



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Φυσικοχημική Μελέτη Αλληλεπιδράσεων
Βιοδραστικών Μορίων σε Λιπιδικές Μεμβράνες**

**ΧΑΤΖΗΓΕΩΡΓΙΟΥ ΠΕΤΡΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΛΙΟΣ 2012

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Φυσικοχημική Μελέτη Αλληλεπιδράσεων Βιοδραστικών Μορίων σε Λιπιδικές
Μεμβράνες

ΧΑΤΖΗΓΕΩΡΓΙΟΥ ΠΕΤΡΟΣ

A. M.: 22512

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Βύρας Κυριάκος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ

Βύρας Κυριάκος, Καθηγητής, ΕΚΠΑ, Τμήμα Χημείας, Επιβλέπων

Μαυρομούστακος Θωμάς, Καθηγητής, ΕΚΠΑ, Τμήμα Χημείας

Τσεκούρας Αθανάσιος, Επίκουρος Καθηγητής, ΕΚΠΑ, Τμήμα Χημείας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Βύρας Κυριάκος, Καθηγητής, ΕΚΠΑ, Τμήμα Χημείας, Επιβλέπων

Μαυρομούστακος Θωμάς, Καθηγητής, ΕΚΠΑ, Τμήμα Χημείας

Τσεκούρας Αθανάσιος, Επίκουρος Καθηγητής, ΕΚΠΑ, Τμήμα Χημείας

Χαβρεδάκη Βασιλική, Καθηγήτρια, ΕΚΠΑ, Τμήμα Χημείας

Σάμιος Ιωάννης, Καθηγητής, ΕΚΠΑ, Τμήμα Χημείας

Παπαϊωάννου Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής, ΕΚΠΑ, Τμήμα Χημείας

Δεμέτζος Κωνσταντίνος, Καθηγητής, ΕΚΠΑ, Τμήμα Φαρμακευτικής

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 24/07/2012

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία αφορά τη φυσικοχημική μελέτη των αναπτυσσόμενων αλληλεπιδράσεων μεταξύ βιοδραστικών μορίων με τις λιπιδικές μεμβράνες. Πιο συγκεκριμένα, αφορά τη διευρεύνηση των αλληλεπιδράσεων που προκαλεί η εισδοχή των αλκαλοειδών της βίγκας (Vinca Alkaloids) βιμπλαστίνης (Vinblastine) και βιγκριστίνης (Vincristine) στις λιπιδικές διπλοστιβάδες της διπαλμιτικής φωσφατιδυλοχολίνης (DPPC), μέσω των φυσικοχημικών τεχνικών Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης και φασματοσκοπίας Raman. Επίσης, μελετήθηκε η δράση των φαρμακευτικών αυτών μορίων, παρουσία χοληστερόλης.

Από τη μια, η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC), χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των θερμικών αλλαγών που προκαλεί η εισδοχή των δύο φαρμακευτικών μορίων στις λιπιδικές διπλοστιβάδες. Τα αποτελέσματά της ανέδειξαν ομοιότητες αλλά και διακριτές διαφορές στον τρόπο με τον οποίο αλληλεπιδρούν με αυτές, γεγονός που οφείλεται στο διαφορετικό αποτύπωμά τους στις λιπιδικές διπλοστιβάδες, παρόλο που πρόκειται για δυο παρεμφερή μόρια της ίδιας οικογένειας ενώσεων.

Από την άλλη, η φασματοσκοπία Raman, χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δομικών αλλαγών που επιφέρει η ενσωμάτωση των αλκαλοειδών της βίγκας στις λιπιδικές διπλοστιβάδες. Τα αποτελέσματά της, ανέδειξαν ομοιότητες αλλά και διαφορές στον τρόπο αλληλεπίδρασής τους με αυτές, γεγονός που επηρεάζει το φαρμακευτικό προφίλ και τη δράση των δύο μελετούμενων μορίων.

Η συστηματική μελέτη και ανάλυση των παραπάνω αποτελεσμάτων, οδήγησε α) στη διαπίστωση της αλληλοεισχώρησης (interdigitation) των αλειφατικών αλυσίδων των λιπιδικών διπλοστιβάδων, ενός σημαντικού φαινομένου που παίζει ρόλο στη βιολογική δραστηριότητα των μορίων, β) στην επεξήγηση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ των βιοδραστικών μορίων και των λιπιδικών διπλοστιβάδων μέσω της δημιουργίας διαφορετικών τμημάτων (domains) των λιπιδικών διπλοστιβάδων και γ) στη διαφορετική δράση τους παρουσία χοληστερόλης.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Λιπιδομική και φαρμακευτική έρευνα

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: λιπιδικές διπλοστιβάδες, αλληλοεισχώρηση, ενδομοριακές – διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, βιμπλασίνη, βιγκρισίνη, χοληστερόλη, Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης, Φασματοσκοπία Raman

ABSTRACT

In the past, lipid bilayers were only thought as static entities and served mainly as barriers for the toxic substances. Today, it is well recognized that they are dynamic structures that play an important role in determining drug action. A new scientific field named lipidomics covers this aspect. Based on this concept, we sought to examine the role of lipid bilayers for the amphiphilic molecules vinblastine and vincristine which are proposed to act on the membrane lipid bilayer. It has also been proposed that each membrane perturbing drug has its own fingerprint and this may determine its pharmacological effects. For this reason, we found it very interesting to study the membrane interactions of vinblastine and vincristine and made an effort to correlate their fingerprint and pharmacological action.

To achieve this aim we investigated the interactions caused by the insertion of Vinca alkaloids vinblastine and vincristine in lipid bilayers of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), by using the physicochemical techniques of Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Raman Spectroscopy. In addition, we studied the effect of this two pharmaceutical molecules with the presence of cholesterol.

The thorough analysis of the obtained results point out that: a) the insertion of Vinca alkaloids in lipid bilayers causes partial interdigitation of aliphatic chains, a phenomenon which influences the biological activity of these molecules; b) the incorporation of this pair of molecules results in the creation of various and distinct domains attributed to their different developed interactions; c) after their localization in membrane bilayers they exhibit similarities and differences in terms of synergistic effect with the bioactive molecule of cholesterol.

SUBJECT AREA: lipidomic and pharmaceutical research

KEYWORDS: lipid bilayers, interdigitation, intermolecular – intramolecular interactions, vinblastine, vincristine, cholesterol, Differential Scanning Calorimetry, Raman spectroscopy

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελεί το αποτέλεσμα ερευνητικής μελέτης, η οποία πραγματοποιήθηκε στην ομάδα Θερμικής Ανάλυσης και Φασματοσκοπίας Raman, του Εργαστηρίου Φυσικοχημείας, στα πλαίσια του Γενικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ). Στην προσπάθειά μου αυτή, καθοριστική αποδείχθηκε η συμβολή διαφόρων μελών ΔΕΠ του εργαστηρίου, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω, ως ελάχιστη ένδειξη ευγνωμοσύνης.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Βύρα Κυριάκο Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ, για την ανάθεση του θέματος της διδακτορικής διατριβής και την εμπιστοσύνη που μου έχει δείξει ως μέλος του Εργαστηρίου Φυσικοχημείας από το 2002.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, κ. Βύρα Κυριάκο Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ, Μαυρομούστακο Θωμά Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ και Τσεκούρα Αθανάσιο Επίκουρου Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ, για την πολύτιμη καθοδήγηση, στήριξη και παρατηρήσεις τους κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη διευθύντρια του Εργαστηρίου Φυσικοχημείας την Καθηγήτρια κ. Χαβρεδάκη Βασιλική, για την παροχή του εργαστηριακού εξοπλισμού και την επίλυση οποιουδήποτε προβλήματος κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Φυσικοχημείας, οι οποίοι ήταν πάντα πρόθυμοι να μου προσφέρουν οποιαδήποτε βοήθεια, ενώ με το ενδιαφέρον τους και την υποστήριξή τους με έκαναν να νιώθω ως μέλος μιας ευρύτερης εργαστηριακής οικογένειας. Στο κλίμα αυτό συνετέλεσαν καθοριστικά οι φιλικές σχέσεις που ανέπτυξα με όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές, υποψήφιους διδάκτορες και μεταδιδακτορικούς συνεργάτες του Εργαστηρίου Φυσικοχημείας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, τους γονείς μου Γιώργο και Αικατερίνη και τον αδερφό μου Νίκο, που ήταν πάντα δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια, με στήριζαν και με βοηθούσαν ο καθένας με το δικό του τρόπο, ενώ παράλληλα μου έδιναν κουράγιο και δύναμη να συνεχίσω.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	28
1.1 Βιολογικές Μembrάνες	28
1.1.1 Λιπίδια των βιολογικών μεμβρανών	29
1.1.2 Ρευστότητα των βιολογικών μεμβρανών	32
1.1.2.1 Επίδραση των λιπαρών οξέων στη ρευστότητα των βιολογικών μεμβρανών	32
1.1.2.2 Επίδραση της χοληστερόλης στη ρευστότητα των βιολογικών μεμβρανών	34
1.1.2.3 Επίδραση της θερμοκρασίας στη ρευστότητα των βιολογικών μεμβρανών	40
1.1.3 Ο ρόλος των μεμβρανών στη δράση των φαρμάκων	41
1.2 Γενικές γνώσεις για τα Φάρμακα	43
1.2.1 Τρόποι χορήγησης φαρμάκων	43
1.2.1.1 Χορήγηση των φαρμάκων από το πεπτικό σύστημα	44
1.2.1.2 Παρεντερική χορήγηση των φαρμάκων	44
1.2.2 Φαρμακοτεχνικές μορφές χορήγησης των φαρμάκων	46
1.2.3 Μεταβολισμός των φαρμάκων	48
1.3 Μεθοδολογίες που εφαρμόζονται στην εξέταση των ιδιοτήτων των βιολογικών μεμβρανών και των αλληλεπιδράσεων μεμβρανών – φαρμάκων	48
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	53
2.1. Πειραματικές Μέθοδοι	53
2.1.1. Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC)	53
2.1.1.1 Εισαγωγή	53
2.1.1.2 Λειτουργία της τεχνικής DSC	55
2.1.1.3 Τυπικό θερμογράφημα της τεχνικής DSC	56

2.1.1.4	Θερμικές μεταβολές που παρατηρούνται στην τεχνική DSC	57
2.1.1.5	Παράγοντες που επηρεάζουν τη μορφή του θερμογραφήματος DSC	59
2.1.1.6	Εφαρμογές της τεχνικής DSC	61
2.1.1.7	Εφαρμογή της τεχνικής DSC στις λιποειδείς διπλοστιβάδες της DPPC	62
2.1.2	Δονητική Φασματοσκοπία	64
2.1.2.1	Βαθμοί ελευθερίας και αριθμός θεμελιωδών καταστάσεων	64
2.1.2.2	Αρμονικός Ταλαντωτής	66
2.1.2.3	Μη αρμονικός ταλαντωτής	68
2.1.2.4	Κανόνες επιλογής δονητικών μεταπτώσεων	69
2.1.2.5	Φαινόμενο Raman	70
2.1.2.6	Κβαντομηχανική θεώρηση του φαινομένου Raman	71
2.1.2.7	Εφαρμογές της φασματοσκοπίας Raman	72
2.1.2.8	Εφαρμογή της φασματοσκοπίας Raman στις λιποειδείς διπλοστιβάδες της DPPC	73
2.2	Υλικά	79
2.2.1	Φωσφολιπίδια	79
2.2.2	Τα αλκαλοειδή της βίγκας	80
3.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ DPPC:ΒΙΜΠΛΑΣΤΙΝΗ	83
3.1	Αποτελέσματα δείγματος λιπιδικών διπλοστιβάδων DPPC	83
3.1.1	Θερμική Ανάλυση	83
3.1.2	Φασματοσκοπία Raman	85
3.2	Αποτελέσματα δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 95:5	92
3.2.1	Θερμική Ανάλυση	92

3.2.2 Φασματοσκοπία Raman	93
3.3 Αποτελέσματα δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 83:17	100
3.3.1 Θερμική Ανάλυση	100
3.3.2 Φασματοσκοπία Raman	102
3.4 Αποτελέσματα δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 75:25	109
3.4.1 Θερμική Ανάλυση	109
3.4.2 Φασματοσκοπία Raman	110
3.5 Αποτελέσματα δείγματος DPPC:χοληστερόλη 90:10	117
3.5.1 Θερμική Ανάλυση	117
3.5.2 Φασματοσκοπία Raman	118
3.6 Αποτελέσματα δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17	124
3.6.1 Θερμική Ανάλυση	124
3.6.2 Φασματοσκοπία Raman	126
3.7 Αποτελέσματα δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 65:10:25	131
3.7.1 Θερμική Ανάλυση	131
3.7.2 Φασματοσκοπία Raman	132
3.8 Συνολικά αποτελέσματα DPPC:βιμπλαστίνης	138
3.8.1 Αποτελέσματα Θερμικής Ανάλυσης	138
3.8.2 Αποτελέσματα φασματοσκοπίας Raman	144
4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ DPPC:ΒΙΓΚΡΙΣΤΙΝΗ	152
4.1 Αποτελέσματα δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 95:5	152
4.1.1 Θερμική Ανάλυση	152
4.1.2 Φασματοσκοπία Raman	154
4.2 Αποτελέσματα δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 83:17	160
4.2.1 Θερμική Ανάλυση	160

4.2.2 Φασματοσκοπία Raman	161
4.3 Αποτελέσματα δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 75:25	167
4.3.1 Θερμική Ανάλυση	167
4.3.2 Φασματοσκοπία Raman	168
4.4 Αποτελέσματα δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17	174
4.4.1 Θερμική Ανάλυση	174
4.4.2 Φασματοσκοπία Raman	175
4.5 Αποτελέσματα δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25	180
4.5.1 Θερμική Ανάλυση	180
4.5.2 Φασματοσκοπία Raman	182
4.6 Συνολικά αποτελέσματα DPPC:βιγκριστίνης	187
4.6.1 Αποτελέσματα Θερμικής Ανάλυσης	187
4.6.2 Αποτελέσματα φασματοσκοπίας Raman	192
5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΩΝ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΒΙΜΠΛΑΣΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΒΙΓΚΡΙΣΤΙΝΗΣ ΜΕ ΤΙΣ ΛΙΠΙΔΙΚΕΣ ΔΙΠΛΟΣΤΙΒΑΔΕΣ DPPC	200
5.1. Αποτελέσματα Θερμικής Ανάλυσης (DSC) για τα συστήματα DPPC:φάρμακο στις διάφορες αναλογίες	200
5.2. Αποτελέσματα φασματοσκοπίας Raman για τα συστήματα DPPC:φάρμακο στις διάφορες αναλογίες	203
5.3. Αποτελέσματα Θερμικής Ανάλυσης (DSC) για τα συστήματα DPPC:χοληστερόλη:φάρμακο στις διάφορες αναλογίες	213
5.4. Αποτελέσματα φασματοσκοπίας Raman στις διάφορες αναλογίες για τα συστήματα DPPC:χοληστερόλη:φάρμακο	216
6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	224
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	229

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση κυτταρικής μεμβράνης.	28
Σχήμα 1.2: Υδρόφιλο και υδρόφοβο τμήμα φωσφολιπιδίου.	30
Σχήμα 1.3 : Δομές λιποειδούς διπλοστιβάδας, λιποσώματος και μικκυλίου.	30
Σχήμα 1.4: Η δομή της φωσφατιδυλοχολίνης.	31
Σχήμα 1.5: Α. φωσφολιπίδια με έναν ακόρεστο δεσμό, όπου οι λιπαρές αλυσίδες δεν είναι παράλληλα τοποθετημένες διότι δημιουργείται κάμψη εξαιτίας των διπλών δεσμών των λιπαρών οξέων. Β. διευθέτηση μεμβρανικών φωσφολιπιδίων αποτελούμενων από κορεσμένα λιπαρά οξέα, όπου παρατηρείται ο συμπτυκνωμένος τρόπος πακεταρίσματος, επειδή οι λιπαρές αλυσίδες είναι παράλληλα τοποθετημένες.	33
Σχήμα 1.6: Τα μόρια της χοληστερόλης εντοπίζονται και στα δυο στρώματα της διπλοστιβάδας, μεταξύ των φωσφολιπιδίων, σχηματίζοντας δεσμό υδρογόνου με το οξυγόνο της εστερικής ομάδας μεταξύ της γλυκερόλης και του λιπαρού οξέος.	35
Σχήμα 1.7: Α. λιπιδική διπλοστιβάδα DPPC και 11% χοληστερόλη, όπου παρατηρείται η ανομοιόμορφη και άτακτη διευθέτηση των αλειφατικών ουρών των λιπιδίων και Β. Λιπιδική διπλοστιβάδα PDDC και 50% χοληστερόλη, όπου διακρίνεται η κανονική διευθέτηση των λιπιδικών αλυσίδων και της χοληστερόλης (πράσινο χρώμα).	36
Σχήμα 1.8: Λιπιδική διπλοστιβάδα όπου διακρίνεται μια λιπιδική μικροδομή ή σχεδία (raft) (πορτοκαλί).	38
Σχήμα 1.9: Αναπαράσταση της μετάβασης από την φάση πηκτώματος στη ρευστή κατάσταση των μεμβρανών και αντίστροφα.	40
Σχήμα 1.10: Διάγραμμα ροής των πληροφοριών των εφαρμοζόμενων τεχνικών στη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεμβρανών – φαρμάκων.	50
Σχήμα 2.1: Σχηματική παράσταση της DSC τεχνικής.	56
Σχήμα 2.2: Τυπικό θερμογράφημα DSC πολυμερικής ουσίας.	57
Σχήμα 2.3: Θερμογράφημα διπλοστιβάδων συμμετρικών φωσφολιπιδίων.	63

Σχήμα 2.4: Αναπαράσταση των φάσεων στις οποίες απαντώνται οι μεμβράνες της DPPC στις διάφορες θερμοκρασίες.	64
Σχήμα 2.5: Θεμελιώδεις δονήσεις νερού.	65
Σχήμα 2.6: Θεμελιώδεις δονήσεις CO ₂	65
Σχήμα 2.7: Μηχανικό μοντέλο διατομικού μορίου και αρμονικής δόνησης. ..	66
Σχήμα 2.8: Ενεργειακές στάθμες αρμονικού ταλαντωτή.	68
Σχήμα 2.9: Δυναμικό Morse και αρμονική προσέγγιση.	69
Σχήμα 2.10: Σχηματική απόδοση της σκέδασης.	70
Σχήμα 2.11: Σχηματική παράσταση της σκέδασης Rayleigh και Raman.	72
Σχήμα 2.12: Φάσμα Raman CCl ₄ στο οποίο φαίνονται οι γραμμές Rayleigh, Stokes και anti-Stokes.	72
Σχήμα 2.13: Κανονικοποιημένο φάσμα Raman των λιπιδικών διπλοστιβάδων της DPPC σε θερμοκρασία 25 °C.	74
Σχήμα 2.14: Λόγος εντάσεως κορυφών I ₂₈₅₀ /I ₂₈₈₀ των διπλοστιβάδων της DPPC.	76
Σχήμα 2.15: Λόγος εντάσεως κορυφών I ₂₉₃₅ /I ₂₈₈₀ των διπλοστιβάδων της DPPC.	77
Σχήμα 2.16: Λόγος εντάσεως κορυφών I ₁₀₉₀ /I ₁₁₃₀ των διπλοστιβάδων της DPPC.	78
Σχήμα 2.17: Χημική δομή της DPPC.	79
Σχήμα 2.18: Μηχανισμός δράσης βιμπλαστίνης (κίτρινο χρώμα). Με μπλε και κόκκινο χρώμα παριστάνονται τα δύο τμήματα (α και β αντίστοιχα) του διμερούς της τομπουλίνης.	80
Σχήμα 2.19: Η χημική δομή του μορίου της βιμπλαστίνης.	81
Σχήμα 2.20: Η χημική δομή του μορίου της βιγκριστίνης.	81
Σχήμα 3.1: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC.	84
Σχήμα 3.2: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC στην περιοχή 2800 – 3000 cm ⁻¹ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	87

Σχήμα 3.3: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} του δείγματος DPPC.	87
Σχήμα 3.4: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2935}/I_{2880} του δείγματος DPPC.	88
Σχήμα 3.5: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC στην περιοχή $1200 - 1500\text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	89
Σχήμα 3.6: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC στην περιοχή $1000 - 1200\text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	90
Σχήμα 3.7: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} του δείγματος DPPC.	90
Σχήμα 3.8: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC στην περιοχή $650 - 750\text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	91
Σχήμα 3.9: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 95:5.	92
Σχήμα 3.10: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 95:5 στην περιοχή $2800 - 3000\text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	95
Σχήμα 3.11: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 95:5.	95
Σχήμα 3.12: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2935}/I_{2880} του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 95:5.	96
Σχήμα 3.13: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 95:5 στην περιοχή $1200 - 1500\text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	97
Σχήμα 3.14: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 95:5.	98
Σχήμα 3.15: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 95:5 στην περιοχή $1000 - 1200\text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	98

Σχήμα 3.16: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 95:5 στην περιοχή $650 - 750 \text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	99
Σχήμα 3.17: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 83:17.	100
Σχήμα 3.18: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 83:17 στην περιοχή $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	104
Σχήμα 3.19: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 83:17.	104
Σχήμα 3.20: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2935}/I_{2880} του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 83:17.	105
Σχήμα 3.21: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 87:13 στην περιοχή $1200 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	107
Σχήμα 3.22: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 83:17.	107
Σχήμα 3.23: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 83:17 στην περιοχή $1000 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	108
Σχήμα 3.24: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 83:17 στην περιοχή $650 - 750 \text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	109
Σχήμα 3.25: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 75:25.	110
Σχήμα 3.26: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 75:25 στην περιοχή $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	112
Σχήμα 3.27: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 75:25.	112
Σχήμα 3.28: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2935}/I_{2880} του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 75:25.	113

Σχήμα 3.29: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 75:25 στην περιοχή $1200 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	114
Σχήμα 3.30: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 75:25.	115
Σχήμα 3.31: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 75:25 στην περιοχή $1000 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	115
Σχήμα 3.32: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 75:25 στην περιοχή $650 - 750 \text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	116
Σχήμα 3.33: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC:χοληστερόλη 90:10.	117
Σχήμα 3.34: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:χοληστερόλη 90:10 στην περιοχή $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	119
Σχήμα 3.35: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} του δείγματος DPPC:χοληστερόλη 90:10.	120
Σχήμα 3.36: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2935}/I_{2880} του δείγματος DPPC:χοληστερόλη 90:10.	120
Σχήμα 3.37: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:χοληστερόλη 90:10 στην περιοχή $1200 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	121
Σχήμα 3.38: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} του δείγματος DPPC:χοληστερόλη 90:10.	122
Σχήμα 3.39: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:χοληστερόλη 90:10 στην περιοχή $1000 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	122
Σχήμα 3.40: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:χοληστερόλη 90:10 στην περιοχή $650 - 750 \text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	123

Σχήμα 3.41: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17.	124
Σχήμα 3.42: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17 με διαχωρισμό κορυφών.	125
Σχήμα 3.43: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17 στην περιοχή $2800 - 3000\text{ cm}^{-1}$	127
Σχήμα 3.44: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17.	127
Σχήμα 3.45: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2935}/I_{2880} του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17.	128
Σχήμα 3.46: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17 στην περιοχή $1200 - 1500\text{ cm}^{-1}$	128
Σχήμα 3.47: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17.	129
Σχήμα 3.48: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17 στην περιοχή $1000 - 1200\text{ cm}^{-1}$	130
Σχήμα 3.49: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17 στην περιοχή $650 - 750\text{ cm}^{-1}$	130
Σχήμα 3.50: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 65:10:25.	131
Σχήμα 3.51: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 65:10:25 στην περιοχή $2800 - 3000\text{ cm}^{-1}$	133
Σχήμα 3.52: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 65:10:25.	133

Σχήμα 3.53: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2935}/I_{2880} του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 65:10:25.	134
Σχήμα 3.54: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 65:10:25 στην περιοχή $1200 - 1500 \text{ cm}^{-1}$	135
Σχήμα 3.55: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 65:10:25.	135
Σχήμα 3.56: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 65:10:25 στην περιοχή $1000 - 1200 \text{ cm}^{-1}$	136
Σχήμα 3.57: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 65:10:25 στην περιοχή $650 - 750 \text{ cm}^{-1}$	136
Σχήμα 3.58: Θερμογραφήματα των δειγμάτων DPPC, DPPC:βιμπλαστίνη 95:5, DPPC:βιμπλαστίνη 83:17 και DPPC:βιμπλαστίνη 75:25.	138
Σχήμα 3.59: Θερμογραφήματα των δειγμάτων DPPC, DPPC:χοληστερόλη 90:10, DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17 και DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 65:10:25.	139
Σχήμα 4.1: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 95:5.	152
Σχήμα 4.2: Καμπύλη θέρμανσης του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 95:5 με διαχωρισμό κορυφών.	153
Σχήμα 4.3: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 95:5 στην περιοχή $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	155
Σχήμα 4.4: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 95:5.	156
Σχήμα 4.5: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2935}/I_{2880} του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 95:5.	156

Σχήμα 4.6: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 95:5 στην περιοχή $1200 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	157
Σχήμα 4.7: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 95:5.	158
Σχήμα 4.8: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 95:5 στην περιοχή $1000 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	158
Σχήμα 4.9: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 95:5 στην περιοχή $650 - 750 \text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	159
Σχήμα 4.10: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 83:17.	160
Σχήμα 4.11: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 83:17 στην περιοχή $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	162
Σχήμα 4.12: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 83:17.	163
Σχήμα 4.13: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2935}/I_{2880} του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 83:17.	163
Σχήμα 4.14: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 87:13 στην περιοχή $1200 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	164
Σχήμα 4.15: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 83:17.	165
Σχήμα 4.16: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 83:17 στην περιοχή $1000 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	166
Σχήμα 4.17: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 83:17 στην περιοχή $650 - 750 \text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	166

Σχήμα 4.18: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 75:25.	167
Σχήμα 4.19: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 75:25 στην περιοχή 2800 – 3000 cm ⁻¹ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	169
Σχήμα 4.20: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I ₂₈₅₀ /I ₂₈₈₀ του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 75:25.	169
Σχήμα 4.21: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I ₂₉₃₅ /I ₂₈₈₀ του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 75:25.	170
Σχήμα 4.22: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 75:25 στην περιοχή 1200 – 1500 cm ⁻¹ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	171
Σχήμα 4.23: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I ₁₀₉₀ /I ₁₁₃₀ του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 75:25.	172
Σχήμα 4.24: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 75:25 στην περιοχή 1000 – 1200 cm ⁻¹ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	172
Σχήμα 4.25: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 75:25 στην περιοχή 650 – 750 cm ⁻¹ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.	173
Σχήμα 4.26: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17.	174
Σχήμα 4.27: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17 με διαχωρισμό κορυφών.	175
Σχήμα 4.28: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17 στην περιοχή 2800 – 3000 cm ⁻¹	176
Σχήμα 4.29: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I ₂₈₅₀ /I ₂₈₈₀ του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17.	177
Σχήμα 4.30: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I ₂₉₃₅ /I ₂₈₈₀ του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17.	177

Σχήμα 4.31: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17 στην περιοχή $1200 - 1500 \text{ cm}^{-1}$	178
Σχήμα 4.32: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17.	179
Σχήμα 4.33: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17 στην περιοχή $1000 - 1200 \text{ cm}^{-1}$	179
Σχήμα 4.34: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17 στην περιοχή $650 - 750 \text{ cm}^{-1}$	180
Σχήμα 4.35: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25.	181
Σχήμα 4.36: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25 με διαχωρισμό κορυφών.	181
Σχήμα 4.37: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25 στην περιοχή $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$	183
Σχήμα 4.38: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25.	183
Σχήμα 4.39: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2935}/I_{2880} του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25.	184
Σχήμα 4.40: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25 στην περιοχή $1200 - 1500 \text{ cm}^{-1}$	185
Σχήμα 4.41: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25.	185
Σχήμα 4.42: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25 στην περιοχή $1000 - 1200 \text{ cm}^{-1}$	186

Σχήμα 4.43: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25 στην περιοχή $650 - 750 \text{ cm}^{-1}$	186
Σχήμα 4.44: Θερμογραφήματα των δειγμάτων DPPC, DPPC:βιγκριστίνη 95:5, DPPC:βιγκριστίνη 83:17 και DPPC:βιγκριστίνη 75:25.	188
Σχήμα 4.45: Θερμογραφήματα των δειγμάτων DPPC, DPPC:χοληστερόλη 90:10, DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17 και DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25.	188
Σχήμα 5.1: Θερμογραφήματα των συστημάτων διπλοστιβάδα:φάρμακο σε διάφορες μοριακές αναλογίες. A) DPPC (μαύρο), B) DPPC:βιμπλαστίνη 95:5 (κόκκινο), Γ) DPPC:βιγκριστίνη 95:5 (ροζ), Δ) DPPC:βιμπλαστίνη 83:17 (γαλάζιο), Ε) DPPC:βιγκριστίνη 83:17 (καφέ), ΣΤ) DPPC:βιμπλαστίνη 75:25 (πράσινο), Ζ) DPPC:βιγκριστίνη 75:25 (μπλε).	200
Σχήμα 5.2: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} των συστημάτων διπλοστιβάδα:φάρμακο σε διάφορες μοριακές αναλογίες. A) DPPC (μαύρο), B) DPPC:βιμπλαστίνη 95:5 (κόκκινο), Γ) DPPC:βιγκριστίνη 95:5 (ροζ), Δ) DPPC:βιμπλαστίνη 83:17 (γαλάζιο), Ε) DPPC:βιγκριστίνη 83:17 (καφέ), ΣΤ) DPPC:βιμπλαστίνη 75:25 (πράσινο), Ζ) DPPC:βιγκριστίνη 75:25 (μπλε). ..	205
Σχήμα 5.3: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} για το σύστημα DPPC:φάρμακο 95:5.	206
Σχήμα 5.4: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} για το σύστημα DPPC:φάρμακο 83:17.	207
Σχήμα 5.5: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} για το σύστημα DPPC:φάρμακο 75:25.	208
Σχήμα 5.6: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} των συστημάτων διπλοστιβάδα:φάρμακο σε διάφορες μοριακές αναλογίες. A) DPPC (μαύρο), B) DPPC:βιμπλαστίνη 95:5 (κόκκινο), Γ) DPPC:βιγκριστίνη 95:5 (ροζ), Δ) DPPC:βιμπλαστίνη 83:17 (γαλάζιο), Ε) DPPC:βιγκριστίνη 83:17 (καφέ), ΣΤ) DPPC:βιμπλαστίνη 75:25 (πράσινο), Ζ) DPPC:βιγκριστίνη 75:25 (μπλε). ..	209
Σχήμα 5.7: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} για το σύστημα DPPC:φάρμακο 95:5.	210

Σχήμα 5.8: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} για το σύστημα DPPC:φάρμακο 83:17.210

Σχήμα 5.9: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} για το σύστημα DPPC:φάρμακο 75:25.211

Σχήμα 5.10: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2935}/I_{2880} των συστημάτων διπλοστιβάδα:φάρμακο σε διάφορες μοριακές αναλογίες. **A)** DPPC (μαύρο), **B)** DPPC:βιμπλαστίνη 95:5 (κόκκινο), **Γ)** DPPC:βιγκριστίνη 95:5 (ροζ), **Δ)** DPPC:βιμπλαστίνη 83:17 (γαλάζιο), **Ε)** DPPC:βιγκριστίνη 83:17 (καφέ), **ΣΤ)** DPPC:βιμπλαστίνη 75:25 (πράσινο), **Ζ)** DPPC:βιγκριστίνη 75:25 (μπλε). ..212

Σχήμα 5.11: Θερμογραφήματα των συστημάτων διπλοστιβάδα:χοληστερόλη:φάρμακο σε διάφορες μοριακές αναλογίες. **A)** DPPC (μαύρο), **B)** DPPC:χοληστερόλη 90:10 (κόκκινο), **Γ)** DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17 (γαλάζιο), **Δ)** DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17 (ροζ), **Ε)** DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 65:10:25 (πράσινο) και **ΣΤ')** DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25 (καφέ).214

Σχήμα 5.12: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} των συστημάτων διπλοστιβάδα:χοληστερόλη:φάρμακο σε διάφορες μοριακές αναλογίες. **A)** DPPC (μαύρο), **B)** DPPC:χοληστερόλη 90:10 (κόκκινο), **Γ)** DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17 (γαλάζιο), **Δ)** DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17 (πράσινο), **Ε)** DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 65:10:25 (ροζ) και **ΣΤ')** DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25 (καφέ).217

Σχήμα 5.13: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} για το σύστημα DPPC:χοληστερόλη:φάρμακο 73:10:17.218

Σχήμα 5.14: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} για το σύστημα DPPC:χοληστερόλη:φάρμακο 65:10:25.219

Σχήμα 5.15: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} των συστημάτων διπλοστιβάδα:χοληστερόλη:φάρμακο σε διάφορες μοριακές αναλογίες. **A)** DPPC (μαύρο), **B)** DPPC:χοληστερόλη 90:10 (κόκκινο), **Γ)** DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17 (γαλάζιο), **Δ)** DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17 (πράσινο), **Ε)**

DPPC:χοληστερόλη:βιμπλασίνη	65:10:25	(ροζ)	και	ΣΤ')	
DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη	65:10:25	(καφέ).			221

Σχήμα 5.16: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2935}/I_{2880} των συστημάτων διπλοστιβάδα:χοληστερόλη:φάρμακο σε διάφορες μοριακές αναλογίες. Α) DPPC (μαύρο), Β) DPPC:χοληστερόλη 90:10 (κόκκινο), Γ) DPPC:χοληστερόλη:βιμπλασίνη 73:10:17 (γαλάζιο), Δ) DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17 (πράσινο), Ε) DPPC:χοληστερόλη:βιμπλασίνη 65:10:25 (ροζ) και ΣΤ') DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25 (καφέ).222

Σχήμα 6.1: Η δράση των λιπιδίων συμπλέκεται με αυτή των πρωτεϊνών για να παραχθεί ένα βιολογικό αποτέλεσμα.225

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 3.1: Διάφορα είδη αλληλοεισχώρησης.	102
Εικόνα 3.2: Φάσματα Raman των δειγμάτων DPPC:βιμπλ 75:25 και βιμπλαστίνης σε θερμοκρασία 25 °C και στην περιοχή 200 – 1800 cm ⁻¹	137

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 3.1: Εξάρτηση της θερμοκρασίας κύριας μεταβολής φάσης σε συνάρτηση της ποσότητας φαρμάκου.	142
Διάγραμμα 3.2: Εξάρτηση της μεταβολής ενθαλπίας κύριας μεταβολής φάσης σε συνάρτηση της ποσότητας φαρμάκου.	143
Διάγραμμα 3.3: Εξάρτηση των σημείων καμπής των σιγμοειδών καμπυλών των λόγων εντάσεως κορυφών Raman σε σχέση με την ποσότητα φαρμάκου.	145
Διάγραμμα 3.4: Εξάρτηση των τιμών του λόγου I_{1090}/I_{1130} από την ποσότητα φαρμάκου.	147
Διάγραμμα 3.5: Εξάρτηση των τιμών του λόγου I_{2850}/I_{2880} από την ποσότητα φαρμάκου.	148
Διάγραμμα 3.6: Εξάρτηση των τιμών του λόγου I_{2935}/I_{2880} από την ποσότητα φαρμάκου.	149
Διάγραμμα 4.1: Εξάρτηση της θερμοκρασίας κύριας μεταβολής φάσης σε συνάρτηση της ποσότητας φαρμάκου.	190
Διάγραμμα 4.2: Εξάρτηση της μεταβολής ενθαλπίας κύριας μεταβολής φάσης σε συνάρτηση της ποσότητας φαρμάκου.	191
Διάγραμμα 4.3: Εξάρτηση των σημείων καμπής των σιγμοειδών καμπυλών των λόγων εντάσεως κορυφών Raman σε σχέση με την ποσότητα φαρμάκου.	194
Διάγραμμα 4.4: Εξάρτηση των τιμών του λόγου I_{1090}/I_{1130} από την ποσότητα φαρμάκου.	196
Διάγραμμα 4.5: Εξάρτηση των τιμών του λόγου I_{2850}/I_{2880} από την ποσότητα φαρμάκου.	197
Διάγραμμα 4.6: Εξάρτηση των τιμών του λόγου I_{2935}/I_{2880} από την ποσότητα φαρμάκου.	197

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

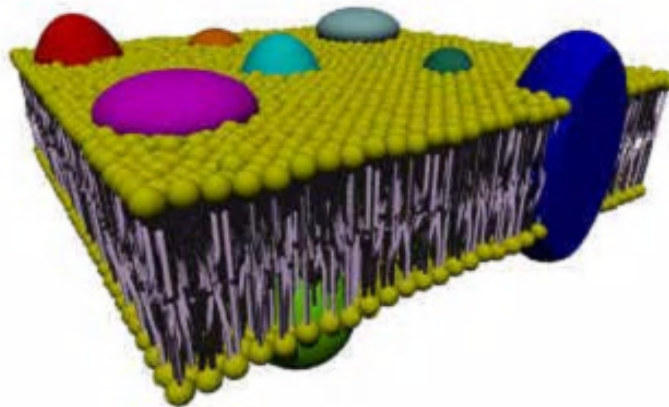
Πίνακας 2.1: Κορυφές Raman των διπλοστιβάδων της DPPC [23-36].	75
Πίνακας 3.1: Αποτελέσματα θερμικής ανάλυσης δειγμάτων βιμπλαστίνης.	140
Πίνακας 3.2: Σημεία καμπής των σιγμοειδών καμπυλών που αντιστοιχούν στους λόγους εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} , I_{2935}/I_{2880} και I_{1090}/I_{1130} .	145
Πίνακας 3.3: Ελάχιστες και μέγιστες παρατηρούμενες τιμές των λόγων εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} , I_{2935}/I_{2880} και I_{1090}/I_{1130} .	146
Πίνακας 3.4: Μετατοπίσεις των παρατηρούμενων κορυφών Raman.	150
Πίνακας 4.1: Αποτελέσματα θερμικής ανάλυσης δειγμάτων βιγκριστίνης.	190
Πίνακας 4.2: Σημεία καμπής των σιγμοειδών καμπυλών που αντιστοιχούν στους λόγους εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} , I_{2935}/I_{2880} και I_{1090}/I_{1130} .	193
Πίνακας 4.3: Ελάχιστες και μέγιστες παρατηρούμενες τιμές των λόγων εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} , I_{2935}/I_{2880} και I_{1090}/I_{1130} .	195
Πίνακας 4.4: Μετατοπίσεις των παρατηρούμενων κορυφών Raman.	198
Πίνακας 5.1: Αποτελέσματα C.U. για τα εξεταζόμενα δείγματα βιμπλαστίνης.	203
Πίνακας 5.2: Αποτελέσματα C.U. για τα εξεταζόμενα δείγματα βιγκριστίνης.	215

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιολογικές Μembrάνες

Οι βιολογικές μεμβράνες είναι δυναμικές ρευστές δομές και αρκετά ετερογενείς σε λειτουργία, οι οποίες έχουν κοινή γενική δομή: αποτελούνται από μόρια λιπιδίων και πρωτεϊνών που ενώνονται με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις (Σχ. 1.1). Η λιπιδική διπλοστιβάδα αποτελεί τη βασική δομή της μεμβράνης και λειτουργεί ως ένας σχετικά αδιαπέραστος φραγμός στο πέρασμα των περισσότερων υδατοδιαλυτών μορίων. Οι σημαντικότερες ομάδες μεμβρανικών λιπιδίων είναι τα φωσfolιπίδια, τα γλυκολιπίδια και οι στερόλες, ενώ οι μεμβρανικές πρωτεΐνες χωρίζονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με τη θέση τους στη λιπιδική διπλοστιβάδα σε: περιφερειακές, διαμεμβρανικές και λιποσυνδεόμενες.



Σχήμα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση κυτταρικής μεμβράνης.

Η εξωτερική πλευρά της κάθε επιφάνειας συντίθεται κυρίως από ιοντικές και πολικές ομάδες που αλληλεπιδρούν με τους υδατικούς πολικούς διαλύτες ενώ η εσωτερική συντίθεται από τις υδρογονανθρακικές αλυσίδες των λιπιδίων. Οι λιπιδικές αλυσίδες διατάσσονται παράλληλα και υπό φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει αρκετή ευκαμψία που επιτρέπει περιστροφές γύρω από τις

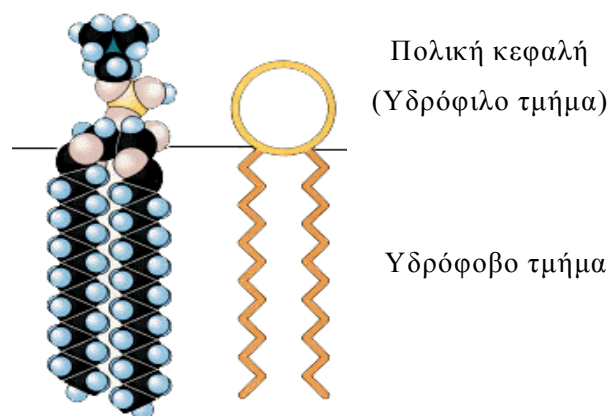
αλειφατικές αλυσίδες. Τα μη πολικά άκρα των αλυσίδων έρχονται σε επαφή στο μέσο της λιπιδικής στοιβάδας δημιουργώντας ένα υδρόφοβο φράγμα αδιαπέραστο από πολικά μόρια αλλά διαπερατό από μικρά υδρόφοβα μόρια όπως η αιθανόλη ή το DMSO. Οι ενσωματωμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες και τα λιπιδικά μόρια που περιορίζονται μέσα στην διλιπιδική στιβάδα μπορούν να διαχέονται πλευρικά. Το κυριότερο χαρακτηριστικό της προσομοίωσης της μεμβράνης ως διδιάστατου πολυμορφικού υγρού είναι ότι περιγράφεται ως ένα δυναμικό σύστημα όπου πρωτεΐνες και λιπίδια μπορούν να μετακινούνται και να αλληλεπιδρούν.

Οι μεμβράνες είναι ασύμμετρες δομές, δηλαδή η σύσταση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών διαφέρουν ανάμεσα στην εξωτερική και εσωτερική επιφάνεια των διαφόρων μεμβρανών και αυτό ανακλά τις διάφορες λειτουργίες που επιτελούνται από το εσωτερικό και το εξωτερικό των μεμβρανών. Οι εξωτερικές μεμβράνες απομονώνουν το κύτταρο από το περιβάλλον και οι πρωτεΐνες που βρίσκονται σε αυτές τις μεμβράνες επιτρέπουν στα κύτταρα να αντιδρούν σε εξωτερικά ερεθίσματα και να ρυθμίζουν την είσοδο και τη μεταβίβαση χημικών σημάτων και θρεπτικών ουσιών. Οι εσωτερικές μεμβράνες των κυττάρων διαχωρίζουν τα κυτταρικά οργάνδια και οι πρωτεΐνες σε αυτά λειτουργούν ως δομικοί σύνδεσμοι επιτρέποντας την επικοινωνία μεταξύ διαφόρων υποκυτταρικών περιοχών. Επιπλέον, οι διαφορές στη λιπιδική σύσταση αντανakλούν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες της εκάστοτε μεμβράνης (π.χ. ρευστότητα, σημείο τήξης, θερμοκρασία μετάπτωσης).

1.1.1 Λιπίδια των βιολογικών μεμβρανών

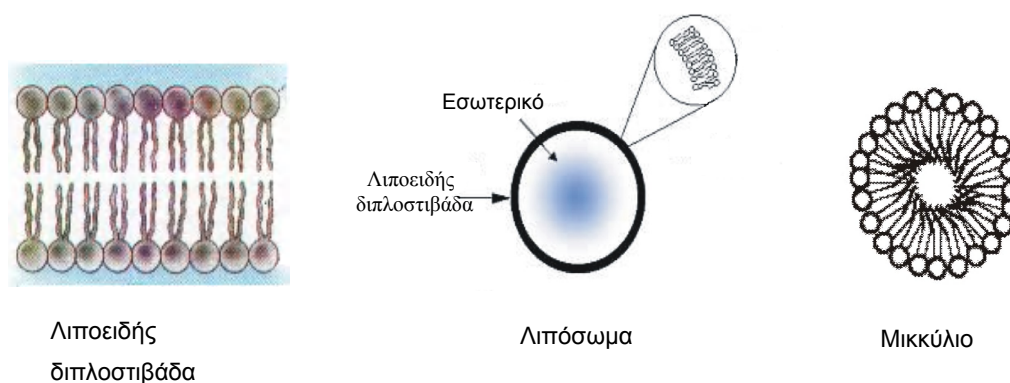
Τα λιπίδια αποτελούν περίπου το 50% της κυτταρικής μεμβράνης. Πρόκειται για αμφίφιλα μόρια καθώς περιέχουν στη δομή τους ένα υδρόφιλο και ένα υδρόφοβο τμήμα (Σχ. 1.2). Τα λιπίδια των μεμβρανών περιλαμβάνουν δύο υδρόφοβες αλειφατικές αλυσίδες λιπαρών οξέων και μια υδρόφιλη ομάδα. Στα περισσότερα λιπίδια η κεντρική ομάδα είναι μία γλυκερόλη όπου συνδέονται οι δύο υδρογονανθρακικές αλυσίδες και μία πολική ομάδα (κυρίως

φωσφορική). Ανάλογα με το είδος των λιπαρών οξέων ή της υδρόφιλης ομάδας σχηματίζεται και διαφορετικό είδος λιπιδίου (Σχ. 1.3).



Σχήμα 1.2: Υδρόφιλο και υδρόφοβο τμήμα φωσfolιπιδίου.

Ο αμφοτερικός χαρακτήρας των λιπιδίων παίζει σπουδαίο ρόλο στη δημιουργία των βιολογικών μεμβρανών, καθώς όταν βρεθούν σε υδατικό περιβάλλον, σχηματίζουν αυθόρμητα διπλοστιβάδες, λιποσώματα (δίστιβες σφαιρικές δομές) και μικκύλια (μονόστιβες σφαιρικές δομές) (Σχ. 3). Οι λιποειδείς διπλοστιβάδες αποτελούν τη βασική δομή των βιολογικών μεμβρανών.

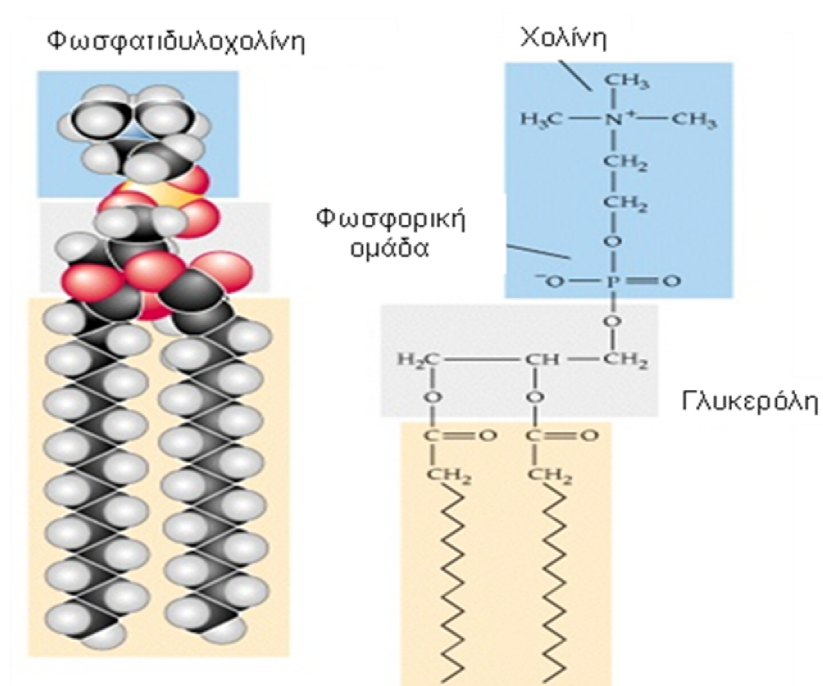


Σχήμα 1.3 : Δομές λιποειδούς διπλοστιβάδας, λιποσώματος και μικκυλίου.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι σημαντικότερες ομάδες μεμβρανικών λιπιδίων είναι τα φωσfolιπίδια, τα γλυκολιπίδια (αποτελούνται κυρίως από λιπίδια και υδατανθρακικές ομάδες) και οι στερόλες με πιο σημαντική τη χοληστερόλη. Η

χοληστερόλη έχει μικρή διαλυτότητα στο νερό και παρεμβάλλεται ανάμεσα από μόρια φωσφολιπιδίων στις διπλοστιβάδες, περιορίζοντας την κινητικότητα των αλειφατικών αλυσίδων και τη διαπερατότητα των μεμβρανών.

Η φωσφατιδυλοχολίνη (Σχ. 1.4) είναι ένα από τα κυριότερα φωσφολιπίδια που παρατηρείται σε βιολογικές μεμβράνες. Είναι μία επαμφοτερίζουσα ιοντική ένωση με αρνητικό φορτίο στη φωσφορική ομάδα και θετικό φορτίο στην αμίνη. Το φωσφατιδικό οξύ, η φωσφατιδυλογλυκερίνη και η φωσφατιδυλοσερίνη είναι επίσης κοινές αρνητικά φορτισμένες πολικές ομάδες λιπιδίων. Μερικές ομάδες τροποποιούνται με μεγάλα υδατανθρακικά συμπλέγματα που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση και αναγνώριση των κυττάρων. Οι πολικές κεφαλές των λιπιδίων αλληλεπιδρούν με ισχυρές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και υδρογονικούς δεσμούς με τα αμινοξικά κατάλοιπα της επιφάνειας διεπαφής των μεμβρανικών πρωτεϊνών. Το φορτίο και το υδατικό μικροπεριβάλλον των φωσφολιπιδίων μπορεί να επηρεάσει τη δραστηριότητα των περιφερειακών μεμβρανικών πρωτεϊνών [1-4].



Σχήμα 1.4: Η δομή της φωσφατιδυλοχολίνης.

1.1.2 Ρευστότητα των βιολογικών μεμβρανών

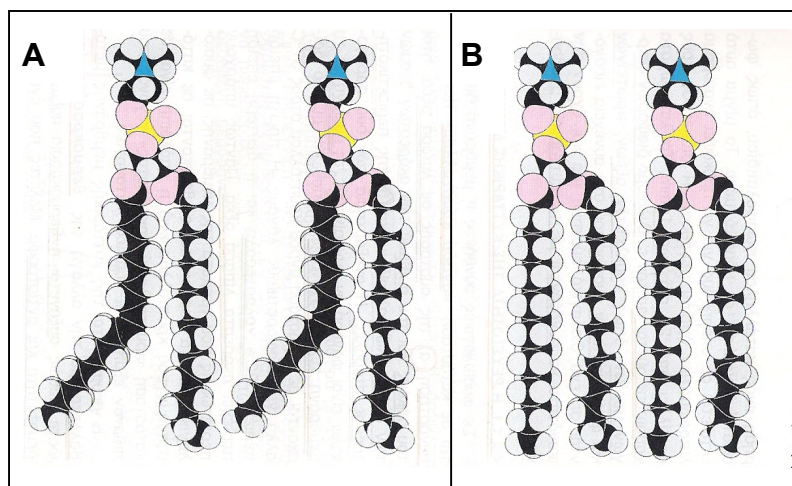
Σε φυσιολογικές συνθήκες η μεμβράνη διατηρείται σε υγρή κρυσταλλική κατάσταση που είναι συνάρτηση: α) της σύστασης σε λιπαρά οξέα, και συγκεκριμένα του μήκους και του αριθμού των ακόρεστων δεσμών των αλειφατικών αλυσίδων, β) της περιεκτικότητας σε στερόλες και γ) τη θερμοκρασία [5].

1.1.2.1 Επίδραση των λιπαρών οξέων στη ρευστότητα των βιολογικών μεμβρανών

Οι πιο σημαντικοί παράγοντες της λιπιδικής σύστασης που επιδρούν στη μεμβρανική ρευστότητα είναι το μήκος των αλειφατικών αλυσίδων των λιπαρών οξέων και ο αριθμός των ακόρεστων δεσμών. Η θερμοκρασία τήξης ενός κορεσμένου λιπαρού οξέος αυξάνεται με την αύξηση του μήκους και τα σημεία τήξεως κυμαίνονται από 32 °C – 76 °C για τα κορεσμένα λιπαρά οξέα με μήκος 10 – 20 άτομα άνθρακα. Για τα λιπαρά οξέα με 18 άτομα άνθρακα, η θερμοκρασία τήξης είναι 70, 16, 5 και -11 °C για κανένα, ένα, δύο και τρεις διπλούς δεσμούς αντίστοιχα. Οι μεμβράνες που περιέχουν πολλά κορεσμένα λιπαρά οξέα έχουν υψηλή θερμοκρασία μετάπτωσης, ενώ οι μεμβράνες με ακόρεστα λιπαρά οξέα έχουν χαμηλότερες θερμοκρασίες μετάπτωσης. Έτσι, τα φωσφολιπίδια με ακόρεστες λιπαρές λυσίδες παρουσιάζουν αυξημένη μεμβρανική ρευστότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες [5].

Η επίδραση των ακόρεστων λιπαρών οξέων στη μεμβρανική ρευστότητα είναι πολύ σημαντική διότι η κάμψη που οι διπλοί δεσμοί εισάγουν στις ουρές των λιπαρών οξέων εμποδίζει την ευθυγράμμιση και το πυκνό πακετάρισμα των υδρογονανθρακικών αλυσίδων (Σχ. 1.5). Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα συνδέονται μεταξύ τους στενά και ελαχιστοποιούν τις van der Waals αλληλεπιδράσεις ενώ τα ακόρεστα όχι. Οι πλασματικές μεμβράνες συνήθως περιέχουν λιπαρά οξέα με ποικίλο μήκος αλυσίδας κα αριθμό ακόρεστων

δεσμών. Πρακτικά η ποικιλότητα είναι συνήθως διαμοριακή γιατί τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια περιέχουν συνήθως ένα κορεσμένο λιπαρό οξύ και ένα ακόρεστο λιπαρό οξύ. Αυτό εγγυάται τη διατήρηση των μεμβρανών στη ρευστή κατάσταση υπό φυσιολογικές συνθήκες.



Σχήμα 1.5: Α. φωσφολιπίδια με έναν ακόρεστο δεσμό, όπου οι λιπαρές αλυσίδες δεν είναι παράλληλα τοποθετημένες διότι δημιουργείται κάμψη εξαιτίας των διπλών δεσμών των λιπαρών οξέων. Β. διεύθετση μεμβρανικών φωσφολιπιδίων αποτελούμενων από κορεσμένα λιπαρά οξέα, όπου παρατηρείται ο συμπυκνωμένος τρόπος πακεταρίσματος, επειδή οι λιπαρές αλυσίδες είναι παράλληλα τοποθετημένες.

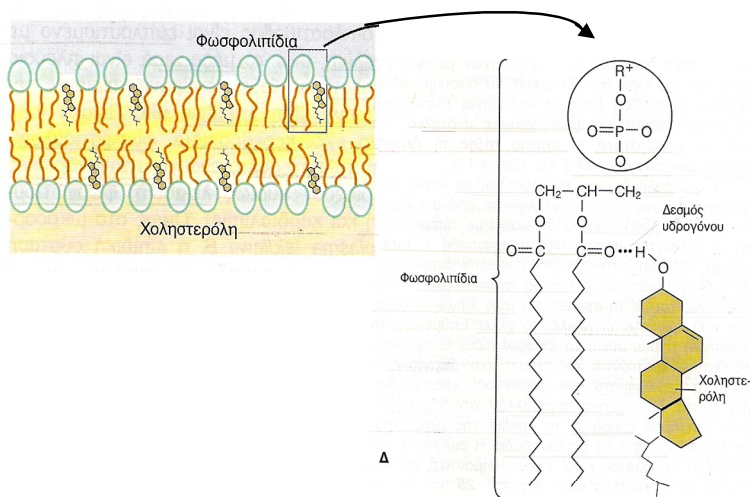
Οι υδρογονανθρακικές αλυσίδες των λιπιδίων έχουν μήκος 14 – 24 ανθράκων και λόγω του τρόπου σύνθεσής τους έχουν πάντα άρτιο αριθμό ανθράκων. Οι αλυσίδες είναι συνήθως παράλληλες μεταξύ τους. Περιστροφές γύρω από τους δεσμούς άνθρακα – άνθρακα (C-C) κατά μήκος των αλυσίδων προσδίδουν στις αλυσίδες την *trans* (επιμήκη) ή *gauche* (στρεβλωμένη) στερεοδομή. Η *trans* επιτρέπει στις αλυσίδες να βρίσκονται κοντά η μία στην άλλη ενώ η *gauche* αυξάνει την απόσταση μεταξύ της στρεβλωμένης αλυσίδας και των γειτονικών της. Το πόσο κοντά βρίσκονται οι υδρογονανθρακικές αλυσίδες υπαγορεύει τις φυσικές ιδιότητες της μεμβράνης όπως τη μετακίνηση των λιπιδίων, τη διαπερατότητα από πολικές ομάδες και τη μετάπτωση φάσης από κολλώδη σε ρευστή. Στην κολλώδη φάση οι λιπιδικές αλυσίδες είναι ευθυγραμμισμένες με λίγες περιστροφές γύρω από τους απλούς δεσμούς C-C που βρίσκονται κυρίως στην *trans* μορφή. Η

ρευστή μορφή της μεμβράνης χαρακτηρίζεται από σχετικά υψηλή διάχυση των μεμβρανικών συστατικών και μικρότερο πάχος της διλιπιδικής στοιβάδας εξ αιτίας του μεγάλου αριθμού *gauche* ισομερών των υδρογονανθρακικών αλυσίδων. Οι διπλοί δεσμοί C=C στις αλυσίδες επίσης μπορούν να βρεθούν σε *trans* ή *cis* μορφή. Λιπίδια με κορεσμένες ή *trans* ακόρεστες αλυσίδες συσσωρεύονται με μεγάλη πυκνότητα. Λιπίδια με *cis* ακόρεστες αλυσίδες, που είναι και οι πλέον συνήθεις στις βιολογικές μεμβράνες, συσσωρεύονται με μικρότερη πυκνότητα εξ αιτίας των παραμορφώσεων των αλυσίδων. Η παρουσία διπλών *cis* δεσμών μειώνει το μήκος της υδρογονανθρακικής αλυσίδας και έτσι διλιπιδικές μεμβράνες ακόρεστων λιπιδίων είναι λεπτότερες από τις αντίστοιχες κορεσμένες του ίδιου αριθμού ανθράκων [6].

1.1.2.2 Επίδραση της χοληστερόλης στη ρευστότητα των βιολογικών μεμβρανών

Η χοληστερόλη απαντάται σε σημαντική ποσότητα στις μεμβράνες των ευκαρυωτικών κυττάρων (20-40 mol%), ενώ σε μεμβράνες προκαρυωτικών κυττάρων δεν έχει ανιχνευτεί.

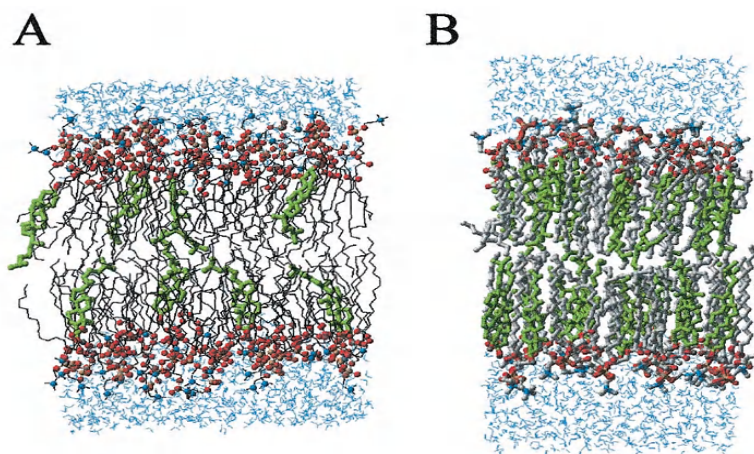
Η χοληστερόλη έχει μικρή διαλυτότητα στο νερό και παρεμβάλλεται ανάμεσα από μόρια φωσφολιπιδίων στις διπλοστιβάδες, περιορίζοντας την κινητικότητα των αλειφατικών αλυσίδων και τη διαπερατότητα των μεμβρανών (Σχ. 1.6). Το μόριο της χοληστερόλης ευθυγραμμίζεται στη λιπιδική διπλοστιβάδα έτσι ώστε το H του υδροξυλίου, το μόνο υδρόφιλο μέρος ενός κατά τα άλλα υδρόφοβου μορίου, να βρίσκεται κοντά στην πολική κεφαλή σε ένα γειτονικό φωσφολιπίδιο, σχηματίζοντας δεσμό υδρογόνου με το οξυγόνο της εστερικής ομάδας μεταξύ της γλυκερόλης και του λιπαρού οξέος. Οι στεροειδείς δακτύλιοι και η υδρογονανθρακική ομάδα της χοληστερόλης αλληλεπιδρούν με γειτονικές υδρογονανθρακικές αλυσίδες των μεμβρανικών λιπιδίων.



Σχήμα 1.6: Τα μόρια της χοληστερόλης εντοπίζονται και στα δυο στρώματα της διπλοστιβάδας, μεταξύ των φωσφολιπιδίων, σχηματίζοντας δεσμό υδρογόνου με το οξυγόνο της εστερικής ομάδας μεταξύ της γλυκερόλης και του λιπαρού οξέος.

Η παρεμβολή των άκαμπτων μορίων χοληστερόλης στη μεμβράνη των ζωικών κυττάρων κάνει τη μεμβράνη περισσότερο ρευστή σε υψηλότερες θερμοκρασίες από ότι θα μπορούσε να γίνει διαφορετικά. Η χοληστερόλη αποτρέπει αποτελεσματικά τις υδρογονανθρακικές αλυσίδες των φωσφολιπιδίων από την πυκνή διεύθετηση, καθώς η θερμοκρασία μειώνεται, ελαττώνοντας με τον τρόπο αυτό την πιθανότητα πηκτωματοποίησης των μεμβρανών με τη ψύξη.

Οι μεμβρανικές στερόλες είναι αμφίτροπα μόρια όπου η μικρή υδρόφιλη HO-ομάδα διευθετείται ενδιάμεσα των λιπιδικών διπλοστιβάδων, όπως παριστάνεται στο Σχ. 1.6 για την περίπτωση της χοληστερόλης. Ένα μόριο χοληστερόλης μπορεί να καταλάβει περίπου τη μισή έκταση της μιας στιβάδας. Είναι γνωστό ότι η χοληστερόλη ρυθμίζει τη διάταξη των αλειφατικών αλυσίδων των λιπιδίων. Πράγματι, τα λιπιδικά μόρια όπως φαίνεται και στο Σχ. 1.6 υπόκεινται σε σημαντικές διευθετήσεις παρουσία της χοληστερόλης. Στο Σχήμα 1.7Α φαίνεται ότι παρουσία 11% χοληστερόλης οι υδρογονανθρακικές ουρές του DPPC όσο και της χοληστερόλης βρίσκονται σε αταξία. Παρουσία, όμως, 50% χοληστερόλης (Σχ. 1.7B) παρατηρείται ότι οι υδρογονανθρακικές ουρές τους είναι πιο διευθετημένες και ότι η χοληστερόλη τοποθετείται/στοιχίζεται παράλληλα με τις ουρές των φωσφολιπιδίων της λιπιδικής διπλοστιβάδας [6,7].



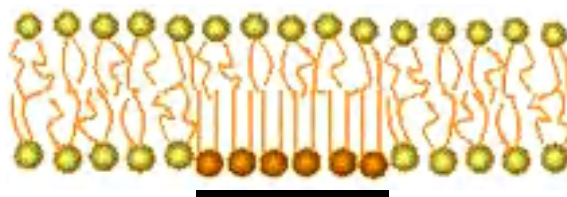
Σχήμα 1.7: Α. Λιπιδική διπλοστιβάδα DPPC και 11% χοληστερόλη, όπου παρατηρείται η ανομοιόμορφη και άτακτη διευθέτηση των αλειφατικών ουρών των λιπιδίων και Β. Λιπιδική διπλοστιβάδα PDDC και 50% χοληστερόλη, όπου διακρίνεται η κανονική διευθέτηση των λιπιδικών αλυσίδων και της χοληστερόλης (πράσινο χρώμα).

Όταν η μεμβράνη βρίσκεται σε ρευστή κατάσταση, απουσία της χοληστερόλης, χαρακτηρίζεται από άτακτη διευθέτηση και γρήγορη πλευρική διάχυση των φωσfolιπιδίων καθώς επίσης και από έντονη αταξία των αλειφατικών αλυσίδων των λιπιδίων, με αποτέλεσμα η μεμβράνη να βρίσκεται σε υγρή αποδιοργανωμένη φάση (liquid disordered phase). Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, η λιπιδική διπλοστιβάδα υφίσταται μια φάση μετάπτωσης [σε μια ορισμένη θερμοκρασία που ονομάζεται θερμοκρασία μετάπτωσης (T_m)], κατά την οποία η μεμβράνη μετατρέπεται σε πήκτωμα, γι' αυτό και ονομάζεται φάση γέλης – στερεή οργανωμένη φάση (solid ordered phase). Σε αυτή την κατάσταση μειώνονται οι κινήσεις των φωσfolιπιδίων, όπως είναι η πλευρική διάχυση και παρατηρείται μια σχετικά κανονική διευθέτηση των λιπιδικών αλειφατικών ουρών.

Η παρουσία, όμως, της χοληστερόλης προκαλεί μια πιο σύνθετη εικόνα. Έχει δειχθεί ότι όταν μια σημαντική ποσότητα χοληστερόλης προστεθεί σε DPPC μεμβράνη, η διπλοστιβάδα μεταβαίνει σε μια καινούργια φάση η οποία φέρει χαρακτηριστικές ιδιότητες υγρής αλλά και στερεής κατάστασης. Σύμφωνα με τους Zuckermann et al. αυτή η νέα φάση καλείται κατάσταση υγρής οργανωμένης φάσης (liquid ordered phase), ενώ η κατάσταση γέλης

ονομάζεται στερεή οργανωμένη φάση – φάση πηκτώματος (solid ordered phase) και η υγρή κρυσταλλική φάση ονομάζεται υγρή αποδιοργανωμένη κατάσταση (liquid disordered phase) [8]. Σε αυτού του είδους την κατηγοριοποίηση οι έννοιες «υγρή» και «στερεή» κατάσταση αναφέρονται στη διάταξη σε σχέση με τους μεταφορικούς (translational) βαθμούς ελευθερίας, ενώ οι όροι «οργανωμένη» και «αποδιοργανωμένη» αναφέρονται στους διαμορφωτικούς (conformational) βαθμούς ελευθερίας. Η παρουσία μικρής ποσότητας χοληστερόλης οδηγεί στην παρατήρηση μόνο των δυο συνήθων καταστάσεων: στερεής οργανωμένης και υγρής αποδιοργανωμένης φάσης. Η μετάβαση από τη στερεή οργανωμένη στην υγρή αποδιοργανωμένη φάση πραγματοποιείται περίπου στους 40 °C. Όταν η ποσότητα της χοληστερόλης σε DPPC μεμβράνες είναι μεγάλη (>25mol%) εμφανίζεται η υγρή οργανωμένη φάση. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι δεν παρατηρείται φάση μετάβασης στην στερεή οργανωμένη φάση όταν προκαλείται μείωση της θερμοκρασίας.

Η χοληστερόλη, πέραν του γεγονότος ότι αυξάνει την κανονική διάταξη των αλυσίδων των μεμβρανικών λιπιδίων, πιστεύεται ότι κατέχει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό μικροδομών στο εξωτερικό φύλλο των λιπιδίων της μεμβράνης. Αυτές οι περιοχές είναι πλούσιες σε χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια, περιέχουν κορεσμένα φωσφολιπίδια και ονομάζονται λιπιδικές δομές ή σχεδίες (Σχ. 1.8). Τα λιπίδια της σχεδίας οργανώνονται σε κανονική διάταξη, είναι περισσότερο πακεταρισμένα και οι αλυσίδες τους εκτεταμένες (τεντωμένες) σε αντίθεση με τα υπόλοιπα λιπίδια της διπλοστιβάδας που είναι άτακτα διευθετημένα. Οι σχεδίες έχει βρεθεί ότι συμπεριφέρονται ως λειτουργικές μονάδες συμμετέχοντας σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες όπως είναι η μεταγωγή σήματος, η ενδοκυττάρια κυκλοφορία, η κυτταρική σύνδεση και προσκόλληση κ.α. Συγκεκριμένα, μπορούν να ενσωματώνουν ή να αποκλείουν μεμβρανικές πρωτεΐνες και έτσι να επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ πρωτεΐνης – πρωτεΐνης ή πρωτεΐνης – λιπιδίων [6,9].



Raft-Σχεδία

Σχήμα 1.8: Λιπιδική διπλοστιβάδα όπου διακρίνεται μια λιπιδική μικροδομή ή σχεδία (raft) (πορτοκαλί).

