

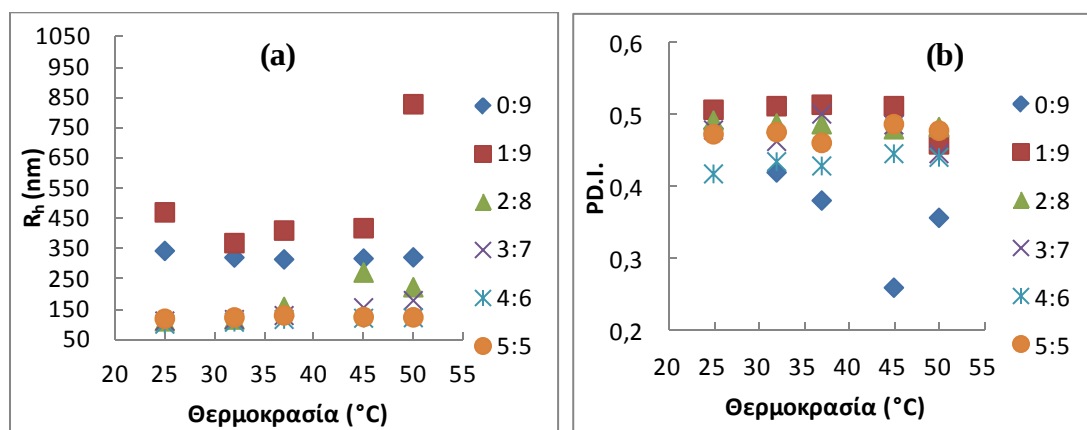
9.1.2 DPPC:MPOx-2 χημικά νανοσυστήματα ως θερμοαποκρινόμενες νανοδομές

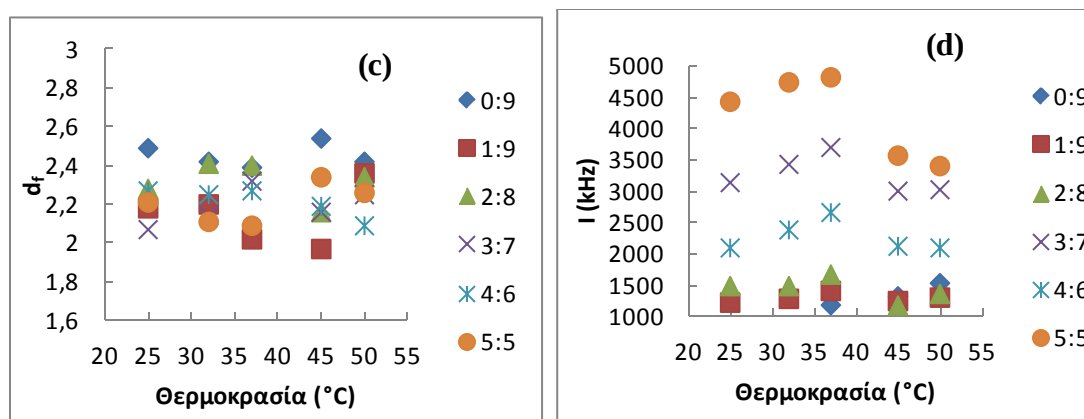
Οι φυσικές και οχημικές ιδιότητες κάποιων μεμβρανών των πολυμεροσωμάτων μεταβάλλονται ως απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα (Amstad et al., 2012). Διάφορα πολυμερή, τα οποία αποκρίνονται στο pH, στη θερμοκρασία, στις συνθήκες οξειδοαναγωγής, στο φως, στην ύπαρξη μαγνητικού πεδίου, στην ιονική ισχύ και στη συγκέντρωση της γλυκόζης έχουν χρησιμοποιηθεί ώστε να σχηματίσουν πολυμεροσώματα για προγραμματισμένη μεταφορά φαρμακομορίων (Amstad et al., 2012). Πολυμερή τα οποία είναι ευαίσθητα σε αρκετά ερεθίσματα (όπως θερμοκρασία, pH κ.ά.) μπορούν να εγκλείσουν φαρμακομόρια ή πρωτεΐνες στα πολυμεροσώματα και αυτό μπορεί να αλλάξει τη μορφολογία του εσωτερικού των πολυμεροσωμάτων (Li et al., 2012; Marguet et al., 2012). Θερμοαποκρινόμενα λιποσώματα που έχουν τροποποιηθεί με πολυμερή (thermoresponsive polymer-modified liposomes) καθώς και θερμοαποκρινόμενα πολυμεροσώματα (thermoresponsive polymersomes) θεωρούνται μία πολλά υποσχόμενη προσέγγιση τοποκατευθυνόμενη μεταφορά φαρμακομορίων (site-specific delivery of drugs) και διεγερμένη αποδέσμευση του φαρμακομορίου (triggered drug release) (Kono et al., 1999a,b, 2001; Amstad et al., 2012). Λαμβάνοντας τα παραπάνω υπόψη, διερευνήσαμε τη θερμοκρασιακή εξάρτηση των δομικών παραμέτρων των χημικών νανοφορέων στη διαδικασία της θέρμανσης (Εικόνες 9.3 και 9.4). Αυτά τα πειράματα προσομοιάζουν την απόκριση των χημικών νανοφορέων μετά τη χορήγησή τους σε

εμπύρετες καταστάσεις ή σε φλεγμαίνουσες περιοχές, αν και το θερμοκρασιακό εύρος το οποίο μελετήθηκε ήταν αρκετά ευρύτερο από τις φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες που συναντώνται στο ανθρώπινο σώμα. Οι υδροδυναμικές ακτίνες (R_h) των DPPC λιποσωμάτων στο PBS μειώθηκαν στη διαδικασία της θέρμανσης στους 50°C (Εικόνα 9.3(a)). Από την άλλη πλευρά, οι υδροδυναμικές ακτίνες (R_h) των χιμαιρικών λιποσωμάτων παρέμειναν ανεπηρέαστες κατά τη διάρκεια της θέρμανσης. Ο πληθυσμός των χιμαιρικών νανοφορέων έγινε περισσότερο ετερογενής στη διαδικασία της θέρμανσης στους 50°C (η πολυδιασπορά αυξήθηκε) (Εικόνα 3(b)). Οι τιμές της κλασματικής διάστασης (d_f) αυξήθηκαν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της θέρμανσης μόνο για τους χιμαιρικούς νανοφορείς σύστασης DPPC:MPOx-2 (5:5 μοριακός λόγος). Οι υδροδυναμικές ακτίνες (R_h) για τις χιμαιρικές νανοδομές σύστασης DPPC:MPOx-2 (1:9 μοριακός λόγος) στο PBS κατά τη διάρκεια της θέρμανσης στους 50°C (Εικόνα 9.4(a)), ενώ οι τιμές της κλασματικής διάστασης παρέμειναν ανεπηρέαστες (Εικόνα 9.4(c)). Από την άλλη πλευρά, ο πληθυσμός των χιμαιρικών νανοφορέων με τη μεγαλύτερη μοριακή αναλογία πολυμερούς έγινε πιο ομοιογενής στο PBS (Εικόνα 9.4(b)). Η κλασματική διάσταση προσφέρει μία ποσοτικοποίηση των αλλαγών της μορφολογίας των νανოსυστημάτων υπό διαφορετικές θερμικές συνθήκες, ανιχνεύοντας διαφορές, τις οποίες η υδροδυναμική ακτίνα δεν αποκαλύπτουν, ειδικότερα για τα νανοςυστήματα με την υψηλότερη συγκέντρωση του συστατικού MPOx-2 (Εικόνα 9.4(c)). Η μάζα των χιμαιρικών νανοφορέων επίσης μειώνεται (Εικόνες 9.3(d) και 9.4(d)) σε θερμοκρασιακό εύρος 25-50°C, όπως υποδεικνύεται από τη μείωση των τιμών της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (η οποία είναι ανάλογη με τη μάζα των νανοςυστημάτων), ειδικότερα για τα χιμαιρικά πολυμεροσώματα. Για τα συμβατικά DPPC λιποσώματα, η μάζα παρέμεινε πρακτικά η ίδια για θερμοκρασιακό εύρος 25-45°C (θερμοκρασία μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία κύριας μετάβασης των DPPC λιπιδίων, $T_m=41^\circ\text{C}$ για τα DPPC λιπίδια), διότι η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από τα λιποσωματικά εναερίσματα παραμένει σχεδόν η ίδια (συμπεριλαμβανομένου και το πειραματικού σφάλματος) (Εικόνες 9.3(d) και 9.4(d)).



Εικόνα 9.3. (a) R_h (b) PD.I. (c) d_f (d) I vs. θερμοκρασίας των χιμαιρικών νανοδομών με το DPPC συστατικό σε μεγαλύτερο μοριακό λόγο στο PBS (η συγκέντρωση των χιμαιρικών συστημάτων είναι σταθερή και ίση με 5×10^{-2} mg/ml).





Εικόνα 9.4. (a) R_h (b) PD.I. (c) d_f (d) I vs. θερμοκρασίας των χημικών νανοδομών με το MPOx-2 συστατικό σε μεγαλύτερο μοριακό λόγο στο PBS (η συγκέντρωση των χημικών συστημάτων είναι σταθερή και ίση με 5×10^{-2} mg/ml).

Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει πως οι χημικές νανοδομές διαφέρουν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους σε συνθήκες αυξημένης θερμοκρασίας και από αυτό προκύπτει το συμπέρασμα ότι είναι θερμοαποκρινόμενα (thermosensitive) νανοσυστήματα. Ο κύριος τρόπος με τον οποίο η θερμοκρασία φαίνεται να επηρεάζει τα νανοσυστήματα είναι η μείωση της μάζας, εξαιτίας μέσω της πιθανής διάσπασης των νανοδομών. Αυτή η διαδικασία σχετίζεται με τη θερμοκρασία της κύριας μετάβασης των DPPC λιπιδίων και η οποία μπορεί να μεταβάλλεται από την παροχή από τα τμήματα του υπολμερούς εντός της λιπιδικής μεμβράνης. Η θέρμανση φαίνεται να οδηγεί σε λιγότερο συμπαγείς δομές καθώς υποδεικνύεται από τη μείωση των τιμών d_f σε κάποιες περιπτώσεις. Οι μορφολογικές διαφορές/αλλαγές αναμένεται να επηρεάσει το ρυθμό αποδέσμευσης του ενσωματωμένου φαρμακομορίου.

9.1.3 Η ενσωμάτωση της IND στους DPPC:MPOx-2 χημικούς νανοφορείς και η αποδέσμευσή της.

Η IND ανήκει στην κατηγορία των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμακομορίων, η οποία είναι εξαιρετικά αποτελεσματική στη θεραπεία μίας ευρείας κατηγορίας νόσων και στην πρόληψη του καρκίνου στον άνθρωπο (Xu, 2002; Soh and Weinstein, 2003; Rao and Reddy, 2004). Από την άλλη πλευρά, η μακροχρόνια

χρήση των NSAIDs έχει ως αποτέλεσμα τη γαστρεντερική τοξικότητα (Zhou et al., 2010). Από την σκοπιά της μείωσης των ανεπιθύμητων ενεργειών των σκευασμάτων της IND, η ενσωμάτωσή της σε νανοδομές φαίνεται να αποτλεί μία ενδιαφέρουσα προσέγγιση από την άποψη της φαρμακευτικής νανοτεχνολογίας. (Chen et al., 2007; Jaafar-Maalej et al., 2011; Milonaki et al., 2012; Lim et al., 2012; Sugihara et al., 2012). Διαμορφώνοντας μία ολοκληρωμένη εικόνα σχετικά με τη συμπεριφορά της αυτό-συναρμολόγησης των διαφορετικών χιμαιρικών νανοφορέων στο PBS, των χιμαιρικών λιποσωμάτων και πολυμεροσωμάτων, αποφασίστηκε να μελετηθεί η δυνατότητας της ενσωμάτωσης της IND σε αυτούς τους νανοφορείς για τη βελτίωση των χαρακτηριστικών απορρόφησης, βιοκατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης αυτού του λιπόφιλου φαρμακομορίου.

Το μέγεθος και η κατανομή μεγεθών, το ζ-δυναμικό και οι τιμές d_f μετά την ενσωμάτωση της IND παρουσιάζεται στον Πίνακα 9.2.

Πίνακας 9.2. Τα φυσικοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά καθώς και των ποσοστό ενσωμάτωσης του φαρμακομορίου για τους νανοφορείς DPPC:MPOx-2:IND στο PBS.

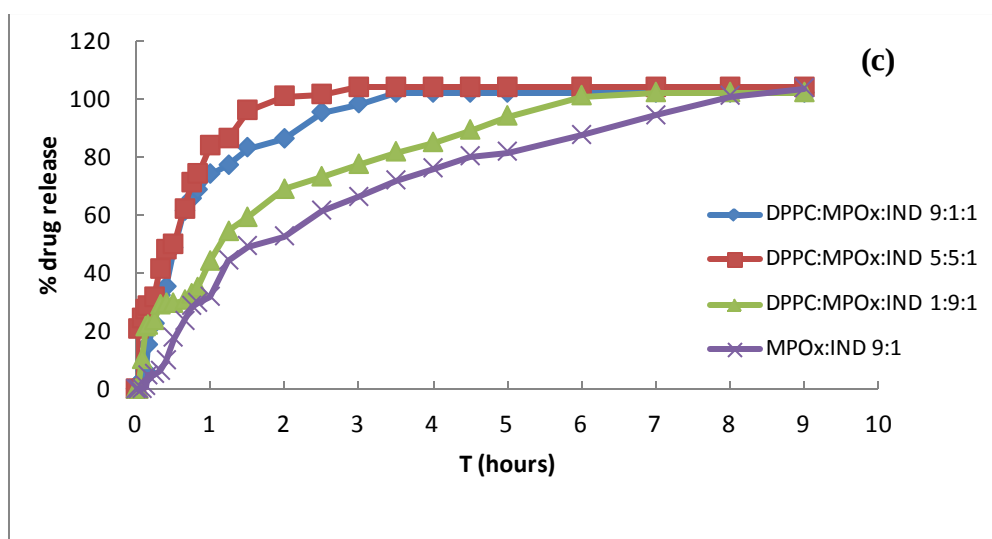
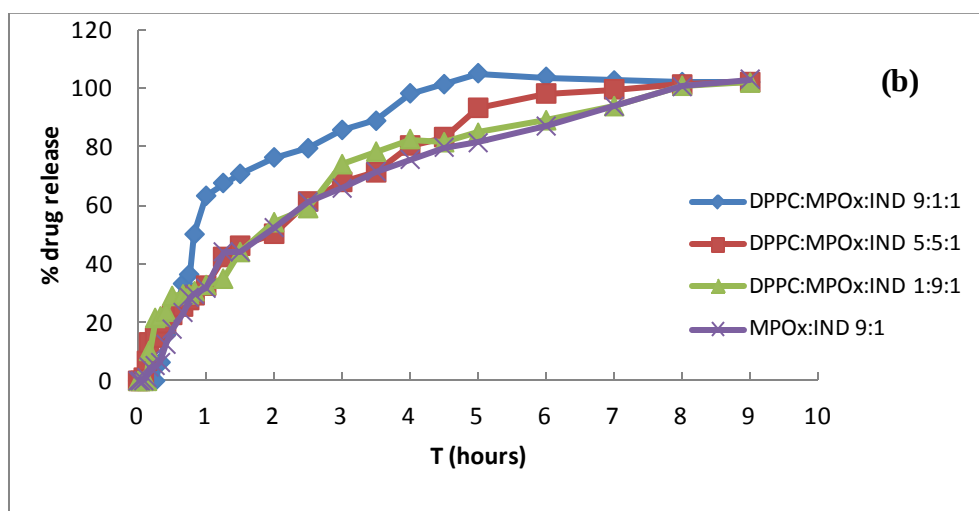
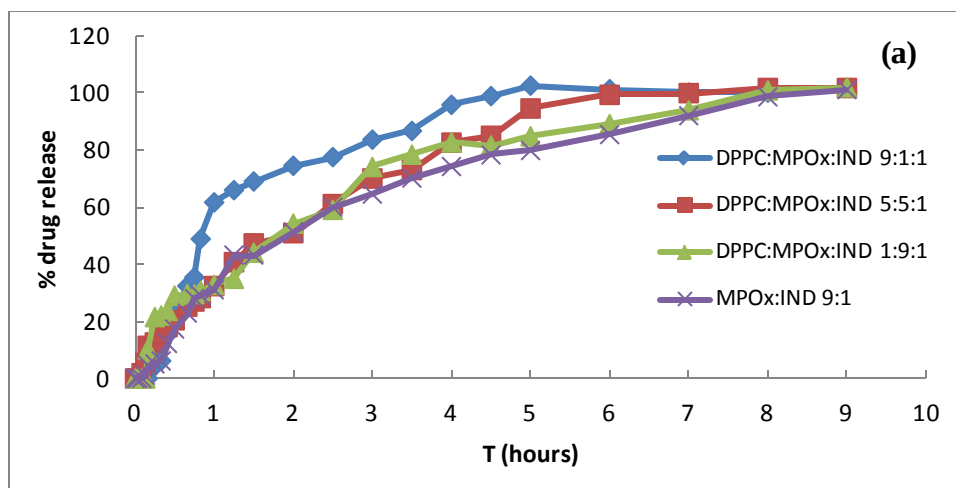
Σύσταση	R_h (nm)	PD.I.	d_f	ζ-δυναμικό (mV)	% Ποσοστό ενσωμάτωσης
DPPC:MPOx-2:IND (9:1:1 μοριακός λόγος)	146.1±10.2	0.52±0.05	2.18±0.1	+5.9±1.6	17.3±0.7
DPPC:MPOx-2:IND (5:5:1 μοριακός λόγος)	206.8±12.4	0.42±0.02	2.01±0.0	+6.6±2.6	10.6±1.1
DPPC:MPOx-2:IND (1:9:1 μοριακός λόγος)	301.4±13.8	0.49±0.04	1.99±0.1	+6.2±2.8	11.5±1.6
MPOx-2:IND (9:1 μοριακός λόγος)	458.2±14.5	0.45±0.02	1.91±0.1	+9.1±1.9	27.8±1.8

Η ενσωμάτωση της ινδομεθακίνης οδήγησε στη μείωση του μεγέθους των χιμαιρικών νανοφορέων και των MPOx-2 πολυμεροσωμάτων (Πίνακες 9.1 και 9.2). Οι τιμές του ζ-δυναμικού δεν παρουσίασαν καμία σημαντική διαφορά μετά την ενσωμάτωση της IND για τους χιμαιρικούς νανοφορείς (Πίνακας 9.2). Αντίθετα, μία μετατόπιση του ζ-δυναμικού σε θετικές τιμές παρατηρήθηκε για τους MPOx-2 νανοφορείς (Πίνακες 9.1 και 9.2). Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των χιμαιρικών νανοφορέων άλλαξαν σημαντικά μετά την ενσωμάτωση της IND, ειδικό εφα για τα MPOx-2 νανοσωματίδια. Πιθανότατα λόγω του αμφίφιλου χαρακτήρα της, η IND διαφοροποιεί τη μετάβαση φάσης σε χωροχρονικό επίπεδο καθώς και τις ιδιότητες επιδιалύτωσης του νανοςυστήματος. Οι προαναφερθείσες παρατηρήσεις παρέχουν συμπληρωματικές πληροφορίες σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις νανοφορέα / φαρμακομορίου (Lúcio et al., 2008; Nunes et al., 2011). Τα ποσοστά ενσωμάτωσης βρέθηκαν 17.3% και 11.5% για τα χιμαιρικά συστήματα σύστασης DPPC:MPOx-2:IND 9:1:1 και 1:9:1 μοριακοί λόγοι στο PBS, αντίστοιχα (Πίνακας 9.2). Το ποσοστό της ενσωμάτωσης των χιμαιρικών νανοφορέων για την IND αυξήθηκε με τη μείωση του συστατικού MPOx-2. Οι χιμαιρικοί νανοφορείς σύστασης DPPC/MPOx-2 φαίνεται να είναι αποτελεσματικοί για την ενσωμάτωση της IND, ειδικότερα αυτοί που παρασκευάστηκαν με τη χαμηλότερη αναλογία του πολυμερικού συστατικού. Αυτό θα πρέπει να συσχετιστεί με την υψηλότερη υδροφοβικότητα του συστατικού DPPC.

Οι διαδικασίες χειρισμού των βιοφυσικών ιδιοτήτων των aDDnSs, ειδικότερα των χιμαιρικών συστημάτων, παρέχει τη δυνατότητα βελτιωμένου ελέγχου της φαρμακοκινητικής (PK) και της φαρμακοδυναμικής (PD) του ενσωματωμένου φαρμακομορίου σε σύγκριση με το ελεύθερο φάρμακο Moghimi and Szebeni, 2003; Allen et al., 2006). Η fractal γεωμετρία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει της πολυπλοκότητα της ετερογενούς φύσης των διαδικασιών του φαρμακομορίου εντός του ανθρώπινου σώματος και της διάλυσης των βιοδραστικών συστατικών (Dokoumetzidis et al., 2004; Dokoumetzidis et al., 2008; Pereira 2010; Dokoumetzidis and Macheras, 2011).

Θα πρέπει να σημειωθεί πως η αποδσμευση των φαρμακομορίων από τα πολυμεροσώματα διέπεται από τη διάχυση του φαρμακομορίου διαμέσου της μεμβράνης (Christian et al., 2009; Lee and Feijen, 2012). Η οδηγούσα δύναμη για την αποδσμευση του φαρμακομορίου είναι η διαβάθμιση της συγκέντρωσης του

φαρμακομορίου μεταξύ των πολυμεροσωμάτων και του περιβάλλοντος υδατικού μέσου (Lee and Feijen, 2012). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, όταν το φαρμακομόριο διαχέεται από τον πυρήνα του πολυμεροσώματος στο περιβάλλον μέσο διασποράς, ο ρυθμός αποδέσμευσης είναι συνάρτησης της τετραγωνικής ρίζας του χρόνου για αυτό το λόγο για τα συστήματα που αποτελούνται από «πολυμεροσώματα μέσα σε πολυμεροσώματα» τα δεδομένα αποδέσμευσης μπορούν ακολουθήσουν τον πειραματικό νόμο των Peppas και Ritger και η κατανομή μεγέθους των πολυμεροσωμάτων διαδραματίζει επίσης έναν πολύ σημαντικό ρόλο για τον ρυθμό της αποδέσμευσης (Christian et al., 2009; Lee and Feijen, 2012; Marguet et al., 2012). Η *in vitro* αποδέσμευση της ινδομεθακίνης από τους χημικούς νανοφορείς και τα πολυμεροσώματα σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (25°C, 37°C και 45°C) παρουσιάζεται στην Εικόνα 9.5. Παρατηρήθηκε πως η αποδέσμευση από το μ παρασκευασθέντες χημικούς νανοφορείς είναι αρκετά ταχεία μόνο για τους μικτούς νανοφορείς με τη χαμηλότερη συγκέντρωση του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες (DPPC:MPOx-2:IND 9:1:1 μοριακός λόγος) (Εικόνα 5) στους 25°C και στους 37°C. Ο συνδυασμός του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες με τα φωσφολιπίδια για την ανάπτυξη νέων χημικών νανοφορέων εμφανίζεται πολλά υποσχόμενη, κυρίως εξαιτίας του γεγονότος ότι το MPOx-2 δρα ως τροποποιητής της αποδέσμευσης της IND. Αυτή η φαινομενολογία παρέχει ένα παράγοντα ελέγχου για την παρασκευή και την ανάπτυξη χημικών φαρμακευτικών σκευασμάτων με το επιθυμητό τρόπο αποδέσμευσης, τροποποιώντας το ρυθμό αποδέσμευσης, και βελτιώνοντας κατά συνέπεια το θεραπευτικό δείκτη της IND και τελικά μειώνοντας τις ανεπιθύμητες ενέργειές της. Από την άλλη πλευρά, τα πολυμεροσώματα μπορούν εύκολα να εγκλείσουν υδροφιλικά μόρια στην εσωτερική τους κοιλότητα, καθώς και υδρόφοβα στην μεμβράνη, επιτρέποντας ταυτόχρονη θεραπεία με χορήγηση συνδυασμού φαρμάκων. Παρουσιάζουν χαμηλή παθητική διαπερατότητα για μικρομόριακο ύψος χημικές ενώσεις, επιτρέποντας την ελεγχόμενη αποδέσμευση με εξωτερικά ερεθίσματα όπως είναι η θερμοκρασία, το pH και το φως. Παρατηρήθηκε ότι η *in vitro* αποδέσμευση του φαρμακομορίου από τα παρασκευασθέντα πολυμεροσώματα σύστασης MPOx-2:IND (9:1 μοριακός λόγος) είναι αρκετά αργή σε σύγκριση με τους χημικούς νανοφορείς (Εικόνα 9.5).



Εικόνα 9.5. Αθροιστική αποδέσμευση του φαρμακομορίου από τους νανοφορείς σύστασης DPPC:MPOx-2: IND 9:1:1, 5:5:1, 1:9:1 και MPOx-2:IND 9:1 μοριακό λόγο στους (a) 25°C, (b) 37°C και (c) 45°C. (κάθε τιμή αναπαριστά το μέσο όρο $\pm$ S.D. των $n = 3$ ανεξάρτητων πειραμάτων).

Η κινητική συμπεριφορά έχει αξιολογηθεί με μελέτες προσομοίωσης της αποδέσμευσης του φαρμακομορίου από fractal πολυμερικές μήτρες. Κατά τη γνώμη μας, φαίνεται πως η χωροχρονική διακύμανση της διαπερατότητας από το δυναμικά διογκούμενο πολυμερές MPOx-2 είναι εγγύτερα στην προσέγγιση της διήθησης για μη κλασσική διάχυση που υποκροαί στην κινητική της αποδέσμευσης (Dokoumetzidis et al., 2004; Dokoumetzidis et al., 2008; Pereira 2010; Dokoumetzidis and Macheras, 2011). Ο σχεδιασμός συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων ελεγχόμενης αποδέσμευσης σε νανοκλίμακα είναι ένα ζήτημα που προτρέπει στην αναζήτηση βιοϋλικών, τα οποία μπορούν να τροποποιήσουν την αποδέσμευση του φαρμάκου σε μία μηδενοταξική κινητική. Όμως, οι καινοτόμες θεραπείες απαιτούν καινοτόμα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων με δυνατότητα ελέγχουν των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των βιοϋλικών που χρησιμοποιούνται καθώς και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ το φ και με το εγκλωβισμένο σε αυτά φαρμακομόριο (Demetzos 2010a,b).

Επιπρόσθετα, η *in vitro* αποδέσμευση του φαρμάκου από τις παρασκευασθείσες χιμαιρικές νανοδομές είναι γρηγορότερη για όλα τα χιμαιρικά νανοσυστήματα στους 45°C, θερμοκρασία μεγαλύτερη από T_m (=45°C) των DPPC λιπιδίων (Εικόνα 9.5(c)) σε σύγκριση με τις άλλες δύο χαμηλότερες θερμοκρασίες (Εικόνες 9.5(a) και (b)). Με άλλα λόγια, για τους χιμαιρικούς νανοφορείς, η αποδέσμευση του φαρμακομορίου αυξήθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, μία διαμορφωτική αλλαγή του απλού δεσμού C-C στην λιπαρή αλυσίδα των DPPC λιπιδίων οδηγεί σε αύξηση του συνολικού όγκου που καταλαμβάνεται από τις υδρογονανθρακικές αλυσίδες στη μεμβράνη, και για αυτό το λόγο αυξάνεται η διαπερατότητα των μεικτών διπλοστοιβάδων. Στη θερμοκρασία της κύριας μετάβασης βάσης T_m (=41°C) των DPPC λιπιδίων η διαπερατότητα αυξάνεται περεταίρω ως αποτέλεσμα της συνύπαρξης περιοχών της μεμβράνης σε δύο φάσεις της υγρής κρυσταλλικής κατάστασης (ρυτιδωμένη φάση και υγρή κρυσταλλική κατάσταση) (Gaber et al., 1995; Hossan et al., 2007; 2012). Η αύξηση της μεμβρανικής διαπερατότητας είναι ο πιο πιθανός λόγος για τους αυξημένους ρυθμούς αποδέσμευσης για τα χιμαιρικά λιποσώματα στους 45°C. Όμως, η παρουσία των αλυσίδων του MPOx-2 τροποποιεί τη συμπεριφορά αυτή καθώς οι χιμαιρικοί νανοφορείς δείχνουν μία διαφορετική εξάρτηση του ρυθμού αποδέσμευσης από τη θερμοκρασία, η οποία επηρεάζεται από το λόγο DPPC/MPOx-2. Από την άλλη

πλευρά, ο ρυθμός αποδέσμευσης της IND από τα MPOx-2 πολυμεροσώματα παρέμεινε ανεπηρέαστη από την αύξηση της θερμοκρασίας (Εικόνα 5) (Christian et al., 2009). Σε αυτές τις κατευθύνσεις της ερευνητικής δραστηριότητας, ο συνδυασμός του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες με λιποσώματα για την ανάπτυξη νέων χιμαιρικών νανοφορέων εμφανίζεται πολλά υποσχόμενη λόγω της ρύθμισης του ρυθμού αποδέσμευσης της IND. Αν και ο ακριβής μηχανισμός της τροποποίησης του ρυθμού αποδέσμευσης είναι σε αναζήτηση, οι παρόντες μελέτες φωτίζουν τις φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών των χιμαιρικών νανοσυστημάτων, που αποτελούνται από διαφορετικά αυτό-συναρμολογούμενα βιοϋλικά.

9.2 Συμπεράσματα

Χιμαιρικοί νανοφορείς που αποτελούνται από λιπίδια DPPC και βαθμιδωτά συμπολυμερή κατά συστάδες MPOx-2 παρασκευάστηκαν με επιτυχία σε PBS. Αυτά τα χιμαιρικά νανοσυστήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καινοτόμα συστήματα μεταφοράς φαρμακομορίων της Νανοτεχνολογίας. Τα φυσικοχημικά και δομικά χαρακτηριστικά αυτών των νανοσυστημάτων βρέθηκαν να εξαρτώνται από το μοριακό λόγο των δύο συστατικών (δηλαδή DPPC και MPOx-2) και της θερμοκρασίας. Η ενσωμάτωση του MPOx-2 βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες στη λιποσωματική διπλοστοιβάδα αυξάνει τη φυσικοχημική σταθερότητα των αρχικών κυστιδίων, ειδικά για την υψηλή θερμοκρασία αναλογικά το MPOx-2, ενώ η δομική μεταβλητότητα παραμένει ανεπηρέαστη στην περίπτωση της υδροδυναμικής ακτίνας (R_h) (μέγεθος / σχήμα) ενώ στην περίπτωση της κλασματικής διάστασης (d_f) (μορφολογία) μειώνεται στη διαδικασία της θέρμανσης στους 50°C. Αυτή η παρατήρηση αποδεικνύει ότι οι χιμαιρικές νανοδομές αλλάζουν τα δομικά χαρακτηριστικά τους σε συνθήκες αυξημένης θερμοκρασίας και μπορούν να θεωρηθούν ως θερμοαποκρινόμενες νανοδομές. Η IND ενσωματώθηκε με επιτυχία σε διαφορετικούς μοριακούς λόγους στα χιμαιρικά νανοσυστήματα και βρέθηκε πως τα δομικά χαρακτηριστικά αυτών των θερμοαποκρινόμενων και στερεοχημικά σταθεροποιημένων νανοφορέων δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μετά την ενσωμάτωση της IND ενώ τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους παρέμειναν

ανεπηρέαστα. Η *in vitro* αποδέσμευση της IND από τους παρασκευασθέντες χιμαιρικούς νανοφορείς είναι αρκετά ταχεία μόνο για τα μεικτά συστήματα με τη χαμηλότερο μοριακό λόγο του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες. Για τους χιμαιρικούς νανοφορείς, ο ρυθμός της αποδέσμευσης αυξήθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας, ενώ για τα MPOx-2 πολυμεροσώματα η κινητική αποδέσμευσης της IND δεν άλλαξε σημαντικά. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ενθαρρυντικά για την ενσωμάτωση και αποδέσμευση φαρμακομορίου σε και από αυτούς, αντίστοιχα, καθώς καθορίστηκαν οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν το θεραπευτικό δείκτη ενός φαρμακομορίου όπως είναι η IND. Αυτό αποδεικνύεται από την παρούσα μελέτη, η οποία απέδειξε πως υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός παραμέτρων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ώστε να μεταβληθεί η μορφολογία των chi-aDDnSs και αυτό συνιστά πλεονέκτημα για τον ορθολογικό σχεδιασμό και την ανάπτυξη νανοφορέων για μεταφορά φαρμακομορίων. Τα αποτελέσματα αυτά υπογραμμίζουν την ύπαρξη πληθώρας παραγόντων για τον έλεγχο της κολλοειδούς συμπεριφοράς και της μορφολογίας των νανοφορέων, με στόχο να επιτευχθεί προγραμματισμένη αποδέσμευση του φαρμακομορίου. Εν κατακλείδι, η σύσταση και κλασματική διάσταση των χιμαιρικών συστημάτων διαδραματίζει έναν ρόλο-κλειδί στις ιδιότητες της αυτό-συναρμολόγησης, οι οποίες χαρτογραφούν το σχεδιασμό των chi-aDDnSs με σαφή γνώση της κινητικής αποδέσμευσης του εγκλωβισμένου φαρμακομορίου.

10 Η απεικόνιση και η μορφοκλασματική μετρολογία των χημικών λιποσωματικών συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων της νανοτεχνολογίας: ο ρόλος της μακρομοριακής αρχιτεκτονικής του πολυμερικού ξενιστή.

10.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Η ταξινόμηση των καινοτόμων συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων της νανοτεχνολογίας, τα οποία αποτελούνται από βιοϋλικά διαφορετικά στη φύση τους και μπορούν να τροποποιήσουν την αποδέσμευση του εγκλωβισμένου φαρμακομορίου και των παραγόντων απεικόνισης, έχει πρόσφατα παρουσιαστεί στη βιβλιογραφία (Rowland et al., 2012; Crommelin and Florence, 2013; Demetzos and Pippa, 2013). Ο χαρακτηρισμός των φαρμακευτικών προϊόντων με μικροσκοπικές τεχνικές είναι εξέχουσας σημασίας για να αποκτήσουν αξιόπιστα στοιχεία σχετικά με το σχήμα και τη μορφολογία των νανοσυστημάτων (Kuntsche et al., 2011; Klang et al., 2012; 2013). Το σχήμα είναι ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τους μηχανισμούς μεταφοράς του συστήματος, όπως είναι η φαγοκυττάρωση, η αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος και η κινητική αποδέσμευσης του ενσωματωμένου φαρμακομορίου (Champion and Mitragorti, 2006; Champion et al., 2007). Οι Champion και Mitragorti (2006) ανέφεραν σε μελέτη τους ένα απροσδόκητο εύρημα για την επιστημονική κοινότητα ότι το σχήμα του σωματιδίου έχει πρωτεύοντα ρόλο στη φαγοκύτωση. Συγκεκριμένα, όλα τα σχήματα είναι ικανά να ξεκινήσουν την φαγοκυττάρωση όταν αποκτήσουν έναν κατάλληλο προσανατολισμό και ένα τοπικό σχήμα/διαμόρφωση του σωματιδίου σε ένα σημείο της αρχικής επαφής με το μακροφάγο υποδεικνύει πως θα ξεκινήσει η φαγοκύτωση.

Επιπρόσθετα, για τη διερεύνηση του μηχανισμού της συσσωμάτωσης και της μορφολογίας των νανοσωματιδίων και των νανοδομημένων συσσωματωμάτων, η fractal ανάλυση έχει θεωρηθεί πως είναι το κυριό εργαλείο για την ποσοτικοποίηση του ολογράμματος τέτοιου είδους νανοσυστημάτων (Sabín et al., 2007a,b Roldán-Vargas et al., 2008; Roldán-Vargas et al., 2009). Η fractal ανάλυση έχει χρησιμοποιηθεί για να προσδιορίζει τη μορφολογία των καινοτόμων συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων της Νανοτεχνολογίας με μία πληθώρα τεχνικών (Pippa et al., 2012a,b,c, 2013a,b,c,d,e; Hadjidemetriou et al., 2013). Επιπρόσθετα, η fractal ανάλυση έχει θεωρηθεί ως ένα συμπληρωματικό αναλυτικό εργαλείο για την

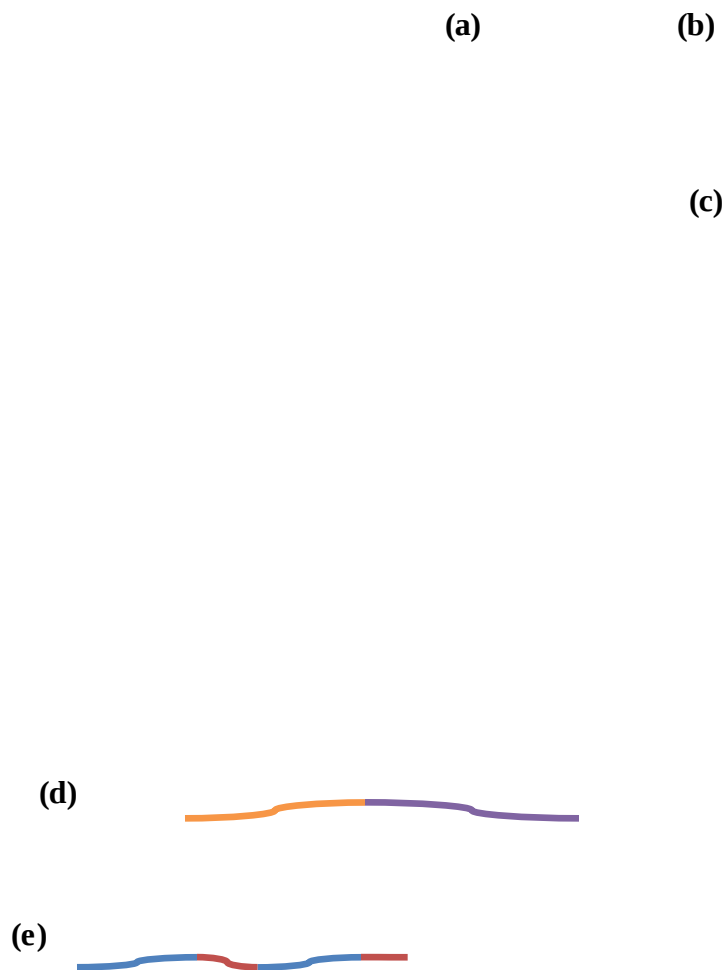
αξιολόγηση της κατανομής μεγέθους των σωματιδίων στη νανοκλίμακα (Kanniah et al., 2012).