Η χοληστερόλη έχει τη δυνατότητα να ρυθμίζει και γενικά να καθορίζει τις φυσικές και τις φυσικοχημικές ιδιότητες καθώς και τις διάφορες λειτουργίες των βιολογικών μεμβρανών. Πιο συγκεκριμένα καθορίζει τη:

- *Διαπερατότητα.* Ένας από τους βασικούς λόγους παρουσίας της χοληστερόλης στις μεμβράνες των ευκαρυωτικών κυττάρων είναι πιθανόν η δυνατότητα ρύθμισης της παθητικής μεταφοράς ουσιών μέσω της μεμβράνης. Οι χοληστερόλες μειώνουν τη διαπερατότητα της λιπιδικής διπλοστιβάδας στα ιόντα και στα μικρά μόρια. Απουσία της χοληστερόλης, οι διπλοστιβάδες χαρακτηρίζονται από αυξημένη διαπερατότητα. Παρουσία χοληστερόλης, προκαλείται διευθέτηση των λιπιδικών αλυσίδων, αυξάνεται το πάχος της μεμβράνης και προκαλείται με αυτόν τον τρόπο μείωση της διαπερατότητας. Αυτό πιθανόν γίνεται επειδή γεμίζουν τους χώρους μεταξύ των υδρογονανθρακικών αλυσίδων των φωσfolιπιδίων και επομένως φράζουν οι μικροί διάυλοι δια μέσου των οποίων ιόντα και μικρά μόρια θα μπορούν να περνούν.
- *Δέσμευση διαλυτών μορίων.* Η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης χοληστερόλης στη λιπιδική διπλοστιβάδα φαίνεται να μειώνει την είσοδο απλών πολικών μορίων, όπως για παράδειγμα της αλκοόλης, δεικνύοντας ότι δρα ανταγωνιστικά στην πρόσδεση τέτοιας φύσεως μορίων στη μεμβράνη.
- *Πλευρική διάχυση.* Έχει διαπιστωθεί ότι σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες της θερμοκρασίας μετάπτωσης (T_m) το φαινόμενο της πλευρικής

διάχυσης μειώνεται στις λιπιδικές διπλοστιβάδες όταν αυξάνεται παράλληλα και η συγκέντρωση της χοληστερόλης. Η μείωση αυτή προκύπτει από το γεγονός ότι η χοληστερόλη προκαλεί διαμορφωτικές αλλαγές στις λιπιδικές αλυσίδες, με αποτέλεσμα οι αλυσίδες να αλληλεπιδρούν πιο αποτελεσματικά, αυξάνοντας την απαιτούμενη ενέργεια ενεργοποίησης για τη μετακίνηση των σωματιδίων. Αντιθέτως, σε χαμηλότερες θερμοκρασίες της T_m η πλευρική διάχυση αυξάνεται γραμμικά σε σχέση με τη συγκέντρωση της χοληστερόλης. Η αύξηση της διάχυσης οφείλεται στην αύξηση της ελεύθερης επιφάνειας ανά μόριο με την αυξανόμενη συγκέντρωση της χοληστερόλης.

- *Λειτουργία διαμεμβρανικών πρωτεϊνών.* Όπως έχει ήδη αναφερθεί η χοληστερόλη αυξάνει το πάχος της λιπιδικής διπλοστιβάδας στη ρευστή φάση και μετατοπίζει την ισορροπία της πλευρικής πίεσης στο εσωτερικό της στιβάδας. Με αυτόν τον τρόπο προκαλεί αλλαγές στις φυσικές ιδιότητες της μεμβράνης, αλλαγές που μπορούν να επηρεάσουν το υδρόφοβο περιβάλλον που αναπτύσσεται στις αλειφατικές αλυσίδες των λίπιδίων. Τέτοιου είδους αλλαγές μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργία διαμεμβρανικών πρωτεϊνών και κατ' επέκταση τη λειτουργικότητα της ίδιας της μεμβράνης. Για παράδειγμα, διαμεμβρανικά κανάλια, ιοντικοί δίαυλοι και μεταφορείς γλυκόζης λειτουργούν ανάλογα με το είδος της μεμβράνης στην οποία ενσωματώνονται και συγκεκριμένα επηρεάζονται από το πάχος της μεμβράνης και από το είδος του υδρόφοβου περιβάλλοντος που υπάρχει μεταξύ των δύο λιπιδικών στιβάδων. Αλλαγές στην πυκνότητα και το πάχος της μεμβράνης επάγουν είτε την ενεργοποίηση είτε την καταστολή των υπαρχόντων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. Επιπλέον, ορισμένες πρωτεΐνες φαίνεται να ενσωματώνονται ή γενικά να αλληλεπιδρούν με τις σχεδίες, δηλαδή με μεμβράνες που είναι πλούσιες σε χοληστερόλη. Αυτές οι πρωτεΐνες φέρουν μια υδρογονανθρακική αλυσίδα η οποία αποτελεί περιοχή πρόσδεσης για τη σχεδία [6].

1.1.2.3 Επίδραση της θερμοκρασίας στη ρευστότητα των βιολογικών μεμβρανών

Η ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης μεταβάλλεται με την αλλαγή της θερμοκρασίας με τέτοιο τρόπο ώστε καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται να αυξάνεται και η ρευστότητα και αντίστροφα (Σχ. 1.9).



Σχήμα 1.9: Αναπαράσταση της μετάβασης από την φάση πηκτώματος στη ρευστή κατάσταση των μεμβρανών και αντίστροφα.

Μελέτες που έχουν γίνει σε τεχνητές μεμβράνες έδειξαν πως κάθε λιπιδική διπλοστιβάδα έχει μια χαρακτηριστική θερμοκρασία μετάπτωσης κατά την οποία η μεμβράνη όταν ψύχεται μετατρέπεται σε πήκτωμα ενώ όταν θερμαίνεται μεταβάλλεται σε ρευστή. Για να λειτουργεί σωστά μια μεμβράνη πρέπει να διατηρείται στη ρευστή κατάσταση οπότε αυτό επιτυγχάνεται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από τη θερμοκρασία μετάπτωσης. Σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από τη θερμοκρασία μετάπτωσης, όλες οι λειτουργίες που εξαρτώνται από την κινητικότητα και τις δομικές αλλαγές των μεμβρανικών πρωτεϊνών εξασθενούν ή διακόπτονται. Τέτοιες λειτουργίες είναι η μεταφορά ουσιών, η ανίχνευση και μεταφορά μηνυμάτων, η κυτταρική επικοινωνία, κ.α.

1.1.3 Ο ρόλος των μεμβρανών στη δράση των φαρμάκων

Η διάλυση και η απορρόφηση των δραστικών συστατικών ενός φαρμακευτικού σκευάσματος είναι απαραίτητες προϋποθέσεις για την εμφάνιση κάποιας συστηματικής φαρμακολογικής δράσης. Ανεξάρτητα από τον τρόπο χορήγησης, η τελική είσοδος του φαρμάκου στην κυκλοφορία καθορίζεται από τη διάβαση ποικίλλων φραγμών, με τη μορφή κυρίως βιολογικών μεμβρανών. Το ίδιο ισχύει και για την ενεργητική ή παθητική απομάκρυνση του φαρμάκου από τον οργανισμό. Γνωρίζοντας λοιπόν, τη λιπιδική φύση και τη δομή των βιολογικών μεμβρανών, γίνεται κατανοητό ότι λιποδιαλυτά φαρμακευτικά μόρια διακινούνται με μεγαλύτερη ευκολία στον οργανισμό, σε αντίθεση με τα υδατοδιαλυτά που συναντούν μεγαλύτερη δυσκολία. Επίσης, τα μακρομόρια και οι μεγαλομοριακές ενώσεις συναντούν μεγαλύτερες δυσκολίες στη μετακίνησή τους λόγω του αυξημένου όγκου ή του μοριακού βάρους τους.

Από την παραπάνω συζήτηση, γίνεται κατανοητό ότι ο ρόλος των βιολογικών μεμβρανών στη διέλευση και μεταφορά των φαρμακευτικών μορίων είναι πολύ σημαντικός. Οι μηχανισμοί διέλευσης των μεμβρανών διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

- Στους ενεργητικούς μηχανισμούς, στους οποίους ανήκουν η ενεργητική μεταφορά, η διευκολυόμενη διάχυση και η ενδοκυττάρωση.
- Στους παθητικούς μηχανισμούς στους οποίους συγκαταλλέγονται η διήθηση και η διάχυση.
 - **Ενεργητική μεταφορά:** Είναι λειτουργία η οποία απαιτεί ενέργεια, επειδή μπορεί να γίνει και αντίθετα προς τη συγκέντρωση του φαρμάκου. Για τη διαδικασία αυτή κρίνεται επιτακτική η ύπαρξη ενός λιποδιαλυτού μορίου στη μεμβράνη, που δρα ως φορέας του φαρμάκου. Μετά τη μεταφορά στην εσωτερική επιφάνεια του κυττάρου, ο ελεύθερος φορέας γυρίζει στην εξωτερική επιφάνεια για να παραλάβει ένα καινούριο φαρμακευτικό μόριο κ.ο.κ. Η διαδικασία αυτή είναι σημαντικός μηχανισμός για την απορρόφηση υδατοδιαλυτών φαρμάκων στο έντερο και για την απέκκριση τους στη χολή και τα ούρα.

- **Διευκολυνόμενη διάχυση:** Ο μηχανισμός αυτός αφορά κυρίως υδατάνθρακες και αμινοξέα αλλά και φαρμακευτικά μόρια που είναι παράγωγα αυτών. Απαιτεί κατανάλωση ενέργειας, ενώ κρίνεται απαραίτητη η παρουσία ενός μεμβρανικού φορέα για τη μεταφορά τους μέσω των μεμβρανών.
- **Ενδοκυττάρωση:** Είναι πολύπλοκος μηχανισμός που απαιτεί ενέργεια και διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην απορρόφηση μεγαλομοριακών και μακρομοριακών ουσιών.
- **Διήθηση:** Ο φραγμός των βιολογικών μεμβρανών έχει το χαρακτήρα της βασικής λιποειδικής δομής, όπου συνυπάρχουν ταυτόχρονα με το λιπιδικό τμήμα και πόροι με υδρόφιλο τοίχωμα. Κατά τη διαδικασία αυτή, οι υδατοδιαλυτές ουσίες περνούν μέσα από τους πόρους λόγω της υδροστατικής ή της ωσμωτικής πίεσης των βιολογικών μεμβρανών.
- **Διάχυση:** Αποτελεί τον πιο κοινό τρόπο διακίνησης και μεταφοράς των λιποδιαλυτών φαρμακευτικών μορίων μέσω των κυτταρικών και βιολογικών μεμβρανών. Δεν απαιτεί καθόλου κατανάλωση ενέργειας και ακολουθεί το νόμο του Fick, ο οποίος δίνεται από τη σχέση:

$$D = K \frac{A(C_1 - C_2)}{d} \quad (1.1)$$

όπου D είναι ο βαθμός διάχυσης, A η επιφάνεια της βιολογικής μεμβράνης που συμμετέχει στη διάχυση, C_1 και C_2 η διαφορά των συγκεντρώσεων στα δύο διαμερίσματα που χωρίζει η μεμβράνη, d το πάχος της μεμβράνης και K η σταθερά διάχυσης της ουσίας – φαρμακευτικού μορίου που εξαρτάται από τη θερμοκρασία, το μοριακό βάρος, τη μοριακή δομή, τη λιποδιαλυτότητα και το βαθμό ιοντισμού της ουσίας.

1.2 Γενικές γνώσεις για τα Φάρμακα [10]

Φάρμακο ονομάζεται κάθε ουσία που μπορεί να μεταβάλλει τις ιδιότητες ενός βιολογικού υποστρώματος. Το φάρμακο αποτελείται από το φαρμακομόριο ή βιοδραστικό μόριο και τα “έκδοχα” τα οποία επιλέγονται ορθολογικά, αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους σε βαθμό που οι φυσικές και οι χημικές τους ιδιότητες καθορίζουν, με σκοπό τη μεγιστοποίηση της αποτελεσματικότητας του προϊόντος που θα χρησιμοποιηθεί για να βελτιώσει ή να επαναφέρει τις φυσιολογικές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού με βασική προϋπόθεση την ασφάλεια του ασθενούς. Τα φάρμακα αξιοποιούνται από την Ιατρική για την πρόληψη, τη διάγνωση και τη θεραπεία των διάφορων νόσων. Η μελέτη των φαρμακολογικών ιδιοτήτων μιας ουσίας βασίζεται σε γνώσεις Φυσικοχημείας, Φαρμακευτικής Χημείας, Βιοχημείας, Φυσιολογίας, Βιολογίας και Γενετικής.

Βιοδιαθεσιμότητα ενός φαρμάκου ονομάζεται το ποσοστό της δόσης ενός φαρμάκου που τελικώς θα εισέλθει στη συστηματική κυκλοφορία. Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα είναι:

- Η αποσάθρωση και η διάλυση του φαρμάκου στα πεπτικά υγρά
- Η διατροφή
- Το μέγεθος του δισκίου ή των κόκκων του περιεχομένου μιας κάψουλας
- Η ποιοτική τυποποίηση των συνθηκών παρασκευής μιας συγκεκριμένης φαρμακοτεχνικής μορφής.

1.2.1 Τρόποι χορήγησης φαρμάκων [10]

Ο συνηθέστερος τρόπος χορήγησης των φαρμάκων είναι από το πεπτικό σύστημα, με σκοπό την εντερική απορρόφηση ή την είσοδο στην κυκλοφορία του αίματος από το βλεννογόνο του στόματος ή το βλεννογόνο του ορθού. Η παρεντερική χορήγηση φαρμάκων αφορά συνήθως την ενδομυϊκή, την

ενδοφλέβια και την υποδόρια ένεση. Σπανίως υπάρχει ανάγκη ενδοδερμικής, ενδοπλευρικής ή ενδοαρτηριακής ένεσης.

1.2.1.1 Χορήγηση των φαρμάκων από το πεπτικό σύστημα [10]

Η λήψη των φαρμάκων με κατάποση παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, από τα οποία τα βασικότερα είναι τα παρακάτω:

- Είναι ανώδυνη και εύκολη
- Η διάλυση του φαρμάκου διευκολύνεται λόγω των άφθονων πεπτικών εκκρίσεων, ενώ οι μεταβολές του pH κατά μήκος της πεπτικής οδού παρέχουν κατάλληλο περιβάλλον για την απορρόφηση πρακτικώς όλων των φαρμάκων.
- Η μεγάλη κινητικότητα, η μεγάλη επιφάνεια και η άφθονη αιμάτωση του βλεννογόνου, διευκολύνουν πολύ την απορρόφηση ενός φαρμάκου.
- Ο ρυθμός απορρόφησης μπορεί να μεταβληθεί ανάλογα με τη φαρμακοτεχνική μορφή.
- Η σχετικά αργή απορρόφηση από το πεπτικό σύστημα, βοηθά σε περίπτωση λάθους τη δυνατότητα έγκαιρης επέμβασης.
- Έχει χαμηλό κόστος, επειδή δεν απαιτούνται στείρες συνθήκες κατά την παρασκευή και τη χορήγηση του φαρμάκου.

Η χορήγηση μέσω του πεπτικού συστήματος εμφανίζει και τα παρακάτω μειονεκτήματα:

- Πολλές ουσίες διασπώνται από τα πεπτικά υγρά όπως η αδρεναλίνη και η ισταμίνη.
- Η μεταβολική αδρανοποίηση της φαρμακευτικής ουσίας στο ήπαρ.
- Η τροφή ή η παρουσία άλλων φαρμάκων μπορεί να επιβραδύνει την απορρόφηση ή και να την εμποδίσει ολοσχερώς.
- Επηρεάζεται από την κατάσταση του ασθενούς.

1.2.1.2 Παρεντερική χορήγηση των φαρμάκων [10]

Η παρεντερική χορήγηση των φαρμάκων διακρίνεται σε ενδοφλέβια, ενδομυϊκή, υποδόρια, τοπική εφαρμογή στο δέρμα και εισπνοές. Παρακάτω αναφέρονται τα γενικά χαρακτηριστικά της καθεμιάς ξεχωριστά.

- *Ενδοφλέβια.* Πλεονεκτήματα της ενδοφλέβιας χορήγησης είναι η ακρίβεια της δοσολογίας και η ταχύτητα άφιξης του φαρμάκου στα σημεία δράσης. Με την ένεση εξασφαλίζεται γραμμική κινητική απορρόφησης, επειδή όλο το ποσό της δόσης εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος. Η διάρκεια της ένεσης πρέπει να είναι τουλάχιστον ένα λεπτό, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα ανάμιξης του φαρμάκου με τον ολικό όγκο του αίματος. Μειονεκτήματα της ενδοφλέβιας ένεσης είναι η πιθανότητα εμβολής, η δημιουργία θρόμβου και η εμφάνιση αλλεργικών αντιδράσεων.
- *Ενδομυϊκή.* Μετά την ενδομυϊκή χορήγηση, η απορρόφηση του φαρμάκου γίνεται μετά από 10 – 30 λεπτά. Παράγοντες που επιδρούν στην απορρόφηση είναι η αιμάτωση στο σημείο ένεσης, οι φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου (λιποδιαλυτότητα, βαθμός ιονισμού και μοριακό βάρος), καθώς και ο όγκος και η ωσμωτικότητα του διαλύματος. Οι μικρές ενώσεις εισέρχονται άμεσα στα τριχαιδία του αίματος ενώ οι μεγάλες περνούν στο αίμα μέσω των λεμφαγγείων. Το φάρμακο μπορεί να δοθεί σε τέτοια μορφή ώστε η απορρόφησή του να διαρκεί ημέρες. Μειονέκτημα της χορήγησης αυτής είναι ο πόνος, ο περιορισμένος όγκος της ένεσης και ο πιθανός κίνδυνος τοπικού ερεθισμού ή τοπικής μόλυνσης (απόστημα).
- *Υποδόρια.* Η απορρόφηση είναι το ίδιο γρήγορη και εξαρτάται από τους ίδιους παράγοντες με την ενδομυϊκή χορήγηση. Τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα είναι περίπου τα ίδια και σε αυτήν την περίπτωση. Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί η υποδόρια εμφύτευση ειδικών δισκίων για τη μακροχρόνια χορήγηση κάποιου φαρμάκου. Ανάλογα με το σχήμα του δισκίου, μπορεί να τροποποιηθεί η ταχύτητα

απελευθέρωσης του δραστικού συστατικού και ο ρυθμός εισόδου στην κυκλοφορία.

- *Τοπική εφαρμογή στο δέρμα.* Η διαπερατότητα του δέρματος ποικίλλει από άτομο σε άτομο, καθώς και από περιοχή σε περιοχή στο ίδιο το άτομο. Φραγμός στις περιπτώσεις αυτές είναι οι επιφανειακές στιβάδες της κερατίνης που διαθέτει η επιδερμίδα. Η απορρόφηση όμως των ουσιών είναι δυνατή αφού το δέρμα σε αυτές τις περιπτώσεις είναι τραυματισμένο.
- *Εισπνοές.* Αφορούν φάρμακα τα οποία προορίζονται είτε για τοπική δράση στο αναπνευστικό σύστημα είτε για συστηματική δράση ως αναισθητικά. Κατά τη χορήγηση αυτή θα πρέπει το μέγεθος των σταγονιδίων να μην ξεπερνά το 1μ σε διάμετρο, γιατί διαφορετικά εγκλωβίζεται στο βρογχικό δέντρο και δεν φτάνει στις κυψελίδες. Ορισμένα εισπνεόμενα διατίθενται με λεπτοκοκκιώδη μορφή, μέσα σε ειδικές κάψουλες που θρυμματίζονται και εισπνέονται ως στερεό εκνέφωμα.

1.2.2 Φαρμακοτεχνικές μορφές χορήγησης των φαρμάκων [10]

Τα περισσότερα φάρμακα κυκλοφορούν στο εμπόριο ως 'φαρμακοτεχνικά σκευάσματα' ή 'ιδιοσκευάσματα' με τη μορφή μίγματος δραστικών συστατικών και αδρανών εκδόχων. Αρκετά συχνά το δραστικό συστατικό διατίθεται με πολλά εμπορικά ιδιοσκευάσματα ίδιας μορφής ή διαφορετικών μορφών. Η φαρμακοτεχνική μορφή καθώς και τα έκδοχα έχουν ως στόχο, να καταστήσουν το φάρμακο περισσότερο εύληπτο και αποτελεσματικό, δηλαδή να βελτιώσουν τις οργανοληπτικές του ιδιότητες. Οι συνηθέστερες μορφές των φαρμάκων είναι οι παρακάτω:

- *Δισκία.* Εκτός από τα δραστικά συστατικά, συχνά επιβάλλεται η παρουσία εκδόχων που αυξάνουν τον όγκο ή βελτιώνουν τη γεύση. Όταν το φάρμακο ερεθίζει το στομάχι ή αδρανοποιείται από τα γαστρικά υγρά, χρησιμοποιούνται ειδικά έκδοχα επικάλυψης, που επιτρέπουν τη διάλυση του δισκίου, μόνο μέσα στον εντερικό αυλό.

- *Κάψουλες*. Η δραστική ουσία περιέχεται σε ειδικό περίβλημα από τη ζελατίνη, το οποίο επικαλύπτει τυχόν δυσάρεστη γεύση και επιτρέπει βαθμιαία διάλυση μέσα στα πεπτικά υγρά ή μόνο μέσα στα εντερικά υγρά. Όταν επιδιώκεται παρατεταμένη ενέργεια, το περιεχόμενο παρασκευάζεται σε μεγαλοκοκκιώδη μορφή.
- *Υπόθετα*. Προορίζονται συνήθως για συστηματική απορρόφηση, οπότε τοποθετούνται στον ορθό για την αποφυγή του φαινομένου της αρχικής διάβασης. Σπανιότερα, επιδιώκεται τοπική δράση στο ορθό ή στον κόλπο.
- *Εναιωρήματα*. Προκύπτουν από αδιάλυτα δραστικά συστατικά και πρέπει να ανακατεύονται καλά πριν από κάθε χρήση. Συνήθως προορίζονται για εσωτερική λήψη.
- *Απλά Διαλύματα*. Είναι διαυγή διαλύματα και εφαρμόζονται τοπικά για πλύσεις του δέρματος και των βλεννογόνων ή προορίζονται για συστηματική χορήγηση ως έχουν ή ως συμπυκνώματα.
- *Σιρόπια*. Είναι απλά διαυγή διαλύματα σακχαρώζης ή άλλων γλυκαντικών ουσιών για τη βελτίωση της γεύσης.
- *Βάμματα*. Είναι απλά διαλύματα στα οποία οι δραστικές ουσίες διαλύονται ή εκχυλίζονται μέσα σε αιθανόλη. Ως βάμματα συνήθως χρησιμοποιούνται αντισηπτικά διαλύματα για τοπική εφαρμογή στο δέρμα ή τους βλεννογόνους.
- *Ενέσιμα διαλύματα*. Διατίθενται αμπούλες, οι οποίες εκτός από τις δραστικές ουσίες περιέχουν και κατάλληλες αποστειρωτικές ή αντιοξειδωτικές ενώσεις.
- *Οφθαλμικά διαλύματα*. Είναι διαλύματα στείρα μικροβίων και ισότονα με τα δάκρυα.
- *Αλοιφές*. Προκύπτουν από ανάμειξη των δραστικών συστατικών με κατάλληλα ημίρευστα υποστρώματα. Όταν τα έκδοχα είναι υδρόφιλες ουσίες χαρακτηρίζονται ως κρέμες. Προορίζονται για τοπικές επαλείψεις στο δέρμα και τους βλεννογόνους.
- *Εμποτισμένα αυτοκόλλητα*. Είναι συστήματα σταδιακής αποδέσμευσης του δραστικού συστατικού από ένα εμποτισμένο αδρανές υλικό που

επικολλάται στο δέρμα. Στόχος είναι η δράση στους ιστούς ή και η συστηματική απορρόφηση με την κυκλοφορία του αίματος.

- *Εισπνεόμενα.* Οι δραστικές ουσίες εισπνέονται ώστε να δράσουν στο αναπνευστικό δένδρο ή να απορροφηθούν για συστηματική ενέργεια.

1.2.3 Μεταβολισμός των φαρμάκων [10]

Οι ουσίες του φυσικού περιβάλλοντος του ανθρώπου που είναι ξένες προς τον ενδιάμεσο μεταβολισμό οδήγησαν στην προοδευτική ανάπτυξη πολύπλοκων ενζυμικών συστημάτων για την απομάκρυνσή τους. Σε αυτή την κατηγορία ουσιών υπάγονται και τα φάρμακα επειδή δεν ενσωματώνονται στο μεταβολισμό του κυττάρου για την παραγωγή ενέργειας. Οι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν το μεταβολισμό των φαρμάκων είναι οι παρακάτω [10]:

- Η **χημική δομή** καθορίζει την πιθανότερη μεταβολική οδό, καθώς και το βαθμό αδρανοποίησης και αποβολής. Πρέπει να σημειωθεί, ότι η ίδια η ουσία μπορεί να ακολουθήσει περισσότερες από μια μεταβολικές οδούς. Το ίδιο ισχύει και για τους μεταβολίτες που θα προκύψουν από την πορεία βιομετατροπής.
- Η **δόση και η συχνότητα χορήγησης** του φαρμάκου εμπεριέχουν τη δυνητική πρόκληση κορεσμού των μεταβολικών οδών, με τελικό αποτέλεσμα την επαγωγή των ενεχόμενων ενζύμων.
- Η **οδός χορήγησης**, δηλαδή το πέρασμα από τον εντερικό βλεννογόνο και το ήπαρ που έχουν μεγάλη μεταβολική ικανότητα.
- **Ατομικοί παράγοντες** όπως γενετικοί (έλλειψη ενός ενζύμου), ασθένειες (νεφροπάθεια), εγκυμοσύνη (παραγωγή ενδογενών ορμονών), ηλικία, γένος, εντερική χλωρίδα.
- **Περιβαλλοντικοί παράγοντες** όπως η ποιότητα διατροφής, επιβάρυνση του οργανισμού με ξένες ουσίες και προηγούμενη αναστολή ενζύμων.

1.3 Μεθοδολογίες που εφαρμόζονται στην εξέταση των ιδιοτήτων των βιολογικών μεμβρανών και των αλληλεπιδράσεων μεμβρανών – φαρμάκων

Όταν απαιτείται ο προσδιορισμός των ιδιοτήτων των βιολογικών μεμβρανών αλλά κυρίως ο χαρακτηρισμός των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μεμβρανών και των φαρμακευτικών μορίων, δεν υπάρχει καμιά απλή τεχνική που να μπορεί να δώσει συνήθως όλες τις πληροφορίες που χρειάζονται για την ανάλυση του πολύπλοκου συστήματος όπως είναι οι μεμβράνες. Γι' αυτό συνήθως χρησιμοποιούνται συμπληρωματικές τεχνικές για την επίτευξη αυξημένης γνώσης του συστήματος που μελετάται.

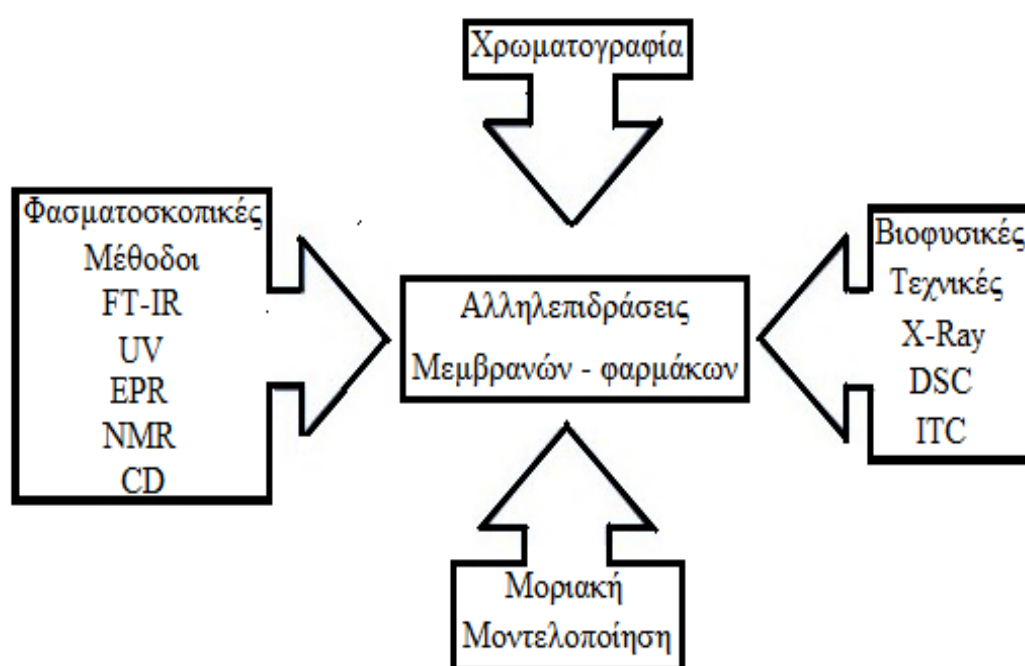
Τέτοιες παράμετροι που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό των αλληλεπιδράσεων αυτών είναι:

- ο τοπογραφικός προσδιορισμός του φαρμάκου, δηλαδή η θέση στην οποία απαντάται το φάρμακο μέσα στη βιολογική μεμβράνη
- η διευθέτηση και η μοριακή δομή που λαμβάνει το φάρμακο όταν εισέρχεται αυτό μέσα στη βιολογική μεμβράνη
- η θερμική συμπεριφορά που επιδεικνύει η βιολογική μεμβράνη μετά την εισδοχή του φαρμακευτικού μορίου
- η κινητική και θερμική σταθερότητα των βιολογικών μεμβρανών
- οποιαδήποτε χημική τροποποίηση μπορεί να προκαλέσει η είσοδος του φαρμάκου στις βιολογικές μεμβράνες

Για τον προσδιορισμό του τρόπου αλληλεπίδρασης των φαρμακευτικών μορίων με τις βιολογικές μεμβράνες, έχουν αναπτυχθεί διάφορες εφαρμογές των αναλυτικών τεχνικών (Σχ. 1.10) οι οποίες και θα αναλυθούν σε συντομία παρακάτω:

- **Φασματοσκοπικές τεχνικές:** Οι φασματοσκοπίες UV – Vis (ορατού – υπεριώδους) [11-12], FTIR (υπερύθρου) πολωμένες και μη πολωμένες [13-14], CD (κυκλικός διχρωισμός) [15-16] και FT-Raman [17-18] δίνουν πολλές πληροφορίες για τον τρόπο αλληλεπίδρασης των φαρμάκων με τις βιολογικές μεμβράνες. Στις FT τεχνικές προσδιορίζονται οι αλλαγές στη θέση, το πάχος και την ένταση των παρατηρούμενων κορυφών λόγω εισδοχής του φαρμακευτικού μορίου και οι οποίες σχετίζονται με τον

τοπογραφικό προσδιορισμό του φαρμάκου. Επίσης, προσδιορίζονται οι θέσεις των παρατηρούμενων κορυφών των μεθυλίων και μεθυλενίων των αλειφατικών αλυσίδων των λιπιδίων, καθών και ο λόγος των εντάσεων των κορυφών αυτών σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία. Σκοπός των παραπάνω τεχνικών είναι ο προσδιορισμός των αλλαγών που επιφέρει η εισδοχή του φαρμάκου στη δομή και τη συμπεριφορά της βιολογικής μεμβράνης. Στην UV – Vis, προσδιορίζεται η ποσότητα του φαρμάκου η οποία εισέρχεται στη βιολογική μεμβράνη αλλά και η θέση στην οποία προσκολλάται αυτό. Στην περίπτωση του κυκλικού διχρωισμού, μελετώνται οι μεταπτώσεις $\pi-\pi^*$ και $n-\pi^*$, οι οποίες δίνουν πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις ηλεκτροστατικής φύσης που καθορίζουν τον τοπογραφικό προσδιορισμό του φαρμάκου μέσα στη βιολογική μεμβράνη.



Σχήμα 1.10: Διάγραμμα ροής των πληροφοριών των εφαρμοζόμενων τεχνικών στη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεμβρανών – φαρμάκων.

- **Φθορισμομετρικές τεχνικές:** Χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της σταθερότητας και της ευκινησίας των βιολογικών μεμβρανών. Η είσοδος ενός φαρμακευτικού μορίου στις πολικές κεφαλές ή στον λιπιδικό πυρήνα, σταθεροποιεί ή αποσταθεροποιεί τη βιολογική μεμβράνη με αποτέλεσμα να μειώνεται ή αυξάνεται αντίστοιχα ο φθορισμός. Με βάση την αλλαγή στο φθορισμό της μεμβράνης, γίνεται ο τοπογραφικός προσδιορισμός του φαρμάκου σε αυτή [19,20].
- **Κρυσταλλογραφικές τεχνικές:** Στις τεχνικές αυτές γίνεται ποιοτική ανάλυση των αλλαγών που υφίσταται η βιολογική μεμβράνη. Μετρούνται η απόσταση κεφαλής – κεφαλής και αλυσίδας – αλυσίδας των λιπιδίων καθώς και το πάχος των μεμβρανών. Τα ποιοτικά αυτά χαρακτηριστικά δίνουν πληροφορίες για τη σταθερότητα της μεμβράνης, αλλά δίνουν και ενδείξεις για τον τοπογραφικό προσδιορισμό του φαρμάκου στη βιολογική μεμβράνη [21,22].
- **Θερμικές τεχνικές:** Στις τεχνικές αυτές προσδιορίζεται η θερμική συμπεριφορά της βιολογικής μεμβράνης πριν και μετά την είσοδο συγκεκριμένης αναλογίας (ποσότητας) φαρμάκου σε αυτήν. Παρατηρείται η αλλαγή στον πολυμορφισμό των βιολογικών μεμβρανών καθώς και οι θερμοκρασίες στις οποίες συμβάνουν οι μεταβάσεις από τη μια φάση στην άλλη. Επίσης, μελετώμενη παράμετρος είναι και η απαιτούμενη ενέργεια (ενθαλπία) για τις μεταβάσεις αυτές. Οι παράμετροι αυτές, δίνουν πληροφορίες για τη σταθερότητα αλλά και τη δομή της μεμβράνης, και σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές προσδιορίζεται η θέση του φαρμάκου [23,24].
- **Φασματοσκοπίες Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού:** Με τις τεχνικές αυτές γίνεται ο τοπογραφικός προσδιορισμός του φαρμακευτικού σκευάσματος. Μετρώντας τις αλλαγές που λαμβάνουν χώρα στις συζεύξεις των ιδιοπεριστροφών (spin – spin coupling) και τους χρόνους εφησυχασμού της λιπιδικής διπλοστιβάδας απουσία και παρουσία φαρμακευτικού μορίου ,

λαμβάνονται πληροφορίες για τη θέση του φαρμάκου στη βιολογική μεμβράνη. Ανάλογα με το είδος της φασματοσκοπίας π.χ ^1H , ^2H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P , ^{15}N και ^{17}O , εξετάζεται και διαφορετικό τμήμα της βιολογικής μεμβράνης που επηρεάζεται από την εισδοχή του φαρμακευτικού μορίου. Η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού τόσο σε στερεή κατάσταση όσο και σε υγρή μπορεί να δώσει πληροφορίες για την τοπική διαταραχή που μπορεί να προκαλέσει ένα φαρμακευτικό μόριο στη μεμβράνη. Είναι δηλαδή η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού μία φασματοσκοπία της οποίας η χρήση επιτρέπει να κατανοηθούν οι αλληλεπιδράσεις φαρμακευτικών μορίων με λιπιδικές διπλοστιβάδες σε ατομικό επίπεδο [25,26].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

2.1. Πειραματικές Μέθοδοι

2.1.1. Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC)

2.1.1.1 Εισαγωγή

Με τον όρο **Θερμική Ανάλυση** εννοούμε σύμφωνα με την I.C.T.A. (International Confederation for Thermal Analysis) το σύνολο των τεχνικών στις οποίες μετρώνται οι φυσικές ιδιότητες καθώς και τα προϊόντα αντιδράσεων μιας ουσίας, σε συνάρτηση με την θερμοκρασία ή τον χρόνο, όταν η ουσία αυτή υποβάλλεται σε ένα πρόγραμμα ελέγχου αύξησης ή μείωσης της θερμοκρασίας αυτής [27].

Με την τεχνική αυτή μπορούν να προσδιοριστούν μεταβολές σε μεγέθη όπως η ενθαλπία, η θερμοχωρητικότητα, ο συντελεστής θερμικής διαστολής, η μάζα, το μέτρο ελαστικότητας, οι οπτικές και ακουστικές ιδιότητες ενός υλικού στη στερεά ή την υγρή φάση. Ειδικότερα στη στερεά κατάσταση με τη μέθοδο της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σαρώσεως εξετάζονται οι μεταβολές φάσεων, η κρυστάλλωση, το σημείο υαλώδους μετάπτωσης κ.ά.

Τα μετρούμενα μεγέθη καταγράφονται σε συνάρτηση με το χρόνο ή τη θερμοκρασία, η οποία προγραμματίζεται σε συγκεκριμένες συνθήκες πίεσης. Το πρόγραμμα μπορεί να περιλαμβάνει θέρμανση ή ψύξη του εξεταζόμενου υλικού με συγκεκριμένο ρυθμό μεταβολής της θερμοκρασίας ή με σταθερή θερμοκρασία ή ακόμα και συνδυασμό αυτών. Κατά τη διαδικασία αυτή, η δομή

και η χημική σύσταση του σώματος υφίστανται αλλαγές φάσης όπως η τήξη, η κρυστάλλωση, η οξείδωση και η αποσύνθεση.

Η θερμική ανάλυση περιλαμβάνει πολλές τεχνικές, από τις οποίες επιλέγεται η πλέον κατάλληλη για τον έλεγχο του φυσικού μεγέθους που επιθυμείται να μετρηθεί. Μερικές από αυτές είναι:

A) DTA (Differential Thermal Analysis) – Διαφορική Θερμική Ανάλυση.

Με την τεχνική αυτή μετρείται η διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ του προς μέτρηση δείγματος και του δείγματος αναφοράς σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία και συνεπώς επιτρέπεται η παρακολούθηση των μεταβολών στη θερμοχωρητικότητα του υλικού. Η DTA μέθοδος επιτρέπει τη μελέτη των μεταβολών αυτών για όλες τις κατηγορίες υλικών.

B) DSC (Differential Scanning Calorimetry) – Διαφορική Θερμιδομετρία Σαρώσεως. Με τη μέθοδο αυτή εκτιμώνται ποσοτικά οι μεταβολές της ενθαλπίας του δείγματος σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία ή το χρόνο.

Γ) TGA (Thermogravimetric Analysis) – Θερμοσταθμική Ανάλυση. Με τη μέθοδο αυτή καταγράφεται η μεταβολή της μάζας ενός υλικού σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία ή το χρόνο.

Δ) TMA (Thermomechanical Analysis) – Θερμομηχανική Ανάλυση. Με τη μέθοδο αυτή καταγράφεται η μεταβολή των μηχανικών ιδιοτήτων των υλικών με τη μεταβολή θερμοκρασίας χωρίς την εφαρμογή μηχανικής τάσης. Αντίστοιχα υπάρχει και η μέθοδος **DMTA (Dynamic Mechanical Thermal Analysis) – Δυναμική Θερμική Μηχανική Ανάλυση**, η οποία καταγράφει τις ίδιες μεταβολές με την επίδραση μηχανικής τάσης [27].

Τα πλεονεκτήματα των θερμικών μεθοδών ανάλυσης, έναντι των υπολοίπων, είναι τα παρακάτω:

- Είναι ταχείες και ακριβείς και δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερες πειραματικές δυσκολίες.
- Έχει αναπτυχθεί κατάλληλη οργανολογία.
- Απαιτείται μικρή ποσότητα δείγματος (μερικά mg).

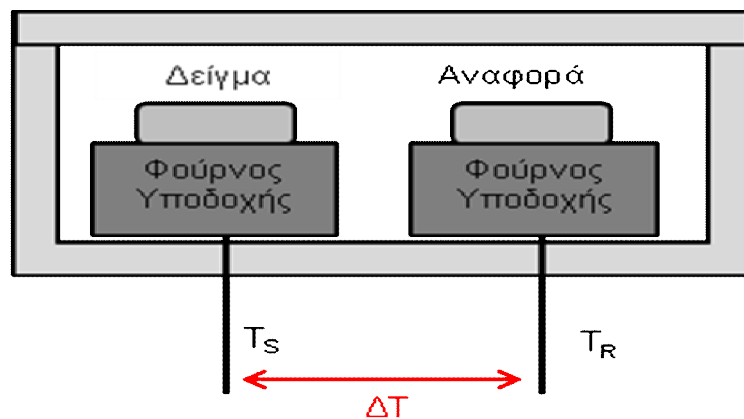
- Μπορούν να ληφθούν πολλές πληροφορίες, όπως για παράδειγμα η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, ο βαθμός κρυσταλλικότητας, η θερμοχωρητικότητα κ.α.

Από τα παραπάνω γίνεται εύκολα κατανοητό ότι οι θερμικές μέθοδοι ανάλυσης αποτελούν μια από τις σημαντικότερες μεθόδους χαρακτηρισμού ενός υλικού.

Στην παρούσα εργασία για τη μελέτη των μεμβρανών χρησιμοποιήθηκε η Διαφορική Θερμιδομετρία Σαρώσεως (DSC), η οποία είναι από τις βασικότερες τεχνικές θερμικής ανάλυσης.

2.1.1.2 Λειτουργία της τεχνικής DSC

Το σύστημα DSC αποτελείται από δύο χώρους S και R για το υπό εξέταση δείγμα και το δείγμα αναφοράς αντίστοιχα. Οι δύο αυτοί χώροι θερμαίνονται ανεξάρτητα από δύο αντιστάσεις. Το σύστημα έχει την ικανότητα να εξισώνει τις θερμοκρασίες του δείγματος με το δείγμα αναφοράς αν συμβεί αύξηση ή μείωση της θερμοκρασίας ενός από των δύο χώρων, με την ενεργοποίηση μιας ηλεκτρικής αντίστασης εισόδου (Σχ. 2.1). Ταυτόχρονα καταγράφεται στον υπολογιστή ένα ηλεκτρικό σήμα με τη μορφή κορυφής με μέγεθος ανάλογο του ποσού ενέργειας που προσφέρεται στο δείγμα προκειμένου να διατηρηθεί η θερμοκρασία του χώρου του δείγματος T_S , στην ίδια θερμοκρασία με αυτή του χώρου αναφοράς T_R . Έτσι προκύπτει τελικά το θερμογράφημα το οποίο αποτελείται από μια ή περισσότερες ενδόθερμες ή εξώθερμες κορυφές ανάλογα με τις μεταβολές που υφίσταται το δείγμα. Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου όπως έχει ήδη προαναφερθεί είναι ότι απαιτείται πολύ μικρή ποσότητα δείγματος της τάξεως των 2-10 mg με αποτέλεσμα η θερμική αντίσταση R ως προς τη θερμική ροή να είναι πολύ μικρή. Συνεπώς το δείγμα αποκρίνεται γρήγορα και η θερμοκρασία του διατηρείται ίδια με αυτή του δείγματος αναφοράς. Για μικρά βάρη δειγμάτων σε καλή θερμική επαφή με την κυψελίδα, η θερμική αντίσταση του δείγματος και της κυψελίδας R_S πρέπει να είναι πολύ μικρή για ένα μέσο ρυθμό σαρώσεως της θερμοκρασίας συγκρινόμενη με την αντίσταση μεταξύ κυψελίδας και υποδοχέα R_O .



Σχήμα 2.1: Σχηματική παράσταση της DSC τεχνικής.

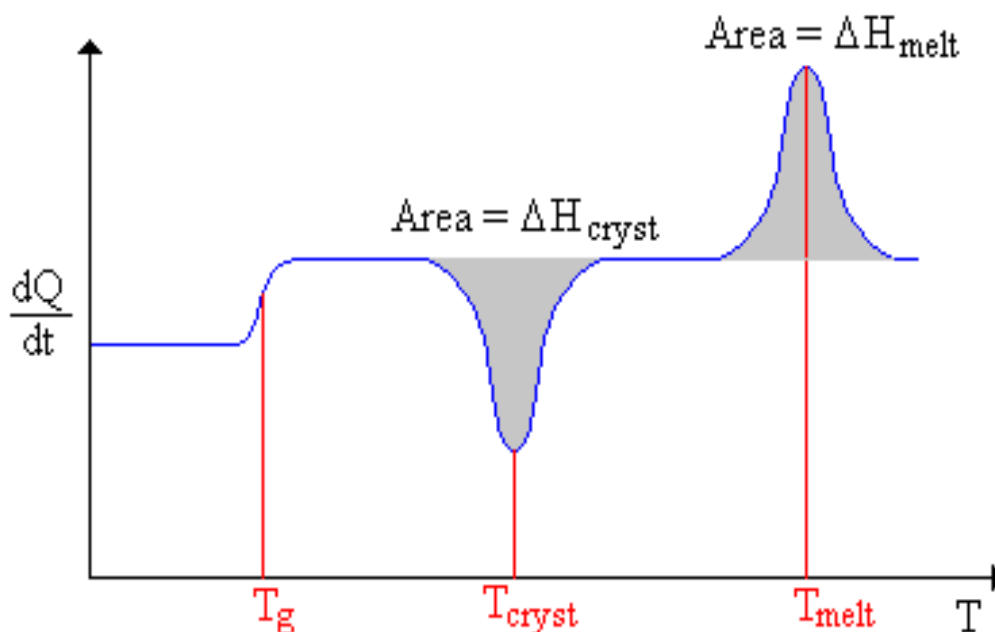
2.1.1.3 Τυπικό θερμογράφημα της τεχνικής DSC

Σε ένα θερμογράφημα DSC, στον άξονα των τετμημένων παριστάνεται η θερμοκρασία T , ενώ στον άξονα των τεταγμένων παριστάνεται η διαφορά θερμικής ισχύος ανάμεσα στους χώρους R και S , dQ/dt . Επειδή ο χρόνος συνδέεται με τη θερμοκρασία μέσω προκαθορισμένου ρυθμού μεταβολής θερμοκρασίας, ο όρος $\left(dQ/dt\right)_p$ ισοδυναμεί με τον όρο $\left(dH/dt\right)_p$ ο οποίος είναι ανάλογος της θερμοχωρητικότητας. Έτσι τελικά παρατηρούνται μεταβολές στη θερμοχωρητικότητα της ουσίας. Οι μονάδες στον άξονα των τεταγμένων είναι mcal/s και στον άξονα των τετμημένων είναι $^{\circ}\text{C}$.

Σύμφωνα με το Σχ. 2.2 παρατηρείται αρχικά μια ασυνέχεια στη γραμμή βάσεως, όταν το υλικό βρίσκεται στη **θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g)**. Η μεταβολή αυτή είναι δευτέρας τάξεως και δε συνοδεύεται από μεταβολή της ενθαλπίας και της εντροπίας του συστήματος, οπότε παρατηρείται τελική αύξηση της **θερμοχωρητικότητας** του υλικού (C_p).

Στη συνέχεια εμφανίζεται μια εξώθερμη μεταβολή στη **θερμοκρασία ψυχρής κρυστάλλωσης (T_{Cryst})** η οποία παριστάνεται με καθοδική απόκλιση από τη γραμμή βάσης και αντιπροσωπεύει ελάττωση της θερμοχωρητικότητας. Τέλος

η ενδόθερμη μεταβολή αντιστοιχεί στη **θερμοκρασία τήξης (T_{melt})**, παριστάνεται από ανοδική απόκλιση και συνοδεύεται από την αύξηση της θερμοχωρητικότητας.



Σχήμα 2.2: Τυπικό θερμογράφημα DSC πολυμερικής ουσίας.

Η τήξη και η κρυστάλλωση είναι μεταβολές πρώτης τάξεως και χαρακτηρίζονται από μεταβολή της εντροπίας και της ενθαλπίας του συστήματος. Η μεταβολή της ενθαλπίας υπολογίζεται από το εμβαδόν της καμπύλης της κορυφής η οποία εμφανίζεται στο εκάστοτε θερμογράφημα.

2.1.1.4 Θερμικές μεταβολές που παρατηρούνται στην τεχνική DSC

Οι κυριότερες μεταβολές οι οποίες παρατηρούνται κατά τη θέρμανση ενός δείγματος με την τεχνική DSC [28,29] είναι οι παρακάτω:

- **Τήξη:** Η τήξη είναι η πιο συνηθισμένη θερμική συμπεριφορά που παρατηρείται με την τεχνική DSC. Τα περισσότερα κρυσταλλικά ή ημικρυσταλλικά υλικά υφίστανται τήξη. Εξαιρέσεις μπορούν να

υπάρξουν εάν το υλικό από τη στερεά κατάσταση μεταβεί στην αέρια φάση ή αποσυντίθεται πριν φτάσει στη θερμοκρασία τήξεως T_m . Στο θερμογράφημα η τήξη εμφανίζεται ως μια οξεία ενδόθερμη κορυφή και το εμβαδόν κάτω από την κορυφή τήξης δίνει απευθείας την ενθαλπία τήξεως του υλικού όπως έχει ήδη αναφερθεί. Η θέση, η μορφή και η οξύτητα της καμπύλης τήξεως εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, όπως η καθαρότητα και το είδος του υλικού καθώς και η κρυσταλλική τελειότητα. Για παράδειγμα η παρουσία ακαθαρσιών στο υλικό μειώνει το σημείο τήξεως και μεγαλώνει το εύρος της κορυφής [28]. Η θερμοκρασία στην οποία γίνεται η τήξη, σχετίζεται άμεσα με την ενέργεια που απαιτείται για να συντελεστεί. Έτσι λοιπόν υλικά που έχουν δεσμούς ή δυνάμεις αλληλεπιδράσεως στον κρύσταλλο, χρειάζονται μεγάλη ενέργεια για να τακούν και έχουν υψηλότερες θερμοκρασίες τήξεως. Αντίθετα, υλικά όπως μικρά μόρια όπου οι δυνάμεις αλληλεπίδρασης είναι ασθενέστερες, απαιτούν μικρότερη ενέργεια και άρα τήκονται σε χαμηλότερη θερμοκρασία. Τέλος οι μη τέλεια ανεπτυγμένοι κρύσταλλοι έχουν μικρότερη θερμοκρασία τήξεως και μπορούν να εξουδετερωθούν από το δείγμα αν θερμανθούν σε μια θερμοκρασία μικρότερη από τη μέγιστη θερμοκρασία τήξεως των τέλειων κρυστάλλων και το δείγμα ψυχθεί απότομα σε χαμηλή θερμοκρασία (ανόπτηση).

- **Κρυστάλλωση:** Η κρυστάλλωση θεωρείται η αντίστροφη πορεία της τήξεως ενός υλικού. Όταν ένα υλικό υποβληθεί σε ελεγχόμενη ψύξη από το τήγμα, τότε αυτό κρυσταλλώνεται και εμφανίζεται ως ένα ισχυρό εξώθερμο φαινόμενο. Αν η κρυστάλλωση είναι πλήρης τότε οι ενθαλπίες τήξεως και κρυσταλλώσεως είναι ίδιες. Τα περισσότερα όμως υλικά δεν κρυσταλλώνονται πλήρως ή και καθόλου. Το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται και σε οργανικά υλικά και σε πολυμερικά, στα οποία η κρυστάλλωση περνά αρχικά από το στάδιο της πυρήνωσης (nucleation), όπου σχηματίζονται τα κέντρα ή πυρήνες κρυστάλλωσης, και ακολουθεί το στάδιο της ανάπτυξης ή αύξησης των κρυστάλλων (growth) [29]. Η κρυστάλλωση μεγαλομοριακών ενώσεων είναι μια πολύπλοκη διαδικασία καθώς το μέγεθος των κρυστάλλων εξαρτάται από την ταχύτητα ψύξης και τη θερμική ιστορία του υλικού,

επομένως η τήξη τους δεν παρατηρείται στην ίδια θερμοκρασία. Γενικά ο ρυθμός ψύξεως πρέπει να είναι μικρός, γιατί σε περίπτωση που είναι υψηλότερος από κάποια συγκεκριμένη τιμή, υπάρχει κίνδυνος να μετατραπεί ένα μεγάλο μέρος του τήγματος σε άμορφο υλικό. Σε μια τέτοια περίπτωση αν επακολουθήσει τήξη, έχουμε αναδιοργάνωση του άμορφου μέρους προς σταθερότερες μορφές, οπότε σχηματίζονται κρύσταλλοι και εκλύεται θερμότητα. Κάτι τέτοιο έχει ως αποτέλεσμα στο θερμογράφημα να υπάρξει μια εξώθερμη κορυφή πριν από το σημείο τήξεως (ψυχρή κρυστάλλωση).

- **Υαλώδης μετάπτωση:** Όταν ένα υλικό μεταπίπτει από την υαλώδη στην ιξωδοελαστική ή πλαστική φάση, δηλαδή από τη φάση που είναι σκληρή και εύθραυστη στη φάση που είναι μαλακή και εύκαμπτη, τότε λέμε ότι η θερμοκρασία αυτή ονομάζεται θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g). Εάν το υλικό είναι 100% κρυσταλλικό τότε δε μπορεί να μεταβεί στην ελαστομερική κατάσταση. Όμως δεν υπάρχει 100% κρυσταλλικό πολυμερές οπότε αυτά εμφανίζουν και σημείο υαλώδους μετάπτωσης και σημείο τήξεως. Μοριακές παράμετροι που επηρεάζουν τη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης είναι η ευκαμψία της μακρομοριακής πολυμερικής αλυσίδας, η ισχύς των διαμοριακών δυνάμεων, η ύπαρξη πλαστικοποιητών, το μοριακό βάρος, ο βαθμός δικτύωσης, η κρυσταλλικότητα κ.ά.

2.1.1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν τη μορφή του θερμογραφήματος DSC

Οι κυριότεροι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τη μορφή και τη θέση των παρατηρούμενων φαινομένων σε ένα θερμογράφημα DSC είναι οι παρακάτω:

- **Αντιστάσεις:** Πρόκειται για τις αντιστάσεις στη μεταφορά θερμότητας μεταξύ υποδοχέων και κυψελίδας που τοποθετείται το δείγμα R_0 καθώς και μεταξύ του δείγματος και της κυψελίδας R_S . Ειδικά όσο αφορά την αντίσταση στη μεταφορά θερμότητας μεταξύ υποδοχέων και

κυψελίδας έχειδειχθεί ότι η κλίση dH/dt σε μια μετάπτωση πρώτης τάξεως, συγκεκριμένα μιας ενδόθερμης τήξης καθαρού υλικού, δίνεται από τη σχέση

$$dH/dt = 1/R (dT/dt) \quad (2.1)$$

όπου dT/dt είναι ο ρυθμός σαρώσεως της θερμοκρασίας ο οποίος έχει προεπιλεγεί. Όπως παρατηρείται από την παραπάνω σχέση, ελάττωση της αντιστάσεως αυξάνει την οξύτητα της κορυφής για σταθερό ρυθμό σαρώσεως [30]. Αυτή στην περίπτωση της τεχνικής DSC είναι σταθερή εφόσον χρησιμοποιείται το ίδιο είδος κυψελίδας και αλλάζει μόνο αν αλλάξει το υλικό αυτής. Για την αντίσταση του δείγματος μεγάλορόλο παίζει η καλή επαφή του δείγματος με την κυψελίδα. Έτσι κατά την τοποθέτηση του δείγματος στην κυψελίδα πρέπει να ασκείται η κατάλληλη πίεση, ώστε το δείγμα να έχει τη μεγαλύτερη επιτρεπτή επιφάνεια επαφής. Επίσης στις περιπτώσεις που είναι εφικτό, το δείγμα τήκεται και στη συνέχεια ψύχεται απότομα ώστε να αποκτήσει τη μεγαλύτερη δυνατή επαφή με την κυψελίδα. Με τον τρόπο αυτό γενικά αποφεύγονται φαινόμενα θερμικής αδράνειας, τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα τη λήψη ευρύτερων κορυφών και αύξηση της θερμοκρασίας του μεγίστου της καμπύλης. Η εξάλειψη τέτοιων φαινομένων αυξάνει την ποιότητα και την αξιοπιστία των θερμογραφημάτων [29].

- **Ρυθμός σάρωσης:** Ο ρυθμός σαρώσεως επηρεάζει σημαντικά τη μορφή των θερμογραφημάτων μέσω της σχέσεως (1.1) επιδρώντας στην κλίση και στο εύρος της καμπύλης [31]. Το κάθε υλικό έχει την ιδιότητα να υφίσταται μια μεταβολή σε κάποια συγκεκριμένη θερμοκρασία απορροφώντας ή εκλύοντας θερμότητα με ένα συγκεκριμένο ρυθμό. Αν κατά τη μέτρηση εκλύεται ή απορροφάται θερμότητα, με ρυθμό μεγαλύτερο από αυτόν που απορροφά το δείγμα, τότε η όποια μεταβολή θα παρατηρηθεί σε μεγαλύτερη θερμοκρασία από την κανονική και μάλιστα τόσο μεγαλύτερη όσο μεγαλύτερος είναι ο ρυθμός σαρώσεως. Αντίθετα, αν το φαινόμενο είναι ταχύτερο τότε

αυτό δεν καταγράφεται. Για μεγαλύτερη ακρίβεια συνιστάται συνήθως μικρός ρυθμός σαρώσεως, ενώ για τον προσδιορισμό των σημείων τήξεως ή κρυσταλλώσεως χρησιμοποιείται η λεγόμενη διόρθωση ως προς τη θερμική καθυστέρηση (thermal lag) [32,33]. Πρέπει να τονιστεί, ότι ο αργός ρυθμός σαρώσεως ευνοεί το διαχωρισμό επικαλυπτόμενων κορυφών, μειώνει όμως την ευαισθησία. Αντίθετα, αύξηση της ευαισθησίας επιτυγχάνεται με γρήγορο ρυθμό σαρώσεως, αφού με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η καταγραφή ασθενών μεταβολών μειώνοντας όμως τη δυνατότητα διαχωρισμού επικαλυπτόμενων κορυφών.

- **Είδος υλικού:** Το είδος του υλικού επηρεάζει κυρίως τη μορφή της καμπύλης. Για το λόγο αυτό ένα καθαρό υλικό όπως μια οργανική ουσία ή ένα μέταλλο, δίνει οξεία κορυφή όταν τήκεται. Αντίθετα ένα πολυμερές συνήθως λόγω της κατανομής μοριακών βαρών ή και άλλων παραγόντων, δίνει ευρεία κορυφή. Η καθαρότητα ενός υλικού ή η ύπαρξη προσμίξεων σε αυτό επιδρά στη θέση των καμπυλών. Τέλος η ποσότητα του δείγματος ειδικά στην περίπτωση πολυμερών, μπορεί και αυτή να μεταβάλλει τη μορφή των καμπυλών όπως και η γεωμετρία του συστήματος δείγμα – κυψελίδα [34].
- **Ποσότητα και γεωμετρία δείγματος:** Τέλος η ποσότητα του δείγματος, μπορεί και αυτή να μεταβάλλει τη μορφή των καμπυλών όπως και η γεωμετρία του συστήματος δείγμα – κυψελίδα.

2.1.1.6 Εφαρμογές της τεχνικής DSC

Λόγω της σημαντικότητας της DSC τεχνικής, υπάρχει μεγάλο εύρος εφαρμογών αυτής τόσο σε ερευνητικό όσο και σε βιομηχανικό επίπεδο. Μερικές από αυτές είναι:

- **Τρόφιμα:** Χρησιμοποιείται για την επεξήγηση της συμπεριφοράς πολλών πολυσακχαριτών και του αμύλου, αλλά και το χαρακτηρισμό μειγμάτων από λιπαρές ουσίες. Επίσης, χρησιμοποιούνται για τον

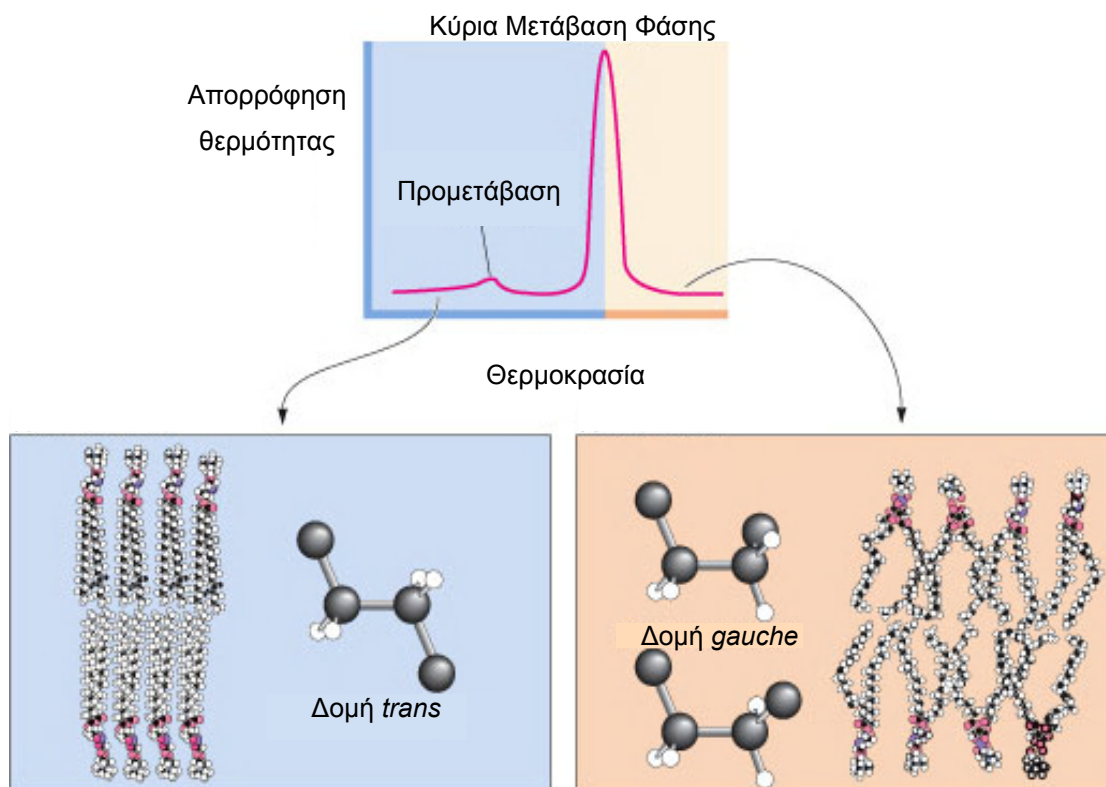
προσδιορισμό της κορεστότητας – ακορεστότητας λιπαρών και των αλλαγών φάσης που υφίστανται αυτά με την αύξηση της θερμοκρασίας. Τέλος, σε πολλές περιπτώσεις, εφαρμόζεται για τον καθορισμό και την εξέταση της φυσικής κατάστασης και των ιδιοτήτων του νερού που περιέχεται σε αυτά [35].

- **Φάρμακα:** Εφαρμόζεται ευρέως στην ανάλυση των φαρμάκων και κάθε είδους υποστρώμα. Χρησιμοποιείται για την ανάλυση απλών συστατικών για τον προσδιορισμό των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους, της καθαρότητας, της κρυσταλλικότητας και της θερμικής συμπεριφοράς τους [36].
- **Βιοτεχνολογία:** Εφαρμόζεται κυρίως σε μακρομοριακά συστήματα και σε βιοπολυμερή όπως επίσης και για το χαρακτηρισμό των λιποσωμάτων [37-39].

2.1.1.7 Εφαρμογή της τεχνικής DSC στις λιπιδικές διπλοστιβάδες της DPPC

Οι βιολογικές μεμβράνες αποτελούνται κυρίως από λιπίδια, πρωτεΐνες καθώς επίσης και από υδατάνθρακες. Τα λιπίδια αποτελούν περίπου το 50% της κυτταρικής μεμβράνης, τα οποία σχηματίζουν αυθόρμητα διπλοστιβάδες, λιποσώματα και μικκύλια. Οι λιποειδείς διπλοστιβάδες αποτελούν τη βασική δομή των βιολογικών μεμβρανών. Για το λόγο αυτό είναι πολύ σημαντική η φυσικοχημική μελέτη για τον προσδιορισμό της θερμικής τους συμπεριφοράς.

Οι πλήρως ενυδατωμένες λιποειδείς διπλοστιβάδες των συμμετρικών φωσφολιπιδίων κατά τη θερμική τους επεξεργασία και με αύξηση της θερμοκρασίας, συνήθως παρουσιάζουν δύο αλλαγές φάσης (phase transitions), οι οποίες παρουσιάζονται στο σχ. 2.3.



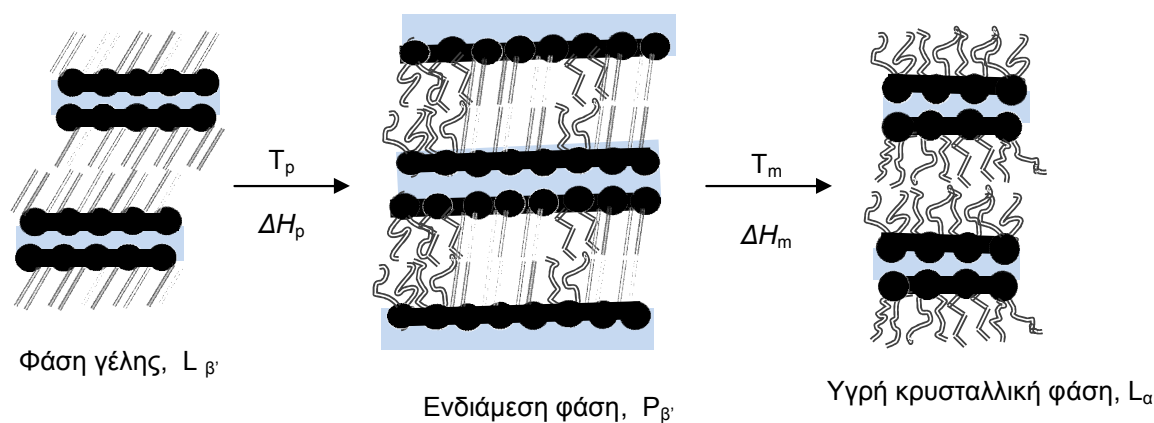
Σχήμα 2.3: Θερμογράφημα διπλοστιβάδων συμμετρικών φωσφολιπιδίων.

Σε συνήθεις θερμοκρασίες και θερμοκρασία περιβάλλοντος, οι διπλοστιβάδες της DPPC απαντώνται σε κατάσταση γέλης (gel phase), η οποία συμβολίζεται ως $L_{\beta'}$.

Με αύξηση της θερμοκρασίας παρατηρείται η προμετάβαση φάσης (pre-transition) σε εύρος θερμοκρασιών $T_p = 34.4 \pm 2.5^\circ\text{C}$ και ενεργειακές απαιτήσεις $\Delta H_p = 1.3 \pm 1.0 \text{ kcal/mol}$. Η αλλαγή φάσης αυτή αντιστοιχεί στην αλλαγή του συστήματος των διπλοστιβάδων από την κατάσταση γέλης σε μια ενδιάμεση κατάσταση που συμβολίζεται με $P_{\beta'}$ (ripple phase).

Με περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας παρατηρείται η κύρια μεταβολή φάσης (main transition) σε εύρος θερμοκρασιών $T_m = 41.3 \pm 1.8^\circ\text{C}$ και ενεργειακές απαιτήσεις $\Delta H_m = 8.2 \pm 1.4 \text{ kcal/mol}$. Η αλλαγή φάσης αυτή αντιστοιχεί στη μετάβαση του συστήματος των διπλοστιβάδων από την ενδιάμεση κατάσταση $P_{\beta'}$ στην υγρή κρυσταλλική φάση L_α (liquid phase) [5].

Συνολικά, οι διπλοστιβάδες της DPPC υπόκεινται δύο μεταβολές φάσεων με αποτέλεσμα να απαντώνται σε τρεις διαφορετικές φάσεις – καταστάσεις. Αυτές οι καταστάσεις παριστάνονται στο σχήμα 2.4.



Σχήμα 2.4: Αναπαράσταση των φάσεων στις οποίες απαντώνται οι λιπιδικές διπλοστιβάδες της DPPC στις διάφορες θερμοκρασίες.

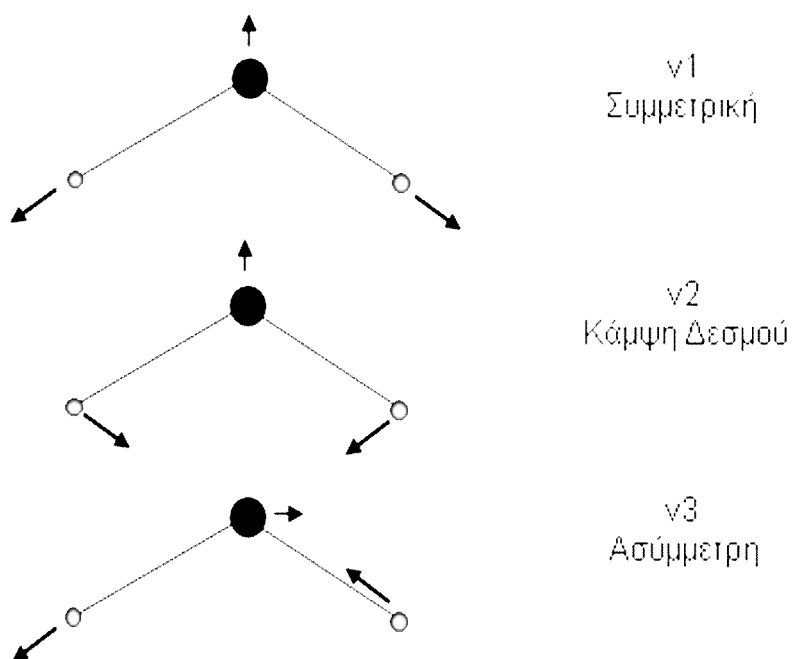
2.1.2 Δονητική Φασματοσκοπία

2.1.2.1 Βαθμοί ελευθερίας και αριθμός θεμελιωδών καταστάσεων

Έστω ένα μόριο, το οποίο απαρτίζεται από N άτομα. Προκειμένου να καθοριστεί η θέση του κάθε ατόμου χρειάζονται τρεις συντεταγμένες, x , y , z . Συνεπώς για N άτομα απαιτούνται συνολικά $3N$ συντεταγμένες, οπότε το μόριο έχει $3N$ βαθμούς ελευθερίας.

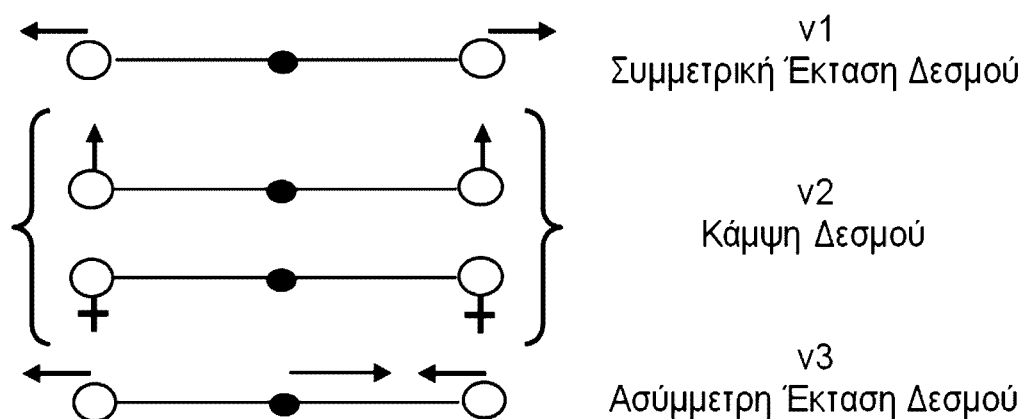
Για μη γραμμικό μόριο από αυτούς τους $3N$ βαθμούς ελευθερίας, τρεις αναφέρονται στη μεταφορική κίνηση του κέντρου μάζας του και άλλοι τρεις αντιστοιχούν στην περιστροφή γύρω από το κέντρο μάζας του. Επομένως, οι υπόλοιποι $3N-6$ βαθμοί ελευθερίας αντιστοιχούν στους δονητικούς βαθμούς ελευθερίας, δηλαδή το πλήθος των κανονικών δονήσεων του μορίου. Με τον όρο θεμελιώδης δόνηση εννοείται κάθε δόνηση, στην οποία όλα τα άτομα του μορίου δονούνται με την ίδια συχνότητα και περνούν από τις θέσεις

ισορροπίας τους ταυτόχρονα. Για παράδειγμα, αναφέρεται το μόριο του νερού το οποίο έχει τρεις θεμελιώδεις δονήσεις (Σχ. 2.5).



Σχήμα 2.5: Θεμελιώδεις δονήσεις νερού.

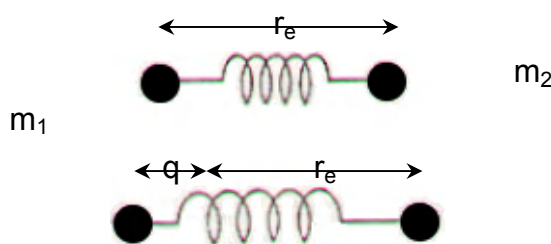
Για γραμμικό μόριο οι αντίστοιχοι βαθμοί ελευθερίας είναι $3N-5$, διότι ο ένας άξονας περιστροφής συμπίπτει με τον άξονα του μορίου και επομένως δεν αποτελεί ανεξάρτητο βαθμό ελευθερίας. Στο σχήμα 2.6 παρουσιάζεται ως παράδειγμα γραμμικού μορίου το διοξείδιο του άνθρακα και οι αντίστοιχες τέσσερις θεμελιώδεις δονήσεις του.



Σχήμα 2.6: Θεμελιώδεις δονήσεις CO₂.

2.1.2.2 Αρμονικός Ταλαντωτής

Όταν σε μια δόνηση οι δυνάμεις που συγκρατούν τα άτομα στο μόριο είναι γραμμικές συναρτήσεις της μετατόπισης των ατόμων από τη θέση ισορροπίας τους, τότε η δόνηση καλείται αρμονική. Στο σχήμα 2.7 παρουσιάζεται ένα μηχανικό μοντέλο για τη μελέτη της αρμονικής δόνησης του διατομικού μορίου.



Σχήμα 2.7: Μηχανικό μοντέλο διατομικού μορίου και αρμονικής δόνησης.

Το παραπάνω σύστημα αποτελείται από δύο μάζες m_1 και m_2 που συνδέονται μεταξύ τους με ελατήριο σταθεράς K , το οποίο υπακούει στο νόμο του Hooke. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι δύο μάζες αντιστοιχούν στις μάζες των ατόμων, και η σταθερά του ελατηρίου στη σταθερά του δεσμού των ατόμων. Εκτρέποντας τις μάζες από τη θέση ισορροπίας τους (r_e) κατά q , θα δεχθούν δύναμη επαναφοράς $F(r)$, η οποία δίνεται από τη σχέση:

$$F(r) = -Kq \quad (2.2)$$

Από το δεύτερο νόμο του Newton προκύπτει ότι :

$$F = \mu \gamma = \mu \frac{d^2 q}{dt^2} \quad (2.3)$$

όπου μ , η ανηγμένη μάζα του συστήματος.

Από τις σχέσεις 2.2 και 2.3 προκύπτει η δευτεροβάθμια εξίσωση:

$$\mu \frac{d^2 q}{dt^2} = -Kq \quad (2.4)$$

Η λύση της σχέσεως 2.4 είναι η εξής:

$$q = q_0 \sin(2\pi\nu t + \varphi) \quad (2.5)$$

όπου q_0 το πλάτος της ταλάντωσης, ϕ η αρχική της φάση και ν η ιδιοσυχνότητα του συστήματος, η οποία δίνεται από τη σχέση:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{\mu}} \quad (2.6)$$

Η δυναμική ενέργεια του συστήματος είναι:

$$V = \int -F(r)dr = \frac{1}{2}Kr^2 \quad (2.7)$$

Η κινητική ενέργεια του συστήματος είναι:

$$T = \frac{1}{2}\mu \left(\frac{dq}{dt} \right)^2 \quad (2.8)$$

Επομένως η ολική ενέργεια του συστήματος θα είναι:

$$E = V + T = c \quad (2.9)$$

Η κβαντομηχανική λύση του παραπάνω προβλήματος από την επίλυση της εξίσωσης Schrödinger:

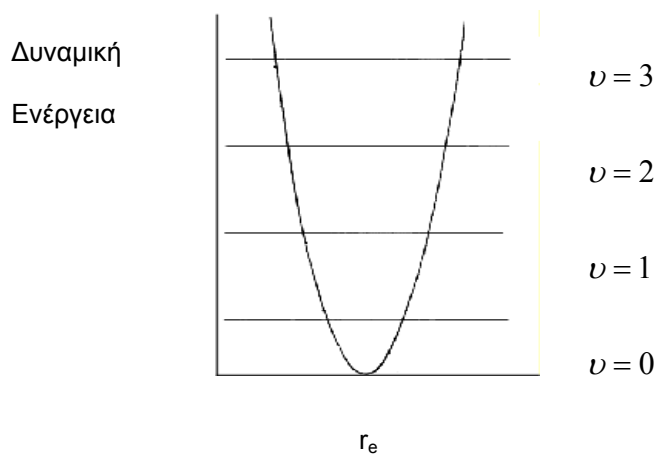
$$-\frac{\hbar^2}{2\mu} \left(\frac{d^2\psi}{dq^2} \right) + \frac{1}{2}Kq^2\psi = E\psi \quad (2.10)$$

από την οποία προκύπτει ότι η ενέργεια του αρμονικού ταλαντωτή δίνεται από τη σχέση:

$$E_v = h\nu \left(v + \frac{1}{2} \right) = \hbar\omega \left(v + \frac{1}{2} \right) \quad (2.11)$$

όπου v ο δονητικός κβαντικός αριθμός με $v=0,1,2,3,\dots$. Από την παραπάνω σχέση γίνεται φανερό ότι σύμφωνα με την κβαντομηχανική θεωρία η ενέργεια είναι κβαντισμένη, κάτι το οποίο δε συμβαίνει με τη χρήση της κλασσικής θεωρίας.

Στο σχήμα 2.8 παριστάνονται οι κβαντισμένες ενεργειακές στάθμες του αρμονικού ταλαντωτή, όπως προκύπτουν από τη σχέση 2.11. Το πλέον σημαντικό είναι το ότι κάθε στάθμη απέχει από την επόμενη ή την προηγούμενη κατά $\hbar\omega$:



Σχήμα 2.8: Ενεργειακές στάθμες αρμονικού ταλαντωτή.

2.1.2.3 Μη αρμονικός ταλαντωτής

Η δυναμική ενέργεια που προέκυψε από τη μελέτη του αρμονικού ταλαντωτή, δεν αποτελεί ικανοποιητική προσέγγιση για τα μόρια διότι οι δυνάμεις και οι δονήσεις των μορίων είναι αναρμονικές. Μια συνάρτηση ενεργείας που περιγράφει τις αναρμονικές δονήσεις των μορίων είναι αυτή του δυναμικού Morse :

$$V = D_e(1 - e^{-\beta q})^2$$

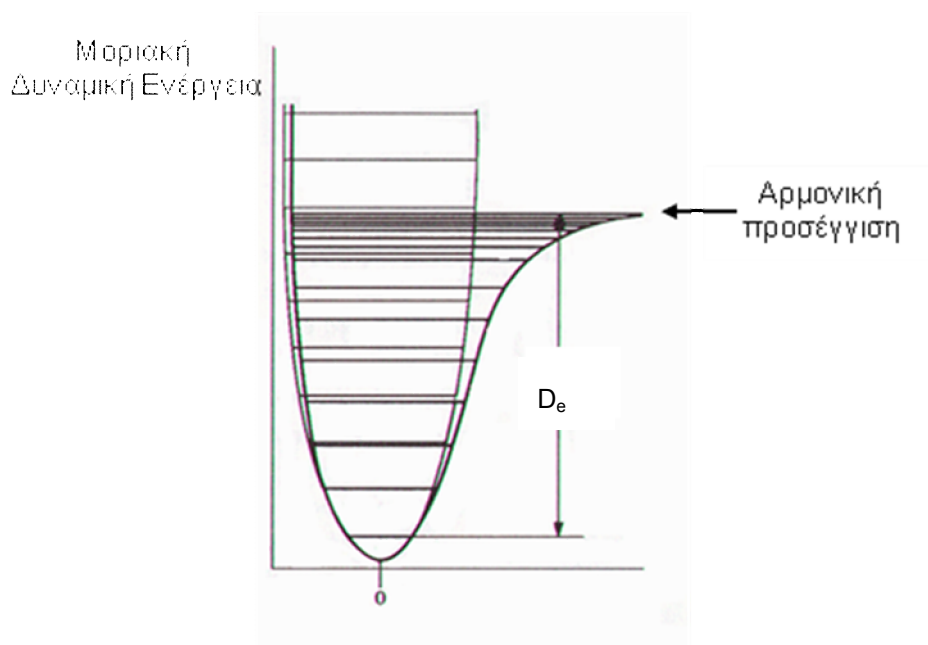
(2.12)

όπου D_e η ενέργεια διάσπασης του μορίου και β το μέτρο της κυρτότητας του δυναμικού γύρω από τη θέση ισορροπίας. Στο σχήμα 2.8 παριστάνεται το διάγραμμα του δυναμικού Morse και το δυναμικό του αρμονικού ταλαντωτή. Οι ενεργειακές στάθμες οι οποίες προκύπτουν από την εξίσωση Schrödinger θεωρώντας το δυναμικό Morse, θα δίνονται από τη σχέση :

$$E_u = h\nu\left(\nu + \frac{1}{2}\right) - h\nu\chi_e\left(\nu + \frac{1}{2}\right)^2 \quad (2.13)$$

όπου $\nu\chi_e$ η σταθερά αναρμονικότητας.

Από το σχήμα 2.9 καθίσταται φανερό ότι σε αντίθεση με τον αρμονικό ταλαντωτή, στον οποίο όλες οι ενεργειακές στάθμες ισαπέχουν ανεξαρτήτως του v , στην περίπτωση του δυναμικού Morse οι στάθμες πυκνώνουν με αύξηση του κβαντικού αριθμού v .



Σχήμα 2.9: Δυναμικό Morse και αρμονική προσέγγιση.

2.1.2.4 Κανόνες επιλογής δονητικών μεταπτώσεων

Στην περίπτωση του αρμονικού ταλαντωτή, σύμφωνα με τους κανόνες επιλογής, επιτρεπτές είναι μόνο οι μεταπτώσεις εκείνες κατά τις οποίες ισχύει $\Delta v = \pm 1$. Μάλιστα οι αρμονικές δονήσεις, οι οποίες εμφανίζονται ως μεταπτώσεις από τη θεμελιώδη στάθμη στην πρώτη διεγερμένη έχουν μεγαλύτερη ένταση και καλούνται θεμελιώδεις. Αυτό αποτελεί άμεση συνέπεια της συνάρτησης κατανομής των Maxwell – Boltzmann, σύμφωνα με την οποία για δεδομένη θερμοκρασία, τον μεγαλύτερο πληθυσμό έχει πάντα η στάθμη με τη χαμηλότερη ενέργεια :

$$\frac{N_1}{N_0} = e^{-\frac{h\nu}{KT}}$$

(2.14)

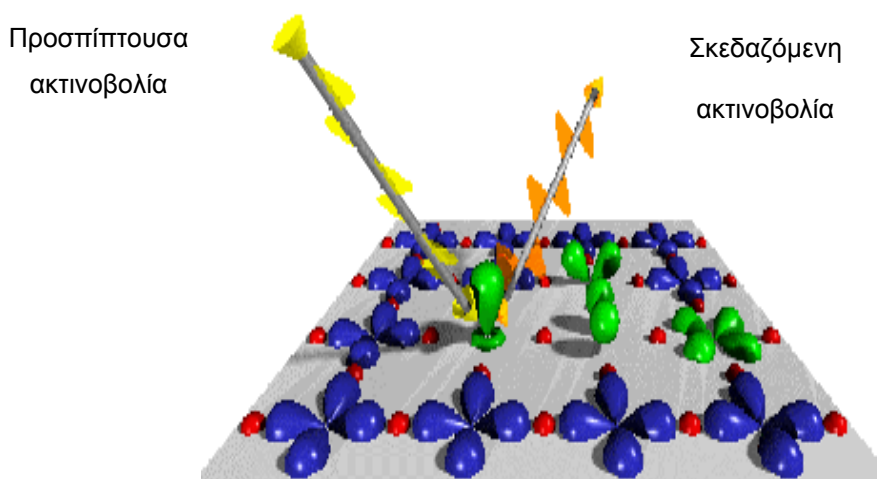
όπου N_1 και N_0 ο αριθμός των μορίων στην πρώτη διεγερμένη και στη θεμελιώδη δονητική στάθμη αντίστοιχα. Συνεπώς ο μεγαλύτερος αριθμός των μορίων βρίσκεται στη θεμελιώδη κατάσταση. Εκτός όμως από τις θεμελιώδεις μεταπτώσεις υπάρχουν και οι θερμές ζώνες (hot bands), οι οποίες είναι μεταπτώσεις με κανόνα επιλογής $\Delta v = \pm 1$, αλλά για μεγαλύτερες τιμές v , δηλαδή $1 \rightarrow 2$, $2 \rightarrow 3$, $3 \rightarrow 4 \dots$. Οι μεταπτώσεις αυτές πραγματοποιούνται σε υψηλότερες θερμοκρασίες και οι εντάσεις τους, σε σχέση με τις θεμελιώδεις, είναι πολύ μικρότερες.

2.1.2.5 Φαινόμενο Raman

Όταν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αλληλεπιδρά με την ύλη, αυτή απορροφάται υπό την προϋπόθεση βέβαια ότι ισχύει η σχέση :

$$\Delta E = h\nu \quad (2.15)$$

όπου ΔE η διαφορά ενεργείας μεταξύ δύο κβαντικών ενεργειακών καταστάσεων του μορίου, h η σταθερά του Planck και ν η συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Εκτός όμως από την απορρόφηση, ένα μικρό μέρος της θα υποστεί σκέδαση. Ο όρος σκέδαση υποδηλώνει μια τυχαία αλλαγή της κατεύθυνσης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (Σχήμα 2.10).



Σχήμα 2.10: Σχηματική απόδοση της σκέδασης.

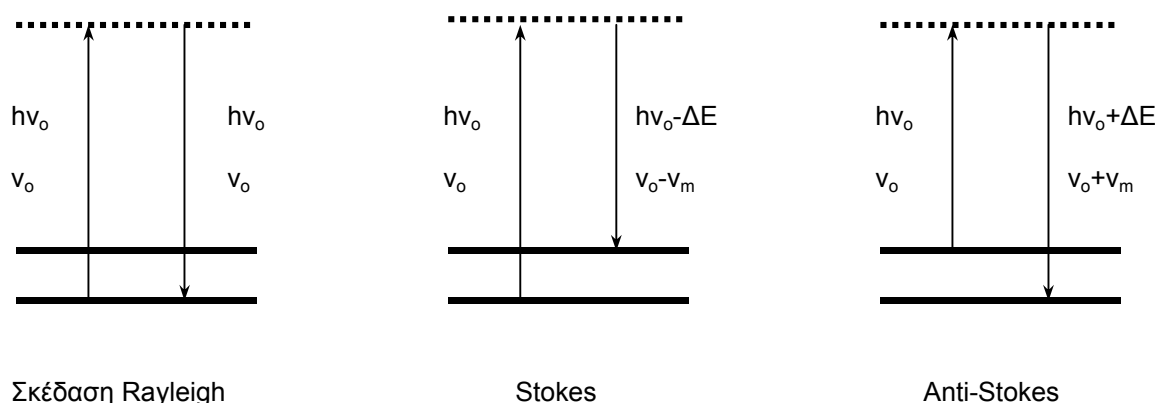
Το 1928 ο ινδός φυσικός Chandrasekhra Venkata Raman κατηύθυνε μονοχρωματική ακτινοβολία συχνότητας ν_0 σε ένα δείγμα και παρατήρησε τη σκεδαζόμενη ακτινοβολία κάθετα προς τη διεύθυνση της εισερχόμενης δέσμης. Αυτή αποτελείται κυρίως από μια έντονη φασματική γραμμή συχνότητας ίδιας με εκείνη της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ν_0 (σκέδαση Rayleigh), καθώς και από ορισμένες ασθενέστερες γραμμές με συχνότητες μεγαλύτερες ή μικρότερες από ν_0 (σκέδαση Raman).

2.1.2.6. Κβαντομηχανική θεώρηση του φαινομένου Raman

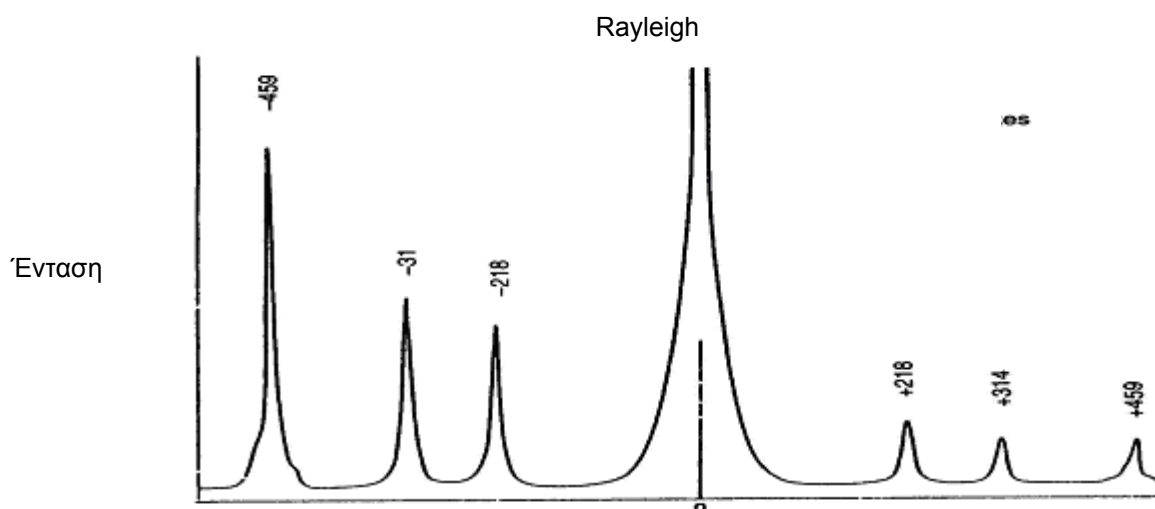
Μονοχρωματική ακτινοβολία συχνότητας ν_0 , προσπίπτει σε δείγμα και σκεδάζεται. Η σκέδαση αυτή οφείλεται σε σύγκρουση μεταξύ των φωτονίων και των ηλεκτρονίων του δείγματος. Η σύγκρουση μπορεί να είναι είτε ελαστική είτε ανελαστική. Στην πρώτη περίπτωση δεν λαμβάνει χώρα ανταλλαγή ενέργειας μεταξύ των συγκρουόμενων σωματιδίων. Αυτό σημαίνει ότι η ενέργεια του μορίου δε μεταβάλλεται και ότι η σκεδαζόμενη ακτινοβολία θα έχει την ίδια ενέργεια και την ίδια συχνότητα με την προσπίπτουσα ακτινοβολία. Αυτή ονομάζεται σκέδαση Rayleigh και αποτελεί το κύριο μέρος της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας. Στην περίπτωση που η σύγκρουση είναι ανελαστική, θα υπάρξει ανταλλαγή ενέργειας, με αποτέλεσμα τα μόρια να κερδίσουν ή να χάσουν ενέργεια. Αυτή είναι η σκέδαση Raman. Στην περίπτωση που το μόριο κερδίζει ενέργεια, τότε η σκεδαζόμενη ακτινοβολία έχει μικρότερη συχνότητα από την προσπίπτουσα, δηλαδή $\nu_0 - \nu_m$, και αυτές οι γραμμές ονομάζονται Stokes στο φάσμα Raman. Σε αντίθετη περίπτωση η σκεδαζόμενη ακτινοβολία έχει συχνότητα $\nu_0 + \nu_m$, και αυτές ονομάζονται γραμμές antistokes (Σχ. 2.11).

Από τη συνάρτηση κατανομής Maxwell – Boltzmann (Σχ. 2.14), προκύπτει ότι σε συνηθισμένες θερμοκρασίες το μεγαλύτερο ποσοστό των μορίων είναι στη θεμελιώδη κατάσταση, οπότε οι γραμμές Stokes έχουν μεγαλύτερη ένταση από τις anti-Stokes (Σχ. 2.12). Στο σχήμα αυτό παριστάνεται η διαφορά στην ένταση της σκέδασης Rayleigh και των γραμμών Stokes και Anti-Stokes της σκέδασης Raman. Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονιστεί ότι ο

άξονας των συχνοτήτων δε δείχνει την απόλυτη συχνότητα των σκεδαζόμενων φωτονίων, αλλά τις διαφορές συχνότητας των σκεδαζόμενων από τα προσπίπτοντα φωτόνια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, ο άξονας των συχνοτήτων να δείχνει τις συχνότητες δονήσεων των σκεδαζόμενων μορίων [40,41].



Σχήμα 2.11: Σχηματική παράσταση της σκέδασης Rayleigh και Raman.



Σχήμα 2.12: Φάσμα Raman CCl_4 στο οποίο φαίνονται οι γραμμές Rayleigh, Stokes και anti-Stokes.

2.1.2.7 Εφαρμογές της φασματοσκοπίας Raman

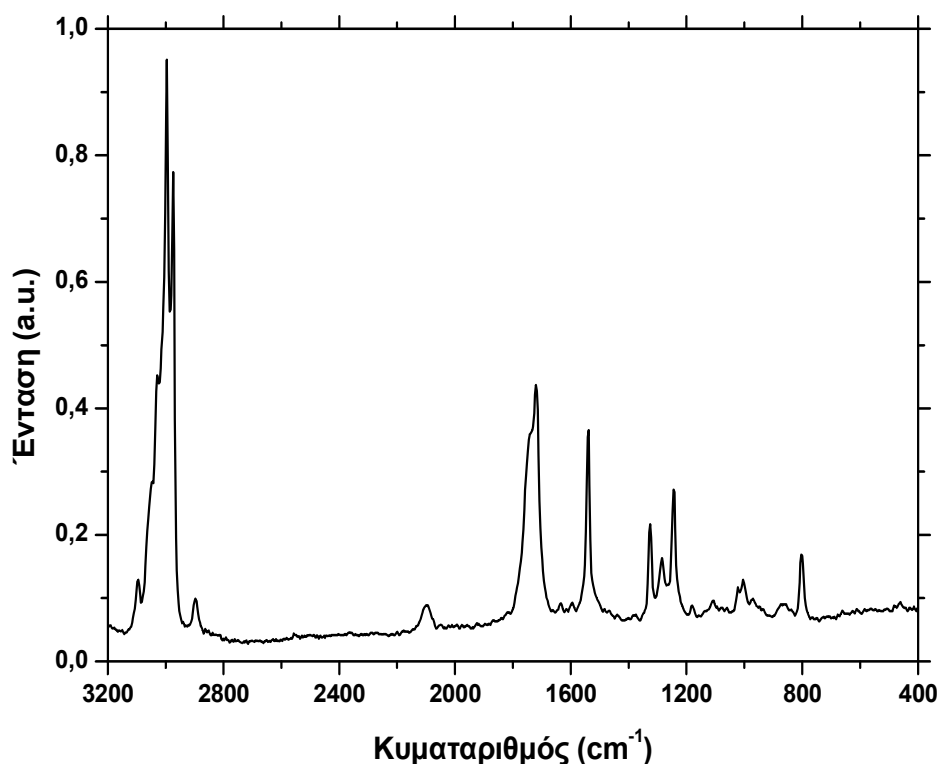
Η φασματοσκοπία Raman, βρίσκει πολλές εφαρμογές σε όλους τους τομείς της έρευνας αλλά και της βιομηχανίας, κυρίως για τον ποιοτικό αλλά και για τον ποσοτικό προσδιορισμό διαφόρων ενώσεων. Οι σημαντικότερες από αυτές είναι:

- Στην αρχαιολογία, για την ανάλυση των μετάλλων και των οργανικών ενώσεων που περιέχονται σε δείγματα χρώματος ή χώματος, για τον προσδιορισμό της ηλικίας και της σύνθεσης των δειγμάτων [42].
- Στην ιχθυολογία, όπου τα δείγματα εξετάζονται για το είδος των πρωτεϊνών που περιέχουν αλλά και των αμινοξέων, κυρίως της προλίνης, που χαρακτηρίζεται ως απαραίτητο αμινοξύ για τον ανθρώπινο οργανισμό [43,44].
- Στην ιατρική, για τη διάγνωση του καρκίνου, μέσω της εξέτασης κατάλληλων δειγμάτων, για τον προσδιορισμό και την ανάλυση της δομής των πρωτεϊνών που είναι αλληλένδετες με αυτόν [45,46].

2.1.2.8 Εφαρμογή της φασματοσκοπίας Raman στις λιποειδείς διπλοστοιβάδες της DPPC

Στο σχήμα 2.13 παρουσιάζεται το φάσμα Raman των διπλοστιβάδων της DPPC στους 25 °C που είναι η αρχική θερμοκρασία μελέτης του δείγματος. Για την ευκολότερη ανάλυση των φασμάτων, αυτά επεξεργάζονται σε 3 διαφορετικές φασματικές περιοχές, οι οποίες θα δίνουν πληροφορίες για τις δομικές αλλαγές που υφίστανται τα υπό εξέταση δείγματα. Ακολουθεί ο πίνακας 2.1 ο οποίος περιέχει την πλήρη ταυτοποίηση των κορυφών του φάσματος. Η μελέτη των κορυφών αυτών ως προς τον κυματαριθμό στον οποίο εμφανίζονται αλλά και ως προς την έντασή τους δίνουν πληροφορίες για τις δομικές αλλαγές των λιπιδικών διπλοστιβάδων πριν αλλά και μετά την

εισδοχή των εξεταζόμενων φαρμάκων. Σημαντικότερη όλων, είναι η μελέτη των λόγων εντάσεων κορυφών Raman, οι οποίοι δίνουν πληροφορίες για τον τρόπο αλληλεπίδρασης των φαρμάκων με τις διπλοστιβάδες [47,48].



Σχήμα 2.13: Κανονικοποιημένο φάσμα Raman των λιπιδικών διπλοστιβάδων της DPPC σε θερμοκρασία 25 °C.

Πιο συγκεκριμένα, οι φασματικές περιοχές με τις οποίες θα ασχοληθούμε είναι οι παρακάτω:

- **Περιοχή 2800 – 3000 cm^{-1} :** Στην περιοχή αυτή εμφανίζονται οι εκτάσεις δεσμού C – H των μεθυλίων και μεθυλενίων των αλειφατικών αλυσίδων. Οι δύο κορυφές που εμφανίζονται στους 2850 cm^{-1} και 2880 cm^{-1} αποδίδονται στην συμμετρική και ασύμμετρη έκταση δεσμού C – H των μεθυλενίων αντίστοιχα, ενώ οι κορυφές 2935 cm^{-1} και 2960 cm^{-1} αποδίδονται στη συμμετρική και ασύμμετρη έκταση δεσμού C – H των τελικών μεθυλίων των αλειφατικών αλυσίδων [47-56]. Στην περιοχή αυτή

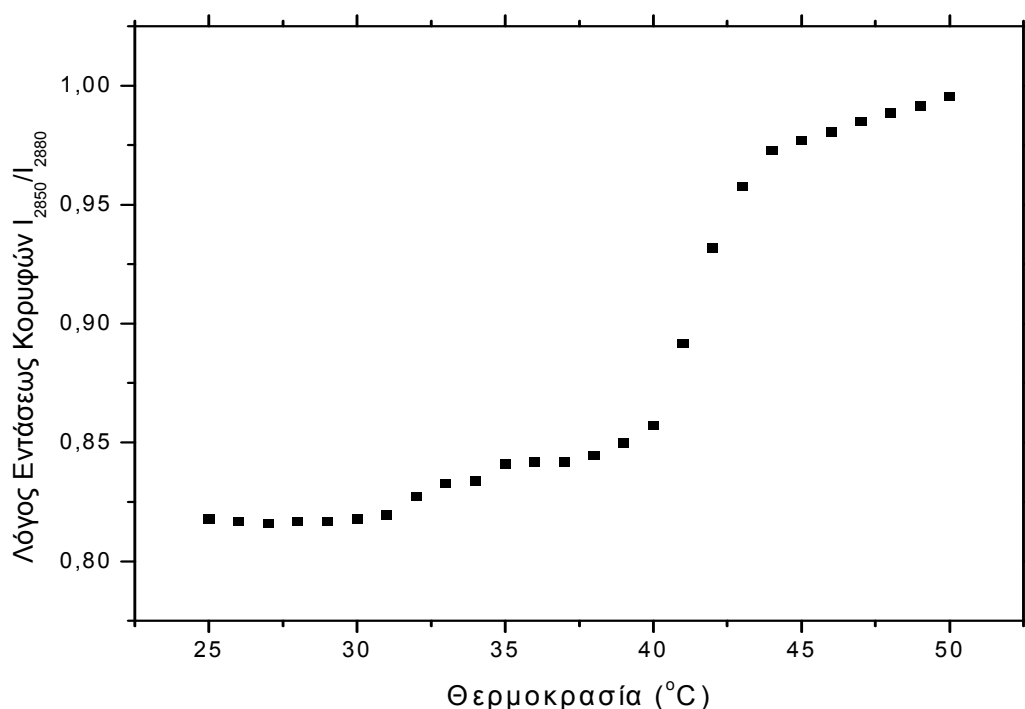
του φάσματος, μπορούν να υπολογιστούν δύο λόγοι εντάσεως κορυφών Raman οι οποίοι μας δίνουν πληροφορίες για τις αλλαγές στη δομή και τα χαρακτηριστικά των διπλοστιβάδων.

Πίνακας 2.1: Κορυφές Raman των διπλοστιβάδων της DPPC [47-56].

Κορυφές	Κυματαριθμός (cm ⁻¹)	Απόδοση
1	720	συμμετρική έκταση δεσμού C - N
2	1060	έκταση δεσμού C - C (trans)
3	1090	έκταση δεσμού C - C (gauche)
4	1130	έκταση δεσμού C - C (trans)
5	1295	ψαλιδοειδής διαμόρφωση δεσμού C-H
6	1435	διαμόρφωση δεσμού C - H
7	2850	συμμετρική έκταση δεσμού C - H
8	2880	ασύμμετρη έκταση δεσμού C - H
9	2935	συμμετρική έκταση δεσμού C - H
10	2960	ασύμμετρη έκταση δεσμού C - H

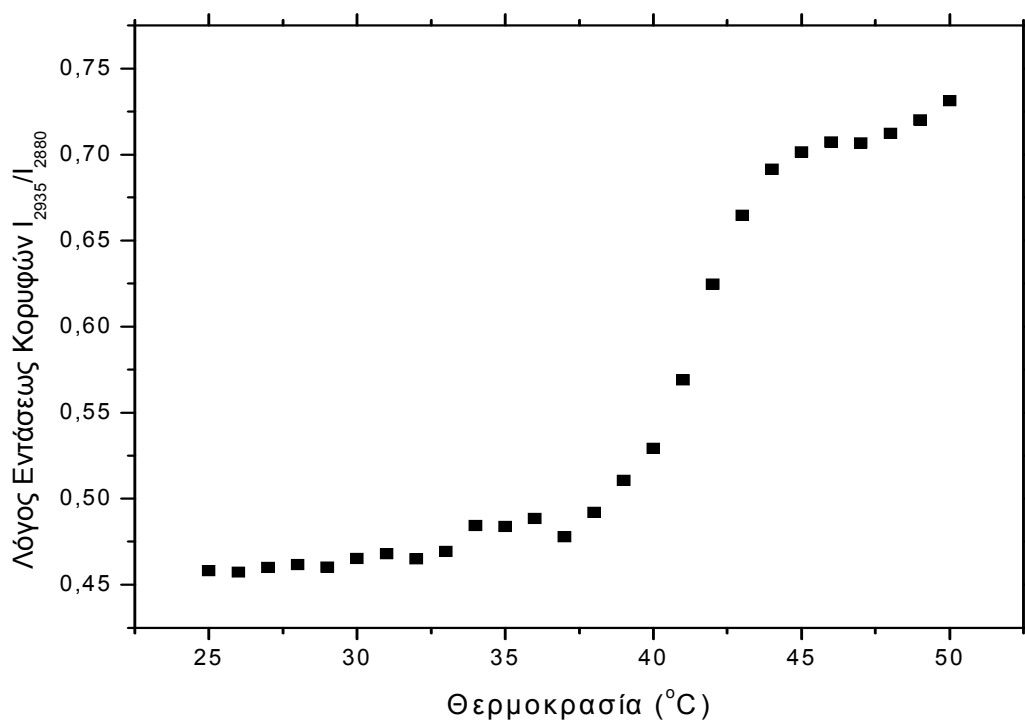
- **Λόγος I_{2850}/I_{2880} :** Ο λόγος αυτός των εντάσεων των κορυφών Raman μας δίνει πληροφορίες τόσο για τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις των λιπιδικών αλυσίδων μεταξύ τους όσο και για την αταξία τους. Όπως παρατηρείται και στο σχήμα 2.14 αύξηση της θερμοκρασίας αποφέρει αύξηση των παραπάνω χαρακτηριστικών. Η σχέση μεταξύ της θερμοκρασίας και του λόγου των εντάσεων είναι μια σιγμοειδής καμπύλη το σημείο καμπής της

οποίας προσδιορίζεται στους 41.4 °C, πολύ κοντά στους 41.3 °C που προσδιορίζεται από τη θερμική ανάλυση.



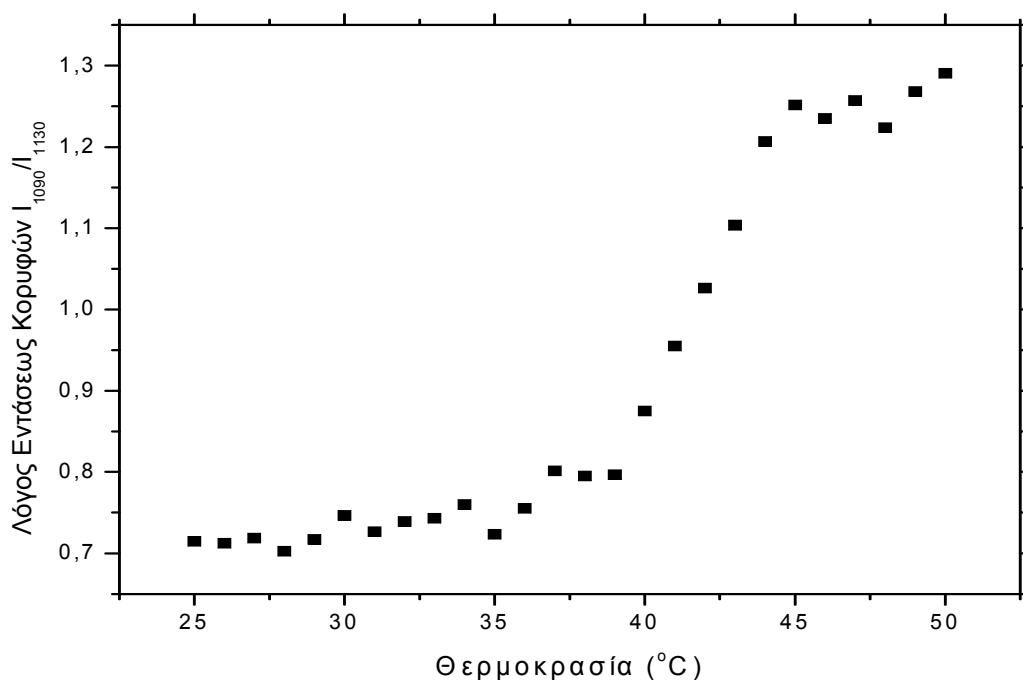
Σχήμα 2.14: Λόγος εντάσεως κορυφών I_{2850}/I_{2880} των διπλοστιβάδων της DPPC.

- **Λόγος I_{2935}/I_{2880} :** Ο λόγος αυτός των εντάσεων κορυφών Raman μας δίνει ταυτόχρονα πληροφορίες για τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις αλυσίδας – αλυσίδας αλλά και για την ευκαμψία – ρευστότητα των διπλοστιβάδων. Η συνάρτηση που καταγράφει τη συμπεριφορά του λόγου αυτού με την αύξηση της θερμοκρασίας είναι και αυτή σιγμοειδής, το σημείο καμπής της οποίας συμπίπτει με την τιμή του προηγούμενου λόγου, δηλαδή είναι 41.4 °C. Στο σχήμα 2.15 φαίνεται η συμπεριφορά αυτή.



Σχήμα 2.15: Λόγος εντάσεως κορυφών I_{2935}/I_{2880} των διπλοστιβάδων της DPPC.

- Περιοχή $1000 - 1200 \text{ cm}^{-1}$:** Η περιοχή αυτή είναι πολύ σημαντική γιατί σε αυτή εμφανίζονται κορυφές οι οποίες αντιστοιχούν σε δονήσεις δεσμών C – C των αλειφατικών αλυσίδων. Οι κορυφές στα 1060 cm^{-1} και στους 1130 cm^{-1} αντιστοιχούν σε δονήσεις C – C των αλειφατικών αλυσίδων που έχουν μορφή *trans* ενώ η κορυφή στους 1090 cm^{-1} αντιστοιχεί στις δομές που έχουν μορφή *gauche* [47-56]. Λαμβάνοντας τον λόγο εντάσεως κορυφών I_{1090}/I_{1130} σε συνάρτηση της θερμοκρασίας παρατηρούμε ότι υπάρχει μια σιγμοειδής εξάρτηση των δυο αυτών μεγεθών, της οποίας το σημείο καμπής προσδιορίζεται στους 41.6°C , τιμή η οποία θεωρείται ίδια με αυτή των προηγούμενων λόγων αλλά και με αυτή της θερμικής ανάλυσης (Σχ. 2.16). Ο λόγος αυτός μας δίνει πληροφορίες για τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις αλλά αποτελεί και μέτρο της αταξίας – ρευστότητας των αλυσίδων.



Σχήμα 2.16: Λόγος εντάσεως κορυφών I_{1090}/I_{1130} των διπλοστιβάδων της DPPC.

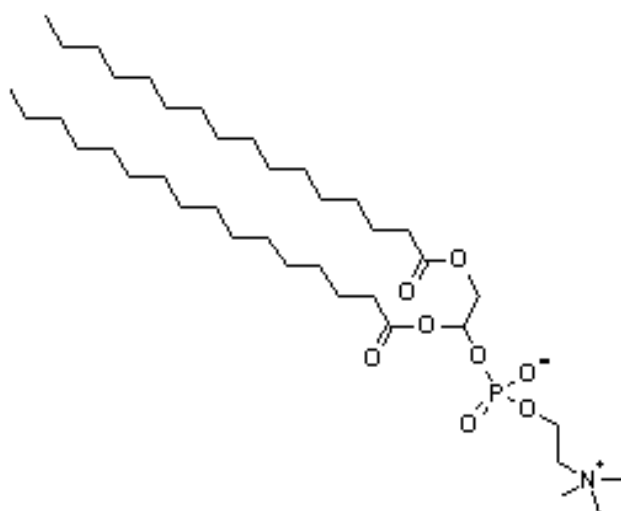
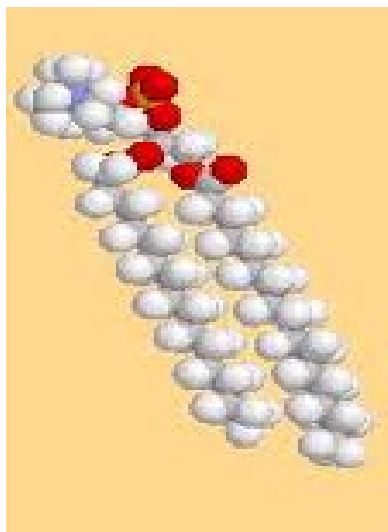
- Περιοχή $700 - 800 \text{ cm}^{-1}$:** Στην περιοχή αυτή εμφανίζεται μια κορυφή που προσδιορίζεται στους 715 cm^{-1} και η οποία αποδίδεται στη συμμετρική δόνηση έκτασης δεσμού C – N της πολικής κεφαλής της χολίνης [47-56]. Η τιμή του κυματαριθμού στην οποία παρατηρείται η κορυφή αυτή μας δίνει πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις των πολικών κεφαλών της χολίνης, ιδιαίτερα μετά την είσοδο των φαρμακευτικών μορίων.

2.2. Υλικά

2.2.1 Φωσφολιπίδια

Για την παρασκευή των διπλοστιβάδων για τη μελέτη της αλληλεπίδρασής τους με τα υπό εξέταση φαρμακευτικά μόρια, χρησιμοποιείται το παρακάτω φωσφολιπίδιο.

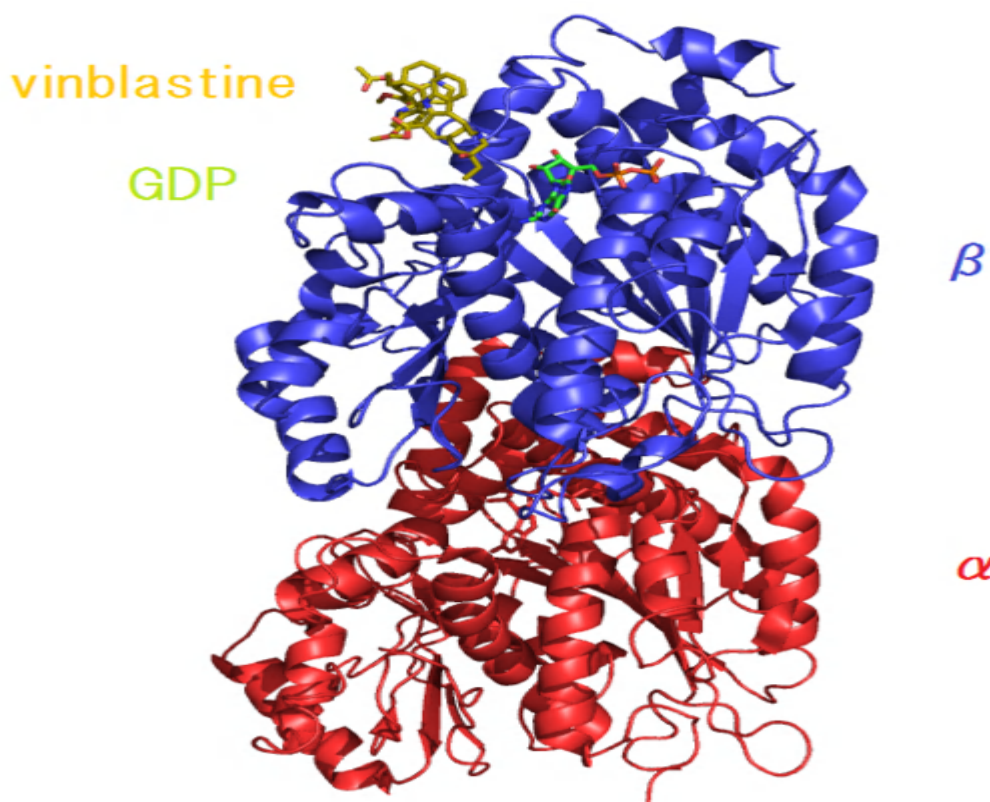
Φωσφατιδυλοχολίνη: Η πλήρης ονομασία του φωσφολιπιδίου αυτού είναι 1,2-διπαλμιτική-sn-γλυκερο-3-φωσφατιδυλοχολίνη και για συντομία θα αναφέρεται ως DPPC. Είναι το απλούστερο φωσφολιπίδιο το οποίο απαντάται, και περιέχει δύο συμμετρικές αλυσίδες λιπαρών οξέων από 16 άτομα C, μια φωσφορική ομάδα καθώς και την πολική κεφαλή της χολίνης. Η χημική της δομή φαίνεται στο σχήμα 2.17.



Σχήμα 2.17: Χημική δομή της DPPC.

2.2.2 Τα αλκαλοειδή της βίγκας

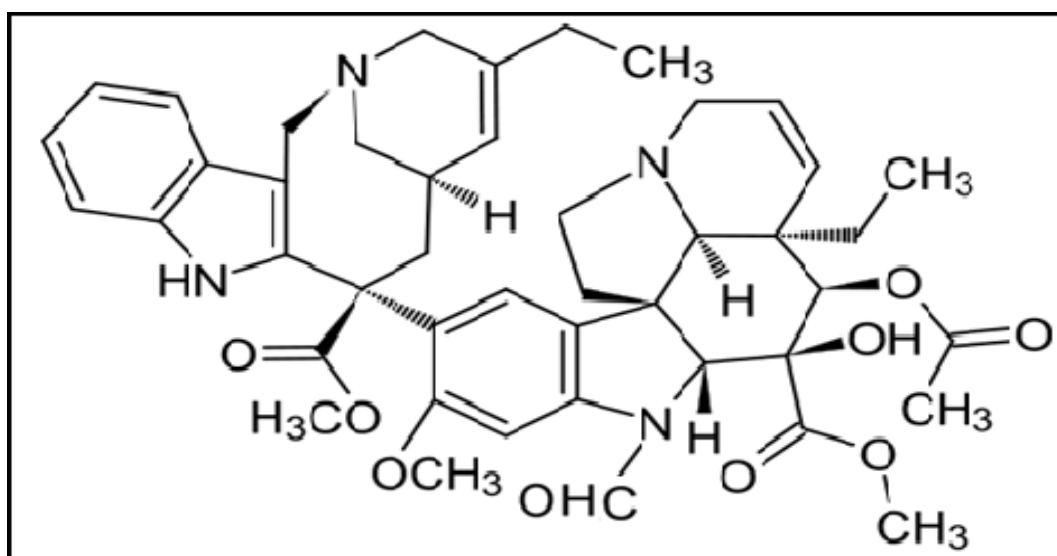
Τα αλκαλοειδή της βίγκας (*Vinca*) απομονώνονται από το αιθαλές φυτό *Catheranthus roseus*. Η κυτταροτοξική τους δράση οφείλεται στην εμπόδιση του πολυμερισμού του διμερούς της τομπουλίνης και το σχηματισμό μικροσωληνίσκων [57,58] (Σχήμα 2.18). Αν και η πρωταρχική κυτταροτοξική δράση των αλκαλοειδών της *Vinca* οφείλεται στην ανάσχεση της μίτωσης κατά τη διάρκεια της μετάφασης, υπάρχουν επιστημονικά δεδομένα που συνηγορούν ότι αυτή μπορεί και να οφείλεται σε άλλες δράσεις [59]. Κυριότεροι αντιπρόσωποι της κατηγορίας αυτής των οργανικών ενώσεων αυτών είναι η βιμπλαστίνη (vinblastine), η βιγκριστίνη (vincristine) και η βινορελμπίνη (vinorelbine). Αυτοί αποτελούν αντινεοπλασματικούς παράγοντες, και δρουν μόνοι τους είτε σε συνδυασμό με άλλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες [60].



Σχήμα 2.18: Μηχανισμός δράσης βιμπλαστίνης (κίτρινο χρώμα). Με μπλε και κόκκινο χρώμα παριστάνονται τα δύο τμήματα (α και β αντίστοιχα) του διμερούς της τομπουλίνης.

Η βιμπλαστίνη (Σχήμα 2.19) και η βιγκριστίνη (Σχήμα 2.20) απομονώνονται από τη μυρτιά ενώ η βινореλμπίνη αποτελεί ένα ημισυνθετικό αλκαλοειδές της *Vinca* η οποία διαφέρει από τα άλλα αλκαλοειδή στο δομικό τμήμα της καθαρανθίνης. Έχει παρατηρηθεί, ότι η βινореλμπίνη επιδεικνύει ευρύτερο φάσμα αντικαρκινικών δράσεων καθώς επίσης ότι μειώνει την νευροτοξικότητα [61].

Σχήμα 2.19: Η χημική δομή του μορίου της βιμπλαστίνης.



Σχήμα 2.20: Η χημική δομή του μορίου της βιγκριστίνης.

Η βιμπλαστίνη αποτελεί φάρμακο το οποίο χρησιμοποιείται κλινικά για τη θεραπεία των ασθενών που πάσχουν από λευχαιμία, ασθένεια του Hodgkin, καρκίνο του μαστού, όγκο του Wilm και σάρκωμα του Ewing [62]. Αποτελεί ογκώδες μόριο το οποίο περιέχει στη δομή του ινδολικό δακτύλιο και διαφυδρογονομένο ινδολικό δακτύλιο. Είναι ισχυρά λιπόφιλο μόριο και επεμβαίνει στο μεταβολισμό των νουκλεϊνικών οξέων, πρωτεϊνών και λιπιδίων και διαταράσσει τους κυτταρικούς μικροσωληνίσκους και μικρονημάτια [63-66]. Εισέρχεται στα κύτταρα με διάχυση μέσω του πλάσματος των μεμβρανών. Η διαπερατότητα των μεμβρανών και άρα η κινητικότητά τους εξαρτάται από τη μοριακή τους οργάνωση και την ευκινησία των μεμβρανικών λιπιδίων [67-69].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ DPRPC:ΒΙΜΠΛΑΣΤΙΝΗ

3.1 Αποτελέσματα δείγματος λιπιδικών διπλοστιβάδων DPRPC

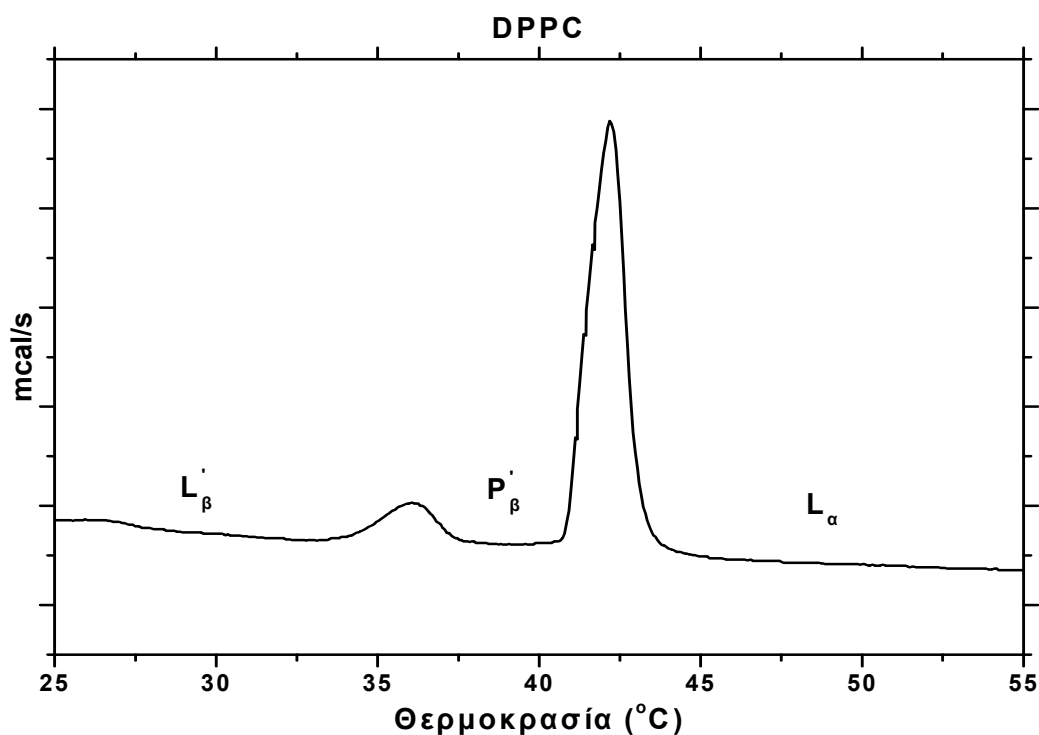
3.1.1 Θερμική Ανάλυση

Για την παρασκευή του δείγματος αυτού ζυγίστηκαν 5.4 mg της στερεής διπαλμιτικής φωσφατιδυλοχολίνης τα οποία και διαλυτοποιήθηκαν σε 100 μL CHCl_3 . Με τη χρήση αέριου αζώτου N_2 ανακτήθηκε η αρχική στερεή ποσότητα σε κρυσταλλική δομή και προστέθηκαν 5.4 μL απεσταγμένου νερού ώστε να δημιουργηθούν οι λιποειδείς διπλοστιβάδες. Το δείγμα κλείστηκε ερμητικά σε αεροστεγή κυψελίδα ώστε το δείγμα να μην έρχεται σε επαφή με υγρασία η οποία επηρεάζει τη θερμοκρασία στην οποία παρατηρούνται οι αλλαγές φάσεις. Η περιοχή θερμοκρασιών που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση του δείγματος είναι από 10 έως 60 $^{\circ}\text{C}$.

Αρχικά το παρασκευαζόμενο δείγμα θερμάνθηκε στους 60 $^{\circ}\text{C}$ με ρυθμό αύξησης 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, ώστε να επιτευχθεί ομογενοποίηση του εξεταζόμενου δείγματος. Έπειτα εφαρμόστηκε ρυθμός μεταβολής θερμοκρασίας 2.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, ώστε να είναι ακριβέστερος ο προσδιορισμός των θερμοκρασιών των μεταβολών φάσεως που λαμβάνουν χώρα στο δείγμα. Στο σχήμα 4.1 παρουσιάζεται το θερμογράφημα το οποίο παρατηρήθηκε κατά τη θέρμανση του δείγματος με ρυθμό σάρωσης 2.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Στο σχήμα 3.1 παρατηρούνται δύο μεταβολές φάσης, γεγονός που σημαίνει ότι το υπό εξέταση δείγμα απαντάται σε τρεις διαφορετικές φάσεις. Η πρώτη φάση είναι η gel φάση (κατάσταση γέλης), η οποία συμβολίζεται με L_{β}' , στην οποία παρατηρείται ότι στις αλειφατικές αλυσίδες επικρατούν οι *trans* διαμορφώσεις. Η αλλαγή φάσης που παρουσιάζεται στους $T_p=34.34$ $^{\circ}\text{C}$ με αντίστοιχη ενθαλπία $\Delta H_p= 0.85 \pm 0.05$ kcal/mol ονομάζεται προμετάβαση

φάσης (pre – transition) και αντιστοιχεί στη μετάβαση του δείγματος από την gel φάση σε μια ενδιάμεση κατάσταση (ripple phase). Η κατάσταση αυτή συμβολίζεται ως P_{β}' και σε αυτήν παρατηρούμε ότι έχουμε μια στροφή των πολικών κεφαλών και μικρή αύξηση των δομών *gauche* των αλυσίδων. Η δεύτερη μεταβολή φάσης παρατηρείται στους $T_m=42.20\text{ }^{\circ}\text{C}$ με ενθαλπία $\Delta H_m=6.95\pm0.35\text{ kcal/mol}$ και ονομάζεται κύρια μεταβολή φάσης (main transition). Αυτή αντιστοιχεί σε μετάβαση των διπλοστοιβάδων από την κατάσταση P_{β}' στην κατάσταση L_{α} η οποία ονομάζεται υγρή κρυσταλλική (liquid crystalline). Η κατάσταση αυτή χαρακτηρίζεται από την αλλαγή των διαμορφώσεων των αλειφατικών αλυσίδων από *trans* σε *gauche* [5,39,56,70-74].



Σχήμα 3.1: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC.

Συνοπτικά, κατά τη θέρμανση του δείγματος ενυδατωμένης DPPC παρατηρούνται δυο μεταβολές φάσης οι οποίες σχετίζονται με αλλαγή της δομής των διπλοστοιβάδων και τη μετάβασή τους σε διαφορετικές μεσομορφικές καταστάσεις $L_{\beta}' \rightarrow P_{\beta}' \rightarrow L_{\alpha}$. Οι μεσομορφικές καταστάσεις και οι διαμορφωτικές μεταβολές θα αναλυθούν παρακάτω με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας Raman.

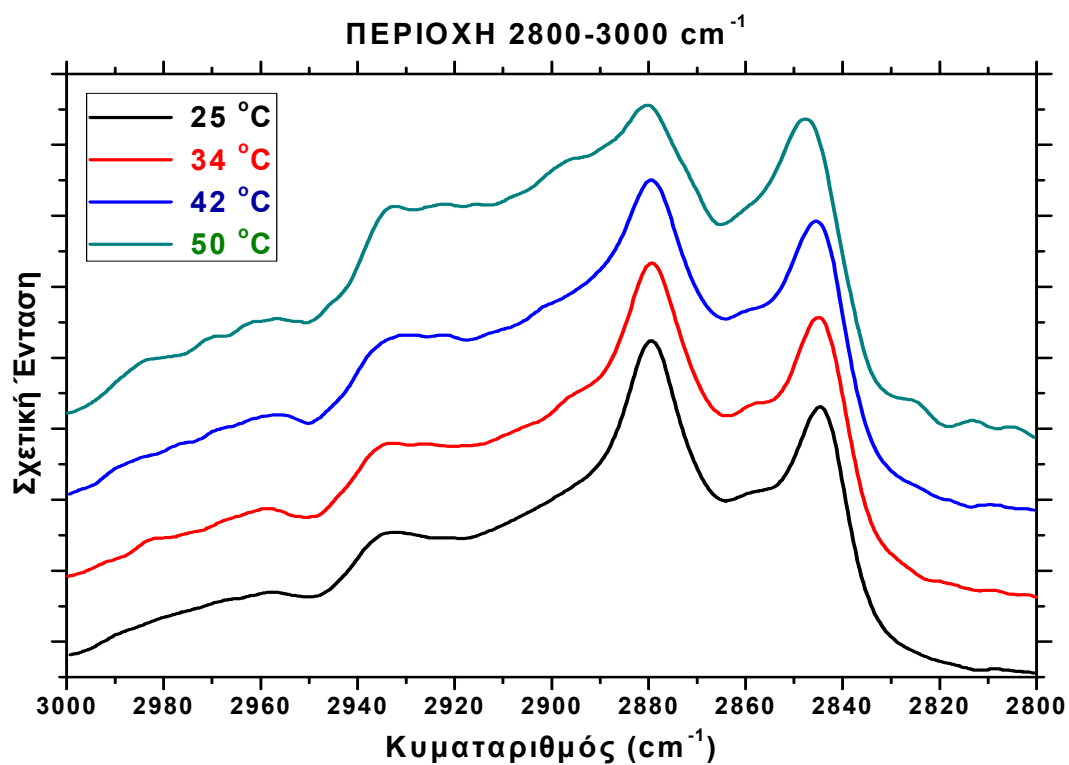
3.1.2 Φασματοσκοπία Raman

Η παρασκευή του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε στη φασματοσκοπία Raman έγινε με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε στη Θερμική Ανάλυση, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος, και συγκεκριμένα 10.8 mg. Η τοποθέτηση του δείγματος έγινε σε ειδική κυψελίδα η οποία είναι συνδεδεμένη με συσκευή θερμοστάτησης της Ventacon με ακρίβεια ως προς τη θερμοκρασία ± 0.50 °C με την οποία αυξάνεται ελεγχόμενα η θερμοκρασία του δείγματος.

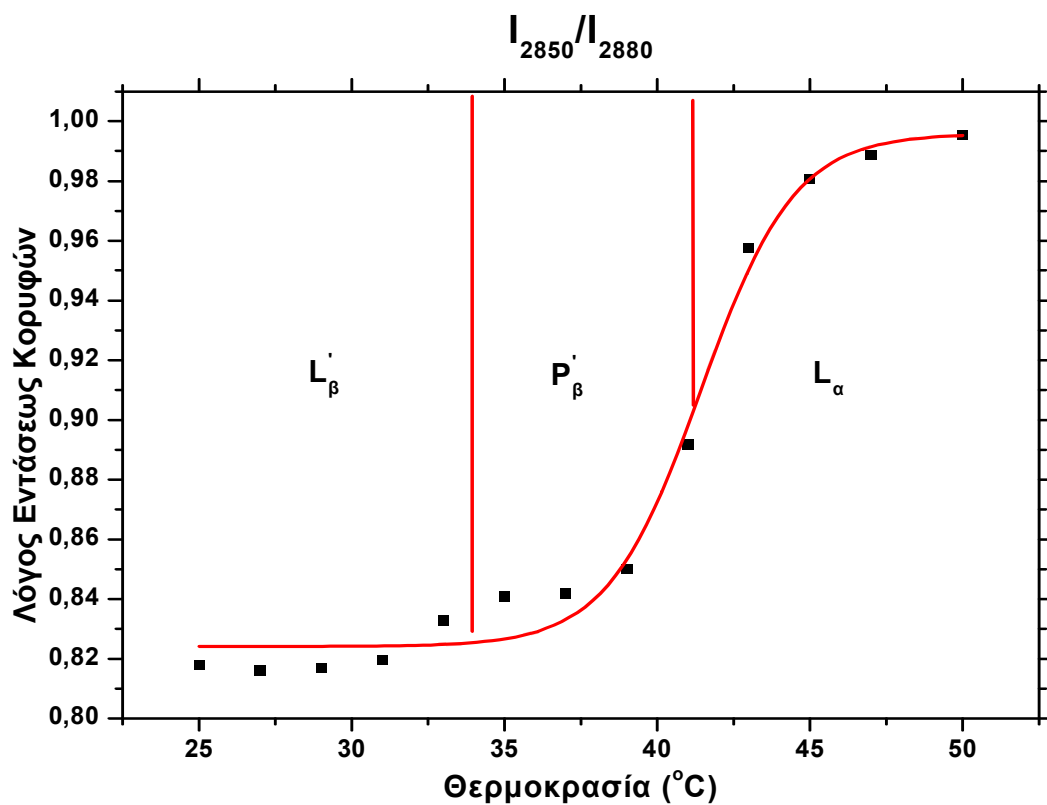
Η τοποθέτηση του δείγματος έγινε μια ημέρα πριν από την μέτρηση, αφενός για την απομάκρυνση της ποσότητας του νερού η οποία δε δεσμεύεται για τη δημιουργία των λιποειδών διπλοστιβάδων και αφετέρου για τη σταθεροποίηση και θερμοστάτηση του δείγματος. Κατά την πειραματική διαδικασία η θερμοκρασία του δείγματος αυξάνεται κατά 1 – 2 °C και θερμοστατείται για 20 min ανά μέτρηση. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται σταθερή διάρκεια της μέτρησης σε κάθε θερμοκρασία στα 50 min αφού γίνονται 250 σαρώσεις για τη λήψη του κάθε φάσματος. Η περιοχή θερμοκρασιών που μελετήθηκε το δείγμα είναι από τους 25 έως τους 50 °C και στην περιοχή κυματαριθμών από 500 έως 3500 cm^{-1} , με διακριτική ικανότητα 2 cm^{-1} . Για την καλύτερη κατανόηση της ανάλυσης των φασμάτων Raman θα χρησιμοποιηθούν τέσσερις (4) διαφορετικές φασματικές περιοχές.

- **Περιοχή 2800 – 3000 cm^{-1} :** Στην περιοχή αυτή εμφανίζονται οι εκτάσεις δεσμού C – H των μεθυλίων και μεθυλενίων των αλειφατικών αλυσίδων. Οι δύο κορυφές οι οποίες εμφανίζονται στους 2850 cm^{-1} και 2880 cm^{-1} αποδίδονται στην συμμετρική και ασύμμετρη έκταση δεσμού C – H των μεθυλενίων αντίστοιχα, ενώ η κορυφή στους 2935 cm^{-1} αποδίδεται στη συμμετρική έκταση δεσμού C – H των τελικών μεθυλίων των αλειφατικών αλυσίδων (Σχήμα 3.2). Στην περιοχή αυτή του φάσματος, μπορούν να υπολογιστούν δύο λόγοι εντάσεως κορυφών Raman οι οποίοι μας δίνουν πληροφορίες για τις αλλαγές στη δομή και τα χαρακτηριστικά των διπλοστιβάδων.

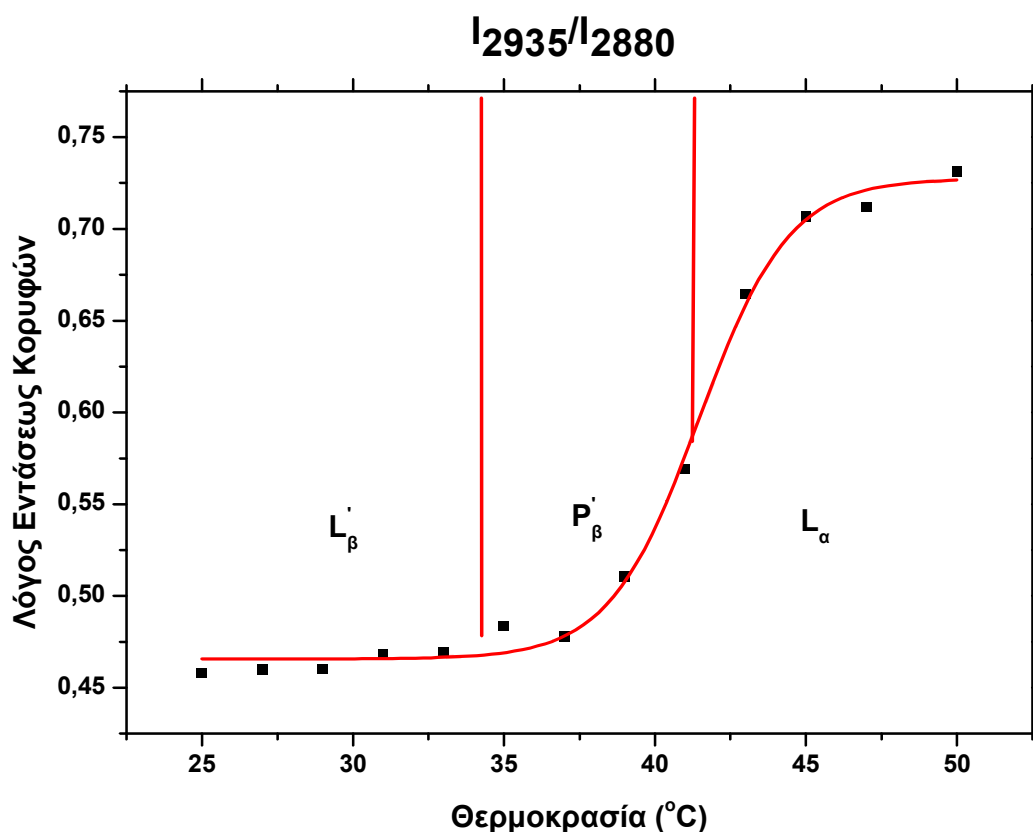
- **Λόγος I_{2850}/I_{2880} :** Ο λόγος αυτός των εντάσεων των κορυφών Raman δίνει πληροφορίες τόσο για τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις των αλειφατικών αλυσίδων των διπλοστιβάδων όσο και την αταξία τους. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 3.3 αύξηση της θερμοκρασίας επιφέρει αύξηση των παραπάνω χαρακτηριστικών. Η σχέση μεταξύ της θερμοκρασίας και του λόγου των εντάσεων είναι μια σιγμοειδής καμπύλη το σημείο καμπής της οποίας προσδιορίζεται στους 41.43 ± 0.28 °C, πολύ κοντά στους 42.2 °C που προσδιορίστηκε από τη θερμική ανάλυση. Επίσης, η διαφορά μεταξύ μέγιστης και ελάχιστης τιμής του λόγου αυτού προσδιορίζεται ως $\Delta R_{I_{2850}/I_{2880}}^{100} = 0.18$, όπου 100 είναι η μοριακή αναλογία του DPPC, δηλαδή 100%.
- **Λόγος I_{2935}/I_{2880} :** Από το λόγο αυτόν των εντάσεων κορυφών Raman αντλούνται ταυτόχρονα πληροφορίες για τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις αλυσίδας – αλυσίδας των διπλοστιβάδων αλλά και την ευκαμψία τους. Η συνάρτηση που καταγράφει τη συμπεριφορά του λόγου αυτού με την αύξηση της θερμοκρασίας είναι και αυτή σιγμοειδής, το σημείο καμπής της οποίας προσδιορίζεται στους 41.46 ± 0.17 °C, δηλαδή πολύ κοντά στην τιμή που προσδιορίστηκε από τη θερμική ανάλυση, δηλαδή 41.4 °C (Σχήμα 3.4). Επίσης, η διαφορά μεταξύ μέγιστης και ελάχιστης τιμής του λόγου αυτού προσδιορίζεται ως $\Delta R_{I_{2935}/I_{2880}}^{100} = 0.27$. Από το σχήμα 3.2 φαίνονται επίσης οι μετατοπίσεις των μελετούμενων κορυφών. Οι κορυφές που αποδίδονται στη συμμετρική και ασύμμετρη έκταση δεσμού των μεθυλενίων C – H μετατοπίζονται σε υψηλότερες συχνότητες λόγω της μετατροπής της διαμόρφωσης των αλειφατικών αλυσίδων από *trans* σε *gauche* οπότε παρατηρείται αύξηση των ενδομοριακών και διαμοριακών αλληλεπιδράσεων με αποτέλεσμα να απαιτείται μεγαλύτερη ενέργεια για τη δόνησή τους. Συγκεκριμένα, οι κορυφές αυτές μετατοπίζονται κατά 3.9 cm^{-1} και κατά 3.7 cm^{-1} αντίστοιχα.