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση των μεταβολών των φυσικοχημικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών των χημικών DPPC λιποσωμάτων, που προκαλείται από την ενσωμάτωση συμπολυμερών κατά συστάδες με διαφορετική αρχιτεκτονική. Αυτά τα νανοσυστήματα μπορούν να ταξινομηθούν στην κατηγορία των χημικών (από την αρχαία ελληνική μυθολογία, η Χίμαιρα ήταν ένα θηλυκό τέρας που εξέπνεε φωτιά από τη Λυκία της Μικράς Ασίας, το οποίο αποτελούσαν από τρία ζώα: ένα λιοντάρι, ένα φίδι και μία κατσίκια), βασιζόμενοι στη διαφορετική φύση των βιοϋλικών (λιπιδίου και συμπολυμερούς κατά συστάδες). Τέτοια μεικτά νανοσυστήματα μπορούν να τροποποιήσουν τη φαρμακοκινητική του ενσωματωμένου φαρμακομορίου και συνεπώς τη βιολειτουργικότητα και την αποτελεσματικότητά του. Το Poly(ethylene oxide)-block-poly(ϵ -caprolactone) (PEO-b-PCL) είναι το συμπολυμερές κατά συστάδες και το poly(2-methyl-2-oxazoline)-grad-poly(2-phenyl-2-oxazoline) (MPOx) είναι το βαθμιδωτό συμπολυμερές κατά συστάδες. Αυτά τα πολυμερή έχουν χρησιμοποιηθεί με διαφορετικές συστάσεις με το λιπίδιο ώστε να παρασκευαστούν μεικτοί λιποσωματικοί φορείς. Μία πληθώρα τεχνικών σκέδασης φωτός και η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης χρησιμοποιήθηκαν για να εξαχθούν πληροφορίες για τα φυσικοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των μεικτών λιποσωματικών νανοφορέων, αντίστοιχα.

Οι δομές και τα μοριακά χαρακτηριστικά των συμπολυμερών παρουσιάζονται στην Εικόνα 10.1 και στον Πίνακα 10.1, αντίστοιχα.

Πίνακας 10.1. Μοριακά χαρακτηριστικά του πολυμερούς και του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες.

Δείγμα	M_w	M_w/M_n	% wt υδρόφοβο συστατικό
PEO-b-PCL -1	10,600	1.43	53 (PCL)
PEO-b-PCL -2	7,700	1.18	30 (PCL)
MPOx-1	5,200	1.14	28 (PhOxz)
MPOx-2	3,300	1.26	39(PhOxz)



Εικόνα 10.1. Χημικές δομές των (a) DPPC λιπιδίου (b) του συμπολυμερούς κατά συστάδες PEO-b-PCL, (c) του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες MPOx, και της μακρομοριακής αρχιτεκτονικής των (d) PEO-b-PCL (υδρόφιλο συστατικό - PEO: μωβ γραμμή και υδρόφοβο συστατικό- PCL: πορτοκαλί γραμμή) και (e) MPOx (υδρόφιλο συστατικό (MeOxz): μπλε γραμμή και υδρόφοβο συστατικό (PhOxz): κόκκινη γραμμή) που χρησιμοποιούνται σε αυτή τη μελέτη.

10.1.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και fractal μορφολογία των χημαιρικών λιποσωμάτων

Τα φυσικοχημικά και δομικά χαρακτηριστικά, μέσω της fractal ανάλυσης, των χημαιρικών λιποσωμάτων σε PBS παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.2. Τα νανοσυστήματα στα οποία έχει ενσωματωθεί το PEO-b-PCL και το MPOx δεν παρουσιάζουν τα ίδια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (μέγεθος και κατανομή μεγέθους) (Πίνακας 10.2) στο PBS.

Πίνακας 10.2: Φυσικοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των χημαιρικών λιποσωμάτων.

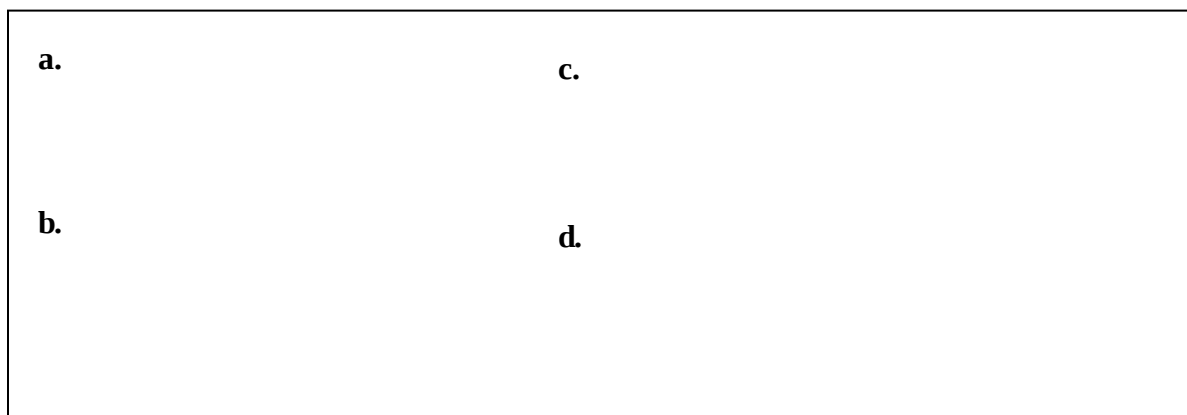
Σύσταση	D_h (nm)	PD.I.	ζ - δυναμικό (mV)	d_f	R_g/R_h
DPPC:PEO-b-PCL 1 (9:1 μοριακός λόγος)	84.2±0.2	0.25±0.01	+2.8±0.5	1.8 ₆	1.02
DPPC:PEO-b-PCL 2 (9:1 μοριακός λόγος)	78.9±0.4	0.26±0.01	-9.3±0.1	1.8 ₃	1.04
DPPC:MPOx 1 (9:1 μοριακός λόγος)	98.9±0.6	0.52±0.01	1.5±0.2	2.4 ₅	0.71
DPPC:MPOx 1 (9:3 μοριακός λόγος)	105.1±1.2	0.42±0.01	-3.5±0.1	2.0 ₈	0.93
DPPC:MPOx 2 (0:9 μοριακός λόγος)	416.1±7.0	0.59±0.02	-17.1±1.4	2.4 ₉	0.84
DPPC:MPOx 2 (5:5 μοριακός λόγος)	213.1±1.2	0.53±0.08	-5.8±1.2	2.2 ₁	0.21
DPPC:MPOx 2 (9:1 μοριακός λόγος)	120.0±2.1	0.41±0.01	+5.1±2.3	2.3 ₂	0.23

Οι χημικοί νανοφορείς που έχουν ενσωματωμένες τις αλυσίδες του PEO-b-PCL είναι μικρότερα από τα DPPC:MPOx χημικά λιποσώματα. Η ενσωμάτωση του PEO-b-PCL 2 οδηγεί σε χημικές νανοδομές με μικρότερο μέγεθος. Αυτό οφείλεται στις στερικές απώσεις που είναι παρούσες εξαιτίας της αγκυροβόλησης των PEO-b-PCL αλυσίδων στη λιπιδική διπλοστοιβάδα. Η διαφορά στο μέγεθος μεταξύ των DPPC:PEO-b-PCL 1 και των DPPC:PEO-b-PCL 2 είναι περίπου 5nm (Πίνακας 10.2) και η διαφορά αυτή πιθανότητα οφείλεται από τη διαφορά του % ποσοστού του υδρόφοβου κομματιού (Πίνακας 10.1), και για αυτό, οι στερικές αλληλεπιδράσεις είναι ισχυρότερες για το DPPC:PEO-b-PCL 2 νανοσύστημα. Οι τιμές της πολυδιασποράς μειώθηκαν σημαντικά από την ενσωμάτωση του συμπολυμερούς κατά συστάδες σε σύγκριση με το βαθμιδωτό συμπολυμερές κατά συστάδες (Πίνακας 10.2). Τα δύο συστατικά έχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μοριακών βαρών, του λόγου υδρόφοβου/υδρόφιλο συστατικό, των ιδιοτήτων αυτό-συναρμολόγησης, και τα χαρακτηριστικά βιοσυμβατότητας και βιοαποικοδομησιμότητας. Αυτές οι διαφορές στη χημική δομή και στη λειτουργικότητα υποστηρίζουν αυτή τη φαινομενολογία των αρκετά διαφορετικών τιμών του δείκτη πολυδιασποράς για τις χημικές νανοδομές. Επιπρόσθετα, η μακρομοριακή αρχιτεκτονική των DPPC λιπιδίων και των PEO-b-PCL συμπολυμερών κατά συστάδες είναι περίπου η ίδια. Αντίθετα, υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση στη μακρομοριακή αρχιτεκτονική του MPOx βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες και του DPPC λιπιδίου. Ακόμη, το ζ-δυναμικό των MPOx-2 νανοσωματιδίων παρουσίασε αρνητικές τιμές. Το ζ-δυναμικό όλων των άλλων χημικών νανοφορέων βρέθηκε περίπου μηδενικό, εξαιτίας της έλλειψης φορτίου πάνω στη λιποσωματική μεμβράνη (Πίνακας 10.1). Λαμβάνοντας υπόψη την ιονική ισχύ του PBS, μπορεί να υποτεθεί ότι οι παραπάνω παρατηρήσεις οφείλονται στη διαφορετική κατάσταση επιδιόρθωσης των υδρόφιλων πολυμερικών αλυσίδων όταν τα ιόντα είναι παρόντα στο διάλυμα. Μία άλλη εξήγηση βασίζεται στις αλλαγές στην ισχύ της δύναμης ενυδάτωσης του νερού, εξαιτίας της παρουσίας ιόντων στο PBS, καθώς και στο γινόμενο ιονικής ενότητας, συντομοσμού αυτών των ιόντων με τις υδρόφιλες πολυμερικές αλυσίδες, κάτι που τις καθιστά πιο υδρόφιλες, βελτιώνοντας τα χαρακτηριστικά ενυδάτωσης των αλυσίδων.

Η κλασματική διάσταση (d_f) (αναπαριστά μία παράμετρο της ποσοτικοποίησης της μορφολογίας των νανοδομών) βρέθηκε ίση με 1.8 για τα DPPC:PEO-b-PCL χημικά λιποσώματα (Πίνακας 10.2). Σύμφωνα με το μοντέλο της περιορισμένης

από τη διάχυση συσσωμάτωσης συμπλεγμάτων, η μορφολογία των σωματιδίων (με df ίσο με 1.8) είναι ανοιχτή και διακλαδισμένη (Meakin, 1983a,b, 1986). Μία αύξηση της κλασματικής διάστασης για τους MPOx χημικούς νανοφορείς παρατηρήθηκε. Η κλασματική διάσταση βρέθηκε περίπου ίση με 2 για το η DPPC:MPOx-1 νανοφορείς στο PBS στη μεγαλύτερη συγκέντρωση του πολυμερικού συστατικού. Σύμφωνα με την περιορισμένη από την αντίδραση συσσωμάτωσης συμπλεγμάτων ή το μοντέλο του Edem, τα συσσωματώματα (με df περίπου ίσο με 2) είναι περισσότερο συμπαγή και πυκνά σε σύγκριση με αυτά του μοντέλου της περιορισμένης από τη διάχυση συσσωμάτωσης συμπλεγμάτων (Meakin, 1983a,b, 1986). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι φυσικοχημική και η δομική συμπεριφορά αυτών των χημικών νανοσυστημάτων βρέθηκε να εξαρτάται από τη σύνθεση του πολυμερικού συστατικού, επίσης (Εικόνα 10.2). Αυτή η φαινομενολογία θα μπορούσε να εξηγηθεί από τις σημαντικές διαφορές στις τιμές της df .

Η βιομοριακή γλυπτική των χημικών λιποσωματικών μεμβρανών είναι διαφορετική εξαιτίας της διαφορετικής αρχιτεκτονικής που παρουσιάζουν τα πολυμερικά συστατικά. Οι αλυσίδες του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες MPOx αναμένεται να παρουσιάζουν πολλά σημεία εισόδου και εξόδου στη λιποσωματική μεμβράνη, σε αντίθεση με τις συζεύξεις λιπιδίων – υδρόφιλων πολυμερών και των αμφίφιλων συμπολυμερών κατά συστάδες, όπως είναι το PEO-b-PCL, όπου το υδρόφοβο τμήμα (PCL) ενσωματώνεται μέσα στη λιπιδική μεμβράνη και η υδρόφιλη πολυμερική αλυσίδα (PEO) είναι αγκυροβολημένη πάνω στη λιποσωματική μεμβράνη (Εικόνα 10.2). Αυτή η διευθέτηση της αλυσίδας του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες έχει αρκετές επιπτώσεις στη δομή και στις δομικές ιδιότητες της λιποσωματικής μεμβράνης αυτής καθευτής και της χημικής νανοδόμης, ως ολότητας, καθώς τα παρόντα αποτελέσματα υποδεικνύουν.



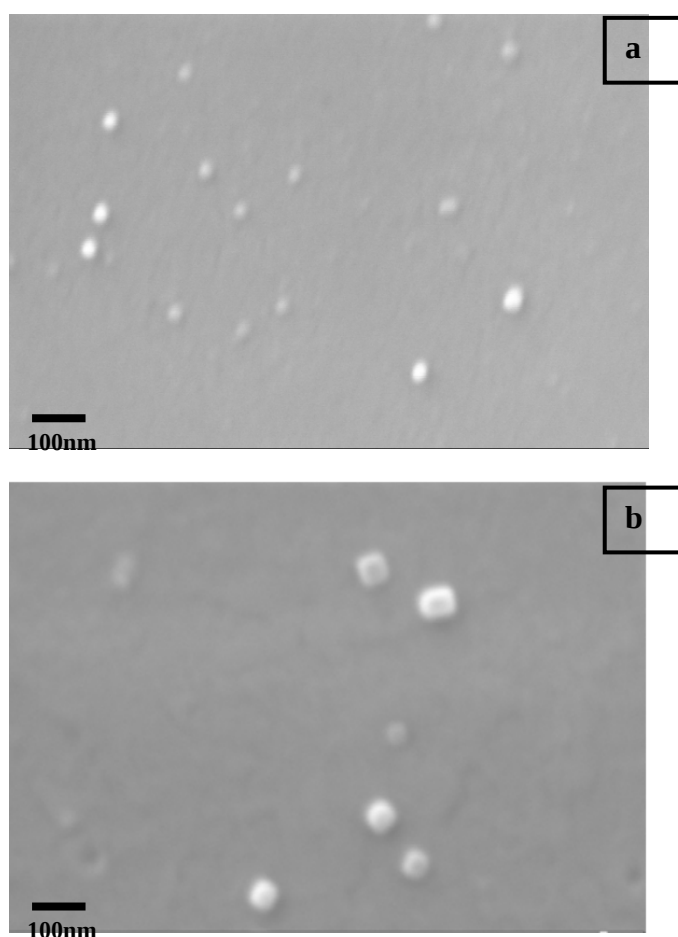
Εικόνα 10.2. Η βιομοριακή γλυπτική των a. DPPC:PEO-b-PCL 1, b. DPPC:PEO-b-PCL 2 c. DPPC:MPOx 1 και d. DPPC:MPOx 2 χημικών λιποσωματικών μεμβρανών. Οι υδρόφιλες πολυμερικές αλυσίδες εισχωρούν και στην εσωτερική πλευρά της λιποσωματικής μεμβράνης.

Ο λόγος R_g/R_h , η οποία είναι μία σημαντική παράμετρος για την κατανόηση της εσωτερικής δομής των λιποσωματικών νανοσωματιδίων σε διασπορά, έχει επίσης προσδιοριστεί (Burchard, 1983). Οι τιμές R_g/R_h είναι κοντά στη μονάδα για τους χημικούς νανοφορείς στους οποίους έχει ενσωματωθεί το PEO-b-PCL συμπολυμερές κατά συστάδες, υποδεικνύοντας μορφολογία κυστιδίου. Αντίθετα, η ενσωμάτωση του MPOx-1 βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες στην DPPC λιποσωματική μεμβράνη οδήγησε στο σχηματισμό σφαιρικών νανοσωματιδίων, ειδικότερα στο μοριακό λόγο 9:1 (Πίνακας 10.2). Τα νανοσυστήματα MPOx-2 είναι σφαιρικά σύμφωνα με τις τιμές R_g/R_h (Πίνακας 10.2). Οι μεικτοί νανοφορείς MPOx-2 (δηλ. DPPC:MPOx-2 5:5 και 9:1 μοριακοί λόγοι) θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως ανοήτες δομές, σύμφωνα με τους λόγους R_g/R_h (Πίνακας 10.2). Ο λόγος R_g/R_h μειώθηκε σημαντικά με την αύξηση του MPOx-2 συστατικού (Πίνακας 10.2). Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει ότι η παρουσία του MPOx-2 προκαλεί σημαντικές διαρθρωτικές αλλαγές στη μορφολογία της λιποσωματικής μεμβράνης.

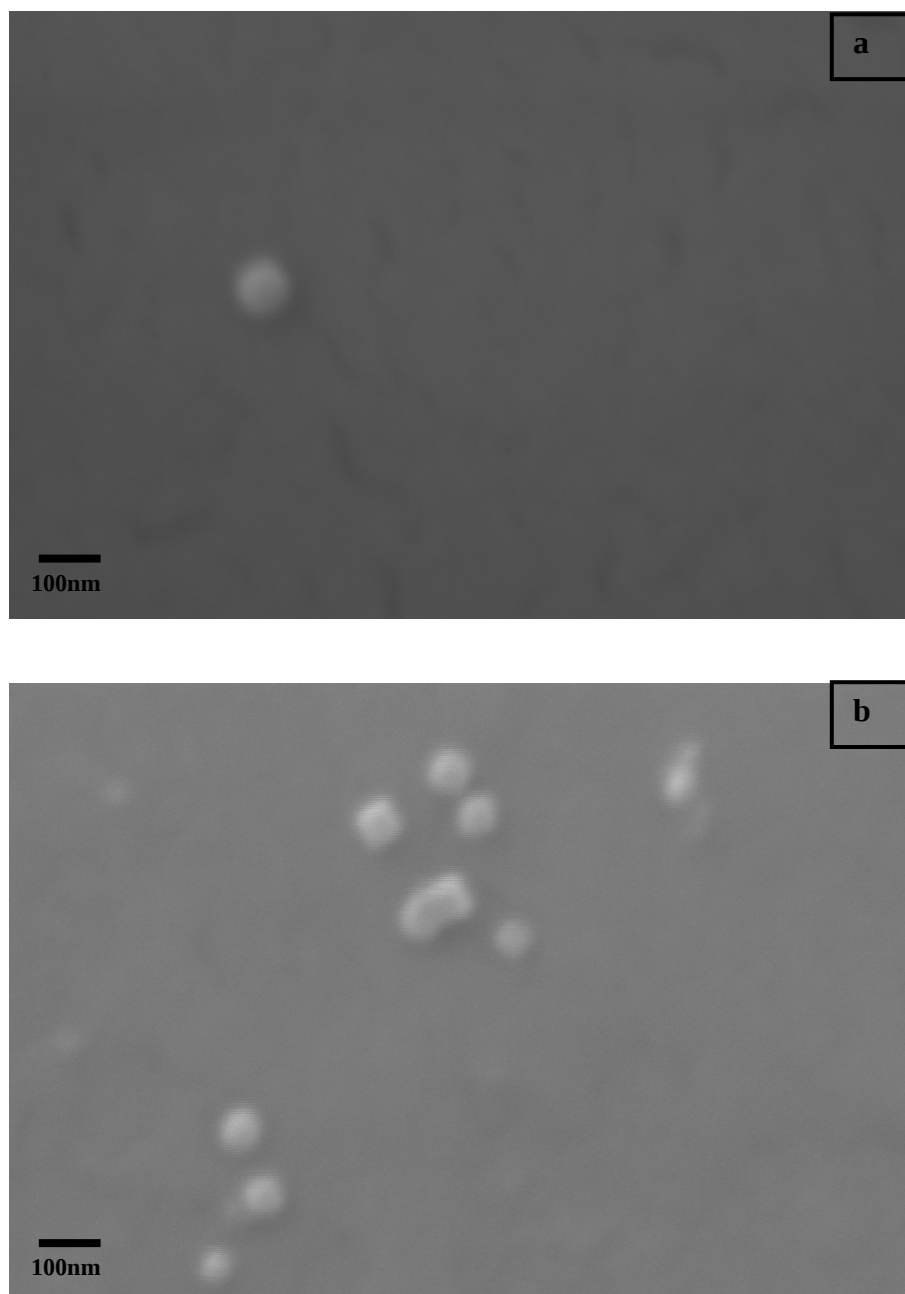
10.1.2 Η απεικόνιση των χημικών λιποσωμάτων

Τα αρχικά αποτελέσματα επικεντρώθηκαν στον προσδιορισμό των φυσικοχημικών και δομικών χαρακτηριστικών των χημικών νανοδομών στο PBS. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα, μελετήσαμε τη μορφολογία των διαφορετικών χημικών λιποσωματικών συστημάτων με SEM. Θα πρέπει να σημειωθεί πως το

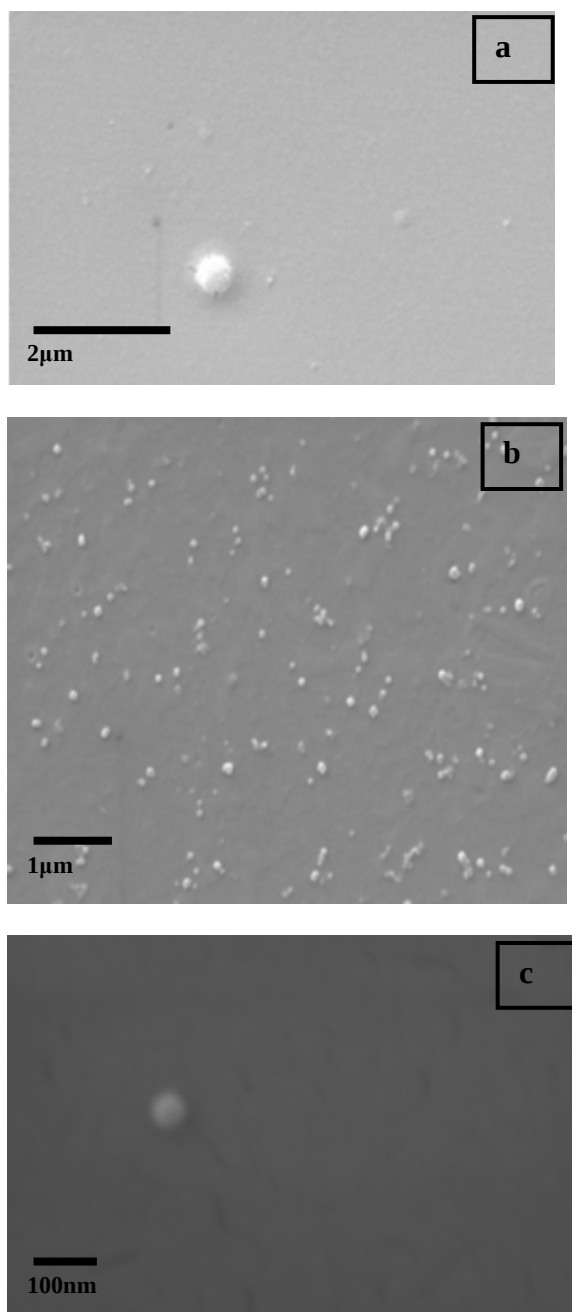
SEM είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για την παρατήρηση της δομής των κολλοειδών συστημάτων, νανομετρικών έως μικρομετρικών διαστάσεων, λόγω του πλεονεκτήματος της ευκολίας στη χρήση και της υψηλής απόδοσης. Για να ληφθούν καθαρές εικόνες, το SEM συνήθως απαιτεί συνθήκες υψηλού κενού, οι οποίες κάποιες φορές οδηγούν τα λιποσώματα να διαρραγούν λόγω της εξάτμισης της υδατικής φάσης. Επιτεύχθηκε η λήψη καθαρών εικόνων των χιμαιρικών λιποσωμάτων στο μέσο διασποράς σε μία ανάλυση εκατοντάδων νανομέτρων (Εικόνες 10.2, 10.3, 10.4 και 10.5). Αυτοί οι χιμαιρικοί λιποσωμακοί νανοφορείς είχαν κυκλικό σχήμα με τη στεφάνη φωτεινότερη σε σύγκριση με το κέντρο τους (Gimzar et al., 2008). Αυτή η φωτεινότητα πιστεύεται ότι προέρχεται από τη δέσμη που οφείλεται στην αυξημένη δευτερογενή συσσώρευση ηλεκτρονίων στις ακμές των δομικών υλικών των υπό εξέταση αντικειμένων, υποδεικνύοντας ότι αυτά τα νανοσυστήματα διαθέτουν ένα σφαιρικό σώμα.



Εικόνα 10.3. SEM εικόνα των **a.** DPPC:PEO-b-PCL 1 (9:1 μοριακός λόγος) και **b.** DPPC:PEO-b-PCL 2 (9:1 μοριακός λόγος).



Εικόνα 10.4. SEM εικόνες των DPPC:MPOx 1 **a.** 9:1 και **b.** 9:3 μοριακός λόγος



Εικόνα 10.5. SEM εικόνες των DPPC:MPOx 2 **a.** 0:9 **b.** 5:5 και **c.** 9:1 μοριακός λόγος.

Οι εικόνες που λήφθηκαν μας αποκάλυψαν το σχήμα και το κατά προσέγγιση σχήμα των χημικών λιποσωμάτων. Στην ανάλυση των εικόνων SEM, η μορφολογία της επιφάνειας όλων των λιποσωματικών δειγμάτων απέδειξε πως η επιφάνεια αποτελείτο από μία πορώδη δομή, ειδικότερα για χημικά λιποσώματα με το MPOx-2 βαθμιδωτό συμπολυμερές κατά συστάδες. Για να επιτευχθεί μία αποτελεσματική σύνθεση για τοπική χρήση των λιποσωμάτων, η κατανομή του μεγέθους θα πρέπει να είναι μεταξύ των 100nm και των 2μm. Με βάση τις μελέτες SEM, παρατηρήσαμε ότι τα DPPC:PEO-b-PCL (1 και/ή 2) χημικά νανοσυστήματα περιείχαν λιποσώματα πολύ μικρού μεγέθους, πολύ κοντά στα 100nm (Εικόνα 10.3). Αυτά τα νανοσυστήματα φαίνεται να είναι αρκετά διαφορετικά όσον αφορά τα μεγέθη τους πιθανότητα εξαιτίας του διαφορετικού κατά βάρους ποσοστού (%wt) του υδρόφοβου συστατικού (Πίνακας 10.1). Αντίθετα, οι DPPC:MPOx-1 νανοφορείς με τους δύο διαφορετικούς μοριακούς λόγους διαθέτουν σφαιρικό σχήμα, ενώ η μορφολογία τους όπως ποσοτικοποιείται από την κλασματική τους διάσταση είναι αρκετά διαφορετική (διαφορετικές τιμές d_f) (Εικόνα 10.3 και Πίνακας 10.2). Από τις εικόνες SEM, συμπεραίνουμε ότι όλα τα χημικά λιποσώματα έχουν σφαιρικό σχήμα. Η παρουσία του πολυμερούς διαδραματίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση των χημικών λιποσωμάτων, ώστε να ληφθούν εικόνες SEM (δηλαδή αυξημένη σταθερότητα στο κενό που απαιτείται για την λήψη εικόνων SEM).

10.2 Συμπεράσματα

Χημικοί νανοφορείς που αποτελούνται από DPPC καθώς και συμπολυμερή κατά συστάδες και βαθμιδωτά συμπολυμερή κατά συστάδες σε διαφορετικούς μοριακούς λόγους παρασκευάστηκαν επιτυχώς. Αυτά τα χημικά νανοσυστήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συστήματα μεταφοράς φαρμακομορίων της νανοτεχνολογίας. Τα φυσικοχημικά και δομικά χαρακτηριστικά τους βρέθηκαν να εξαρτώνται από τη μακρομοριακή αρχιτεκτονική του πολυμερικού συστατικού. Συγκριμένα, οι νανοφορείς που είχαν ενσωματωμένα το PEO-b-PCL και το MPOx παρουσιάζουν διαφορετικά μεγέθη και κλασματικά μορφολογικά χαρακτηριστικά στο PBS. Αντίθετα, σφαιρικό σχήμα παρατηρήθηκε για όλους τους παρασκευασθέντες νανοφορείς από τις εικόνες SEM. Κλείνοντας, η μακρομοριακή αρχιτεκτονική και η

χημική σύσταση συμβάλει στη fractal μορφολογία της χιμαιρικής λιποσωμιακής μεμβράνης και θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη, ενώ το σχήμα των χιμαιρικών λιποσωμάτων είναι ανεξάρτητο από τη δομή του πολυμερικού ξενιστή.

11 Η φυσικοχημική/θερμοδυναμική ισορροπία των καινοτόμων λιποσωμακών νανοφορέων.

11.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Τα λιποσώματα είναι σφαιρικά, κλειστά κυστίδια που αποτελούνται από κυρτές λιπιδικές στοιβάδες, η οποία εγκλείει ένα μέρος του διαλύτη στο εσωτερικό τους και τα μεγέθη τους κυμαίνονται από 20nm έως και κάποια μικρόμετρα. Τα καινοτόμα συστήματα μεταφοράς φαρμακομορίων της νανοτεχνολογίας είναι μεικτά νανოსυστήματα εξαιτίας του συνδυασμού διαφορετικής φύσης υλικών, όπως είναι φωσφολιπίδια και δενδριμερή ή φωσφολιπίδια και πολυμερή. Τα πλεονεκτήματα αυτών των νανοφορέων απορρέουν από τις δυνατότητες της ελεγχόμενης αποδέσμευσης των φαρμακομορίων και της βελτίωσης των ιδιοτήτων της απορρόφησης, της βιοκατανομής, του μηχανισμού και της απέκκρισης του φαρμακομορίου.

Σύμφωνα με τη πρόσφατη βιβλιογραφία, η κατανομή του μεγέθους των νανοσωματιδίων, οι φυσικοχημικές ιδιότητες και η σταθερότητα σε διαφορετικά μέσα θεωρούνται σημαντικά για την πρόταση ενός νέου κανονιστικού πλαισίου για προϊόντα της νανοκλίμακας και νανοφαρμακευτικών προϊόντων. Η μορφολογία και το σχήμα, καθώς και η ισορροπία σχήματος και μορφολογίας αυτών των συστημάτων είναι ευθέως σχετιζόμενα με την κολλοειδή και βιολογική τους συμπεριφορά. Μελέτες των κολλοειδών ιδιοτήτων χρησιμοποιώντας λιποσωματικά και πολυμερικά νανοσωματίδια χρησιμοποιώντας τη fractal γεωμετρία, έχουν ήδη εμφανιστεί στη βιβλιογραφία.

Επιπρόσθετα, η θερμική ανάλυση φωτίζει μέσω μίας νέας επιστημονικής θεώρησης τα φάρμακα ως βιοϋλικά και όχι ως απλά υλικά. Στις φαρμακευτικές επιστήμες, μόνο ελάχιστες από τις χρησιμοποιούμενες τεχνικές δίνουν πληροφορίες σχετικές με φαινόμενα όπως είναι η συσσωμάτωση. Καθώς τα φαρμακευτικά σκευάσματα γίνονται όλο και πιο σύνθετα και ο πλήρης χαρακτηρισμός τους πιο πολύπλοκος, οι παραγωγοί έχουν πραγματοποιήσει μία εξαιρετική εργασία για να συμβαδίζουν με μεγαλύτερη ακρίβεια και ευαισθησία με τη σύγχρονη οργανολογία. Ειδικότερα, οι τεχνολογίες που εφαρμόζονται στη μεταφορά φαρμάκων εστιάζουν στη σύνδεση μεταξύ των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών (πολυμορφισμός, ρευστότητα, φορτίο

επιφανείας, θερμοτροπική συμπεριφορά της λιποσωμιακής μεμβράνης, κλπ.) και των κυτταρικών μεμβρανών με την τροποποίηση της φαρμακοκινητικής και της βιοκατανομής των φαρμακομορίων, καθώς και της χρήσης των φορέων για τη μείωση των ανεπιθύμητων ενεργειών. Η χημική και η φυσική κατάσταση, καθώς και η βιολογική σταθερότητα είναι κάποιες από τις φυσικοχημικές παραμέτρους των λιποσωμάτων, οι οποίες θα πρέπει να προσδιορίζονται ώστε τα λιποσώματα που χρησιμοποιούνται στη φαρμακευτική και στην ιατρική να είναι πλήρως χαρακτηρισμένα. Αναμφίβολα, αυτές οι παράμετροι επηρεάζουν τη φυσική και τη χημική σταθερότητα κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παρασκευής αλλά και της αποθήκευσης των φαρμακευτικών προϊόντων, και μελετώνται κάτω από το πρίσμα της θερμικής ανάλυσης. Τέλος, τα κανονιστικά ζητήματα σχετικά με τη διαδικασία ανάπτυξης των φαρμάκων έχουν συμπεριλάβει τη θερμική ανάλυση ως μία πολύτιμη τεχνική για την μελέτη των φυσικών και ενεργειακών ιδιοτήτων των φαρμακομορίων και των εκδόχων, καθώς και των βιονανοϋλικών.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών μέσω της fractal ανάλυσης και των μεταβολών της θερμοτροπικής συμπεριφοράς των DPPC λιποσωμάτων, που προκαλούνται από την ενσωμάτωση της χοληστερόλης, του δενδριμερούς PAMAM, και του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες MPOx-2. Μία πληθώρα τεχνικών σκέδασης φωτός και η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης χρησιμοποιήθηκαν για να εξαχθούν πληροφορίες για τα μορφολογικά (σε διαφορετικά μέσα διασποράς) και τα θερμοδυναμικά χαρακτηριστικά των λιποσωμιακών νανοφορέων, αντίστοιχα. Υπογραμμίζεται ότι αυτή η ιδέα μπορεί να προωθήσει μία αναλυτική προσέγγιση που βασίζεται στα μορφολογικά και θερμοτροπικά χαρακτηριστικά των καινοτόμων συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων, η οποία είναι πολύ χρήσιμη στην κατανόηση της κολλοειδούς συμπεριφοράς των συμβατικών και των χιμαιρικών λιποσωμάτων.

11.1.1 Φυσικοχημικός, μορφολογικός και θερμοδυναμικός χαρακτηρισμός των λιποσωματικών συστημάτων

Τα φυσικοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των DPPC, DPPC:cholesterol (9:1 μοριακός λόγος), DPPC:PAPAM G4 (9:1 μοριακός λόγος) και DPPC:MPOx-2 (9:1 μοριακός λόγος) λιποσωμάτων σε υδατικά (νερό HPLC καθαρότητας και PBS) και βιολογικά (FBS) μέσα παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.1.

Η R_h των DPPC λιποσωμάτων αυξήθηκε από τα 100nm περίπου στο 1μm κατά τη διάρκεια μία μελέτης σταθερότητα 20 ημερών σε νερό HPLC καθαρότητα (Εικόνα 11.2) και η κινητική της συσσώματωσης, η οποία θεωρείται ταχεία περιγράφεται από μία μηδενοταξική κινητική (Πίνακας 11.1).

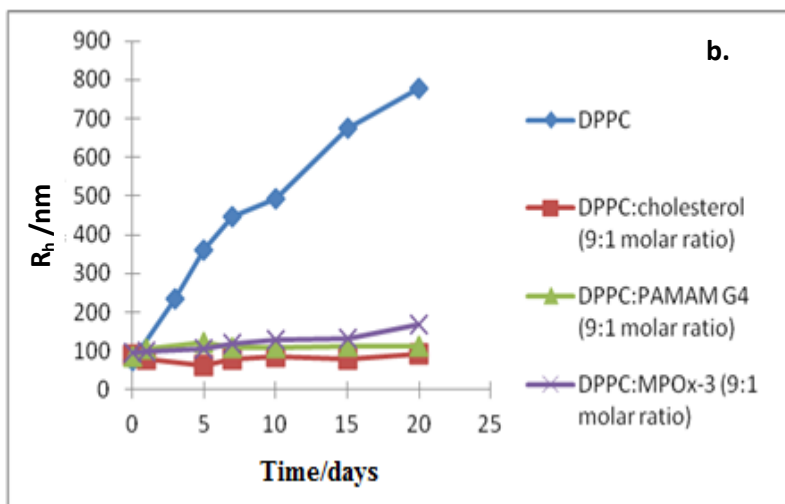
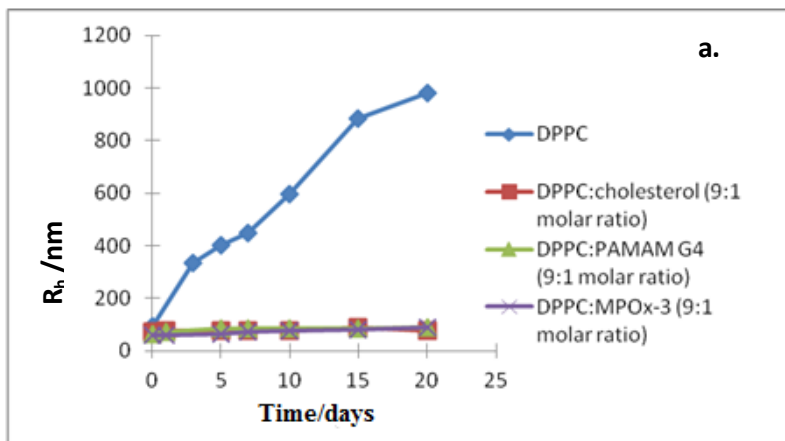
Πίνακας 11.1: Τα φυσικοχημικά και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και η κινητική της συσσωμάτωσης των λιποσωμιακών νανοφορέων σε διαφορετικά μέσα διασποράς.