Σχήμα 3.2: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC στην περιοχή 2800 – 3000 cm^{-1} και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.



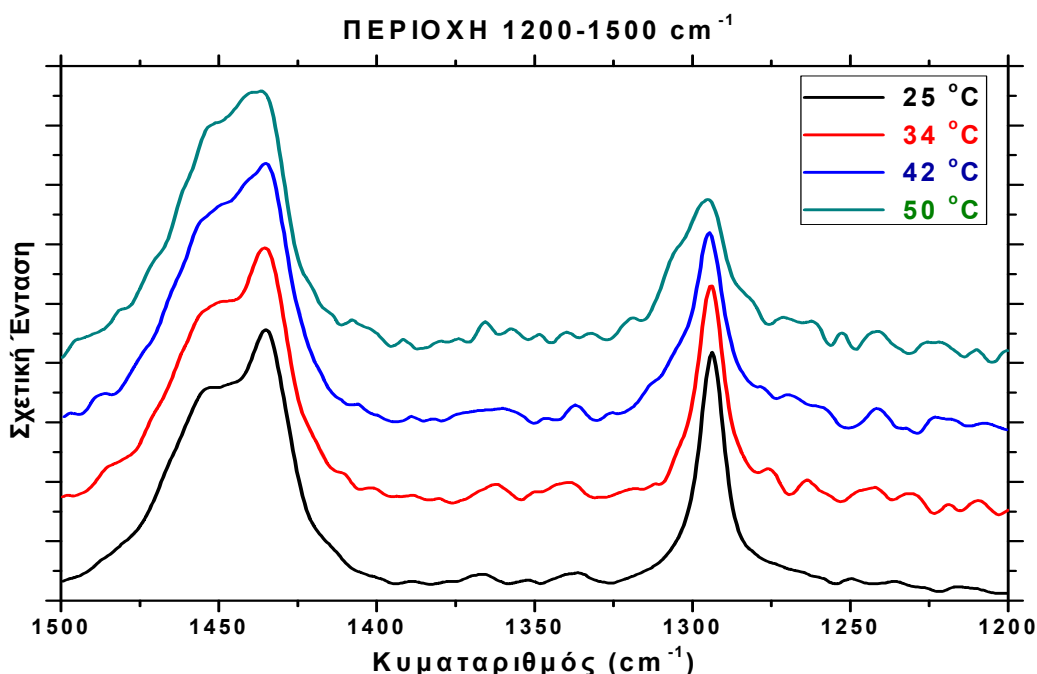
Σχήμα 3.3: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} του δείγματος DPPC.



Σχήμα 3.4: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2935}/I_{2880} του δείγματος DPPC.

- Περιοχή $1200 - 1500 \text{ cm}^{-1}$:** Στην περιοχή αυτή εμφανίζονται δύο κορυφές οι οποίες αντιστοιχούν σε διαφορετικές δονήσεις των μεθυλενίων. Συγκεκριμένα η κορυφή στους 1294 cm^{-1} αντιστοιχεί στη δόνηση στρέψης των μεθυλενίων και η κορυφή στους 1436 cm^{-1} στην κάμψη γωνιών των μεθυλενίων του επιπέδου (Σχήμα 3.5). Αυτή η κορυφή στους 1436 cm^{-1} με αύξηση της θερμοκρασίας αλλά και την εμφάνιση του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης, εμφανίζει μια διάσχιση, η οποία παρατηρείται ως ώμος στα αριστερά της κύριας κορυφής στους 1457 cm^{-1} και αντιστοιχεί σε κάμψη γωνιών των μεθυλενίων που δεν βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο. Συνήθως, για την ποσοτικοποίηση των κορυφών χρησιμοποιείται η μέθοδος του διαχωρισμού κορυφών (Σχήμα Π.1). Το αποτέλεσμα του διαχωρισμού κορυφών, χρησιμοποιείται για τη δημιουργία του λόγου εντάσεως κορυφών Raman I_{1457}/I_{1436} , ο οποίος αποδίδει τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γειτονικών αλειφατικών αλυσίδων των

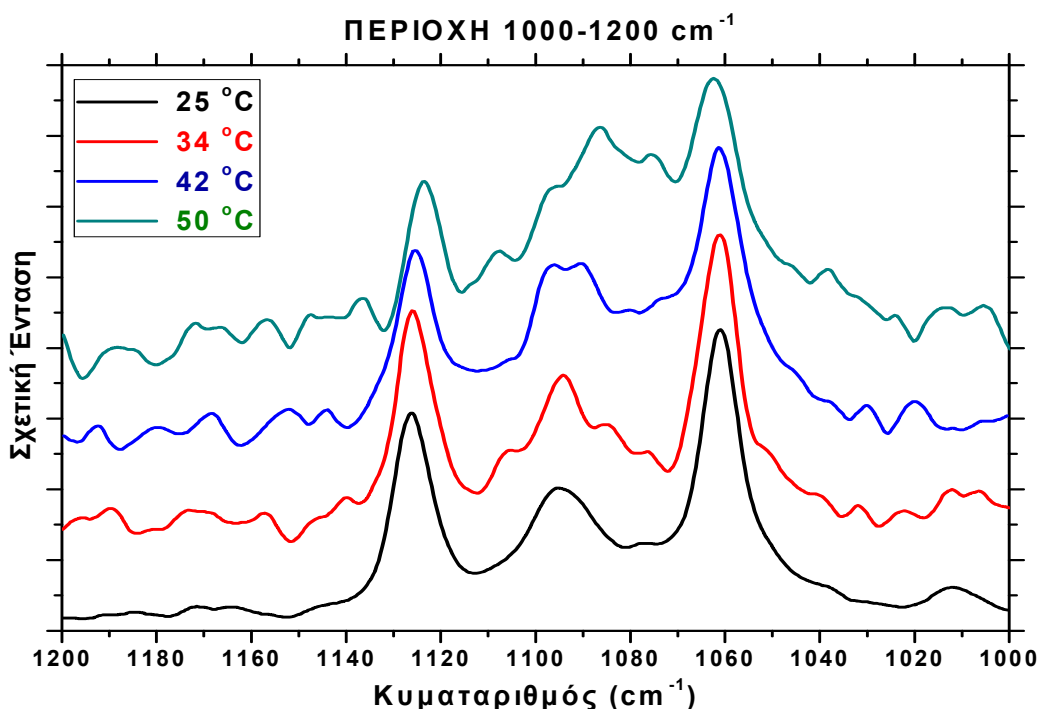
διπλοστιβάδων (Σχήμα Π.2). Οι κορυφές των μεθυλενίων μετατοπίζονται κατά 2.4 cm^{-1} και 3.1 cm^{-1} αντίστοιχα και η μετατόπιση αυτή οφείλεται στην αλλαγή της διαμόρφωσης των αλυσίδων λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας (Σχήμα 3.5).



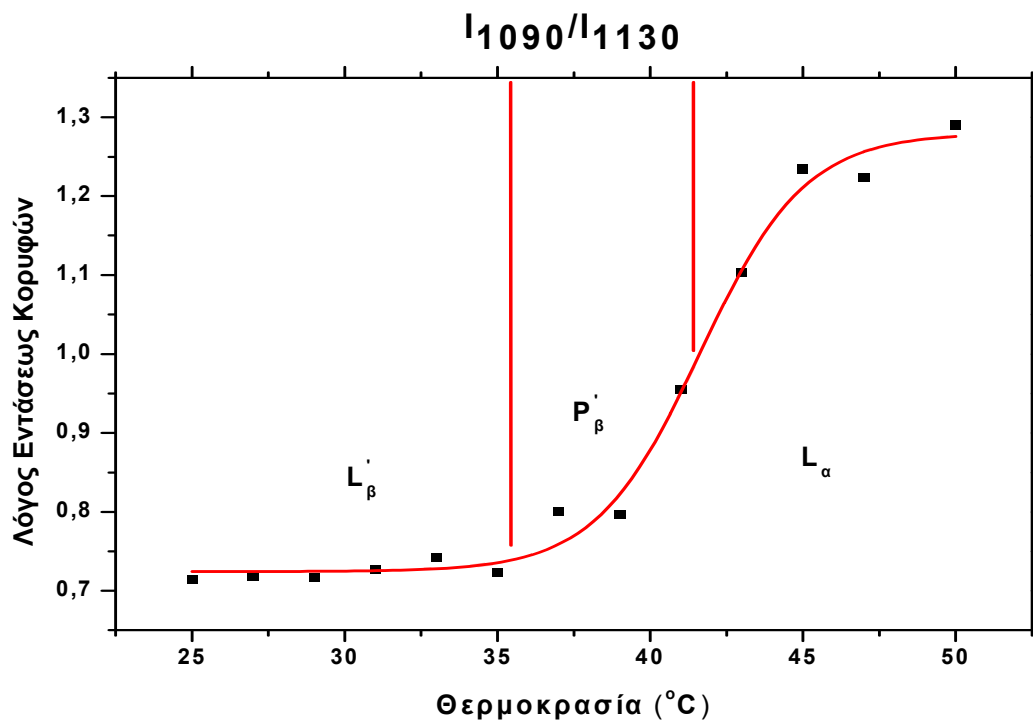
Σχήμα 3.5: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC στην περιοχή $1200 - 1500\text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.

Περιοχή $1000 - 1200\text{ cm}^{-1}$: Η περιοχή αυτή είναι πολύ σημαντική γιατί σε αυτή εμφανίζονται κορυφές οι οποίες αντιστοιχούν σε δονήσεις δεσμών C – C των αλειφατικών αλυσίδων. Οι κορυφές 1060 cm^{-1} και 1130 cm^{-1} αντιστοιχούν σε δονήσεις C – C των αλειφατικών αλυσίδων που έχουν διαμόρφωση *trans* ενώ η κορυφή 1090 cm^{-1} αντιστοιχεί στις δομές που έχουν διαμόρφωση *gauche* (Σχήμα 3.6). Λαμβάνοντας το λόγο εντάσεως κορυφών I_{1090}/I_{1130} σε συνάρτηση της θερμοκρασίας παρατηρείται ότι υπάρχει μια σιγμοειδής εξάρτηση των δυο αυτών μεγεθών, της οποίας το σημείο καμπής προσδιορίζεται στους $41.63 \pm 0.27\text{ }^{\circ}\text{C}$. Το εύρος τιμών του λόγου αυτού είναι $\Delta R_{I_{1090}/I_{1130}}^{100} = 0.58$. Από το λόγο αυτό αντλούνται πληροφορίες για τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις των μορίων αλλά αποτελεί και μέτρο της αταξίας των αλυσίδων (Σχήμα 3.7). Από άποψη μετατοπίσεων οι

κορυφές στους 1090 cm^{-1} και 1130 cm^{-1} μετατοπίζονται σε χαμηλότερες συχνότητες κατά 10.7 cm^{-1} και 2.9 cm^{-1} λόγω της μεγαλύτερης ευκινησίας του τελικού μεθυλίου.

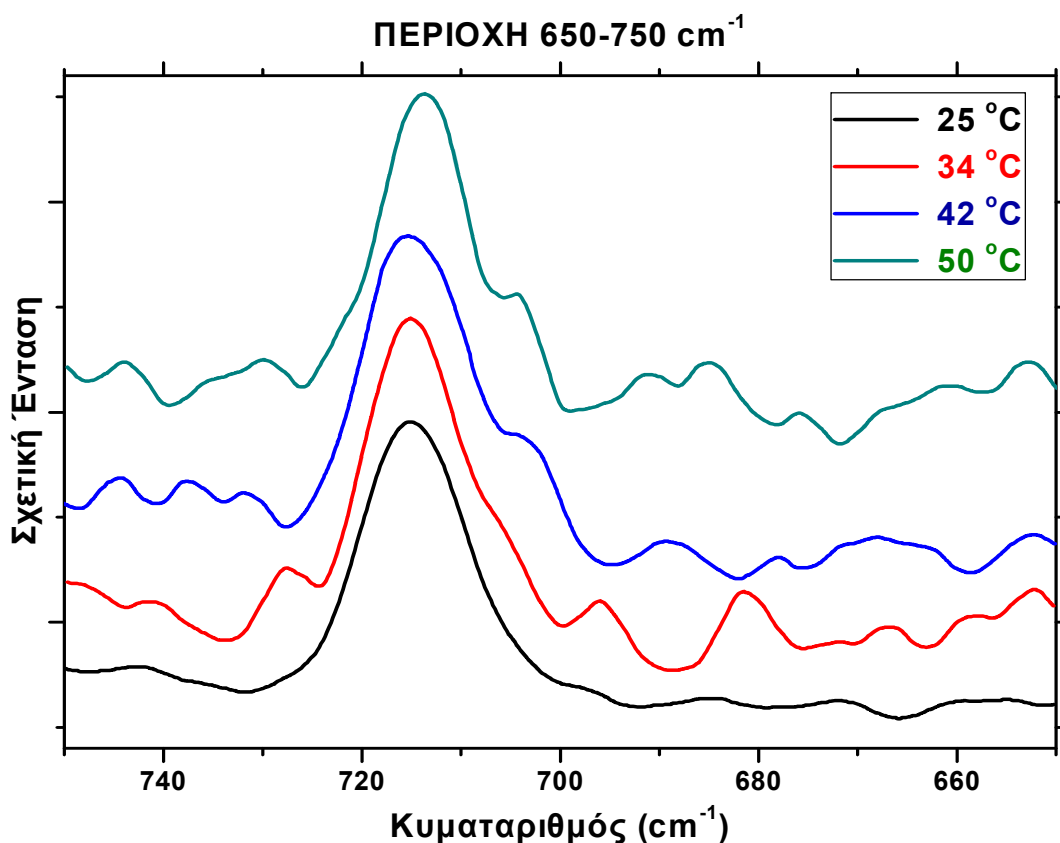


Σχήμα 3.6: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC στην περιοχή $1000 - 1200\text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.



Σχήμα 3.7: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} του δείγματος DPPC.

- Περιοχή 650 – 750 cm^{-1} :** Στην περιοχή αυτή εμφανίζεται μια κορυφή που προσδιορίζεται στους 715 cm^{-1} και η οποία αποδίδεται στη συμμετρική δόνηση έκτασης δεσμού C – N της πολικής κεφαλής της χολίνης (Σχήμα 3.8). Η ένταση της κορυφής αυτής δε μπορεί να αξιοποιηθεί ενώ από άποψη μετατόπισης είναι αυτή η οποία αλλάζει θέση λόγω της αλληλεπίδρασης του νερού με την πολική κεφαλή των διπλοστιβάδων. Η μετατόπιση αυτής της κορυφής σε χαμηλότερες συχνότητες προσδιορίζεται στους 2.8 cm^{-1} λόγω της αύξησης των δομών *gauche* που λαμβάνει η πολική κεφαλή με αποτέλεσμα να γίνεται πιο ευκίνητη.



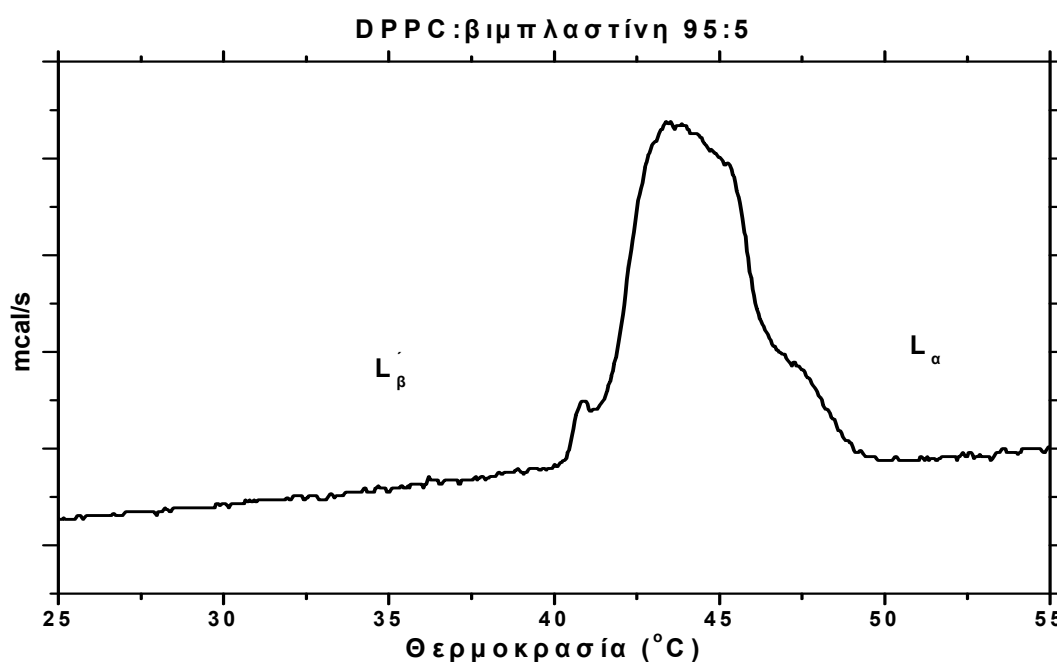
Σχήμα 3.8: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC στην περιοχή 650 – 750 cm^{-1} και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.

3.2 Αποτελέσματα δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 95:5.

3.2.1 Θερμική Ανάλυση

Το υπό εξέταση δείγμα παρασκευάστηκε με τον ίδιο τρόπο με αυτόν που παρασκευάστηκε το δείγμα της διπταμιτικής φωσφατιδυλοχολίνης για τη δημιουργία των λιπιδικών διπλοστιβάδων, αναμειγνύοντας κατάλληλες αναλογίες ώστε το μοριακό κλάσμα μεμβράνης:φαρμάκου να είναι 95:5. Για τη θερμική ανάλυση του δείγματος χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι ρυθμοί αύξησης της θερμοκρασίας με σκοπό την απ'ευθείας σύγκριση των λαμβανόμενων αποτελεσμάτων. Οι μετρήσεις σε κάθε δείγμα επαναλαμβάνονταν μέχρι την παρατήρηση τριών όμοιων θερμογραφημάτων.

Στο σχήμα 3.9 παρουσιάζεται το θερμογράφημα του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 95:5 στην περιοχή θερμοκρασιών του πειράματος. Σε αυτό παρατηρείται ότι με την εισδοχή του φαρμακευτικού μορίου στις διπλοστιβάδες, προκαλείται πλήρης εξαφάνιση της προμετάβασης φάσης, γεγονός που οφείλεται στην ισχυρή αλληλεπίδραση αυτού με την πολική κεφαλή της χολίνης.



Σχήμα 3.9: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 95:5.

Έτσι το σύστημα μεμβράνης:βιμπλαστίνη μεταβαίνει από τη φάση γέλης απ'ευθείας στην υγρή κρυσταλλική φάση, μέσω της κύριας μετάβασης φάσης, που παρατηρείται σε θερμοκρασία $T_m=43.31\text{ }^{\circ}\text{C}$, ενώ η αντίστοιχη ενθαλπία προσδιορίζεται στα $\Delta H_m= 6.99 \pm 0.35\text{ kcal/mol}$.

Παρατηρώντας την υφή του θερμογραφήματος, συμπεραίνεται πως η καμπύλη δεν είναι συμμετρική όπως στην περίπτωση των λιπιδικών μεμβρανών χωρίς την είσοδο του φαρμάκου (Σχ. 3.1). Αυτή η μορφή θερμογραφήματος μπορεί να αποδοθεί σε δύο παράγοντες: i) Σε γραμμομοριακή αναλογία 95:5 η ποσότητα της βιμπλαστίνης δεν ισοκατανέμεται μέσα στις λιπιδικές διπλοστιβάδες, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται πιθανά ταυτόχρονα περιοχές των διπλοστιβάδων “πλούσιες σε φάρμακο” (rich domains) σε χαμηλότερες θερμοκρασίες αλλά και περιοχές “φτωχές σε φάρμακο” (poor domains) στις υψηλότερες θερμοκρασίες. Οι διπλοστιβάδες με την μεγαλύτερη ποσότητα φαρμάκου είναι πιο εύηκτες με μικρότερη θερμοκρασία μεταβολής φάσης ενώ αυτές με την μικρότερη ποσότητα είναι πιο δύσνηκτες με μεγαλύτερη θερμοκρασία, ii) Λόγω λιποφιλικότητας ή/και στερεοχημικών παρεμποδίσεων η ποσότητα της βιμπλαστίνης δεν ενσωματώνεται πλήρως στις λιπιδικές διπλοστιβάδες, αλλά μέρος αυτής παρατηρείται επιδιαλυτωμένη στο υδατικό περιβάλλον και κοντά στην πολική κεφαλή της χολίνης.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι σε αυτή τη μικρή αναλογία, η βιμπλαστίνη δεν επηρεάζει τη ΔH . Αυτό ίσως να δείχνει ότι η δράση της είναι περισσότερο στην επιφάνεια της λιπιδικής διπλοστιβάδας.

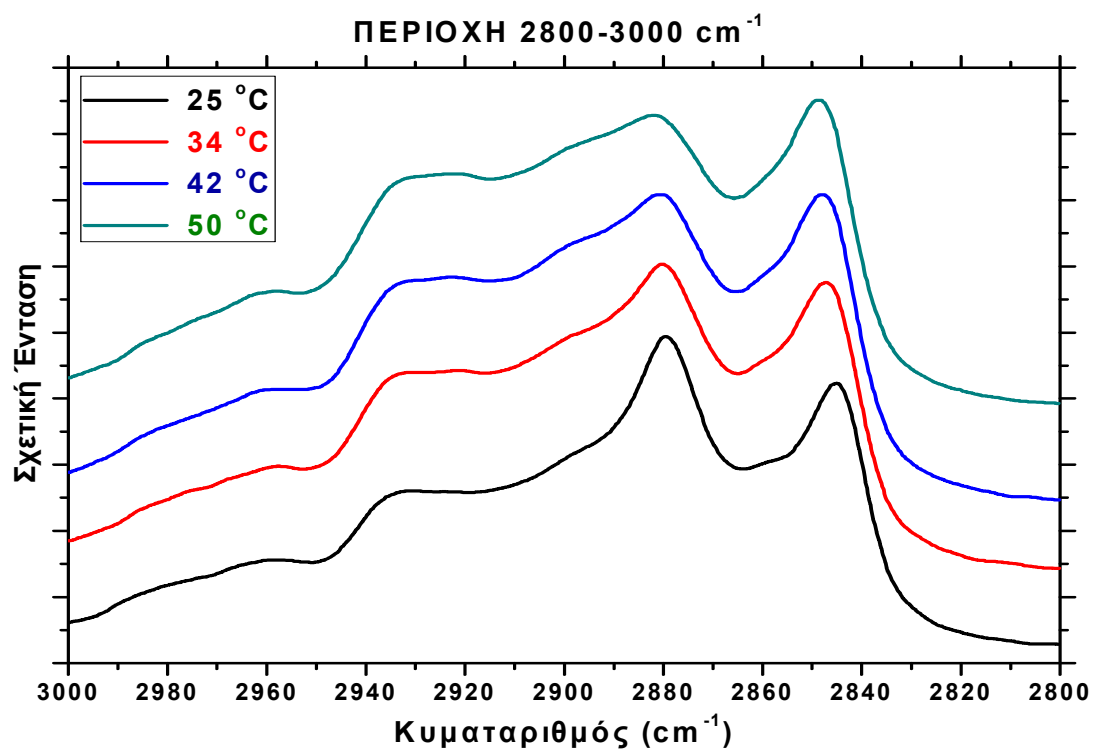
3.2.2 Φασματοσκοπία Raman

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τις τέσσερις διαφορετικές φασματικές περιοχές στο ίδιο δείγμα.

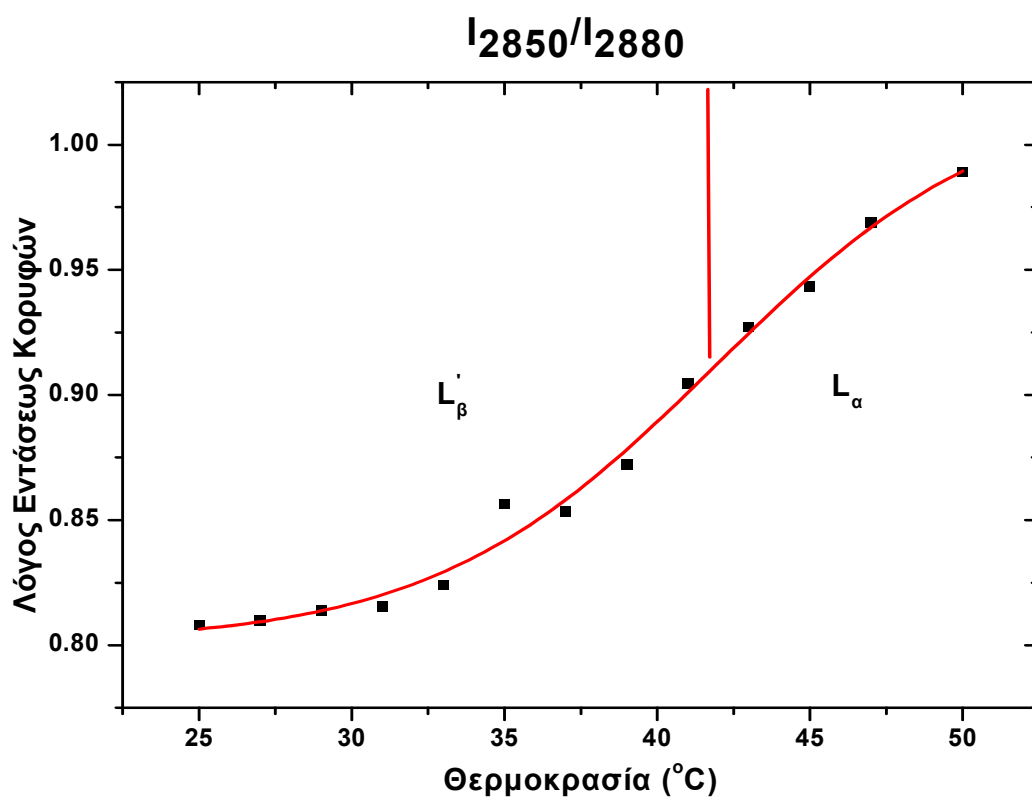
- **Περιοχή $2800 - 3000\text{ cm}^{-1}$:** Στο σχήμα 3.10 παρουσιάζονται τα φάσματα Raman του συστήματος μεμβράνης:βιμπλαστίνης 95:5 σε

τέσσερις (4) διαφορετικές θερμοκρασίες. Από τις εντάσεις των κορυφών αυτών υπολογίζονται οι λόγοι εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} και I_{2935}/I_{2880} .

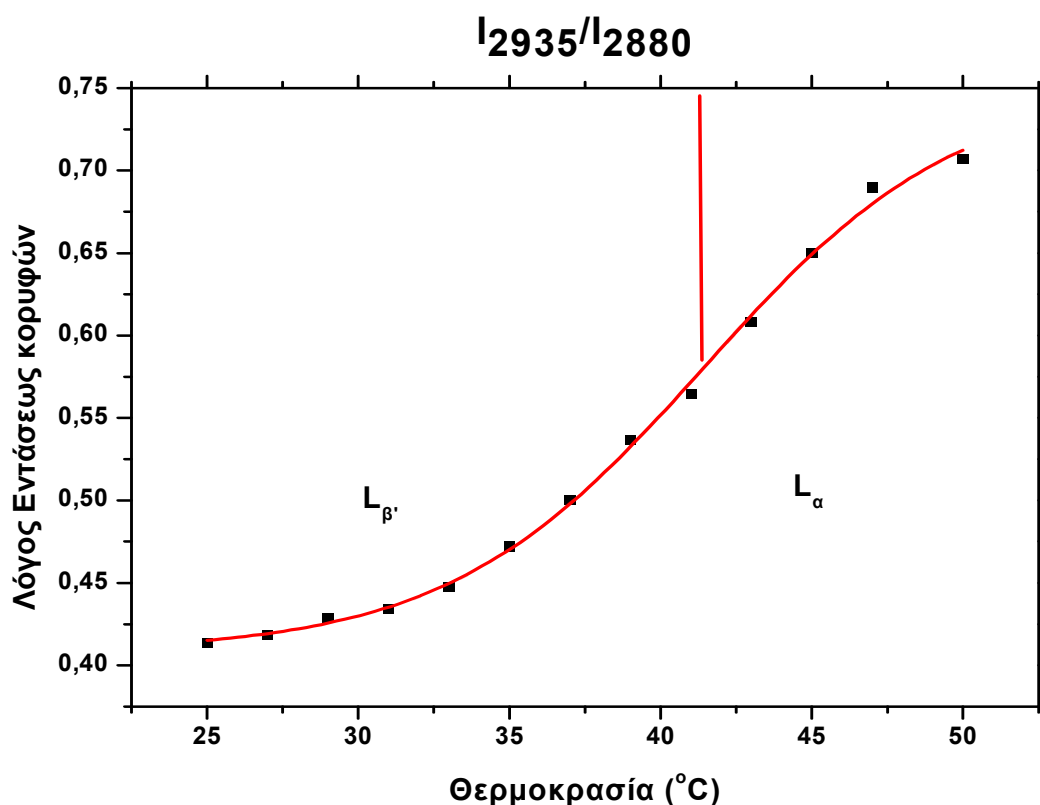
- **Λόγος I_{2850}/I_{2880} :** Η συμπεριφορά του λόγου αυτού είναι παρόμοια με αυτή στο δείγμα των λιπιδικών μεμβρανών DPPC, το σημείο καμπής της οποίας προσδιορίζεται στους 41.89 ± 0.91 °C (σχήμα 3.11). Το εύρος των τιμών του λόγου αυτού στο εξεταζόμενο σύστημα είναι $\Delta R_{I_{2850}/I_{2880}}^{95:5} = 0.18$, όπου 95:5 η μοριακή αναλογία του συστήματος μεμβράνη:βιμπλαστίνη.
- **Λόγος I_{2935}/I_{2880} :** Η συμπεριφορά του λόγου αυτού είναι παρόμοια με αυτή στο δείγμα των λιπιδικών μεμβρανών DPPC, το σημείο καμπής της οποίας προσδιορίζεται στους 41.42 ± 0.36 °C (σχήμα 3.12). Το εύρος των τιμών του λόγου αυτού στο εξεταζόμενο σύστημα είναι $\Delta R_{I_{2935}/I_{2880}}^{95:5} = 0.29$. Στο σχήμα 3.10 παριστάνονται επίσης οι μετατοπίσεις των μελετούμενων κορυφών. Συγκεκριμένα, η κορυφή στους 2850 cm^{-1} μετατοπίζεται σε υψηλότερες συχνότητες κατά 0.7 cm^{-1} ενώ αντίστοιχα η κορυφή στους 2880 cm^{-1} κατά 0.5 cm^{-1} . Παρατηρείται ότι, στην περίπτωση αυτή έχουμε μείωση της μετατόπισης των κορυφών σε υψηλότερες συχνότητες σε σχέση με το δείγμα της ενυδατωμένης φωσφατιδυλοχολίνης χωρίς την εισδοχή του φαρμάκου, διότι η είσοδος του φαρμακευτικού μορίου της βιμπλαστίνης εντοπίζεται όπως δείχνουν τα πειράματα Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης, στο ανώτερο τμήμα των πολικών κεφαλών της χολίνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το φάρμακο να μην προκαλεί διαταραχή στις αλειφατικές αλυσίδες των λιπιδικών διπλοστιβάδων και αυτές να μην παρουσιάζουν μεταβολή.



Σχήμα 3.10: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιμπλασίνη 95:5 στην περιοχή 2800 – 3000 cm^{-1} και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.

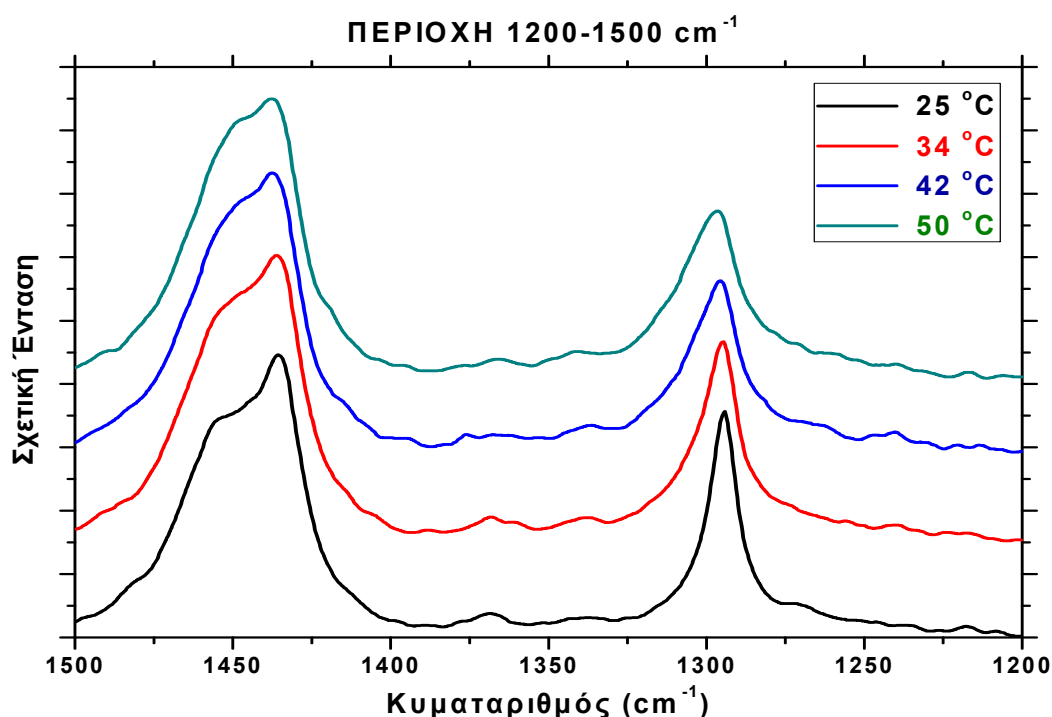


Σχήμα 3.11: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} του δείγματος DPPC:βιμπλασίνη 95:5.



Σχήμα 3.12: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2935}/I_{2880} του δείγματος DPPC:βιμπλασίνη 95:5.

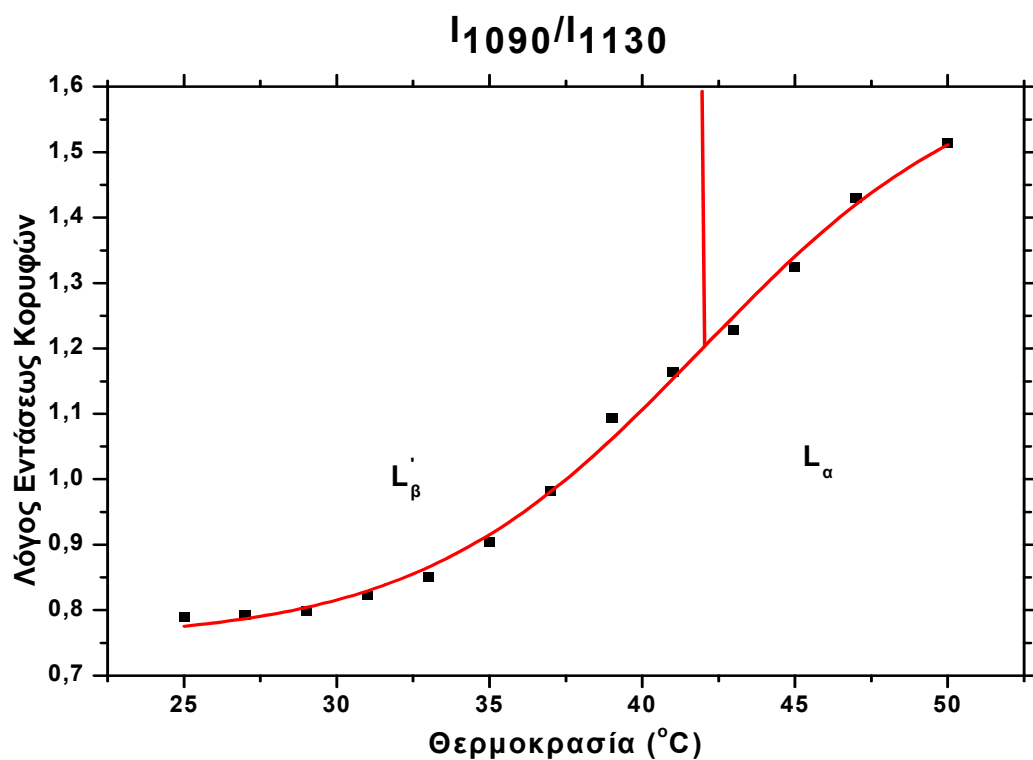
- Περιοχή $1200 - 1500 \text{ cm}^{-1}$:** Στην περιοχή αυτή, οι κορυφές που παρατηρούνται, παρουσιάζουν μια μετατόπιση σε υψηλότερες συχνότητες με αντίστοιχη αύξηση της θερμοκρασίας. Η κορυφή στους 1295 cm^{-1} μετατοπίζεται κατά 0.5 cm^{-1} ενώ αυτή στους 1436 cm^{-1} κατά 0.4 cm^{-1} (σχήμα 3.13), ενώ το αποτέλεσμα του διαχωρισμού κορυφών παρουσιάζεται στο σχήμα Π.3. Και σε αυτή την περίπτωση, η μετατόπιση των κορυφών είναι μικρότερη σε σχέση με αυτή των λιπιδικών διπλοστιβάδων DPPC χωρίς την προσθήκη βιμπλασίνης, επιβεβαιώνοντας την ισχυρή αλληλεπίδραση με την πολική κεφαλή. Επίσης, από την εξέταση του λόγου I_{1457}/I_{1436} (Σχήμα Π.4), παρατηρείται αύξηση των τιμών του λόγου αυτού, συμπεριφορά η οποία δεικνύει ελάττωση των διαμορικών αλληλεπιδράσεων των γειτονικών αλειφατικών αλυσίδων.



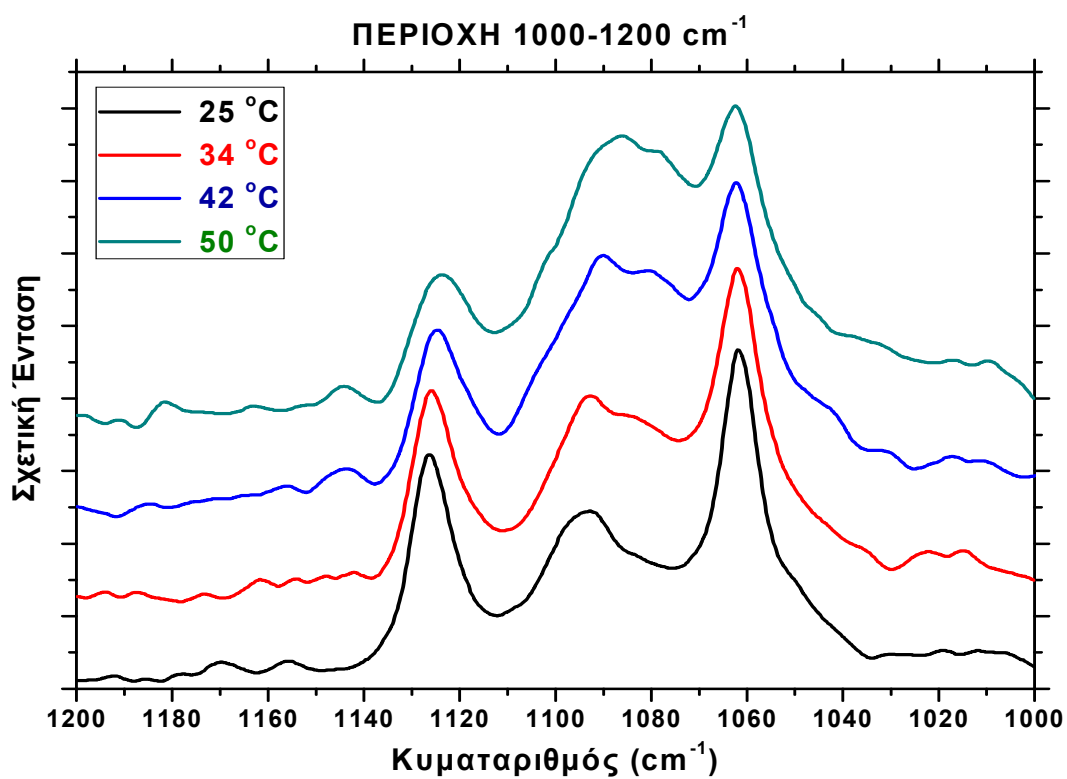
Σχήμα 3.13: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 95:5 στην περιοχή 1200 – 1500 cm^{-1} και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.

- **Περιοχή 1000 – 1200 cm^{-1} :** Στην περιοχή αυτή υπολογίζεται ο λόγος των εντάσεων κορυφών Raman, ο οποίος δείχνει τη συμπεριφορά των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων στο δείγμα. Ο λόγος αυτός απεικονίζεται με μια σιγμοειδή καμπύλη, το σημείο καμπής της οποίας προσδιορίζεται στους 41.93 ± 0.60 °C (σχήμα 3.14). Το εύρος των τιμών του λόγου αυτού στο εξεταζόμενο σύστημα είναι $\Delta R_{I_{1090}/I_{1130}}^{95:5} = 0.72$.

Στο σχήμα 3.15, παριστάνονται οι μετατοπίσεις των κορυφών οι οποίες εξετάζονται. Η κορυφή στους 1090 cm^{-1} μετατοπίζεται κατά 3 cm^{-1} ενώ η κορυφή στους 1130 cm^{-1} κατά 1.1 cm^{-1} , αντίστοιχα. Παρατηρείται ότι και στην περίπτωση των κορυφών αυτών, η μετατόπιση είναι μικρότερη λόγω της σταθεροποίησης των αλειφατικών αλυσίδων. Η παρουσία όμως του φαρμάκου σε αυτή τη μοριακή αναλογία επιφέρει αλλαγή στις τιμές του λόγου I_{1090}/I_{1130} , γεγονός το οποίο οφείλεται στην παρουσία του ποσοστού του φαρμάκου που έχει εισχωρήσει μέσα στις λιπιδικές διπλοστιβάδες.

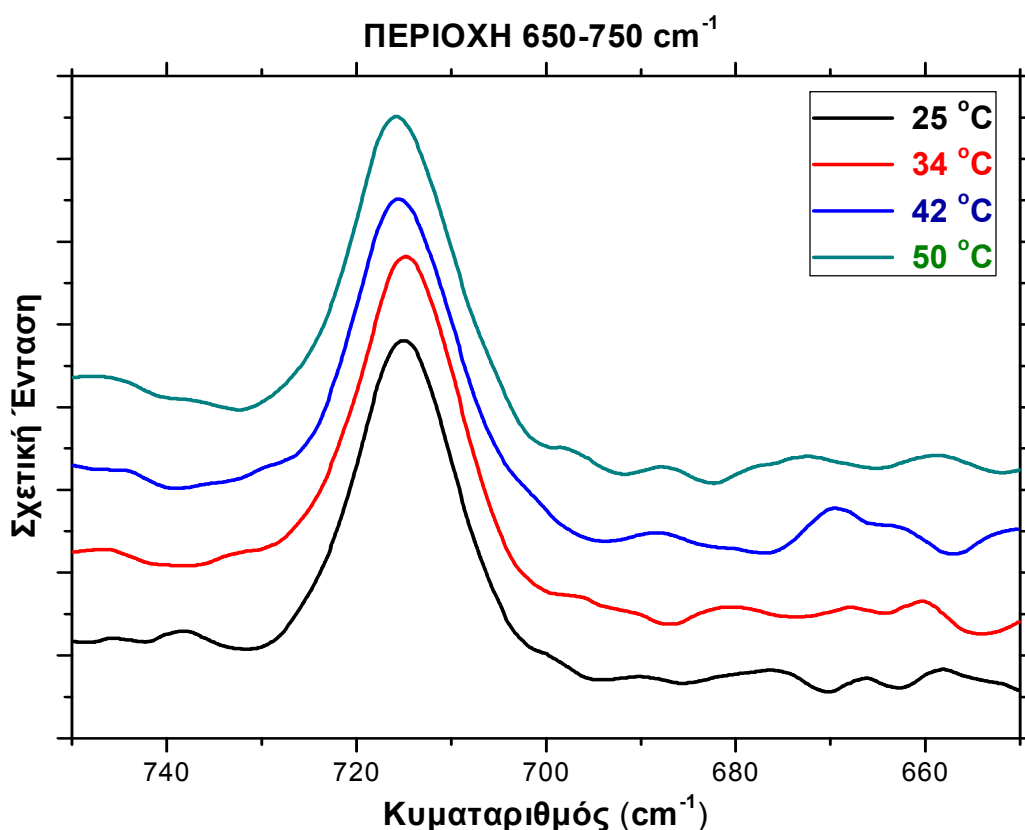


Σχήμα 3.14: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} του δείγματος DPPC:βιμπλασίνη 95:5



Σχήμα 3.15: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιμπλασίνη 95:5 στην περιοχή 1000 – 1200 cm^{-1} και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.

- Περιοχή 650 – 750 cm^{-1} :** Η κορυφή στους 715 cm^{-1} παρουσιάζει μια μετατόπιση της τάξης των 1.7 cm^{-1} με αύξηση της θερμοκρασίας σε υψηλότερες συχνότητες (σχήμα 3.16). Σε αντίθεση, στο δείγμα των λιπιδικών διπλοστιβάδων DPPC χωρίς την εισδοχή του φαρμάκου, παρατηρείται μετατόπιση σε χαμηλότερες συχνότητες. Η διαφορά αυτή οφείλεται στην έντονη αλληλεπίδραση που παρουσιάζει το φαρμακευτικό μόριο της βιμπλαστίνης με την πολική κεφαλή της χολίνης αυτών. Αυτή η μετατόπιση, επιβεβαιώνει και τα αποτελέσματα της Θερμικής Ανάλυσης, δηλαδή την αύξηση της θερμοκρασίας κύριας αλλαγής φάσης λόγω της αλληλεπίδρασης του φαρμάκου με την πολική κεφαλή της χολίνης.



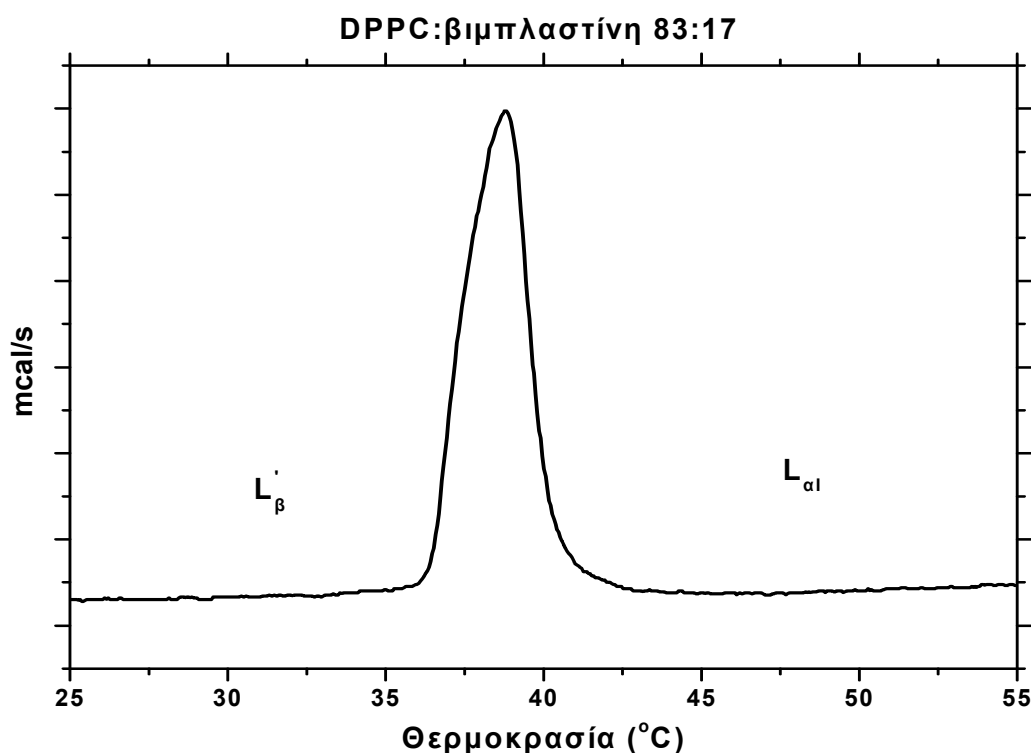
Σχήμα 3.16: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 95:5 στην περιοχή 650 – 750 cm^{-1} και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.

3.3 Αποτελέσματα δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 83:17.

3.3.1 Θερμική Ανάλυση

Στο σχήμα 3.17 παρουσιάζεται το θερμογράφημα του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 83:17 στην περιοχή θερμοκρασιών του πειράματος. Σε αυτό παρατηρείται ότι με την εισδοχή του φαρμακευτικού μορίου στις λιπιδικές διπλοστιβάδες, προκαλείται πλήρης εξαφάνιση της προμετάβασης φάσης, όπως και στην περίπτωση του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 95:5, γεγονός που οφείλεται στην ισχυρή αλληλεπίδραση αυτού με την πολική κεφαλή της χολίνης.

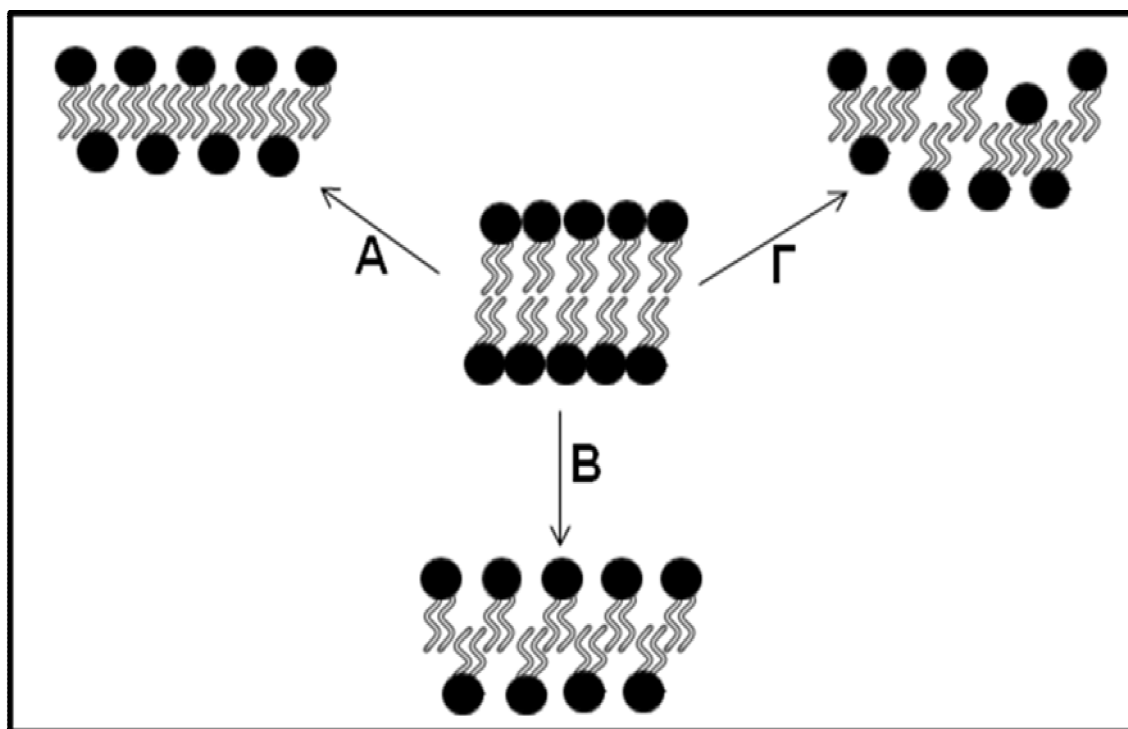
Έτσι το σύστημα μεμβράνη:βιμπλαστίνη μεταβαίνει από τη φάση γέλης στην υγρή κρυσταλλική φάση, μέσω της κύριας μετάβασης φάσης, που παρατηρείται σε θερμοκρασία $T_m=38.64\text{ }^{\circ}\text{C}$, ενώ η αντίστοιχη μεταβολή ενθαλπίας προσδιορίζεται στα $\Delta H_m= 8.12 \pm 0.41\text{ kcal/mol}$.



Σχήμα 3.17: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 83:17.

Παρατηρώντας την υφή του θερμογραφήματος, συμπεραίνεται πως η καμπύλη θέρμανσης είναι συμμετρική, γεγονός το οποίο σημαίνει ότι το δείγμα είναι πλήρως ομογενοποιημένο (Σχ. 3.17). Στη συγκεκριμένη περίπτωση όμως, παρατηρείται ότι η κύρια μετάβαση φάσης παρουσιάζει μια αύξηση σε ενεργειακές απαιτήσεις συγκριτικά με αυτή των λιπιδικών διπλοστιβάδων DPPC ($\Delta H_m = 6.95 \pm 0.35 \text{ kcal/mol}$). Παρατηρείται δηλαδή αύξηση της ΔH_m κατά 1.17 kcal/mol ή αλλιώς 14.4%.

Το φαινόμενο αυτό της αύξησης της απαιτούμενης μεταβολής ενθαλπίας, έχει αποδοθεί στη διεθνή βιβλιογραφία με τον όρο αλληλοεισχώρηση ή αλληλοδιείσδυση ή αλληλοπεριχώρηση (**interdigitation**) των απέναντι λιπιδικών αλυσίδων στη διάταξη ουρά – ουρά. Ανάλογα με την αύξηση της μεταβολής ενθαλπίας το φαινόμενο αυτό μπορεί να χαρακτηριστεί ως: i) ολική αλληλοεισχώρηση (**full interdigitation**), ii) μερική αλληλοεισχώρηση (**partial interdigitation**), iii) ενδιάμεση αλληλοεισχώρηση (**mixed interdigitation**). Από χημικής δομής και λειτουργίας, τα μόρια τα οποία μπορούν να δημιουργήσουν αλληλοεισχώρηση πρέπει να είναι: i) αμφίφιλα, ii) ογκώδη iii) μικρού μήκους και iv) να δρουν στην μεσεπιφάνεια, δηλαδή στην περιοχή κοντά στις πολικές κεφαλές της χολίνης και του ανώτερου τμήματος των λιπιδικών αλυσίδων. Στην περίπτωσή μας, το φαρμακευτικό μόριο της βιμπλαστίνης παρουσιάζει όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά. Συγκρίνοντας την αύξηση της ενθαλπίας που παρατηρείται, με βιβλιογραφικά δεδομένα άλλων συστημάτων που παρουσιάζουν αλληλοεισχώρηση, συμπεραίνεται ότι στην περίπτωση της βιμπλαστίνης εμφανίζεται το φαινόμενο της μερικής αλληλοεισχώρησης (Εικόνα 3.1) [75-82].



Εικόνα 3.1: Διάφορα είδη αλληλοεισχώρησης μετά από α) αλλαγή συνθηκών και β) εισδοχή βιοδραστικών μορίων. Α) Ολική αλληλοεισχώρηση, Β) Μερική αλληλοεισχώρηση και Γ) Ενδιάμεση αλληλοεισχώρηση.

3.3.2 Φασματοσκοπία Raman

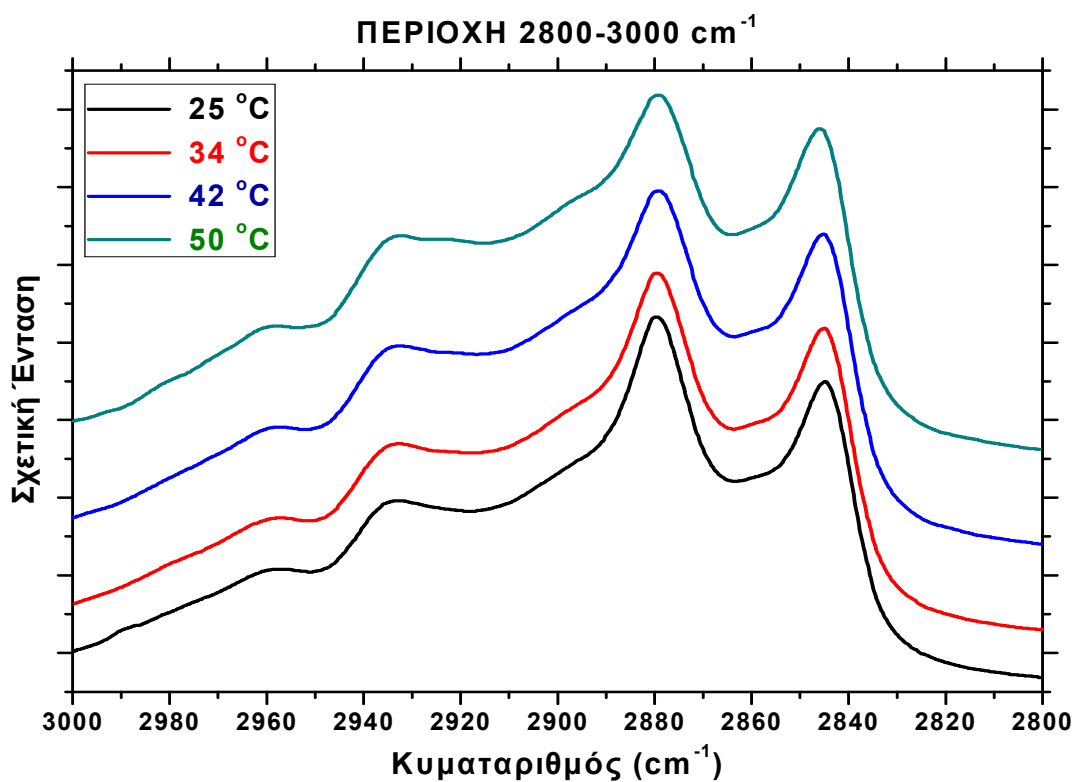
Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τις τέσσερις διαφορετικές φασματικές περιοχές.

- **Περιοχή $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$:** Στο σχήμα 3.18 παρουσιάζονται τα φάσματα Raman του συστήματος μεμβράνης:βιμπλαστίνης 83:17 σε τέσσερις (4) διαφορετικές θερμοκρασίες. Από τις εντάσεις των κορυφών αυτών υπολογίζονται οι λόγοι εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} και I_{2935}/I_{2880} .

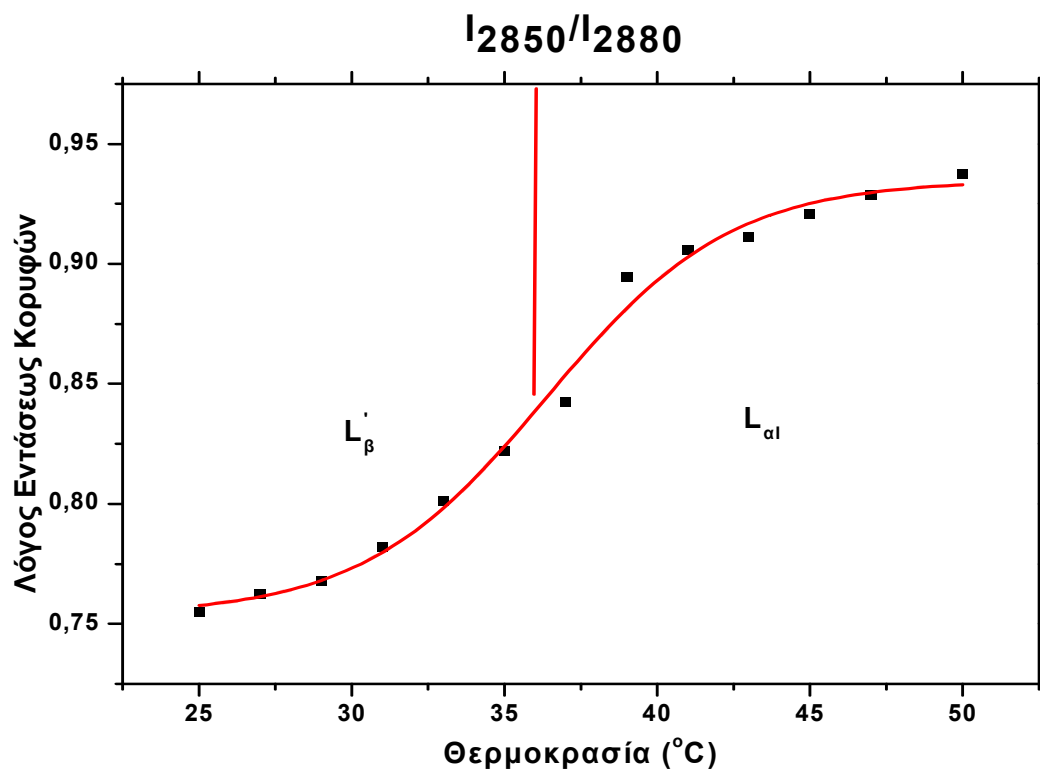
- **Λόγος I_{2850}/I_{2880} :** Η συμπεριφορά του λόγου αυτού είναι παρόμοια με αυτή στο δείγμα των λιπιδικών μεμβρανών DPPC, το σημείο καμπής της οποίας προσδιορίζεται στους 36.37 ± 0.38 °C (σχήμα 3.19). Το εύρος των τιμών του λόγου αυτού στο

εξεταζόμενο σύστημα είναι $\Delta R_{I_{2850}/I_{2880}}^{83:17} = 0.18$. Επιπρόσθετα, συγκρίνοντας τις απόλυτες τιμές του λόγου στις αντίστοιχες θερμοκρασίες, παρατηρείται ότι πριν την αλλαγή φάσης αυτές είναι παρόμοιες, γεγονός που εκφράζει την ομοιότητα των καταστάσεων σε όλα τα έως τώρα μελετημένα δείγματα. Όμως μετά την αλλαγή φάσης, αυτές παρουσιάζονται μικρότερες, γεγονός που ερμηνεύεται με αύξηση της τάξης (οργάνωσης) των λιπιδικών αλυσίδων των διπλοστιβάδων. Η συμπεριφορά αυτή είναι σε συμφωνία με την εμφάνιση του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης, αφού σε αυτήν τα τελικά άκρα των αλκυλικών αλυσίδων αλληλοεισχωρούν με αποτέλεσμα να παρατηρείται μείωση της κινητικότητας των τελικών άκρων αυτών.

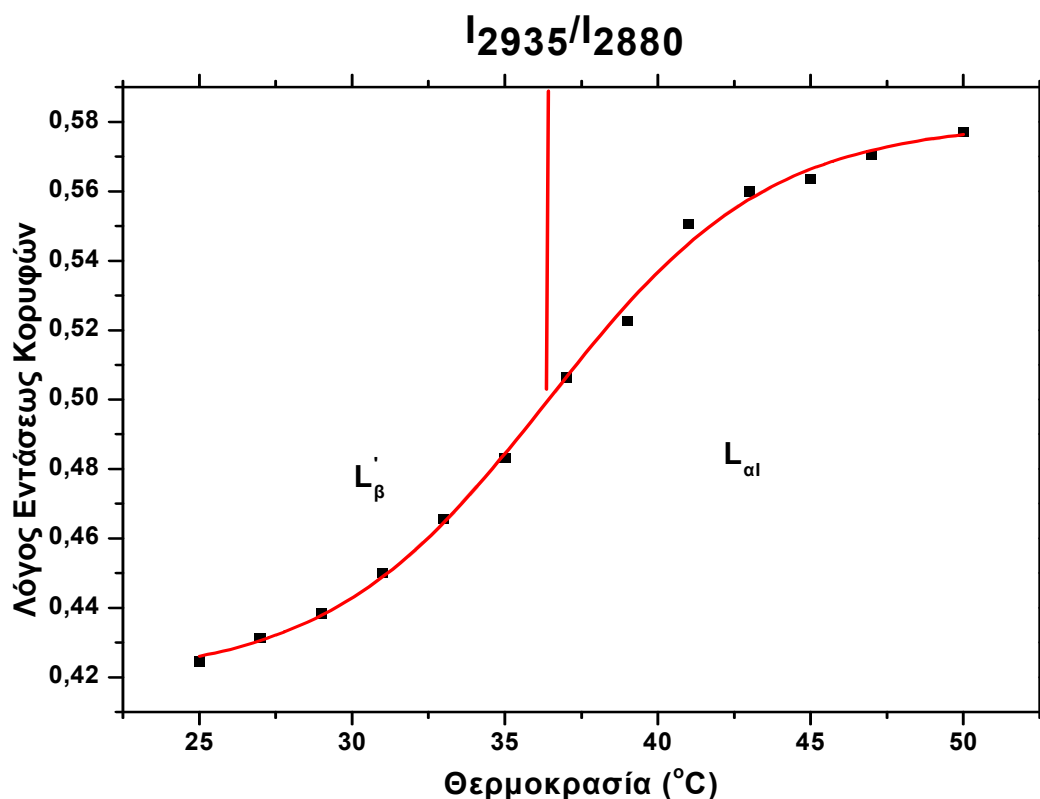
- **Λόγος I_{2935}/I_{2880} :** Η συμπεριφορά του λόγου αυτού είναι παρόμοια με αυτή στο δείγμα των λιπιδικών μεμβρανών DPPC, το σημείο καμπής της οποίας προσδιορίζεται στους 36.4 °C (σχήμα 3.20). Το εύρος των τιμών του λόγου αυτού στο εξεταζόμενο σύστημα είναι $\Delta R_{I_{2935}/I_{2880}}^{83:17} = 0.11$. Επίσης, συγκρίνοντας τις τιμές του λόγου με αυτές των προηγούμενων δειγμάτων και σε ίδια θερμοκρασία, είναι μικρότερες μετά την κύρια αλλαγή φάσης, γεγονός που συνηγορεί με το φαινόμενο της αλληλοεισχώρησης.



Σχήμα 3.18: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 83:17 στην περιοχή 2800 – 3000 cm^{-1} και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.



Σχήμα 3.19: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 83:17.

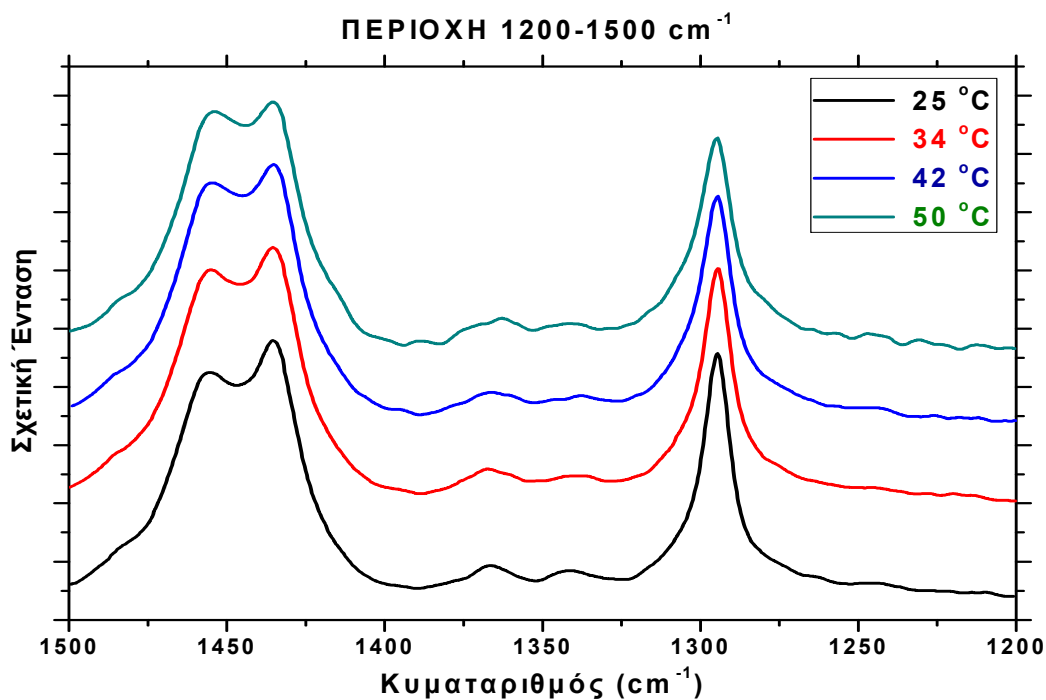


Σχήμα 3.20: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2935}/I_{2880} του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 83:17.

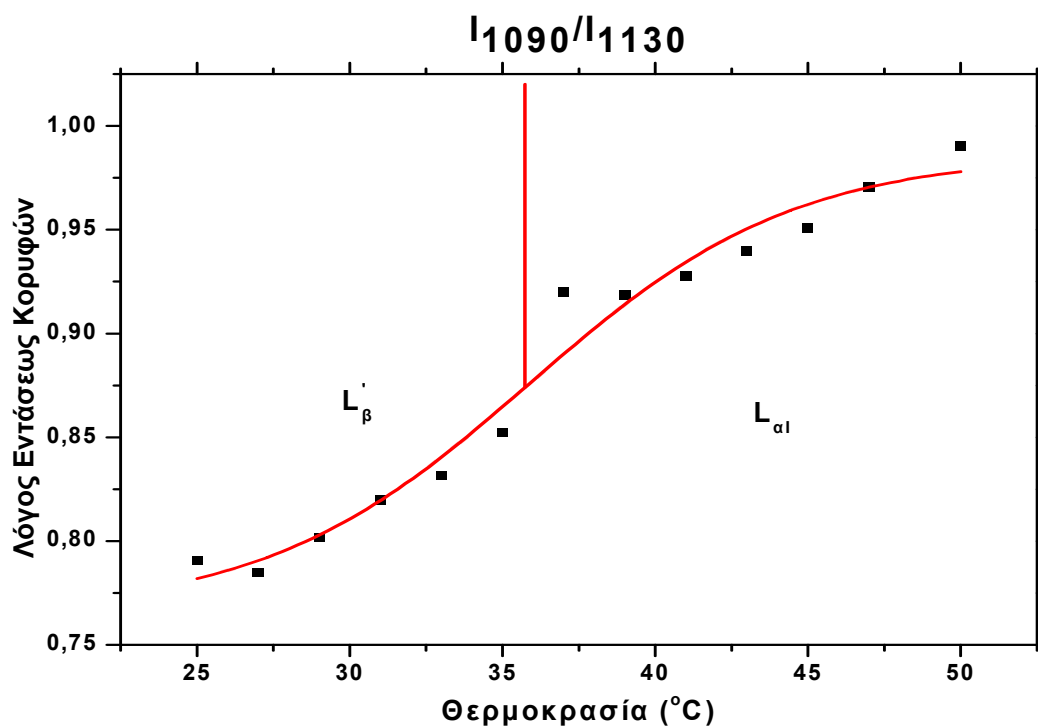
Στο σχήμα 3.18 παρατηρούνται επίσης οι μετατοπίσεις των μελετούμενων κορυφών. Συγκεκριμένα, η κορυφή στους 2850 cm^{-1} μετατοπίζεται σε υψηλότερες συχνότητες κατά 1.1 cm^{-1} ενώ αντίστοιχα η κορυφή στους 2880 cm^{-1} κατά 1.7 cm^{-1} . Γενικά παρατηρείται μείωση της μετατόπισης των κορυφών σε υψηλότερες συχνότητες σε σχέση με το δείγμα της ενυδατωμένης φωσφατιδυλοχολίνης χωρίς την εισδοχή του φαρμάκου αλλά αύξηση σε σχέση με το δείγμα DPPC:βιμπλαστίνη 95:5, διότι από τη μια η είσοδος του φαρμακευτικού μορίου εντοπίζεται στο ανώτερο τμήμα των πολικών κεφαλών της χολίνης και από την άλλη λόγω της αυξημένης ποσότητας του φαρμάκου η οποία ενσωματώνεται επηρεάζει και τις αλειφατικές αλυσίδες. Επίσης, οι μικρότερες μετατοπίσεις οφείλονται και στην εμφάνιση του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης.

- Περιοχή 1200 – 1500 cm^{-1} :** Στο σχήμα 3.21 παρατηρείται ότι η κορυφή στους 1294 cm^{-1} μετατοπίζεται κατά 1 cm^{-1} ενώ στους 1436 cm^{-1} κατά 1.4 cm^{-1} . Και σε αυτή την περίπτωση, η μετατόπιση των κορυφών είναι μικρότερη σε σχέση με αυτή των διπλοστιβάδων χωρίς την προσθήκη φαρμάκου αλλά μεγαλύτερη από αυτή του δείγματος DPRPC:βιμπλαστίνη 95:5. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με την έκφραση του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης και την παρουσία ποσότητας φαρμακευτικού μορίου στο ενδότερο τμήμα των αλυσίδων. Το αποτέλεσμα του διαχωρισμού κορυφών φαίνεται στο σχήμα Π.5, ενώ η συμπεριφορά του λόγου I_{1457}/I_{1436} στο σχήμα Π.6. Η αύξηση των τιμών του λόγου σε σχέση με αυτές των λιπιδικών διπλοστιβάδων σε χαμηλές θερμοκρασίες, δεικνύουν ασθενέστερες αλληλεπιδράσεις των γειτονικών αλυσίδων και μεγαλύτερη ρευστότητα των διπλοστιβάδων. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες από τη θερμοκρασία κύριας μετάβασης φάσης παρατηρείται μείωση των τιμών αυτών, αποτέλεσμα της ισχυροποίησης των αλληλεπιδράσεων λόγω του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης.
- Περιοχή 1000 – 1200 cm^{-1} :** Στην περιοχή αυτή υπολογίζεται ο λόγος των εντάσεων κορυφών Raman, ο οποίος δείχνει τη συμπεριφορά των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων στο δείγμα. Ο λόγος αυτός απεικονίζεται με μια σιγμοειδή καμπύλη, το σημείο καμπής της οποίας προσδιορίζεται στους $35.8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (σχήμα 3.22). Το εύρος των τιμών του λόγου αυτού στο εξεταζόμενο σύστημα είναι $\Delta R_{11090/11130}^{83:17} = 0.20$. Παρατηρείται, ότι το εύρος των τιμών αυτών, είναι πολύ μικρότερο σε σχέση με αυτό των προηγούμενων δειγμάτων. Η μείωση αυτή ισοδυναμεί με μείωση του ποσοστού ισομερείωσης των αλυσίδων από διαμόρφωση *trans* σε διαμόρφωση *gauche*, φαινόμενο που συμβαδίζει με αύξηση της οργάνωσης των αλυσίδων και αλληλοεισχώρησης μεταξύ τους. Από το σχήμα 3.23, φαίνονται οι μετατοπίσεις των κορυφών οι οποίες εξετάζονται. Η κορυφή στους 1090 cm^{-1} μετατοπίζεται κατά 5.6 cm^{-1} ενώ αυτή στους 1130 cm^{-1} κατά 2 cm^{-1} , αντίστοιχα. Παρατηρείται ότι και στη περίπτωση των κορυφών αυτών,

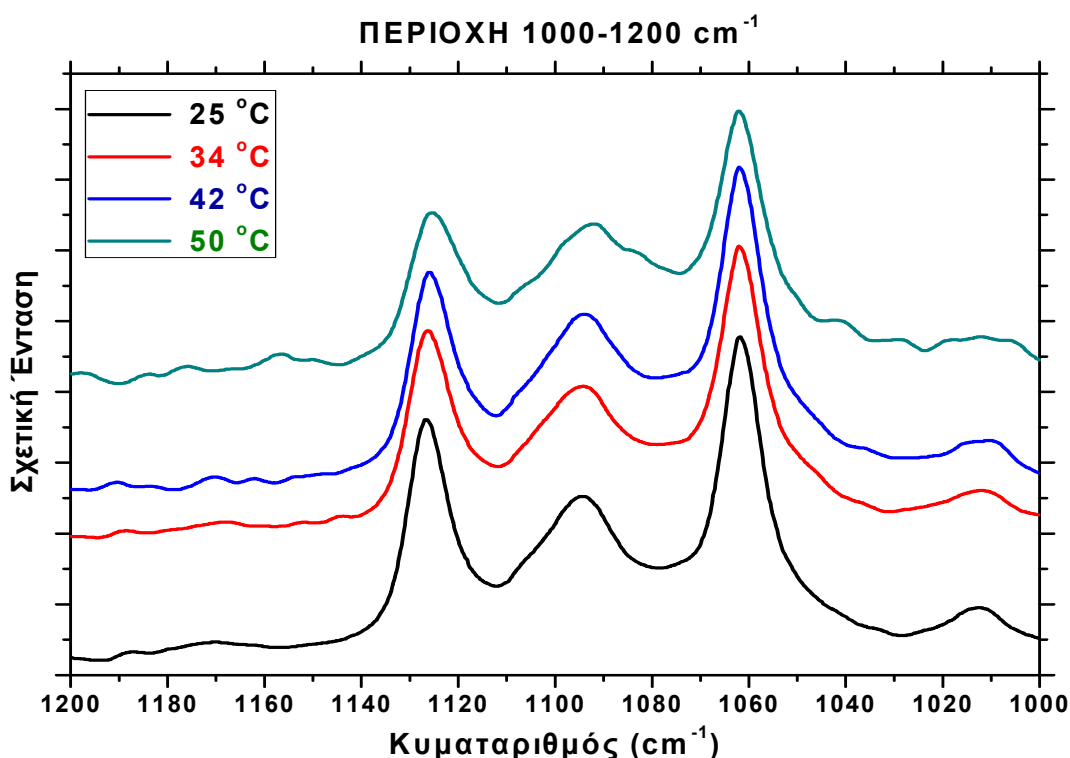
η μετατόπιση είναι μικρότερη λόγω της σταθεροποίησης των αλειφατικών αλυσίδων.



Σχήμα 3.21: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 87:13 στην περιοχή 1200 – 1500 cm^{-1} και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.

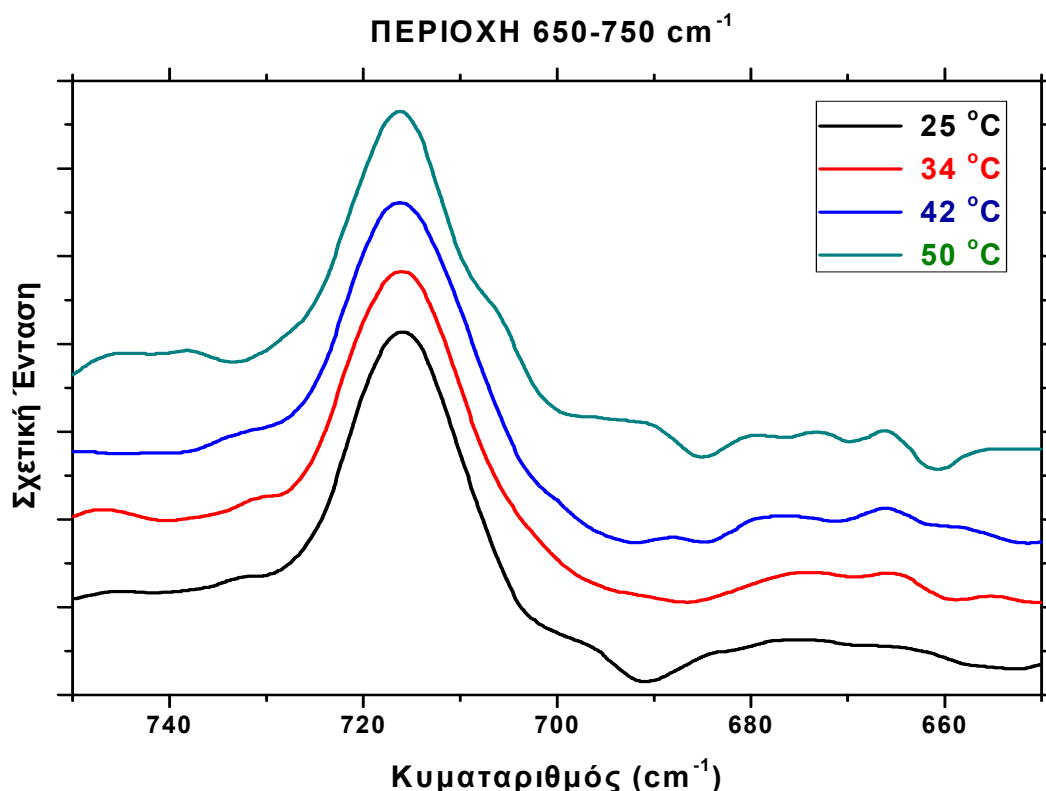


Σχήμα 3.22: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 83:17.



Σχήμα 3.23: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 83:17 στην περιοχή 1000 – 1200 cm^{-1} και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.

- Περιοχή 650 – 750 cm^{-1} :** Η κορυφή στους 715 cm^{-1} παρουσιάζει μια μετατόπιση της τάξης των 1 cm^{-1} με αύξηση της θερμοκρασίας σε υψηλότερες συχνότητες (σχήμα 3.24). Η θετική μετατόπιση της κορυφής αυτής πιστοποιεί την αλληλεπίδραση της βιμπλαστίνης με την πολική κεφαλή των λιπιδικών διπλοστιβάδων και σε σύγκριση με το δείγμα DPPC:βιμπλαστίνη 95:5, αυτή εμφανίζεται μικρότερη λόγω αλληλεπίδρασης και με τις λιπιδικές αλυσίδες.



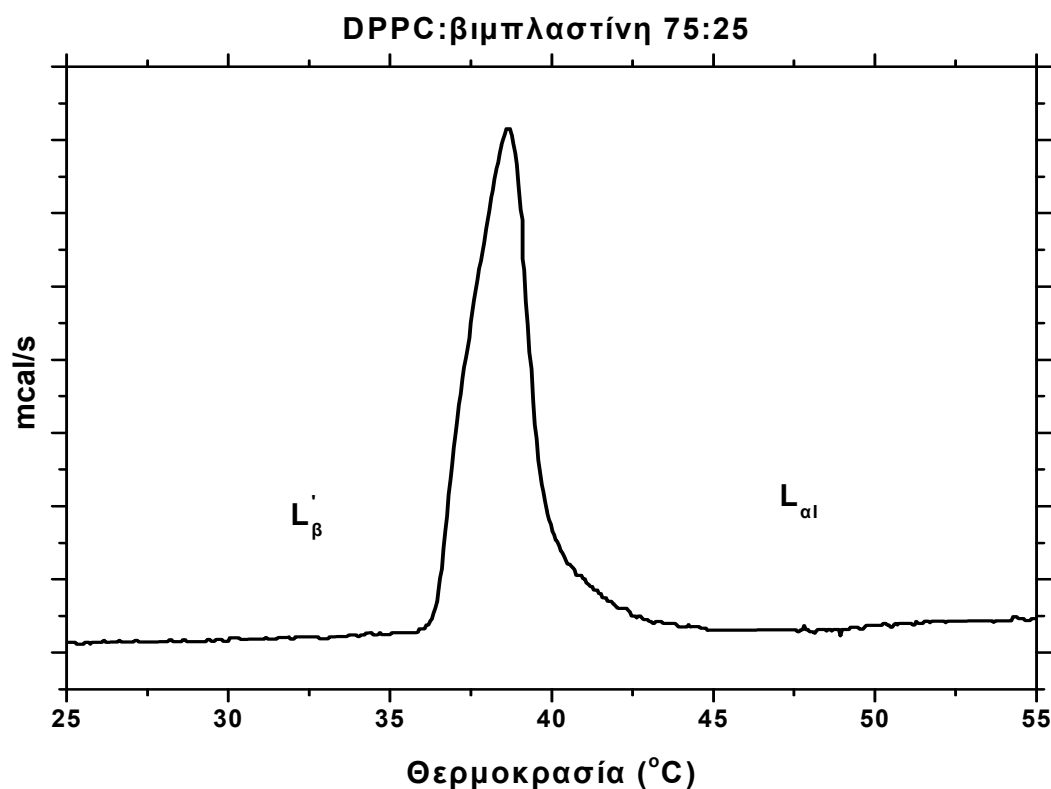
Σχήμα 3.24: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 83:17 στην περιοχή 650 – 750 cm^{-1} και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.

3.4 Αποτελέσματα δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 75:25.

3.4.1 Θερμική Ανάλυση

Στο σχήμα 3.25 παρουσιάζεται το θερμογράφημα του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 75:25 στην περιοχή θερμοκρασιών του πειράματος. Σε αυτό φαίνεται ότι με την εισδοχή του φαρμακευτικού μορίου στις διπλοστιβάδες, προκαλείται πλήρης εξαφάνιση της προμετάβασης φάσης, όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις, φαινόμενο το οποίο οφείλεται στην ισχυρή αλληλεπίδραση αυτού με την πολική κεφαλή της χολίνης. Έτσι το σύστημα μεμβράνη:φαρμάκου μεταβαίνει από την φάση γέλης στην υγρή κρυσταλλική φάση, μέσω της κύριας μετάβασης φάσης, που παρατηρείται σε θερμοκρασία $T_m = 38.54\text{ }^{\circ}\text{C}$, ενώ η αντίστοιχη μεταβολή ενθαλπίας προσδιορίζεται στα $\Delta H_m = 8.29 \pm 0.42\text{ kcal/mol}$. Λόγω της αύξησης της

μεταβολής ενθαλπίας κατά 1.34 kcal/mol ή αλλιώς 16.2%, συμπεραίνεται ότι στην υγρή κρυσταλλική φάση παρατηρείται ισχυρότερο το φαινόμενο της αλληλοεισχώρησης.



Σχήμα 3.25: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 75:25.

3.4.2 Φασματοσκοπία Raman

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τις τέσσερις διαφορετικές φασματικές περιοχές.

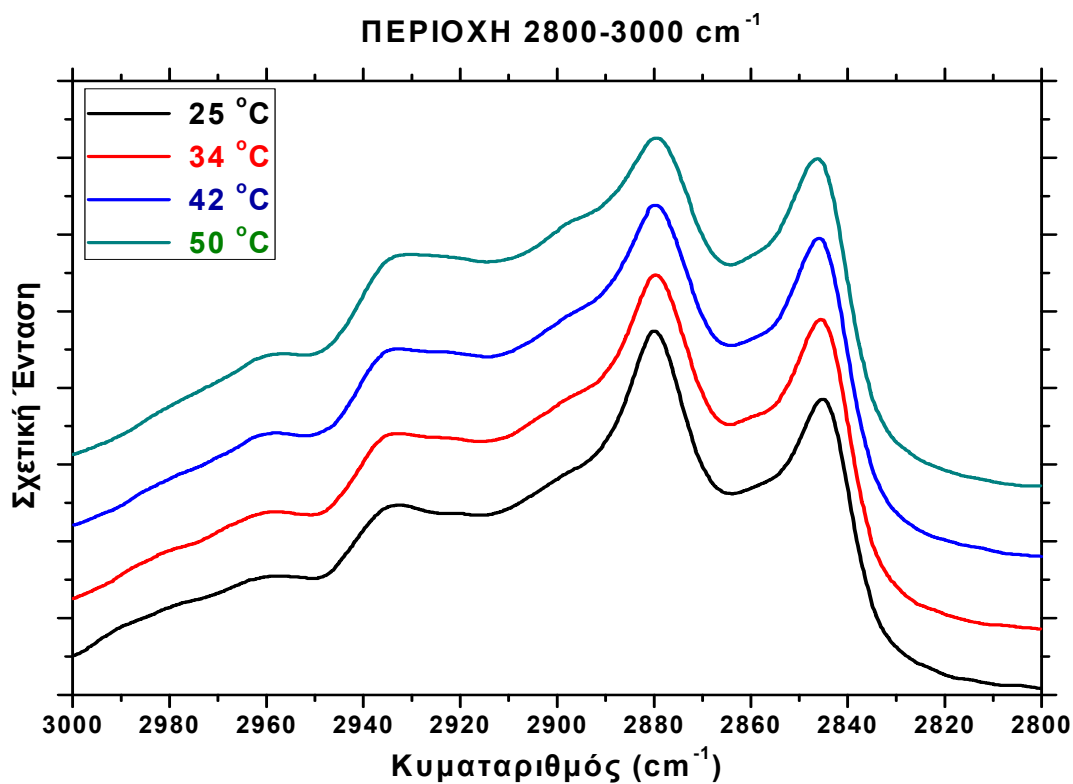
- **Περιοχή $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$:** Στο σχήμα 3.26 παρουσιάζονται τα φάσματα Raman του συστήματος μεμβράνης:βιμπλαστίνης 75:25 σε τέσσερις (4) διαφορετικές θερμοκρασίες. Από τις εντάσεις των κορυφών αυτών υπολογίζονται οι λόγοι εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} και I_{2935}/I_{2880} .

➤ **Λόγος I_{2850}/I_{2880} :** Η συμπεριφορά του λόγου αυτού είναι παρόμοια με αυτή στο δείγμα των λιπιδικών μεμβρανών, το

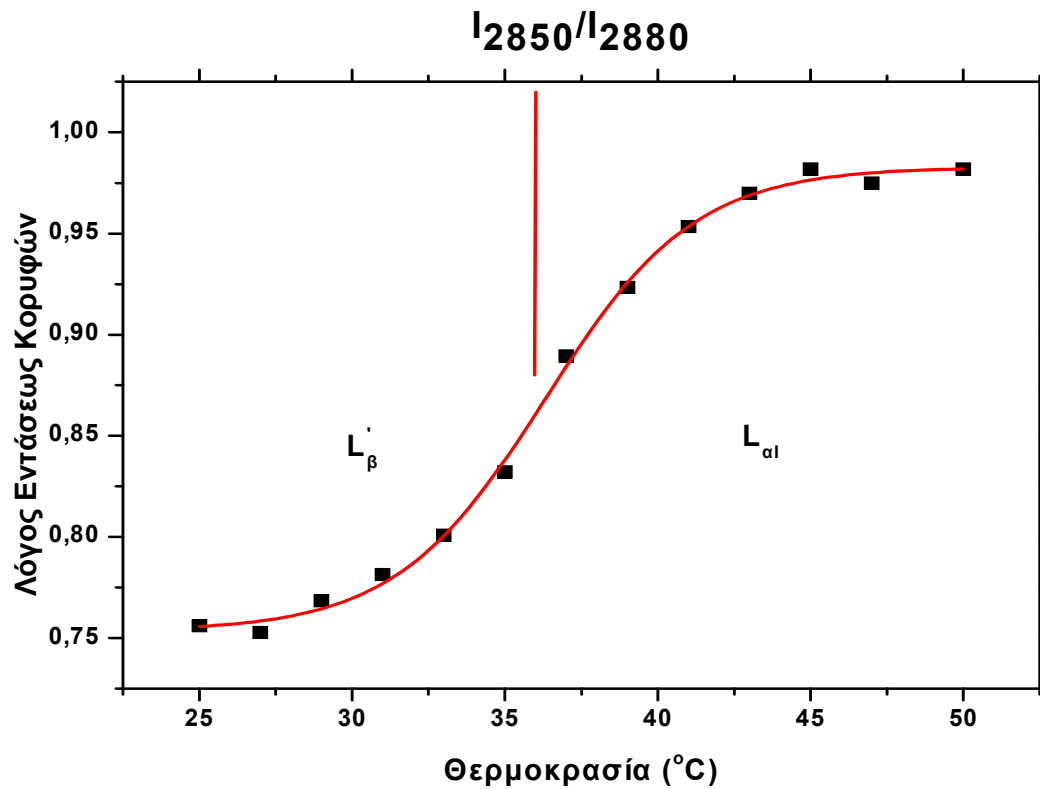
σημείο καμπής της οποίας προσδιορίζεται στους 36.31 ± 0.16 °C (σχήμα 3.27). Το εύρος των τιμών του λόγου αυτού στο εξεταζόμενο σύστημα είναι $\Delta R_{I_{2850}/I_{2880}}^{75:25} = 0.22$. Η συμπεριφορά των τιμών του λόγου ομοιάζει με αυτήν του προηγούμενου δείγματος, συμπεριφορά που συνηγορεί στην εμφάνιση της αλληλοεισχώρησης.

- **Λόγος I_{2935}/I_{2880} :** Η συμπεριφορά του λόγου αυτού είναι παρόμοια με αυτή του δείγματος των λιπιδικών μεμβρανών, το σημείο καμπής της οποίας προσδιορίζεται στους 36.10 ± 0.28 °C (σχήμα 3.28). Το εύρος των τιμών του λόγου αυτού στο εξεταζόμενο σύστημα είναι $\Delta R_{I_{2935}/I_{2880}}^{75:25} = 0.17$. Ομοίως, και στην περίπτωση αυτή, λόγω του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης οι τιμές του λόγου είναι πολύ μικρότερες σε σχέση με το δείγμα των λιπιδικών διπλοστιβάδων.

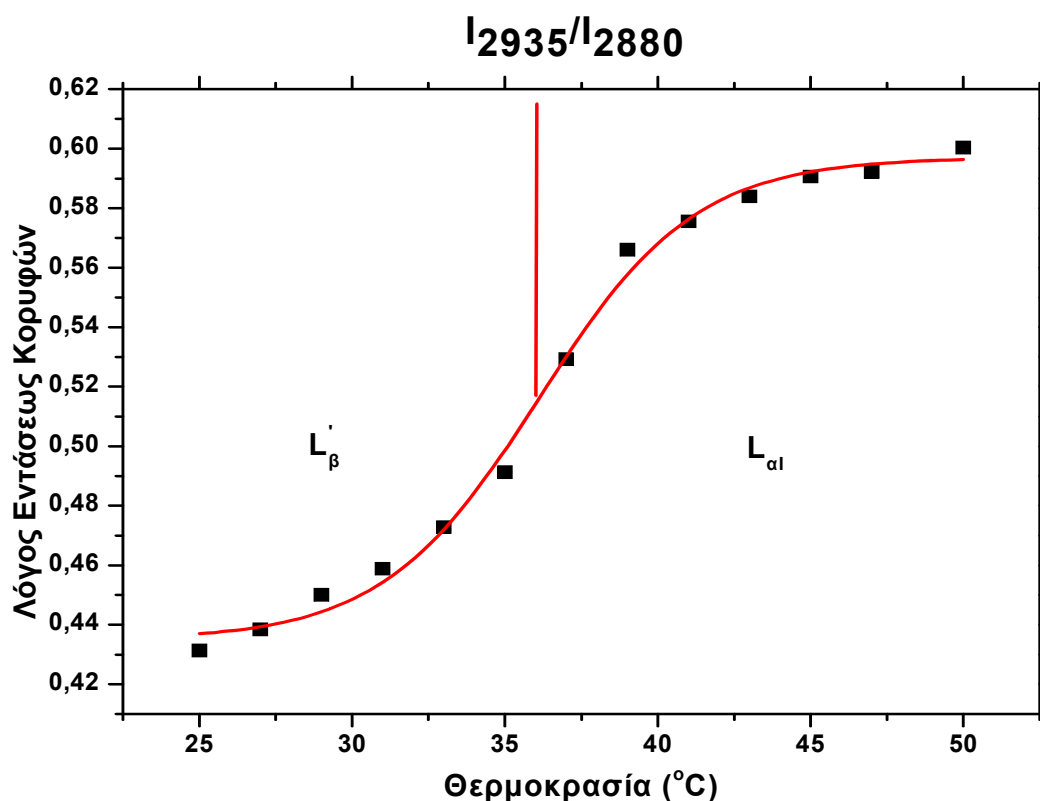
Από το σχήμα 3.26 παρατηρούνται επίσης οι μετατοπίσεις των μελετούμενων κορυφών. Συγκεκριμένα, η κορυφή στους 2850 cm^{-1} μετατοπίζεται σε υψηλότερες συχνότητες κατά 3.3 cm^{-1} ενώ αντίστοιχα η κορυφή στους 2880 cm^{-1} κατά 2.5 cm^{-1} . Παρατηρείται ότι, η συμπεριφορά των μετατοπίσεων είναι παρόμοια με του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 83:17.



Σχήμα 3.26: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 75:25 στην περιοχή 2800 – 3000 cm^{-1} και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.

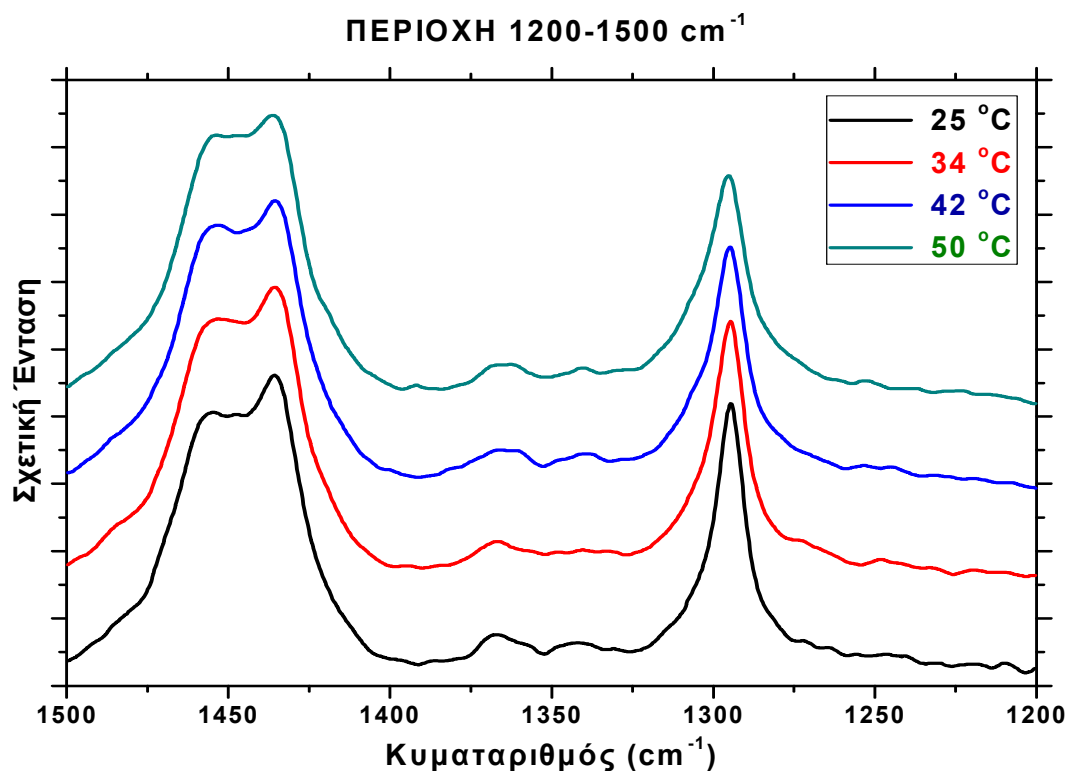


Σχήμα 3.27: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 75:25.



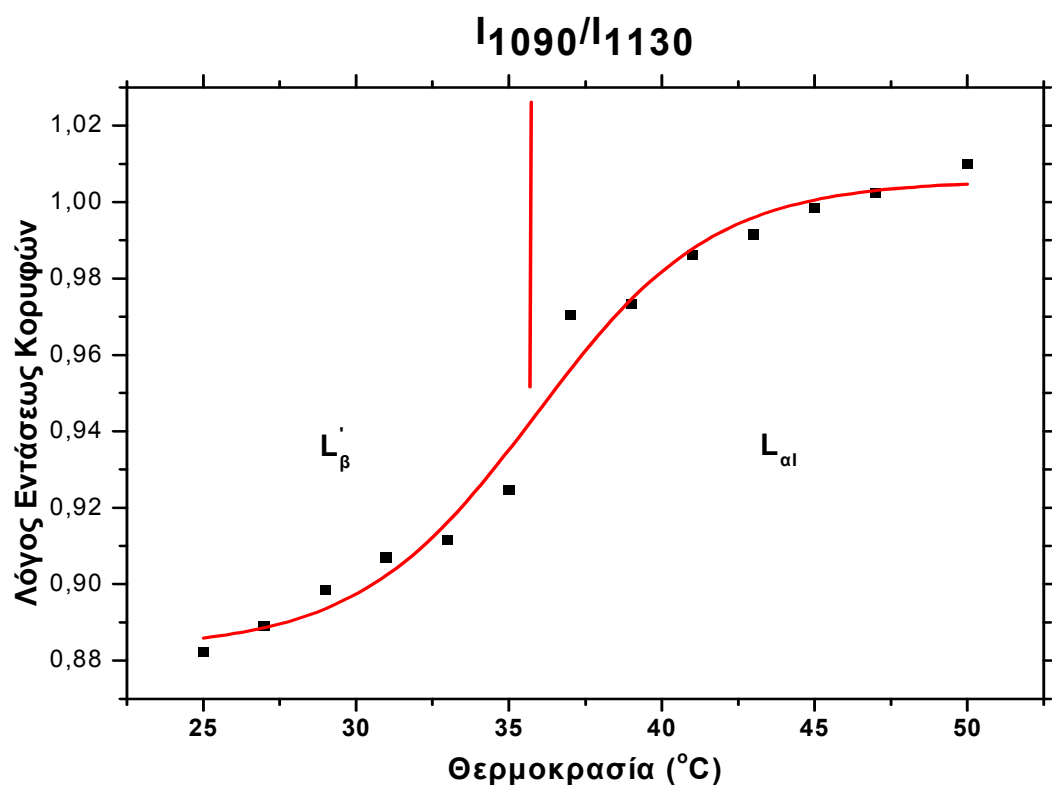
Σχήμα 3.28: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2935}/I_{2880} του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 75:25.

- Περιοχή $1200 - 1500 \text{ cm}^{-1}$:** Στο σχήμα 3.29 είναι διακριτό ότι η κορυφή στους 1294 cm^{-1} μετατοπίζεται κατά 2.2 cm^{-1} ενώ αυτή στους 1436 cm^{-1} κατά 2.4 cm^{-1} . Και σε αυτή την περίπτωση, η μετατόπιση των κορυφών είναι μικρότερη σε σχέση με αυτή των λιπιδικών διπλοστιβάδων χωρίς την προσθήκη βιμπλαστίνης αλλά μεγαλύτερη από αυτή των δεγμάτων DPPC:βιμπλαστίνη 95:5 και 83:17. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με την έκφραση του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης και την παρουσία ποσότητας φαρμακευτικού μορίου στο ενδότερο τμήμα των αλυσίδων. Το αποτέλεσμα του διαχωρισμού της κορυφής στους 1436 cm^{-1} , παρουσιάζεται στο σχήμα Π.7, ενώ η συμπεριφορά του λόγου εντάσεως κορυφών Raman I_{1457}/I_{1436} στο σχήμα Π.8. Η μελέτη του λόγου αυτού επιβεβαιώνει το φαινόμενο της αλληλοεισχώρησης.

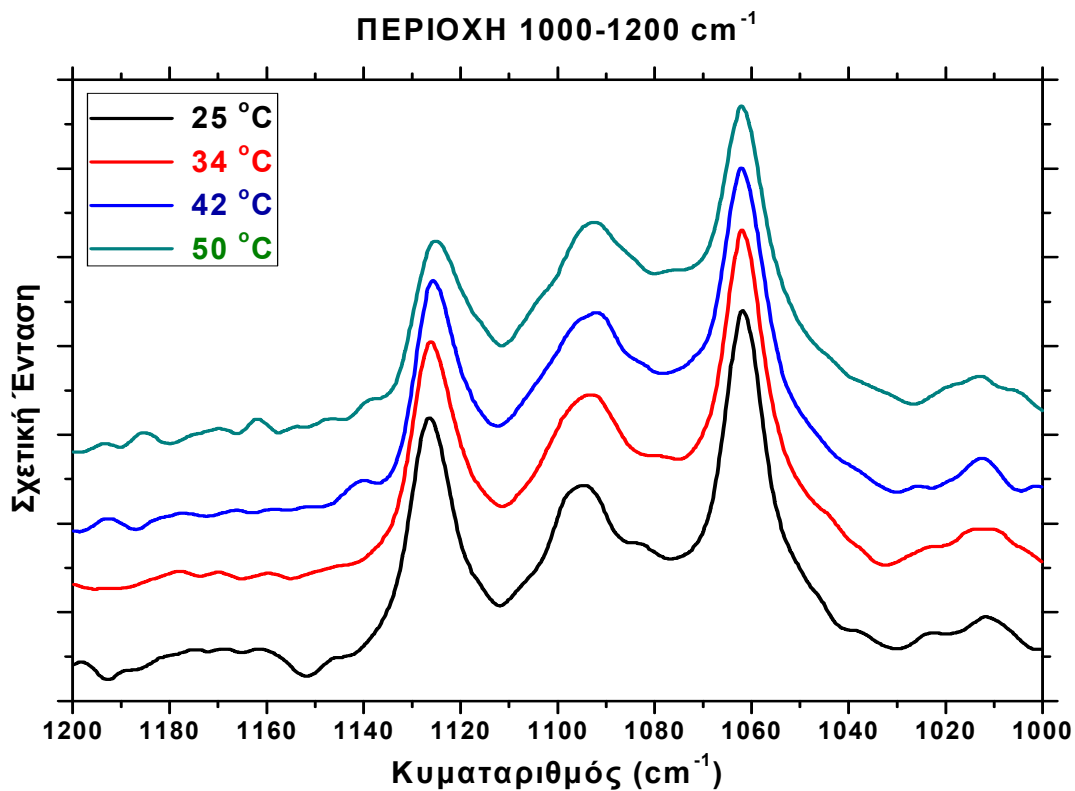


Σχήμα 3.29: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 75:25 στην περιοχή 1200 – 1500 cm^{-1} και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.

- Περιοχή 1000 – 1200 cm^{-1} :** Ο λόγος I_{1090}/I_{1130} απεικονίζεται με μια σιγμοειδή καμπύλη, το σημείο καμπής της οποίας προσδιορίζεται στους 35.8 °C (σχήμα 3.30). Το εύρος των τιμών του λόγου αυτού στο εξεταζόμενο σύστημα είναι $\Delta R_{I_{1090}/I_{1130}}^{75:25} = 0.13$. Επιπλέον, η μετατόπιση της κορυφής στους 1090 cm^{-1} υπολογίζεται στους 6.9 cm^{-1} ενώ αυτή στους 1130 cm^{-1} 2.6 cm^{-1} σε χαμηλότερες συχνότητες (σχήμα 3.31).

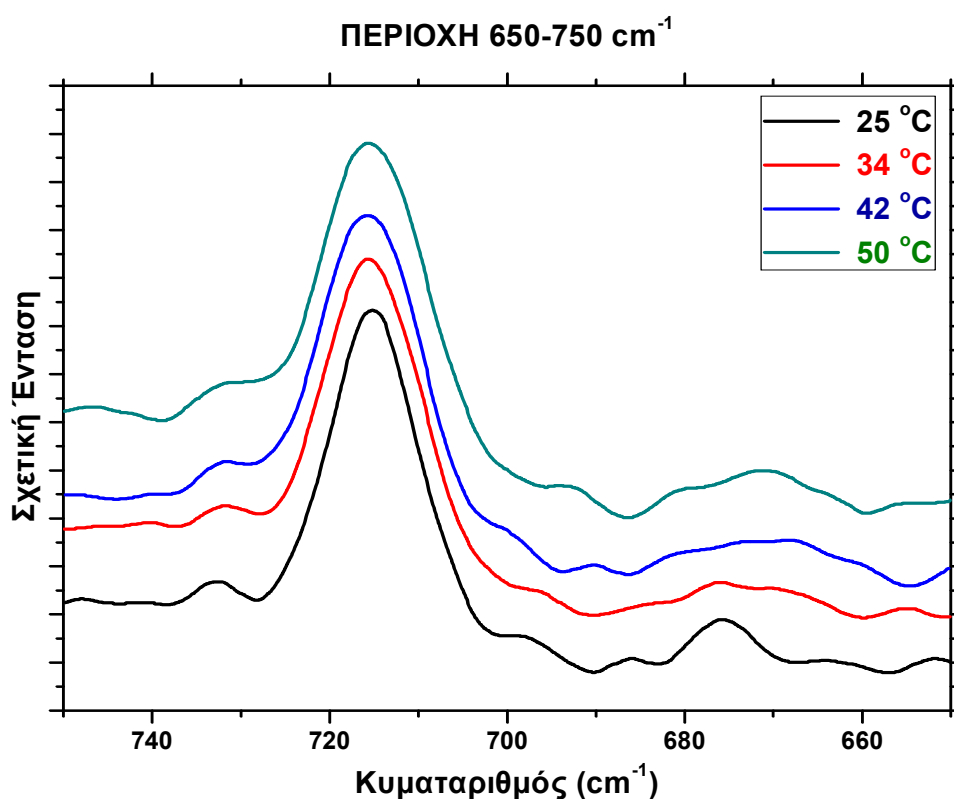


Σχήμα 3.30: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} του δείγματος DPPC:βιμπλασίνη 75:25.



Σχήμα 3.31: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιμπλασίνη 75:25 στην περιοχή 1000 – 1200 cm^{-1} και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.

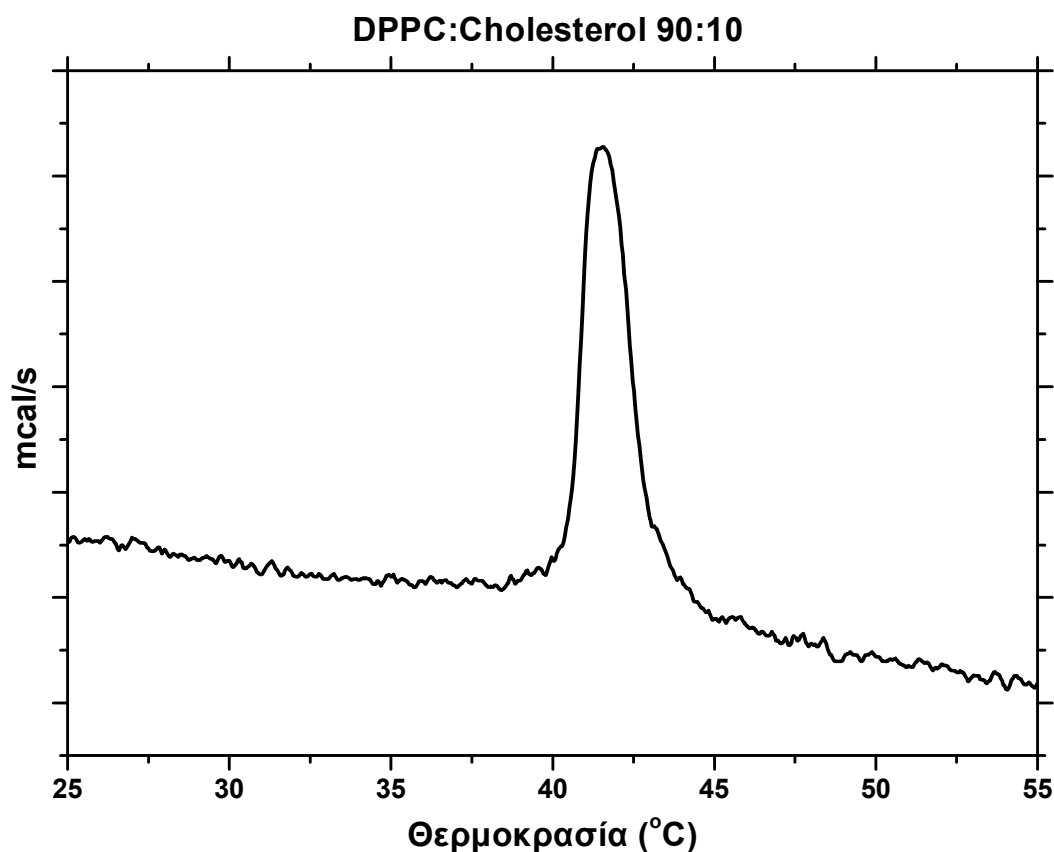
- **Περιοχή 650 – 750 cm^{-1} :** Η κορυφή στους 715 cm^{-1} παρουσιάζει μια μετατόπιση της τάξης των 0.3 cm^{-1} με αύξηση της θερμοκρασίας σε υψηλότερες συχνότητες (σχήμα 3.32). Η θετική μετατόπιση της κορυφής αυτής πιστοποιεί την αλληλεπίδραση της βιμπλαστίνης με την πολική κεφαλή των διπλοστιβάδων και σε σύγκριση με το δείγμα DPPC:βιμπλαστίνη 95:5 και 83:17, αυτή εμφανίζεται μικρότερη λόγω ισχυρής αλληλεπίδρασης και με τις λιπιδικές αλυσίδες.



Σχήμα 3.32: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 75:25 στην περιοχή 650 – 750 cm^{-1} και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.

3.5 Αποτελέσματα δείγματος DPPC:χοληστερόλη 90:10.

3.5.1 Θερμική Ανάλυση



Σχήμα 3.33: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC:χοληστερόλη 90:10.

Στο σχήμα 3.33 παρουσιάζεται το θερμογράφημα του δείγματος DPPC:χοληστερόλη 90:10 στην περιοχή θερμοκρασιών του πειράματος. Σε αυτό παρατηρούμε ότι η καμπύλη της μεταβολής φάσης είναι συμμετρική ενώ η προμετάβαση φάσης έχει πλήρως εξαφανιστεί. Η μεταβολή φάσης πραγματοποιείται στους $T_m = 41.50\text{ }^{\circ}\text{C}$, ενώ η απαιτούμενη μεταβολή ενθαλπίας προσδιορίζεται στα $\Delta H_m = 4.72 \pm 0.24\text{ kcal/mol}$. Οι παρατηρήσεις αυτές εξηγούνται ως εξής: i) η εξαφάνιση της προμετάβασης φάσης οφείλεται στον προσανατολισμό που λαμβάνει το μόριο της χοληστερόλης με το υδροξύλιό της στραμένο προς τις πολικές κεφαλές της χολίνης προκαλώντας

ισχυρή αλληλεπίδραση με αυτές, ii) η δραστική μείωση της μεταβολής ενθαλπίας αλλαγής φάσης οφείλεται στον παράλληλο προς τις λιπιδικές αλυσίδες προσανατολισμό που αποκτά το υδρόφοβο τμήμα του μορίου της χοληστερόλης.

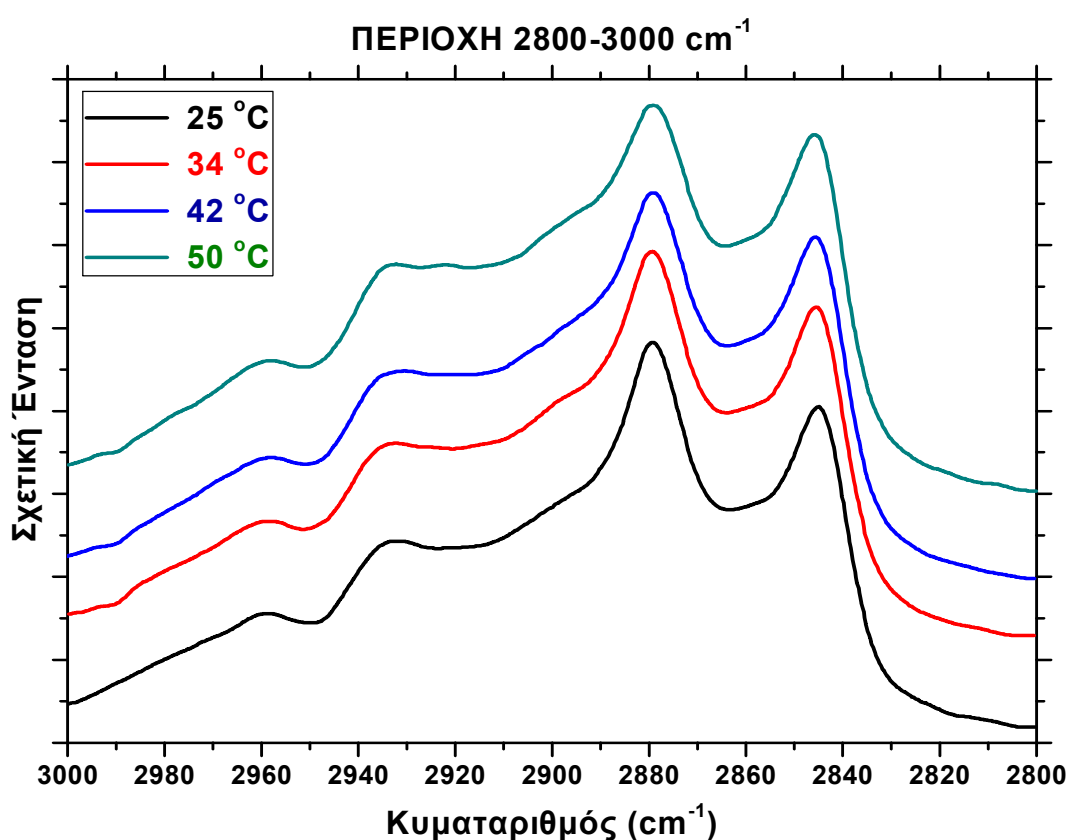
Βιβλιογραφικά έχει αποδειχθεί με διάφορες φυσικοχημικούς μεθόδους ότι η εισδοχή της χοληστερόλης στις λιπιδικές διπλοστιβάδες προκαλεί εξαφάνιση της προμετάβασης φάσης και μείωση της μεταβολής ενθαλπίας αυτής. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η χοληστερόλη προσδίδει πιο ρευστό χαρακτήρα στην κατάσταση γέλης των διπλοστιβάδων πριν την κύρια μεταβολή φάσης, ενώ αντίθετα αυξάνει την οργάνωση αυτών στην υγρή κρυσταλλική φάση. Με τον τρόπο αυτό, μετά τη μεταβολή φάσης παρατηρείται πιο “σφικτό πακετάρισμα” των διπλοστιβάδων, αύξηση της μηχανικής αντοχής και μείωση της διαπερατότητας. Παρ’όλα αυτά όμως η ικανότητα των διπλοστιβάδων για πλευρική και περιστροφική διάχυση συνεχίζει να εκφράζεται σε μεγάλο ποσοστό.

3.5.2 Φασματοσκοπία Raman

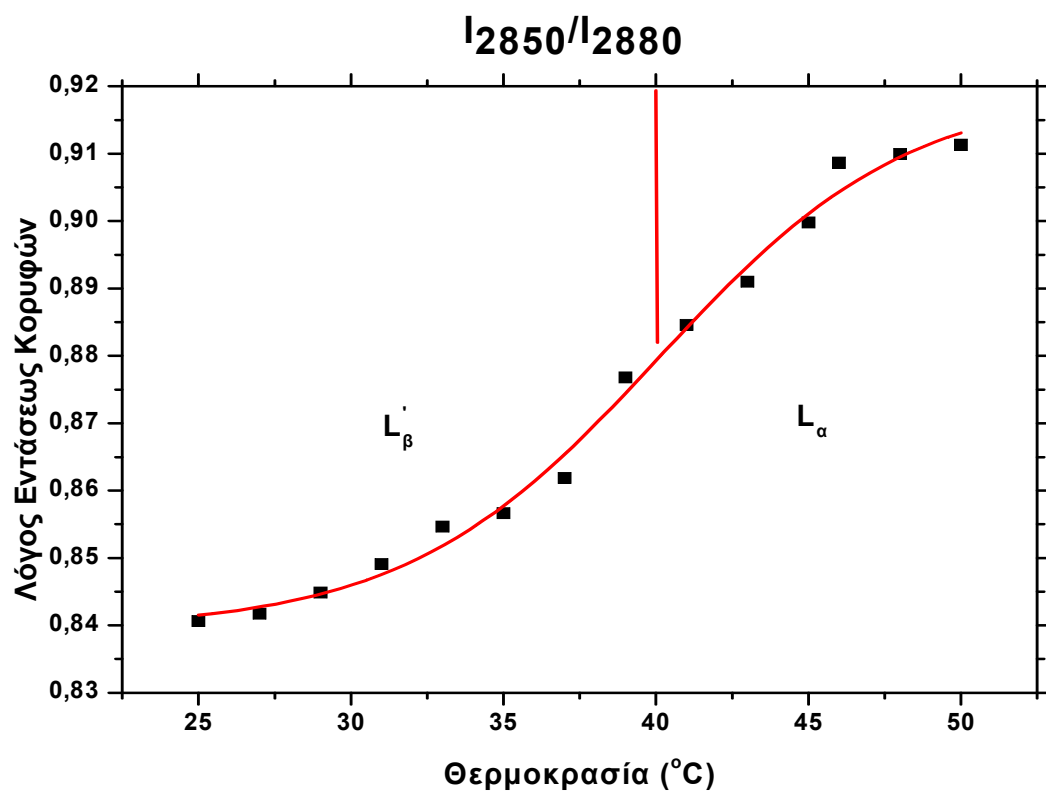
Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τις τέσσερις διαφορετικές φασματικές περιοχές.

- **Περιοχή $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$:** Στο σχήμα 3.34 παρουσιάζονται τα φάσματα Raman του συστήματος μεμβράνης:χοληστερόλης 90:10 σε τέσσερις (4) διαφορετικές θερμοκρασίες. Από τις εντάσεις των κορυφών αυτών υπολογίζονται οι λόγοι εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} και I_{2935}/I_{2880} . Για την περίπτωση των λόγων εντάσεως των κορυφών στο υπό εξέταση δείγμα, η συμπεριφορά των τιμών υπακούει σε μια σιγμοειδή καμπύλη, το σημείο καμπής των οποίων προσδιορίζεται στους $40.07 \pm 0.57 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (σχήματα 3.35, 3.36), και για τις δύο περιπτώσεις. Επιπλέον, το εύρος τιμών των λόγων αυτών υπολογίζεται για το μεν I_{2850}/I_{2880} ως $\Delta R_{I_{2850}/I_{2880}}^{90:10} = 0.07$, και για το δε I_{2935}/I_{2880} ως $\Delta R_{I_{2935}/I_{2880}}^{90:10} = 0.08$. Συγκρίνοντας, τις τιμές των λόγων

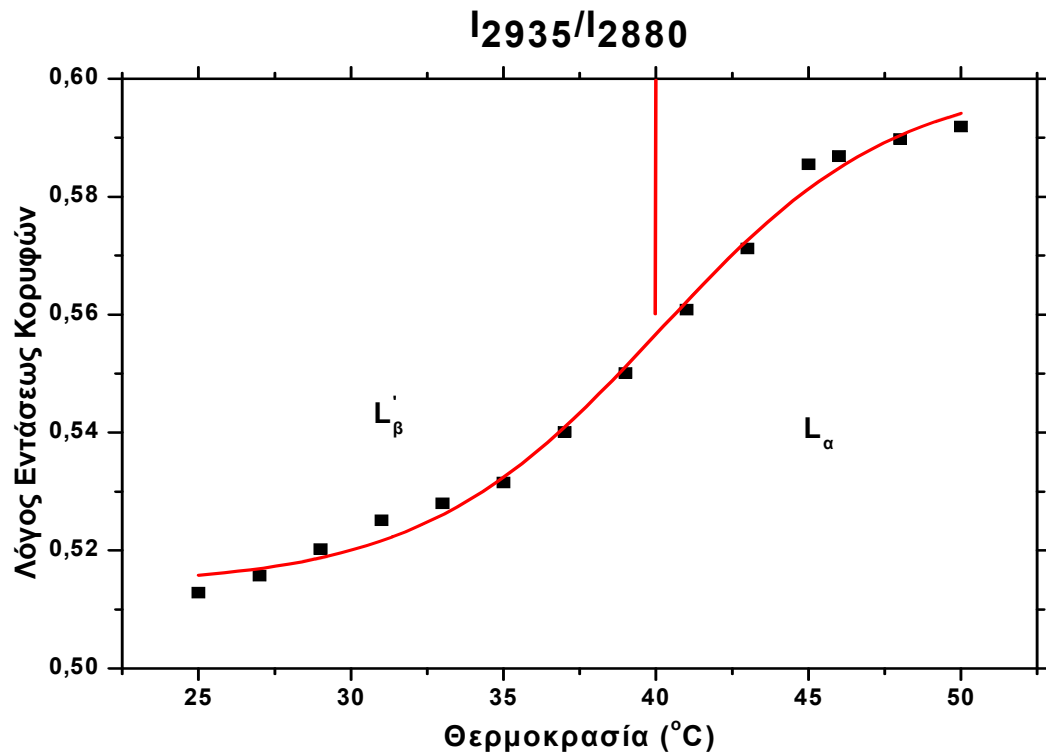
αυτών με τις τιμές των λόγων του δείγματος DPPC χωρίς την είσοδο της χοληστερόλης και σε ίδια θερμοκρασία, παρατηρείται ότι οι τιμές του δείγματος DPPC:χοληστερόλη 90:10 είναι μεγαλύτερες πριν τη μεταβολή φάσης και αντίθετα μικρότερες μετά τη μεταβολή φάσης. Η παρατήρηση αυτή πιστοποιεί το γεγονός της αύξησης της ρευστότητας των λιπιδικών διπλοστιβάδων στη φάση γέλης και της μείωσης αυτής στην υγρή κρυσταλλική φάση. Τέλος, η κορυφή στους 2850 cm^{-1} μετατοπίζεται κατά 1.1 cm^{-1} ενώ η κορυφή στους 2880 cm^{-1} κατά 0.3 cm^{-1} (σχήμα 3.34).



Σχήμα 3.34: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:χοληστερόλη 90:10 στην περιοχή $2800 - 3000\text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.

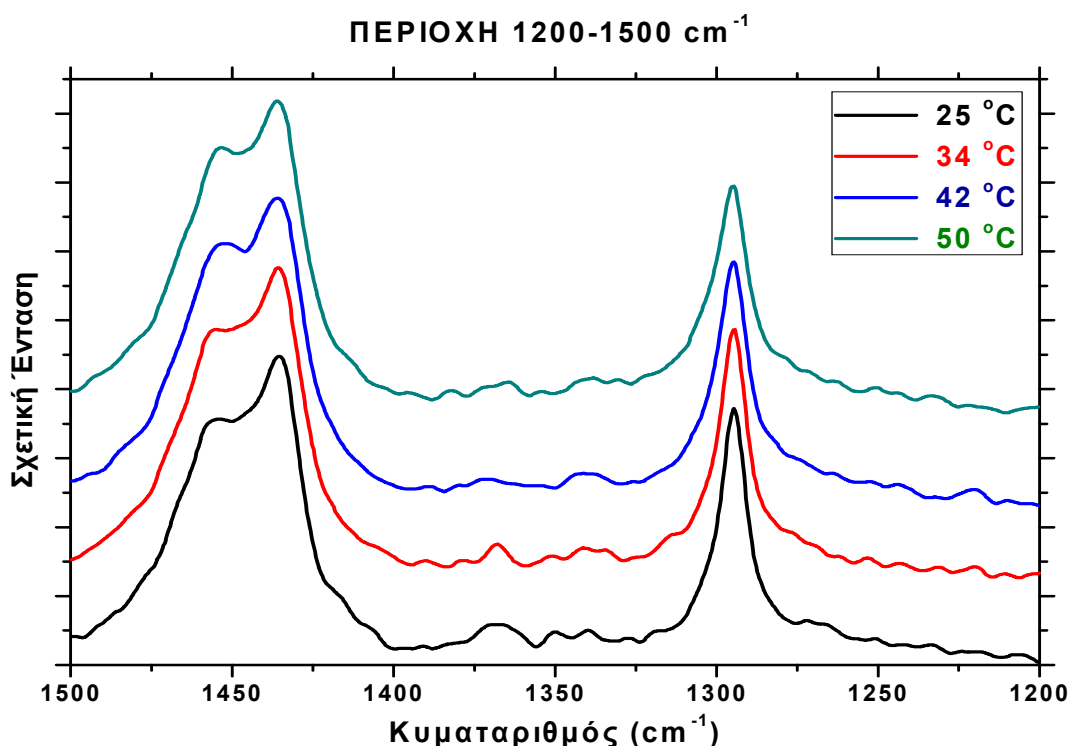


Σχήμα 3.35: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} του δείγματος DPPC:χοληστερόλη 90:10.



Σχήμα 3.36: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2935}/I_{2880} του δείγματος DPPC:χοληστερόλη 90:10.

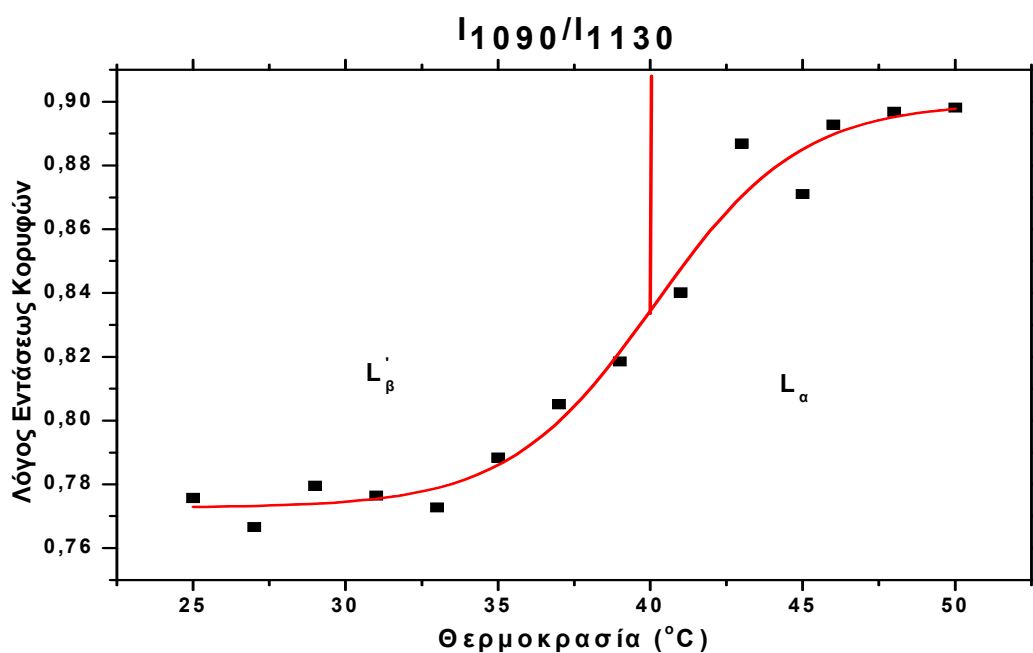
- Περιοχή 1200 – 1500 cm^{-1} :** Στο σχήμα 3.37 γίνεται σαφές ότι η κορυφή στους 1294 cm^{-1} μετατοπίζεται κατά 0.6 cm^{-1} ενώ αυτή στους 1436 cm^{-1} κατά 0.9 cm^{-1} , γεγονός που έρχεται σε συμφωνία ότι στη υγρή κρυσταλλική φάση οι διπλοστιβάδες είναι περισσότερο πακεταρισμένες. Ομοίως, η συμπεριφορά του λόγου I_{1457}/I_{1436} (Σχήμα Π.9), αποτέλεσμα του διαχωρισμού της κορυφής στους 1436 cm^{-1} (Σχήμα Π.10), επιβεβαιώνει την αλληλοεισχώρηση των λιπιδικών αλυσίδων των διπλοστιβάδων και την αύξηση των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων των γειτονικών αλειφατικών αλυσίδων.



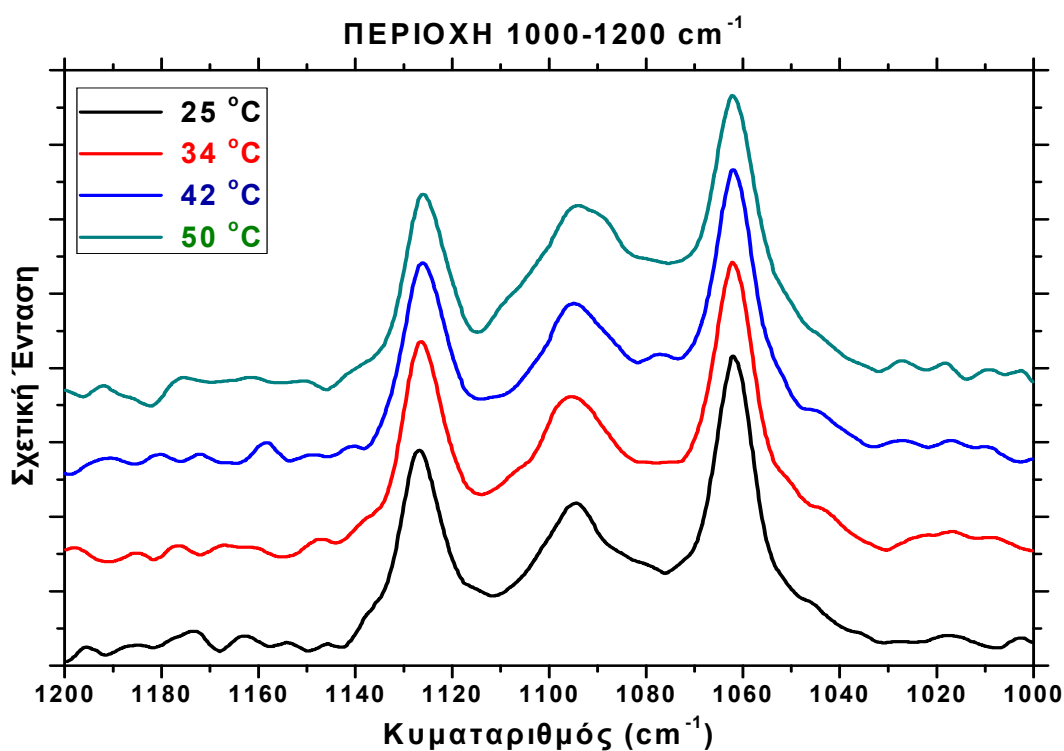
Σχήμα 3.37: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:χοληστερόλη 90:10 στην περιοχή 1200 – 1500 cm^{-1} και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.

- Περιοχή 1000 – 1200 cm^{-1} :** Ο λόγος I_{1090}/I_{1130} απεικονίζεται με μια σιγμοειδή καμπύλη, το σημείο καμπής της οποίας προσδιορίζεται στους 40.1 $^{\circ}\text{C}$ (σχήμα 3.38). Το εύρος των τιμών του λόγου αυτού στο εξεταζόμενο σύστημα είναι $\Delta R_{I_{1090}/I_{1130}}^{90:10} = 0.12$. Επιπλέον, η μετατόπιση της κορυφής στους 1090 cm^{-1} υπολογίζεται στους 2.7 cm^{-1} ενώ αυτή στους 1130 cm^{-1} 0.9 cm^{-1} σε χαμηλότερες συχνότητες (σχήμα 3.39). Παρατηρείται, ότι το εύρος των τιμών είναι μικρότερο. Αυτό το

αποτέλεσμα συνηγορεί στη μεγαλύτερη οργάνωση των αλειφατικών αλυσίδων των διπλοστιβάδων. Όμοια συμπεριφορά εκφράζεται και από τις μικρότερες μετατοπίσεις των μελετούμενων κορυφών.

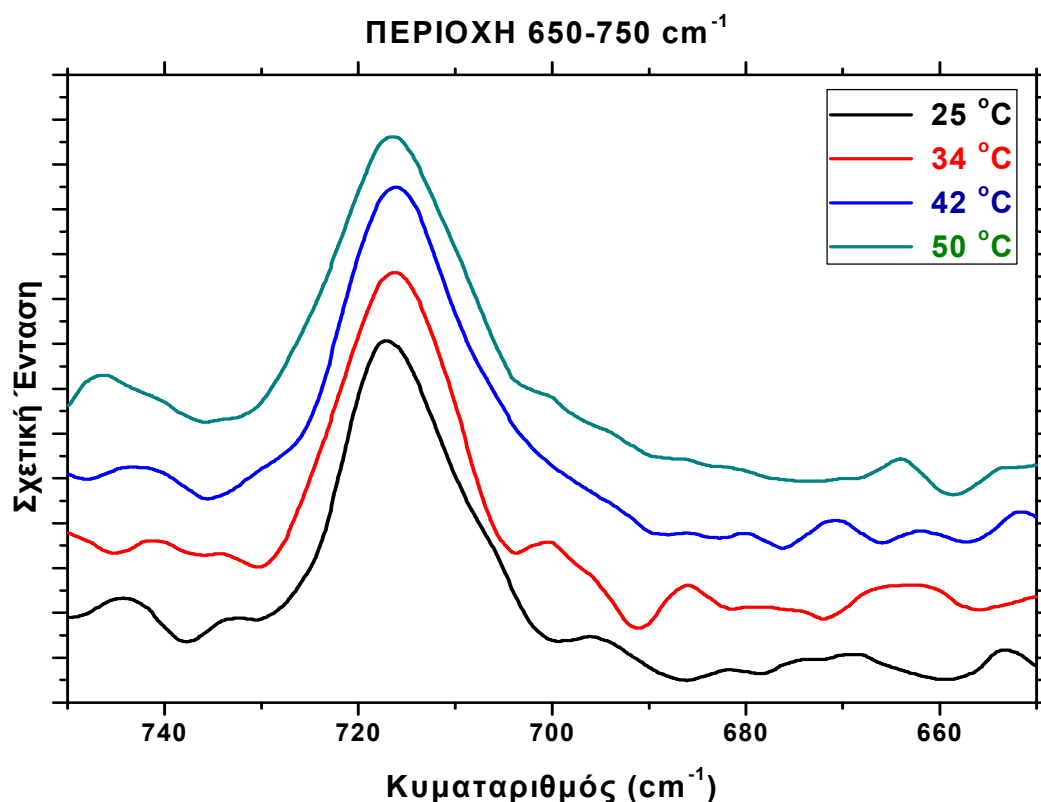


Σχήμα 3.38: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} του δείγματος DPPC:χοληστερόλη 90:10.



Σχήμα 3.39: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:χοληστερόλη 90:10 στην περιοχή 1000 – 1200 cm^{-1} και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.

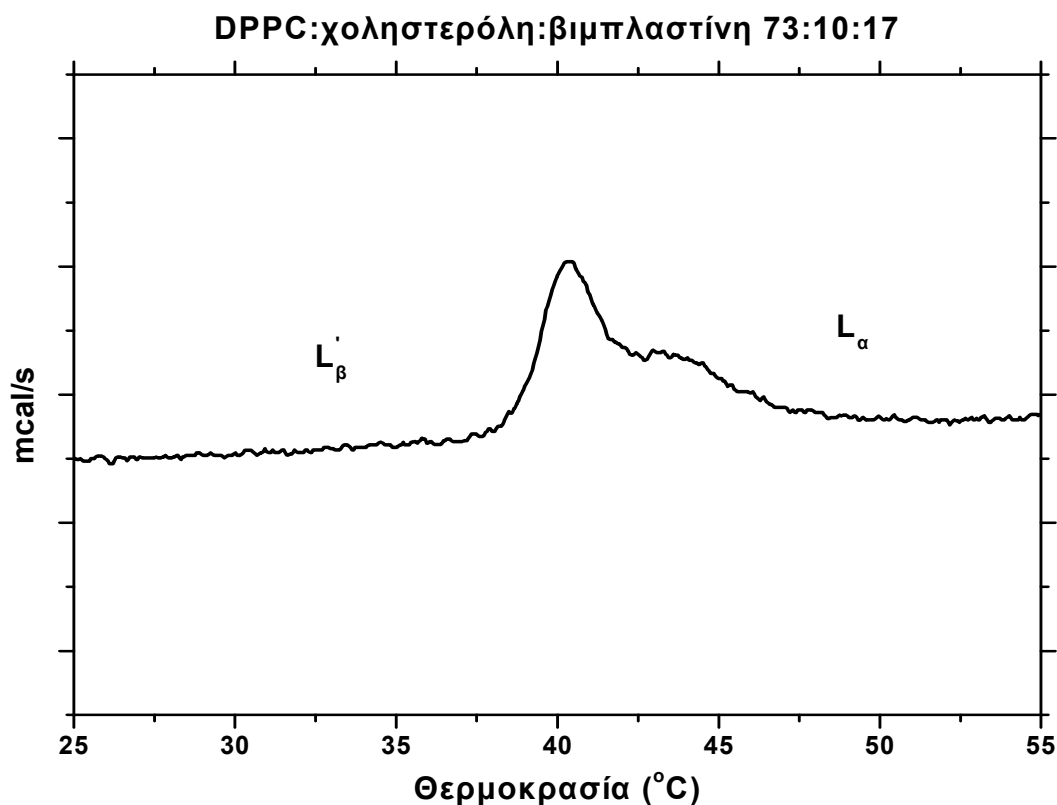
- **Περιοχή 650 – 750 cm^{-1} :** Η κορυφή στους 715 cm^{-1} παρουσιάζει μια μετατόπιση της τάξης των 1.8 cm^{-1} με αύξηση της θερμοκρασίας σε χαμηλότερες συχνότητες (σχήμα 3.40). Η αρνητική μετατόπιση αυτή σχετίζεται με την ισχυρή αλληλεπίδραση του υδροξυλίου του μορίου της χοληστερόλης με τις πολικές κεφαλές των διπλοστιβάδων.