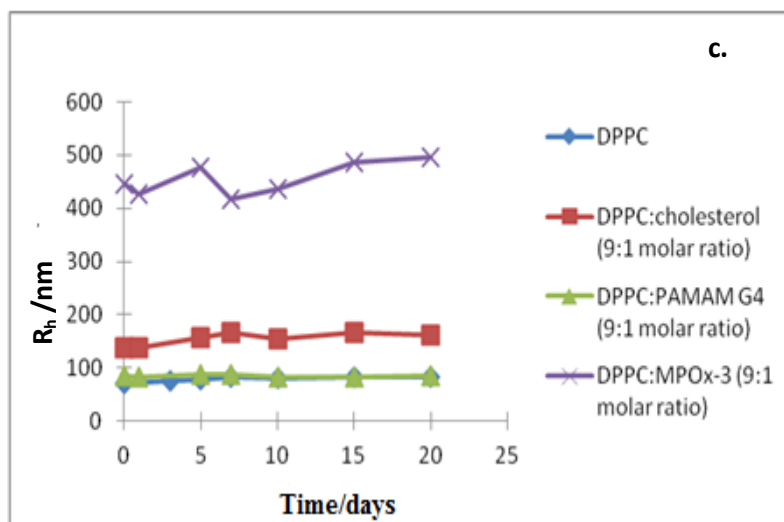
Σύσταση	$T_{\text{onset,m}}$ (°C)	T_m (°C)	$\Delta T_{1/2\text{ m}}$ (°C)	ΔH_m (J/mol)
DPPC	41.2 ±0.1	42.3±0.03	1.3±0.0	-45.4±1.4
DPPC:cholesterol (9:1 μοριακός λόγος)	38.0 ±5.3	43.0±1.5	3.9±4.9	-0.60±0.3
DPPC:PAMAM G4 (9:1 μοριακός λόγος)	41.3 ±0.1	42.7±0.6	1.2±0.1	-17.9±1.6
DPPC:MPOx-2 (9:1 μοριακός λόγος)	41.2 ±0.3	42.3±0.1	1.4±0.3	-24.4±0.5

Θα πρέπει να σημειωθεί πως το DPPC λιποσωμιακό σύστημα είναι πιθανό από φυσικής άποψης να ακολουθεί μία μη γραμμική κινητική συσσωμάτωσης. Σε αυτή τη μελέτη, η ανάλυση της κινητικής της συσσωμάτωσης έχει αξιολογηθεί με γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης, ακόμα και αν ο συντελεστής συσχέτισης σε αυτήν την περίπτωση δεν είναι κατάλληλος για την περιγραφή αυτής της διαδικασίας της συσσωμάτωσης, πραγματοποιήθηκε μόνο για λόγους σύγκρισης μεταξύ των διαφορετικών παρασκευασθέντων λιποσωμιακών συστημάτων.

Το μέγεθος των DPPC λιποσωμάτων στο FBS αυξήθηκε περίπου 25nm σε σύγκριση με το νερό HPLC καθαρότητα, πιθανότητα εξαιτίας της μεμβρανικής διαπερατότητας σε κάποια ιόντα, τα οποία δημιουργούν οσμωτικές δυνάμεις, οι οποίες οδηγούν σε απομάκρυνση του ύδατος από το εσωτερικό των λιποσωμάτων. Η d_f βρέθηκε ίση με 2.45 για τα λιποσώματα στο νερό HPLC καθαρότητας (Πίνακας 11.1). Μείωση της κλασματικής διάστασης από 2.1 σε ένα 1.8 που παρατηρήθηκε για τα λιποσώματα σύστασης DPPC στο FBS (Πίνακας 11.1). Στη βιβλιογραφία, έχει αναφερθεί πως η μείωση της κλασματικής διάστασης από 2.5 σε 1.8 πραγματοποιείται καθώς η ιονική

ισχύς αυξάνεται. Η τιμή της d_f δεν μεταβλήθηκε για μία χρονική περίοδο 20 ημερών παρά την παρατηρούμενη συσσωμάτωση. Η Πλευρική Σύσσωμάτωση Συμπλεγμάτων, η οποία είναι μία τρισδιάστατη ανάπτυξη, μπορεί να είναι μία εξήγηση για την προαναφερθείσα παρατήρηση όσον αφορά την μορφολογία των DPPC λιποσωματικών εναιωρημάτων σε υδατικά μέσα.





Εικόνα 11.2. Μελέτη σταθερότητας των λιποσωμιακών σκευασμάτων σε **a.** νερό HPLC καθαρότητας, **b.** PBS, και **c.** FBS.

Η λιποσωμιακή σταθερότητα για τα λιποσώματα σύστασης DPPC:cholesterol (9:1 μοριακός λόγος) σε υδατικά μέσα (Εικόνες 11.2(a), (b)) αποδεικνύει πως μία άλλη δύναμη είναι υπεύθυνη για την αποφυγή της συσσωμάτωσης, Πρόκειται για την ενέργεια ενυδάτωσης, η οποία προβλέπεται από την επέκταση της θεωρίας DLVO. Οι τιμές d_f δεν παρουσιάζουν σημαντική στατιστική διαφοροποίηση στο βιολογικό μέσο σε σύγκριση με τα υδατικά μέσα λόγω της παρουσίας της χοληστερόλης (Πίνακας 11.1). Είναι πιθανό πως η πρωτεϊνική σύνδεση στο FBS δεν παρουσιάζει σημαντική διαφοροποίηση της μορφολογίας των λιποσωμάτων σε σύγκριση με τα υδατικά μέσα (Πίνακας 11.1).

Επιπρόσθετα, η μορφολογία των λιποσωμάτων σύστασης DPPC:MPOx-2 (9:1 μοριακός λόγος), όπως ποσοτικοποιείται από την d_f , στο νερό HPLC καθαρότητας και στο PBS, έδειξε μία μικρή διαφορά, η οποία δεν είναι σημαντική σε σύγκριση με το FBS, εξαιτίας της ενσωμάτωσης της συμπολυμερικής αλυσίδας (Πίνακας 11.1). Αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν πως οι πολυμερικές αλυσίδες προκαλούν κάποιες μορφολογικές διαταράξεις, όταν εισάγονται στα λιπιδικά μείγματα που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή της λιποσωμιακής μεμβράνης, με ιδιότητες στερεοχημικής σταθεροποίησης και/ή αποφυγής του ανοσοποιητικού συστήματος. Η βιομοριακή γλυπτική των MPOx-2 βαθμιδωτών συμπολυμερών κατά συστάδες διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο για αυτή τη φαινομενολογία. Η αλυσίδα

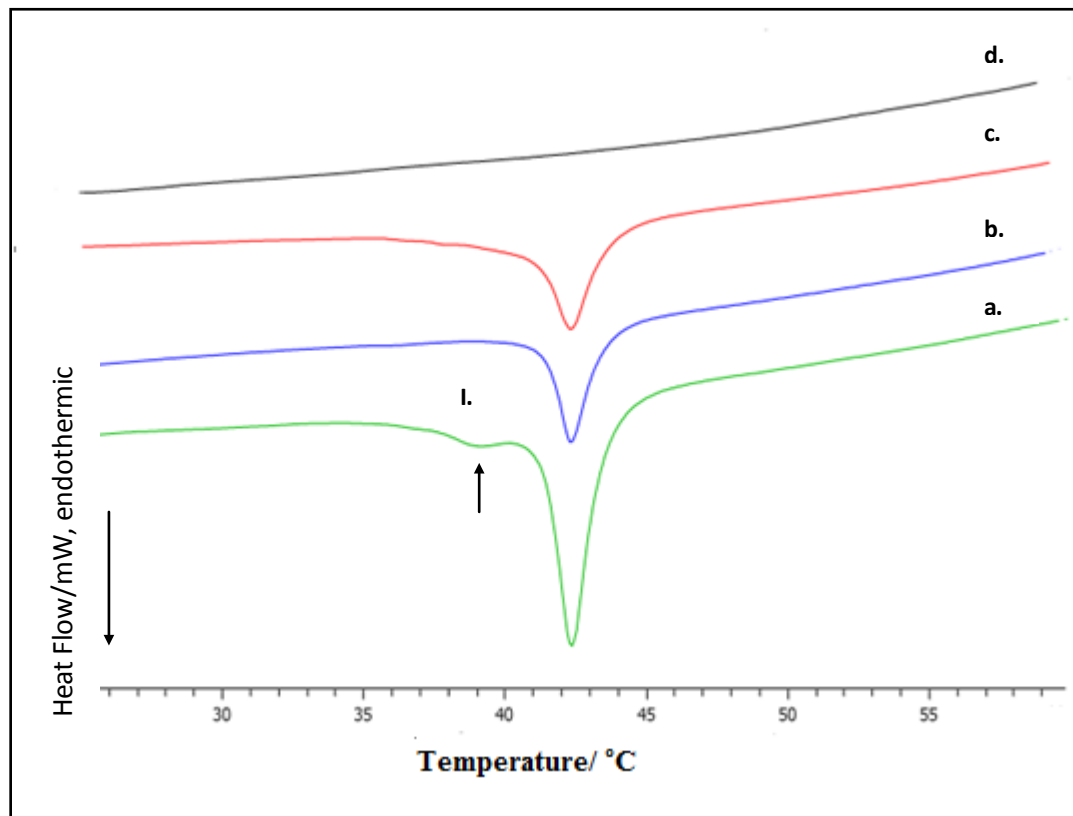
του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες αναμένεται να διαθέτει πολλαπλά σημεία εισόδου και εξόδου στη λιπιδική μεμβράνη, σε σύγκριση με τις συζεύξεις λιπιδίων-υδρόφιλων πολυμερών και αμφίφιλων συμπολυμερών κατά συστάδες, όπου το υδρόφοβο τμήμα ενσωματώνεται στη λιπιδική μεμβράνη και η υδρόφιλη πολυμερική αλυσίδα αγκυροβολείται πάνω στη μεμβράνη.

Επιπρόσθετα, τα λιποσώματα σύστασης DPPC:PAPAM G4 (9:1 μοριακός λόγος) παρουσίασαν μία απροσδόκητη συμπεριφορά όσον αφορά τον περιορισμό του φαινομένου της συσσωμάτωσης, πιθανότητα λόγω της ενσωμάτωσης του PAPAM G4 στα DPPC λιποσώματα, που προκαλεί μία δομική αναδιάταξη των λιποσωματικών διπλοστοιβάδων (Εικόνα 11.2, Πίνακας 11.1). Από την άλλη πλευρά, οι τιμές d_f μεταβλήθηκαν σημαντικά στο FBS σε σύγκριση με το υδατικό μέσο (Πίνακας 11.1).

Η DSC χρησιμοποιήθηκε για τα μελετήσει τις επιδράσεις των διαφορετικών βιοϋλικών (χοληστερόλης, MPOx-2 και PAMAM G4) στη θερμοτροπική συμπεριφορά των DPPC λιποσωμάτων και στην ικανότητά τους να επηρεάσουν τη μεμβρανική ρευστότητα. Είναι καλά τεκμηριωμένο στη βιβλιογραφία ότι οι DPPC διπλοστοιβάδες υφίστανται μετάβαση φάσης με την αύξηση της θερμοκρασίας. Οι καμπύλες DSC που λήφθηκαν για τα συμβατικά DPPC λιποσώματα και για τα χημικά DPPC λιποσώματα που περιείχαν χοληστερόλη, MPOx-2 και PAMAM G4 (9:1 μοριακός λόγος) απεικονίζονται στην Εικόνα 11.3, ενώ οι μεταβολές των θερμοδυναμικών παραμέτρων συνοψίζονται στον Πίνακα 11.2.

Πίνακας 11.2: Θερμοτροπικές παράμετροι των λιποσωμιακών νανοφορέων (θέρμανση)

Σύσταση	Μέσο διασποράς	R_h (nm)	d_f	Κινητική συσσωμάτωσης
DPPC	Νερό HPLC καθαρότητας	56.32	2.45	$R_h(t) = 101.7t + 55.196 / r^2 = 0.7415$
	PBS	75.3	2.42	$R_h(t) = 34.092 + 145.42 / r^2 = 0.9616$
	FBS	70.24	1.86	$R_h(t) = 1.9193t + 71.434 / r^2 = 0.8061$
DPPC: cholesterol	Νερό HPLC καθαρότητας	73.30	2.27	Φυσικοχημικά σταθερό
	PBS	87.50	2.24	Φυσικοχημικά σταθερό
	FBS	137.57	2.40	$R_h(t) = 4.362t + 135.96 / (r^2 = 0.6617)$
DPPC: PAMAM G4	Νερό HPLC καθαρότητας	62.45	1.91	$R_h(t) = 3.7196t + 64.828 / (r^2 = 0.7590)$
	PBS	87.50	1.87	Φυσικοχημικά σταθερό
	FBS	85.68	1.83	Φυσικοχημικά σταθερό
DPPC:MPOx-2	Νερό HPLC καθαρότητας	58.50	2.29	$R_h(t) = 13.353t + 67.93 / (r^2 = 0.8257)$
	PBS	97.00	2.32	$R_h(t) = 3.28t + 94.647 / (r^2 = 0.9463)$
	FBS	446.67	2.62	Φυσικοχημικά σταθερό



Εικόνα 11.3. DSC θερμογράμματα των **a.** DPPC, **b.** DPPC:PAMAM G4 (9:1 μοριακός λόγος), **c.** DPPC:MPOx-2 (9:1 μοριακός λόγος) and **d.** DPPC:cholesterol (9:1 μοριακός λόγος) λιποσωμάτων.

Η καμπύλη για τα συμβατικά DPPC λιποσώματα φαίνεται να είναι διαφορετική από αυτή που λαμβάνεται συνήθως για τις λιπιδικές διπλοστοιβάδες. Συγκεκριμένα, ελλείπει οποιουδήποτε πρόσθετου συστατικού, τα DPPC λιπίδια παρουσιάζουν ένα φαινόμενο προμετάπτωσης στους 36.1°C που ακολουθείται από ένα φαινόμενο κύριας μετάπτωσης, το οποίο αντιστοιχεί στους 41.7° C. Αυτή η παρατήρηση δείχνει ότι η κυστιδική δομή των λιποσωμάτων έχει ένα διαφορετικό θερμοδυναμικό περιεχόμενο, το οποίο αντιστοιχεί σε μία διαφορετική θερμοτροπική συμπεριφορά. Μπορεί να υποτεθεί πως η κυρτότητα της λιποσωματικής δομής διαδραματίζει σημαντικό στη θερμοδυναμική τους συμπεριφορά. Ειδικότερα, είναι πράγματι γνωστό ότι η συνεργασιμότητα κατά τη μετάβαση φάσης εξαρτάται από τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της λιποσωματικής μεμβράνης και αυξάνεται με την αύξηση της κυρτότητας των κυστιδίων. Όμως, είναι σημαντικό ώστε να ληφθεί υπόψη πως το θερμογράμμα των DPPC λιποσωματικών φορέων εμφανίζει μετασταθείς φάσεις (I στην Εικόνα 11.3) και λίγο ποσοστό σχετίζεται με την προμετάπτωση των πολικών κεφαλών των φωσfolιπιδίων, αλλά με μία διαφορετική συνεισφορά στη θερμοδυναμική ισορροπία των DPPC λιποσωμάτων σε σύγκριση με αυτή των λιπιδικών διπλοστοιβάδων. Με άλλα λόγια, αυτές οι μετασταθείς φάσεις μπορούν να συσχετισθούν τη δομή/μορφολογία των λιποσωμάτων. Επιπλέον, η κορυφή της κύριας μετάπτωσης έχει μετατοπιστεί σε υψηλότερη θερμοκρασία υποδεικνύοντας διαφορετική δομική αναδιάρθρωση σε σύγκριση με τις DPPC λιπιδικές διπλοστοιβάδες (Πίνακας 11.2, Εικόνα 11.3). Ειδικότερα, η βασική καμπύλη των DPPC λιποσωματικών κυστιδίων αντιστοιχεί σε μία θερμοτροπική συμπεριφορά όπως αυτή απεικονίζεται στην Εικόνα 11.3, και αυτή η φαινομενολογία παρατηρείται καθώς η αυτό-συναρμολόγηση των λιποσωματικών συστατικών είναι διαφορετική όταν αυτά βρίσκονται σε διασπορά (Εικόνα 11.3).

Η ενσωμάτωση των μακρομοριακών βιοϋλικών (όπως του PAMAM G4 και του MPOx-2) είχε ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της θερμοτροπικής συμπεριφοράς των DPPC λιποσωμάτων επηρεάζοντας μόνο την ενθαλπία της κύριας μετάβασης φάσης, ΔH (Πίνακας 11.2, Εικόνα 11.3). Όλες οι άλλες θερμοδυναμικές παράμετροι παρέμειναν ανεπηρέαστες. Αυτό το γεγονός υποδεικνύει πως οι αλληλεπιδράσεις αυτών των συστατικών με τα DPPC λιποσώματα επηρεάζει την κινητικότητα των λιπιδικών πολικών κεφαλών, η οποία θεωρείται ως σημαντική για όλα τα βιοϋλικά που ενσωματώθηκαν. Η θερμοκρασία της κύριας μετάβασης φάσης, η οποία

αντιστοιχεί στην κινητικότητα των λιπαρών αλυσίδων των φωσφολιπιδίων παραμένει ανεπηρέαστη, καθώς και όλες οι άλλες θερμοτροπικές παράμετροι (Πίνακας 11.2). Η μείωση των τιμών ΔH θα πρέπει να συσχετισθεί με την μείωση του «κλάσματος του αποτελεσματικού όγκου» των λιπιδικών νανο-περιοχών που παραμένουν ανεπηρέαστες και συνεχίζουν να προκαλούν τη μετάβαση, μετά την ενσωμάτωση των μακρομοριακών συστατικών εντός της λιποσωμιακής μεμβράνης. Η ενσωμάτωση της χοληστερόλης σε 9:1 μοριακό λόγο οδηγεί σε μοντέλο που προσομοιάζει τη συμπεριφορά διαλύματος, και υποδεικνύει μία διαφορετική θερμοτροπική/χωρική ενσωμάτωση της χοληστερόλης στα λιποσώματα σε σύγκριση με αυτή της λιπιδικής διπλοστοιβάδας.

Ακόμη, παρατηρήθηκε απουσία της μετασταθούς φάσης τύπου I για τα λιποσώματα σύστασης DPPC:PAPAM G4 (9:1 μοριακός λόγος) και DPPC:MPOx-2 (9:1 μοριακός λόγος). Η επίδραση των συστατικών PAPAM G4 και MPOx-2 στη θερμοτροπική συμπεριφορά μπορεί να αποδοθεί κατά κύριο λόγο στη σημαντική διαφορά της μοριακής διαμόρφωσης (Πίνακας 11.2, Εικόνα 11.3). Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η σταθερότητα και η συνεργασιμότητα κατά την κύρια μετάβαση της χημικής λιποσωμιακής μεμβράνης πραγματοποιούνται εξαιτίας το μεγέθους των κυστιδίων με τη μικρότερη κυρτότητα της μεμβράνης, όπως υποδεικνύεται από την κλασματική διάσταση του συστήματος.

Σκοπός της εργασίας είναι να συσχετισθεί η σταθερότητα της χημικής λιποσωμιακής μεμβράνης όπως βρέθηκε από τη θερμοτροπική συμπεριφορά των λιποσωμάτων με την κλασματική διάστασή τους και την κολλοειδή συμπεριφορά τους. Η μετασταθής φάση I θα μπορούσε να θεωρηθεί ως «φυσική πρόσμειξη», η οποία οδηγεί σε «φυσική ασυμβασία» και συνεπώς σε συσσωμάτωση των DPPC λιποσωμάτων σε νερό HPLC καθαρότητας. Από την άλλη πλευρά, η έλλειψη της «φυσικής πρόσμειξης», η οποία είναι η αιτία για την εμφάνιση εντροπικών φαινομένων είναι ο λόγος για την παρατηρούμενη κολλοειδή σταθερότητα των DPPC λιποσωμάτων με ενσωματωμένα τα βιοϋλικά PAMAM G4 και MPOx-2 (σε μοριακό λόγο 9:1). Συγκεκριμένα, η μετασταθής φάση I προάγει τη συσσωμάτωση των DPPC λιποσωμάτων από θερμοδυναμικής άποψης (Εικόνα 11.2) και η απουσία της προάγει την κολλοειδή σταθερότητα, παρά του γεγονότος ότι η θερμοκρασία κύριας μετάβασης παραμένει ανεπηρέαστη, καθώς και η ΔH (Πίνακας 11.2). Από την άλλη πλευρά, από φυσικοχημικής άποψης, ο λόγος της συσσωμάτωσης των DPPC

λιποσωμάτων είναι η ύπαρξη των van der Waals αλληλεπιδράσεων. Εδώ, θα πρέπει να προστεθεί ότι οι στερικές επιδράσεις που δημιουργούνται από τη μακρομοριακή φύση των συστατικών PAMAM G4 και MPOx-2 επίσης συνεισφέρουν στην κολλοειδή σταθερότητα και στην διαμόρφωση της μορφολογίας των χημικών λιποσωμάτων.

Η θερμοδυναμική άποψη που αναδύεται από την παρούσα μελέτη είναι πως τα λιποσώματα σύστασης DPPC:PAMAM G4 (9:1 μοριακός λόγος) και DPPC:MPOx-2

(9:1 μοριακός λόγος) συγκέντρωσαν όλα τα ιδανικά χαρακτηριστικά ώστε να χρησιμοποιηθούν ως αξιοποιήσιμοι νανοφορείς φαρμακομορίων, αν ληφθεί υπόψη μας την υψηλή φυσικοχημική / κολλοειδή σταθερότητα σε υδατικά και βιολογικά μέσα.

11.2 Συμπεράσματα

Εν κατακλείδι, η πειραματικά προσδιορισμένη κλασματική διάσταση και οι θερμοτροπικές παράμετροι απεικονίζουν με έναν κατανοητό τρόπο τη μορφολογική πολυπλοκότητα και τη συμπεριφορά της αυτό-συναρμολόγησης των λιποσωματικών νανοφορέων, αντίστοιχα. Αυτό, θα μπορούσε με τη σειρά του να είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την ανάπτυξη και τον χαρακτηρισμό καινοτόμων νανοφορέων για βιοϋαστικά μόρια, με πλήρη γνώση των δομικών και θερμοδυναμικών χαρακτηριστικών τους. Μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα πως η fractal ανάλυση μπορεί να προάγει μία νέα αναλυτική προσέγγιση που βασίζεται στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των λιποσωματικών νανοφορέων συμπληρωματικών με τις τεχνικές της θερμικής ανάλυσης. Οι έρευνα με την DSC επιτρέπει την βαθύτερη κατανόηση των φυσικοχημικών παραγόντων οι οποίοι αιτιολογούν την κολλοειδή συμπεριφορά των καινοτόμων λιποσωματικών συστημάτων. Από φαρμακευτικής άποψης, οι

τεχνικές θερμικής ανάλυσης χρησιμοποιούνται για να αξιολογήσουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες των φαρμακομορίων και τις αλληλεπιδράσεις τους σε βιολογικό επίπεδο, καθώς επίσης και τη συμπεριφορά τους κατά τη διαδικασία της μορφοποίησης. Τα κανονιστικά ζητήματα που αφορούν το σχεδιασμό και την ανάπτυξη λιποσωματικών συστημάτων περιλαμβάνουν έναν συνδυασμό τεχνικών για

το δομικό και θερμοδυναμικό χαρακτηρισμό με σκοπό τη πλήρη σκιαγράφηση της φυσικοχημικής / θερμοδυναμικής ισορροπίας, η οποία βρίσκεται σε συμφωνία με την ισορροπία σχήματος / μορφολογίας

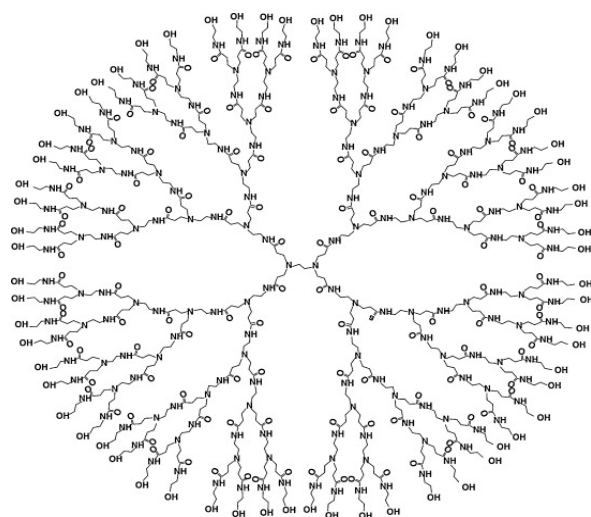
$T_{\text{onset, m}}$: θερμοκρασία κατά την οποία το θερμικό φαινόμενο αρχίζει; T_m : θερμοκρασία κατά την οποία η θερμοχωρητικότητα υπό σταθερή πίεση είναι μέγιστη (ΔC_p); ΔH : η ενθαλπία κύρια μετάβασης κανονικοποιημένη ανά mol του λιποσωμιακού συστήματος; $\Delta T_{1/2}$: το ήμισυ του πλάτους της κορυφής κύριας μετάβασης

a.

b.

d.

c.



Εικόνα 11.1. Χημικές δομές των **a.** DPPC λιπιδίου, **b.** χοληστερόλης, **c.** PAMAM G4 και **d.** MPOx-2 βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες.

12 Οι μετασταθείς φάσεις ως ρυθμιστές της βιοφυσικής συμπεριφοράς των λιποσωματικών μεμβρανών: Ο ρόλος της βιοφυσικής γλυπτικής του πολυμερικού ξενιστή.

12.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Η θερμική ανάλυση θεωρείται από τις πιο δημοφιλείς τεχνικές στην Επιστήμη των Υλικών και στην Μηχανική. Η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης είναι μία ιδιαίτερα ευαίσθητη τεχνική για τη μελέτη των θερμοτροπικών ιδιοτήτων αρκετών διαφορετικών μακρομορίων. Η DSC έχει εφαρμοστεί στις φαρμακευτικές επιστήμες για τη μελέτη των εκδόχων, των βιοϋλικών και των φαρμακομορίων. Εφαρμογές της τεχνικής αυτής σε λιπιδικά συστήματα περιλαμβάνουν τη μέτρηση διαφορετικών θερμοδυναμικών παραμέτρων και έναν λεπτομερή χαρακτηρισμό της θερμοτροπικής και της συμπεριφοράς μετάβασης φάσης. Η τεχνολογία των καινοτόμων συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων της Νανοτεχνολογίας συνδέει τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (πολυμορφισμός, ρευστότητα, φορτίο επιφανείας κ.ά.) με τη μεταβολή της φαρμακοκινητικής και της βιοκατανομής του φαρμακομορίου και κατά επέκταση της μείωσης των ανεπιθύμητων ενεργειών τους.

Ο συνδυασμός των λιπιδίων με τα συμπολυμερή κατά συστάδες μπορεί να οδηγήσει σε μία νέα κατηγορία βιοϋλικών και υπερμοριακών δομών, τα οποία συνδυάζουν τις ιδιότητες των βιοϋλικών και των δύο κατηγοριών. Μεμβράνες και κυστίδια παρασκευάζονται από πολυμερή και λιπίδια, που οδηγούν στο σχηματισμό χιμαιρικών λιποσωμάτων και/ή πολυμεροσωμάτων με stealth ιδιότητες και βελτιωμένη βιολογική συμπεριφορά. Ένας μεγάλος αριθμός μελετών υποδεικνύει ότι είναι πιθανό να επιτευχθεί πρόφηση ή ενσωμάτωση των συμπολυμερών κατά συστάδες σε προσχηματισμένα λιποσώματα ή αυτό-συναρμολογούμενες υπερδομές σε υδατικά μέσα. Γενικά, η ενσωμάτωση των συμπολυμερών βελτιώνει τη φυσικοχημική σταθερότητα των μεικτών/χιμαιρικών συστημάτων. Επιπρόσθετα, οι αλληλεπιδράσεις και ο μηχανισμός ενσωμάτωσης μεταξύ των λιπιδίων και των συμπολυμερών κατά συστάδες είναι εξαιρετικής σημασίας εξαιτίας των φαρμακευτικών τους εφαρμογών. Το φαινόμενο διαχωρισμού φάσεων και η πλευρική διάχυση των λιπιδίων είναι θεμελιώδη ζητήματα, τα οποία σχετίζονται με την οργάνωση και τις ιδιότητες των λιπιδικών ή μεικτών λιπιδικών μεμβρανών. Ο

διαχωρισμός φάσεων των λιπιδικών διπλοστοιβάδων κατέχει εξέχοντα ρόλο όχι μόνο στην οργάνωση και στη δομή της μεμβράνης, αλλά και στα συνακόλουθα μορφολογικά χαρακτηριστικά που λαμβάνουν χώρα στην επιφάνεια των μεικτών μεμβρανών, καθώς επίσης συνεισφέρουν και στη δημιουργία αλληλεπιδράσεων με τα συστατικά του ορού του πλάσματος σε βιολογικά μέσα.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη των μεταβολών των φυσικοχημικών, μορφολογικών και θερμοτροπικών χαρακτηριστικών των συμβατικών, stealth και χημικών DPPC λιποσωμάτων, οι οποίες προκλήθηκαν από την ενσωμάτωση PEG-ylated λιπιδίου και συμπολυμερών κατά συστάδες με διαφορετική αρχιτεκτονική και σύσταση. 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[Methoxy(Polyethylene glycol)-3000] (DPPE-PEG 3000) είναι το PEGylated λιπίδιο, poly(ethylene oxide)-block-poly(ε-caprolactone) (PEO-b-PCL) είναι το πολυμερές κατά συστάδες και poly(2-methyl-2-oxazoline)-grad-poly(2-phenyl-2-oxazoline) (MPOx) είναι το βαθμιδωτό συμπολυμερές κατά συστάδες, τα οποία επιλέχθηκαν για να την παρασκευή των λιποσωματικών συστημάτων. Αυτά τα πολυμερή με τη διαφορετική σύσταση που χρησιμοποιήθηκαν με το λιπίδιο DPPC για να σχηματιστούν χημικά λιποσωματικά συστήματα. Τεχνικές σκέδασης του φωτός και Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης χρησιμοποιήθηκαν για να εξαχθούν πληροφορίες σχετικά με τη φυσικοχημική / θερμοδυναμική ισορροπία για τα παρασκευασθέντα λιποσωματικά συστήματα. Η παρούσα μελέτη έχει ως στόχο να τοίσει πως η διαφορετική μακρομοριακή αρχιτεκτονική του πολυμερούς επηρεάζει τη θερμοτροπική συμπεριφορά της λιποσωματικής μεμβράνης δημιουργώντας νέες μετασταθείς φάσεις, και συνεπώς προάγει νέα δεδομένα στον τομέα της βιοφυσικής με στόχο το σχεδιασμό και την ανάπτυξη μεικτών λιποσωμάτων. Η παραπάνω προέγγιση συνδυάζει τη βιοφυσική και τη θερμοδυναμική για το σχεδιασμό καινοτόμων δοσολογικών συστημάτων (όπως είναι τα λιποσώματα), η οποία είναι ελκυστική για την ανάπτυξη νέων και καινοτόμων φαρμάκων. Με άλλα λόγια, κύριος στόχος της παρούσας μελέτης είναι να διερευνήσει τη σχέση δομής-συμπεριφοράς της αυτό-συναρμολόγησης της λιποσωματικής μεμβράνης, η οποία οδηγεί σε καλύτερη κατανόηση της θερμοδυναμικής και της βιοφυσικής των καινοτόμων συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων της Νανοτεχνολογίας.

Τα μοριακά χαρακτηριστικά των συμπολυμερών παρουσιάζονται στον Πίνακα 12.1.

Πίνακας 12.1. Τα μοριακά χαρακτηριστικά για τα συμπολυμερή.

Δείγμα	M_w	M_w/M_n	%wt υδρόφοβο συστατικό
PEO-b-PCL -1	10,600	1.43	53/ PCL
PEO-b-PCL -2	7,700	1.18	30/PCL
MPOx-1	5,200	1.14	28/ PhOxz
MPOx-2	3,300	1.26	39/ PhOxz

12.1.1 Φυσικοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των συμβατικών, stealth και χημικών λιποσωμάτων.

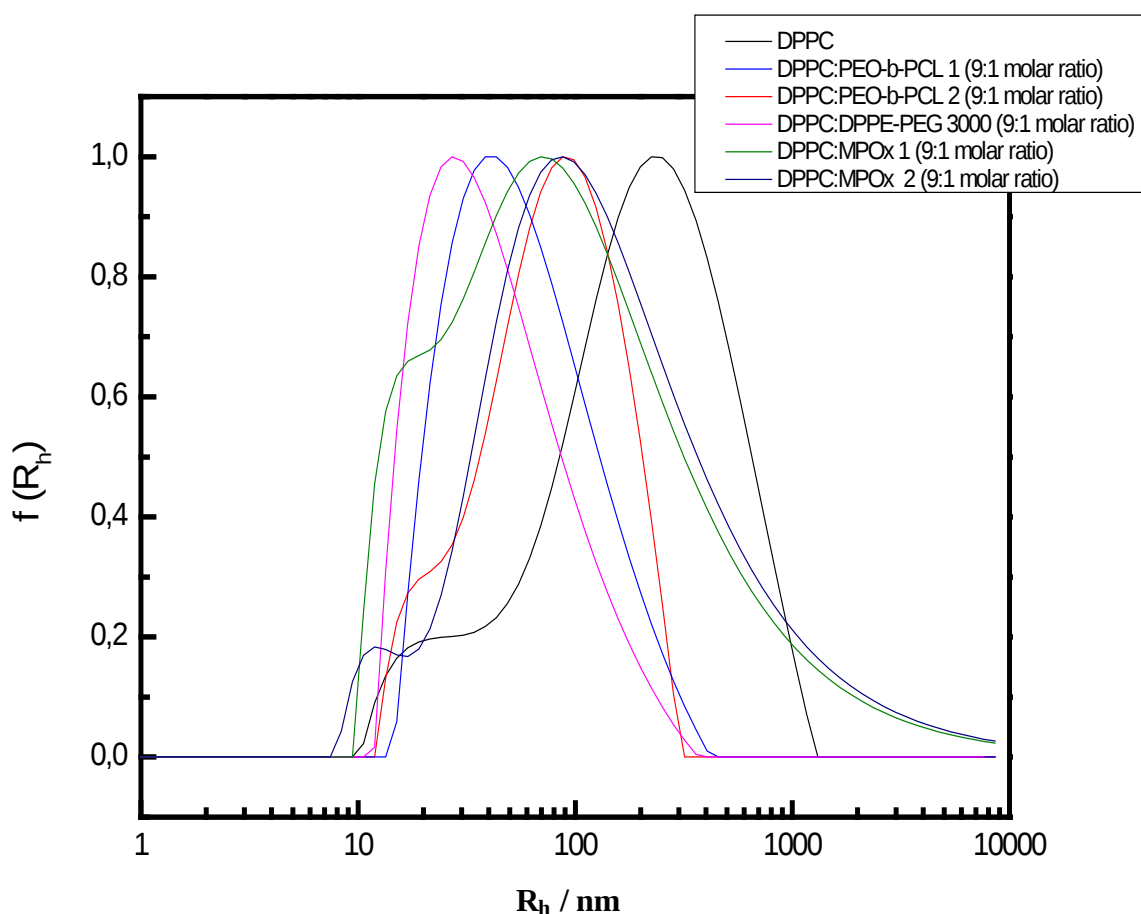
Τα φυσικοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά, με fractal ανάλυση, των συμβατικών, stealth και χημικών λιποσωμάτων σε νερό HPLC καθαρότητας παρουσιάζονται στον Πίνακα 12.2. Τα συμβατικά DPPC λιποσώματα παρουσιάζουν το μεγαλύτερο μέγεθος σε σύγκριση με όλα τα άλλα παρασκευασθέντα συστήματα.

Πίνακας 12.2: Τα φυσικοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των συμβατικών, stealth και χημικών λιποσωμάτων.

Σύσταση	R_h / nm	$PD.I.$	ζ -δυναμικό/ mV	d_f	R_g/R_h
DPPC	72.2±2.2	0.62±0.20	+1.0±0.1	2.4 ₆	0.99
DPPC:DPPE-PEG 3000/ 9:1 μοριακός λόγος	36.5±1.9	0.32±0.40	-32.8±0.5	1.9 ₈	1.06
DPPC:PEO-b-PCL 1/ 9:1 μοριακός λόγος	42.2±0.2	0.25±0.01	+2.6±0.5	1.8 ₆	1.02
DPPC:PEO-b-PCL 2/ 9:1 μοριακός λόγος	38.9±0.4	0.26±0.01	-6.3±0.1	1.8 ₃	1.04
DPPC:MPOx 1/ 9:1 μοριακός λόγος	58.9±0.6	0.52±0.01	1.6±0.2	2.4 ₅	0.71
DPPC:MPOx 2/ 9:1 μοριακός λόγος	62.0±2.1	0.41±0.01	+6.2±2.3	2.3 ₂	0.23

Από την άλλη πλευρά, τα stealth λιποσώματα DPPC:DPPE-PEG 3000 (9:1 μοριακός λόγος) είναι τα λιποσώματα του μικρότερου μεγέθους. Τα λιποσώματα με ενσωματωμένα τα PEO-b-PCL και MPOx συμπολυμερή κατά συστάδες και βαθμιδωτά συμπολυμερή κατά συστάδες, αντίστοιχα, δεν παρουσιάζουν τα ίδια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (μέγεθος και κατανομή μεγέθους) (Πίνακας 12.2). Τα χημικά λιποσώματα με ενσωματωμένες τις PEO-b-PCL αλυσίδες είναι μικρότερα από τα DPPC:MPOx λιποσώματα. Αυτό θα πρέπει να σχετίζεται με τα στερικά φαινόμενα τα οποία είναι παρόντα εξαιτίας της αγκυροβόλησης των PEO-b-PCL αλυσίδων στις λιπιδικές διπλοστοιβάδες. Η διαφορά μεγέθους μεταξύ των DPPC:PEO-b-PCL 1 και DPPC:PEO-b-PCL 2 είναι περίπου 5 nm (Πίνακας 12.2) και η διαφορά αυτή πιθανότητα οφείλεται στη διαφορά της %wt του υδρόφιλου

συστατικού (Πίνακας 12.1) και συνακόλουθα οι στερικές αλληλεπιδράσεις είναι εντονότερες για το PEO-b-PCL 2. Οι τιμές της πολυδιασποράς μειώνονται σημαντικά από την ενσωμάτωση του συμπολυμερούς κατά συστάδες σε σύγκριση με το βαθμιδωτό συμπολυμερές κατά συστάδες (Πίνακας 12.2, Εικόνα 12.1). Το ζ-δυναμικό των χημικών λιποσωμάτων είναι μηδενικό εξαιτίας της απουσίας μόνιμου φορτίου στην χημική λιποσωματική επιφάνεια (Πίνακας 12.1). Τα stealth λιποσώματα παρουσιάζουν αρνητικό ζ-δυναμικό που οφείλεται στην ενσωμάτωση των αρνητικά φορτισμένων DPPE-PEG 3000 λιπιδίων.



Εικόνα 12.1: Η κατανομή μεγέθους για τα συμβατικά, stealth και χημικά λιποσώματα.

Τα συμβατικά λιποσώματα παρουσίασαν τη μεγαλύτερη κλασματική διάσταση. Η ενσωμάτωση του PEG-ylated λιπιδίων και / ή των συμπολυμερών οδηγεί σε μείωση της κλασματικής διάστασης των μεικτών λιποσωμάτων. Η κλασματική διάσταση (d_f)

περίπου ίση με 2 για τα DPPC:DPPE-PEG 3000. Η κλασματική διάσταση (d_f) ήταν κοντά στο 1.8 για τα DPPC:PEO-b-PCL χημικά λιποσώματα (Πίνακας 12.2). Επιπρόσθετα, οι τιμές R_g/R_h (σημαντική παράμετρος για την κατανόηση της εσωτερικής μορφολογίας των λιποσωμάτων σε υδατικό μέσο) είναι κοντά στην μονάδα για τους χημικούς νανοφορείς με ενσωματωμένα το PEGylated λιπίδιο και τα συμπολυμερή PEO-b-PCL, αποδεικνύοντας μία μορφολογία κυστιδίου. Μία αύξηση της κλασματικής διάστασης για τους MPOx χημικούς νανοφορείς, σε σύγκριση με τα νανοςυστήματα που περιέχουν το PEGylated λιπίδιο και τα συμπολυμερή PEO-b-PCL, παρατηρήθηκε. Θα πρέπει να υπογραμμιστεί πως η μορφολογία των χημικών λιποσωμάτων με ενσωματωμένα συμπολυμερή φαίνεται να εξαρτάται από την αρχιτεκτονική του πολυμερικού συστατικού.

12.1.2 Τα θερμοτροπικά χαρακτηριστικά των συμβατικών, stealth και χημικών λιποσωμάτων

Η DSC εφαρμόστηκε για τη μελέτη των αποτελεσμάτων των διαφορετικών βιοϋλικών PEG-ylated λιπιδίου, συμπολυμερούς κατά συστάδες και βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες στη θερμοκρασία συμπεριφορά των DPPC λιποσωμάτων και στην ικανότητά τους να επηρεάσουν τη ρευστότητα και τις ιδιότητες αυτό-συναρμολόγησης της μεμβράνης. Τα θερμογράμματα που λήφθηκαν για τα κενά DPPC λιποσώματα, τα stealth και τα χημικά DPPC λιποσώματα παρουσιάζονται στις Εικόνες 12.2 και 12.3, και οι αλλαγές των θερμοδυναμικών παραμέτρων παρουσιάζονται συνοπτικά στους Πίνακες 12.3 και 12.4.

Πίνακας 12. 3: Οι θερμοδυναμικές παράμετροι των συμβατικών, stealth και χημικών λιποσωμάτων (θέρμανση).

Σύσταση	$T_{onset,m}/^{\circ}\text{C}$	$T_m / ^{\circ}\text{C}$	$\Delta T_{1/2 m}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H_m/\text{J/mol}$
DPPC	40.6 ±0.1	41.3±0.0	0.8±0.0	58.7±1.4
DPPC:DPPE-PEG 3000/	39.9 ±0.1	40.8±0.1	0.9±0.1	56.9±1.2
9:1 μοριακός λόγος				
DPPC:PEO-b-PCL 1/	37.5 ±0.1	40.7±0.0	5.3±0.6	21.2±0.7
9:1 μοριακός λόγος				
DPPC:PEO-b-PCL 2/	40.2 ±0.2	41.7±0.1	1.5±0.4	69.5±1.1
9:1 μοριακός λόγος				
DPPC:MPOx 1/	33.4 ±0.2	47.8±0.0	6.2±0.6	32.4±1.2
9:1 molar ratio				
DPPC:MPOx 2/	40.9 ±0.3	42.3±0.1	1.8±0.3	60.4±0.1
9:1 μοριακός λόγος				

$T_{onset m}$: θερμοκρασία κατά την οποία το θερμικό φαινόμενο αρχίζει; T_m : θερμοκρασία κατά την οποία η θερμοχωρητικότητα υπό σταθερή πίεση είναι μέγιστη (ΔC_p); ΔH : η ενθαλπία κύρια μετάβασης κανονικοποιημένη ανά mol του λιποσωματικού συστήματος; $\Delta T_{1/2}$: το ήμισυ του πλάτους της κορυφής κύριας μετάβασης

Πίνακας 12.4: Οι θερμοδυναμικές παράμετροι των συμβατικών, stealth και χημικών λιποσωμάτων (ψύξη).

Σύσταση	$T_{onset,m} / ^\circ\text{C}$	$T_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta T_{1/2 m} / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_m / \text{J/mol}$
DPPC	40.6 ±0.1	40.0±0.0	1.1±0.0	-52.9±1.4
DPPC:DPPE-PEG 3000/	40.2 ±0.1	39.0±0.1	1.4±0.1	-41.6±1.2
9:1 μοριακός λόγος				
DPPC:PEO-b-PCL 1/	43.4 ±0.1	40.1±0.0	5.3±0.6	-18.6±0.3
9:1 μοριακός λόγος				
DPPC:PEO-b-PCL 2/	40.9 ±0.2	39.8±0.1	1.5±0.4	-93.1±1.1
9:1 μοριακός λόγος				
DPPC:MPOx 1/	42.4 ±0.2	40.7±0.0	2.3±0.6	-58.3±1.2
9:1 μοριακός λόγος				
DPPC:MPOx 2/	42.9 ±0.3	42.0±0.1	1.1±0.3	-35.6±0.1
9:1 μοριακός λόγος				

$T_{onset m}$: θερμοκρασία κατά την οποία το θερμικό φαινόμενο αρχίζει; T_m : θερμοκρασία κατά την οποία η θερμοχωρητικότητα υπό σταθερή πίεση είναι μέγιστη (ΔC_p); ΔH : η ενθαλπία κύρια μετάβασης κανονικοποιημένη ανά mol του λιποσωματικού συστήματος; $\Delta T_{1/2}$: το ήμισυ του πλάτους της κορυφής κύριας μετάβασης

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το θερμόγραμμα των κενών DPPC λιποσωμάτων είναι διαφορετικό από αυτό που συνήθως λαμβάνεται από τις λιπιδικές διπλοστοιβάδες. Το φαινόμενο της προμετάπτωσης, το οποίο εντοπίζεται στους 36.1°C, είναι απόν. Επιπρόσθετα, η μετασταθής φάση I (Εικόνα 12.2) (η οποία δεν αντιστοιχεί στο φαινόμενο της προμετάπτωσης δεν παρατηρείται για κανένα από τα μεικτά (stealth και χημικά) λιποσώματα (Εικόνα 12.2). Η εξαφάνιση της μετασταθούς φάσης I (Εικόνα 2) είναι μία ένδειξη πως ο πολυμερικής φύσης ξενιστής τοποθετείται στην περιοχή της λιποσωματικής διπλοστοιβάδας. Οι θερμοδυναμικές παράμετροι παρέμειναν στατιστικά ανεπηρέαστες για τα DPPC λιποσώματα από την ενσωμάτωση του DPPE-PEG 3000 λιπιδίου σε σύγκριση με το λιποσωματικό σύστημα αναφοράς (DPPC λιποσώματα) (Πίνακας 12.3, Εικόνα 12.2).

Η ενσωμάτωση των συμπολυμερών κατά συστάδες PEO-b-PCL (1 και 2) οδήγησε σε μείωση της θερμοκρασίας κατά την οποία αρχίζει το θερμικό φαινόμενο ($T_{onset,m}$ - Πίνακας 2). Από την άλλη πλευρά, η θερμοκρασία της κύριας μετάβασης, η οποία αντιστοιχεί στην κινητικότητα των λιπαρών αλυσίδων των φωσφολιπιδίων, παραμένει αμετάβλητη μετά την ενσωμάτωση των συμπολυμερών κατά συστάδες (Πίνακας 12.3 και Εικόνα 12.2). Σύμφωνα με τη μετάβαση φάσης των λιποσωμάτων, κατά τη θέρμανση υπάρχει ένα αυξημένη κινητικότητα των πολικών ομάδων και διεύθυνση ύδατος στην περιοχή της διεπιφάνειας της λιπιδικής διπλοστοιβάδας. Η θερμοκρασία της κύριας μετάβασης σε μεγάλο βαθμό καθορίζεται από την κινητικότητα των πολικών ομάδων και το μήκος και ο βαθμό ακορεστότητας των υδρογονανθρακικών αλυσίδων. Η συνεργασιμότητα των DPPC λιπιδίων και των PEO-b-PCL συμπολυμερών κατά συστάδες μειώθηκε σημαντικά, καθώς το %wt του υδρόφλου συστατικού αυξήθηκε. Η μείωση των τιμών ΔH για τα λιποσώματα σύστασης DPPC:PEO-b-PCL 1 (9:1 μοριακός λόγος) σχετίζεται με το μειωμένο «κλάσμα του αποτελεσματικού όγκου» των λιπιδικών νανοπεριοχών, οι οποίες μένουν ανεπηρέαστες και εξακολουθούν να προκαλούν τη μετάβαση φάσης, μετά την ενσωμάτωση του πολυμερικού συστατικού στη λιποσωματική μεμβράνη (μετασταθής φάση II στην Εικόνα 12.2). Πιο συγκεκριμένα, η ενθαλπία ήταν σημαντικά χαμηλότερη όταν το PEO-b-PCL 1 ενσωματώθηκε στα λιποσώματα, και αλλαγές στο θερμόγραμμα παρουσία του συμπολυμερούς σχετίζονται με μείωση του μεγέθους των κυστιδίων (μειωμένο «κλάσμα του αποτελεσματικού όγκου») (εξαιτίας των στερικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων και των λιπιδίων). Μία

κυστιδική μεμβρανική με συμπολυμερή κατά συστάδες με νανοπεριοχές τύπου σχεδίας (“raft-like” nanodomains) δομείται. Κατά τη γνώμη μας, αυτές οι νανο περιοχές τύπου σχεδίας των συμπολυμερών κατά συστάδες, οι οποίες είναι μετασταθείς καταστάσεις, «λειτουργώντας ως ραφίδες» (“working as a zipper”) τροποποιούν την κινητική της αποδέσμευσης του φαρμακομορίου. Οι θερμοτροπικές παράμετροι, οι φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις και οι παράμετροι του μικροπεριβάλλοντος (όπως είναι το μέσο διασποράς και η θερμοκρασία) επηρεάζουν τη δομή της μεικτής μεμβράνης. Από την άλλη πλευρά, η ενσωμάτωση του PEO-b-PCL 2 σε 9:1 μοριακό λόγο οδηγεί «σε ένα μοντέλο που προσομοιάζει το διάλυμα» (“solution like model”) (Εικόνα 12.2, φάση III), το οποίο αποδεικνύει μία διαφορετική θερμοτροπική / χωρική ενσωμάτωση αυτού του συμπολυμερούς κατά συστάδες στα λιποσώματα σε σύγκριση με το PEO-b-PCL 1 (μετασταθείς φάσεις II και III στην Εικόνα 12.2). Αυτό προκύπτει με βάση την εντροπία του συστήματος, τη σταθεροποίηση των νανοπεριοχών και τη φυσική κυρτότητα των κυστιδίων. Με άλλα λόγια, η διεύρυνση της κορυφής της κύριας μετάβασης, η οποία πραγματοποιείται λόγω της παρουσίας των PEO-b-PCL συμπολυμερών κατά συστάδες συνοδεύεται από μικρή μείωση της θερμοκρασίας της κύριας μετάβασης, που σχετίζεται με τα φαινόμενα της ρευστοποίησης της λιποσωμιακής διπλοστοιβάδας.

Η ενσωμάτωση του MPOx-1 οδήγησε σε μία μικρή μείωση της συνεργασιμότητας των δύο βιοϋλικών (δηλαδή των λιπιδίων και των βαθμιδωτών συμπολυμερών κατά συστάδες) καθώς οι τιμές $\Delta T_{1/2,m}$ υποδεικνύουν (Πίνακας 12.2). Η T_m των λιποσωμάτων DPPC:MPOx-1 (9:1 μοριακός λόγος) αυξήθηκε σημαντικά μετά την προθήκη του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες (μετασταθείς φάση II, Εικόνα 12.2). Μία αύξηση της θερμοκρασίας της κύριας μετάβασης T_m αποδεικνύει πως η ενσωμάτωση του MPOx-1 οδηγεί σε μία αύξηση της θερμικής ενέργειας (ενθαλπικό φαινόμενο), το οποίο είναι υπεύθυνο για τον αναπροσανατολισμό της λιπιδικής διπλοστοιβάδας από τη solid-gel στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση. Κατά τη γνώμη μας, αυτή η παρατήρηση οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η φάση IV (Εικόνα 12.2) είναι υπεύθυνη για την αυξημένη μεμβρανική ακαμψία και την κυρτότητα, όπως οι τιμές d_f υποδεικνύουν (Πίνακες 12.2 και 12.3). Η αυξημένη ακαμψία και κυρτότητα των λιποσωμάτων είναι ο κυρίαρχος παράγοντας για την αυξημένη σταθερότητα, όπως παρατηρήθηκε από τις προηγούμενες μελέτες μας. Η ενσωμάτωση του MPOx-2 βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες είχε ως

αποτέλεσμα μεταβολές στη θερμοτροπική συμπεριφορά των DPPC λιποσωμάτων, η οποία επηρεάζει το μέσο πλάτος της κύριας μετάβασης φάσης ($\Delta T_{1/2,m}$) (Πίνακας 12.3 και Εικόνα 12.2). Όλες οι άλλες θερμοδυναμικές παράμετροι παρέμειναν ανεπηρέαστες. Αυτό το γεγονός υποδεικνύει πως οι αλληλεπιδράσεις αυτού του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες (MPOx-2) με τα DPPC λιποσώματα επηρεάζει την κινητικότητα των πολικών κεφαλών. Η αλληλεπίδραση των DPPC λιπιδίων με τις υδρόφιλες αλυσίδες του MPOx-2 βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες είναι πολύ περιορισμένες/ασθενείς στο νερό, και αποδίδονται διστακτικά σε δεσμούς υδρογόνου. Η συνεργασιμότητα των DPPC λιπιδίων και του MPOx βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες μειώθηκε σημαντικά, καθώς η %wt του υδρόφοβου συστατικού μειώθηκε (Πίνακες 12.1 και 12.3). Θα πρέπει να σημειωθεί πως η μακρομοριακή αρχιτεκτονική των πολυμερικών ενιστών επηρεάζει κατά αντίθετο τρόπο τη συνεργασιμότητα των συστατικών του συστήματος καθώς η %wt του υδρόφοβου συστατικού αυξάνεται. Κατά τη γνώμη μας, η μετασταθής φάση IV συμπεριφέρεται ως ρυθμιστής της συμπεριφοράς της μεμβράνης καθώς αυξάνει την αποϊσμεύσης της ενδομεθαινής από το υψοφείς σύστασης DPPC:MPOx-1 (9:1 μοριακός λόγος) σε σύγκριση με το υψο DPPC:MPOx-2 (9:1 μοριακός λόγος), όπως παρατηρήθηκαν σε προηγούμενες μελέτες μας. Η θερμοκρασία κύριας μετάβασης φάσης, η οποία αντιστοιχεί στην κινητικότητα των λιπαρών αλυσίδων των φωσφολιπιδίων, παραμένει ανεπηρέαστη, όπως προαναφέρθηκε (Πίνακας 12.3 και Εικόνα 12.2). Η σύσταση του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες επηρεάζει τη συνεργασιμότητα των βιοϋλικών, από τα οποία αποτελούνται τα χιμαιρικά λιποσώματα. Η επίδραση των πολυμερικών συστατικών στη θερμοτροπική συμπεριφορά φάσης της λιποσωματικής μεμβράνης μπορεί να συσχετισθεί πρωταρχικά με τις σημαντικές διαφορές στη μοριακή αρχιτεκτονική τους και συνεπώς και στις ιδιότητες διαμόρφωσής τους (Πίνακας 12.2 και Εικόνα 12.3).

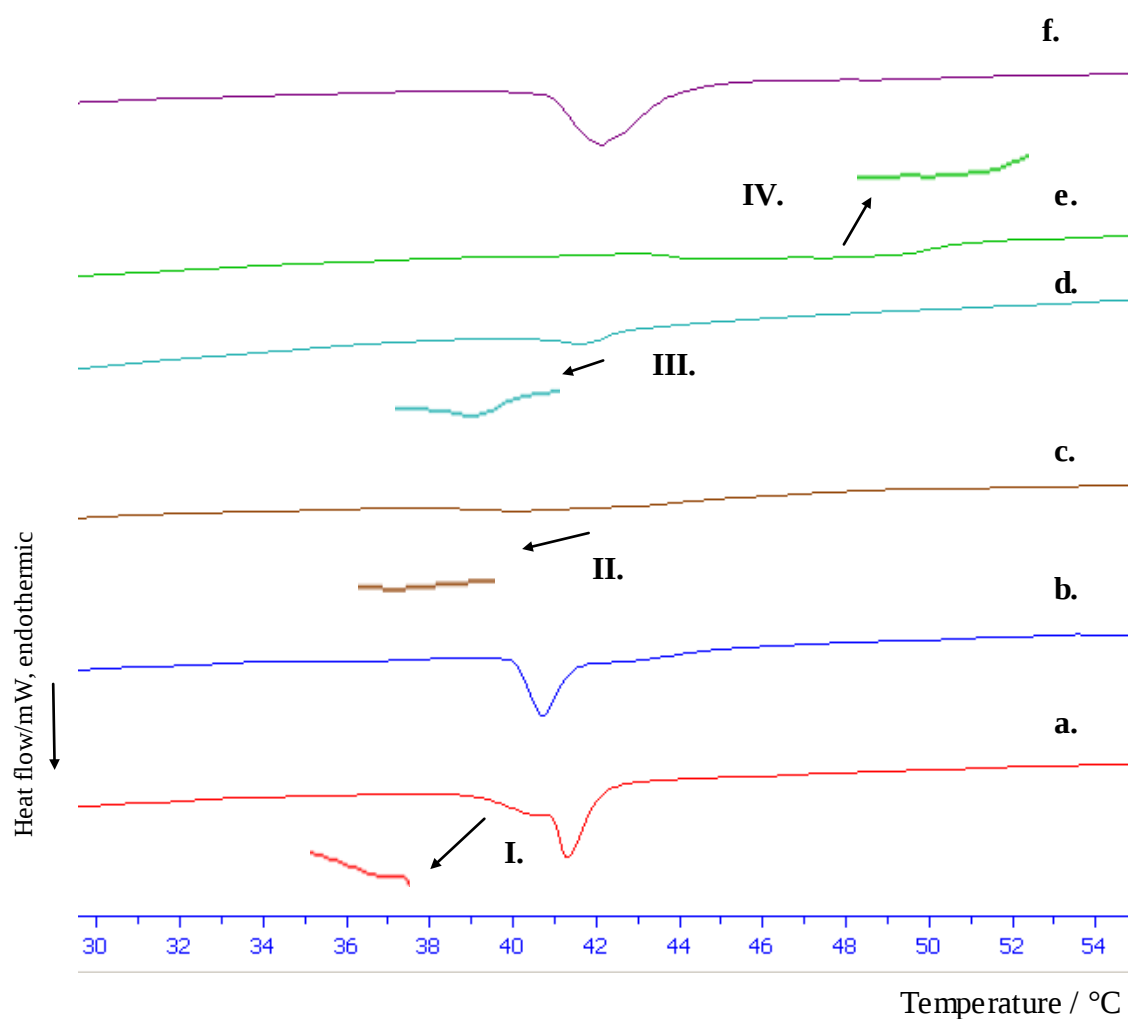
Θα πρέπει να σημειώσουμε ότι για τα DSC θερμογράμματα ψύξης μόνο για τα χιμαιρικά λιποσώματα σύστασης DPPC:MPOx-1 (9:1 μοριακός λόγος) [MPOx με το χαμηλότερη %wt αναλογία υδρόφοβου συστατικού] νέες μεταβάσεις φάσεων εμφανίστηκαν (φάση VII) και σημαντική υστέρηση παρατηρήθηκε (Εικόνα 12.3 και Πίνακας 12.4). Ειδικότερα, η μετάβαση φάσης παρατηρήθηκε στους 40.7°C παρουσιάζοντας μία υστέρηση των 6.9°C (Εικόνα 12.3 και Πίνακας 12.4). Λαμβάνοντας υπόψη τον υδρόφιλο χαρακτήρα του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά

συστάδες και τη σημαντική υστέρηση κατά τη διάρκεια της ψύξης, μία ένδειξη για το σχηματισμό φάσης ενδοεισχώρησης (φάση VII) θα μπορούσε να υποστηριχθεί (Εικόνα 12.3). Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τα DSC θερμογράμματα ψύξης, η θερμοκρασία της κύριας μετάβασης φάσης μειώθηκε με την ενσωμάτωση του MPOx-1, όμως μία σημαντική υστέρηση παρατηρήθηκε σε σύγκριση με τα κενά λιποσώματα DPPC. Η ανίχνευση της νέας μεσόφασης VII (Εικόνα 12.3) της υγρής κρυσταλλικής κατάστασης της λιποσωματικής μεμβράνης σχηματισμένης από DPPC:MPOx-1 (9:1 μοριακός λόγος) μπορεί να παραχθεί εξαιτίας της μακρομοριακής αρχιτεκτονικής του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες. Αυτές οι αναπαραγόμενες μετασταθείς φάσεις μπορούν να συσχετισθούν με το μηχανισμό αποδέσμευσης από το συγκεκριμένο χιμαιρικό σύστημα μεταφοράς φαρμακομορίων. Αυτή η θερμοτροπική συμπεριφορά των χιμαιρικών λιποσωματικών μεμβρανών είναι η μηχανιστική εξήγηση του ταχύτερου ρυθμού αποδέσμευσης αμφιφιλικών φαρμακομορίων (όπως είναι η ινδομεθακίνη) από τα λιποσώματα σύστασης DPPC:MPOx-1 (9:1 μοριακός λόγος) σε σύγκριση με τα λιποσώματα σύστασης DPPC:MPOx-2 (9:1 μοριακός λόγος). Επιπρόσθετα, θεωρητικές και πειραματικές εργασίες έχουν δείξει ότι τα λιποσώματα δεν είναι θερμοδυναμικά σταθερά συστήματα μεταφοράς φαρμακομορίων. Από την άλλη πλευρά, εξαιτίας της ενέργειας που τους παρέχεται κατά τη διάρκεια του σχηματισμού μας, τα λιποσώματα είναι παγιδευμένα σε διαφορετικές μετασταθείς υγρές κρυσταλλικές φάσεις. Σύμφωνα με τον Lasic (1990), αυτές οι μετασταθείς φάσεις μπορούν να χαρακτηριστούν ως «κινητικά παγιδευμένες». Σε αυτή τη μελέτη, πιστεύουμε ότι οι δυνάμεις ενυδάτωσης, οι οποίες συντηρούν την ενδοεισχώρηση, είναι υπεύθυνες για την εντροπική σταθεροποίηση των DPPC:MPOx-1 (9:1 μοριακός λόγος). Από φυσικοχημικής άποψης, η παρατηρούμενη κολλοειδής σταθερότητας υποδεικνύει πως οι δυνάμεις ενυδάτωσης θα πρέπει να είναι υπεύθυνες για να κρατούν τα DPPC:MPOx-1 (9:1 μοριακός λόγος) λιποσώματα μακριά από την αποσταθεροποίηση λόγω των ελκτικών δυνάμεων van der Waals, εξαιτίας της αποψίας ηλεκτροστατικών απώσεων (σύμφωνα με την επέκταση της DLVO θεωρία). Από θερμοδυναμικής άποψης, η νέα μετασταθείς φάση VII, η οποία είναι κινητικά παγιδευμένη και αντιστοιχεί σε μία φάση ενδοεισχώρησης, αιτιολογεί την κολλοειδή σταθερότητα του νανοσυστήματος (Εικόνα 12.3, Πίνακας 12.4).

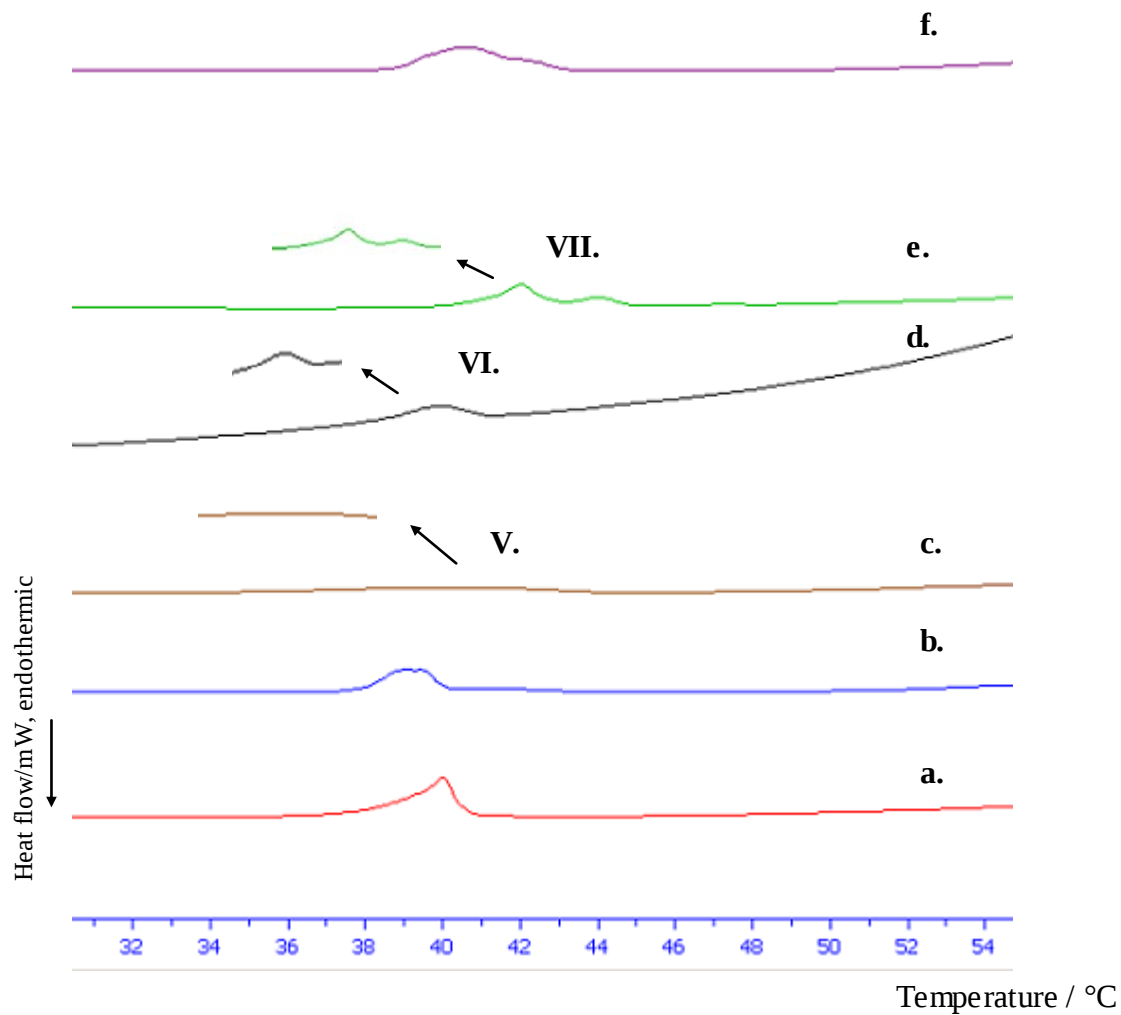
Για να συνοψίσουμε τα προαναφερθέντα αποτελέσματα, η θερμική ανάλυση παρέχει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τη συνεργασιμότητα, τη θερμική σταθερότητα, την επεξήγηση της κινητικής της αποδέσμευσης του φαρμακομορίου καθώς και της συμβατότητας σε μελέτες προ-μορφοποίησης φαρμάκων, στα στάδια της έρευνας και της ανάπτυξης. Εφαρμογές της τεχνικής αυτής σε λιπιδικά συστήματα περιλαμβάνουν μετρήσεις διαφορετικών θερμοτροπικών παραμέτρων και λεπτομερή χαρακτηρισμό της μετάβασης φάσεων, όπως προαναφέρθηκε. Οι τεχνολογίες για τα καινοτόμα συστήματα μεταφοράς φαρμακομορίων συνδέουν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (πολυμορφισμό, ρευστότητα, φορτίο επιφανείας κ.ά.) με την μεταβολή της φαρμακοκινητικής και της βιοκατανομής των φαρμακομορίων, και για το λόγο αυτό και των ανεπιθύμητων ενεργειών τους.

12.2 Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη, η θερμική συμπεριφορά των χιμαιρικών DPPC λιποσωμάτων με ενσωματωμένα PEG-ylated λιπίδιο, συμπολυμερές κατά συστάδες και βαθμιδωτό συμπολυμερές κατά συστάδες μελετήθηκε με στόχο το σχεδιασμό καινοτόμων συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων της Νανοτεχνολογίας. Η φυσικοχημική και δομική συμπεριφορά αυτών των χιμαιρικών λιποσωμάτων βρέθηκε να εξαρτάται από την αρχιτεκτονική του πολυμερικού συστατικού. Οι επιπτώσεις του πολυμερικού ξενιστή στη θερμοτροπική μετάβαση φάσης (νέες μετασταθείς φάσεις) σχετίζονται πρωταρχικά με τη σημαντική διαφορά στη μακρομοριακή αρχιτεκτονική τους. Κλείνοντας, προτείνεται ότι η μακρομοριακή αρχιτεκτονική και η χημική σύσταση των πολυμερικών ξενιστών που έχουν ενσωματωθεί στα λιποσώματα διαδραματίζει έναν πρωτεύοντα ρόλο στη θερμοτροπική συμπεριφορά των χιμαιρικών συστημάτων προώτας τη δημιουργία νέων μετασταθών φάσεων. Αυτές οι βιοφυσικές προσεγγίσεις δίνουν πιο ρεαλιστικές εξηγήσεις στη φαινομενολογία που αφορά την αποδέσμευση λιπόφιλων φαρμακομορίων από λιποσώματα, βασιζόμενες στη θερμοτροπική συμπεριφορά της λιποσωματικής μεμβράνης.



Εικόνα 12. 2. : Τα DSC θερμογράμματα θέρμανσης για τα λιπосώματα σύστασης **a.** DPPC, **b.** DPPC:DPPE-PEG 3000 (9:1 μοριακός λόγος), **c.** DPPC:PEO-b-PCL 1 (9:1 μοριακός λόγος), **d.** DPPC:PEO-b-PCL 2 (9:1 μοριακός λόγος), **e.** DPPC:MPOx-1 (9:1 μοριακός λόγος) και **f.** DPPC:MPOx-2 (9:1 μοριακός λόγος). Τα όρια για τον υπολογισμό των θερμοτροπικών παραμέτρων είναι από 35°C ως 45°C.



Εικόνα 12. 3. : Τα DSC θερμογράμματα ψύξης για τα λιπосώματα σύστασης **a.** DPPC, **b.** DPPC:DPPE-PEG 3000 (9:1 μοριακός λόγος), **c.** DPPC:PEO-b-PCL 1 (9:1 μοριακός λόγος), **d.** DPPC:PEO-b-PCL 2 (9:1 μοριακός λόγος), **e.** DPPC:MPOx-1 (9:1 μοριακός λόγος) και **f.** DPPC:MPOx-2 (9:1 μοριακός λόγος). Τα όρια για τον υπολογισμό των θερμοτροπικών παραμέτρων είναι από 35°C ως 45°C.

13 Η αλληλεξάρτηση μεταξύ του ρυθμού της αποδέσμευσης από χημικούς λιποσωματικούς νανοφορείς και της κλασματικής διάστασής τους.

13.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Μία από τις πιο πολλά υποσχόμενες κατηγορίες νανοφορέων για τη μεταφορά φαρμακομορίων είναι τα λιποσώματα, τα οποία ανήκουν στα βιο-κolloειδή νανοσωματίδια (Bangham et al., 1965; Gregoriadis et al., 1974). Τα λιποσωματικά σκευάσματα βελτιώνουν τη θεραπευτική αξία πολλών φαρμακομορίων (Lasic, 1996; Xiong et al., 2005a,b; Eldar-Boock et al., 2013). Τα λιποσώματα επίσης βελτιώνουν την αποδέσμευση καθώς και την φαρμακοκINETική του εγκλωβισμένου σε αυτά φαρμακομορίου (Allen et al., 2006; Slingerland et al., 2012). Τα stealth λιποσώματα έχουν πλεονεκτήματα όπως η παρατεταμένη κυκλοφορία στο αίμα και η χαμηλή ανοσογονικότητα (Moghimi and Szebeni, 2003; Cattel et al., 2004; Immordino et al., 2006; Samad et al., 2007; Mufamadi et al., 2011).

Επιπρόσθετα, το σχήμα και το μέγεθος των λιποσωματικών φορέων είναι κυρίαρχες παράμετροι για τη συμπεριφορά τους in vivo (Champion et al., 2006, 2007; Canelas et al., 2009; Tomalia, 2009; Longmire et al., 2011). Συγκεκριμένα, τα μικρό μονοστοιβατικά κυστίδια αποδεσμεύουν τα φαρμακομόρια πιο εύκολα λόγω της μεγαλύτερης καμπυλότητάς τους και της διαμόρφωσης των λιπιδίων μέσα στη μεμβράνη (Düzgüneş et al., 1983; Nagayasu et al., 1995; Yamauchi et al., 2007). Το σχήμα για του φορείς φαρμακομορίων της νανοκλίμακας συμβάλλει σημαντικά στη θεραπευτική διαδικασία, όπως είναι η προσκόλληση των σωματιδίων και η βιοκατανομή (Liu et al., 2012). Η fractal ανάλυση έχει πρόσφατα χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των λιποσωματικών συσσωματωμάτων και των λιποσωμάτων, όπως επίσης και των μεικτών λιποσωματικών νανοσωματιδίων (Sabín et al., 2007a,b; Roldán-Vargas et al., 2008,2009; Pippa et al., 2012a,b, Hadjide metriou et al., 2013; Pippa et al., 2013a,b,c).

Η μαθηματική μοντελοποίηση της αποδέσμευσης του φαρμακομορίου μπορεί να είναι πολύ χρήσιμη για την επιτάχυνση της ανάπτυξης και την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών για τον έλεγχο της αποδέσμευσης από συστήματα μεταφοράς φαρμακομορίων (Siepmann and Siepmann, 2011, 2012). Αρκετοί φυσικοχημικοί

παράγοντες ελέγχουν το ρυθμό αποδέσμευσης από καινοτόμες δοσολογικές μορφές, ειδικά από πολυμερικά συστήματα με ιδιότητες ελεγχόμενης αποδέσμευσης (Siepmann et al., 1999; Siepmann and Peppas, 2001; Lee et al., 2012). Επιπρόσθετα, πολλά άρθρα έχουν δημοσιευθεί για τη μοντελοποίηση των στοχαστικών διαδικασιών του φαρμακομορίου· μελέτες διάλυσης και αποδέσμευσης χρησιμοποιώντας τη fractal ανάλυση (Macheras and Dokoumetzidis, 2000; Rinaki et al., 2003; Dokoumetzidis et al., 2001; 2005; 2007; 2010; Pereira, 2010; Dokoumetzidis and Macheras, 2011).

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνηθεί η κινητική αποδέσμευσης της IND από χιμαιρικά λιποσώματα σύστασης Dipalmytolphosphatidylcholine (DPPC) and Poly(2-methyl-2-oxazoline)-grad-poly(2-phenyl-2-oxazoline) (MPOx-1) σε διαφορετικούς μοριακούς λόγους (9:0.1, 9:0.5, 9:1, 9:2 και 9:3), και να εξετάσει τη καταλληλότητα του power law για την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων της αποδέσμευσης, και να ανιχνεύσει την αλληλεξάρτηση της κλασματικής διάστασης (d_f) των μεικτών νανοφορέων με το ποσοστό της IND που έχει αποδεσμευθεί. Μία πληθώρα τεχνικών σκέδασης φωτός και η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC) χρησιμοποιούνται για να εξαχθούν πληροφορίες σχετικά με τα φυσικοχημικά, δομικά (μέσω της fractal ανάλυσης) και των θερμοδυναμικών χαρακτηριστικών των λιποσωμάτων. Μαθηματικά μοντέλα χρησιμοποιήθηκαν για να περιγράψουν ποσοτικά την αποδέσμευση της IND από τα λιποσώματα. Αυτά τα μοντέλα μπορούν να αποκαλύψουν πολλά νέα δεδομένα που αφορούν την αλληλεξάρτηση μεταξύ των κλασματικών διαστάσεων των χιμαιρικών νανοφορέων και του ρυθμού της αποδέσμευσης του φαρμακομορίου.

13.1.1 Η θερμοτροπική συμπεριφορά των χιμαιρικών λιποσωμάτων

Η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης χρησιμοποιείται στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης φαρμάκων για να προσδιοριστεί η φυσική συμπεριφορά (πολυμορφισμός, καθαρότητα, θερμοκρασία μετάβασης κλπ.) και συμβάλλει στην ανάπτυξη φαρμακευτικών σκευασμάτων (Demetzos, 2008; Pippa et al., 2013e). Η θερμοτροπική συμπεριφορά των λιποσωμάτων παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων MPOx-1 μελετήθηκε και οι μεταβολές των θερμικών γεγονότων

καταγράφηκαν σε ολόκληρη την περιοχή των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 13.1 και στην Εικόνα 13.1. Η ενσωμάτωση του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες, MPOx-1, προκάλεσε μεταβολές στη θερμοτροπική συμπεριφορά των DPPC λιποσωμάτων, επηρεάζοντας μόνο την ειδική ενθαλπία της κύριας μετάβασης ΔH_m (specific enthalpy main transition) και το μέσο πλάτος στο μέσο της κύριας μετάβασης φάσης $\Delta T_{1/2}$ (half width at half peak height of the transition) (Πίνακας 13.1 και Εικόνα 13.1).

Πίνακας 13.1. Θερμοδυναμικές παράμετροι των DPPC:MPOx-1 λιποσωμάτων σε 9:0, 9:0.1, 9:0.5, 9:1 και 9:3 μοριακοί λόγοι (θέρμανση).