Σχήμα 3.40: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:χοληστερόλη 90:10 στην περιοχή 650 – 750 cm^{-1} και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.

3.6 Αποτελέσματα δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17.

3.6.1 Θερμική Ανάλυση

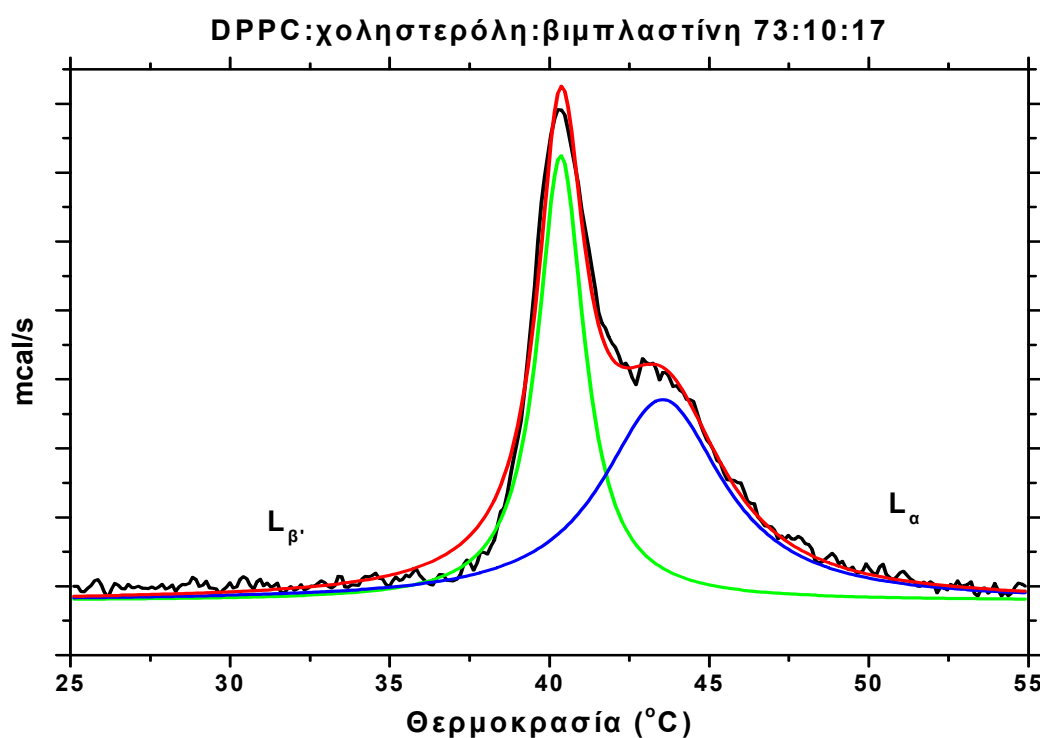


Σχήμα 3.41: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17.

Στο σχήμα 3.41 παρουσιάζεται η καμπύλη θέρμανσης του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17 από το οποίο προσδιορίζεται ότι η μεταβολή φάσης λαμβάνει χώρα στους $T_m = 40.12^{\circ}\text{C}$ με αντίστοιχη μεταβολή ενθαλπίας $\Delta H_m = 5.32 \pm 0.27 \text{ kcal/mol}$.

Από την υφή (μορφή) του θερμογραφήματος παρατηρείται ότι υπάρχει ανωμαλία στην καμπύλη αλλαγής φάσης η οποία μπορεί να οφείλεται στο γεγονός της δημιουργίας τμημάτων “φτωχών” και “πλούσιων” σε βιμπλαστίνη (domains), μιας και αποδείχθηκε ότι η χοληστερόλη διασπείρεται ομογενώς μέσα στις λιπιδικές διπλοστιβάδες από το δείγμα DPPC:χοληστερόλη 90:10. Πραγματοποιώντας αποσυγκερασμό (deconvolution) του θερμογραφήματος

και χρησιμοποιώντας της μεθόδους: i) δημιουργίας γραμμής βάσης και ii) διαχωρισμού κορυφών, το θερμογράφημα μπορεί να αναλυθεί σε δυο επιμέρους κορυφές μεταβολής φάσης. Η πρώτη κορυφή παρουσιάζεται στους 40.35 ± 0.01 °C με μεταβολή ενθαλπίας $\Delta H = 2.45 \pm 0.13 \text{ kcal/mol}$, ενώ η δεύτερη παρατηρείται στους 43.54 ± 0.06 °C με αντίστοιχη μεταβολή ενθαλπίας $\Delta H = 2.87 \pm 0.14 \text{ kcal/mol}$ (σχήμα 3.42).



Σχήμα 3.42: Καμπύλη θέρμανσης του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17 με διαχωρισμό κορυφών.

Από το σχήμα αυτό, συμπεραίνεται η ύπαρξη των ανομοιογενών τμημάτων των λιπιδικών διπλοστιβάδων (domains). Από τη μια, η κορυφή στους 40.35 °C αντιστοιχεί σε τμήμα διπλοστιβάδας το οποίο περιέχει την ποσότητα της χοληστερόλης μαζί με τη μεγαλύτερη ποσότητας της βιμπλαστίνης πλήρως ομογενοποιημένων ("πλούσιο τμήμα"). Από την άλλη, η κορυφή στους 43.54 °C αντιστοιχεί σε τμήμα διπλοστιβάδας στο οποίο δεν υπάρχει ποσότητα χοληστερόλης αλλά μόνο η υπόλοιπη ποσότητα της βιμπλαστίνης ("φτωχό τμήμα").

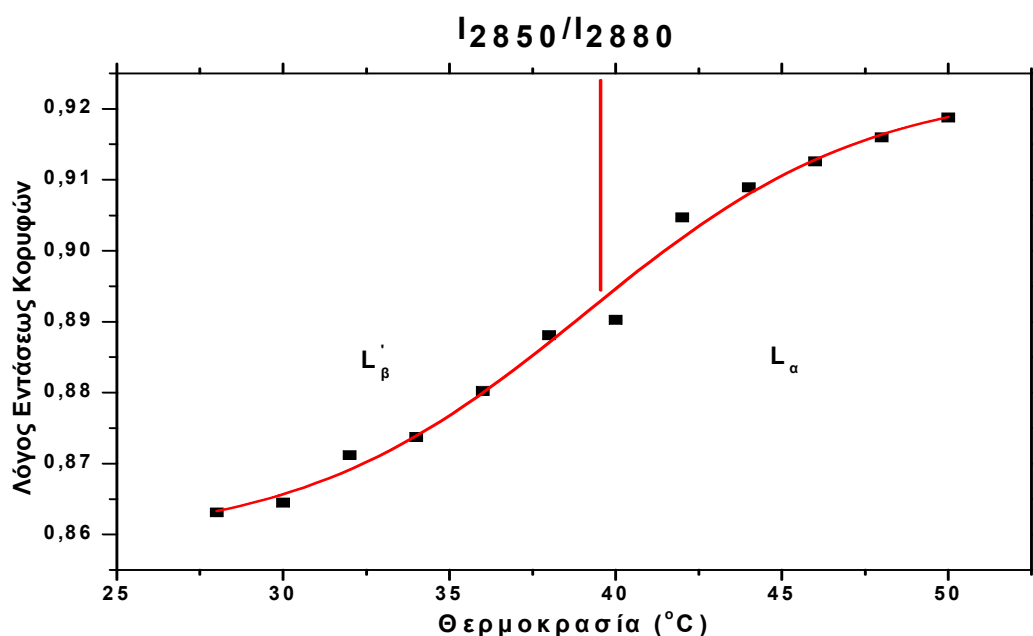
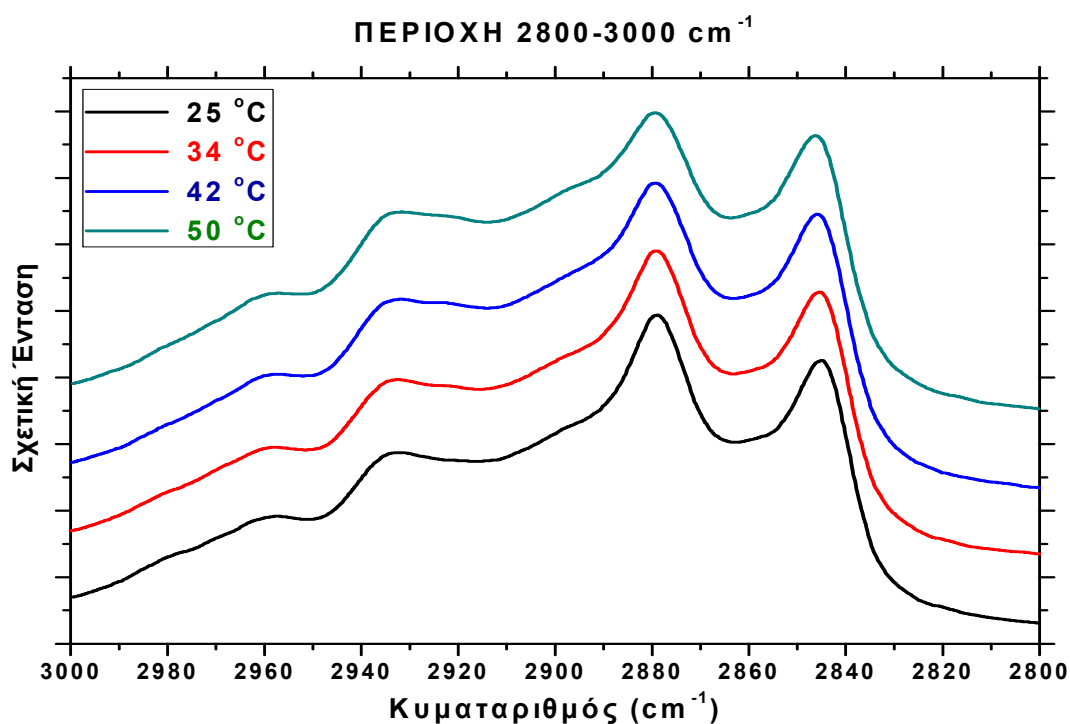
Συγκρίνοντας τις τιμές της μεταβολής ενθαλπίας και φάσης των δειγμάτων DPPC, DPPC:βιμπλαστίνη 83:17, DPPC:χοληστερόλη 90:10 και DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17, παρατηρείται ότι αυτές είναι $6.95 \pm 0.35 \text{ kcal/mol}$, $8.12 \pm 0.41 \text{ kcal/mol}$, $4.72 \pm 0.24 \text{ kcal/mol}$ και $5.32 \pm 0.27 \text{ kcal/mol}$. Έτσι γίνεται σαφές ότι η προσθήκη της χοληστερόλης στις λιπιδικές διπλοστιβάδες αλλά και στο σύστημα λιπιδικών διπλοστιβάδων:βιμπλαστίνη προκαλεί μείωση της μεταβολής ενθαλπίας αλλαγής φάσης κατά 32-34%. Από το αποτέλεσμα αυτό εξάγονται τα παρακάτω συμπεράσματα: i) η προσθήκη της χοληστερόλης στις λιπιδικές διπλοστιβάδες αλλά και στο σύστημα λιπιδικές διπλοστιβάδες:βιμπλαστίνης προκαλεί ρευστότερη κατάσταση γέλης και πιο οργανωμένη υγρή κρυσταλλική κατάσταση, ii) η χοληστερόλη είναι μόριο το οποίο λόγω του προσανατολισμού που λαμβάνει όταν εισέρχεται στις λιπιδικές διπλοστιβάδες, δεν επιτρέπει την αλληλοεισχώρηση των λιπιδικών αλυσίδων, iii) η μικρή αύξηση μεταβολής ενθαλπίας μεταξύ των δειγμάτων DPPC:χοληστερόλη 90:10 και DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17 οφείλεται στην αλληλεπίδραση του μορίου της βιμπλαστίνης με τις πολικές κεφαλές και iv) η ταυτόχρονη δράση χοληστερόλης και φαρμακευτικού μορίου βιμπλαστίνης είναι ανταγωνιστική.

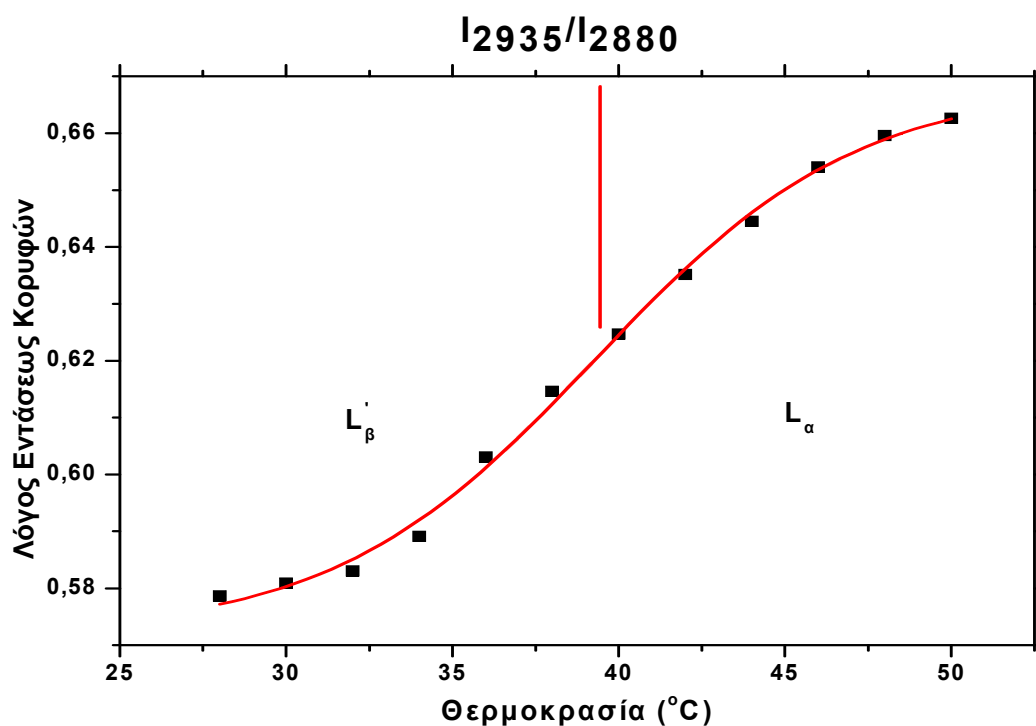
3.6.2 Φασματοσκοπία Raman

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τις τέσσερις διαφορετικές φασματικές περιοχές.

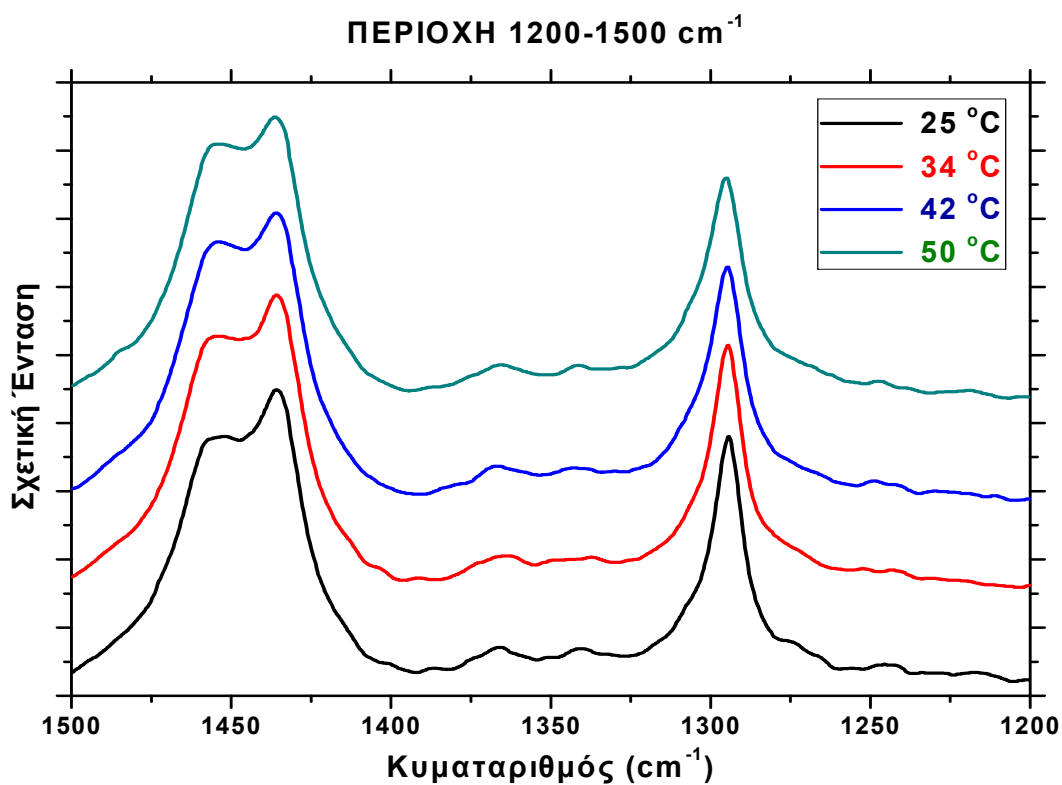
- **Περιοχή $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$:** Στο σχήμα 3.43 παρουσιάζονται τα φάσματα Raman σε τέσσερις (4) διαφορετικές θερμοκρασίες του συστήματος μεμβράνης:χοληστερόλης:βιμπλαστίνης 73:10:17. Από τις εντάσεις των κορυφών αυτών υπολογίζονται οι λόγοι εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} και I_{2935}/I_{2880} . Τα σημεία καμής των σιγμοειδών καμπυλών που προκύπτουν είναι 39.07 ± 0.62 και 39.30 ± 0.32 °C αντίστοιχα (σχήματα 3.44, 3.45). Το εύρος των τιμών των μελετούμενων λόγων είναι $\Delta R_{I_{2850}/I_{2880}}^{73:10:17} = 0.05$ και $\Delta R_{I_{2935}/I_{2880}}^{73:10:17} = 0.08$,

ενώ τέλος οι μελετούμενες κορυφές 2850 και 2880 cm^{-1} παρουσιάζουν μετατόπιση σε υψηλότερες συχνότητες κατά 1.3 και 0.4 cm^{-1} αντίστοιχα (σχήμα 3.43).



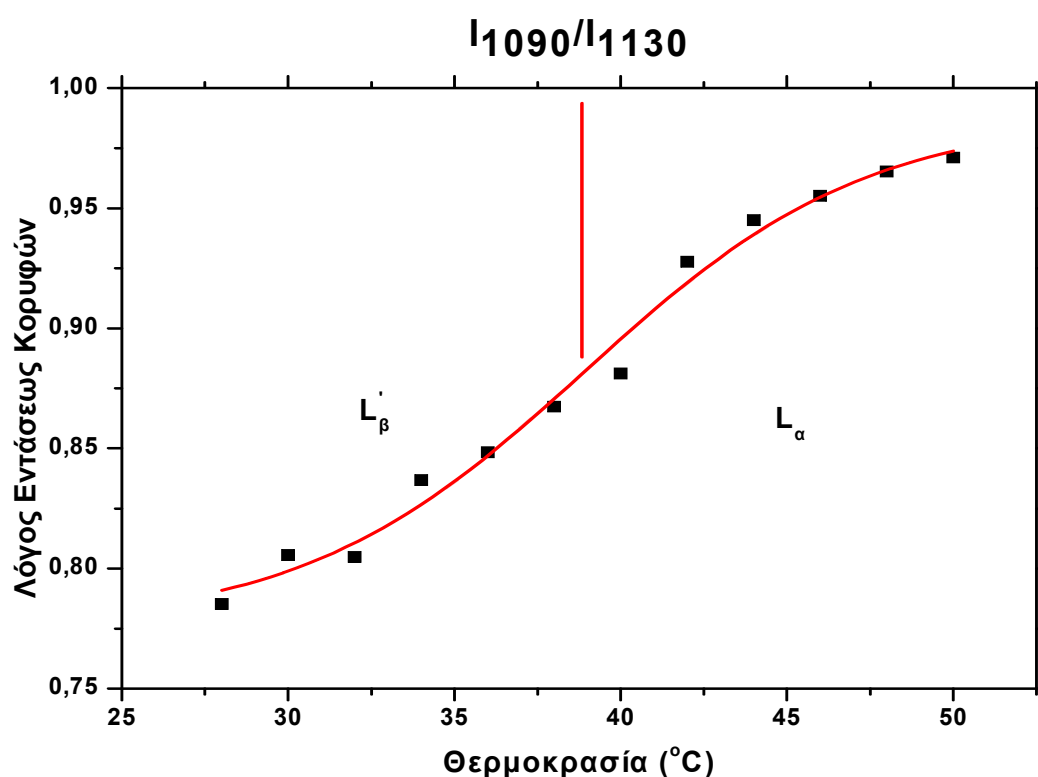


Σχήμα 3.45: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2935}/I_{2880} του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλασίνη 73:10:17.

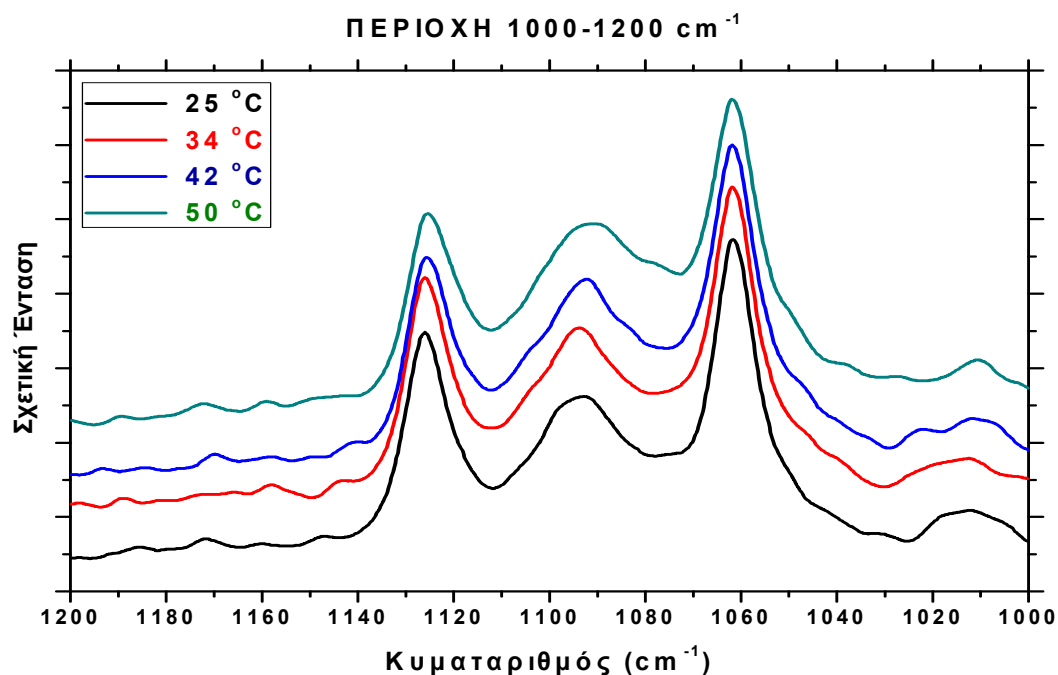


Σχήμα 3.46: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλασίνη 73:10:17 στην περιοχή 1200 – 1500 cm^{-1} .

- **Περιοχή 1200 – 1500 cm⁻¹:** Στο σχήμα 3.46 παρατηρείται ότι η κορυφή στους 1294 cm⁻¹ μετατοπίζεται κατά 0.7 cm⁻¹ ενώ αυτή στα 1436 cm⁻¹ κατά 0.4 cm⁻¹, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία ότι στη υγρή κρυσταλλική φάση οι διπλοστιβάδες είναι περισσότερο πακεταρισμένες. Η μελέτη του λόγου I₁₄₅₇/I₁₄₃₆ (Σχήμα Π.11) έπεται από τον διαχωρισμό της κορυφής στους 1436 cm⁻¹ (Σχήμα Π.12), επιβεβαιώνει την εξασθένιση των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων αλλά και την αύξηση της ρευστότητας της λιπιδικής διπλοστιβάδας.
- **Περιοχή 1000 – 1200 cm⁻¹:** Ο λόγος I₁₀₉₀/I₁₁₃₀ απεικονίζεται με μια σιγμοειδή καμπύλη, το σημείο καμπής της οποίας προσδιορίζεται στους 38.92 ± 0.74 °C (σχήμα 3.47). Το εύρος των τιμών του λόγου αυτού στο εξεταζόμενο σύστημα είναι $\Delta R_{I_{1090}/I_{1130}}^{73:10:17} = 0.19$. Επιπλέον, η μετατόπιση της κορυφής στους 1090 cm⁻¹ υπολογίζεται στους 3.5 cm⁻¹ ενώ αυτή στους 1130 cm⁻¹ 0.5 cm⁻¹ σε χαμηλότερες συχνότητες (σχήμα 3.48). Η συμπεριφορά αυτή εξηγείται από την αλληλεπίδραση που παρουσιάζει το μόριο της βιμπλαστίνης με τις αλειφατικές αλυσίδες.

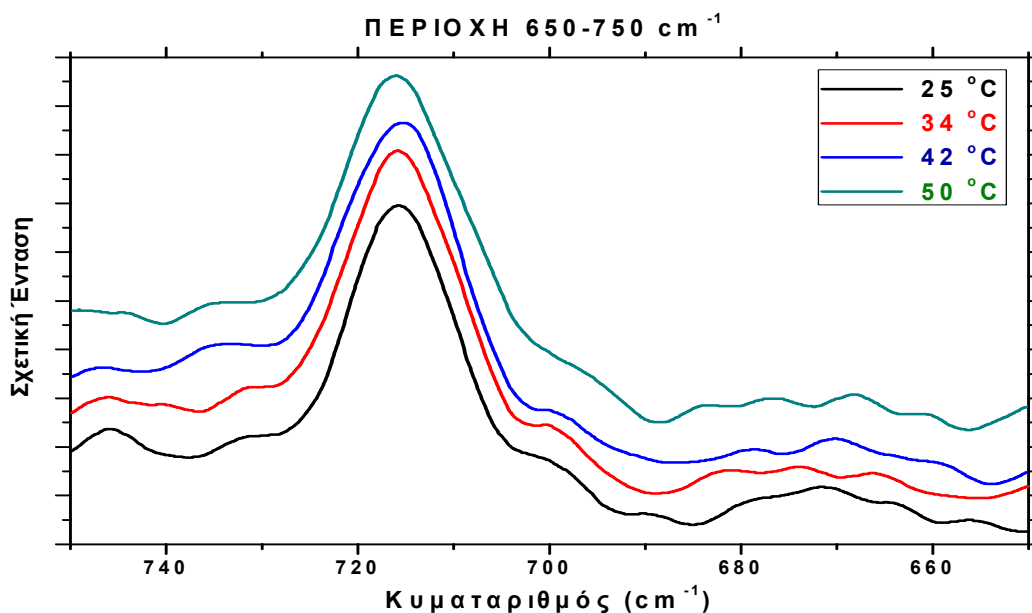


Σχήμα 3.47: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I₁₀₉₀/I₁₁₃₀ του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17.



Σχήμα 3.48: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17 στην περιοχή 1000 – 1200 cm^{-1} .

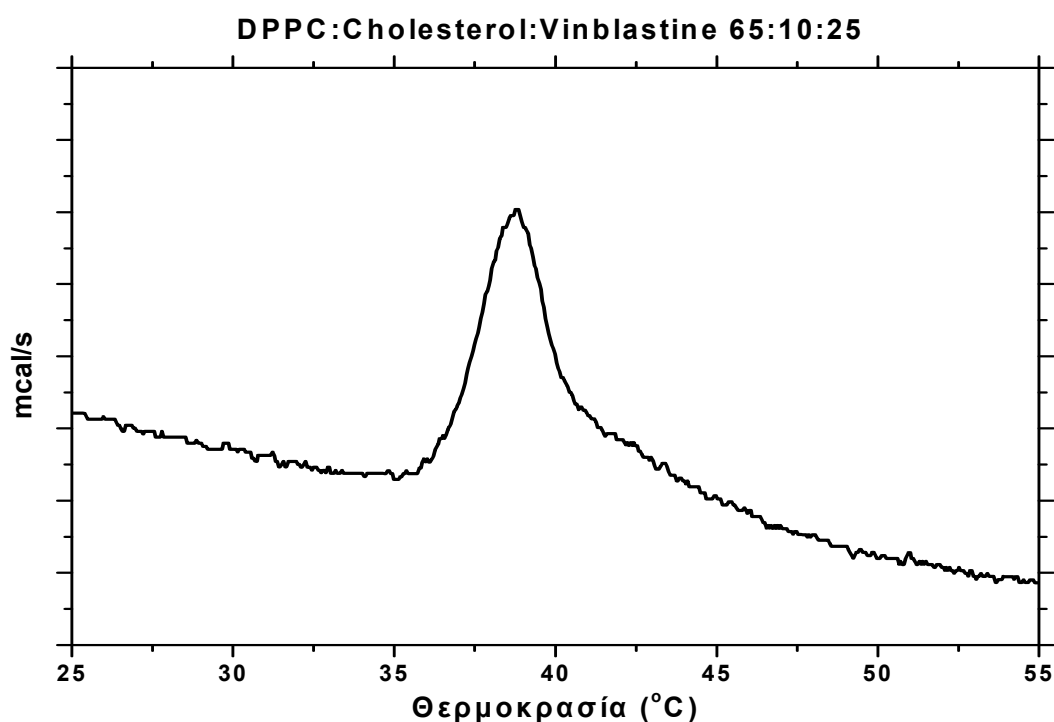
- **Περιοχή 650 – 750 cm^{-1} :** Η κορυφή στους 715 cm^{-1} παρουσιάζει μια μετατόπιση της τάξης των 1 cm^{-1} με αύξηση της θερμοκρασίας σε υψηλότερες συχνότητες (σχήμα 3.49).



Σχήμα 3.49: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17 στην περιοχή 650 – 750 cm^{-1} .

3.7 Αποτελέσματα δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 65:10:25.

3.7.1 Θερμική Ανάλυση



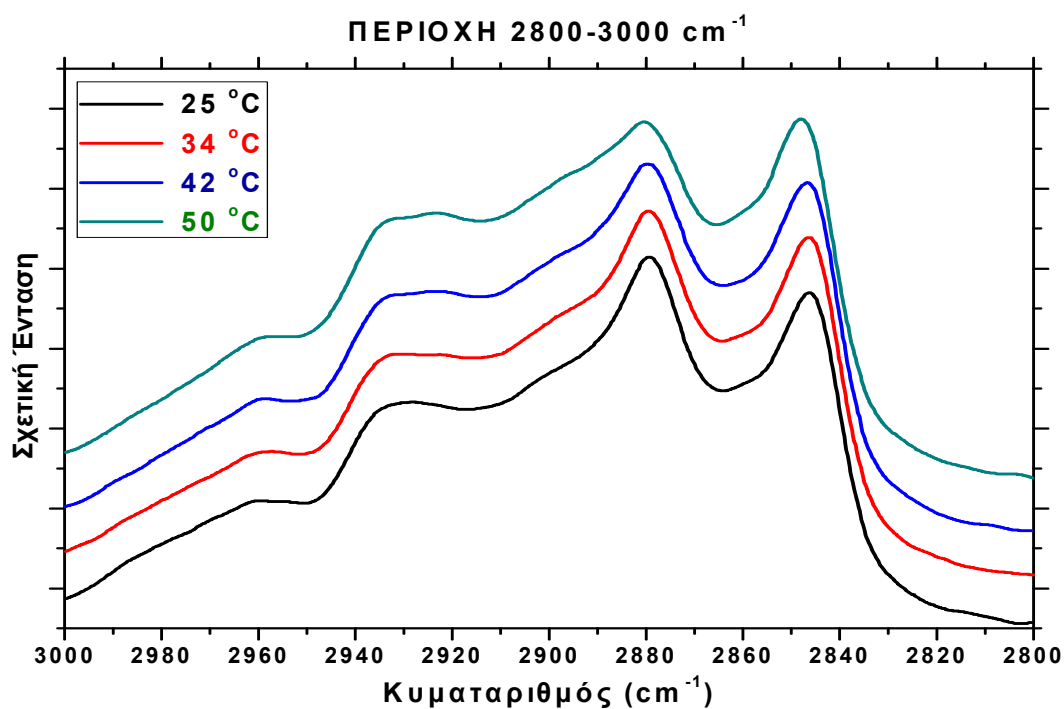
Σχήμα 3.50: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 65:10:25.

Στο σχήμα 3.50 παρατηρείται το θερμογράφημα για το υπό εξέταση δείγμα, για το οποίο προσδιορίζουμε θερμοκρασία μεταβολής φάσης $T_m = 38.69\text{ }^{\circ}\text{C}$ και μεταβολή ενθαλπίας αλλαγής φάσης $\Delta H_m = 4.36 \pm 0.22\text{ kcal/mol}$. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα αυτά με εκείνα του προηγούμενου δείγματος καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα: i) το δείγμα DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 65:10:25 είναι πιο ομογενοποιημένο καθώς από την υφή του θερμογραφήματος παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει δημιουργία “πλούσιων” ή “φτωχών” τμημάτων διπλοστιβάδων σε χοληστερόλη ή βιμπλαστίνη, ii) η ταυτόχρονη δράση χοληστερόλης και της βιμπλαστίνης στις διπλοστιβάδες είναι ανταγωνιστική αφού αύξηση της ποσότητας του φαρμάκου επιφέρει και αύξηση της αταξίας των αλειφατικών αλυσίδων σε σύγκριση με τη χοληστερόλη που έχει την τάση να προκαλεί καλύτερη οργάνωση στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση.

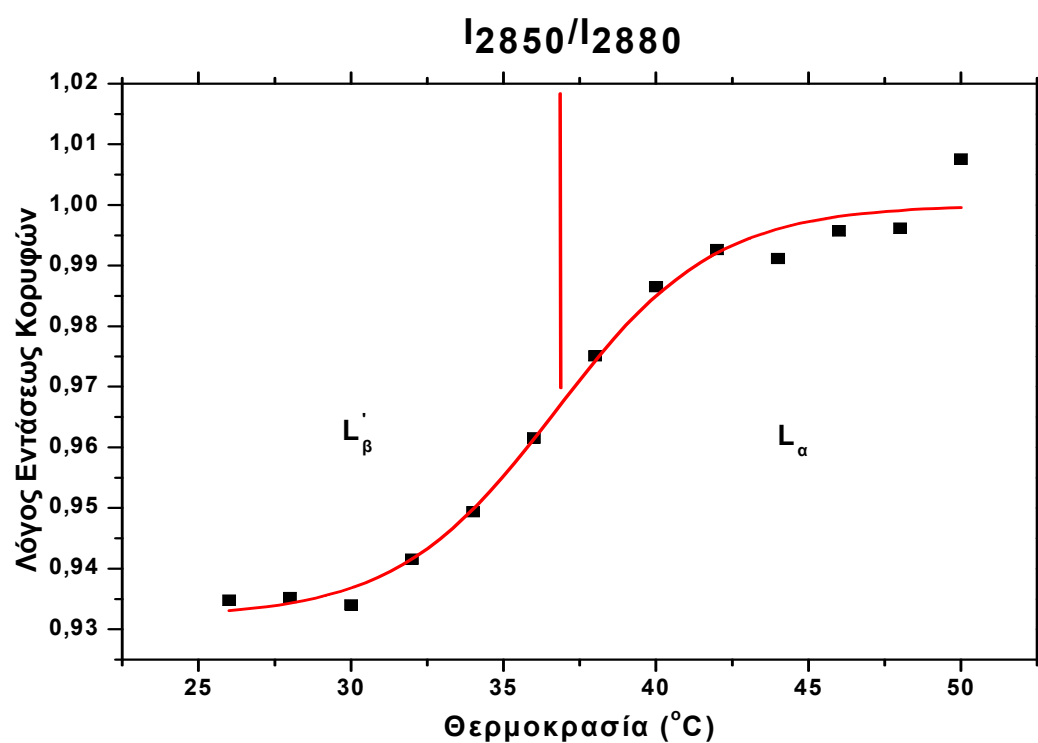
3.7.2 Φασματοσκοπία Raman

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τις τέσσερις διαφορετικές φασματικές περιοχές.

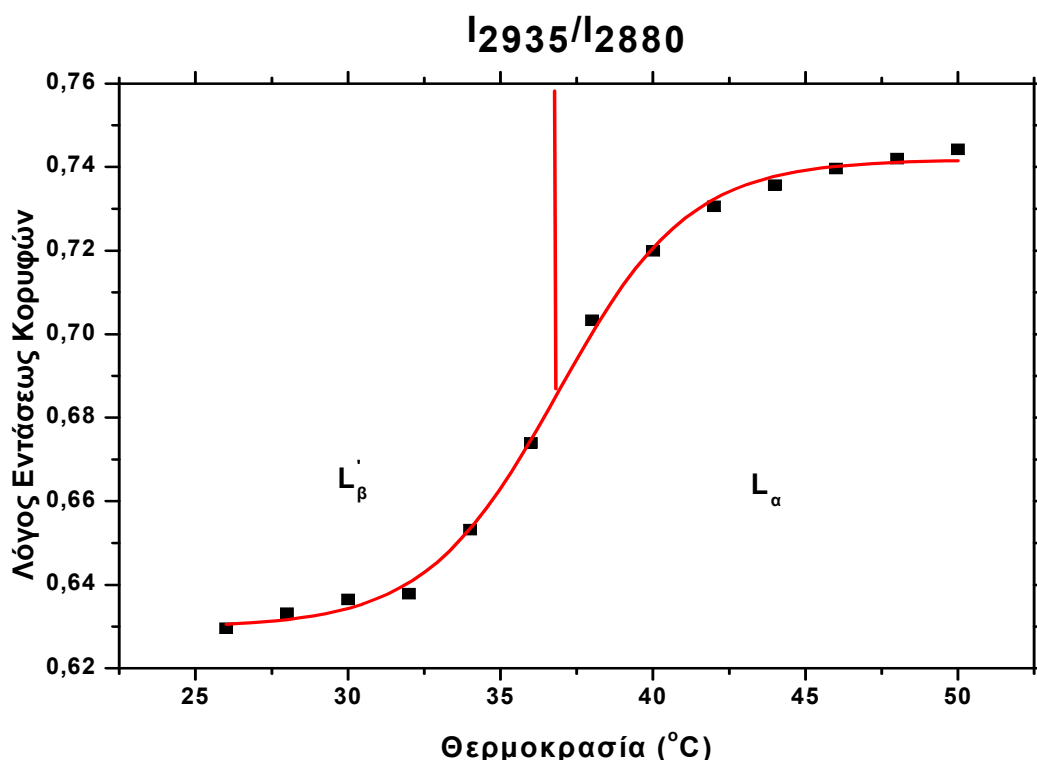
- **Περιοχή 2800 – 3000 cm^{-1} :** Στο σχήμα 3.51 παρουσιάζονται τα φάσματα Raman σε τέσσερις (4) διαφορετικές θερμοκρασίες του συστήματος μεμβράνης:χοληστερόλης:βιμπλαστίνης 65:10:25. Από τις εντάσεις των κορυφών αυτών υπολογίζονται οι λόγοι εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} και I_{2935}/I_{2880} . Τα σημεία καμπής των σιγμοειδών καμπυλών που προκύπτουν είναι 36.70 ± 0.47 και 36.84 ± 0.14 °C αντίστοιχα (σχήματα 3.52, 3.53). Το εύρος των τιμών των μελετούμενων λόγων είναι $\Delta R_{I_{2850}/I_{2880}}^{65:10:25} = 0.07$ και $\Delta R_{I_{2935}/I_{2880}}^{65:10:25} = 0.11$, ενώ τέλος οι μελετούμενες κορυφές 2850 και 2880 cm^{-1} παρουσιάζουν μετατόπιση σε υψηλότερες συχνότητες κατά 1.3 και 1.2 cm^{-1} αντίστοιχα (σχήμα 3.51). Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα αυτά με εκείνα του δείγματος 73:10:17, συμπεραίνεται η ανταγωνιστική δράση μεταξύ της χοληστερόλης και της βιμπλαστίνης, αφού και το εύρος τιμών των λόγων εντάσεως κορυφών αλλά και οι επιμέρους μετατοπίσεις είναι μεγαλύτερες στο δείγμα 65:10:25.



Σχήμα 3.51: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλασίνη 65:10:25 στην περιοχή 2800 – 3000 cm^{-1} .

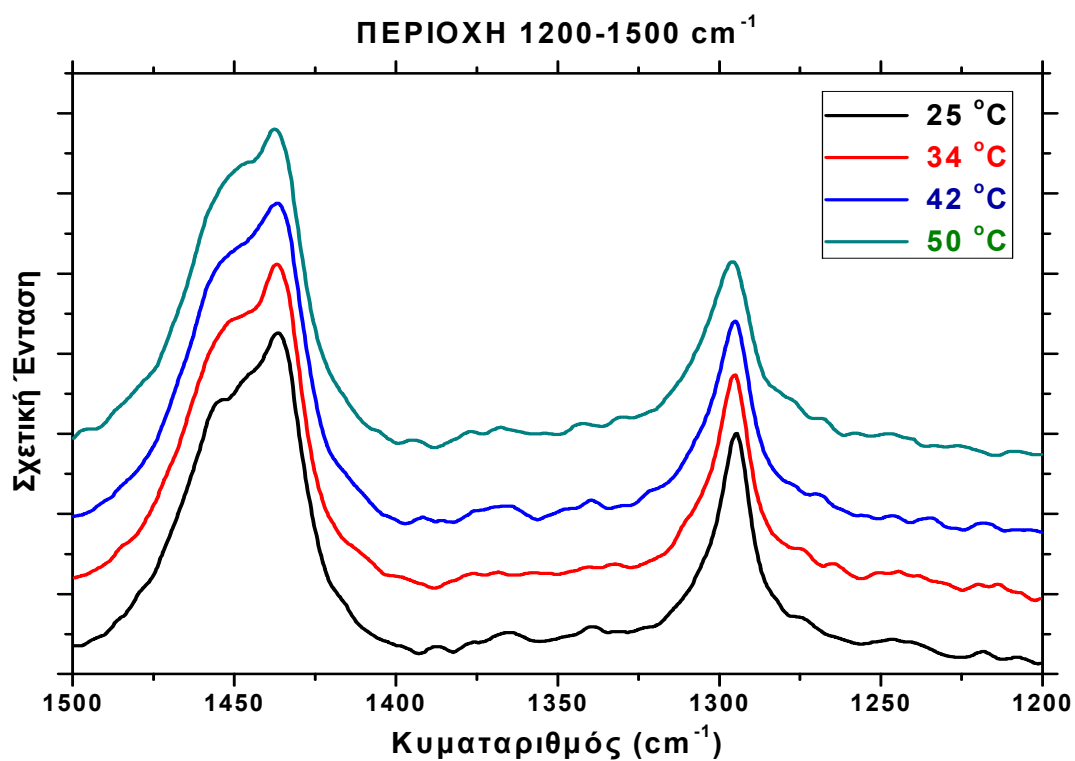


Σχήμα 3.52: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλασίνη 65:10:25.

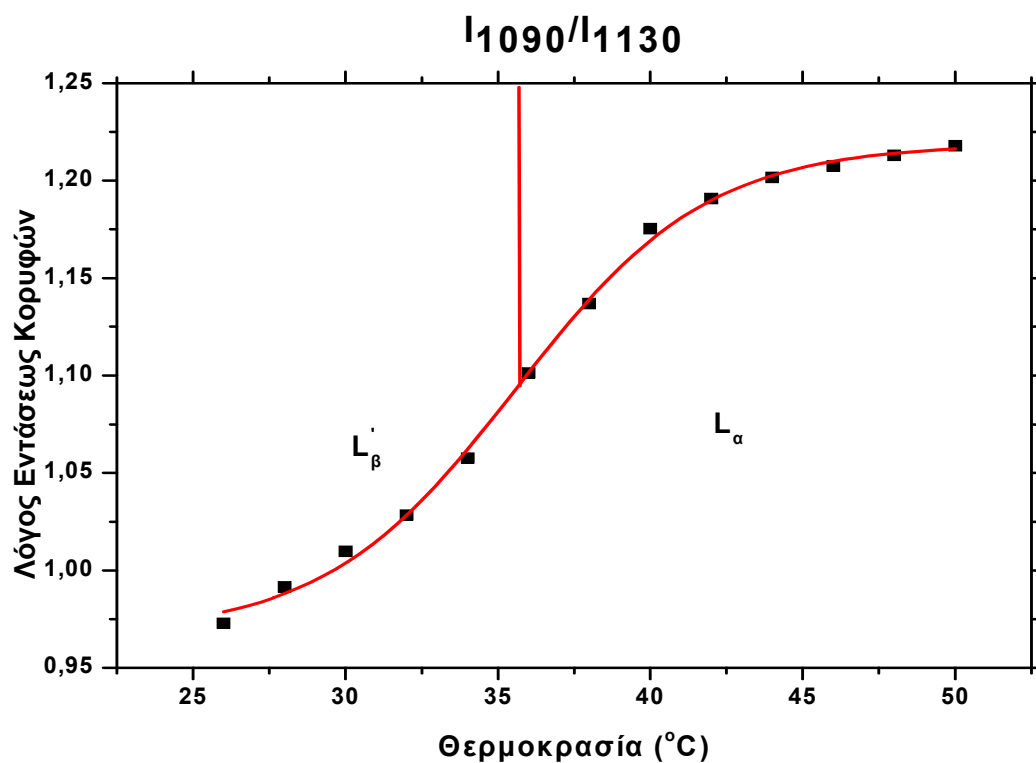


Σχήμα 3.53: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2935}/I_{2880} του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 65:10:25.

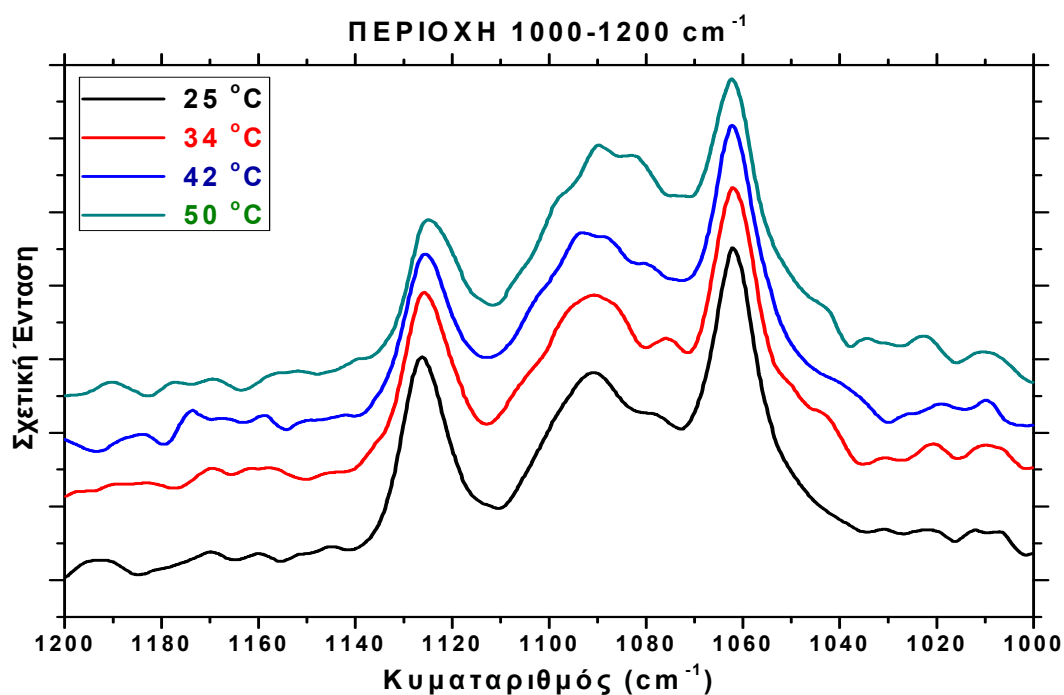
- **Περιοχή $1200 - 1500 \text{ cm}^{-1}$:** Στο σχήμα 3.54 φαίνεται ότι η κορυφή στους 1294 cm^{-1} μετατοπίζεται κατά 0.9 cm^{-1} ενώ αυτή στους 1436 cm^{-1} κατά 0.8 cm^{-1} , παρατήρηση που πιστοποιεί το γεγονός ότι η αύξηση της ποσότητας φαρμάκου προκαλεί περαιτέρω αταξία στις αλειφατικές αλυσίδες. Και σε αυτή την περίπτωση, ο διαχωρισμός της κορυφής (Σχήμα Π.13) και η μελέτη του λόγου I_{1457}/I_{1436} (Σχήμα Π.14) αποδεικνύει την αύξηση της αταξίας και της ρευστότητας της διπλοστιβάδας.
- **Περιοχή $1000 - 1200 \text{ cm}^{-1}$:** Ο λόγος I_{1090}/I_{1130} απεικονίζεται με μια σιγμοειδή καμπύλη, το σημείο καμπής της οποίας προσδιορίζεται στους $35.58 \pm 0.20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (σχήμα 3.55). Το εύρος των τιμών του λόγου αυτού στο εξεταζόμενο σύστημα είναι $\Delta R_{I_{1090}/I_{1130}}^{65:10:25} = 0.24$. Επιπλέον, η μετατόπιση της κορυφής στους 1090 cm^{-1} υπολογίζεται στους 2.3 cm^{-1} ενώ αυτή στους 1130 cm^{-1} κατά 1.1 cm^{-1} σε χαμηλότερες συχνότητες (σχήμα 3.56).



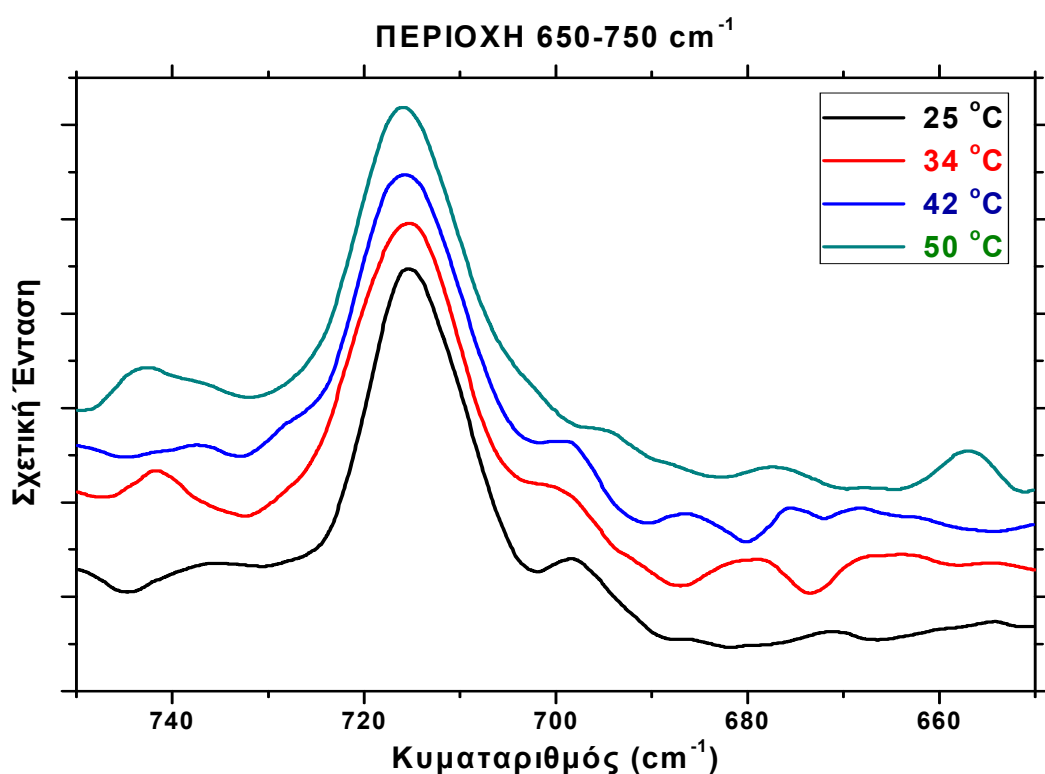
Σχήμα 3.54: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλασίνη 65:10:25 στην περιοχή 1200 – 1500 cm^{-1} .



Σχήμα 3.55: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλασίνη 65:10:25.



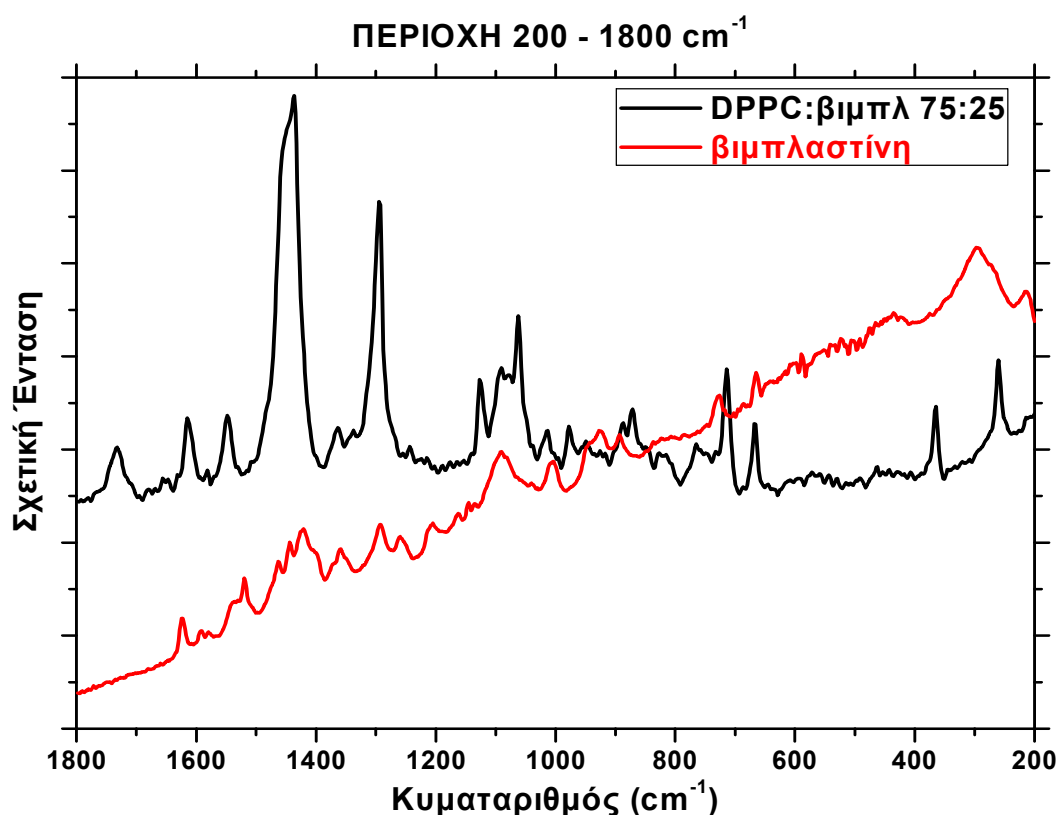
Σχήμα 3.56: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλασίνη 65:10:25 στην περιοχή 1000 – 1200 cm^{-1} .



Σχήμα 3.57: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλασίνη 65:10:25 στην περιοχή 650 – 750 cm^{-1} .

- **Περιοχή 650 – 750 cm^{-1} :** Η κορυφή στους 715 cm^{-1} παρουσιάζει μια μετατόπιση της τάξης των 1 cm^{-1} με αύξηση της θερμοκρασίας σε υψηλότερες συχνότητες (σχήμα 3.57). Η θετική μετατόπιση αυτή εκφράζει την ισχυρή αλληλεπίδραση της βιμπλαστίνης με τις πολικές κεφαλές.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Σε όλα τα δείγματα τα οποία περιείχαν το φαρμακευτικό μόριο της βιμπλαστίνης εκτός από αυτό του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 95:5, παρατηρήθηκαν επιπλέον κορυφές στα φάσματα Raman των δειγμάτων. Αυτές προσδιορίστηκαν στους 260, 666 (αιώρηση $-\text{CH}_3$), 1014 (βενζολικό δακτυλικό αποτύπωμα), 1548 (έκταση δεσμού $\text{N} - \text{H}$) και 1615 (βενζολικό δακτυλικό αποτύπωμα) cm^{-1} . Οι παραπάνω κορυφές οφείλονται σε δονήσεις του μορίου της βιμπλαστίνης, η παρατήρηση των οποίων επιβεβαιώνει την εισδοχή (ενσωμάτωση) του μορίου στις λιπιδικές διπλοστιβάδες (Εικόνα 3.2).

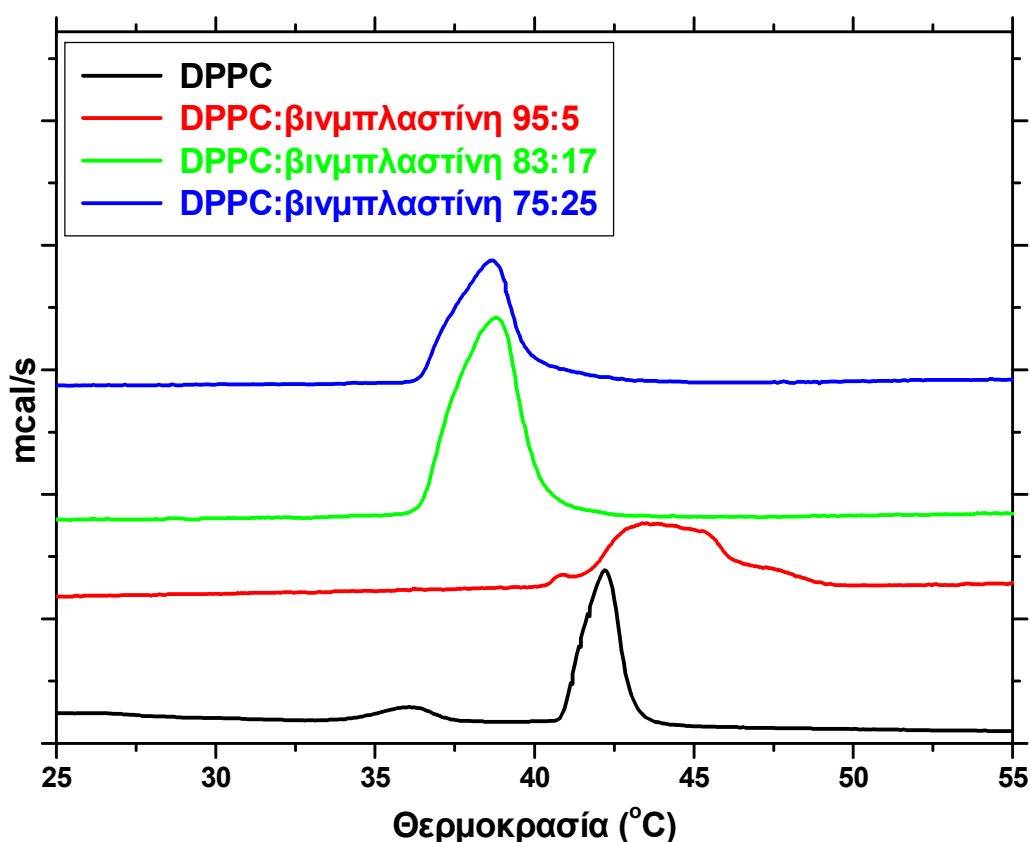


Εικόνα 3.2: Φάσματα Raman των δειγμάτων DPPC:βιμπλ 75:25 και βιμπλαστίνης σε θερμοκρασία 25 °C και στην περιοχή 200 – 1800 cm^{-1} .

3.8 Συνολικά αποτελέσματα DPPC:βιμπλαστίνης.

3.8.1 Αποτελέσματα Θερμικής Ανάλυσης.

Στο σχήμα 3.58 παρουσιάζονται τα θερμογραφήματα των λιπιδικών διπλοστιβάδων που προέκυψαν έπειτα από την εισδοχή διαφορετικών μοριακών αναλογιών του φαρμακευτικού μορίου της βιμπλαστίνης σε αυτές.

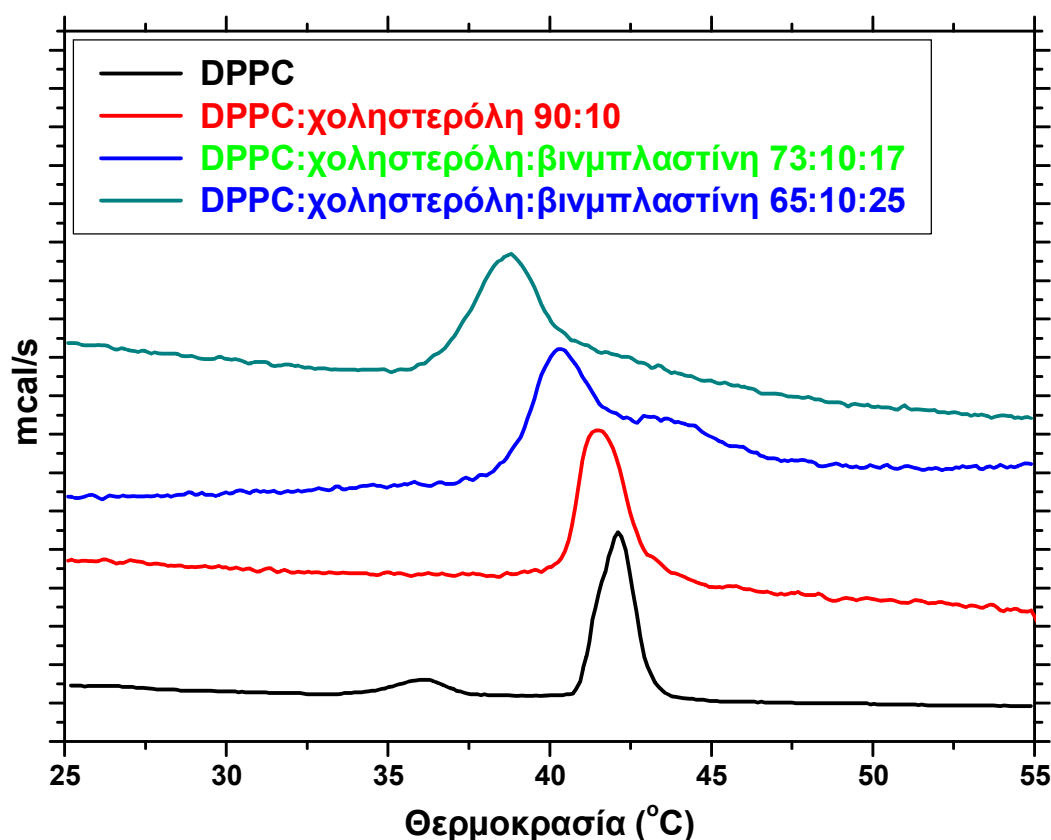


Σχήμα 3.58: Θερμογραφήματα των δειγμάτων DPPC, DPPC:βιμπλαστίνη 95:5, DPPC:βιμπλαστίνη 83:17 και DPPC:βιμπλαστίνη 75:25.

Από το σχήμα αυτό παρατηρούνται τα εξής: i) η εξαφάνιση της προμετάβασης φάσης των λιπιδικών διπλοστιβάδων ακόμα και μετά την εισδοχή της μικρότερης μοριακής αναλογίας φαρμάκου, γεγονός που αποδεικνύει την έντονη αλληλεπίδραση αυτού με τις πολικές κεφαλές της χολίνης των διπλοστιβάδων, ii) την αύξηση της θερμοκρασίας κύριας μεταβολής φάσης

στη μοριακή αναλογία 95:5, γεγονός που συμβαδίζει με την αλληλεπίδραση που περιγράφηκε παραπάνω, iii) την ασυμμετρία της κορυφής στη μοριακή αναλογία 95:5, η οποία πιστοποιεί τη δράση της βιμπλαστίνης στην περιοχή της μεσεπιφάνειας, iv) η συμμετρία των κορυφών στις μοριακές αναλογίες 83:17 και 75:25 επιβεβαιώνει την περισσότερη εισδοχή του φαρμάκου στις λιπιδικές διπλοστιβάδες και v) η δραστική μείωση της θερμοκρασίας κύριας μεταβολής φάσης στις αναλογίες 83:17 και 75:25 πιστοποιεί την αλληλεπίδραση της βιμπλαστίνης και με την λιπιδική περιοχή της διπλοστιβάδας.

Στο σχήμα 3.59 παρουσιάζονται τα θερμογραφήματα των μελετούμενων δειγμάτων τα οποία εμπεριείχαν το μόριο της χοληστερόλης, δηλαδή τα δείγματα DPPC, DPPC:χοληστερόλη 90:10, DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17 και DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 65:10:25.



Σχήμα 3.59: Θερμογραφήματα των δειγμάτων DPPC, DPPC:χοληστερόλη 90:10, DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17 και DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 65:10:25.

Από το σχήμα αυτό παρατηρούνται τα εξής: i) τη συνεχή μείωση της θερμοκρασίας κύριας μεταβολής φάσης με την προσθήκη της χοληστερόλης αλλά και της βιμπλαστίνης, ii) την ασυμμετρία της κορυφής του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17, γεγονός που αποκαλύπτει τη δημιουργία περιοχών “πλούσιων” και “φτωχών” σε περιεκτικότητα φαρμάκου και iii) την περισσότερη εισδοχή της βιμπλαστίνης στις λιπιδικές διπλοστιβάδες στο δείγμα 65:10:25.

Στον πίνακα 3.1 συνοψίζονται τα αποτελέσματα τα οποία λαμβάνονται από τη θερμική ανάλυση των υπό εξέταση δειγμάτων.

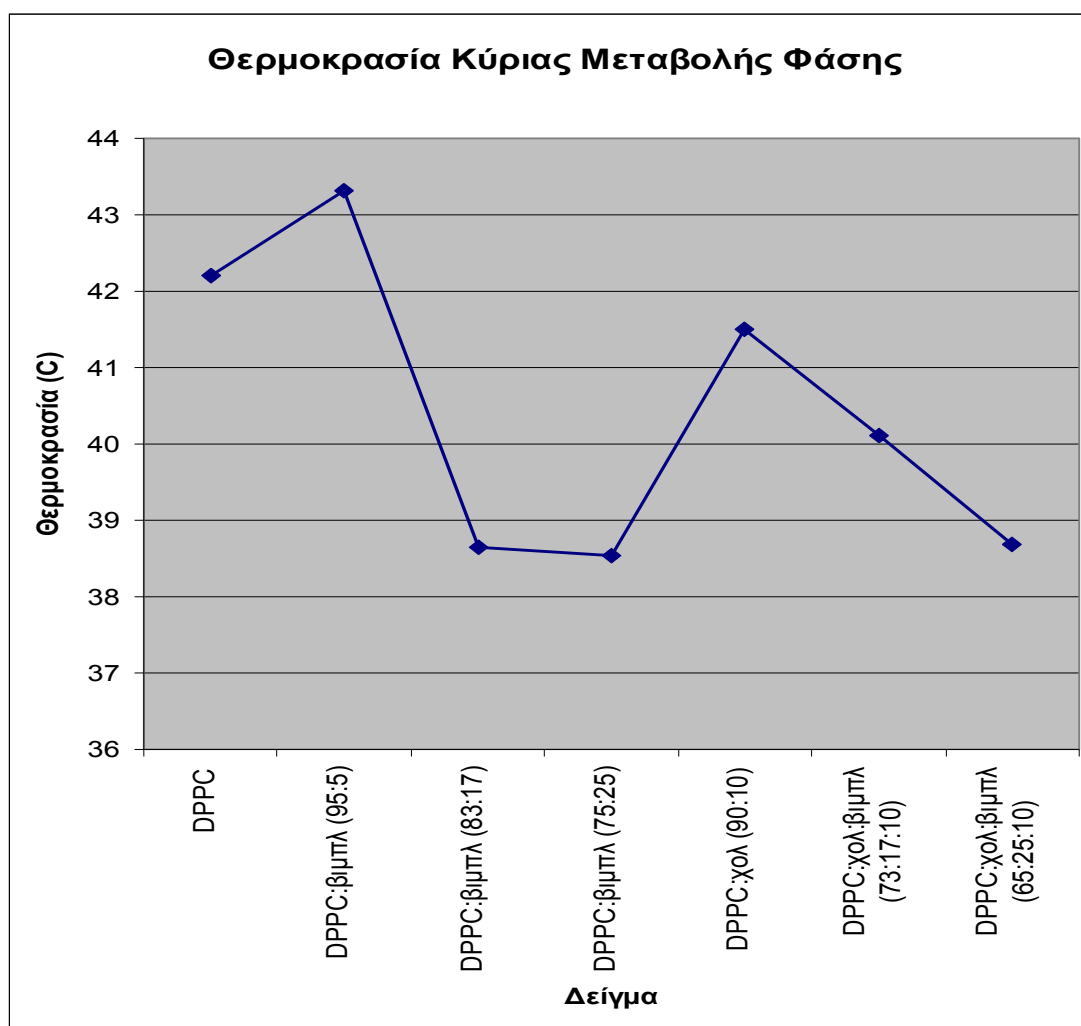
Πίνακας 3.1: Αποτελέσματα θερμικής ανάλυσης δειγμάτων βιμπλαστίνης.