Σύστημα	T_{onset} (°C)	T_m (°C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	ΔH_m (J/mol)
DPPC liposomes	41.19	42.33	1.30	-45.42
DPPC:MPOx-1 (9:0.1)	40.86	42.41	1.85	-42.30
DPPC:MPOx-1 (9:0.5)	41.08	42.48	1.78	-32.54
DPPC:MPOx-1 (9:1)	41.22	42.49	1.63	-21.67
DPPC:MPOx-1 (9:3)	40.95	40.95	2.02	-13.83

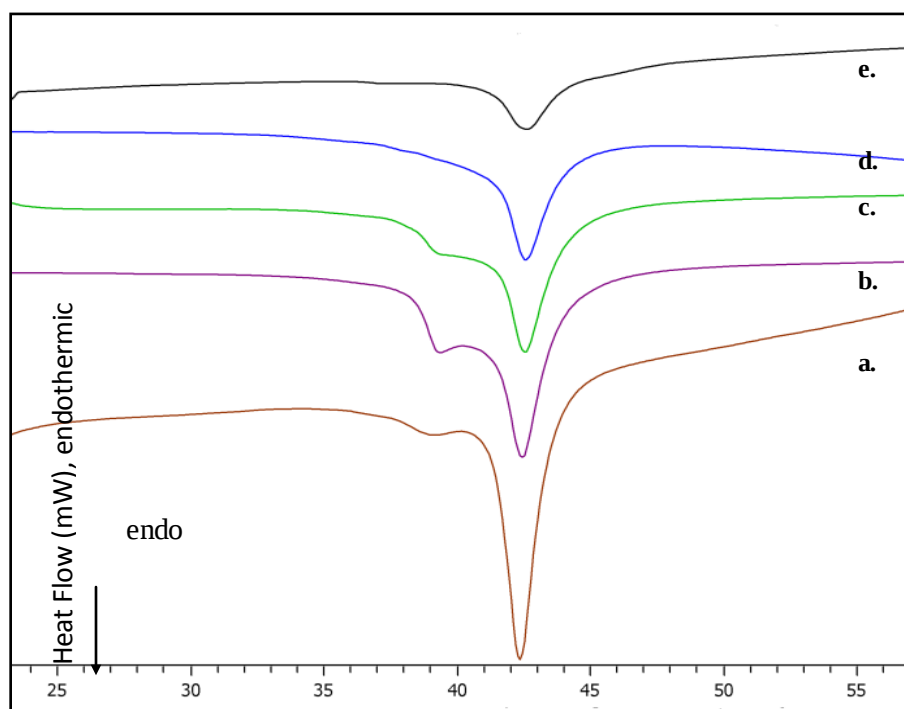
T_{onset} : θερμοκρασία κατά την οποία το θερμικό φαινόμενο αρχίζει; T_m : θερμοκρασία κατά την οποία η θερμοχωρητικότητα υπό σταθερή πίεση είναι μέγιστη (ΔC_p); ΔH : η ενθαλπία κύρια μετάβασης κανονικοποιημένη ανά mol του λιποσωματικού συστήματος; $\Delta T_{1/2}$: το ήμισυ του πλάτους της κορυφής κύριας μετάβασης.

Όλες οι άλλες θερμοδυναμικές παράμετροι παρέμειναν αμετάβλητες (δηλαδή T_{onset} : θερμοκρασία στην οποία το θερμικό φαινόμενο αρχίζει; T_m : θερμοκρασία κατά την οποία η θερμοχωρητικότητα (ΔC_p) σε συνθήκες σταθερής πίεσης, είναι μέγιστη). Αυτό το γεγονός υποδεικνύει πως οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των συστατικών και του των DPPC λιποσωμάτων επηρεάζει την κινητικότητα των πολικών κεφαλών των λιπιδίων, το οποίο θεωρείται ως σημαντικό για όλα τα ενσωματωμένα βιοϋλικά. Η θερμοκρασία κύριας μετάβασης φάσης, η οποία αντιστοιχεί στην κινητικότητα των λιπαρών αλυσίδων των φωσfolιπιδίων παραμένει ανεπηρέαστη, καθώς και των άλλων θερμοτροπικών παραμέτρων (Πίνακας 13.2).

Πίνακας 13.2. Τα φυσικοχημικά και τα δομικά χαρακτηριστικά των χιμαιρικών DPPC:MPOx-1 λιποσωμάτων σε PBS.

Σύστημα	R_h (nm)	PD.I.	ζ -potential (mV)	d_f	R_g/R_h
DPPC:MPOx-1 (9:0.1)	55.3	0.59	0	2.4 ₁	0.68
DPPC:MPOx-1 (9:0.5)	61.6	0.63	0.9	2.3 ₁	0.19
DPPC:MPOx-1 (9:1)	75.4	0.68	1.5	2.4 ₅	0.71
DPPC:MPOx-1 (9:2)	54.0	0.51	-3.1	2.0 ₈	0.93
DPPC:MPOx-1 (9:3)	52.3	0.51	-3.5	2.0 ₈	0.93

Η παρουσία του MPOx-1 προώλεσε μία διεύρυνση της κορυφής της κύριας μετάβασης φάσης που σχετίζεται με τη μειωμένη συνεργασμότητα των βιοϋλικών κατά την κύρια μετάβαση, ενώ η θερμοκρασία της κύριας μετάβασης φάσης T_m παρέμεινε ανεπηρέαστη ως συνάρτηση της αυξανόμενης συγκέντρωσης του MPOx-1 (Εικόνα 13.1.).



Εικόνα 13.1. DSC καμπύλες θέρμανσης των DPPC:MPOx-1 λιποσωμάτων **a.** 9:0 **b.** 9:0.1 **c.** 9:0.5 **d.** 9:1 και **e.** 9:3 μοριακό λόγο .
(°C)

Η μείωση των τιμών ΔH σχετίζονται με το μειωμένο «αποτελεσματικό κλασματικό όγκο» “effective volume fraction” των λιπιδικών νανο-περιοχών (lipid nanodomains), οι οποίες παραμένουν αμετάβλητες και συνεχίζουν να προκαλούν τη μετάβαση, μετά την ενσωμάτωση των μακρομοριακών συστατικών εντός της λιποσωμιακής μεμβράνης.

13.1.2 Φυσικοχημικός και μορφολογικός χαρακτηρισμό των χημικών λιποσωμάτων

Τα φυσικοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των DPPC:MPOx-1 μεικτών λιποσωμάτων (9:0.1, 9:0.5, 9:1, 9:2 και 9:3 μοριακοί λόγοι) σε PBS παρουσιάζονται στον Πίνακα 13.2. Τα λιποσώματα με ενσωματωμένο το MPOx-1 σε διαφορετικές μοριακές αναλογίες παρουσιάζουν παρόμοια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (μέγεθος, κατανομή μεγέθους και ζ-δυναμικό) (Πίνακας 13.2) στο PBS. Από την άλλη πλευρά μία μείωση των τιμών d_f παρατηρήθηκε για τα DPPC:MPOx-1 χημικά λιποσώματα σε PBS, ειδικότερα σε μοριακούς λόγους 9:2 και 9:3 (Πίνακας 13.2) κάτι που υποδεικνύει πως τα μορφολογικά χαρακτηριστικά (d_f και R_g/R_h) έχουν διαφοροποιηθεί στην υψηλότερη συγκέντρωση του MPOx-1 συστατικού.

Τα φυσικοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των μεικτών λιποσωμάτων μετά την ενσωμάτωση της IND παρουσιάζονται στον Πίνακα 13.3.

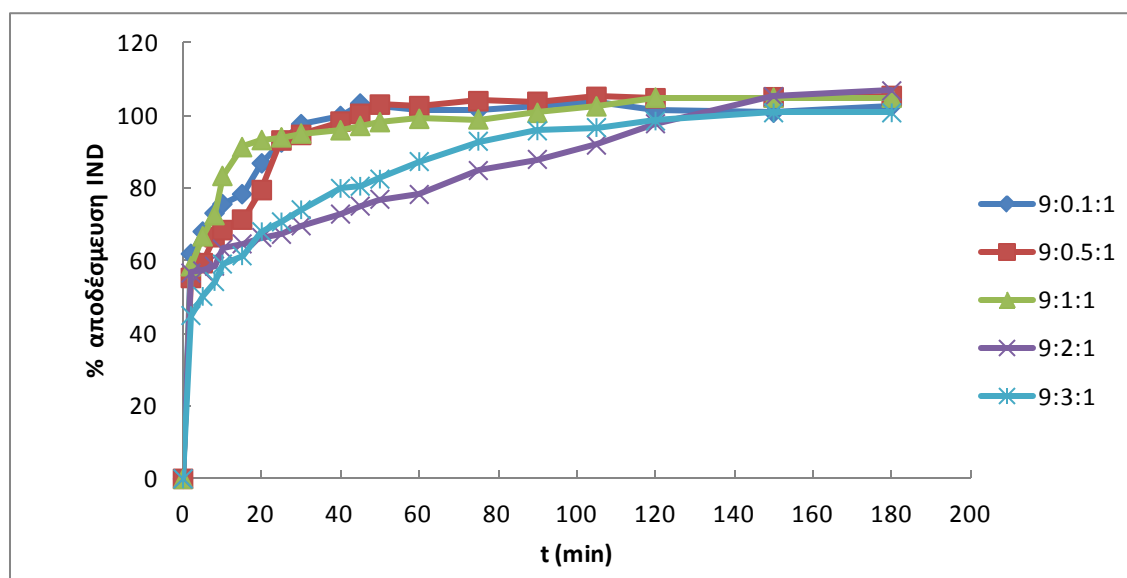
Πίνακας 13.3. Τα φυσικοχημικά και δομικά χαρακτηριστικά των χημικών λιποσωμάτων σε PBS μετά την ενσωμάτωση της IND και ποσοστό ενσωμάτωσης.

Σύσταση	R_h (nm)	PD.I.	d_f	ζ-δυναμικό (mV)	% ποσοστό ενσωμάτωσης
DPPC:MPOx-1:IND (9:0.1:1)	205.4	0.55	2.3 ₈	+0.3	11.1
DPPC:MPOx-1:IND (9:0.5:1)	75.0	0.59	2.3 ₇	-3.1	18.7
DPPC:MPOx-1:IND (9:1:1)	60.4	0.52	2.2 ₆	-2.6	22.9
DPPC:MPOx-1:IND (9:2:1)	61.8	0.53	2.1 ₈	-1.0	13.8
DPPC:MPOx-1:IND (9:3:1)	65.5	0.48	2.4 ₇	-1.1	10.8

Η ενσωμάτωση της IND οδήγησε σε αύξηση του μεγέθους των μεικτών λιποσωμάτων, ειδικότερα στα συστήματα με το χαμηλότερο μοριακό λόγο του MPOx-1 συστατικού. Αντίθετα, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως περιγράφονται από τιμές df των νανοφορέων δείχνουν κάποιες διαφοροποιήσεις μετά την ενσωμάτωση της IND, ειδικότερα για τις υψηλότερες συγκεντρώσεις του πολυμερικού συστατικού (DPPC:MPOx-1: IND 9:3:1 μοριακός λόγος). Επιπρόσθετα, τα λιποσώματα σύστασης DPPC:MPOx-1: IND 9:1:1 μοριακός λόγος διαθέτουν το υψηλότερο ποσοστό ενσωμάτωσης της IND.

13.1.3 In vitro αποδέσμευση της IND

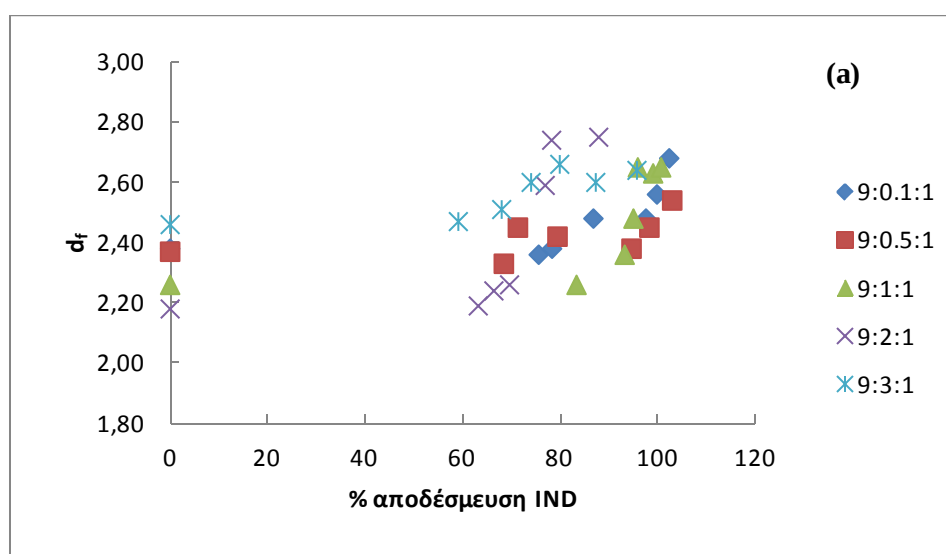
Η in vitro αποδέσμευση της IND από τα DPPC:MPOx-1 λιποσώματα σε διαφορετικούς μοριακούς λόγους του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες παρουσιάζεται στην Εικόνα 13.2. Παρατηρήθηκε πως η in vitro αποδέσμευση της IND από τους παρασκευασθέντες μεικτούς λιποσωματικούς φορείς είναι αρκετά ταχεία για τα συστήματα σύστασης DPPC:MPOx-1: IND 9:0.1:1 και 9:0.5:1 μοριακός λόγος. Συγκεκριμένα, in vitro αποδέσμευση της IND είναι ταχύτερη για τα μεικτά λιποσώματα με το μικρότερο μοριακό λόγο του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες (Εικόνα 13.2).

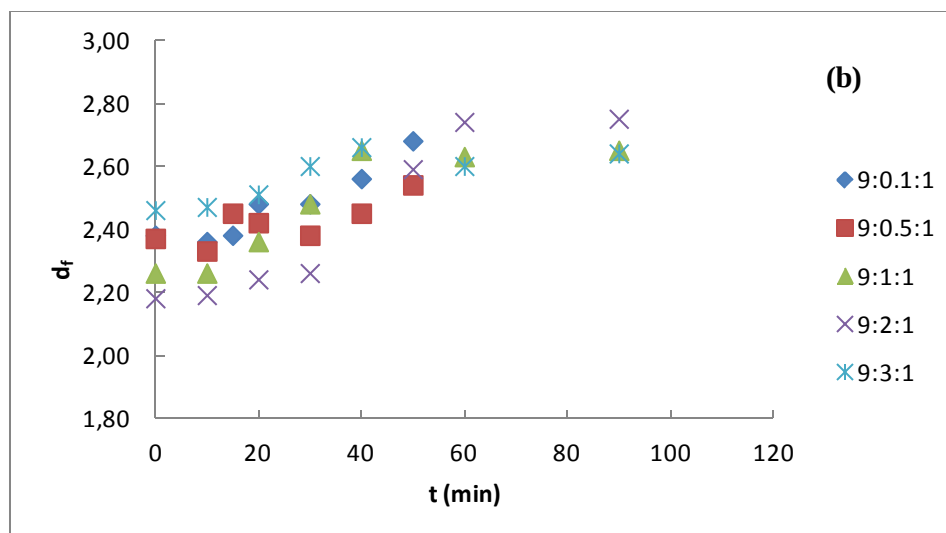


Εικόνα 13.2. Αθροιστική αποδέσμευση της IND από τους DPPC:MPOx-1:IND (κάθε τιμή αναπαριστά το μέσο όρο $\pm$ S.D. των $n = 3$ ανεξάρτητων πειραμάτων).

Αυτή φαινομενολογία θα μπορούσε να λειτουργήσει ως οδηγός για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη σκευασμάτων με την επιθυμητή κινητική αποδέσμευσης της IND, ελέγχοντας τις αναλογίες των δύο συστατικών. Ο συνδυασμός βιοϋλικών και συγκεκριμένα πολυμερών και λιπιδίων για την ανάπτυξη καινοτόμων νανοφορέων εμφανίζεται πολύ ενδιαφέρον, καθώς τα πολυμερικά συστατικά δρουν ως ρυθμιστές της αποδέσμευσης της IND από τους σχηματιζόμενους νανοφορείς της (Pirra et al., 2013a,b,c,d).

Η κλασματική διάσταση των μεικτών νανοφορέων προσδιορίστηκε κατά τη διάρκεια της αποδέσμευσης της IND από τα χημικά νανοσυστήματα (Εικόνα 13.3).





Εικόνα 13.3. (a) Κλασματική διάσταση vs. % ποσοστό αποδέσμευσης και **b)** Κλασματική διάσταση vs. χρόνος για τα λιποσώματα DPPC:MPOx-1:IND.

Μία αύξηση της d_f παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της αποδέσμευσης της IND (Εικόνα 13.3). Όπως προαναφέρθηκε, παρατηρήθηκε πως η *in vitro* αποδέσμευση του φαρμακομορίου από τις παρασκευασθείσες νανοδομές είναι αρκετά ταχεία, ειδικότερα για τους μεικτούς νανοφορείς που παρασκευάστηκαν με τη χαμηλότερη μοριακή αναλογία του βαθμιδωτού συμπολυμερούς κατά συστάδες. Οι κλασματικές διαστάσεις κυμαίνονταν από 2.18 σε 2.47, που αντιστοιχούσαν στο μοριακό λόγο του MPOx-1 συστατικού. Πιθανότητα, η χωροχρονική διακύμανση στη μεμβρανική διαπερατότητα του δυναμικά διογκούμενου πολυμερούς MPOx-1 σχετίζεται με μη κλασσική διάχυση για να συσχετισθεί με την κινητική αποδέσμευσης.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε πως υπάρχει μία ισχυρή αλληλεξάρτηση μεταξύ της μορφολογίας των λιποσωμάτων, όπως παρουσιάζονται από τιμές d_f και του ρυθμού της αποδέσμευσης της IND από τους μεικτούς λιποσωματικούς. Συγκεκριμένα, μεγαλύτερες τιμές d_f αντιστοιχούν σε χαμηλότερους ρυθμούς αποδέσμευσης, ενώ καθώς η διαδικασία της αποδέσμευσης προχωρά η μορφολογία των λιποσωμάτων μεταβάλλεται και οι τιμές d_f αυξάνονται. Μια χρονική υστέρηση παρατηρείται μεταξύ κάθε στιγμιότυπου της αποδέσμευσης και της αντίστοιχης αλλαγής d_f , που αντικατοπτρίζει το χρόνο αναδιοργάνωσης της μορφολογίας της νανοδομής. Αντίθετα, θα πρέπει να σημειώσουμε πως το μέγεθος των χιμαιρικών νανοφορέων

παραμένει ανεπηρέαστο σε όλη τη διάρκεια της αποδέσμευσης. Η κινητική της αποδέσμευσης μελετήθηκε με ανάλυση παλινδρόμησης των συγκεντρώσεων του φαρμακομορίου από fractal υλικά σε σχέση με το χρόνο. Τα παραπάνω αποτελούν την πρώτη αναφορά στη διεθνή βιβλιογραφία συσχέτισης της fractal μορφολογίας των λιποσωμάτων με την αποδέσμευση του ενσωματωμένου φαρμακομορίου.

13.1.4 Μαθηματική μοντελοποίηση

Η Εικόνα 13.4 απεικονίζει τα διαγράμματα των μοντέλων και των πειραματικών δεδομένων της αποδέσμευσης με καλούς συντελεστές συσχέτισης. Μία εξίσωση power law, μία εξίσωση piece-wise power law functions και μία κατανομή Weibull (Weibull distribution) προσαρμόστηκαν στα δεδομένα της αποδέσμευσης και εκτιμήθηκαν οι παράμετροι των μοντέλων. Καλές προσαρμογές παρατηρήθηκαν σε όλα τα σύνολα των δεδομένων που αναλύθηκαν. Ο Πίνακας 13.4 απαριθμεί τις τιμές όλων των γνωστών παραμέτρων που εκτιμήθηκαν από τα μαθηματικά μοντέλα καθώς και των τυπικών σφαλμάτων για τα μεικτά λιποσωμιακά νανοσυστήματα, στα οποία είχε ενσωματωθεί η IND. Στον Πίνακα 13.4, C_0 είναι το αρχικό ποσοστό του φαρμακομορίου που αποδεσμεύτηκε, το οποίο αντιστοιχεί με μία άμεση αποδέσμευση της IND από τους νανοφορείς.

Πίνακας 13.4: Εκτίμηση των παραμέτρων (SE στις παρενθέσεις) όπως προκύπτουν από την προσαρμογή στις εξισώσεις (4.13), (4.14) και (4.15) στα πειραματικά δεδομένα της αποδέσμευσης της IND.

DPPC:MPOx- 1:IND (μοριακό λόγο)	Μοντέλο	C_0	n_1 or $a_1^{(*)}$	k_1 or $b_1^{(*)}$	C_1	n_2	k_2	T
9:0.1:1	4.14	48.98 (7.67)	0.48(0.12)	8.88 (5.12)	—	—	—	—
9:0.5:1	4.13	42.60 (11.43)	0.54(0.20)	7.53 (6.86)	—	—	—	—
9:1:1	4.14	50.46(4.98)	0.83(0.20)	4.34(2.76)	—	0.76(0.39)	0.35(0.68)	15.06(1.42)
9:2:1	4.13	53.32(1.44)	0.67(0.046)	1.66(0.42)	—	—	—	—
9:3:1	4.12	40.71(1.93)	0.84(0.07)	0.023(0.00)	63.2(3.19)	—	—	—

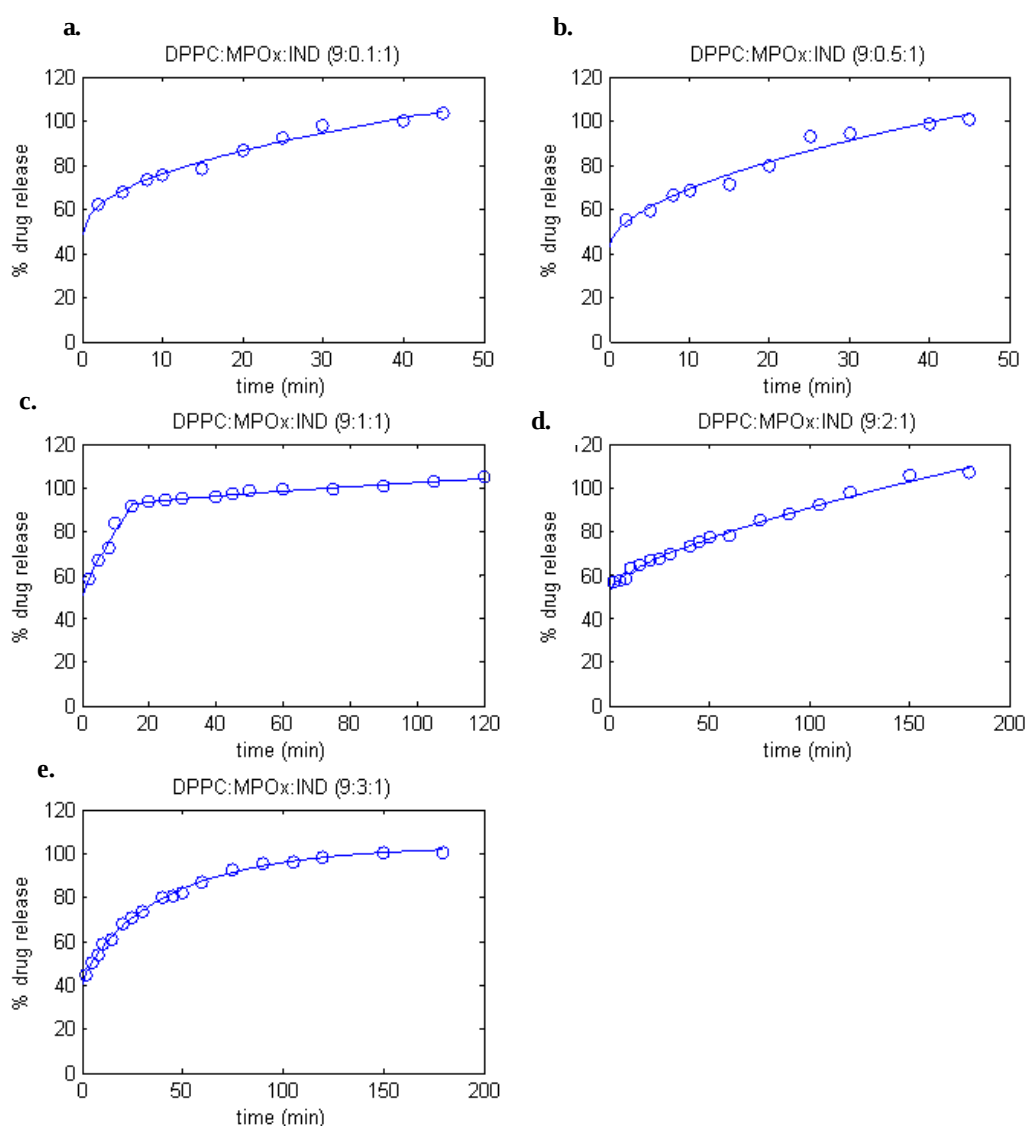
(*) k_1 και n_1 αντιστοιχούν στις εξισώσεις 4.14 και 4.15 και a_1 , b_1 ή εξίσωση 4.13.

Τα αποτελέσματα για τα συστήματα σύστασης DPPC:MPOx-1:IND 9:0.1:1 και 9:0.5:1 μοριακοί λόγοι, τα οποία παρατίθενται στον Πίνακα 13.4 δείχνουν σχεδόν μηδενικής τάξης κινητική. Και στις δύο περιπτώσεις, για να γίνει προσαρμογή στο μοντέλο χρησιμοποιήθηκαν όλα τα διαθέσιμα πειραματικά δεδομένα. Συγκεκριμένα, έγκυρες εκτιμήτριες για τα K_1 και n_1 μπορούν να προκύψουν από την προσαρμογή από την εξίσωση 4.13 στο 100% των πειραματικών δεδομένων της αποδέσμευσης. Αυτές οι εκτιμήσεις για τους εκθέτες n_1 είναι 0.48 και 0.54 για τα συστήματα σύστασης DPPC:MPOx-1:IND 9:0.1:1 και 9:0.5:1 μοριακοί λόγοι, αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί πως ένας σημαντικό αριθμός των σημείων των δεδομένων που αναλύθηκαν βρίσκονται εκτός του ορίου του 60% για το F. Λεπτομερείς συζητήσεις σχετικά με τις υποθέσεις της παραπάνω εξίσωσης για την έγκυρη εφαρμογή της σε πραγματικά πειραματικά δεδομένα υπάρχουν στη βιβλιογραφία καθώς και για τη διασαφήνιση των μηχανισμών της αποδέσμευσης (Siermann and Peppas, 2001; Macheras and Iliadis, 2006; Rinaki et al., 2003).

Από την άλλη πλευρά, για τις Εικόνας 13.2 και 13.4(c), διαφασικά μοτίβα αποδέσμευσης του φαρμακομορίου παρατηρήθηκαν για τα λιποσώματα DPPC:MPOx-1:IND (9:1:1 μοριακός λόγος). Για το λόγο αυτό, μία παραλλαγή του power-law που εμφανίζεται ως άθροισμα δύο power-law χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει την από δέσμευση της IND που παρουσίασε δύο διακριτές φάσεις. Η κινητική της αποδέσμευσης της IND από αυτό το νανοςύστημα ακολουθεί μηδενοταξική κινητική, αλλά χωρίζεται σε δύο φάσεις με διακριτούς ρυθμούς, μία αρχική ταχύτερη, η οποία ακολουθείται από μία αργότερη (Εικόνες 13.2 και 13.4(c)). Η εκτίμηση της παραμέτρου T στον Πίνακα 13.4 αντιστοιχεί σε ένα κρίσιμο σημείο, στο οποίο η κινητική αλλάζει. Θα πρέπει να σημειωθεί πως σε αυτό το κρίσιμο σημείο η κλασματική διάσταση των μεικτών λιποσωμιακών νανοφορέων αυξήθηκε, όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε στην Εικόνα 13.3(b). Συγκεκριμένα, θα μπορούσε να υποστηριχθεί από τα παρόντα αποτελέσματα ότι διακριτές περιοχές διαφορετικών ρυθμών αποδέσμευσης αντιστοιχούν σε διαφορετικές τιμές d_f (Εικόνες 13.3 και 13.4, Πίνακας 13.4). Κατά τη γνώμη μας, η αναδιάταξη της δομής της μεικτής μεμβράνης, όπως ποσοτικοποιείται από την κλασματική διάσταση, είναι η αιτία για την αλλαγή της κινητικής της IND.

Επιπρόσθετα, η χρήση του power-law στην περιγραφή ολόκληρης της καμπύλης της αποδέσμευσης για τα πειραματικά δεδομένα από το σύστημα DPPC:MPOx-1:IND

(9:2:1 μοριακός λόγος) ταιριάζουν πλήρως στην εξίσωση 4.13 και αποδεικνύουν σχεδόν μηδενολογική κινητική (Πίνακας 13.4). Για αυτόν τον νανοφορέα, η αύξηση των τιμών d_f κατά τη διάρκεια της κινητικής της αποδέσμευσης είναι υψηλότερη και αργότερη σε σύγκριση με τους υπολοίπους νανοφορείς της IND (Εικόνα 13.3). Η αρχική ταχεία αποδέσμευση της IND από αυτόν το νανοφορέα είναι υψηλότερη, όπως αποδεικνύεται από την C_0 παράμετρο που εκτιμήθηκε στον Πίνακα 13.4, αλλά οι αλλαγές στο d_f είναι μεγαλύτερες (Πίνακας 13.4 και Εικόνα 13.3).



Εικόνα 13. 4. Γραφήματα που αντιστοιχούν στα δεδομένα της *in vitro* αποδέσμευσης της IND από τους νανοφορείς σύστασης DPPC:MPOx-1:IND **a.** 9:0.1:1, **b.** 9:0.5:1, **c.** 9:1:1, **d.** 9:2:1 και **e.** 9:3:1 μοριακό λόγο μετά από προσομοίωση των πειραματικών αποτελεσμάτων.

Από την άλλη πλευρά, η C_0 είναι μικρότερη στην υψηλότερη συγκέντρωση του συστατικού MPOx-1 (δηλ για το νανοςύστημα (DPPC:MPOx-1:IND 9:3:1 μοριακός λόγος). Αυτό το μεικτό λιποσωμιακό σύστημα ταιριάζει απόλυτα στην εξίσωση Weibull (Εξίσωση 4.12), η οποία αντιστοιχεί σε μικρότερη αποδέσμευση IND σε σύγκριση με τους υπολοίπους νανοφορείς (Πίνακας 13.4). Για το σύστημα DPPC:MPOx-1:IND (9:3:1 μοριακός λόγος) η κλασματική διάσταση δεν αλλάζει σημαντικά κατά τη διάρκεια της αποδέσμευσης του ενσωματωμένου φαρμακομορίου (Εικόνα 13.3). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι για κάθε σύστημα με διαφορετική κλασματική διάσταση παρουσίασε ένα διαφορετικό τρόπο αποδέσμευσης της IND, για τον οποίο μειωμένος ρυθμός αποδέσμευσης του φαρμακομορίου αντιστόιχησε σε αυξημένες τιμές κλασματικής διάστασης (Εικόνα 13.3). Πιθανότητα, η μορφολογία των λιποσωμάτων αναδιατάσσεται αργότερα σε σχέση με τα υπόλοιπα παρασκευασθέντα νανοςυστήματα εξαιτίας της μειωμένης συνεργασιμότητας των δύο συστατικών σε μοριακό λόγο 9:3, όπως αποδεικνύεται από τις καμπύλες DSC και τις θερμοτροπικές παραμέτρους (Πίνακας 13.1 και Εικόνα 13.1).

13.2 Συμπεράσματα

Η παρουσία του πολυμερικού συστατικού (MPOx-1) διαδραματίζει έναν κυρίαρχο ρόλο στη θερμοτροπική συμπεριφορά των μεικτών νανοφορέων και οι δομικές αναδιατάξεις της λιποσωμιακής μεμβράνης, καθώς τα DSC θερμογράμματα και οι θερμοτροπικές παράμετροι αποδεικνύουν. Τα φυσικοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά μέσω της κλασματικής διάστασης των DPPC:MPOx-1 λιποσωμάτων χωρίς και με IND σε διαφορετικούς μοριακούς λόγους σε PBS μελετήθηκαν. Η αποδέσμευση της IND από τα μεικτά λιποσώματα μελετήθηκε και η παρουσία του υμεροζύ ήταν ο ρυθμιστής της αποδέσμευσης του ενσωματωμένου φαρμακομορίου. Η βασική ιδέα αυτής της μελέτης είναι να υπογραμμίσει την αλληλεξάρτηση του σχήματος και της μορφολογίας των παρασκευασθέντων λιποσωμάτων (όπως ποσοτικοποιείται από την κλασματική διάσταση) και του ρυθμού της αποδέσμευσης του φαρμακομορίου. Σαφέστατα, παρατηρήθηκε ότι κάθε λιποσωμιακό νανοςύστημα με διαφορετική κλασματική διάσταση παρουσίασε έναν διαφορετικό τρόπο αποδέσμευσης του ενσωματωμένου φαρμακομορίου, για τον

οποίο παρατηρήθηκε μία τάση αύξησης των τιμών df με τη μείωση του ρυθμού της αποδέσμευσης. Κατάλληλα μοντέλα αποδέσμευσης προτάθηκαν για τα λιποσώματα σύστασης DPPC:MPOx-1 και αποδείχθηκαν καλές προσαρμογές των μοντέλων με τα πειραματικά δεδομένα. Ο νανοφορέας ο οποίος προσαρμόστηκε στην εξίσωση Weibull παρουσίασε το μικρότερο ρυθμό αποδέσμευσης σε σύγκριση με το α υπόλοιπους νανοφορείς. Από την άλλη πλευρά, εξισώσεις power-law προσαρμόστηκαν στα δεδομένα αποδέσμευσης της IND από άλλους νανοφορείς. Η θερμική συμπεριφορά όπως μελετήθηκε παρείχε την μηχανιστική προσέγγιση για την αύξηση της κλασματικής διάστασης για τα χιμαιρικά λιποσώματα εξαιτίας της μεμβρανικής αναδιάταξης. Συμπερασματικά, προτείνεται πως η κλασματική μορφολογία των χιμαιρικών λιποσωμάτων επηρεάζει την αποδέσμευση του φαρμακομορίου και θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη για την ανάπτυξη λιποσωματικών φαρμάκων με πλήρη γνώση των δομικών χαρακτηριστικών τους, εξαιτίας της ισχυρής αλληλεξάρτησης της μορφολογίας των λιποσωμάτων και του ρυθμού της αποδέσμευσης του ενσωματωμένου φαρμακομορίου.

14 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή αφορούν στην ποσοτικοποίηση της μορφολογίας λιποσωμάτων (συμβατικών και χιμαιρικών) με τη χρήση της κλασματικής διάστασής τους (fractal dimension) σε διασποράς με Στατική Σκέδαση Φωτός. Η κλασματική διάσταση απέδειξε διαφορές στη μορφολογία των νανοφορέων με αλλαγή των κολλοειδών συνθηκών (συγκέντρωση, θερμοκρασία, φόρτωση με φαρμακομόριο, παρουσία πολυμερούς στη λιποσωματική μεμβράνη), οι οποίες δεν ανιχνεύονταν πάντα με τον προσδιορισμό των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών (υδροδυναμική ακτίνα, δείκτης πολυδιασποράς, ζ-δυναμικό). Επίσης, προσδιορίστηκε η αλλαγή των μορφολογικών χαρακτηριστικών χιμαιρικών λιποσωμάτων κατά την αποδέσμευση του ενσωματωμένου σε αυτά φαρμακομορίου.

Επιπρόσθετα, παρασκευάστηκαν και χαρακτηρίστηκαν πλήρως φυσικοχημικά μεικτοί / χιμαιρικοί νανοφορείς που αποτελούνταν από λιπίδια και συμπολυμερή (και βαθμιδωτά συμπολυμερή κατά συστάδες) σε διάφορες αναλογίες των δύο συστατικών, σε διάφορα μέσα διασποράς και σε διαφορετικές συνθήκες (θερμοκρασίας και συγκέντρωσης). Η παρουσία των πολυμερών προέδωσε ιδιότητες θερμοδυναμικής σταθεροποίησης στη λιποσωματική μεμβράνη και stealth και ελεγχόμενης αποδέσμευσης ιδιότητες στους νανοφορείς. Η αρχιτεκτονική και η σύσταση του πολυμερικού ξενιστή στη λιποσωματική μεμβράνη βρέθηκε να επηρεάζει τις προαναφερθείσες ιδιότητες. Ακόμη, έγινε σύνδεση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των χιμαιρικών λιποσωμάτων, όπως αυτά ποσοτικοποιήθηκαν μέσω της κλασματικής διάστασης, με τα φυσικοχημικά και θερμοτροπικά χαρακτηριστικά των μεικτών νανοφορέων.

Κλείνοντας και συνοψίζοντας όλα όσα αναλύθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή, θα θέλαμε να σημειώσουμε πως η κλασματική διάσταση των νανοφορέων θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη από τους ελεγχτικούς μηχανισμούς για τον πλήρη φυσικοχημικό και μορφολογικό χαρακτηρισμό των προηγμένων συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων της Νανοτεχνολογίας.

15 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

15.1 Η ισορροπία σχήματος/μορφολογίας: μελέτη των αόρατων από το ανοσοποιητικό σύστημα λιποσωμάτων μέσω της μορφοκλασματικής ανάλυσης και ενσωμάτωση φαρμακομορίου.

Σκοπός του παραρτήματος είναι η μορφοκλασματική ανάλυση έχει χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για τη μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών των PEGylated λιποσωμάτων. Μελετήθηκαν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των stealth λιποσωμάτων που αποτελούνταν από DPPC και DPPE-PEG 3000 σε δύο μέσα διασποράς χρησιμοποιώντας τη μορφοκλασματική ανάλυση.

15.1.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Η τεχνολογία των stealth λιποσωμάτων είναι η πιο συχνά απαντούμενη για τη δημιουργία συστημάτων βασισμένων στα λιποσώματα για τη μεταφορά βιοδραστικών μορίων. Τα stealth λιποσώματα ανήκουν στη «δεύτερα γενιά λιποσωμάτων», ενώ οι συμβατικοί λιποσωμακοί φορείς χαρακτηρίζονται ως «πρώτης γενιάς λιποσώματα» (Cattel et al., 2004; Immordino et al., 2006). Οι στρατηγικές της τεχνολογίας των stealth λιποσωμάτων επιτυγχάνονται με την τροποποίηση της επιφανείας της λιποσωματικής μεμβράνης με την επίτευξη χημικής μηχανικής σύζευξης υδρόφιλου πολυμερούς, όπως της πολυαιθυλενογλυκόλης, η οποία είναι το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο πολυμερές για σύζευξη, και μειώνει την πρόσληψη των ναυοφορέων από τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα (Moghimi and Szebeni, 2003). Αυτοί οι λιποσωμακοί ναυοφορείς χαρακτηρίζονται από υψηλή βιοσυμβατότητα, έλλειψη τοξικότητας, χαμηλή ανοσογονικότητα (immunogenicity) και αντιγονικότητα (antigenicity) και εμφανίζουν να επεκτείνουν το χρόνο κυκλοφορίας τους στο αίμα. Οι κολλοειδείς ιδιότητες της μεγάλης σταθερότητας και της μακράς κυκλοφορίας στο αίμα είναι εξαιρετικής σημασίας για φαρμακευτικές και κλινικές εφαρμογές τους (Samad et al., 2007; Mufamadi et al., 2011).

Η ινδομεθακίνη ανήκει στην τάξη των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμακομορίων, τα οποία είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά στη θεραπεία μία μεγάλης

κατηγορίες νόσων και ασθενειών, περιλαμβάνοντας φλεγμονές, καρκίνους, καρδιαγγειακές και εκφυλιστικές νόσους του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος όπως οι νόσοι Alzheimer και Parkinson, αντίστοιχα. Αρκετές επιδημιολογικές, κλινικές και πειραματικές μελέτες απέδειξαν πως τα NSAIDs αποτελούν πολλά υποσχόμενους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες κατά του καρκίνου και την πρόληψη του καρκίνου στον άνθρωπο, διότι ο εμπλουτισμός των γνώσεων στον επιστημονικό τομέα έχει επιφέρει καινοτόμες προσεγγίσεις χρησιμοποιώντας το συνδυασμό δράσεων των NSAIDs και άλλων θεραπευτικών παραγόντων οι οποίοι παρουσιάζουν διαφορετικό τρόπο δράσης (Xu, 2002; Soh and Weinstein, 2003; Rao and Reddy, 2004). Η μακροχρόνια χρήση των NSAIDs έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση γαστρεντερικής τοξικότητας, σε πολλές περιπτώσεις έλκος, που οδηγεί σε σοβαρή αιμορραγία, διάτρηση και απόφραξη (Caruso and Bianchi Porro, 1980; Morris et al., 1981; Zhou et al., 2010). Με στόχο την την απαιτούμενη μείωση των ανεπιθύμητων ενεργειών των κυκλοφορούντων σκευασμάτων της ινδο μεθακίνης, η ενσωμάτωσή της σε νανο οδό, περιλαμβάνοντας μικκύλια και λιποσώματα, εμφανίζεται να είναι μία ελκυστική προσέγγιση για τους ερευνητικούς προσανατολισμούς της φαρμακευτικής νανοτεχνολογίας (Soehngen et al., 1988; Chen et al., 2007; Jaafar-Maalej et al., 2011; Milonaki et al., 2012; Sugihara et al., 2012). Τα εναλλακτικά φαρμακευτικά σκευάσματα διερευνώνται για να ληφθούν τελικά φαρμακευτικά προϊόντα με χαμηλότερη τοξικότητα και υψηλότερη σταθερότητα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η εφαρμογή λιπιδικής-βάσης νανοφορέων, συμπεριλαμβανομένων των μικκυλίων, των λιποσωμάτων, των στερεών λιπιδικών νανοσωματιδίων, των νανογαλακτωμάτων και των νανοεναιωρημάτων, στη μορφοποίηση αυτού του φαρμακομορίου είναι μία προσέγγιση για να επιτευχθεί μεγαλύτερη ασφάλεια (Lim et al., 2012). Εξαιτίας της χαμηλής διαλυτότητας της ινδο μεθακίνης σε υδατικά μέσα, έχει ήδη ενσωματωθεί σε λιποσωματικά νανοσωματίδια με αποτέλεσμα την αύξηση της διαλυτότητας της, η οποία επηρεάζει τη δραστηριότητά της εναντίον καρκινικών κυτταρικών σειρών που ακολουθείται από μείωση της τοξικότητάς της, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Επιπρόθετα, έχει αποδειχθεί πως η ενσωμάτωσή της σε λιποσωματικούς φορείς τροποποίησαν την κυτταρική της πρόσληψη ευνοώντας της επιλεκτική συσσώρευση στις κυτταρικές μεμβράνες από ό α υ έχει αποδειχθεί ό π ο φέεται και η παρατεταμένη αποδέσμευσή της (Chen et al., 2007).

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της σταθερότητας των stealth λιποσωμιακών φορέων που αποτελούνται από DPPC:DPPE-PEG 3000 (9:0.1, 9:0.5 και 9:1 μοριακοί λόγοι), ο καθορισμός της κλασματικής τους διάστασης, ο έλεγχος των φυσικοχημικών τους χαρακτηριστικών σε διαφορετικά μέσα, η αντιστοίχιση της εξάρτησης της κλασματικής διάστασης από την θερμοκρασία και η ανίχνευση των μορφολογικών διαφοροποιήσεων των λιποσωμιακών φορέων με την ενσωμάτωση ενός NSAIDs, όπως της IND. Αν και τα PEGylated λιποσώματα έχουν μελετηθεί εκτενώς, αυτή η μελέτη απο ελεί την πρώτη αναφορά, η οποία συμβάλει στην ποσοτικοποίηση των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών μέσω της μορφολογικής ανάλυσης. Αυτή η προέγγιση μπορεί να θεωρηθεί ως καινοτόμος και συμβάλει στη βαθύτερη κατανόηση του αναλυτικού τρόπου, που βασίζεται στη θερμοκρασιακά εξαρτώμενη μορφολογική ποσοτικοποίηση των λιποσωμιακών φορέων στους οποίους έχει ενσωματωθεί η IND.

15.1.2 Υλικά και Μέθοδοι

15.1.2.1 Υλικά

Τα φωσφολιπίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) και 1,2- dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N- [Methoxy(Polyethylene glycol)-3000] (Sodium salt) (DPPE-PEG 3000). Αγοράστηκαν από την Avanti Polar Lipids Inc., (Albaster, AL, USA) και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς επιπλέον καθαρισμό.

15.1.2.2 Παρασκευή των stealth λιποσωμάτων

Διαφορετικοί stealth λιποσωμιακοί φορείς παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο ενυδάτωσης του λεπτού λιπιδικού υμενίου (thin-film hydration method). Κατάλληλες ποσότητες των DPPC:DPPE-PEG-3000 (9:0.1, 9:0.5, και 9:1 μοριακοί λόγοι) μειγμάτων διαλύθηκαν σε μείγμα χλωροφορμίου / μεθανόλης (9:1 v/v), τότε μεταφέρθηκαν σε σφαιρική φιάλη, για την εξάτμιση των οργανικών διαλυτών σε συσκευή εξάτμισης υπό κενό. Ο διαλύτης εξατμίζεται αργά σε περιστρεφόμενη

συσκευή εξάτμισης υπό κενό μέχρι το σχηματισμό ομοιογενούς υμενίου. Το σχηματιζόμενο υμένιο αφήνεται σε ξηραντήρα κενού τουλάχιστον για 24 ώρες για την απομάκρυνση πιθανών ιχνών διαλυτών. Το λιπιδικό υμένιο ενυδατώνεται με νερό HPLC-καθαρότητας και PBS, αντίστοιχα. Η ενυδάτωση πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο πάνω από τη θερμοκρασία μετάβασης των λιπιδίων (41°C για τα λιπίδια DPPC) με αργή περιστροφή της φιάλης για μία ώρα. Στη συνέχεια οι σχηματισθείσες νανοδομές αφήνονται σε ηρεμία για 30 λεπτά πριν υποβληθούν σε δύο κύκλους υπερήχησης των 3 και 2 λεπτών με διακοπή 3 λεπτών στο ενδιάμεσο χρησιμοποιώντας αισθητήρα υπερήχησης (πλάτος ταλάντωσης 100%, διάρκεια παλμού 0.7 sec). Οι νανοδομές που σχηματίζονται με υπερήχηση αφήνονται σε ηρεμία για 30 λεπτά. Οι νανοδομές που περιείχαν το φαρμακομόριο παρασκευάστηκαν με την διάλυση της IND στο αρχικό μείγμα λιπιδίου/συμπολυμερούς στους ακόλουθους μοριακούς λόγους: DPPC: DPPE-PEG-3000:IND 9:0.1:1, DPPC: DPPE-PEG-3000:IND 9:0.5:1 and DPPC: DPPE-PEG-3000:IND 9:1:1. Η επίδραση της ενσωμάτωσης της IND στα μεικτά λιποσωμακικά παρασκευάσματα εκτιμήθηκε με μέτρηση της κατανομής του μεγέθους και ζ-δυναμικού των χημικών νανοφορέων. Η μέση υδροδυναμική διάμετρος χρησιμοποιήθηκε για το χαρακτηρισμό των χημικών εναιωρημάτων αμέσως μετά την παρασκευή τους (t=0days), καθώς και για την παρακολούθηση της φυσικής σταθερότητάς τους με την πάροδο του χρόνου.

15.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση

15.2.1 Φυσικοχημικός και μορφολογικός χαρακτηρισμός των stealth λιποσωμάτων

Τα φυσικοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των DPPC:DPPE-PEG-3000 (9:0.1, 9:0.5, και 9:1 μοριακοί λόγοι) λιποσωμάτων στα δύο υδατικά μέσα διασποράς παρουσιάζονται στον Πίνακα 15.1. Θα πρέπει να σημειωθεί πως το pH και η ιονική ισχύς του PBS προσομοιώνουν τις συνθήκες του ανθρώπινου οργανισμού. Οι τιμές PD.I. αποδεικνύουν αρκούντως μονοδιάσπαρτους πληθυσμούς μόνο για τους stealth φορείς. Η κατανομή μεγέθους επίσης αυξάνεται στο νερό HPLC-καθαρότητας (Πίνακας 15.1). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ορθώς παρασκευασμένα λιποσωμακικά συστήματα θα πρέπει να εμφανίζουν στενή κατανομή μεγέθους νανοσωματιδίων

(Heutault et al., 2003). Τα λιποσώματα στα οποία έχει ενσωματωθεί το PEGylated λιπίδιο είναι μικρότερο σε σύγκριση με τα συμβατικά DPPC λιποσώματα και στα δύο μέσα διασποράς. Η ενσωμάτωση 10% (μοριακός λόγος) του PEGylated λιπιδίου οδήγησαν σε λιποσώματα μικρότερου μεγέθους. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα λιποσώματα σύστασης DPPC:DPPE-PEG-3000 (9:1 μοριακός λόγος) στο PBS εμφανίζουν την μικρότερη R_h σε σύγκριση με όλα τα λιποσωμιακά εναιωρήματα που παρασκευάστηκαν (Πίνακας 15.1). Λαμβάνοντας υπόψη τη μεγαλύτερη ιονική ισχύ του PBS μπορεί κάποιος να υποθέσει ότι η παραπάνω παρατήρηση οφείλεται στη διαφορετική επιδιαλύτωση της πολυμερικής αλυσίδας της πολυαιθυλενογλυκόλης, όταν τα ιόντα είναι παρόντα στο εναιώρημα. Μία άλλη εξήγηση μπορεί να βασιστεί στις αλλαγές στην ενέργεια ενυδάτωσης του νερού, εξαιτίας της παρουσίας ιόντων στο PBS, καθώς και στον, τουλάχιστον εν μέρει, συντονισμό αυτών των ιόντων προς τις πολυμερικές αλυσίδες της πολυαιθυλενογλυκόλης, κάτι που τις καθιστά περισσότερο υδρόφιλες, βελτιώνοντας τα χαρακτηριστικά ενυδάτωσης των αλυσίδων PEG (Ganguly and Asawal, 2008). Τα stealth λιποσώματα παρουσιάζουν αρνητικό ζ-δυναμικό που σχετίζεται με την ενσωμάτωση του αρνητικά φορτισμένου DPPE-PEG λιπιδίου (Πίνακας 15.1). Το PEGylated λιπίδιο που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την εργασία είναι το εμπορικά διαθέσιμο λιπίδιο φωσφατίδυλοαιθανολαμίνη με ομοιοπολικά συνδεδεμένη αλυσίδα PEG. Αυτή η τροποποίηση προσδίδει στο λιπίδιο ένα δίκτυο αρνητικού φορτίου. Από την άλλη πλευρά, το ζ-δυναμικό των DPPC λιποσωμάτων στα δύο μέσα διασπορά ήταν περίπου μηδενικό, εξαιτίας της απουσίας φορτίου πάνω στην λιποσωμιακή επιφάνεια (Πίνακας 15.1). Η ανασύσταση στο PBS οδήγησε σε μία μετατόπιση του ζ-δυναμικού με λιγότερο αρνητικές τιμές για τα stealth λιποσώματα, πιθανών λόγω της υψηλότερης ιονικής ισχύος στο PBS. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αυτό είναι αποτέλεσμα της απουσίας ηλεκτροστατικής άπωσης και της συσσωμάτωσης των DPPC λιποσωμιακών φορέων στα υδατικά μέσα (Heutault et al., 2003).

Η κλασματική διάσταση (d_f) βρέθηκε ίση με 2.5 για τους συμβατικούς λιποσωμιακούς φορείς στο νερό HPLC καθαρότητας. Μία μείωση των τιμών d_f παρατηρήθηκε για τα stealth λιποσώματα στα υδατικά μέσα (Πίνακας 15.1). Όμως, η αναμειξιμότητα διαφορετικών βιοϋλικών (διαφορετικά στη φύση φωσφολιπίδια) για την παρασκευή stealth λιποσωμάτων θα πρέπει να ληφθεί υπόψη για τον έλεγχο των

μορφολογικών χαρακτηριστικών της επιφανείας, τα οποία μπορούν να ποσοτικοποιηθούν με τη χρήση της μορφοκλασματικής ανάλυσης.

Πίνακας 15.1

Τα φυσικοχημικά (R_h , PD.I. και ζ-δυναμικό) και μορφολογικά (d_f , R_g/R_h) χαρακτηριστικά των stealth λιποσωμάτων σε διαφορετικά μέσα διασποράς.

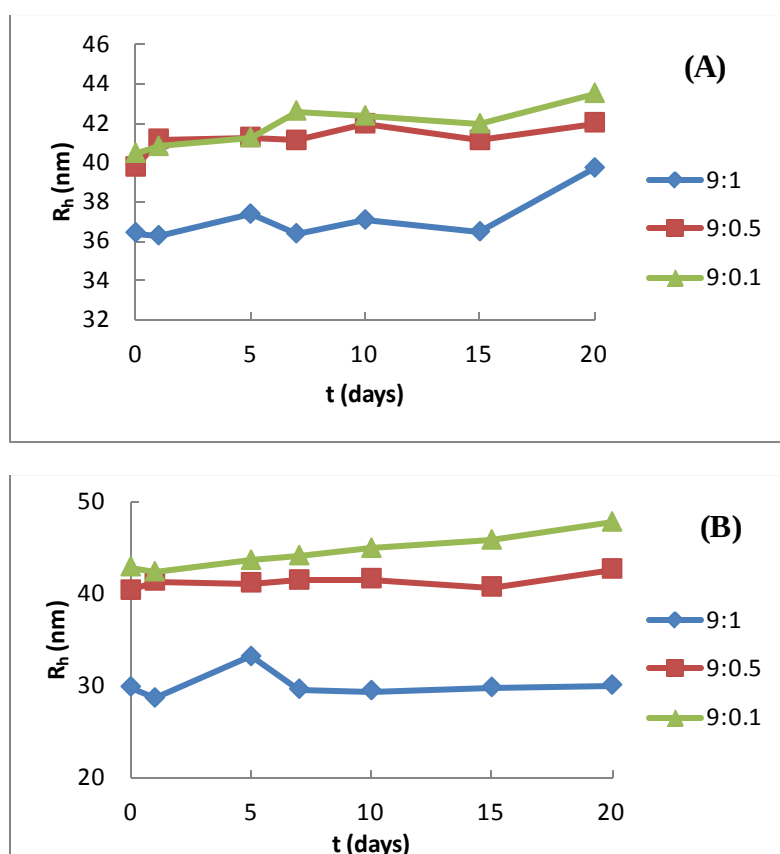
Δείγμα	Μέσο διασποράς	R_h (nm)	PD.I.	ζ-δυναμικό (mV)	d_f	R_g/R_h
DPPC	ΝερόHPLC καθαρότητας	62.50±2.5	0.605 ±0.016	+1.0±0.4	2.51	0.99
DPPC:DPPE-PEG 3000 (9:0.1 μοριακός λόγος)	ΝερόHPLC καθαρότητας	40.45±0.4	0.354 ±0.002	-19.9±3.1	1.99	1.25
DPPC:DPPE-PEG 3000 (9:0.5 μοριακός λόγος)	ΝερόHPLC καθαρότητας	39.75±0.4	0.327 ±0.008	-35.6±7.6	1.98	1.16
DPPC:DPPE-PEG 3000 (9:1 μοριακός λόγος)	ΝερόHPLC καθαρότητας	36.40±2.4	0.392±0.010	-28.7±2.4	1.98	1.07
DPPC	PBS	95.85±6.8	0.699±0.007	+0.7 ±0.2	2.73	1.24
DPPC:DPPE-PEG 3000 (9:0.1 μοριακός λόγος)	PBS	42.90±1.5	0.290 ±0.012	-12.1±1.5	2.13	1.45
DPPC:DPPE-PEG 3000 (9:0.5 μοριακός λόγος)	PBS	40.35±0.3	0.279±0.020	-10.2±5.7	1.95	1.25
DPPC:DPPE-PEG 3000 (9:1 μοριακός λόγος)	PBS	29.85±1.3	0.238 ±0.083	-19.7 ±3.4	2.29	0.93

Η μορφολογία των stealth λιποσωμιακών συστημάτων σε νερό HPLC καθαρότητας δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση καθώς ο λόγος του PEGylated λιπιδίου αυξήθηκε (Πίνακας 15.1). Τα ίδια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν για τα συμβατικά και τα stealth λιποσώματα στο PBS. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, έχει αναφερθεί πως μείωση των τιμών d_f για τα συμβατικά λιποσώματα μπορεί να λάβει χώρα καθώς η ιονική ισχύς του μέσου διασποράς αυξάνεται εξαιτίας των οσμωτικών δυνάμεων (Sabín et al., 2007). Αυτή η φαινομενολογία δεν παρατηρήθηκε για τα stealth λιποσώματα αυτής της μελέτης σε PBS (Πίνακας 15.1). Οι αλλαγές στις τιμές d_f υποδεικνύουν διαφορές στην εσωτερική μορφολογία των stealth λιποσωμάτων εξαιτίας της «αγκυροβόλησης» των PEG αλυσίδων (δηλαδή μία αύξηση στο πλάτος της μεικτής λιποσωμιακής μεμβράνης θα πρέπει να λαμβάνει χώρα ως αποτέλεσμα της παρουσίας επιδιαλυτωμένων PEG αλυσίδων).

Επιπρόσθετα, ο λόγος R_g/R_h , ο οποίος είναι μία σημαντική παράμετρος για την κατανόηση της διαμόρφωσης των λιποσωμιακών νανοσωματιδίων στη διασπορά, επίσης προσδιορίστηκε. Έχει αναφερθεί ότι ο λόγος R_g/R_h λαμβάνει τιμές 0.775 για σκληρές συμπαγείς σφαίρες και 1.0 για κυστίδια με λεπτά τοιχώματα, ενώ τιμές από 1.3 έως 1.5 αποδεικνύουν διαμόρφωση τυχαίας σπείρας (ανοιχτή/ χαλαρή δομή) στην περίπτωση των μακρομοριακών αλυσίδων. Οι υπολογισμένες τιμές των τιμών R_g/R_h παρουσιάζονται στον Πίνακα 15.1. Αυτός ο λόγος είναι ευαίσθητος στην αλλαγή του σχήματος των σωματιδίων σε διάλυμα ή σε διασπορά και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της εσωτερικής μορφολογίας των νανοσωματιδίων. Οι τιμές R_g/R_h είναι κοντά στη μονάδα για τα DPPC λιποσώματα, αποδεικνύοντας μία κυστιδική μορφολογία, όπως ήταν εξάλλου αναμενόμενο. Ο λόγος R_g/R_h αυξήθηκε με την αύξηση του PEGylated λιπιδίου. Αυτές οι παρατηρήσεις θα πρέπει να αποδοθούν στην «πάχυνση» της λιποσωμιακής μεμβράνης των stealth λιποσωμάτων που περιέχουν DPPE-PEG 3000, αποδεικνύοντας μία αλλαγή στην αναμενόμενη δομή των λιποσωμάτων από μία ανοιχτή/ χαλαρή δομή σε μία πιο συμπαγή συνολική νανοδομή.

Η κολλοειδής σταθερότητα σε βάθος χρόνου των αρχικά σχηματιζόμενων stealth λιποσωμιακών νανοδομών διερευνήθηκε. Ο έλεγχος της κατανομής μεγέθους είναι μεγάλης σημασίας για την παρασκευή λιποσωμιακών εναιωρημάτων, επειδή το μέγεθος των λιποσωμάτων μπορεί να τροποποιήσει τη βιολογική σταθερότητα και το

μηχανισμό πρόσληψης από τα μακροφάγα. Η φυσική σταθερότητα σε βάθος χρόνου όλων των λιποσωμιακών σκευασμάτων προσδιορίστηκε σε βάθος χρόνου 20 ημερών μετρώντας το μέγεθος και την κατανομή μεγέθους. Τα stealth λιποσώματα στα δύο μέσα διασποράς βρέθηκαν να διατηρούν τα αρχικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους (μέγεθος και κατανομή μεγέθους) κατά ελάχιστο για το χρονικό διάστημα κατά το οποίο μελετήθηκαν (Εικόνα 15.1).



Εικόνα 15.1. Μελέτη σταθερότητας των stealth λιποσωμιακών συστημάτων σε **(A)** νερό HPLC- καθαρότητας και σε **(B)** PBS.

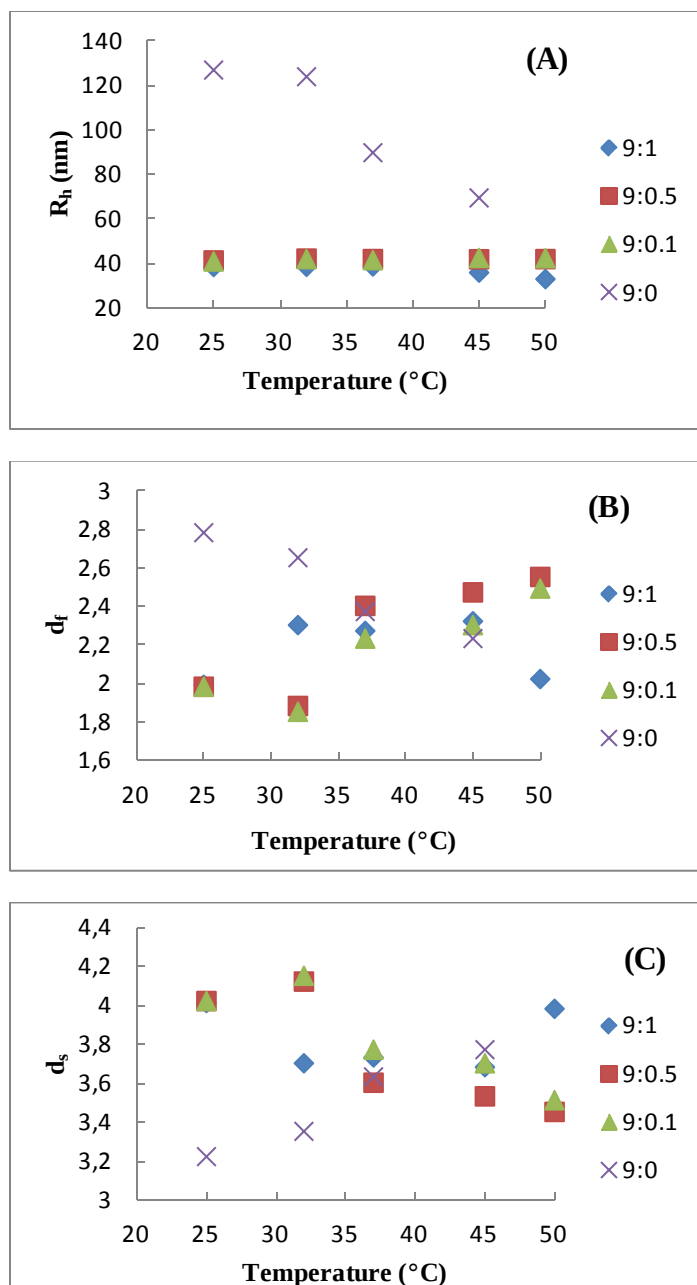
Η λιποσωμιακή σταθερότητα αποδεικνύει ότι οι ηλεκτροστατικές και οι στερικές αλληλεπιδράσεις είναι υπεύθυνες για να κρατούν τα λιποσώματα σε απαιώρηση έτσι ώστε να αποφεύγεται η συσσωμάτωση και η σύντηξη εξαιτίας των van der Waals αλληλεπιδράσεων, όπως ακριβώς παρουσιάζονται στην κλασσική DLVO θεωρία. Υψηλές τιμές ζ-δυναμικού κατά απόλυτη τιμή αποδεικνύουν την ηλεκτροστατική άπωση. Επιπρόσθετα, το προστατευτικό στρώμα των αλυσίδων PEG πιθανότητας δρα

ως στερικός φραγμός / στερικό εμπόδιο εμποδίζοντας τη σύντηξη των λιποσωμιακών κυστιδίων, εξαιτίας της προσθήκης των PEG πολυμερικών αλυσίδων που αυξάνουν τον «παράγοντα πακεταρίσματος» στην stealth λιποσωμιακή διπλοστοιβάδα (Liu and Liu, 1995; Silvander et al., 2000). Είναι ευρέως γνωστό ότι η βιοκατανομή κάθε κολλοειδούς συστήματος μεταφοράς φαρμακομορίων εξαρτάται από το μέγεθος και την κατανομή μεγέθους των νανοσωματιδίων (Liu and Liu, 1996). Από την άλλη πλευρά, οι ιδιότητες των νανοσωματιδίων κατά την *in vivo* κυκλοφορία και ο ρυθμός της λιποσωμιακής κάθαρσης από το αίμα από το δίκτυο-ενδοθυλιακό σύστημα εξαρτάται από τις ιδιότητες επιφανείας και από τη λιποσωμιακή σύσταση (Shimanouchi et al., 2011).

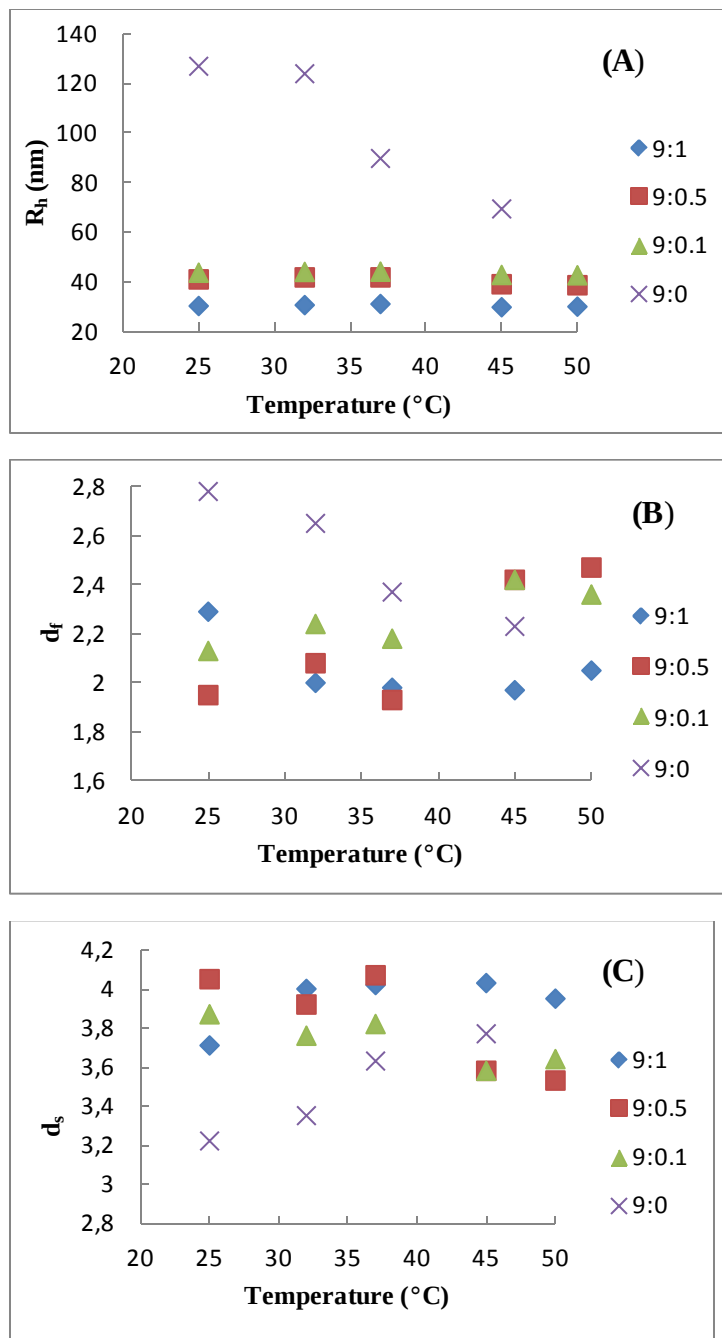
15.2.2 Η επίδραση της θερμοκρασίας στη λιποσωμιακή μορφολογία

Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα των λιποσωμιακών φορέων είναι η δυνατότητα ελέγχου της μορφολογίας και της κατανομής μεγέθους, και κατά επέκταση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του συστήματος, με τη βοήθεια μία μεγάλης ποικιλίας φυσικοχημικών παραμέτρων. Πιθανότατα, η πιο σημαντική από αυτές είναι η θερμοκρασία, ειδικότερα για εφαρμογές μελετών σταθερότητας στη φαρμακευτική βιομηχανία.

Η κλασματική διάσταση διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο για τη διασαφήνιση των μορφολογικών χαρακτηριστικών συμβατικών λιποσωμάτων κατά τη διάρκεια αλλαγών των φυσικοχημικών παραμέτρων του λιποσωμιακού εναιωρήματος, όπως είναι η συγκέντρωση και η θερμοκρασία. Στην μελέτη αυτή, διερευνάται η θερμοκρασιακή εξάρτηση των φυσικοχημικών παραμέτρων των stealth λιποσωμάτων κατά τη διαδικασία της θέρμανσης στα δύο μέσα διασποράς (Εικόνες 15.2 και 15.3).



Εικόνα 15.2. (A) R_h , (B) d_f , (C) d_s vs. θερμοκρασία για τα stealth λιποσώματα σε νερό HPLC καθαρότητας (η συγκέντρωση των λιποσωμάτων είναι σταθερή και ίση με 5×10^{-3} mg/ml).



Εικόνα 15.3. (A) R_h , (B) d_f , (C) d_s vs. θερμοκρασία για τα stealth λιποσώματα σε PBS (η συγκέντρωση των λιποσωμάτων είναι σταθερή και ίση με 5×10^{-3} mg/ml).

Αυτοί οι τύποι των πειραμάτων προσβάλλουν την απόκριση των stealth λιποσωμιακών σκευασμάτων μετά την χορήγησή τους σε εμπύρετες ή φλεγμονώδεις καταστάσεις. Οι τιμές R_h των stealth λιποσωμάτων παρέμειναν σταθερές κατά τη διάρκεια της διαδικασίας θέρμανσης στους 50°C, ενώ οι τιμές d_f αυξήθηκαν κατά τη διάρκεια της θέρμανσης (Εικόνες 15.2b και 15.3b), ειδικότερα για τους stealth φορείς στο νερό HPLC καθαρότητας. Στην υψηλότερη θερμοκρασία ο λιποσωμιακός πληθυσμός έγινε περισσότερο ομοιογενής. Από την άλλη πλευρά, οι τιμές R_h των συμβατικών DPPC λιποσωμάτων μειώθηκαν κατά τη διάρκεια της θέρμανσης στους 50°C στα δύο μέσα διασποράς, ενώ οι τιμές d_f μειώθηκαν (Εικόνες 15.2a και 15.3a). Στην υψηλότερη θερμοκρασία ο πληθυσμός των stealth λιποσωμιακών νανοφορέων έγινε πιο ομοιογενής και στο PBS. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ενώ το μέσο μέγεθος των διαφορετικών λιποσωμιακών νανοφορέων δεν άλλαξε σημαντικά στο PBS, οι κλασματικές διαστάσεις που προσδιορίστηκαν έδειξαν κάποιες διαφορές που σχετίζονται πιθανότατα με αλλαγές στη μορφολογία των stealth νανοφορέων, εξαιτίας της ενσωμάτωσης των PEG αλυσίδων. Οι τιμές της κλασματικής διάστασης της επιφανείας για τα συστήματα που μελετήθηκαν υπολογίζονται με βάση την εξίσωση:

$$d_f = 6 - d_s$$

όπου d_s είναι η κλασματική διάσταση της επιφανείας. Οι τιμές d_s αποδεικνύουν αυξημένη κυρτότητα σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από τη θερμοκρασία κύριας μετάβασης των DPPC λιπιδίων ($T_m=41^\circ\text{C}$ για τα DPPC λιπίδια) (Εικόνες 15.2c και 15.3c). Η μεμβρανική επιφάνεια γίνεται περισσότερο υδρόφοβη σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από τη θερμοκρασία της κύριας μετάβασης των DPPC λιπιδίων (Vogt et al., 2010). Για το λόγο αυτό, αυτά τα αποτελέσματα είναι μία πρώτη ένδειξη της παρουσίας μία ετερογενούς νανοδομημένης μορφολογία για τα stealth λιποσωμιακά συστήματα και η λιποσωμιακή μεμβράνη γίνεται περισσότερο υδρόφοβη (Vogt et al., 2010). Επιπρόσθετα, εμφανίζεται μία αύξηση της κινητικότητας των πολικών κεφαλών όταν η λιποσωμιακή μεμβράνη βρίσκεται στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση και αυτό επηρεάζει τη δυναμική συμπεριφορά της λιπιδικής μεμβράνης. Θα πρέπει να σημειωθεί πως ενώ το μέσο μέγεθος των διαφορετικών stealth λιποσωμάτων δεν άλλαξε σημαντικά, οι κλασματικές διαστάσεις έδειξαν κάποια διαφοροποίηση, που σχετίζονται με αλλαγές στη λιποσωμιακή μορφολογία και στα δύο μέσα διασποράς. Η κλασματική διάσταση της μάζας και η κλασματική διάσταση

της επιφανείας προσφέρουν μία ποσοτικοποίηση των αλλαγών της μορφολογίας των stealth λιποσωμάτων σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας, ανιχνεύοντας διαφορές που η R_h από μόνη της δεν φανερώνει.

15.2.3. Μικροπολικότητα και μικρορευστότητα των stealth λιποσωματικών μεμβρανών.

Η Φθορισμομετρία έχει χρησιμοποιηθεί στην προσπάθεια να εξαχθούν χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τη νανοδόμηση και το μικροπεριβάλλον των stealth λιποσωματικών νανοδομών σε υδατικά μέσα διασποράς. Οι μεταβολές που σημειώνονται στην stealth λιποσωματική μεμβράνη παρακολουθήθηκαν με μετρήσεις φθορισμομετρίας του ενσωματωμένου πυρενίου στα δύο μέσα διασποράς. Ο λόγος I_1/I_3 στο φάσμα εκπομπής του φθορισμού του πυρενίου χρησιμοποιείται ως μέτρο της πολικότητας του περιβάλλοντος που περιβάλλει τον πυρένιο. Σε υδατικό ή σε πολικό μέσο διασποράς αυτός ο λόγος βρέθηκε να είναι ίσος μεταξύ του 1.6 και 1.9. Η μικροπολικότητα των υδρογονανθρακικών αλυσίδων του DPPC και των DPPC:DPPE-PEG 3000 λιποσωματικών διπλοστοιβάδων δεν άλλαξε στατιστικά σημαντικά στο νερό HPLC καθαρότητας και στο PBS, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 15.2. Οι αλλαγές στην μικροπολικότητα είναι αναμενόμενες λόγω της ενσωμάτωσης του περισσότερο πολικού PEGylated λιπιδίου στην περιοχή των περιοχών των υδρογονανθρακικών ουρών της λιπιδικής διπλοστοιβάδας, όπως καθώς και στις πιθανές μεταβολές που προκαλούνται στη δομή της διπλοστοιβάδας, αλλά κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται ξεκάθαρα. Η μικροπολικότητας στην περιοχή της ουράς παραμένει αμετάβλητη και λίγο υψηλότερη από ότι στην περίπτωση της ενιαίας ουράς επιφανειοδραστικού μικκυλίου. Από την άλλη πλευρά, η μικρορευστότητα στην περιοχή των υδρόφοβων ουρών των stealth λιποσωματικών μεμβρανών μειώνεται με την μεταβολή της ιονικής ισχύος του μέσου διασποράς (από νερό HPLC καθαρότητας σε PBS) και με την αύξηση της ενσωμάτωσης του PEGylated λιπιδίου (οι τιμές I_E/I_M στον Πίνακα 15.2.) Θα μπορούσε να εξαχθεί το συμπέρασμα πως το μικροϊξώδες αυξήθηκε για τα stealth λιποσώματα στο PBS, πιθανότατα εξαιτίας της αύξησης της ιονικής ισχύος (χαμηλότερες τιμές I_E/I_M στον Πίνακα 15.2). Εναλλακτικά, η αύξηση του υδατικού περιεχομένου στο νερό HPLC καθαρότητας μπορεί να ευνοείται από την ενσωμάτωση του πυρενίου στα stealth

λιποσώματα, οδηγώντας σε μία μεγαλύτερη συσσωμάτωση του πυρενίου μέσα στη διπλοστοβάδα. Η συσσωμάτωση του πυρενίου φαίνεται να είναι μικρότερη στις διασπορές του PBS πιθανότατα λόγω αλλαγών στη δομή της διπλοστοβάδας, ως αποτέλεσμα των αλλαγών (της αύξησης) της ιονικής ισχύος του μέσου διασποράς.

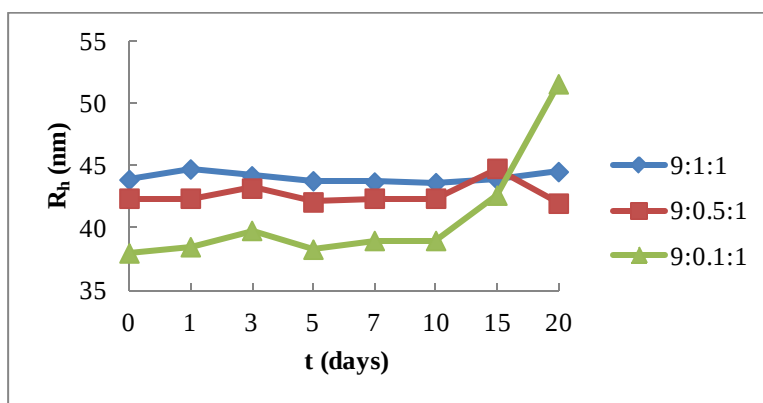
15.2.4 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και ενσωμάτωση της IND στα stealth λιποσώματα

Η IND είναι ένα αμφίφιλο φαρμακομόριο και όπως όλα τα NSAIDs αλληλεπιδρούν σημαντικά με τις λιπιδικές μεμβράνες (Lichtenberger et al., 1995, 2006; Giroud et al., 1999; Zhou et al., 2005; Lúcio et al., 2008; Nunes et al., 2011). Η επίδραση της μεθόδου παρασκευής των λιποσωμάτων, η λιπιδική σύνθεση, η ύπαρξη φορτίου και χοληστερόλης στην ενσωμάτωση της IND σε λιποσωμακοίς φορείς, καθώς και η κινητική της αποδέσμευσής της και τα *in vivo* πειράματα έχουν ήδη διερευνηθεί (Srinath et al., 2000a,b; Palakurthi et al., 2005). Στην παρούσα μελέτη η IND χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο βιοδραστικό συστατικό για την παρακολούθηση των αλλαγών της μορφολογίας των stealth λιποσωμάτων εξαιτίας της ενσωμάτωσης ενός αμφιφίλου θεραπευτικού παράγοντα.