ΔΕΙΓΜΑ	T_m (°C)	ΔH_m (kcal / mol)
DPPC	42.2	6.95
DPPC:βιμπλαστίνη (95:5)	43.31	6.99
DPPC:βιμπλαστίνη (83:17)	38.64	8.12
DPPC:βιμπλαστίνη (75:25)	38.54	8.29
DPPC:χοληστερόλη (90:10)	41.5	4.72
DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη (73:17:10)	40.12	5.32
DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη (65:25:10)	38.69	4.36

Από τη μια, λαμβάνοντας τις τιμές θερμοκρασίας κύριας μεταβολής φάσης των δειγμάτων που εξετάστηκαν, προκύπτει το διάγραμμα 3.1, στο οποίο παρατηρείται η εξάρτηση της θερμοκρασίας με την αύξηση της ποσότητας του

φαρμάκου που ενσωματώνεται στις λιπιδικές διπλοστιβάδες. Στο διάγραμμα αυτό γίνεται αντιληπτή η αύξηση της θερμοκρασίας για το δείγμα DPPC:βιμπλαστίνη 95:5 λόγω της αλληλεπίδρασης του φαρμάκου με τις πολικές κεφαλές όπως και τη δραστική μείωση αυτής στα δείγματα DPPC:βιμπλαστίνη 83:17 και DPPC:βιμπλαστίνη 75:25 λόγω της ισχυρής αλληλεπίδρασης με τις λιπιδικές αλυσίδες της διπλοστιβάδας. Ομοίως, εξετάζοντας τις θερμοκρασίες κύριας μεταβολής φάσης των δειγμάτων που περιέχουν βιμπλαστίνη και σταθερή ποσότητα χοληστερόλης στο διάγραμμα 3.1, παρατηρείται τη σχεδόν γραμμική μείωση αυτής στα υπό εξέταση δείγματα. Αυτό δηλώνει ότι η χοληστερόλη δεν παρεμποδίζει τη γραμμική αύξηση της ρευστότητας που προκαλούν οι δύο συγκεντρώσεις βιμπλαστίνης που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σημαντικό γιατί έχει παρατηρηθεί σε προηγούμενες ερευνητικές μας εργασίες ότι η χοληστερόλη παρεμποδίζει την εισδοχή των AT₁ ανταγωνιστών. Σε αυτές τις μελέτες συμπεράναμε ότι οι AT₁ ανταγωνιστές δεν εισδύουν σε περιοχές πλούσιες σε χοληστερόλη (raft). Με τα αντικαρκινικά μόρια της βίγκας δεν παρατηρείται αυτό. Αυτά δεν εμφανίζονται να εξοστρακίζονται από τις λιπιδικές διπλοστιβάδες και επομένως να χάνουν τη βιολογική τους δράση παρουσία της χοληστερόλης. Αντίθετα, η αύξηση της συγκέντρωσής τους επιφέρει ισχυρότερη διαταραχή στις αλυσίδες των λιπιδικών διπλοστιβάδων.

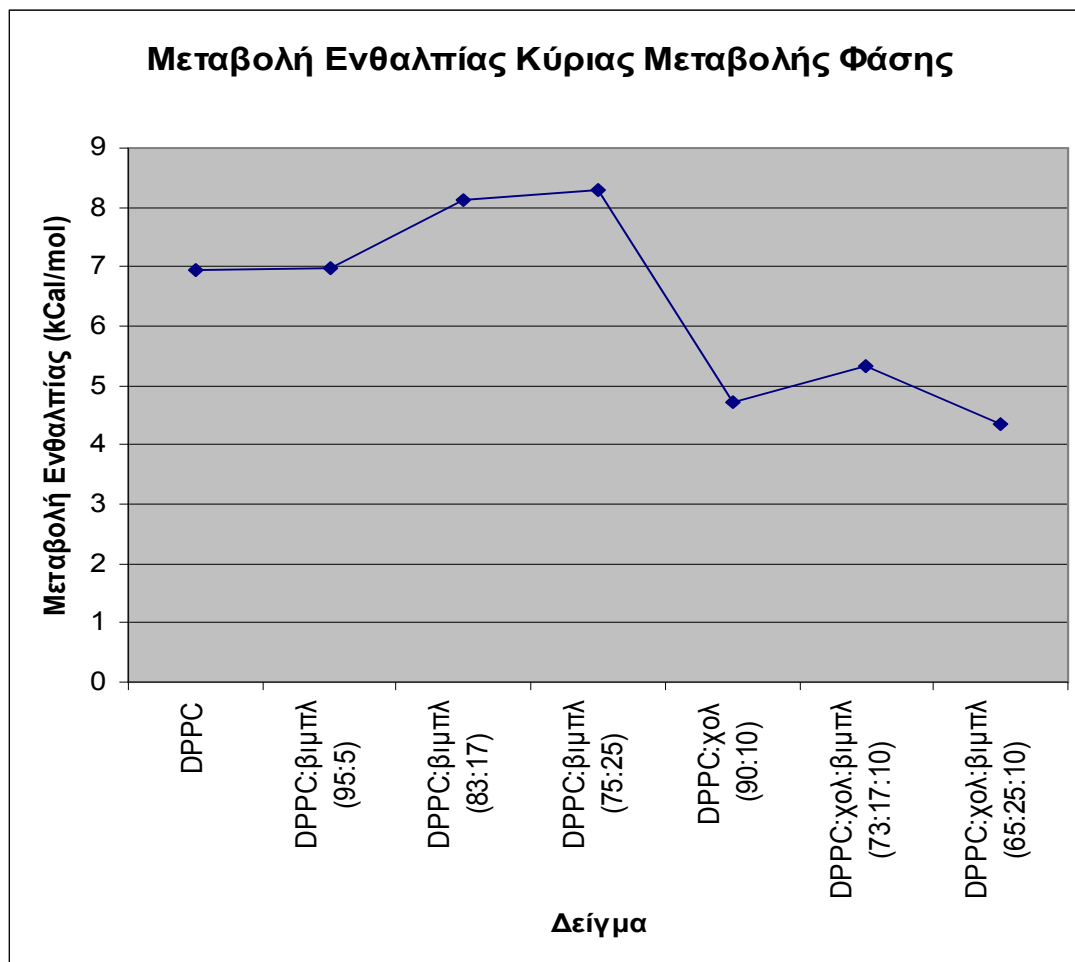
Μία ακόμη αξιοσημείωτη παρατήρηση είναι ότι η βιμπλαστίνη απουσία χοληστερόλης εμφανίζεται να εμφανίζει κορεσμό στις θερμικές αλλαγές που προκαλεί στη μοριακή αναλογία 17% αφού το θερμογράφημα στη μεγαλύτερη αναλογία των 25% είναι σχεδόν ταυτόσημο. Αντίθετα παρουσία χοληστερόλης η αύξηση συγκέντρωσης από 17% σε 25% έχει ως συνέπεια την αυξημένη δράση της. Συμπερασματικά, η χοληστερόλη αποτελεί μόριο το οποίο όχι μόνο δεν εμποδίζει τον κορεσμό δράσης της βιμπλαστίνης αλλά συνεργεί στη δράση της.



Διάγραμμα 3.1: Εξάρτηση της θερμοκρασίας κύριας μεταβολής φάσης σε συνάρτηση της ποσότητας φαρμάκου.

Οι διαφορές στη μεταβολή της ενθαλπίας της κύριας μεταβολής φάσης με τη συγκέντρωση των φαρμάκων, παριστάνονται στο διάγραμμα 3.2. Από αυτό παρατηρείται η αύξηση της απαιτούμενης μεταβολής ενθαλπίας κατά τη διάρκεια της κύριας φάσης μετασχηματισμού για τα δείγματα που περιέχουν βιμπλαστίνη λόγω του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης των αλειφατικών αλυσίδων των λιπιδικών διπλοστιβάδων. Επίσης, παρατηρώντας τις τιμές των δειγμάτων που περιέχουν χοληστερόλη, συμπεραίνουμε τη δραστική μείωση της απαιτούμενης μεταβολής ενθαλπίας κύριας μεταβολής φάσης, γεγονός που πιστοποιεί τη δράση της χοληστερόλης ως αναστολέα του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης. Επιπρόσθετα, λόγω της περαιτέρω μείωσης της ενθαλπίας με αύξηση της ποσότητας φαρμάκου, γίνεται κατανοητή η

συναγωνιστική δράση της χοληστερόλης και της βιμπλαστίνης όταν αυτές δρουν ταυτόχρονα στις λιπιδικές διπλοστιβάδες.



Διάγραμμα 3.2: Εξάρτηση της μεταβολής ενθαλπίας κύριας μεταβολής φάσης σε συνάρτηση της ποσότητας φαρμάκου.

Ανακεφαλαιώνοντας, τα αποτελέσματα της Θερμικής Ανάλυσης για τα δείγματα DPPC:βιμπλαστίνης και DPPC:χοληστερόλης:βιμπλαστίνης είναι τα ακόλουθα:

- ✓ Η βιμπλαστίνη παρουσιάζει ισχυρή αλληλεπίδραση με τις πολικές κεφαλές της χολίνης των λιπιδικών διπλοστιβάδων στη μεσεπιφάνεια αυτών με φορά προς τα μέσα, αφού σε μεγάλες συγκεντρώσεις επηρεάζει και τις αλειφατικές αλυσίδες.
- ✓ Η εισδοχή της βιμπλαστίνης στις λιπιδικές διπλοστιβάδες σε μοριακή αναλογία μεγαλύτερη από 83:17, προκαλεί το φαινόμενο της

αλληλοεισχώρησης των απέναντι αλειφατικών αλυσίδων των διπλοστιβάδων.

- ✓ Η χοληστερόλη δρα ως αναστολέας του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης σε μεγάλη συγκέντρωση βιμπλαστίνης.
- ✓ Η ταυτόχρονη εισδοχή χοληστερόλης και βιμπλαστίνης στις λιπιδικές μεμβράνες σε μεγάλες συγκεντρώσεις επιφέρουν συναγωνιστικά αποτελέσματα.

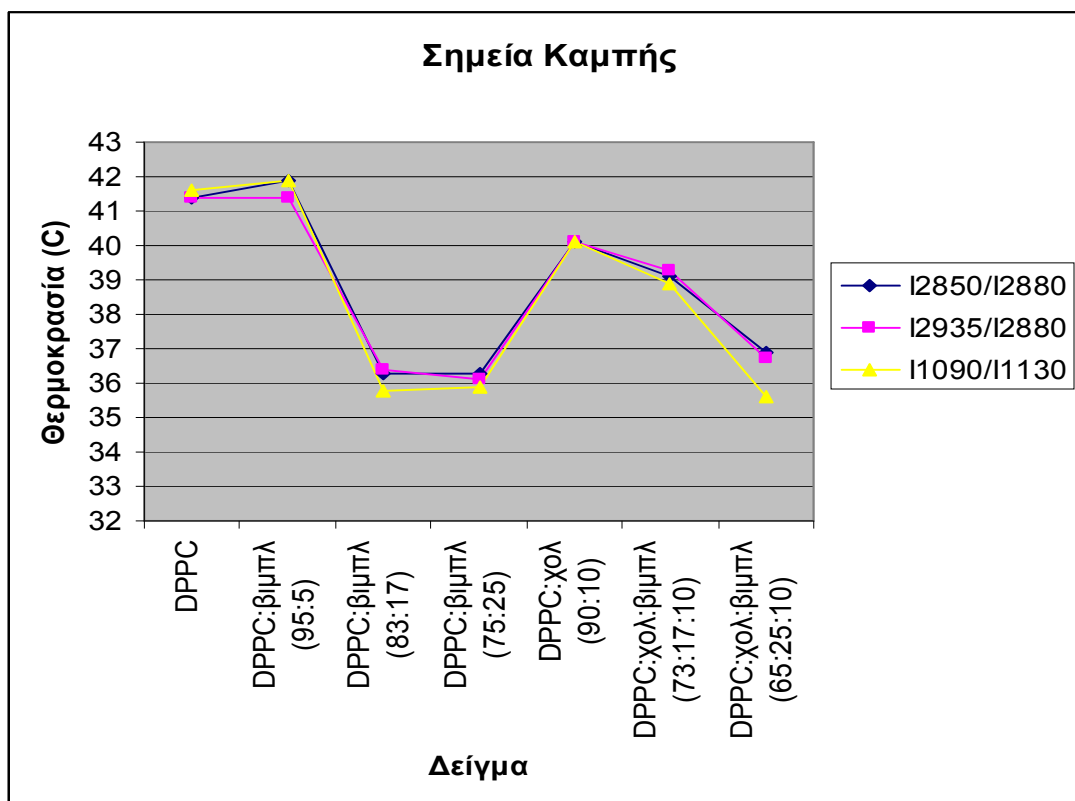
3.8.2 Αποτελέσματα φασματοσκοπίας Raman.

Στο σημείο αυτό για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων Raman των εξεταζόμενων δειγμάτων, θα αναλυθεί η εξάρτηση κάθε παραμέτρου που προσδιορίστηκε σε σχέση με την ποσότητα του φαρμάκου και της χοληστερόλης, με σκοπό τον προσδιορισμό των δομικών αλλαγών που συμβαίνουν στις λιπιδικές διπλοστιβάδες.

- **Σημεία καμπής σιγμοειδών καμπυλών:** Στον πίνακα 3.2 παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα των σημείων καμπής των σιγμοειδών καμπυλών των δειγμάτων που αναλύθηκαν για τους λόγους εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} , I_{2935}/I_{2880} και I_{1090}/I_{1130} . Χρησιμοποιώντας τα δεδομένα του πίνακα 3.2, προκύπτει το διάγραμμα 3.3 στο οποίο καταγράφεται η συμπεριφορά των σημείων καμπής των σιγμοειδών καμπυλών των λόγων εντάσεως κορυφών Raman. Από τη μελέτη του διαγράμματος αυτού, παρατηρείται ότι τα αποτελέσματα της Φασματοσκοπίας Raman είναι σε πολύ καλή συμφωνία με αυτά της Θερμικής Ανάλυσης. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα πως η φασματοσκοπία Raman, παρόλο που είναι μικροσκοπική μέθοδος και δίνει πληροφορίες για τις δομικές μεταβολές των υλικών, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως μέθοδος προσδιορισμού μακροσκοπικών ιδιοτήτων των υλικών όπως η θερμοκρασία κύριας μεταβολής φάσης των λιπιδικών διπλοστιβάδων.

Πίνακας 3.2: Σημεία καμπής των σιγμοειδών καμπυλών που αντιστοιχούν στους λόγους εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} , I_{2935}/I_{2880} και I_{1090}/I_{1130} .

ΔΕΙΓΜΑ	Σημεία Καμπής (°C)			T_m (°C)
	I_{2850}/I_{2880}	I_{2935}/I_{2880}	I_{1090}/I_{1130}	
DPPC	41.43	41.46	41.63	42.20
DPPC:βιμπλ (95:5)	41.89	41.42	41.93	43.31
DPPC:βιμπλ (83:17)	36.37	36.39	35.87	38.64
DPPC:βιμπλ (75:25)	36.31	36.10	35.87	38.54
DPPC:χολ (90:10)	40.07	40.07	40.12	41.50
DPPC:χολ:βιμπλ (73:17:10)	39.07	39.30	38.92	40.12
DPPC:χολ:βιμπλ (65:25:10)	36.70	36.86	35.58	38.69



Διάγραμμα 3.3: Εξάρτηση των σημείων καμπής των σιγμοειδών καμπυλών των λόγων εντάσεως κορυφών Raman σε σχέση με την ποσότητα φαρμάκου.

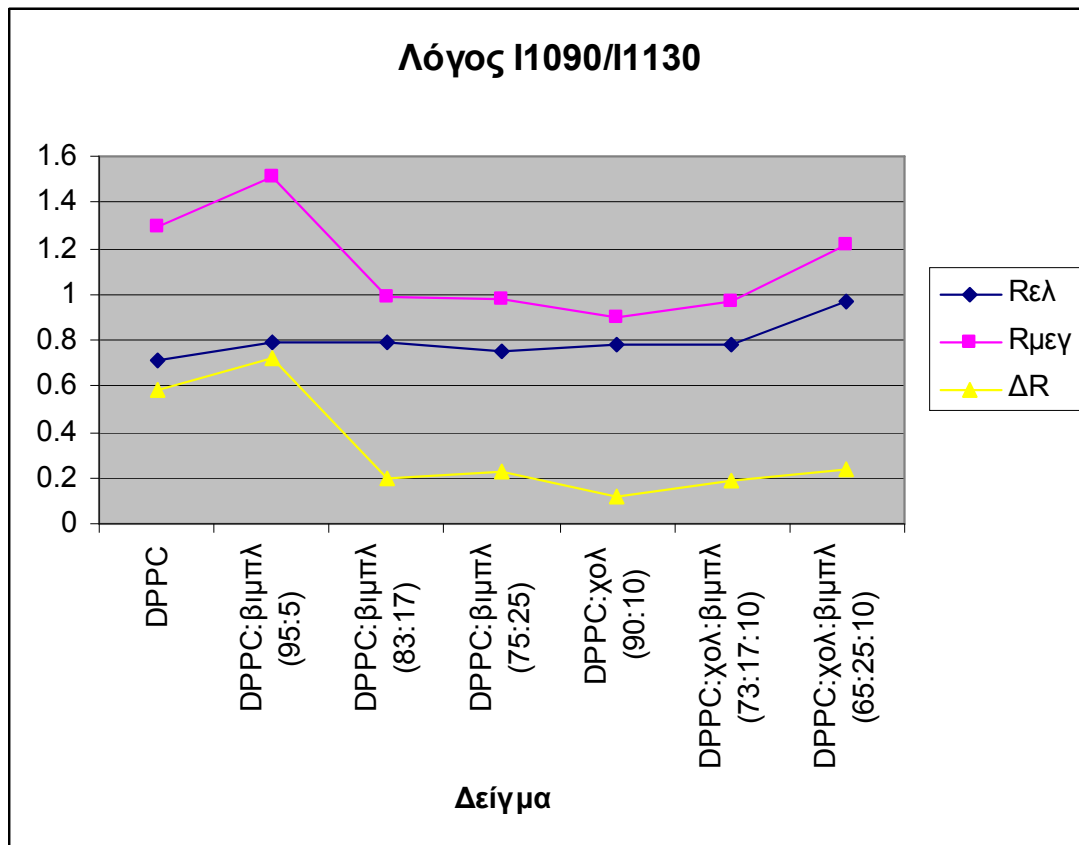
- **Εύρος τιμών των λόγων εντάσεως κορυφών Raman:** Στον πίνακα 3.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δειγμάτων που εξετάστηκαν για την ελάχιστη και τη μέγιστη τιμή που παρουσίασαν οι λόγοι εντάσεως κορυφών Raman σε όλο το εύρος θερμοκρασιών της πειραματικής διαδικασίας.

Πίνακας 3.3: Ελάχιστες και μέγιστες παρατηρούμενες τιμές των λόγων εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} , I_{2935}/I_{2880} και I_{1090}/I_{1130} .

	Παρατηρούμενες τιμές των λόγων εντάσεως κορυφών Raman								
	I_{2850}/I_{2880}			I_{2935}/I_{2880}			I_{1090}/I_{1130}		
ΔΕΙΓΜΑ	$R_{ελ}$	$R_{μεγ}$	ΔR	$R_{ελ}$	$R_{μεγ}$	ΔR	$R_{ελ}$	$R_{μεγ}$	ΔR
DPPC	0.82	1	0.18	0.46	0.73	0.27	0.71	1.29	0.58
DPPC:βιμπλ (95:5)	0.81	0.99	0.18	0.42	0.71	0.29	0.79	1.51	0.72
DPPC:βιμπλ (83:17)	0.76	0.94	0.18	0.42	0.57	0.15	0.79	0.99	0.2
DPPC:βιμπλ (75:25)	0.88	1	0.12	0.43	0.6	0.17	0.75	0.98	0.23
DPPC:χολ (90:10)	0.84	0.91	0.07	0.51	0.59	0.08	0.78	0.9	0.12
DPPC:χολ:βιμπλ (73:17:10)	0.87	0.92	0.05	0.58	0.66	0.08	0.78	0.97	0.19
DPPC:χολ:βιμπλ (65:25:10)	0.94	1.01	0.07	0.63	0.74	0.11	0.97	1.21	0.24

- Η τιμή του λόγου I_{1090}/I_{1130} δείχνει την αναλογία *gauche* και *trans* διαμορφωμένων των λιπιδικών αλυσίδων των διπλοστιβάδων καθώς και τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται. Όσο μεγαλύτερη η τιμή του λόγου αυτού, τόσο περισσότερες είναι οι δομές *gauche* που επικρατούν, τόσο μικρότερες οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις και άρα η λιπιδική διπλοστιβάδα εμφανίζει μεγαλύτερη ρευστότητα.

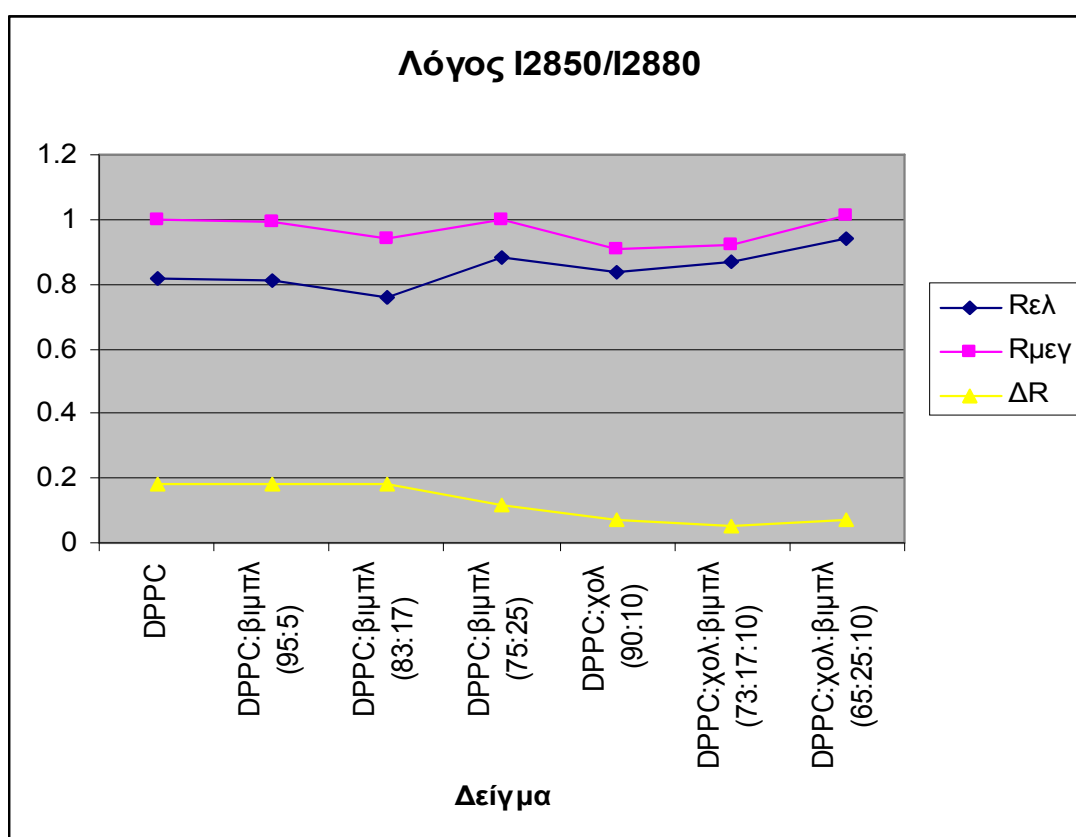
Παρατηρείται λοιπόν, ότι η εισδοχή της βιμπλαστίνης αποδιοργανώνει τις αλυσίδες στην κατάσταση γέλης λόγω της αλληλεπίδρασής της με αυτές μέχρι την κύρια μεταβολή φάσης ενώ μετά από αυτήν προκαλεί μείωση της ρευστότητας λόγω της εμφάνισης του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης. Η προσθήκη της χοληστερόλης στις διπλοστιβάδες προκαλεί αποδιοργάνωση της κατάστασης γέλης αλλά πιο συνεκτικό πακετάρισμα της υγρής κρυσταλλικής φάσης. Η ταυτόχρονη όμως προσθήκη χοληστερόλης και βιμπλαστίνης προκαλεί περαιτέρω αποδιοργάνωση της υγρής κρυσταλλικής φάσης, αύξηση της ρευστότητας, αποδεικνύοντας έτσι την ανταγωνιστική τους δράση (διάγραμμα 3.4).



Διάγραμμα 3.4: Εξάρτηση των τιμών του λόγου I_{1090}/I_{1130} από την ποσότητα φαρμάκου.

- Η τιμή του λόγου I_{2850}/I_{2880} αποτελεί μέτρο των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων που επικρατούν στις λιπιδικές διπλοστιβάδες. Όσο μικρότερη η τιμή του, τόσο μεγαλύτερες είναι αυτές ενώ αντίθετα αύξηση της τιμής του αποκαλύπτει μείωση των

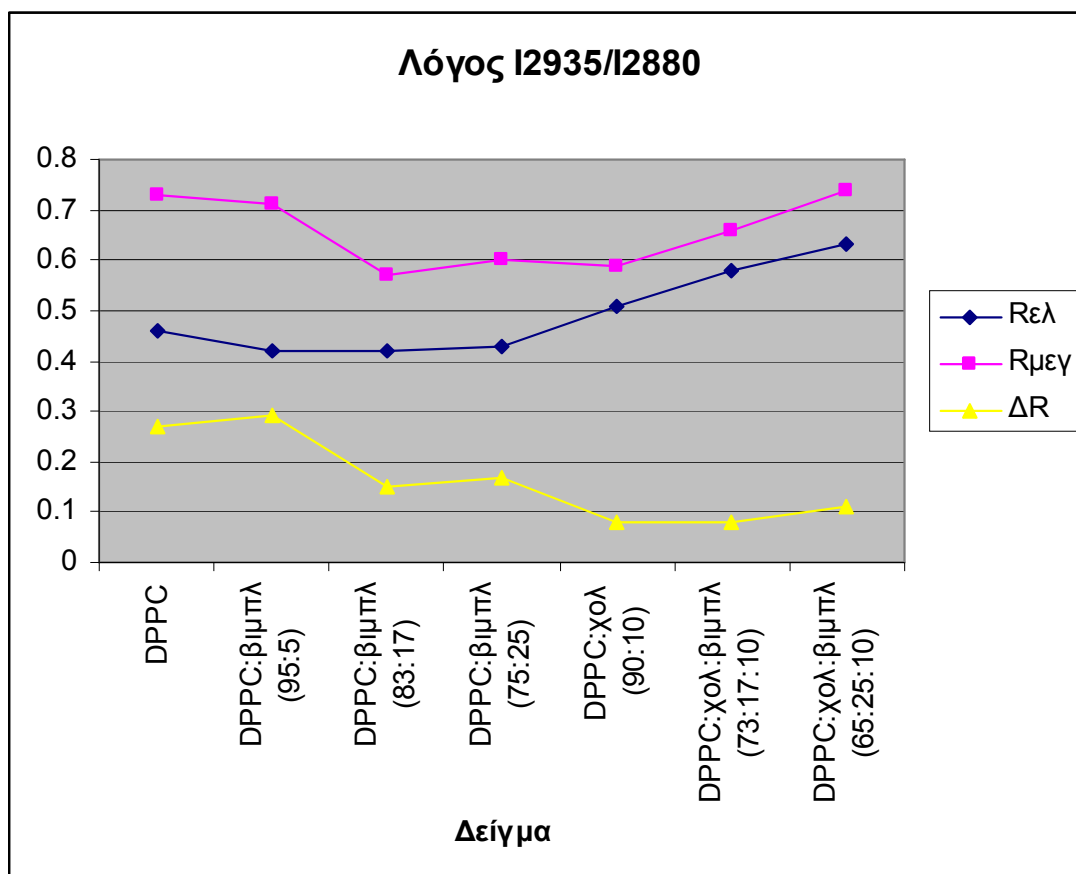
αλληλεπιδράσεων αυτών. Από το διάγραμμα 3.5 γίνεται σαφές ότι η ενσωμάτωση της βιμπλαστίνης στις λιπιδικές διπλοστιβάδες προκαλεί αύξηση των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων λόγω της εμφάνισης του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης ενώ η ταυτόχρονη είσοδος χοληστερόλης και βιμπλαστίνης προκαλεί αύξηση της τιμής του λόγου αυτού αφού: i) η χοληστερόλη αποτρέπει τη δημιουργία αλληλοεισχώρησης και ii) η βιμπλαστίνη προκαλεί περαιτέρω αποδιοργάνωση των αλειφατικών αλυσίδων.



Διάγραμμα 3.5: Εξάρτηση των τιμών του λόγου I_{2850}/I_{2880} από την ποσότητα φαρμάκου.

➤ Η τιμή του λόγου I_{2935}/I_{2880} αποτελεί μέτρο της αταξίας (αποδιοργάνωση) των λιπιδικών διπλοστιβάδων. Μικρότερη τιμή του λόγου αυτού σημαίνει ισχυρότερη οργάνωση (είσοδος βιμπλαστίνης) και μεγαλύτερη τιμή αποκαλύπτει «χαλαρό» ή μη

συνεκτικό πακετάρισμα των αλυσίδων (εισδοχή χοληστερόλης και βιμπλαστίνης) (διάγραμμα 3.6).



Διάγραμμα 3.6: Εξάρτηση των τιμών του λόγου I_{2935}/I_{2880} από την ποσότητα φαρμάκου.

- Μετατοπίσεις κορυφών Raman:** Στον πίνακα 3.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δειγμάτων που εξετάστηκαν για τη μετατόπιση που εμφανίζουν οι παρατηρούμενες κορυφές λόγω της αλληλεπίδρασης της χοληστερόλης και του φαρμάκου με τις λιπιδικές διπλοστιβάδες. Από τις τιμές της μετατόπισης της κορυφής στους 715 cm^{-1} γίνεται σαφής η ισχυρή αλληλεπίδραση της βιμπλαστίνης με την πολική κεφαλή της χολίνης σε όλες τις μοριακές αναλογίες ενώ από τις τιμές μετατόπισης των κορυφών στους 1090, 1130, 1294, 1436, 2850 και 2880 cm^{-1} γίνεται σαφής η ολοένα ισχυρότερη αλληλεπίδραση της βιμπλαστίνης με τις αλειφατικές αλυσίδες με αύξηση της μοριακής αναλογίας αυτής στις λιπιδικές διπλοστιβάδες.

Πίνακας 3.4: Μετατοπίσεις των παρατηρούμενων κορυφών Raman.

ΔΕΙΓΜΑ	Μετατοπίσεις Κορυφών Raman (cm ⁻¹)						
	715	1090	1130	1294	1436	2850	2880
DPPC	-2.8	-10.7	-2.9	2.4	3.1	3.9	3.7
DPPC:βιμπλ (95:5)	1.7	-3.0	-1.1	0.5	0.4	0.7	0.5
DPPC:βιμπλ (83:17)	1.0	-5.6	-2.0	1.0	1.4	1.1	1.7
DPPC:βιμπλ (75:25)	0.3	-6.9	-2.6	2.2	2.4	3.3	2.5
DPPC:χολ (90:10)	-1.8	-2.7	-0.9	0.6	0.9	1.1	0.3
DPPC:χολ:βιμπλ (73:17:10)	1.0	-3.5	-0.5	0.7	0.4	1.3	0.4
DPPC:χολ:βιμπλ (65:25:10)	1.0	-2.3	-1.1	0.9	0.8	1.3	1.2

Ανακεφαλαιώνοντας, τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας Raman για τα δείγματα DPPC:βιμπλαστίνης και DPPC:χοληστερόλης:βιμπλαστίνης είναι τα ακόλουθα:

- ✓ Η βιμπλαστίνη παρουσιάζει ισχυρότερη αλληλεπίδραση με τις πολικές κεφαλές της χολίνης των λιπιδικών διπλοστιβάδων στη μεσεπιφάνεια αυτών με φορά προς τα μέσα, αφού σε μεγάλες συγκεντρώσεις επηρεάζει και τις αλειφατικές αλυσίδες.
- ✓ Η εισδοχή της βιμπλαστίνης στις λιπιδικές διπλοστιβάδες σε μοριακή αναλογία μεγαλύτερη από 83:17, προκαλεί το φαινόμενο της αλληλοεισχώρησης των απέναντι αλειφατικών αλυσίδων των διπλοστιβάδων.

- ✓ Η δράση της βιμπλαστίνης δείχνει να κορένεται μετά τη μοριακή αναλογία 83:17, αφού στη μοριακή αναλογία 75:25 παρατηρούνται πανομοιότυπα αποτελέσματα.
- ✓ Η χοληστερόλη δρα ως αναστολέας του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης προκαλώντας ρευστοποίηση της κατάστασης πηκτώματος, εξασθενώντας τις διαμορικές αλληλεπιδράσεις και ισχυροποιώντας τις ενδομοριακές.
- ✓ Η ταυτόχρονη εισδοχή χοληστερόλης και βιμπλαστίνης στις λιπιδικές μεμβράνες επιφέρουν συναγωνιστικά και ανταγωνιστικά αποτελέσματα.
- ✓ Το θερμοκρασιακό προφίλ του λόγου I_{2935}/I_{2880} είναι ίδιο με αυτό του λόγου I_{2850}/I_{2880} στα συστήματα DPPC:φάρμακο ενώ αντίθετα είναι ίδιο με αυτό του λόγου I_{1090}/I_{1130} στα συστήματα DPPC:χοληστερόλη:φάρμακο. Η συμπεριφορά αυτή δεικνύει την επικράτηση των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων στα δείγματα DPPC:φάρμακο και την επικράτηση των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων στα δείγματα DPPC:χοληστερόλη:φάρμακο.

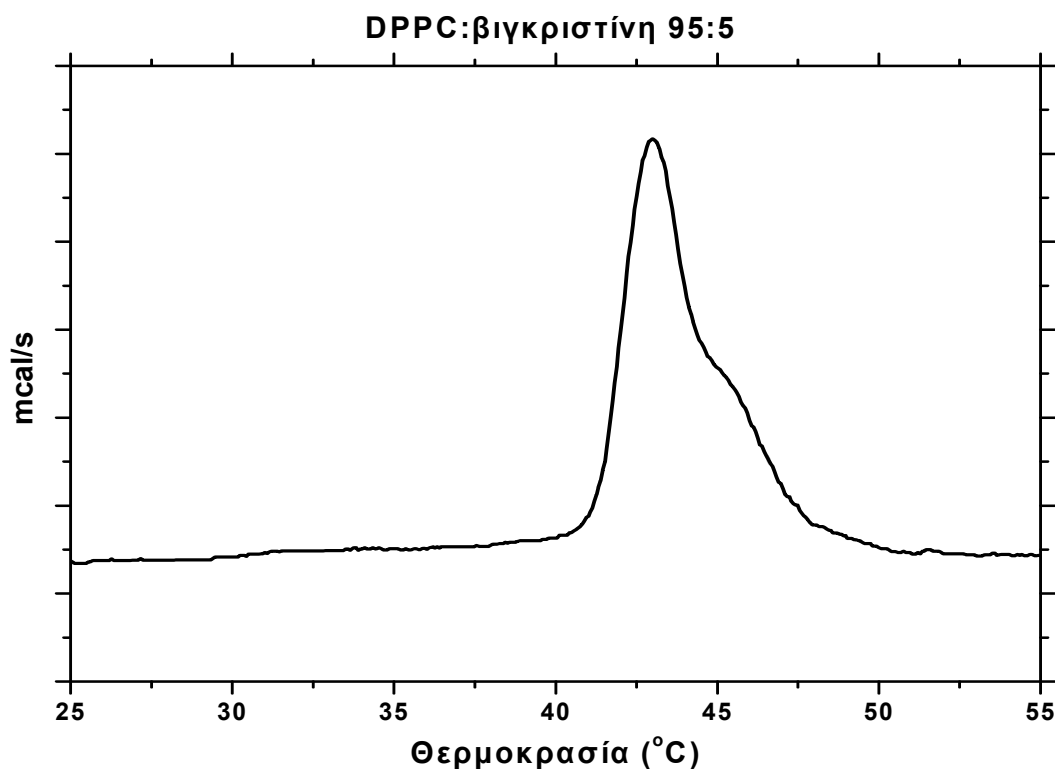
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ DPPC:ΒΙΓΚΡΙΣΤΙΝΗ

4.1 Αποτελέσματα δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 95:5

4.1.1 Θερμική Ανάλυση

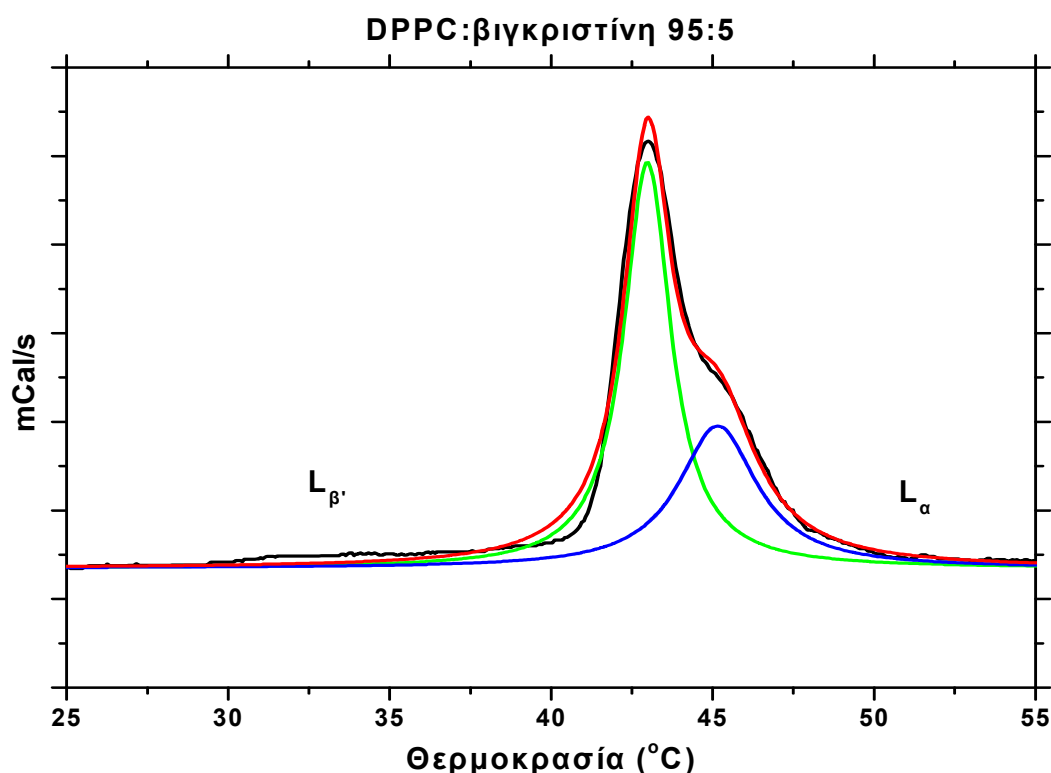
Στο σχήμα 4.1 παρουσιάζεται το θερμογράφημα του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 95:5 στην περιοχή θερμοκρασιών του πειράματος. Σε αυτό παρατηρείται ότι με την εισδοχή του φαρμακευτικού μορίου στις λιπιδικές διπλοστιβάδες, προκαλείται πλήρης εξαφάνιση της προμετάβασης φάσης, γεγονός που οφείλεται στην ισχυρή αλληλεπίδραση αυτού με την πολική κεφαλή της χολίνης.



Σχήμα 4.1: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 95:5.

Συμπερασματικά, το σύστημα μεμβράνη:βιμπλαστίνη μεταβαίνει από την φάση γέλης απ'ευθείας στην υγρή κρυσταλλική φάση, μέσω της κύριας μετάβασης φάσης, που παρατηρείται σε θερμοκρασία $T_m = 43\text{ }^{\circ}\text{C}$, ενώ η αντίστοιχη μεταβολή ενθαλπίας προσδιορίζεται στα $\Delta H_m = 7.33 \pm 0.37\text{ kcal/mol}$, αυξημένη σε σχέση με αυτήν των λιπιδικών διπλοστιβάδων DPPC.

Παρατηρώντας την υφή του θερμογραφήματος, συμπεραίνεται πως η καμπύλη δεν είναι συμμετρική όπως στην περίπτωση των λιπιδικών μεμβρανών χωρίς την είσοδο του φαρμάκου (Σχ. 4.1). Εφαρμόζοντας, τη μέθοδο αποσυγκερασμού κορυφών προκύπτει το σχήμα 4.2 στο οποίο φαίνεται ότι η αρχική καμπύλη θέρμανσης αποτελείται από δύο διαφορετικές κορυφές. Η πρώτη κορυφή παρατηρείται στους $T_{m1} = 42.97 \pm 0.01\text{ }^{\circ}\text{C}$ με μεταβολή ενθαλπίας $\Delta H_{m1} = 4.62 \pm 0.23\text{ kcal/mol}$ ενώ η δεύτερη στους $T_{m2} = 45.16 \pm 0.05\text{ }^{\circ}\text{C}$ με μεταβολή ενθαλπίας $\Delta H_{m2} = 2.71 \pm 0.14\text{ kcal/mol}$.



Σχήμα 4.2: Καμπύλη θέρμανσης του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 95:5 με διαχωρισμό κορυφών.

Αυτή η μορφή θερμογραφήματος μπορεί να αποδοθεί σε δύο παράγοντες: i) Σε γραμμομοριακή αναλογία 95:5 η ποσότητα της βιγκριστίνης δεν εισέρχεται με ομογενή τρόπο μέσα στις λιπιδικές διπλοστιβάδες, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται πιθανά ταυτόχρονα περιοχές των διπλοστιβάδων “πλούσιες σε φάρμακο” (rich domains) σε χαμηλότερες θερμοκρασίες αλλά και περιοχές “φτωχές σε φάρμακο” (poor domains) στις υψηλότερες θερμοκρασίες. Οι διπλοστιβάδες με τη μεγαλύτερη ποσότητα φαρμάκου είναι πιο εύηκτες με μικρότερη θερμοκρασία μεταβολής φάσης ενώ αυτές με την μικρότερη ποσότητα είναι πιο δύστηκτες και παρουσιάζουν μεγαλύτερη θερμοκρασία μεταβολής φάσης, ii) Λόγω λιποφιλικότητας ή/και στερεοχημικών παρεμποδίσεων η ποσότητα της βιγκριστίνης δεν ενσωματώνεται πλήρως στις λιπιδικές διπλοστιβάδες, αλλά μέρος αυτής παρατηρείται επιδιαλυτωμένη στο υδατικό περιβάλλον και κοντά στην πολική κεφαλή της χολίνης.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι σε αυτή τη μικρή αναλογία, η βιγκριστίνη δεν επηρεάζει αισθητά τη ΔH . Αυτό ίσως να δείχνει ότι η δράση της είναι περισσότερο στην επιφάνεια της λιπιδικής διπλοστιβάδας.

4.1.2 Φασματοσκοπία Raman

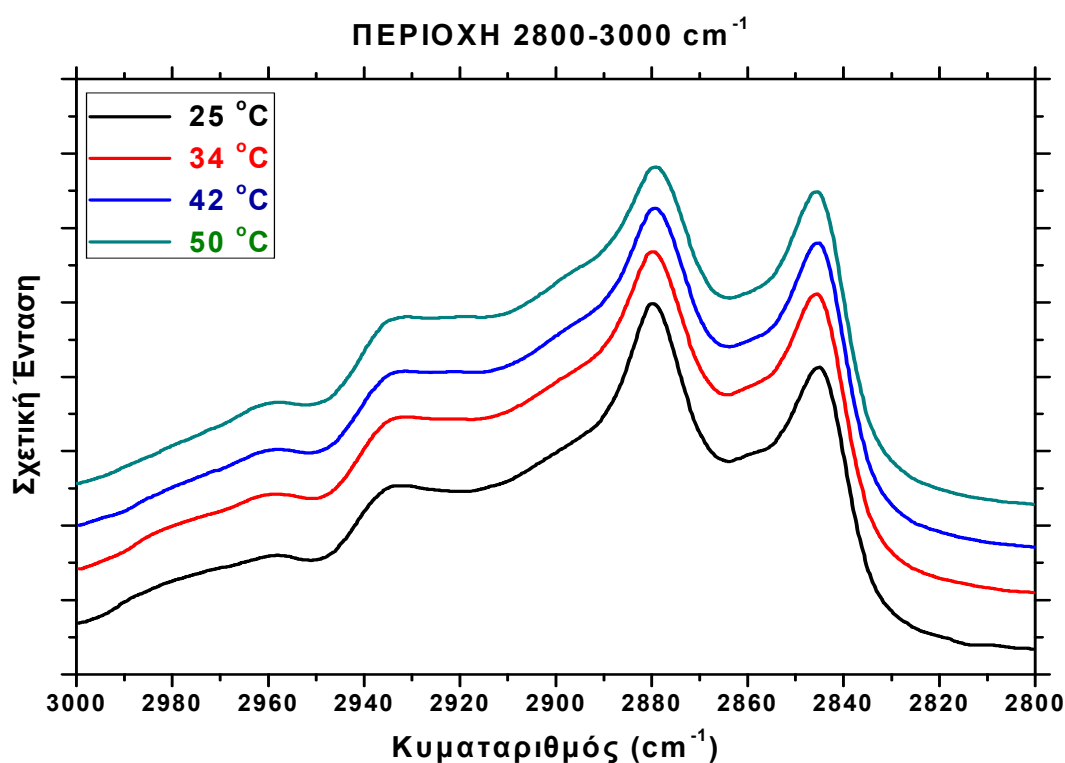
Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τις τέσσερις διαφορετικές φασματικές περιοχές στο ίδιο δείγμα.

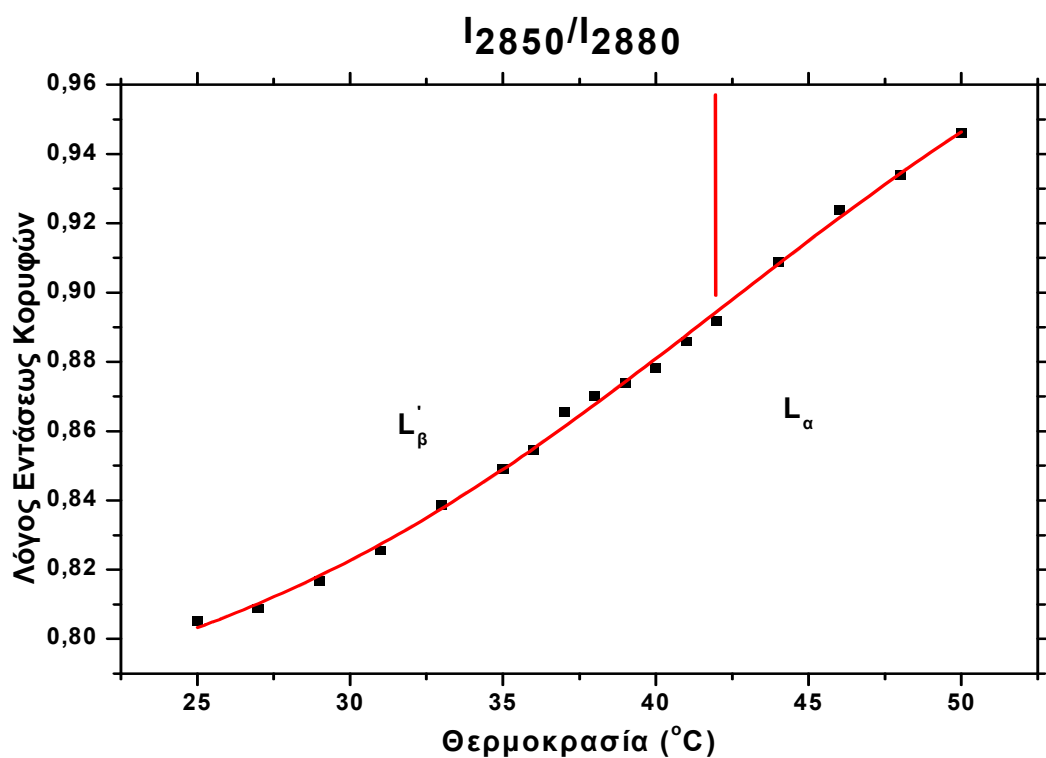
- **Περιοχή 2800 – 3000 cm^{-1} :** Στο σχήμα 4.3 παρουσιάζονται τα φάσματα Raman του συστήματος μεμβράνης:βιγκριστίνης 95:5 σε τέσσερις (4) διαφορετικές θερμοκρασίες. Από τις εντάσεις των κορυφών αυτών υπολογίζονται οι λόγοι εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} και I_{2935}/I_{2880} .

➤ **Λόγος I_{2850}/I_{2880} :** Η συμπεριφορά του λόγου αυτού είναι παρόμοια με αυτή στο δείγμα των λιπιδικών μεμβρανών DPPC, το σημείο καμπής της οποίας προσδιορίζεται στους 42.22 ± 1.47 °C (σχήμα 4.4). Το εύρος των τιμών του λόγου αυτού στο εξεταζόμενο σύστημα είναι $\Delta R_{I_{2850}/I_{2880}}^{95:5} = 0.14$.

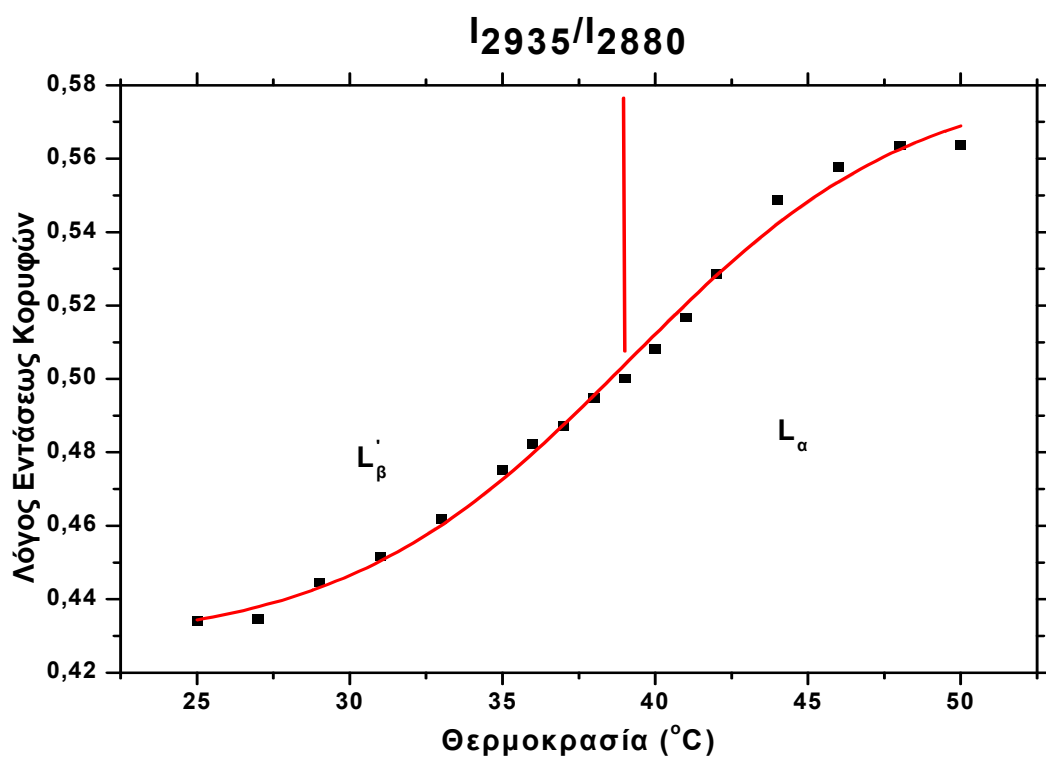
- **Λόγος I_{2935}/I_{2880} :** Η συμπεριφορά του λόγου αυτού είναι παρόμοια με αυτή στο δείγμα των λιπιδικών μεμβρανών DPPC, το σημείο καμπής της οποίας προσδιορίζεται στους 39.13 ± 0.41 °C (σχήμα 4.5). Το εύρος των τιμών του λόγου αυτού στο εξεταζόμενο σύστημα είναι $\Delta R_{I_{2935}/I_{2880}}^{95:5} = 0.13$.

Στο σχήμα 4.3 παριστάνονται επίσης οι μετατοπίσεις των μελετούμενων κορυφών. Συγκεκριμένα, η κορυφή στους 2850 cm^{-1} μετατοπίζεται σε υψηλότερες συχνότητες κατά 0.6 cm^{-1} ενώ αντίστοιχα η κορυφή στους 2880 cm^{-1} κατά 0.6 cm^{-1} σε χαμηλότερες συχνότητες.



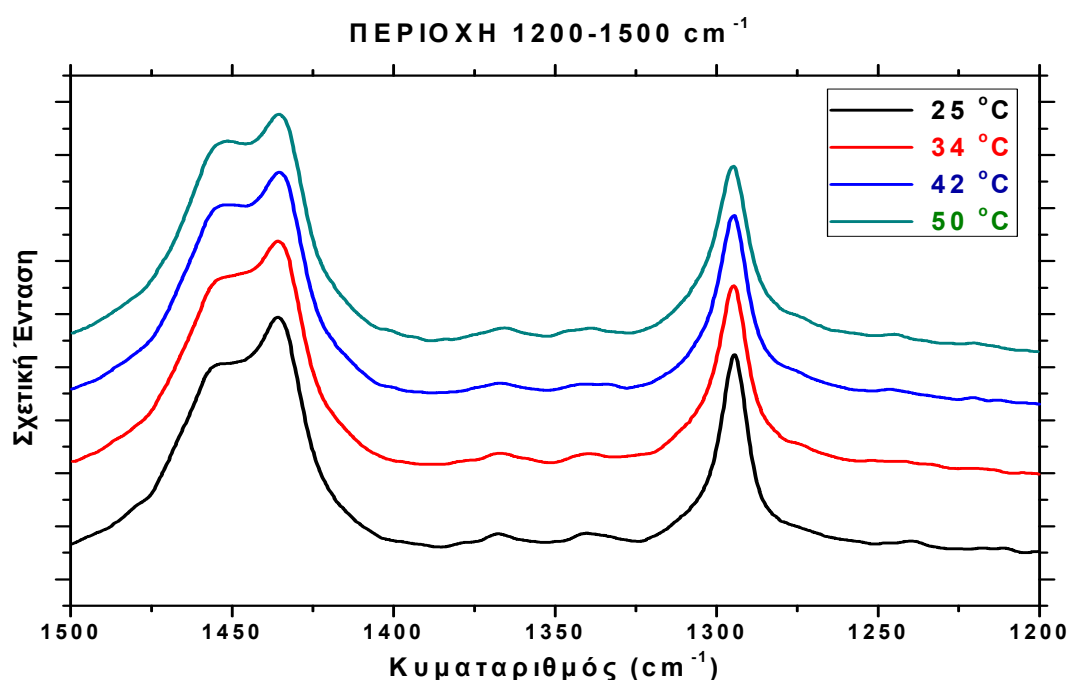


Σχήμα 4.4: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 95:5.



Σχήμα 4.5: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2935}/I_{2880} του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 95:5.

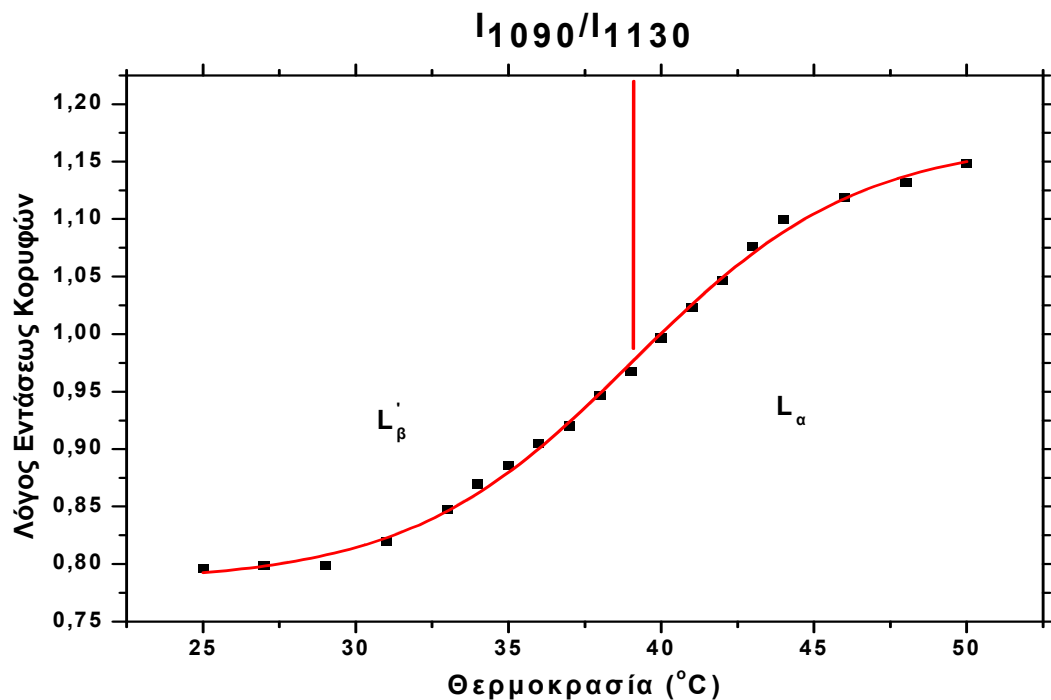
- Περιοχή 1200 – 1500 cm^{-1} :** Στην περιοχή αυτή, οι κορυφές που παρατηρούνται, παρουσιάζουν μια διαφορετική μετατόπιση με αντίστοιχη αύξηση της θερμοκρασίας. Η κορυφή στους 1295 cm^{-1} μετατοπίζεται κατά 0.5 cm^{-1} σε υψηλότερες συχνότητες ενώ αυτή στους 1436 cm^{-1} κατά 0.4 cm^{-1} σε χαμηλότερες συχνότητες (σχήμα 4.6). Επίσης, από τον διαχωρισμό κορυφών (Σχήμα Π.15) και την εξέταση του λόγου I_{1457}/I_{1436} (Σχήμα Π.16), παρατηρείται αύξηση των τιμών του λόγου αυτού, συμπεριφορά η οποία δεικνύει ελάττωση των διαμορικών αλληλεπιδράσεων των γειτονικών αλειφατικών αλυσίδων.



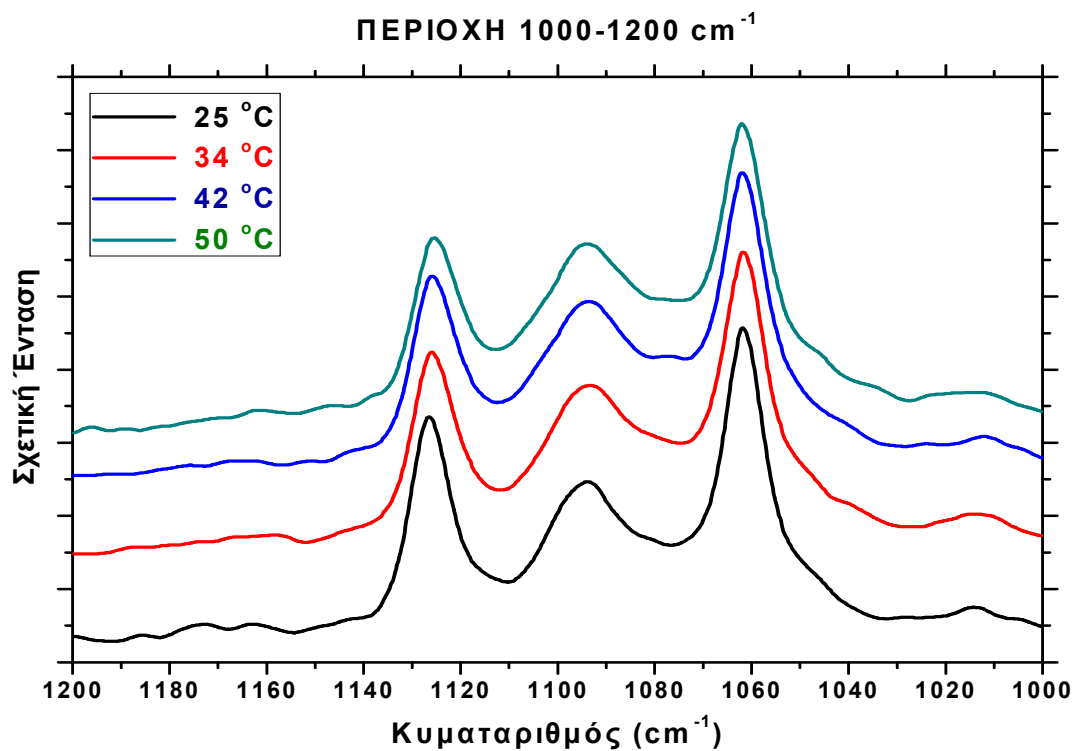
Σχήμα 4.6: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 95:5 στην περιοχή 1200 – 1500 cm^{-1} και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.

- Περιοχή 1000 – 1200 cm^{-1} :** Στην περιοχή αυτή υπολογίζεται ο λόγος των εντάσεων κορυφών Raman, ο οποίος δείχνει τη συμπεριφορά των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων στο δείγμα. Ο λόγος αυτός απεικονίζεται με μια σιγμοειδή καμπύλη, το σημείο καμπής της οποίας προσδιορίζεται στους 39.06 ± 0.18 °C (σχήμα 4.7). Το εύρος των τιμών του λόγου αυτού στο εξεταζόμενο σύστημα είναι $\Delta R_{I_{1090}/I_{1130}}^{95:5} = 0.35$. Στο σχήμα 4.8, παριστάνονται οι μετατοπίσεις των κορυφών οι οποίες

εξετάζονται. Η κορυφή στους 1090 cm^{-1} μετατοπίζεται κατά 0.3 cm^{-1} ενώ η κορυφή στους 1130 cm^{-1} κατά 1 cm^{-1} , αντίστοιχα.

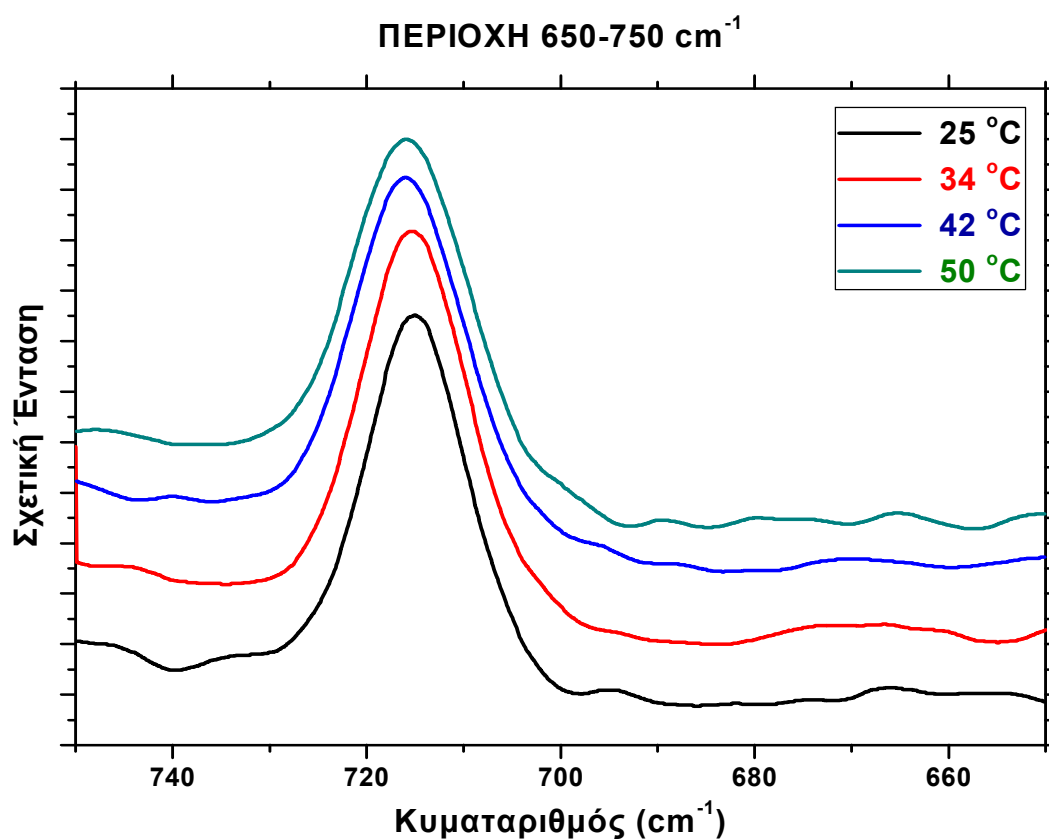


Σχήμα 4.7: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 95:5.



Σχήμα 4.8: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 95:5 στην περιοχή $1000 - 1200\text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.

- **Περιοχή 650 – 750 cm^{-1} :** Η κορυφή στους 715 cm^{-1} παρουσιάζει μια μετατόπιση της τάξης των 0.8 cm^{-1} με αύξηση της θερμοκρασίας σε υψηλότερες συχνότητες (σχήμα 4.9). Σε αντίθεση, στο δείγμα των λιπιδικών διπλοστιβάδων DPPC χωρίς την εισδοχή του φαρμάκου, παρατηρείται μετατόπιση σε χαμηλότερες συχνότητες. Η διαφορά αυτή οφείλεται στην έντονη αλληλεπίδραση που παρουσιάζει το φαρμακευτικό μόριο της βιμπλαστίνης με την πολική κεφαλή της χολίνης αυτών. Αυτή η μετατόπιση, επιβεβαιώνει και τα αποτελέσματα της Θερμικής Ανάλυσης, δηλαδή την αύξηση της θερμοκρασίας κύριας αλλαγής φάσης λόγω της αλληλεπίδρασης του φαρμάκου με την πολική κεφαλή της χολίνης.

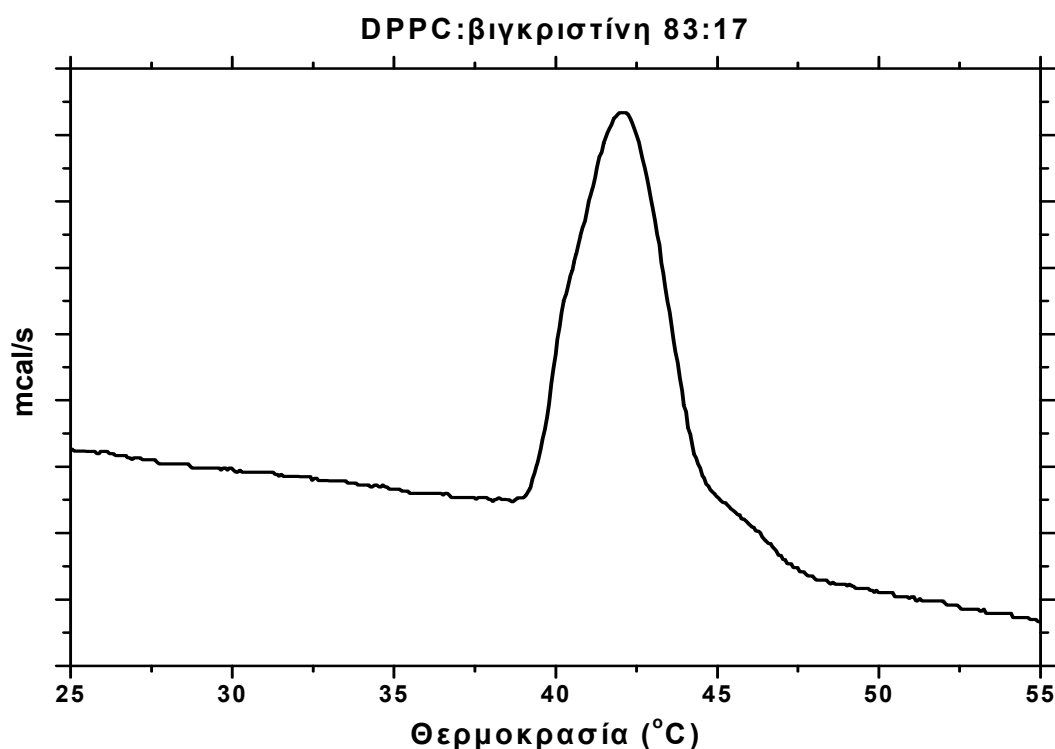


Σχήμα 4.9: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 95:5 στην περιοχή 650 – 750 cm^{-1} και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.

4.2 Αποτελέσματα δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 83:17.

4.2.1 Θερμική Ανάλυση

Στο σχήμα 4.10 παρουσιάζεται το θερμογράφημα του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 83:17 στην περιοχή θερμοκρασιών του πειράματος. Σε αυτό παρατηρείται ότι με την εισδοχή του φαρμακευτικού μορίου στις λιπιδικές διπλοστιβάδες, προκαλείται πλήρης εξαφάνιση της προμετάβασης φάσης, όπως και στην περίπτωση του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 95:5, γεγονός που οφείλεται στην ισχυρή αλληλεπίδραση αυτού με την πολική κεφαλή της χολίνης. Έτσι το σύστημα μεμβράνη:βιγκριστίνη μεταβαίνει από τη φάση γέλης στην υγρή κρυσταλλική φάση, μέσω της κύριας μετάβασης φάσης, που παρατηρείται σε θερμοκρασία $T_m=41.95\text{ }^{\circ}\text{C}$, ενώ η μεταβολή ενθαλπίας $\Delta H_m= 7.92 \pm 0.40\text{ kcal/mol}$.



Σχήμα 4.10: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 83:17.