Η IND ενσωματώθηκε στα stealth λιποσώματα που αποτελούνταν από DPPC:DPPE-PEG-3000:IND (9:0.1:1, 9:0.5:1 και 9:1:1 μοριακοί λόγοι). Το μέγεθος και η κατανομή μεγέθους, το ζ-δυναμικό και οι τιμές της κλασματικής διάστασης των λιποσωμάτων παρουσιάζονται στον Πίνακα 15.3. Η ενσωμάτωση της IND οδήγησε σε μικρή αύξηση του μεγέθους των stealth λιποσωμάτων. Οι τιμές του ζ-δυναμικού παρουσίασαν μία μετατόπιση σε λιγότερο αρνητικές τιμές μετά την ενσωμάτωση της IND (Πίνακας 15.3). Από την άλλη πλευρά, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των stealth λιποσωμάτων δεν παρουσίασαν καμία στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση μετά την ενσωμάτωση της IND. Οι τιμές *df* των DPPC:DPPE-PEG-3000:IND λιποσωμάτων μειώθηκε ελάχιστα μετά την ενσωμάτωση του φαρμακομορίου (ειδικότερα για τα stealth λιποσώματα με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε DPPE-PEG 3000). Θα πρέπει να σημειωθεί πως αυτές οι μικρές μεταβολές στη νανοδόμηση της λιπιδικής διπλοστοβάδας, όπως αποδεικνύει η μορφοκλασματική ανάλυση, είναι εξαιτίας της ενσωμάτωσης της IND. Γενικά, η IND διαφοροποιεί τη χωροχρονική

συμπεριφορά φάσης των λιποσωμάτων, προκαλεί μεμβρανική σύντηξη και αλλαγές στην οργάνωση των πρωτεϊνών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Zhou et al., 2012). Θα πρέπει να σημειωθεί πως η επίδραση των NSAIDs στις φυσικές ιδιότητες της λιπιδικής διπλοστοιβάδας έχει ήδη μελετηθεί (Lúcio et al., 2008; Nunes et al., 2011). Αυτές οι ερευνητικές κατευθύνσεις αποτελούν μία βιοφυσική προσέγγιση που παρέχουν λεπτομερείς πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις φαρμακομορίου / μεμβράνης (Lúcio et al., 2008; Nunes et al., 2011). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η IND τοποθετείται στην περιοχή της λιπιδικής αλυσίδας κοντά στις πολικές κεφαλές σε συνθήκες pH ανάλογες με αυτές του νερού HPLC καθαρότητας (Nunes et al., 2011). Για το λόγο αυτό, η μορφολογία των stealth λιποσωμάτων δεν άλλαξε σημαντικά μετά την ενσωμάτωση του φαρμακομορίου. Η παρούσα μελέτη αποπλεί την πρώτη αναφορά στη διεθνή του προσδιορισμού της κλασματικής διάστασης των stealth λιποσωματικών φορέων στους οποίους είναι ενσωματωμένο ένα βιοδραστικό μόριο, οδηγώντας στον προσδιορισμό των δομικών και μορφολογικών μεταβολών μετά την ενσωμάτωση του φαρμακομορίου.

Η μελέτη σταθερότητα σε βάθος χρόνου όλων των συστημάτων με ενσωματωμένη την IND πραγματοποιήθηκε με τη μέτρηση της κατανομής μεγέθους των λιποσωμάτων για μία χρονική περίοδο μέχρι 3 εβδομάδες. Όλοι οι λιποσωματικοί φορείς στους οποίους είχε ενσωματωθεί το αμφίφιλο φαρμακομόριο βρέθηκαν να διατηρούν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους το λιγότερο για χρονικό διάστημα 10 ημερών (Εικόνα 15.4).



Εικόνα 15.4. Μελέτη σταθερότητας των stealth λιποσωματικών συστημάτων με ενσωματωμένη την IND σε νερό HPLC- καθαρότητας.

Θα πρέπει να υπογραμμιστεί πως το ποσοστό ενσωμάτωσης της IND στους φορείς αυξήθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης του PEGylated λιπιδίου, πιθανότητα εξαιτίας του γεγονότος ότι η μεμβράνη έγινε περισσότερο πολική με την παρουσία του PEGylated λιπιδίου, όπως απέδειξαν τα αποτελέσματα της φθορισμομετρίας (Πίνακες 15.2 και 15.3). Υπάρχει μία άμεση συσχέτιση μεταξύ της μείωσης της προσδιοριζόμενης τιμής d_f και της αύξησης του ποσοστού ενσωμάτωσης του φαρμακομορίου.

Πίνακας 15.2

Οι λόγοι της έντασης φθορισμού του πυρενίου I_1/I_3 (ένδειξη της μικροπολικότητας) και I_E/I_M (ένδειξη της μικρορευσιμότητας) για τις stealth λιποσωματικές διπλοστοιβάδες.

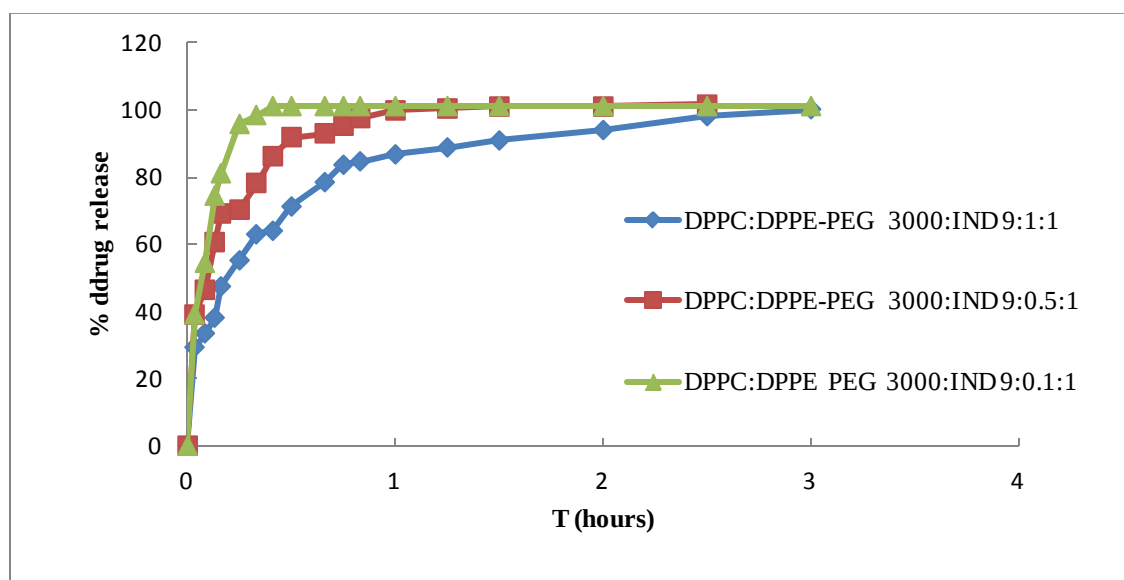
Δείγμα	Νερό HPLC καθαρότητας		PBS	
	I_1/I_3	I_{ex}/I_m	I_1/I_3	I_{ex}/I_m
DPPE	1.36	0.76	1.35	0.36
DPPE:DPPE-PEG 3000 (9:0.1 μοριακός λόγος)	1.30	0.51	1.27	0.07
DPPE:DPPE-PEG 3000 (9:0.5 μοριακός λόγος)	1.34	0.08	1.35	0.12
DPPE:DPPE-PEG 3000 (9:1 μοριακός λόγος)	1.40	0.38	1.36	0.16

Πίνακας 15.3

Τα φυσικοχημικά (R_h , PD.I. και ζ -δυναμικό) και μορφολογικά (d_f) χαρακτηριστικά καθώς και το ποσοστό ενσωμάτωσης (%IE) των stealth λιποσωματικών συστημάτων με ενσωματωμένη IND σε νερό HPLC καθαρότητας.

Δείγμα	R_h (nm)	PD.I.	d_f	ζ -pot (mV)	% IE
DPPC:DPPE-PEG 3000:IND (9:0.1:1 μοριακός λόγος)	38.0 $\pm$ 0.9	0.279 $\pm$ 0.014	1.93	-7.8 $\pm$ 9.1	12.40
DPPC:DPPE-PEG 3000:IND (9:0.5:1 μοριακός λόγος)	42.4 $\pm$ 0.2	0.314 $\pm$ 0.032	2.04	-11.8 $\pm$ 1.6	13.70
DPPC:DPPE-PEG 3000:IND (9:1:1 μοριακός λόγος)	43.9 $\pm$ 0.5	0.311 $\pm$ 0.002	1.83	-23.6 $\pm$ 3.4	14.80

Η in vitro αποδέσμευση της IND από τα stealth λιποσώματα στους 37°C παρουσιάζεται στην Εικόνα 15.5. Παρατηρήθηκε πως η in vitro αποδέσμευση του φαρμακομορίου από τα παρασκευασθέντα λιποσώματα είναι αρκετά ταχεία μόνο για τους νανοφορείς που περιείχαν το χαμηλότερο μοριακό λόγο του PEGylated λιπιδίου (DPPC:DPPE-PEG-3000:IND 9:0.1:1 μοριακός λόγος) στους 37°C (Εικόνα 15.5).



Εικόνα 15.5. Αθροιστική αποδέσμευση του φαρμακομορίου από τα stealth λιποσώματα σύστασης DPPC: DPPE-PEG 3000: IND 9:0.1:1, 9:0.5:1, 9:1:1 μοριακός λόγος (κάθε τιμή αναπαριστά το μέσο όρο $\pm$ S.D. των $n = 3$ ανεξάρτητων πειραμάτων).

Ο συνδυασμός των PEGylated λιπιδίων με τα φωσφολιπίδια για την ανάπτυξη stealth νανοφορέων εμφανίζεται ως πολλά υποσχόμενη, κυρίως εξαιτίας του γεγονότος ότι το PEGylated λιπίδιο μεταβάλλει της κλασματική μορφολογία των μεικτών νανοφορέων και επιδρά στο ρυθμό αποδέσμευσης του φαρμακομορίου. Στην πραγματικότητα, η αποδέσμευση του φαρμακομορίου είναι αργότερη όσο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητα του DPPE-PEG 3000 λιπιδίου στο λιποσωματικό σύστημα. Τα παρόντα αποτελέσματα δείχνουν μία συσχέτιση μεταξύ της κλασματικής διάστασης, του ποσοστού ενσωμάτωσης του φαρμακομορίου και της κινητικής της αποδέσμευσης. Αυτή η φαινομενολογία λειτουργεί ως ένας παράγοντας ελέγχου για την παρασκευή και την ανάπτυξη stealth λιποσωμάτων με το επιθυμητό ρυθμό αποδέσμευσης, ρυθμίζοντας το ρυθμό αποδέσμευσης της IND, βελτιώνοντας το θεραπευτικό της δείκτη και τελικά μειώνοντας τις ανεπιθύμητες ενέργειές της.

15.3. Συμπεράσματα

Λιποσωμακοί φορείς που αποτελούνται από DPPC:DPPE-PEG-3000:IND (9:0.1:1, 9:0.5:1 και 9:1:1 μοριακοί λόγοι) μελετήθηκαν σε δύο μέσα διασποράς και βρέθηκαν να διατηρούν την αρχική κατανομή μεγέθους το η το λιγότερο για το χρονικό διάστημα για το οποίο μελετήθηκαν (δηλαδή για 20 ημέρες). Η σταθερότητα το η αποδεικνύει ότι οι ηλεκτροστατικές και οι στεरिकές απώσεις είναι υπεύθυνες για να κρατούν τα λιποσώματα σε απαιώρηση και να αποφεύγεται η συσσώματωση. Οι υψηλές τιμές του ζ-δυναμικού υποδηλώνουν την ύπαρξη ηλεκτροστατικών απώσεων, ειδικότερα στο νερό HPLC καθαρότητας. Η διασπορά στο PBS έχει ως αποτέλεσμα μία μετατόπιση του ζ-δυναμικού σε λιγότερο αρνητικές τιμές για τα stealth λιποσώματα, προφανώς εξαιτίας των φαινομένων εξουδετέρωσης των φορτίων (screening effects). Η μορφολογία και οι δομικές ιδιότητες των τριών λιποσωματικών συστημάτων δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα δύο μέσα διασποράς, όπως αποδεικνύεται από την ανάλυση των μορφοκλασματικών συνόλων. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά (d_f και d_s) μεταβλήθηκαν σημαντικά σε διαφορετικές θερμοκρασίες, αποκαλύπτοντας αλλαγές που οι μετρήσεις μεγέθους στις ίδιες συνθήκες δεν κατέδειξαν. Η μικροπολικότητα της μεμβράνης παρέμεινε αμετάβλητη με την αύξηση του PEGylated λιπιδίου στα δύο μέσα διασποράς. Η

συσσωμάτωση του πυρενίου, όπως αποδεικνύεται από τις τιμές I_E/I_M , είναι ένδειξη των αλλαγών της δομής και της ρευστότητας της μεμβράνης. Η IND ενσωματώθηκε σε διαφορετικούς λιποσωμιακά συστήματα και τα αρχικά αποτελέσματα έδειξαν ότι με την ενσωμάτωση της IND το μέγεθος των λιποσωμάτων παρέμεινε ανεπηρέαστο σε αντίθεση με τις τιμές του ζ-δυναμικού στη χαμηλότερη συγκέντρωση του PEGylated λιπιδίου. Οι τιμές d_f μειώθηκαν ελάχιστα αποκαλύπτοντας αλλαγές στη μορφολογία των stealth λιποσωμάτων. Είναι από τις πρώτες αναφορές στη βιβλιογραφία που πραγματοποιείται ενσωμάτωση της ινδομεθακίνης σε stealth λιποσώματα και η ποσοτικοποίηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των stealth λιποσωμάτων με ενσωματωμένο μη Στερεοειδές Αντιφλεγμονώδες Φάρμακο.

Συμπερασματικά, η πειραματικά προσδιορισμένη κλασματική διάσταση αντικατοπτρίζει με έναν πολύ περιεκτικό τρόπο την αυτό-συναρμολόγηση και τη μορφολογική πολυπλοκότητα των stealth λιποσωμάτων. Αυτό θα μπορούσε με τη σειρά του να είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την ανάπτυξη και το χαρακτηρισμό καινοτόμων νανοφορέων για την ενσωμάτωση βιοδραστικών μορίων με σαφή και ολοκληρωμένη γνώση των δομικών τους χαρακτηριστικών. Εν κατακλείδι, η μορφοκλασματική ανάλυση μπορεί να αποτελέσει ένα νέο αναλυτικό εργαλείο που θα βασίζεται στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των λιποσωμιακών φορέων, συμπληρωματικό των ήδη υπαρχόντων συμβατικών αναλυτικών τεχνικών. Τελικά, αυτή η προέγγιση μπορεί να επηρεάσει τη φαρμακοκινητική συμπεριφορά των NSAIDs και να βελτιώσει τη θεραπευτική αξία τους εξομαλύνοντας τις ανεπιθύμητες ενέργειές τους λόγω της αλληλεξάρτησης του μεγέθους, του σχήματος και της μορφολογίας που επιδρούν στη βιολογική και φαρμακοκινητική συμπεριφορά τους. Αυτοί οι ερευνητικοί προσανατολισμοί μπορούν να διαμορφώσουν ένα μαθηματικό μοντέλο για την πρόβλεψη της φυσικής συμπεριφοράς λιποσωμιακών νανοφορέων.

16 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdullah, N., Yuriz, A., Curtis, T.P., Yahya, A., Ujang, Z., 2013. Characterization of aerobic granular sludge treating high strength agro-based wastewater at different volumetric loadings. *Bioresour. Technol.* 127, 181-187.
- Accardo, A., Affinito, M., Carrozzi, M., Bouquet, F., 1997. Use of fractal dimension for the analysis of electroencephalographic time series. *Biol. Cybern.* 77, 339-350.
- Adams, N., Schubert, U., 2007. Poly(2-oxazolines) in biological and biomedical application contexts. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 59, 1504-1520.
- Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L.K., Farokhzad, O.K., 2008. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol. Pharm.* 5,505-515.
- Albrecht-Buehler, G., 2012. Fractal genome sequences. *Gene.* 498, 20-27.
- Allen, T.M., Cheng, W.W., Hare, J.I., Laginha, K.M., 2006. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of lipidic nano-particles in cancer. *Anticancer Agents Med. Chem.* 6,513-523.
- Amoozgar, Z., Yeo, Y., 2012. Recent advances in stealth coating of nanoparticles drug delivery systems. *Wiley Interdiscipl. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 4, 219-433.
- Anderson, B.J., Holford, N.H., 2009. Mechanistic basis of using body size and maturation to predict clearance in humans. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 24(1), 25-36.
- Aon, M.A., Cortassa, S., Lloyd, D., 2000. Chaotic dynamics and fractal space in biochemistry: simplicity underlies complexity. *Cell Biol. Int.* 24,581-587.
- Aon, M.A., O' Rourke, B., Cortassa, S., 2004. The fractal architecture of cytoplasmic organization: scaling, kinetics and emergence in metabolic networks. *Mol. Cell Biochem.* 256-257(1-2):169-184.
- Aranda, J.S., Salgado, E., Muñoz-Diosdado, A., 2006. Multifractality in intracellular enzymatic reactions. *J. Theor. Biol.* 240, 209-217.

- Avnir, D., Farin, D., Pfeifer, P., 1984. Molecular fractal surfaces. *Nature*, 308, 261-263.
- Baish, J.W., Jain, R.K., 2000. Fractals and cancer. *Cancer Research*, 60:3683-3688.
- Balmert, S.C., Little, S.R., 2012. Biomimetic delivery with micro- and nanoparticles, *Adv. Mater.* 24, 3757-3778.
- Bangham, A. D., Standish, M. M., Watkins, J. C., 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13, 238-252
- Bancaud, A., Lavelle, C., Huet, S., Ellenberd, J., 2012. A fractal model for nuclear organization: current evidence and biological implications. *Nucleic Acids Res.* In press.
- Bauer, M., Schroeder, S., Tauhardt, L., Kempe, K., Schubert, U.S., Fischer, D., 2013. In vitro hemocompatibility and cytotoxicity study of poly(2-methyl-2 oxazoline) for biomedical applications. *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* 51, 1816-1821.
- Bonacucina, G., Cepsi, M., Misici-Falsi, M., Palmieri, G. F., 2009. Colloidal Soft Matter as Drug Delivery System. *J. Pharm. Sci.* 98,1-42.
- Brittain, H.G., Bogdanowich, S.J., Bugay, D.E., DeVincentis, J., Lewen, G., Newman, A.W., 1991. Physical characterization of pharmaceutical solids. *Pharm. Res.* 8, 963-973.
- Brodsky, V.Y., 2006. Direct cell-cell communication: a new approach derived from recent data on the nature and self-organization of ultradian (circadian) intracellular rhythms. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 81, 143-162.
- Brú, A., Albertos, S., Subiza, J.L., Carcía-Asenjo, J.L., Brú, I., 2003. The universal dynamics of tumor growth. *Biophysical Journal*, 85: 2948-2961.
- Bunde, A., Havlin, S., Nossal, R., Stanley, H.E., Weiss, G.H., 1985. On controlled diffusion-limited drug release from a leaky matrix. *J. Chem. Phys.* 83, 5909-5913.
- Bushell, G.C., Yan, Y.D., Woodfield, D., Raper, J., Amal, R., 2002. On techniques for measurement of the mass fractal dimension of aggregation. *Adv. Colloid. Interface Sci.* 95,1-50.

- Burnett, D.J., Heng, J.Y., Thielmann, F., Garcia, A.R., Naderi, M., Acharya, M., 2011. Measuring surface roughness of pharmaceutical powders using vapor sorption methods. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 12(1), 56-61.
- Canelas, D.A., Herlihy, K.P., DeSimone, J.M., 2009. Top-down particle fabrication: control of size and shape for diagnostic imaging and drug delivery. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 1,393-404.
- Cattel, L., Ceruti, M., Dosio, F., 2004. From conventional to stealth liposomes: a new frontier in cancer chemotherapy. *J. Chemother.* 4,94-97.
- Caruthers, S.D., Wickline, S.A., Lanza, G.M., 2007. Nanotechnological applications in medicine. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18, 26-30.
- Cerofini, G.F., Narducci, D., Amato, P., Romano, E., 2008. Fractal Nanotechnology, *Nanoscale Res. Lett.*, 3, 381-385.
- Champion, J.A., Mitragotri, S., 2006. Role of target geometry in phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103, 4930-4934.
- Champion, J.A., Katare, Y.K., Mitragotri, S., 2007. Particle shape: A new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers, *J. Control. Release* 121, 3-9.
- Chardot, V., Banon, S., Misiuwianiec, M., Hardy, J., 2002. Growth kinetics and fractal dimensions of casein particles during acidification. *J. Dairy Sci.*, 85, 8-14.
- Chen, M.L., 2008. Lipid excipients and delivery systems for pharmaceutical development: A regulatory perspective. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60,768-777.
- Chu B., Liu T., 2000. Characterization of nanoparticles by scattering techniques. *J. Nanopart. Res.*, 2, 29-41.
- Crivoi, A., Duan, F., 2012. Evaporation-induced formation of fractal-like structures from nanofluids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14, 1449-1454.
- Crommelin, D.J., Florence, A.T., 2013. Towards more effective advanced drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* In press.
- Cross, S.S., 1997. Fractals in pathology. *J. Pathol.* 182, 1-8.

Demetzos, C., 2010a. Drug delivery nanosystems and their classification based on their dynamic variability. In: 2nd International Symposium on Biological Applications of Dendrimers. June 23–26, Porquerolles islands, France.

Demetzos, C., 2010b. Advances in drug delivery systems (DDSs). In: International Congress on New Delivery Systems, Biosimilars, Bioequivalence-Biowaivers-Biotechnology Products. July 2–3, Athens, Greece.

Demetzos, C., 2011. Drug Delivery nano Systems (DDnSs) and advances on their physical stability. In: Dendrimers as Composites of Advanced Drug Delivery nano-Systems (aDDnSs). Biomedical Applications, October 3-7, Athens, Greece.

Dey, P., 2005. Basic principle and applications of fractal geometry in pathology: a review. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 27, 284-290.

Dokoumetzidis, A., Iliadis, A., Macheras, P., 2001. Nonlinear dynamics and chaos theory: concepts and applications relevant to pharmacodynamics. *Pharm. Res.* 18, 415-426.

Dokoumetzidis, A., Iliadis, A., Macheras, P., 2002. Nonlinear Dynamics in Clinical Pharmacology: the paradigm of cortisol secretion and suppression. *Br. Clin. Pharmacol.*, 54, 21-29.

Dokoumetzidis, A., Macheras, P., 2003. A model for transport and dispersion in the circulatory based on the vascular fractal tree. *Ann. Biomed Eng.* 31(3):284-293.

Dokoumetzidis, A., Karalis, V., Iliadis, A., Macheras, P., 2004. The heterogeneous course of drug transit through the body. *Trends Pharmacol Sci.* 25,140-146.

Dokoumetzidis, A., Kosmidis, K., Argyrakis, P., Macheras, P., 2005. Modeling and monte Carlo simulations in oral absorption. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 96, 200-205.

Dokoumetzidis, A., Valsami, G., Macheras, P., 2007. Modeling and simulation in drug absorption processes. *Xenobiotica.* 37, 1052-1065.

Dokoumetzidis, A., Papadopoulou, V., Valsami, G., Macheras, P., 2008. Development of a reaction-limited model of dissolution: Application to official dissolution tests experiments. *Int. J. Pharm.* 355, 114-125.

Dokoumetzidis, A., Macheras, P., 2009. Fractional kinetics in drug absorption and disposition processes. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* 36, 165-178.

Dokoumetzidis, A., Magin, R., Macheras, P., 2010a. Fractional kinetics in multi-compartmental systems. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* 37, 507-524.

Dokoumetzidis, A., Magin, R., Dokoumetzidis, A., Magin, R., Macheras, P., Macheras, P., 2010b. A commentary on fractionalization of multi-compartmental models. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* 37, 203-207.

Dokoumetzidis, A., Macheras, P., 2011. The changing face of the rate concept in biopharmaceutical sciences: from classical to fractal and finally to fractional. *Pharm. Res.* 28, 1229-1232.

Du, Y., Chen, W., Zheng, M., Meng, F., Zhong Z., 2012. pH-sensitive degradable chimaeric polymersomes for the intracellular release of doxorubicin hydrochloride. *Biomaterials.* 33(29), 7291-7299.

Düzgüneş, N., Wilschut, J., Hong, K., Fraley, R., Perry, C., Friend, D.S., James, T.L., Papahadjopoulos, D., 1983. Physicochemical characterization of large unilamellar phospholipid vesicles prepared by reverse-phase evaporation. *Biochim. Biophys. Acta.* 732(1), 289-299.

Ehlers, C.L., Havstad, J., Prichard, D., Theiler, J., 1998. Low doses of ethanol reduce evidence for nonlinear structure in brain activity. *Neurosci.* 18, 7474-7486.

Eke, A., Herman, P., Kocsis, L., Kozar, L.R., 2002. Fractal characterization of complexity in temporal physiological signals. *Physiol. Meas.* 23, R1-38.

Eldar-Boock, A., Polyak, D., Scomparin, A., Satchi-Fainaro, R., 2013. Nano-sized polymers and liposomes designed to deliver combination therapy for cancer. *Curr Opin Biotechnol.* 24(4), 682-689.

Esquena, J., Solans, C., Llorens, J., 2000. Nitrogen sorption studies of silica particles obtained in emulsion and microemulsion media. *J. Colloid Interface Sci.* 225, 291-298.

Farin, D, Avnir, D, 1992. Use of fractal geometry to determine effects of surface morphology on drug dissolution. *J. Pharm. Sci.* 81, 54-57.

Fernández, E., Jelinek, H.F., 2001. Use of fractal theory in neuroscience: methods, advantages, and potential problems. *Methods.* 24, 309-321.

Fini, A., Fazio, G., Fernández-Hervás, M.J., Holgado, M.A., Rabasco, A.M., 1996. Fractal analysis of sodium cholate particles. *J. Pharm. Sci.* 85, 971-975.

Fini, A., Fernández-Hervás, M.J., Holgado, M.A., Rodriguez, L., Cavallari, C., Passerini, N., Caputo, O., 1997. Fractal analysis of beta-cyclodextrin-indomethacin particles compared by ultrasound. *J. Pharm. Sci.* 86, 1303-1309.

Fini, A., Ospitali, F., Zoppetti, G., Puppini, N., 2008. ATR/Raman and fractal characterization of HPBCD/progesterone complex solid particles. *Pharm. Res.* 25(9), 2030-2040.

Fini, A., Holgado, M.A., Rodriguez, L., Cavallari, C., 2002. Ultrasound-compacted indomethacin/polyvinylpyrrolidone systems: effect of compaction process on particle morphology and dissolution behavior. *J. Pharm. Sci.* 91, 1880-1890.

Firestone, M.A., Seifert, S., 2005. Interaction of nonionic PEO-PPO diblock copolymers with lipid bilayers. *Biomacromolecules*, 6, 2678-2687.

Forrest, S.R., Witten, T.A., 1979. Long- range correlations in smoke particle aggregates. *J. Phys. A: Math. Gen.* 12, 5, L109-L117.

Fuite, J., Marsh, R., Tuszyński, J., 2002. Fractal pharmacokinetics of the drug mibefradil in the liver. *Phys. Rev. E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* 66, 0201904.

Gaber, M.H., Hong, K., Huang, D., Papahadjopoulos, 1995. Thermosensitive sterically stabilized liposomes: formulation and in vitro studies on mechanism of doxorubicin release from bovine serum and human plasma. *Pharm. Res.* 12, 1407-1416.

Gardikis, K., Hatziantoniou, S., Signorelli, M., Pusceddu, M., Micha-Screttas, M., Schiraldi, A., Demetzos, C., Fessas, D., 2010a. Thermodynamical and structural characterization of Liposomal-Locked in Dendrimers as drug carriers, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 81,11-19

Gardikis, K., Tsimplouli, C., Dimas, K., Micha-Screttas, M., Demetzos, C., 2010b. New chimeric advanced Drug Delivery nano System (chi-aDDnSs) as doxorubicin carriers, *Int. J. Pharm.* 402, 231-237.

Gardikis, K., Fessas, D., Signorelli, M., Dimas, K., Tsimplouli, C., Ionov, M., Demetzos, C., 2011. A new chimeric drug delivery nano system (chi-aDDnS) composed of PAMAM G 3.5 dendrimer and liposomes as doxorubicin's carrier. *In vitro pharmacological studies*, *JNN* (5), 3764-72.

Gasilova, E.R., Matveeva, G., N., Aleksandrova, G.P., Sukhov, B.G., Trofimov, B.A., 2013. Colloidal aggregates of Pd nanoparticles supported by larch arabinogalactan. *J. Phys. Chem. B*. In press.

Garfinkel, A., Spano, M., Ditto, W., Weiss, J., 1992. Controlling cardiac chaos, *Science*, 257, 1230-1235.

Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., Delie, F., 2008. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particles size parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 1-9.

Geneser, S.E., Kirby, R.M., MacLeod, R.S., 2008. Application of stochastic finite element methods to study the sensitivity of ECG forward modeling to organ conductivity. *IEEE Trans Biomed Eng.* 55(1), 31-40.

Goldberd, M., Langer, R., Jia, X., 2007. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 18, 241-268.

González, A.E., Martínez-López, F., Moncho-Jordá, A., Hildalgo-Alvarez, R., 2002. Two-dimensional colloidal aggregation: concentration. *J. Colloid. Interface Sci.* 246, 227-234.

Gratton, S.E., Ropp, P.A., Pohlhaus, P.D., Luft, J.C., Madden, V.J., Napier, M.E., DeSimone, J.M., 2008. The effect of particle design on cellular internalization pathways, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 11613-11618.

Gregoriadis, G., Wills, E. J., Swain, C.P., Tavill, A. S., 1974. Drug-carrier potential of liposomes in cancer chemotherapy. *Lancet* 1, 1313-1316.

Gregory, J., 2009. Monitoring particle aggregation processes. *Adv. Colloid Interface Sci.* 147-148,109-123.

Grogan, M.J., Rotkina, L., Bau, H.H., 2011. In situ liquid-cell electron microscopy of colloid aggregation and growth dynamics. *Physical Review E* 83, 061405,1-5.

Hamley, I.W., 2003. Nanotechnology with soft materials. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42: 1692-1712.

Harshe, Y.M., Lattuada, M., 2012. Viscosity contribution of an arbitrary shape rigid aggregate to a dilute suspension. *J. Colloid Interface Sci.* 367(1):83-91.

Harshe, Y.M., Ehrl, L., Lattuada M., 2010. Hydrodynamic properties of rigid fractal aggregates of arbitrary morphology. *J. Colloid Interface Sci.*, 352(1):87-98.

Hadjidemetriou, M., Pippa, N., Pispas, S., Demetzos C., 2013. Incorporation of dimethoxycurcumin into charged liposomes and the formation kinetics of fractal aggregates of uncharged vectors. *J. Liposome Res.* *In press*

Helgeson, M.E., Moran, S.E., An, H.Z., Doyle, P.S., 2012. Mesoporous organohydrogels from thermogelling photocrosslinkable nanoemulsions. *Nat. Mater.* 11, 344-352.

Hoogenboom, R., 2009. Poly(2-oxazoline)s: a polymer class with numerous potential applications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48(43),7978-7994.

Hossann, M., Wiggendorff, M., Schwerdt, A., Wachholz, K., Teichert, N., Eibl, H., Issels, R.D., Lindner, L.H., 2007. In vitro stability and content release properties of phosphatidylglycerol containing thermosensitive liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768, 2491-2499.

Hossann, M., Syunyaeva, Z., Schmidt, R., Zengerle, A., Eibl, H., Issels, R.D., Lindner, L.H., 2012. Proteins and cholesterol lipid vesicles are mediators of drug release from thermosensitive liposomes. *J. Control. Release.* 162, 400-406.

Huang, S., Ernberg, I., Kauffman, S., 2009. Cancer attractors: a system view of tumors from a gene network dynamics and development perspective. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 20(7),869-876.

- Huang, X., Teng, X., Chen, D., Tang, F., He J., 2010. The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function, *Biomaterials*, 31, 438-448.
- Hughes, G.A., 2005. Nanostructure-mediated drug delivery. *Nanomedicine*. 1, 22-30.
- Iezzi, G., Aprile, G., Tripodi, D., Scarano, A., Piatelli, A., Perrotti, V., 2011. Implant surface topographies analyzed using fractal dimension. *Implant Dent*. 20,131-138.
- Igbal, M.A., Md, S., Sahni, J.K., Baboota, S., Dang, S., Ali, J., 2012. Nanostructured lipid carriers system: Recent advances in drug delivery. *J. Drug Target*. In press.
- Ilias, I., Vgontzas, N.A., Provata, A., Mastorakos, G., 2002. Complexity and non-linear description of diurnal cortisol and growth hormone secretory patterns before and after sleep deprivation. *Endocr. Regul.* 36, 63-72.
- Immordino, M.L., Dosio, F., Cattel, L., 2006. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int. J. Nanomedicine*. 1, 297-315.
- Jaafar-Maalej, C., Charcosset, C., Fessi, H., 2011. A new method for liposome preparation using a membrane contactor. *J. Liposome Res.* 21(3), 213-220.
- Janecka, I.P., 2007. Cancer control through principles of systems science, complexity, and chaos theory: a model. *Int. J. Med. Sci.*, 4,164-173.
- Janssen, H.K., Stenull, O., 2009. Distribution functions in percolation problems. *Phys. Rev. E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* 79, 011128.
- Janssen, H.K., Stenull, O., 2000. Diluted networks of nonlinear resistors and fractal dimensions of percolation clusters. *Phys. Rev. E Stat. Phys. Plasmas Fluids Relat. Interdiscip. Topics.* 61,4821-4834.
- Jasmine, J. M., Prasad, E., 2010. Fractal growth of PAMAM dendrimers aggregate and its impact on the intrinsic emission properties. *J. Phys. Chem. B*, 114, 7735-7742.
- Jelinek, H.F., Fernandez, E., 1998. Neurons and fractals: how reliable and useful are calculations of fractal dimensions? *J. Neurosci. Methods*, 81, 9-18.

Jeong, J., Kim, D.J., Chae, J.H., Kim, S.Y., Ko, H.J., Paik, I.K., 1998. Nonlinear analysis of the EEG of schizophrenics with optimal embedding dimension. *Med. Eng. Phys.* 20, 669-676.

Jullien, R., 1987. Aggregation phenomena and fractal aggregates. *Contmp. Phys.*, 28, 5, 477-493.

Jurczyszyn, K., Osiecka, B.J., Ziolkowski, P., 2012. The use of fractal dimension analysis in estimation of blood vessels shape in transplantable mammary adenocarcinoma in Wistar rats after photodynamic therapy combined with cystein protease inhibitors. *Comput. Math. Methods Med.* 2012, 793291-793297.

Kaditi, E., Mountrichas, G., Pispas, S., Demetzos, C., 2012. Block copolymers for drug delivery nano systems (DDnSs). *Curr. Med. Chem.*, 19(29), 5088-100.

Kalampokis, A., Argyrakis, P., Macheras, P., 1999a. Heterogeneous tube model for the study of small intestinal transit flow. *Pharm. Res.* 16(1), 87-91.

Kalampokis, A., Argyrakis, P., Macheras, P., 1999b. A heterogeneous tube model of intestinal absorption based on probalistic concepts. *Pharm. Res.* 16(11), 1764-1769.

Kanniah, V., Wu, P., Mandzy, Grulke E.A., 2012. Fractal analysis as a complimentary technique for characterizing nanoparticle size distributions, *Powder Technology*, 226, 189-198.

Kamiya, A., Takahashi, T., 2007. Qunatitative assessments of morphological and functional properties of biological trees based on their fractal nature. *J. Appl. Physiol.* 102, 2315-2323.

Karalis, V., Claret, L., Illiadis, A., Macheras, P., 2001. Fractal volume of drug distribution: it scales proportionally to body mass. *Pharm. Res.* 18(7),1056-1060.

Karalis, V., Macheras, P., 2002. Drug disposition viewed in terms of the fractal volume of distribution. *Pharm.Res.* 19(5),696-703.

Kempe, K., Lobert, M., Hoogenboom, R., Schubert, U.S., 2009. Synthesis and characterization a series of diverse poly(2-oxazoline)s. *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* 47(15), 3829-3838.

- Kim, T., Lee, C.H., Joo, S.W., Lee, K., 2008. Kinetics of gold nanoparticle aggregation: Experiments and modeling. *J. Colloid Interface Sci.* 318, 238-243.
- Kimori, Y., Katayama, E., Morone, N., Kodoma, T., 2011. Fractal dimension analysis and mathematical morphology of structural changes in actin filaments imaged by electron microscopy. *J. Struct. Biol.*, 176, 1-8.
- King, R.D., Brown, B., Hwang, M., Jeon, T., George, A.T., 2010. Fractal dimension analysis of the cortical ribbon in mild Alzheimer's disease. *Neuroimage*, 52(2):471-479.
- Kita-Tokarczyk, K., Ite, F., Grzelakowski M., Egli S., Rossbach P., Meier W., 2009. Monolayer interactions between lipids and amphiphilic block copolymers. *Langmuir*, 25(17), 9847-9856.
- Khan, S.A., Zoeller, N.J., 1993. Dynamic rheological behavior of flocculated silica suspensions. *J. Rheol.* 37, 1225-1235.
- Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D., Schubert, U.S. 2010. Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 49, 6288-6308.
- Koch, H.P., 1993. The concept of fractals in the pharmaceutical sciences. *Pharmazie*. 48, 643-659.
- Kono, K., Nakai, R., Morimoto, K., Takagishi, T., 1999a. Thermosensitive polymer-modified liposomes that release contents around physiological temperature. *Biochim. Biophys. Acta* 1416,239-250.
- Kono, K., Henmi, A., Yamashita, H., Hayashi, H., Takagishi, T., 1999b. Improvement of temperature-sensitivity of poly(N-isopropylacrylamide)-modified liposomes. *J. Control Release* 59,63-75.
- Kono, K., 2001. Thermosensitive polymer-modified liposomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53, 307-319.

Kontogiannopoulos, K.N., Assimopoulou, A.N., Hantziantoniou, S., Karatassos, K., Demetzos, C., Papageorgiou, V.P., 2012. Chimeric advanced drug delivery nano systems (chi-aDDnSs) for shikonin combining dendritic and liposomal technology. *Int. J. Pharm.*, 422, 381-9.

Kopelman, R., 1988. Fractal reaction kinetics. *Science*, 241, 1620-1626.

Kosmidis, K., Argyrakis, P., Macheras, P., 2003. A reappraisal of drug release law using Monte Carlo simulations: the prevalence of Weibull function. *Pharm. Res.* 20(7),988-995.

Kosmidis, K., Rinaki, E., Argyrakis, P., Macheras, P., 2003. Analysis of case II drug transport with radial and axial release from cylinders. *Int. J. Pharm.* 254(2), 183-188.

Kosmidis, K., Karalis, V., Argyrakis, P., Macheras, P., 2004. Michaelis –Menten kinetics under spatially constrained conditions: application to mibefradis pharmacokinetics. *Biophys. J.*, 87, 1498-1506.

Kostarelos, K., 2010. Nanorobots for medicine: how close are we? *Nanomedicine* : 5, 341-342.

de Kruif, C.G., Huppertz, T., Urban, V.S., Petukhov, A.V., 2012. Casein micelles and their internal structure. *Adv. Colloid. Interface Sci.* 171-172,36-52.

de Kruif, J.K., Khoo, J., Bravo, R., Kuentz, M., 2013. Novel quality by design tool for concentrated drug suspensions: surface energy profiling and the fractal concept of flocculation. *J. Pharm. Sci.* 102, 994-1007.

Lacerda, L., Herrero, M.A., Venner, k., Bianco, A., Prato, M., Kostarelos K., 2008. Carbon-nanotube shape and individualization critical for renal excretion. *Small.* 4,1130-1132.

Laffon, E., Suárez, K., Berthoumieu, Y., Ducassou, D., Marthan, R., 2006. Normalization in quantitative [18F]FBG PET imaging: The “body surface area” may be volume. *Phys. Med. Biol.* 51(3):N47-50.

Lambermont-Thijs, H.M.L., Heuts, J.P.A., Hoeppener, S., Hoogenboom, R., Schubert, U.S., 2011. Selective partial hydrolysis of amphiphilic copoly(2-oxazoline)s as basis for temperature and pH responsive micelles. *Polym. Chem.* 2,313-322.

Lasic, D.D., 1996. Doxorubicin in sterically stabilized liposomes. *Nature*, 380 (6574),561-562.

Lattuada, M., Wu, H., Morbidelli, M., 2001. Estimation of fractal dimension of colloidal gels in the presence of multiple scattering. *Physical Review E* 64, 061404, 1-7.

Lattuada, M., Wu, H., Morbidelli, M., 2003a. A simple model for the structure of fractal aggregates. *J. Colloid Interface Sci.* 268(1),106-120.

Lattuada, M., Sandkühler, P., Wu, H., Sefcik, J., Morbidelli, M., 2003b. Aggregation kinetics of polymer colloids in reaction limited regime: experiments and simulations. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 103, 33-56.

Lee, J.S., Feijen, J., 2012. Polymersomes for drug delivery: design, formation and characterization. *J. Control Release* 161(2):473-83.

Le Meins, J.F., Sandre, O., Lecommandoux, S., 2011. Recent trends in the tuning of polymersomes membrane properties. *Eur. Phys. J. E. Soft Matter*, 34(2),1-16.

Leiske, D.L., Meckes, B., Miller, C.E., Wu C., Walker, T.W., Lin, B., Meron, M., Ketelson, H.A., Toney, M.F., Fuller, G.G., 2011. Insertion mechanism of a poly(ethylene oxide)-poly(butylenes oxide) block copolymer into DPPC monolayer. *Langmuir*, 27, 11444-11450

Letchford, K., Burt, H., 2007. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 65(3),259-269.

Li, S., Meng, F., Wang, Z., Zhong, Y., Zheng, M., Liu, H., Zhong, Z., 2012. Biodegradable polymersomes with an ionizable membrane: facile preparation, superior protein loading, and endosomal pH-responsive protein release. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 82(1),103-11.

Li, X., Fan, Y., Watari, F., 2010. Current investigation into carbon nanotubes for biomedical application, *Biomed. Mater.* 5, 022001.

- Lim, S.B., Banerjee, A., Onyüksen, H., 2012. Improvement of drug safety by the use of lipid-based nanocarriers. *J. Control. Release.* 163(1),34-45.
- Liu, Y., Miyoshi, H., Nakamura, M., 2007. Nanomedicine for drug delivery and imaging: A promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles. *Int. J. Cancer* 120, 2527-2537.
- Lúcio, M., Bringezu, F., Reis, S., Lima, J.L., Brezesinski, G., 2008. Binding of nonsteroidal anti-inflammatory drugs to DPPC: structure and thermodynamic aspects. *Langmuir* 24(8):4132-4139.
- Lin, M.Y., Lindsay, H.M., Weitz, D.A., Klein, R., Ball, R.C., Meakin, P., 1989 Universal reaction – limited colloid aggregation, *Nature* 339, 360-362.
- Link, O., Snelling, D.R., Thomson, K.A., Smallwood, G.J., 2011. Development of absolute intensity multi-angle light scattering for determination of polydisperse soot aggregate properties. *Proceedings of the Combustion Institute.* 33, 847-854.
- Liu, Y., Tan, J., Thomas, A., Ou-Yang, D., Muzykantov, V.R., 2012. The shape of things to come: importance of design in nanotechnology for drug delivery, *Ther. Deliv.* 2,181-194.
- Longmire, M.R., Ogawa, M., Choyke, P.L., Kobayashi, H., 2011. Biologically optimized nanosized molecules and particles: more than just size. *Bioconjug Chem.* 22, 993-1000.
- Losa, G.A., Nonnenmacher, T.F., 1996. Self-similarity and fractal irregularity in pathologic tissues. *Mod. Pathol.* 9, 174-182.
- Macheras, P., 1995. Carrier-mediated transport can obey fractal kinetics. *Pharm. Res.* 12, 541-548.
- Macheras, P., 1996. A fractal approach to heterogeneous drug distribution: calcium pharmacokinetics. *Pharm. Res.* 13, 663-670.
- Macheras, P., Argyrakís, P., Polymilis, C., 1996. Fractal geometry, fractal kinetics and chaos en route to biopharmaceutical sciences. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 21, 77-86.

Macheras, P., Argyrakis, P., 1997. Gastrointestinal drug absorption: is it time to consider heterogeneity as well as homogeneity? *Pharm. Res.* 14, 842 -847.

Macheras, P., Dokoumetzidis, A., 2000. On the heterogeneity of drug dissolution and release. *Pharm. Res.* 17(2):108-112.

Macheras, P., Iliadis, A. Modeling in biopharmaceutics, pharmacokinetics and pharmacodynamics: homogeneous and heterogeneous approaches. New York: Springer, 2006.

Mackey, M., AnDerheiden, U., 1984. The dynamics of recurrent inhibition. *Journal of Mathematical Biology.* 19(2):211-225.

Mandelbrot, B.B., 1982. The Fractal Geometry of Nature, San Francisco: Freeman & Co.

Manoj, P., Fillery-Travis, A.J., Watson, A.D., Hibberd, D.J., Robins, M.M., 2000. Characterization of polydisperse depletion-flocculated emulsion. *J. Colloid Interface Sci.* 228, 200-206.

Marcato, P.D., Durán, N., 2008. New aspects of nanopharmaceuticals delivery systems. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 8, 1-14.

Marguet, M., Edembe, L., Lecommandoux, S., 2012. Polymersomes in polymersomes: multiple loading and permeability control. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 51(5),1173-1176.

Marsh, R.E., Tuszyński, J.A., 2006. Fractal michaelis - menten kinetics under steady state conditions: Application to mibefradil. *Pharm. Res.* 23, 2760-2767.

Martínez, L., Villalobos, R., Sánchez, M., Cruz, J., Ganem, A., Melgoza, L.M., 2009. Monte Carlo simulations for the study of drug release from cylindrical matrix systems with an inert nucleus. *Int. J. Pharm.* 369(1-2):38-46.

Mazzola, L., 2003. Commercializing nanotechnology. *Nat. Biotechnol.* 21, 1137-1143.

McNally, J.G., Mazza, D., 2010. Fractal geometry in the nucleus. *The EMBO Journal*, 29(1),1-3.

- Meakin, P., 1983a. The structure of two-dimensional Witten-Sander aggregates. *J. Phys A Math Gen* 19, L661-L666
- Meakin, P., 1983b. Formation of Fractal Cluster and Networks by Irreversible Diffusion-Limited Aggregation, *Phys. Rev. Lett.* 51, 13, 1119-1122
- Meakin, P., 1986. A New Model for Biological Pattern Formation. *J.Theor. Biol.*, 118, 101-113
- Meng, F., Zhong, Z., 2011. Polymersomes spanning from nano- to microscale: advanced vehicles for controlled drug delivery and robust vesicles for virus and cell mimicking. *J. Phys. Chem. Lett.*, 2 (13), 1533–1539.
- Meng, Z., Hashmi, S.M., Elimelech, M., 2013. Aggregation rate and fractal dimension of fullerene nanoparticles via simultaneous multiangle static and dynamic light scattering measurement. *J. Colloid Interface Sci.* In press.
- Metulio, L., Ferrone, M., Coslanich, A., Fuchs, S., Fermeglia, M., Paneni, M.S., Pricl, S., 2004. Polyamidoamine (Yet not PAMAM) Dendrimers as Bioinspired Materials for Drug Delivery: Structure – Activity Relationships by Molecular Simulations. *Biomacromolecules*, 5 (4), 1371-1378.
- Milonaki, Y., Kaditi, E., Pispas, S., Demetzos, C., 2012. Amphiphilic gradient copolymers of 2-methyl- and 2-phenyl-2-oxazoline: self-organization in aqueous media and drug encapsulation. *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.*, 50, 1226-1237.
- Milton, J., Black, D., 1995. Dynamic diseases in neurology and psychiatry. *Chaos*. 5, 8-13.
- Mirny, L.A., 2011. The fractal globule as a model of chromatin architecture in the cell. *Chromosome Res.* 19, 37-51.
- Mishra, B., Bhavesh, B., Patel, Tiwari, S., 2010. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine*. 6, 9-24.
- Moghimi, S.M., Szebeni, J., 2003. Stealth liposomes and long-circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties, *Prog. Lipid Res.*, 42, 463-478.

Moreno, P.A., Vélez, P.E., Martínez, E., Garreta, L.E., Díaz, N., Amador, S., Tischer, I., Gutiérrez, J.M., Naik, A.K., García, F., 2011. The human genome: a multifractal analysis. *BMC Genomics* 12, 506-523.

Mufamadi, M.S., Pillay V., Choonara Y.E., Du Toit L.C., Modi G., Naidoo D., Ndesendo, V.M.K., 2011. A review on composite liposomal technologies for specialized drug delivery. *J. Drug Deliv.* 2011, 939851-939870.

Nam, J., Beales, P.A., Vanderlick, T.K., 2011. Giant phospholipid/block copolymer hybrid vesicles: mixing behavior and domain formation. *Langmuir*, 27(1), 1-6.

Nayak, S., Lyon, L.A., 2005. Soft nanotechnology with soft nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44(47):7686-708.

Nunes, C., Brezesinski, G., Pereira-Leite, C., Lima, J.L., Reis, S., Lúcio, M., 2011. NSAIDs interactions with membranes: a biophysical approach. *Langmuir* 27(17),10847-10858.

Nyström, B., Kjøniksen, A.L., Beheshti, N., Maleki, A., Zhu, K., Knudsen, K.D., Pamies, R., Hernández Cifre J.G., García de la Torre, J., 2010. Characterization of polyelectrolyte features in polysaccharide systems and mucin. *Adv. Colloid. Interface Sci.* 158, 108-118.

Ogasawara, T., Izawa, K., Hattori, N., Okabayashi, H., O'Connor C.J., 2000. Growth process for fractal polymer aggregates formed by perfluorooctyltrimethoxysilane. Time-resolved small-angle X-ray scattering study, *Colloid Polym. Sci.* 278,293-300.

Owens, D.E., Peppas, N.A., 2006. Opsonization, biodistribution and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 307, 93-102.

Papadopoulou, V., Kosmidis, K., Vlachou, M., Macheras, P., 2006. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *Int. J. Pharm.* 309(1-2):44-50.

Panouillé, M., Durand, D., Nicolai, T., Larquet, E., Boisset, N., 2005. Aggregation and geletion of micellar casein particles. *J. Colloid Interface Sci.* 287, 85 -93.

- Pantic, I., Harhaji-Trajkovic, L., Pantovic, A., Milisevic, M.T., Trajkovic, V., 2012. Changes in fractal dimension and lacunarity as early marker of UV-induced apoptosis, *J. Theor. Biol.* 303, 87-92.
- Papagiannaros, A., Dimas, K., Papaioannou, G.T., Demetzos, C., 2005. Doxorubicin-PAMAM dendrimers complex attached to liposomes: Cytotoxic studies against human cancer cell lines, 302, 29-38.
- Peppas, N.A., 1985. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Pharm. Acta Helv.* 60, 110-111.
- Pereira, L.M., 2010. Fractal pharmacokinetics. *Comput. Math. Methods Med.* 11, 161-84.
- Pinfield, V.J., Dickinson, E., Povey, M.J.W., 1997. Modeling of combined creaming and flocculation in emulsions. *J. Colloid Interface Sci.* 186, 80-89.
- Pippa, N., Demetzos C., Danezis, E., 2012a. The formalism of fractal aggregation phenomena of colloidal drug delivery systems. *J. Liposome Res.* 22, 55-61.
- Pippa, N., Pispas, S., Demetzos, C., 2012b. The fractal hologram and elucidation of the structure of liposomal carriers in aqueous and biological media. *Int. J. Pharm.* 430, 65-73.
- Pippa, N., Pispas, S., Demetzos, C., 2012c. The delineation of the morphology of charged liposomal vectors via a fractal analysis in aqueous and biological media: physicochemical and self-assembly studies. *Int. J. Pharm.* 437, 264-274.
- Pippa, N., Kaditi, E., Pispas, S., Demetzos, C., 2013a. PEO-b-PCL/DPPC chimeric nanocarriers: self-assembly aspects in aqueous and biological media and drug incorporation. *Soft Matter.* 9, 4073-4082.
- Pippa, N., Merkouraki, M., Pispas, S., Demetzos, C., 2013b. DPPC:MPOx chimeric advanced Drug Delivery nanosystems (chi-aDDnSs): physicochemical and structural characterization, stability and drug release studies. *Int. J. Pharm.* 450(1-2),1-10.

- Pippa, N., Kaditi, E., Pispas, S., Demetzos, C., 2013c. DPPC/poly(2-methyl-2-oxazoline)-grad-poly(2-phenyl-2-oxazoline) chimeric nanostructures as potential drug nanocarriers. *J. Nanopart. Res.* 15,1685.
- Pispas, S., Sarantopoulou, E., 2007. Self-assembly in Mixed Aqueous Solutions of Amphiphilic Block Copolymers and Vesicle-Forming Surfactant. *Langmuir* 23, 7484-7490.
- Pispas, S., 2011a. Self-assembles nanostructures in mixed anionic-neutral double hydrophilic block copolymer/cationic vesicle –forming surfactant solutions. *Soft Matter*, 7, 474-482.
- Pispas, S., 2011b. Vesicular structures in mixed block copolymer/surfactant solutions. *Soft Matter*, 7, 8697-8701.
- Racz Z., Vicsek K.T., 1983. Diffusion-controlled deposition: Cluster statistics and scaling. *Phys. Rev. Lett.* 51, 26, 2382-2385.
- Ravichandron, R., 2009. Nanotechnology – based drug delivery systems. *Nanobiotechnol.* 5,17-33.
- Rinaki, E., Valsami, G., Macheras, P., 2003. Quantitative biopharmaceutics classification system: the central role of dose/solubility ratio. *Pharm. Res.* 20, 1917-1925.
- Roldán-Vargas, S., Barnabas-Rodríguez, R., Martín-Molina, A., Quesada-Pérez, M., Estelrich, J., Callejas-Fernández, J., 2008. Growth of lipid vesicle structures: from surface fractals to mass fractals. *Physical Review E* 78, 010902(R), 1-4.
- Roldán-Vargas, S., Barnabas-Rodríguez, R., Quesada-Pérez, M., Estelrich, J., Callejas-Fernández, J., 2009. Surface fractals in liposome aggregation. *The American physical society, Phys. Rev.* 79, 1-14.
- Rowland, M., Noe, C.R., Smith, D.A., Tucker, G.T., Cromellin, D.J., Peck, C.C., Rocci, M.L. Jr., Besançon, L., 2012. Impact of the pharmaceutical sciences on the health care: a reflection over the past 50 years. *J. Pharm. Sci.* 101(11):4075-4099.
- Sabín, J., Prieto, G., Ruso, J.M., Sarmiento, F., 2007a. Fractal aggregates induced by liposome- liposome interaction in the presence of Ca^{2+} . *Eur. Phys. J. E* 24, 201–210.

Sabín, J., Prieto, G., Ruso, J.M., Messina, P.V., Sarmiento, F., 2007b. Aggregation of liposomes in presence of La^{3+} : a study of the fractal dimension. *Phys. Rev. E* 76, 011408, 1-7.

Saladin El Naschie M., 20006. Nanotechnology for the developing world. *Chaos, Solitons, Fractals*, 30(4): 769-773.

Schaeublin, N.M., Braydich-Stolle, L.K., Maurer, E.L., Park K., MacCuspie, R.I., Afroz, A.R., Vaia, R.A., Saleh N.B., Hussain, S.M., 2012. Does shape matter? Bioeffects of gold nanomaterials in a human skin cell model. *Langmuir*, 28, 3248-58.

Siepmann, J., Siepmann, E., 2011. Mathematical modeling of drug release from lipid dosage forms. *Int. J. Pharm.* 418(1), 42-53.

Siepmann, J., Siepmann, E., 2012. Modeling of diffusion controlled drug delivery. *J. Control. Release.*, 161(2), 351-362.

Siepmann, J., Kranz, H., Bodmeier, R., Peppas, N.A., 1999. HPMC-matrices for controlled drug delivery: A new model combining diffusion, swelling, and dissolution mechanisms and predicting the release kinetics. *Pharm. Res.* 16, 1748-1756.

Siepmann, J., Peppas, N.A., 2001. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv. Drug Deliv. Rev.* 48, 139-157.

Slingerland, M., Guchelaar, H.J., Gelderblom, H., 2012. Liposomal drug formulations in cancer therapy: 15years along the road. *Drug Discov. Today*. 17, 160-166.

Silva, C., Pimentel, I.R., Andreade, A., Foreid, J.P., Ducla-Soares, E., 1999. Correlation dimension mapsof EEG from epileptic absences. *Brain Topogr.* 11, 201-209.

Smith, T.G. Jr, Lange, G.D., Marks, W.B., 1996. Fractal methods and results in cellular morphology – dimensions, lacunarity and multifractals. *J. Neurosci. Methods.* 69, 123-136.

Soh, J.W., Weinstein, I.B., 2003. Role of COX-independent targets of NSAIDs and related compounds in cancer prevention and treatment. *Prog. Exp. Tumor Res.* 37, 261-285.

Sotiriou, K., Pispas, S., Hadjichristidis, N., 2007. Controlling the colloidal behavior of styrene-isoprene diblock copolymers by selective end functionalization. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 293, 51-57

Souza, G.R., Staquicini, F.I., Christianson, D.R., Ozawa, M.G., Houston Miller, J., Pasqualini, R., Arap, W., 2010. Combinatorial targeting and nanotechnology applications. *Biomed. Microdevices* 12, 597-606.

Stam, K.J., Tavy, D.L., Jelles, B., Achtereekte H.A., Slaets, J.P., Keunen, R.W., 1994. Non-linear dynamical analysis of multichannel EEG: Clinical applications in dementia and Parkinson's disease. *Med. Eng. Phys.* 7, 141-150.

Stoenescu, R., Graff, A., Meier, W., 2004. Asymmetric ABC-triblock copolymer membranes induce a directed insertion of membrane proteins, *Macromol. Biosci.* 4, 930-935.

Sugihara, H., Yamamoto, H., Kawashima, Y., Takeuchi, H., 2012. Effectiveness of submicronized chitosan-coated liposomes in oral absorption of indomethacin. *J. Liposome Res.* 22(1):72-79.

Streba, C.T., Pirici, D., Vere, C.C., Mogoanta, L., Comanescu, V., Rogoveanu, I., 2011. Fractal analysis differentiation of nuclear and vascular patterns in hepatocellular carcinomas and hepatic metastasis. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 52(3), 845-854.

Swenson, D.J., Geneser, S.E., Stinstra, J.G., Kirby, R.M., MacLeod, R.S., 2011. Cardiac position sensitivity study in the electrocardiographic forward problem using stochastic collocation and boundary element methods. *Ann. Biomed Eng.* 39(12), 2900-2910.

Tambasco, M., Eliasziw, M., Magliocco, A.M., 2010. Morphologic complexity of epithelial architecture for predicting invasive breast cancer survival. *J. Transl. Med.* 8:140.

Tang, S., Preece, J.M., McFarlane, C.M., Zhang, Z., 2000. Fractal morphology and breakage of DLCA and RLCA aggregates. *J. Colloid Interface Sci.*, 221(1):114-123.

Thill, A., Veerapaneni, S., Simon, B., Wiesner, M., Bottero, J.Y., Snidaro, D., 1998. Determination of structure of aggregates by confocal scanning laser microscopy. *J. Colloid Interface Sci.*, 204(2):357-62.

Thibert, R., Akbarieh, M., Tawashi, R., 1988. Application of fractal dimension to the study of the surface ruggedness of granular solids and excipients. *J. Pharm. Sci.* 77, 724-726.

Thompson, K.L., Chambon, P., Versber, R., Armes, S.P., 2012. Can polymersomes form colloidosomes? *J. Am Chem. Soc.* 134(30),12450-12453.

Tolic, I.M., Mosekilde, E., Sturis, J., 2000. Modeling the insulin-glucose feedback system. The significant of pulsatile insulin secretion. *J. Theor. Biol.* 207,361-375.

Tomalia, D.A. 2009. In quest of a systematic framework for unifying and defining nanoscience. *J. Nanopart. Res.* 11, 1251-1310.

Topp, B., Promislow, K., Devries, G., Miura, R.M., Finegood, D.T., 2000. A model of β -cells mass, insulin and glucose kinetics: pathways to diabetes. *J. Theor. Biol.*, 206, 605-619.

Torchilin, V.P., 2007. Micellar Nanocarriers:Pharmaceutical perspectives *Pharmaceutical Research*, 21 (1), 1-15.

Torchilin, V.P., 2004. Targeted polymeric micelles for delivery of poorly soluble drugs, *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 2549-2559.

Tromelin, A., Gnanou, J.C., Andrès, C., Pourcelot, Y., Chaillot, B., 1996. Study of morphology of reactive dissolution interface using fractal geometry. *J. Pharm. Sci.* 85, 924-928.

Tromelin, A., Hautbout, G., Pourcelot, Y., 2001. Application of fractal geometry to dissolution kinetic study of a sweetener excipient. *Int. J. Pharm.* 224(1-2):131-140.

- Vamvakas, S., Martinaldo, J., Pita, R., Isaak, M., 2011. On the edge of new Technologies (advanced therapies, nanomedicines). *Drug Discovery Today: Technology*, 8, 1, e21-e28.
- Verotta, D., 2010. Fractional dynamics pharmacokinetics-pharmacodynamic models. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* 37(3), 257-276.
- de Villires, M.M., Aramwit, P., Know, G.S. *Nanotechnology in Drug Delivery. Biopharmaceutical aspects.* Springer AAPS PRESS. American Association of Pharmaceutical Scientists, New York, U.S.A., 2009.
- Wangner, C., Person, D., 1998. Chaos in the cardiovascular system: An update. *Cardiovascular Research*, 40(2), 236-265.
- Wagner, V., Dullaart, A., Bock, A.K., Zweck, A., 2006. The emerging nanomedicine landscape. *Nat. Biotechnol.*, 24, 1211-1217.
- Wang, J., Byrne, J.D., Napier, M.E., DeSimone, J.M., 2011. More effective nanomedicines through particle design, *Small*, 7, 1919-1931.
- Weibull, W., 1951. A statistical distribution of wide applicability. *J. Appl. Mech.* 18, 293-297.
- Weiss, M., Li, P., Roberts, M.S., 2012. Estimation of sinusoidal flow heterogeneity in normal and diseased rat livers from tracer dilution data using a fractal model. *Microcirculation*. 19, 723-728.
- Weiss, M., 2013. Fractal structure of the liver: effect on drug elimination. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* 40, 11-14.
- West, G.B., Brown, J.H., Enquist, B.J., 1997. A general model for the origin of allometric scaling laws in biology. *Science*. 276(5309):122-126.
- West, G.B., Brown, J.H., Enquist, B.J., 1999. The fourth dimension of life: fractal geometry and allometric scaling of organisms. *Science*. 248(5420):1677-1679.
- Witten, T.A., Sander, L.M., 1981. Diffusion –Limited Aggregation, a kinetic critical phenomena, *Phys. Rev. Lett.* 47, 19, 1400-1403.

- Witten, T.A, Sander, L.M., 1983. Diffusion –Limited Aggregation, *Phys. Rev. B* 27, 9, 5686-5697
- Whitesides G.M., Lipomi D.J., 2009. Soft nanotechnology: structure vs. function. *Faraday Discuss.* 143, 373-384.
- Whitesides, G.M., Grzybowski, B., 2007. Self-assembly at all scales. *Science*, 295: 2418-2421.
- Woodle, M.C., Engbers, C.M., Zalipsky, S., 1994. New amphipatic polymer-lipid conjugates forming long-circulating reticubendthelial system-evading liposomes. *Bioconjug. Chem.* 5(6),493-496.
- Xu, X.C., 2002. COX-2 inhibitors in cancer treatment and prevention, a recent development. *Anticancer Drugs* 13(2), 127-137.
- Wu, C.Y., Tarimala, S., Dai, L.L., 2006. Dynamics of charged microparticles at oil-water interfaces. *Langmuir*, 22, 2112-2116.
- Wu, B., Lin, Y., Zhang, Z., Chen, G., 2012. Trapping in dendrimers and regular hyperbranched polymers. *J. Chem. Phys.* 137, 044903-044911.
- Xiong, X.B., Huang, Y., Lu, W.L., Zhang, X., Zhang, H., Nagai, T., Zhang, Q., 2005. Enhanced intracellular delivery and improved antitumor efficacy of doxorubicin by sterically stabilized liposomes modified with a synthetic RGD mimetic. *J. Control. Release.*, 107(2), 262-275.
- Xiong, X.B., Huang, Y., Lu, W.L., Zhang, H., Zhang, X., Zhang, Q., 2005. Enhanced intracellular uptake of sterically stabilized liposomal Doxorubicin in vitro resulting in improved antitumor activity in vivo. *Pharm Res.* 22(6),933-939.
- Yamauchi, M., Tsutsumi, K., Abe, M., Uosaki, Y., Nakakura, M., Aoki, N., 2007. Release of drugs from liposomes varies with particle size. *Biol. Pharm. Bull.* 30(5), 963-966.
- Yoo, J.W., Chambers, E., Mitragorti S., 2010. Factors that control the circulation time of nanoparticles in blood: challenges, solutions and future prospects, *Curr. Pharm. Des.*, 16, 2298-307.

Zalipsky, S., Hansen, C.M., Oaks, J.M., Allen, T.M., 1996. Evaluation of blood clearance and biodistribution of poly(2-oxazoline)-grafted liposomes. *J. Pharm. Sci.* 85(2),133-137.

Zhou, Y., Dial, E.J., Doyen, R., Lichtenberger, L.M., 2010. Effect of indomethacin on bile acid-phospholipid interactions: implication for small intestinal injury induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 298(5), G722-731.

Ελληνική βιβλιογραφία

Δεμέτζος Κ. Φαρμακευτική Νανοτεχνολογία: Βασικές Αρχές και Πρακτικές Εφαρμογές. Εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα, 2014.

Δημοσιεύσεις

© Research papers

- 1) The metastable phases as modulators of biophysical behavior of liposomal membranes: The role of biomolecular sculpture of polymeric guest. N. Pippa, S. Pispas, C. Demetzos, Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2015, In press.
- 2) The interplay between the rate of the release from polymer grafted liposomes and their fractal morphology. N. Pippa, A. Dokoumetzidis, S. Pispas, C. Demetzos, International Journal of Pharmaceutics, 2014, 465, 63-69.
- 3) The imaging and the fractal metrology of chimeric liposomal Drug Delivery nano Systems: The role of macromolecular architecture of polymeric guest. N. Pippa, S. Pispas, C. Demetzos, Journal of Liposome Research, 2014, In press.
- 4) Gradient block copolymer structures as drug nanocarriers. N. Pippa, E. Kaditi, S. Pispas, C. Demetzos, Advanced Science, Engineering and Medicine, 2014, 6(6):642-648.
- 5) The physicochemical/thermodynamic balance of advanced drug liposomal delivery systems. N. Pippa, K. Gardikis, S. Pispas, C. Demetzos, Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2014, 116(1): 99-105.
- 6) DPPC/poly(2-methyl-2-oxazoline)-grad-poly(2-phenyl-2-oxazoline) chimeric nanostructures as potential drug nanocarriers. N.Pippa, E. Kaditi, S. Pispas, C. Demetzos, J. Nanopart. Res. 2013. 15,1685.
- 7) The shape/morphology balance: A study of stealth liposomes via fractal analysis and drug encapsulation. N.Pippa, F. Psarommati, S. Pispas, C. Demetzos, Pharmaceutical Research, 2013, 30(9):2385-95.
- 8) PEO-b-PCL/DPPC chimeric nanocarriers: self-assembly aspects in aqueous and biological media and drug incorporation. N.Pippa, E. Kaditi, S. Pispas, C. Demetzos Soft Matter, 2013, 9, 4073-4082.

- 9) DPPC:MPOx chimeric advanced Drug Delivery nanosystems (chi-aDDnSs): physicochemical and structural characterization, stability and drug release studies. N. Pippa, M. Merkouraki, S. Pispas, C. Demetzos, International Journal of Pharmaceutics, 2013, 450(1-2),1-10.
- 10) The delineation of the morphology of charged liposomal vectors via a fractal analysis in aqueous and biological media: physicochemical and self-assembly studies, N. Pippa, S. Pispas, C. Demetzos, International Journal of Pharmaceutics, 2012, 437, 264-274.

● Review Papers

- 1) Advanced Drug Delivery nano Systems (aDDnSs): A Mini-Review. C. Demetzos and N. Pippa, Drug Delivery, 2014, 21(4):250-257.
- 2) On the ubiquitous presence of fractals and fractal concepts in Pharmaceutical Sciences: A Review. N. Pippa, A. Dokoumetzidis, C. Demetzos, P. Macheras, International Journal of Pharmaceutics, 2013, 456(2):340-352.

● Chapters in Books

- 1) Mixed biocompatible block copolymer/ lipid nanostructures as drug nanocarriers: advantages and pharmaceutical perspectives. N. Pippa, S. Pispas, Costas Demetzos In: Handbook of Pharmaceutical Polymers: Biomedical/ Pharmaceutical Polymeric Materials: Science and Technology. Wiley. 2014
- 2) Bio-Inspired Chimeric Drug Delivery Nano Systems (chi-DDnSs): Their Fractal Morphology and Regulatory Aspects. N. Pippa, S. Pispas, C. Demetzos. (Chapter 4) In: Recent Advances in Drug Delivery Research. Nova Science Publishers, Inc. New York, USA.

◎ Προφορικές ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια

- 1) Chimeric biocompatible block copolymer/lipid nanostructures as drug nanocarriers: from bio-inspiration to in vitro evaluation. N. Pippa, S. Pispas, C. Demetzos, 1st International Congress: from drug discovery to drug delivery. 13-15 November, 2015, Athens, Greece
- 2) Bio-inspired chimeric Drug Delivery nano Systems (chi-DDnSs): their fractal hologram and regulatory aspects. N. Pippa, S. Pispas, C. Demetzos, 1st World Congress on Geriatrics and Neurodegenerative Disease Research, 10-13 April, 2014, Corfu, Greece
- 3) The fractal analysis as a complementary approach to predict the stability of Liposomal Drug Delivery nano Systems (LDDnSs) in aqueous and biological media: a regulatory proposal? C. Demetzos, N. Pippa. ILS 2013 MEETING Liposome advances: progress in drug and vaccine delivery, School of Pharmacy, University of London, London, *December 14-17, 2013*.
- 4) Studies on the Self Assembly of Sterically Stabilized Liposomal Drug Delivery nano Systems (LDDnSs) via fractal analysis. N. Pippa, S. Pispas and C. Demetzos, ILS 2013 MEETING Liposome advances: progress in drug and vaccine delivery, School of Pharmacy, University of London, London, *December 14-17, 2013*.
- 5) PEO-b-PCL: DPPC chimeric nanocarriers: self-assembly aspects in aqueous and biological media and drug release studies. N. Pippa, S. Pispas, A. Dokoumetzidis, C. Demetzos, 5th BBBB International Conference, 26-28 September, Athens, Greece

◎ Αναρτημένες Ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια

- 1) Advanced Drug Delivery nano Systems (aDDnSs): A proposal for their classification. C. Demetzos, N. Pippa, Biodendrimer 2014, 4th International Symposium on Biomedical Applications of Dendrimers, June 18-20, 2014 Lugano, Switzerland

- 2) The fractal morphology and thermal behavior of DPPC:PAMAM G4 chimeric liposomes. **N. Pippa**, S. Pispas, C. Demetzos, Biodendrimer 2014, 4th International Symposium on Biomedical Applications of Dendrimers, June 18-20, 2014 Lugano, Switzerland
- 3) Bio-inspired chimeric drug delivery nano systems (chi-DDnSs): Their fractal morphology and regulatory aspects. **N. Pippa**, S. Pispas, C. Demetzos, Industrial Technologies 2013, Smart Growth through Research and Innovation, 9-11 April, 2013, Athens, Greece
- 4) The imaging and the fractal metrology of chimeric liposomes: The role of macromolecular architecture of polymeric guest. **N. Pippa**, S. Pispas, C. Demetzos. ILS 2013 MEETING Liposome advances: progress in drug and vaccine delivery, School of Pharmacy, University of London, London, *December 14-17, 2013*.
- 5) The physicochemical/thermodynamic balance of advanced drug liposomal delivery systems as reflected on the drug release profile. **N. Pippa**, A. Dokoumetzidis, S. Pispas, C. Demetzos, ILS 2013 MEETING **Liposome advances: progress in drug and vaccine delivery**, School of Pharmacy, University of London, London, *December 14-17, 2013*.
- 6) Mixed/chimeric liposomes incorporating copolymers as advanced drug delivery systems. **N. Pippa**, S. Pispas, C. Demetzos. In: Materials Today: Biomaterials virtual conference, November 19-21, 2013 (*Invited Poster*)
- 7) The interplay between the rate of release from advanced drug delivery nanosystems and their fractal morphology. **N. Pippa**, A. Dokoumetzidis, S. Pispas, C. Demetzos In: 8th International Dendrimer Symposium, Madrid, 23-27 June, 2013, Spain. AND 5th BBBB International Conference, 26-28 September, Athens, Greece
- 8) DPPC:MPOX chimeric nanocontainers: the fractal sculpture of novel advanced drug delivery nanosystems and drug release studies. M. Merkouuraki, **N. Pippa**, S. Pispas, C. Demetzos, In: 8th International Dendrimer Symposium, Madrid, 23-27 June, 2013, Spain. AND 5th BBBB International Conference, 26-28 September, Athens, Greece

- 9) Fractal analysis of conventional and chimeric liposomal aggregates. **N. Pippa**, S. Pispas, C. Demetzos. In: 8th International Dendrimer Symposium, Madrid, 23-27 June, 2013, Spain.
- 10) The fractal analysis as a complementary approach to study drug delivery systems: a regulatory proposal. C. Demetzos, D.A. Tomalia, **N. Pippa** In: 8th International, Dendrimer Symposium, Madrid, 23-27th June, 2013, Spain.
- 11) Fractal analysis of liposomal aggregation. **N. Pippa**, S. Pispas, C. Demetzos, 5th BBBB International Conference, 26-28 September, Athens, Greece
- 12) The fractal morphology and the thermal behavior of liposomal drug nanocarriers, **N. Pippa**, S. Pispas, C. Demetzos, 11th Mediterranean Conference on Calorimetry and Thermal Analysis, Medicta 2013, 12-15 June, Athens, Greece.
- 13) Preparation and thermal behavior of DPPC/MPOx chimeric liposomes, **N. Pippa**, K. Gardikis, S. Pispas, C. Demetzos, 11th Mediterranean Conference on Calorimetry and Thermal Analysis, Medicta 2013, 12-15 June, Athens, Greece.
- 14) Fractal analysis of liposomal aggregation, **N. Pippa**, S. Pispas, C. Demetzos, 9th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology with focus on Nanopharmaceuticals and Nanomedicine, 20-22 September, 2012, Dubrovnic, Croatia
- 15) MPOx grafted DPPC liposomes: stability, self-assembly, fractal analysis of the nanostructures and drug encapsulation, **N. Pippa**, E. Kaditi, S. Pispas, C. Demetzos, Biodendrimer 2012, 3rd International Symposium on Biological Application of Dendrimers, 5th-8th September **2012**, Toledo, Spain
- 16) PEO-b-PCL grafted DPPC liposomes: self-assembly, stability and fractal analysis of novel Advanced Drug Delivery nano Systems (aDDnSs), **N. Pippa**, S. Pispas, C. Demetzos, 9th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies, 3-6 July 2012, Thessaloniki, Greece
- 17) Preparation, physicochemical characterization and elucidation of stealth liposomal nanocarriers' morphology in accordance to fractal analysis, F.

Psarommati, **N. Pippa**, S. Pispas, C. Demetzos, 9th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies, 3-6 July 2012, Thessaloniki, Greece

◎ Ανακοινώσεις σε ελληνικά συνέδρια

- 1) DPPC/poly(2-methyl-2-oxazoline)-grad-poly(2-phenyl-2-oxazoline) chimeric nanostructures as drug delivery systems. N. Pippa, S. Pispas, C. Demetzos, Convention of the Hellenic Society of Biomaterials. 7th -8th November 2014, B.&M. Theocharakis Foundation for the Fine Arts and Music, Athens, Greece (*Poster Presentation*)
- 2) The metastable phases as modulators of functionality in chimeric liposomes. C. Demetzos, N. Pippa, S. Pispas, Therma 2014, 26th -28th September 2014, Larisa, Greece (*Oral Presentation*)
- 3) The thermotropic behavior of DPPC:PAMAM G-4 chimeric liposomes. N. Pippa, S. Pispas, C. Demetzos, Therma 2014, 26th -28th September 2014, Larisa, Greece (*Poster Presentation*)
- 4) PEO-b-PCL grafted DPPC liposomes: self-assembly, stability and fractal analysis of the nanostructures, N. Pippa, S. Pispas, C. Demetzos, 15th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry, Athens, 25-27 May, 2012 (*Poster*)