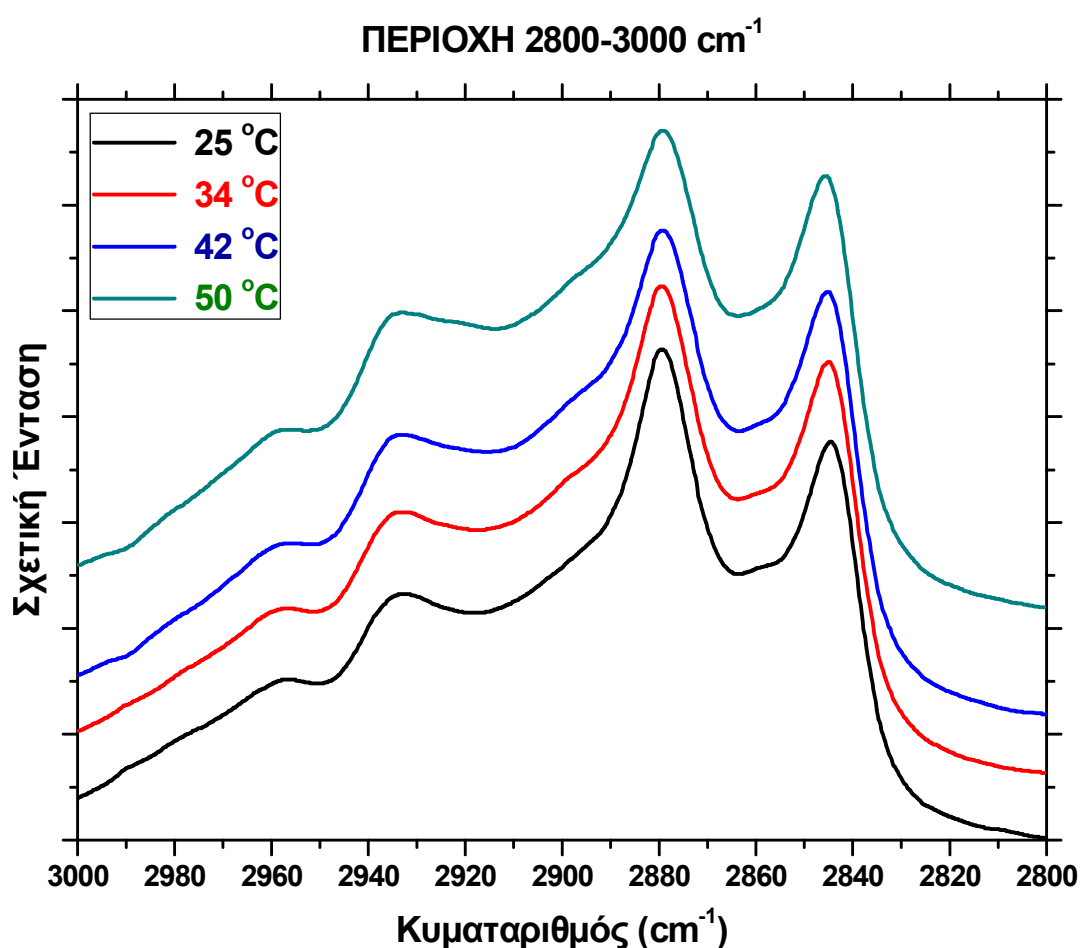
Στην συγκεκριμένη μοριακή αναλογία μεμβράνης:βιγκριστίνης, γίνεται σαφές ότι η κύρια μετάβαση φάσης παρουσιάζει μια αύξηση σε ενεργειακές απαιτήσεις συγκριτικά με αυτή των λιπιδικών διπλοστιβάδων DPPC ($\Delta H_m = 6.95 \pm 0.35 \text{ kcal/mol}$). Παρατηρείται δηλαδή αύξηση των 0.97 kcal/mol ή αλλιώς 12.3%. Το φαινόμενο αυτό της αύξησης της μεταβολής ενθαλπίας της κύριας αλλαγής φάσης είναι γνωστό ως αλληλοεισχώρηση των λιπιδικών αλυσίδων των διπλοστιβάδων, και συγκεκριμένα μερικής αλληλοεισχώρησης.

4.2.2 Φασματοσκοπία Raman

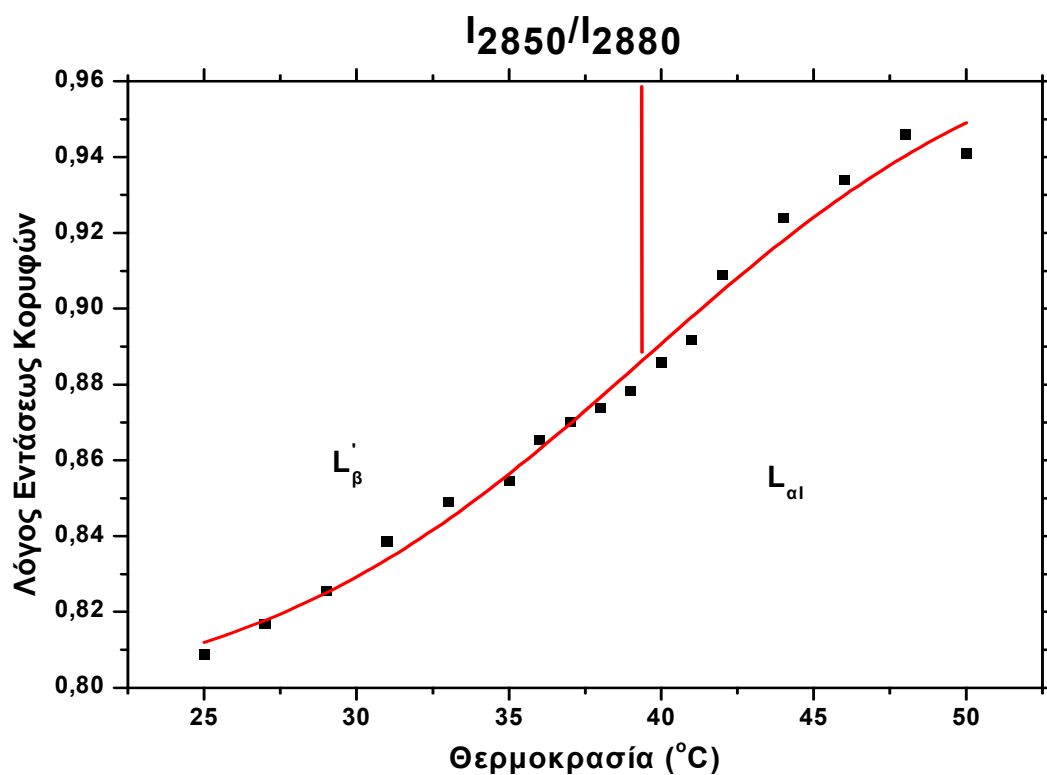
Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τις τέσσερις διαφορετικές φασματικές περιοχές.

- **Περιοχή $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$:** Στο σχήμα 4.11 παρουσιάζονται τα φάσματα Raman του συστήματος μεμβράνης:βιγκριστίνης 83:17 σε τέσσερις (4) διαφορετικές θερμοκρασίες. Από τις εντάσεις των κορυφών αυτών υπολογίζονται οι λόγοι εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} και I_{2935}/I_{2880} .
 - **Λόγος I_{2850}/I_{2880} :** Η συμπεριφορά του λόγου αυτού είναι παρόμοια με αυτή στο δείγμα των λιπιδικών μεμβρανών DPPC, το σημείο καμπής της οποίας προσδιορίζεται στους 39.44 ± 1.07 °C (σχήμα 4.12). Το εύρος των τιμών του λόγου αυτού στο εξεταζόμενο σύστημα είναι $\Delta R_{I_{2850}/I_{2880}}^{83:17} = 0.13$. Συγκρίνοντας τις απόλυτες τιμές του λόγου αυτού με αυτές του δείγματος DPPC και DPPC:βιγκριστίνη 95:5, είναι μικρότερες μετά τη μεταβολή φάσης λόγω της εμφάνισης του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης.
 - **Λόγος I_{2935}/I_{2880} :** Η συμπεριφορά του λόγου αυτού είναι παρόμοια με αυτή στο δείγμα των λιπιδικών μεμβρανών DPPC, το σημείο καμπής της οποίας προσδιορίζεται στους 38.14 ± 0.24 °C (σχήμα 4.13). Το εύρος των τιμών του λόγου αυτού στο εξεταζόμενο σύστημα είναι $\Delta R_{I_{2935}/I_{2880}}^{83:17} = 0.7$. Ομοίως, και στην

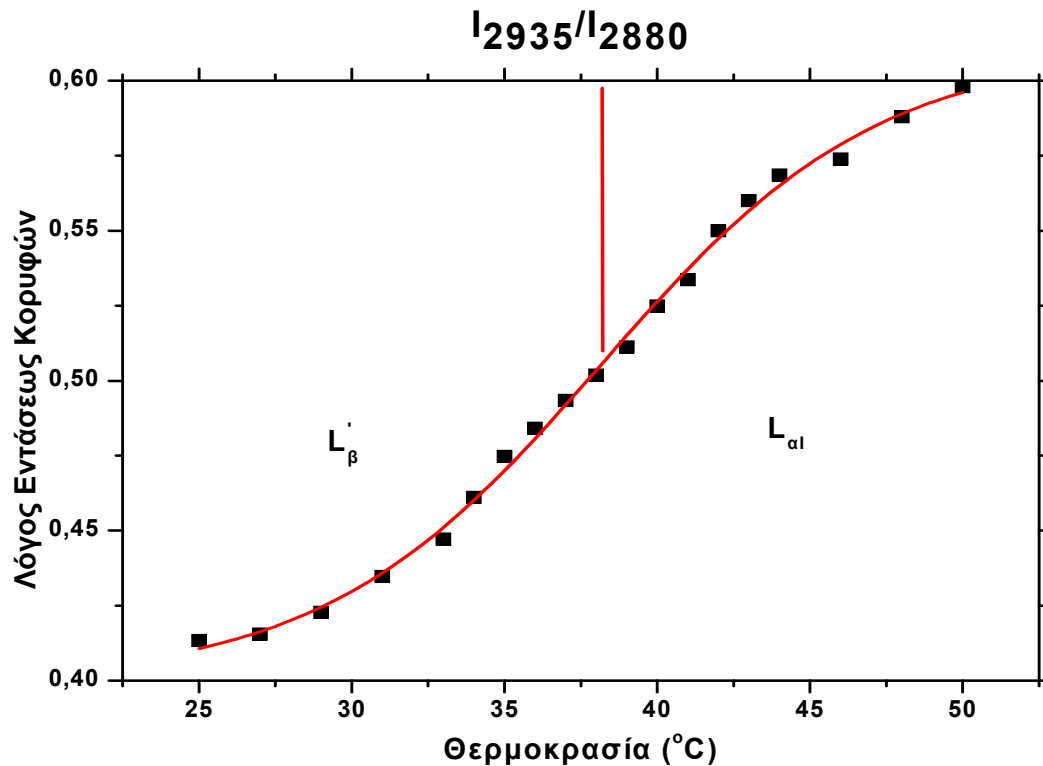
περίπτωση αυτή, οι τιμές του λόγου είναι πολύ μικρότερες λόγω του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης. Από άποψη μετατοπίσεων, με αύξηση της θερμοκρασίας, η κορυφή στους 2850 cm^{-1} μετατοπίζεται σε υψηλότερες συχνότητες κατά 1.1 cm^{-1} ενώ αυτή στους 2880 cm^{-1} κατά 0.3 cm^{-1} , τιμές οι οποίες επιβεβαιώνουν την αλληλοεισχώρηση αλλά και την ασθενέστερη αλληλεπίδραση με τις λιπιδικές αλυσίδες των λιπιδικών διπλοστιβάδων, σε σχέση με αυτήν που παρατηρείται για το μόριο της βιμπλαστίνης.



Σχήμα 4.11: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 83:17 στην περιοχή $2800 - 3000\text{ cm}^{-1}$ και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.

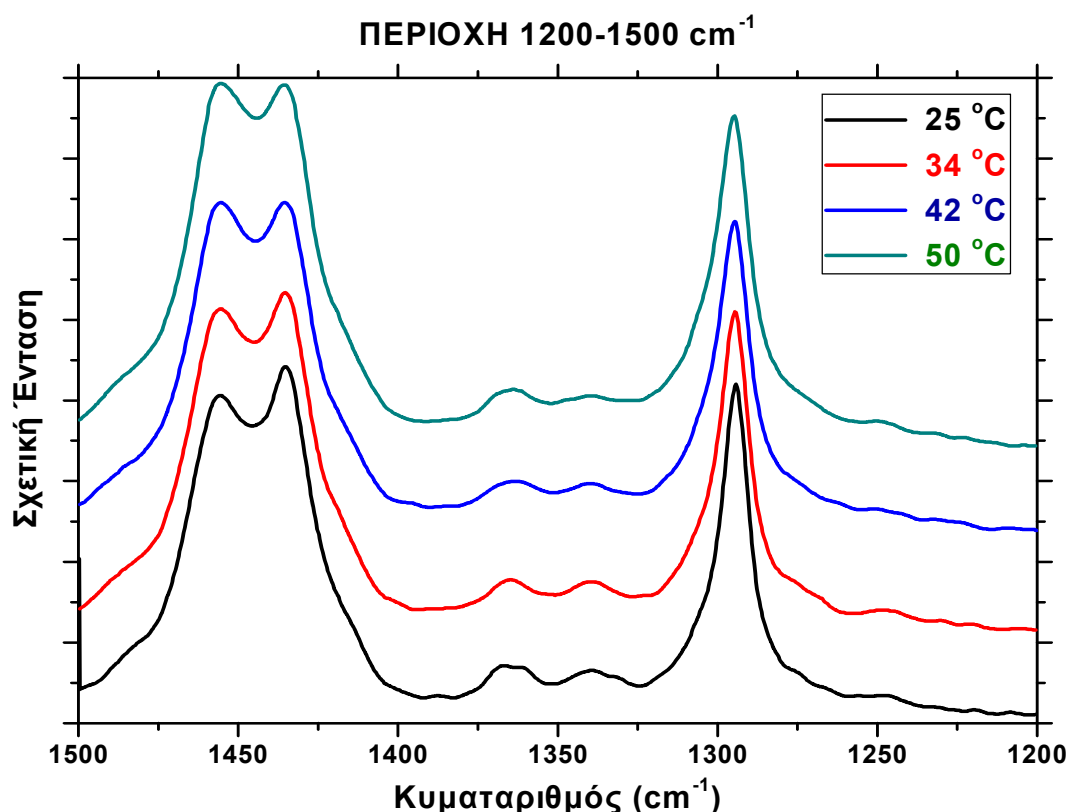


Σχήμα 4.12: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 83:17.

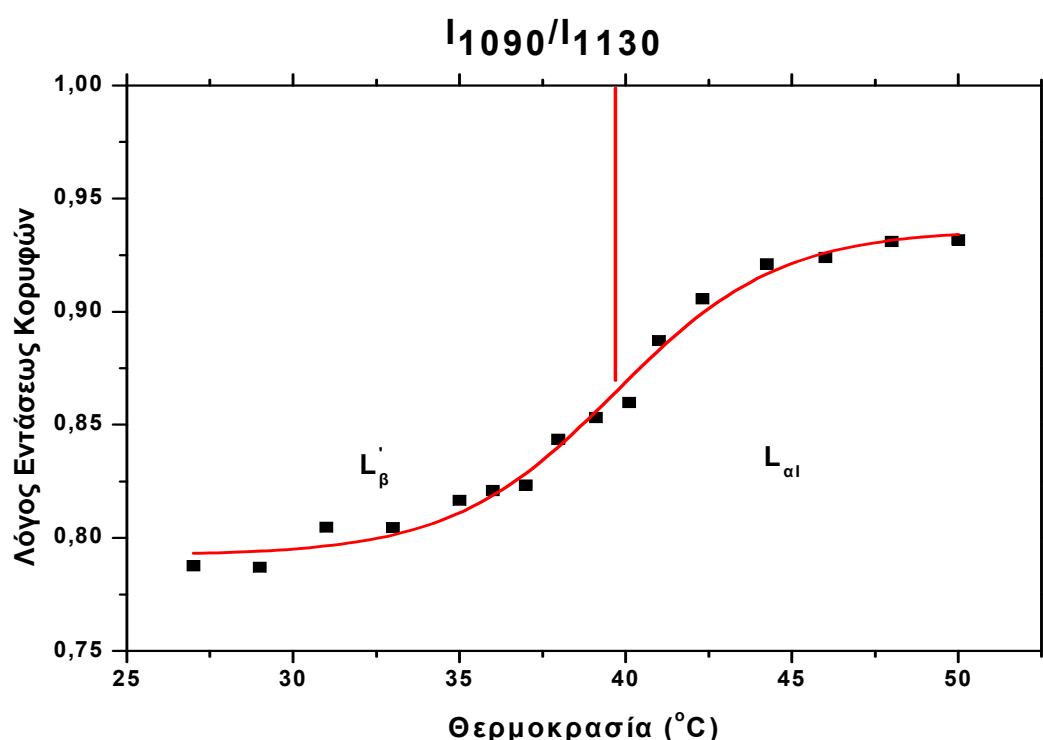


Σχήμα 4.13: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2935}/I_{2880} του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 83:17.

- Περιοχή 1200 – 1500 cm^{-1} :** Στο σχήμα 4.14 η κορυφή που εμφανίζεται στους 1294 cm^{-1} μετατοπίζεται κατά 0.5 cm^{-1} ενώ αυτή στους 1436 cm^{-1} κατά 0.4 cm^{-1} . Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με την έκφραση του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης και την παρουσία ποσότητας φαρμακευτικού μορίου στο ενδότερο τμήμα των αλυσίδων παρουσιάζοντας ασθενέστερη αλληλεπίδραση με αυτές σε σύγκριση με τη βιμπλασίνη. Το αποτέλεσμα του διαχωρισμού κορυφών φαίνεται στο σχήμα Π.17, ενώ η συμπεριφορά του λόγου I_{1457}/I_{1436} στο σχήμα Π.18. Η αύξηση των τιμών του λόγου σε σχέση με αυτές των λιπιδικών διπλοστιβάδων σε χαμηλές θερμοκρασίες, δεικνύουν ασθενέστερες αλληλεπιδράσεις των γειτονικών αλυσίδων και μεγαλύτερη ρευστότητα των διπλοστιβάδων. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες από τη θερμοκρασία κύριας μετάβασης φάσης παρατηρείται μείωση των τιμών αυτών, αποτέλεσμα της ισχυροποίησης των αλληλεπιδράσεων λόγω του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης.

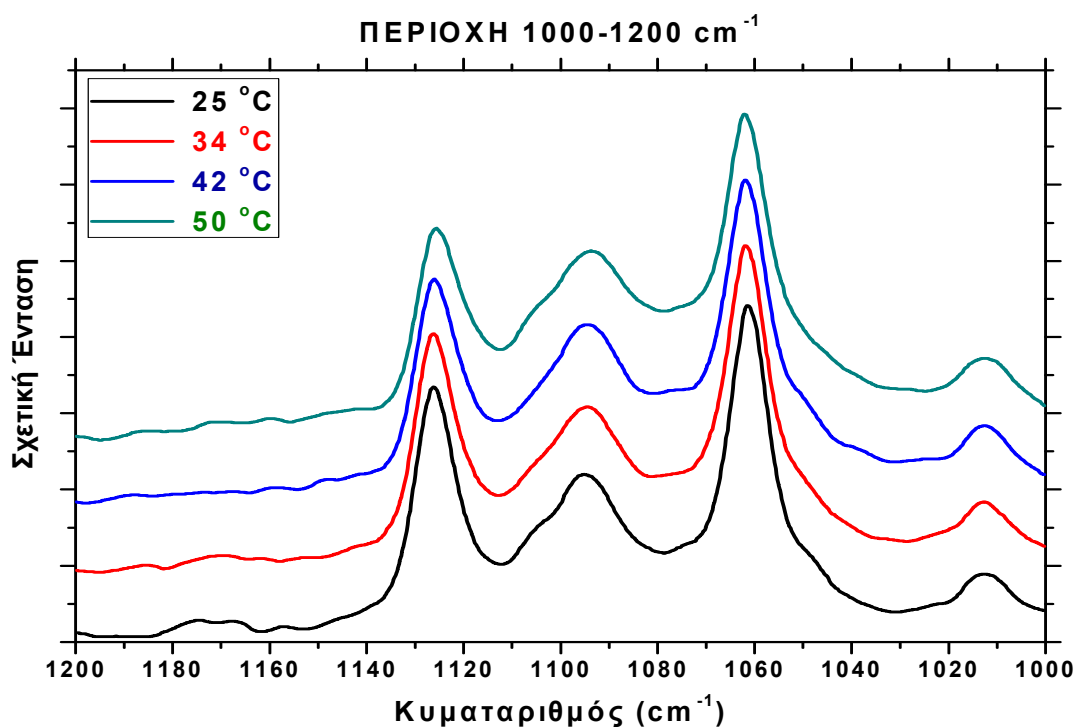


- Περιοχή 1000 – 1200 cm⁻¹:** Στην περιοχή αυτή υπολογίζεται ο λόγος των εντάσεων κορυφών Raman, ο οποίος δείχνει τη συμπεριφορά των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων στο δείγμα. Ο λόγος αυτός απεικονίζεται με μια σιγμοειδή καμπύλη, το σημείο καμπής της οποίας προσδιορίζεται στους 39.68 ± 0.30 °C (σχήμα 4.15). Το εύρος των τιμών του λόγου αυτού στο εξεταζόμενο σύστημα είναι $\Delta R_{I_{1090}/I_{1130}}^{83:17} = 0.16$. Επίσης, στο σχήμα 4.16, παριστάνεται η μετατόπιση της κορυφής 1090 cm⁻¹ κατά 1.7 cm⁻¹ ενώ της κορυφής στους 1130 cm⁻¹ κατά 0.7 cm⁻¹, αντίστοιχα, σε χαμηλότερες συχνότητες. Οι παρατηρούμενες τιμές επιβεβαιώνουν τα προηγούμενα ως τώρα συμπεράσματα

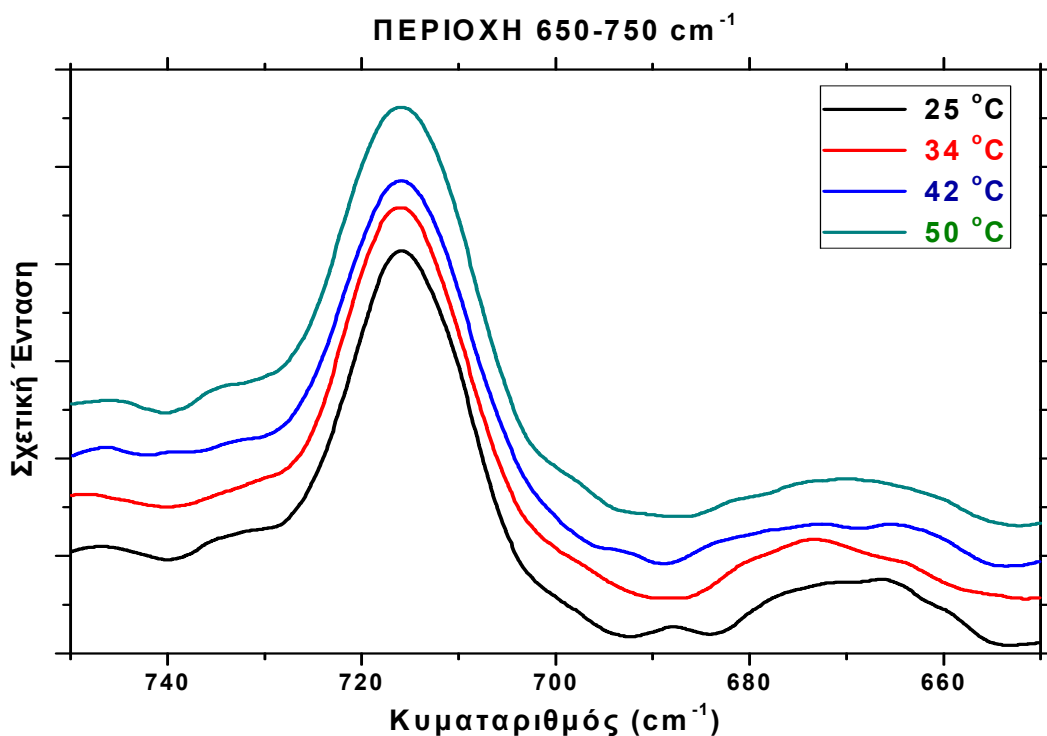


Σχήμα 4.15: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 83:17.

- Περιοχή 650 – 750 cm⁻¹:** Η κορυφή στους 715 cm⁻¹ παρουσιάζει μια μετατόπιση της τάξης των 0.2 cm⁻¹ με αύξηση της θερμοκρασίας σε υψηλότερες συχνότητες (σχήμα 4.17). Η μετατόπιση αυτή αποδεικνύει την αλληλεπίδραση της βιγκριστίνης με την πολική κεφαλή, η οποία όμως είναι μικρότερη από αυτήν του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 95:5 αλλά μεγαλύτερη από αυτήν των λιπιδικών διπλοστιβάδων.



Σχήμα 4.16: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 83:17 στην περιοχή 1000 – 1200 cm^{-1} και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.

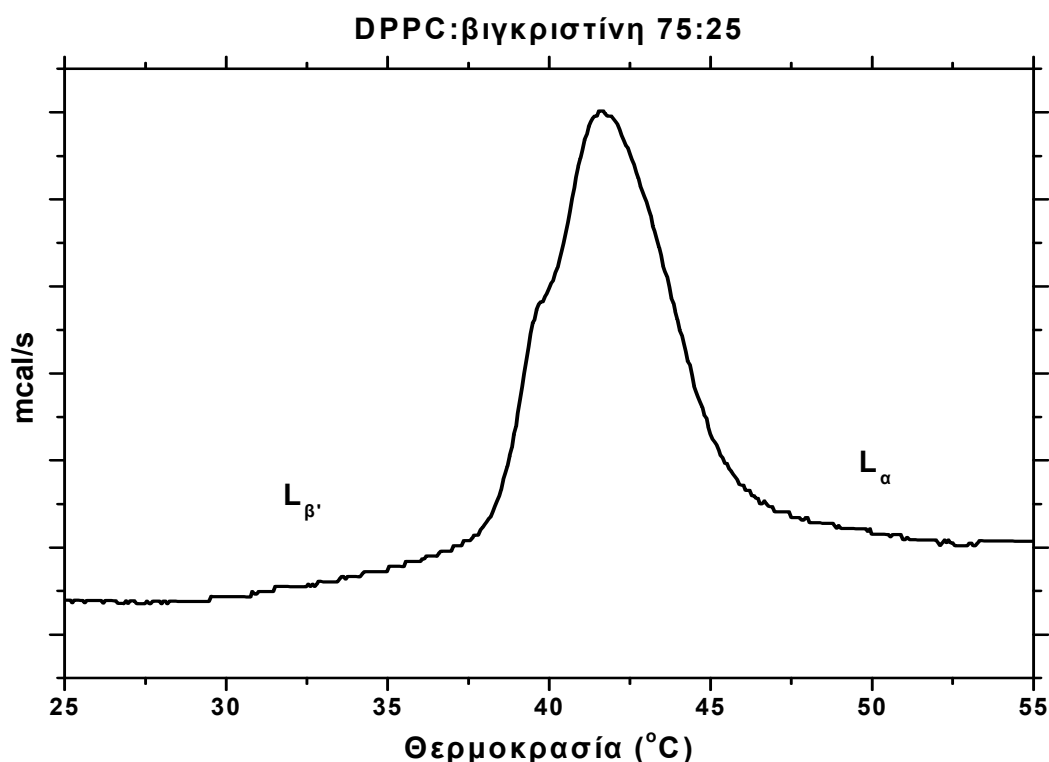


Σχήμα 4.17: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 83:17 στην περιοχή 650 – 750 cm^{-1} και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.

4.3 Αποτελέσματα δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 75:25.

4.3.1 Θερμική Ανάλυση

Στο σχήμα 4.18 παρουσιάζεται το θερμογράφημα του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 75:25 στην περιοχή θερμοκρασιών του πειράματος. Σε αυτό παρατηρείται πλήρης εξαφάνιση της προμετάβασης φάσης, όπως και στα προηγούμενα δείγματα, γεγονός που οφείλεται στην ισχυρή αλληλεπίδραση αυτού με την πολική κεφαλή της χολίνης. Συμπερασματικά, το σύστημα μεμβράνη:βιγκριστίνη μεταβαίνει από τη φάση γέλης στην υγρή κρυσταλλική φάση, μέσω της κύριας μετάβασης φάσης, που παρατηρείται σε θερμοκρασία $T_m=41.45\text{ }^{\circ}\text{C}$, ενώ η αντίστοιχη μεταβολή ενθαλπίας προσδιορίζεται $\Delta H_m= 8.11\pm 0.41\text{ kcal/mol}$.



Σχήμα 4.18: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 75:25.

Στην συγκεκριμένη μοριακή αναλογία μεμβράνης:βιγκριστίνης, γίνεται σαφές ότι η κύρια μετάβαση φάσης παρουσιάζει μια αύξηση σε ενεργειακές απαιτήσεις συγκριτικά με αυτή των λιπιδικών διπλοστιβάδων DPPC ($\Delta H_m = 6.95 \pm 0.35 \text{ kcal/mol}$). Παρατηρείται δηλαδή αύξηση 1.16 kcal/mol ή αλλιώς 14.3%, γεγονός που μεταφράζεται με το φαινόμενο της μερικής αλληλοεισχώρησης των αλυσίδων.

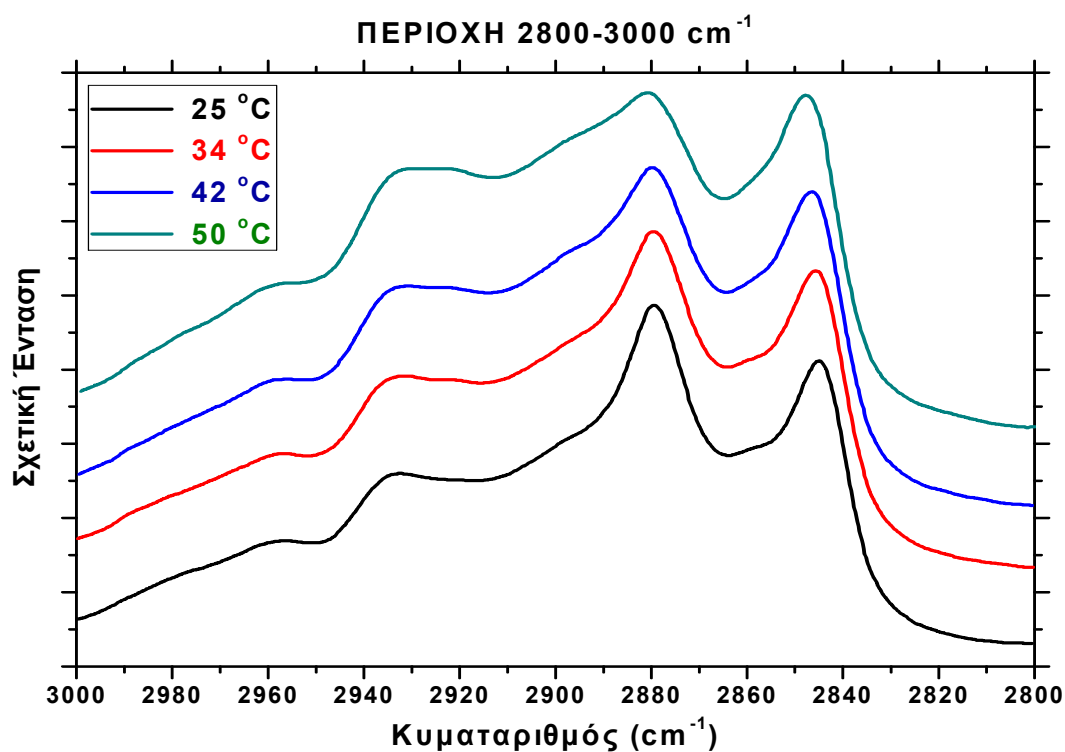
4.3.2 Φασματοσκοπία Raman

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τις τέσσερις διαφορετικές φασματικές περιοχές.

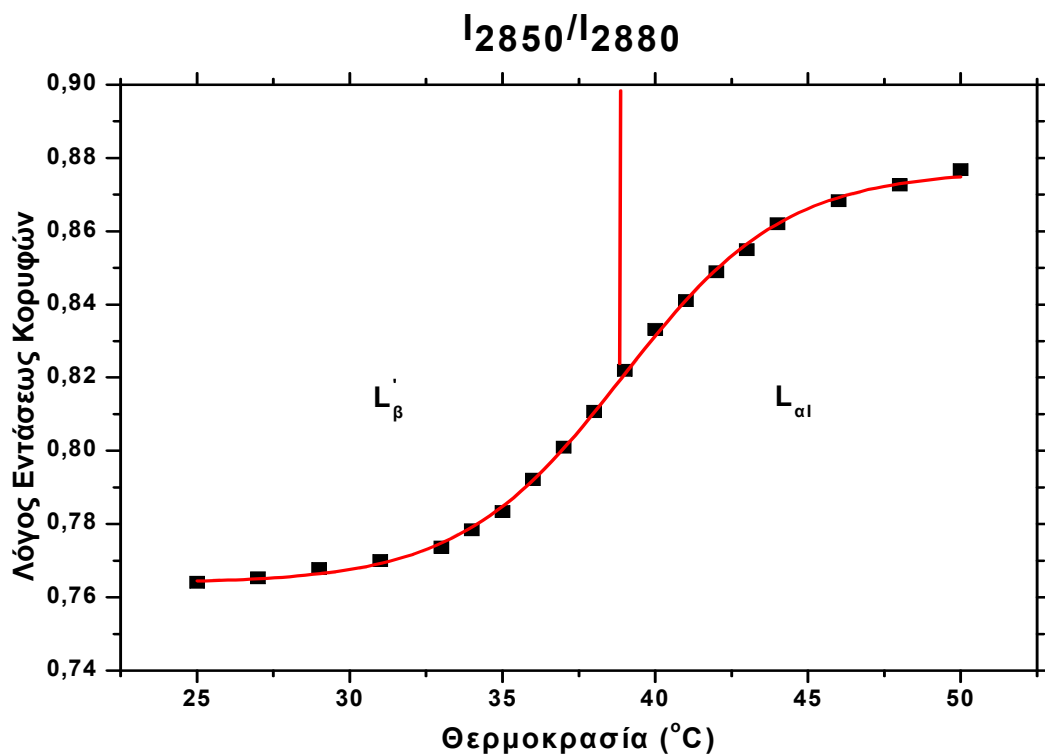
- **Περιοχή $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$:** Στο σχήμα 4.19 παρουσιάζονται τα φάσματα Raman του συστήματος μεμβράνης:βιγκριστίνης 75:25 σε τέσσερις (4) διαφορετικές θερμοκρασίες. Από τις εντάσεις των κορυφών αυτών υπολογίζονται οι λόγοι εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} και I_{2935}/I_{2880} .

➤ **Λόγος I_{2850}/I_{2880} :** Η συμπεριφορά του λόγου αυτού είναι παρόμοια με αυτή στο δείγμα των λιπιδικών μεμβρανών DPPC, το σημείο καμπής της οποίας προσδιορίζεται στους 38.92 ± 0.07 °C (σχήμα 4.20). Το εύρος των τιμών του λόγου αυτού στο εξεταζόμενο σύστημα είναι $\Delta R_{I_{2850}/I_{2880}}^{83:17} = 0.12$.

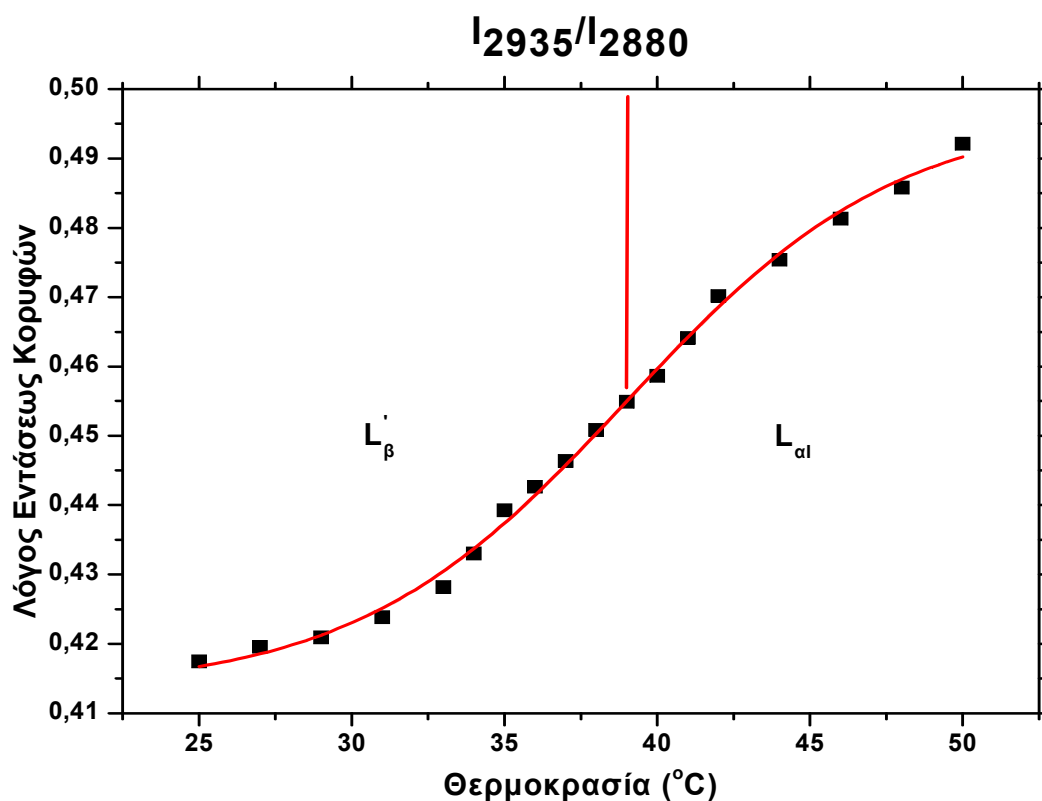
➤ **Λόγος I_{2935}/I_{2880} :** Η συμπεριφορά του λόγου αυτού είναι παρόμοια με αυτή στο δείγμα των λιπιδικών μεμβρανών DPPC, το σημείο καμπής της οποίας προσδιορίζεται στους 39.00 ± 0.26 °C (σχήμα 4.21). Το εύρος των τιμών του λόγου αυτού στο εξεταζόμενο σύστημα είναι $\Delta R_{I_{2935}/I_{2880}}^{83:17} = 0.07$. Ομοίως, και στην περίπτωση αυτή, οι τιμές του λόγου είναι πολύ μικρότερες λόγω του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης. Από άποψη μετατοπίσεων, με αύξηση της θερμοκρασίας η κορυφή στους 2850 cm^{-1} μετατοπίζεται σε υψηλότερες συχνότητες κατά 3.2 cm^{-1} ενώ αυτή στους 2880 cm^{-1} κατά 1.7 cm^{-1} .



Σχήμα 4.19: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 75:25 στην περιοχή 2800 – 3000 cm^{-1} και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.

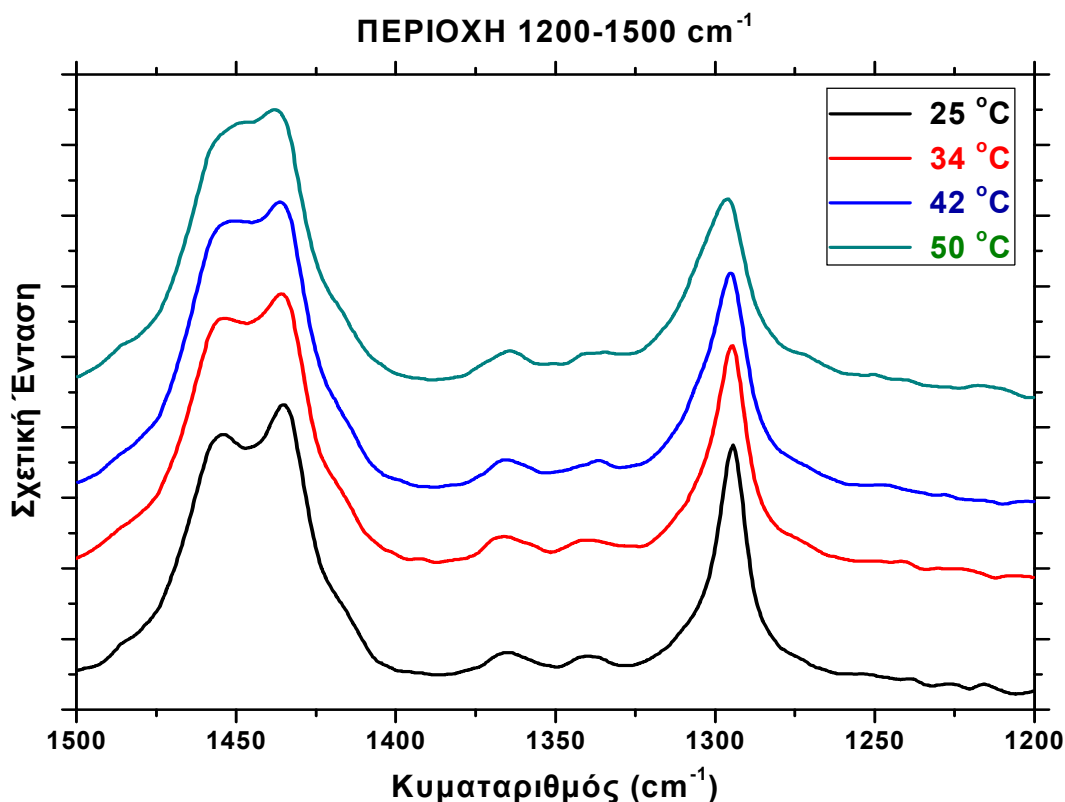


Σχήμα 4.20: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 75:25.

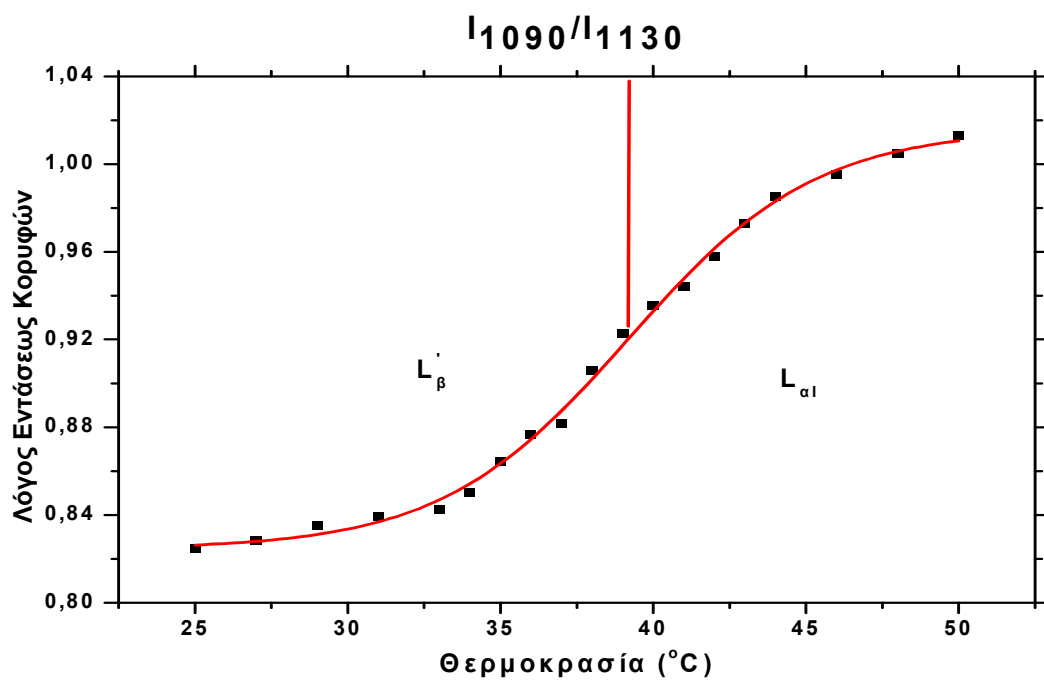


Σχήμα 4.21: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2935}/I_{2880} του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 75:25.

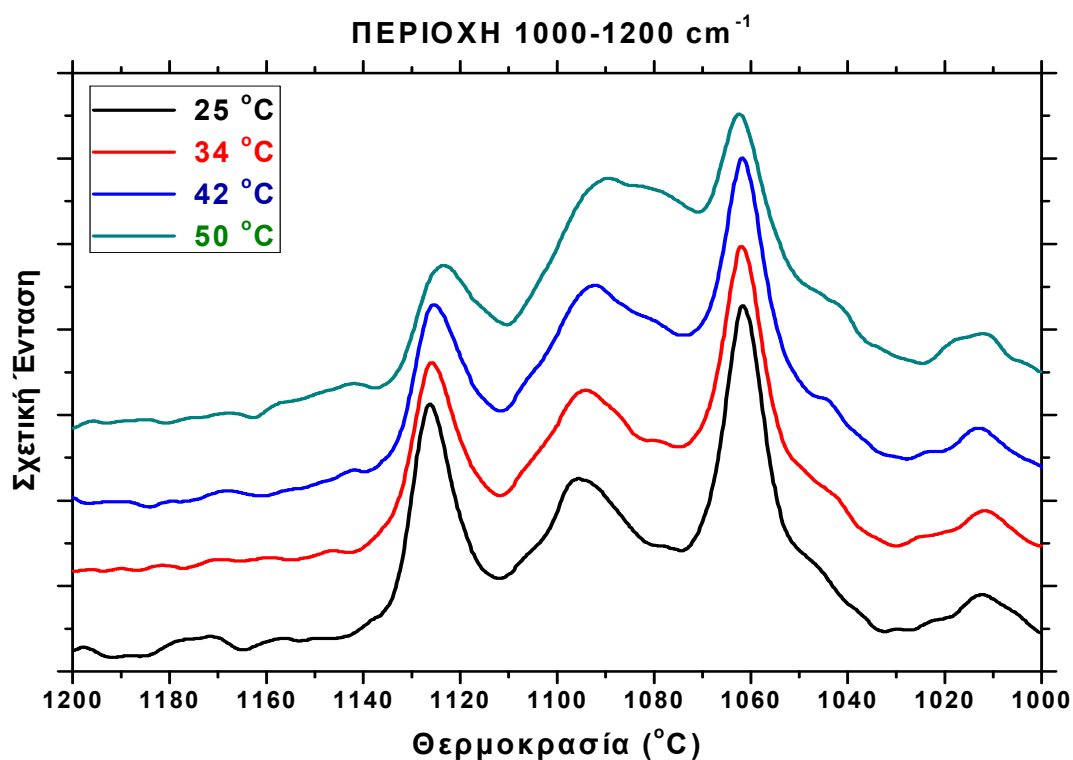
- Περιοχή $1200 - 1500 \text{ cm}^{-1}$:** Στο σχήμα 4.22 παρατηρούμε ότι η κορυφή στους 1294 cm^{-1} μετατοπίζεται κατά 1.9 cm^{-1} ενώ αυτή στους 1436 cm^{-1} κατά 2.6 cm^{-1} . Και στην περίπτωση αυτή, οι μετατοπίσεις αυτές αποδεικνύουν την εισχώρηση της βιγκριστίνης στο λιπιδικό τμήμα των διπλοστιβάδας, σε μικρότερο βαθμό από το μόριο της βιμπλαστίνης. Το αποτέλεσμα του διαχωρισμού της κορυφής στους 1436 cm^{-1} , παρουσιάζεται στο σχήμα Π.19, ενώ η συμπεριφορά του λόγου εντάσεως κορυφών Raman I_{1457}/I_{1436} στο σχήμα Π.20. Η μελέτη του λόγου αυτού επιβεβαιώνει το φαινόμενο της αλληλοεισχώρησης.



- Περιοχή 1000 – 1200 cm^{-1} :** Στην περιοχή αυτή υπολογίζεται ο λόγος των εντάσεων κορυφών Raman, ο οποίος δείχνει τη συμπεριφορά των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων στο δείγμα. Ο λόγος αυτός απεικονίζεται με μια σιγμοειδή καμπύλη, το σημείο καμπής της οποίας προσδιορίζεται στους 39.18 ± 0.17 °C (σχήμα 4.23). Το εύρος των τιμών του λόγου αυτού στο εξεταζόμενο σύστημα είναι $\Delta R_{1090/1130}^{83:17} = 0.19$. Επίσης, στο σχήμα 4.24, παριστάνεται η μετατόπιση της κορυφής 1090 cm^{-1} κατά 6.2 cm^{-1} ενώ της κορυφής στους 1130 cm^{-1} κατά 2.7 cm^{-1} , αντίστοιχα, σε χαμηλότερες συχνότητες. Οι παρατηρούμενες τιμές επιβεβαιώνουν τα προηγούμενα ως τώρα συμπεράσματα.

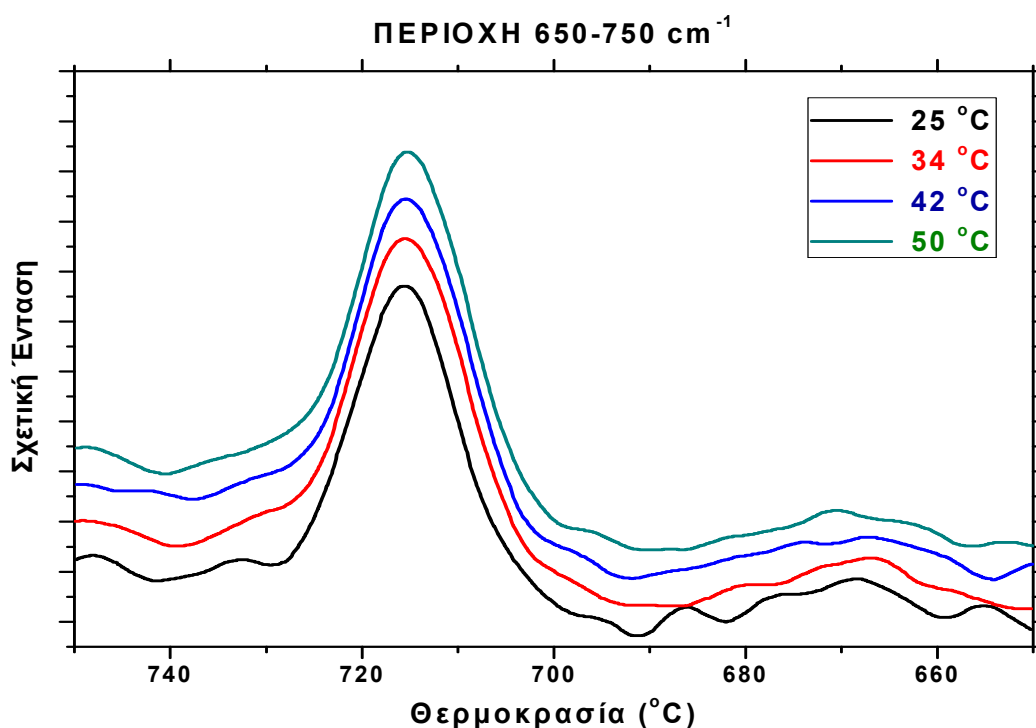


Σχήμα 4.23: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 75:25.



Σχήμα 4.24: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 75:25 στην περιοχή 1000 – 1200 cm^{-1} και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.

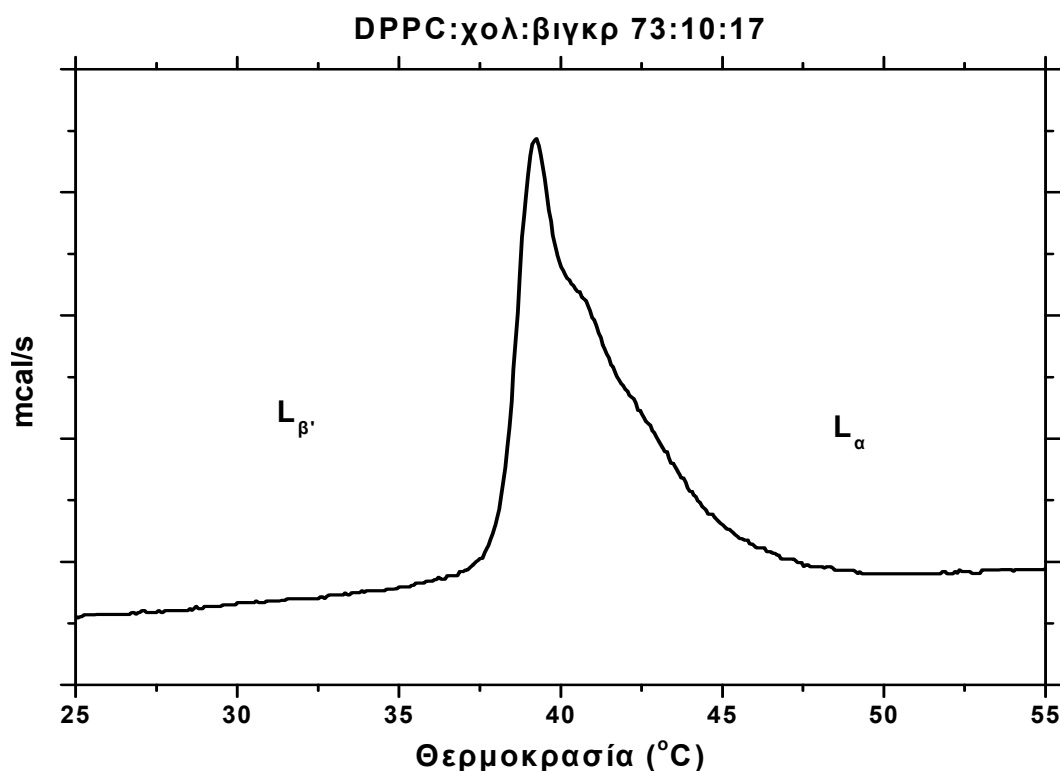
- Περιοχή 650 – 750 cm^{-1} :** Η κορυφή στους 715 cm^{-1} παρουσιάζει μια μετατόπιση της τάξης των 0.2 cm^{-1} με αύξηση της θερμοκρασίας σε χαμηλότερες συχνότητες (σχήμα 4.25). Η αρνητική μετατόπιση αυτή αποδεικνύει την αλληλεπίδραση της βιγκριστίνης με την πολική κεφαλή, η οποία όμως είναι ασθενέστερη από αυτή του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 95:5 και DPPC:βιγκριστίνη 83:17 αλλά ισχυρότερη από αυτή των λιπιδικών διπλοστιβάδων. Με το αποτέλεσμα αυτό συμπεραίνεται πως αύξηση της μοριακής αναλογίας του φαρμάκου οδηγεί τη βιγκριστίνη προς το λιπόφιλο τμήμα των διπλοστιβάδων.



Σχήμα 4.25: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 75:25 στην περιοχή 650 – 750 cm^{-1} και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.

4.4 Αποτελέσματα δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17.

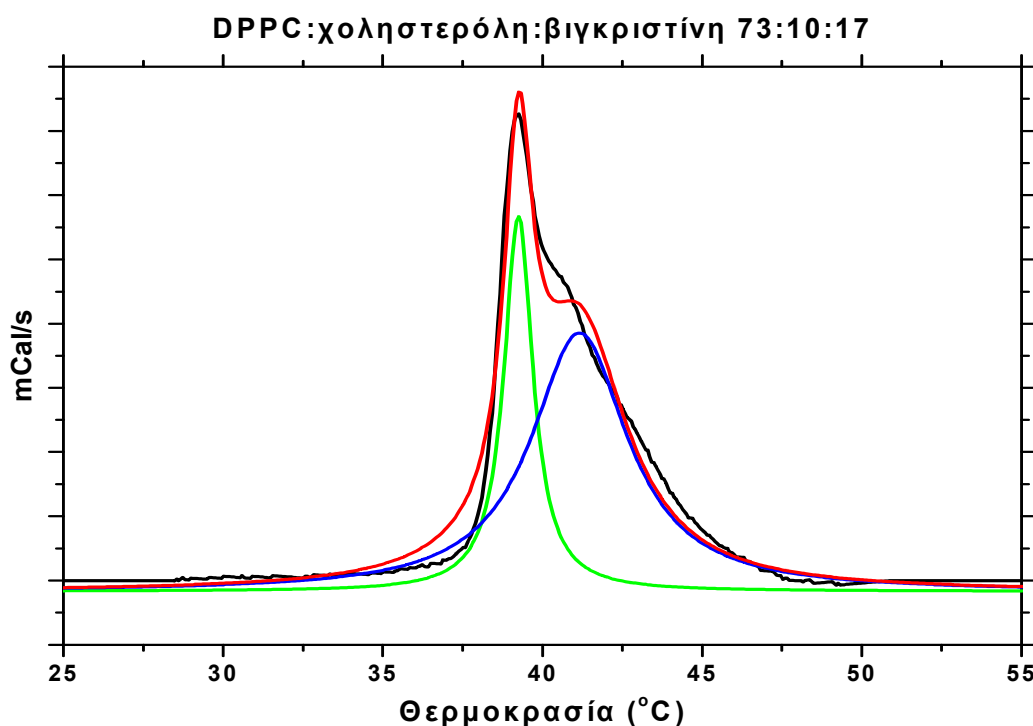
4.4.1 Θερμική Ανάλυση



Σχήμα 4.26: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17.

Στο σχήμα 4.26 παρατηρείται το θερμογράφημα για το υπό εξέταση δείγμα, για το οποίο προσδιορίζεται θερμοκρασία μεταβολής φάσης $T_m = 39.11\text{ }^{\circ}\text{C}$ και μεταβολή ενθαλπίας μεταβολής φάσης $\Delta H_m = 5.11 \pm 0.26\text{ kcal/mol}$. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα αυτά με εκείνα του προηγούμενου δείγματος συμπεραίνεται στο ότι η ταυτόχρονη δράση χοληστερόλης και της βιγκριστίνης στις διπλοστιβάδες είναι ανταγωνιστική αφού αύξηση της ποσότητας του φαρμάκου επιφέρει και αύξηση της αταξίας των αλειφατικών αλυσίδων σε σύγκριση με τη χοληστερόλη που έχει την τάση να προκαλεί καλύτερη οργάνωση στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση.

Πραγματοποιώντας αποσυγκερασμό της κορυφής του θερμογραφήματος του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17, προκύπτει το σχήμα 5.27, στο οποίο παρατηρούνται δυο κορυφές κύριας μεταβολής φάσης. Η πρώτη παρατηρείται στους $T_{m1}=39.24 \pm 0.01^\circ\text{C}$ με μεταβολή ενθαλπίας $\Delta H_{m1}=1.55 \pm 0.08 \text{ kcal/mol}$, ενώ η δεύτερη στους $T_{m2}=41.15 \pm 0.05^\circ\text{C}$ με μεταβολή ενθαλπίας $\Delta H_{m2}=3.56 \pm 0.18 \text{ kcal/mol}$. Η κορυφή χαμηλής μεταβολής ενθαλπίας αντιστοιχεί σε τμήματα “πλούσια” σε βιγκριστίνη – χοληστερόλη (rich domains) ενώ η κορυφή υψηλής μεταβολής ενθαλπίας σε τμήματα “φτωχά” σε βιγκριστίνη (poor domains).

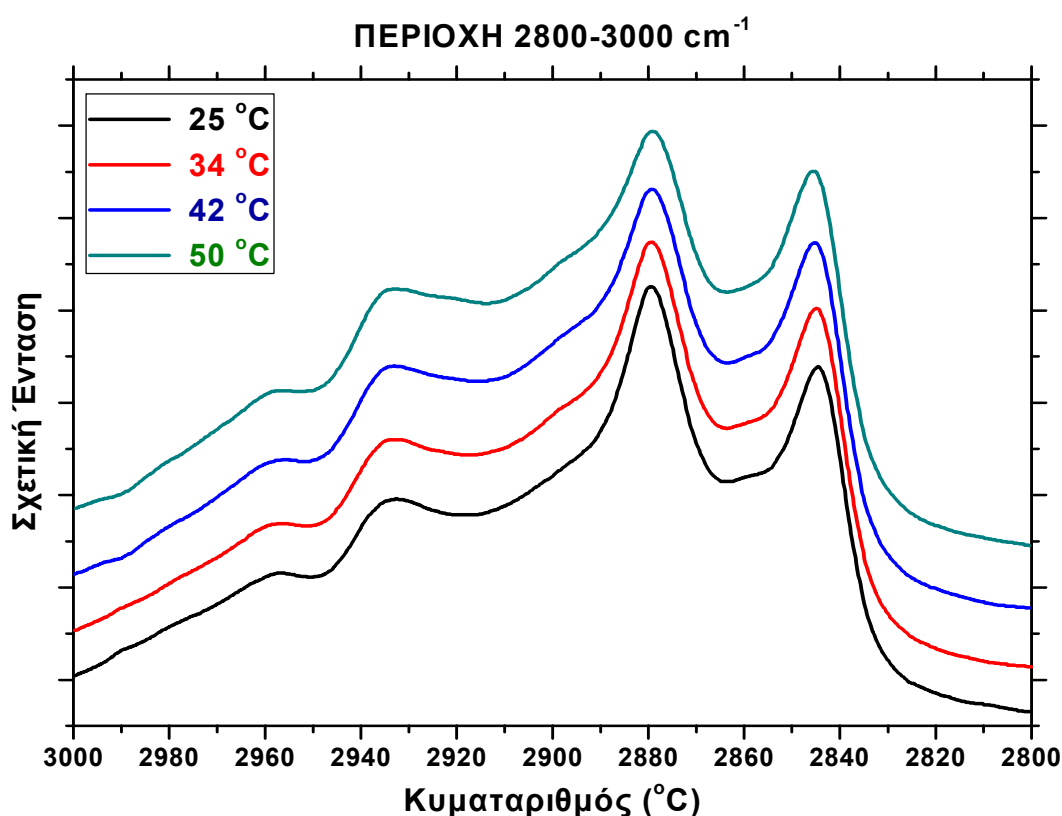


Σχήμα 4.27: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17 με διαχωρισμό κορυφών.

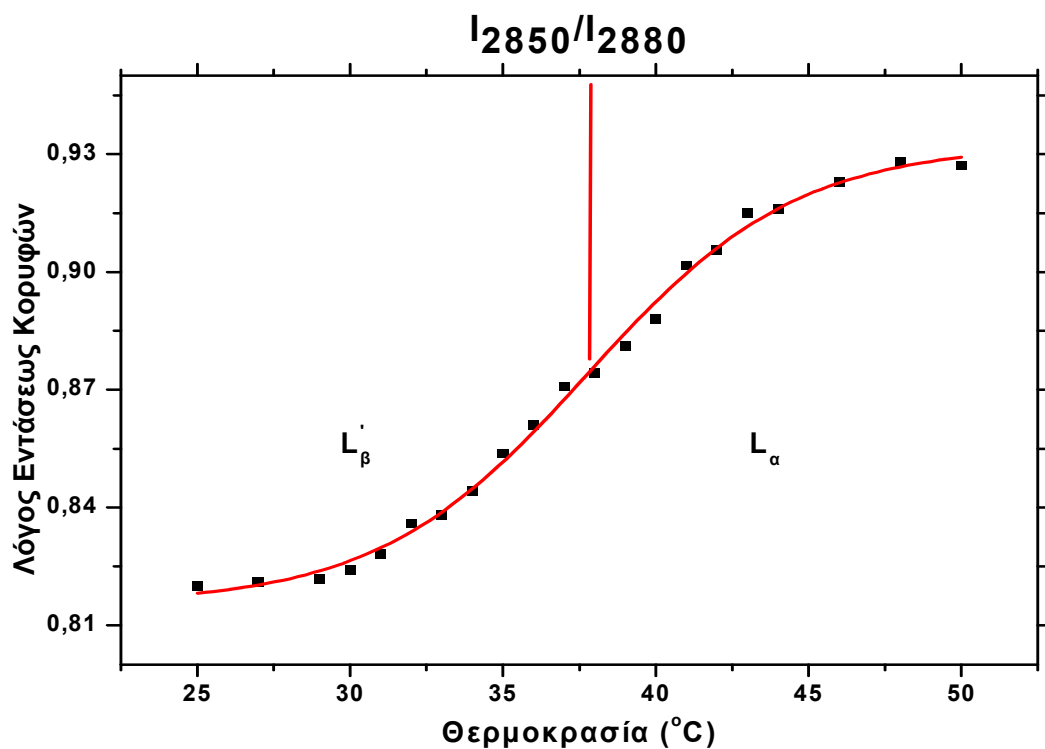
4.4.2 Φασματοσκοπία Raman

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τις τέσσερις διαφορετικές φασματικές περιοχές.

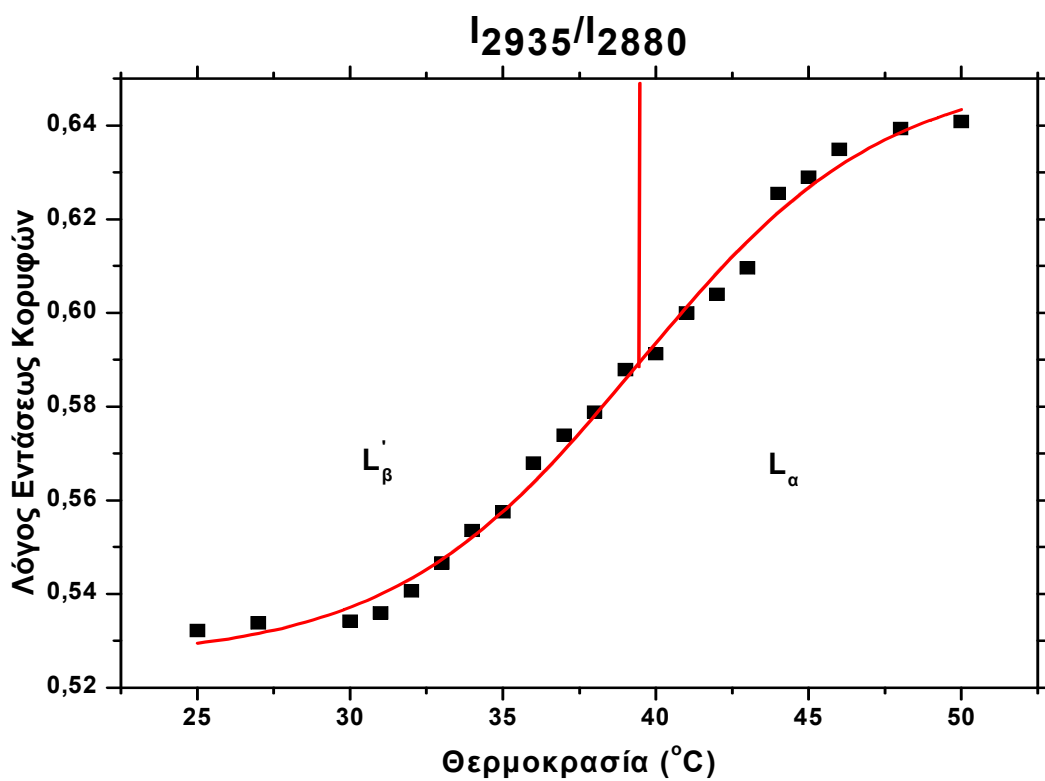
- Περιοχή 2800 – 3000 cm^{-1} :** Στο σχήμα 4.28 παρουσιάζονται τα φάσματα Raman σε τέσσερις (4) διαφορετικές θερμοκρασίες του συστήματος μεμβράνης:χοληστερόλης:βιγκριστίνης 73:10:17. Από τις εντάσεις των κορυφών αυτών υπολογίζονται οι λόγοι εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} και I_{2935}/I_{2880} . Τα σημεία καμπής των σιγμοειδών καμπυλών που προκύπτουν είναι 37.75 ± 0.20 και 39.41 ± 0.36 $^{\circ}\text{C}$ αντίστοιχα (σχήματα 4.29, 4.30). Το εύρος των τιμών των μελετούμενων λόγων είναι $\Delta R_{I_{2850}/I_{2880}}^{65:10:25} = 0.10$ και $\Delta R_{I_{2935}/I_{2880}}^{65:10:25} = 0.14$, ενώ τέλος οι μελετούμενες κορυφές 2850 και 2880 cm^{-1} παρουσιάζουν μετατόπιση σε υψηλότερες συχνότητες κατά 1.1 και 0.2 cm^{-1} αντίστοιχα (σχήμα 4.27).



Σχήμα 4.28: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17 στην περιοχή 2800 – 3000 cm^{-1} .

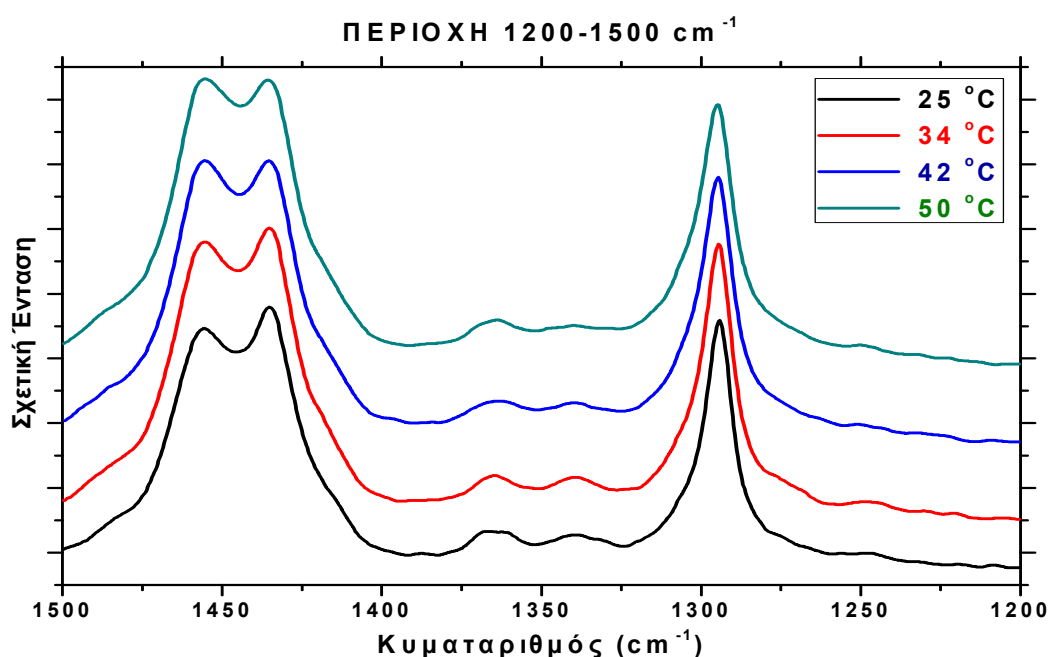


Σχήμα 4.29: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17.



Σχήμα 4.30: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2935}/I_{2880} του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17.

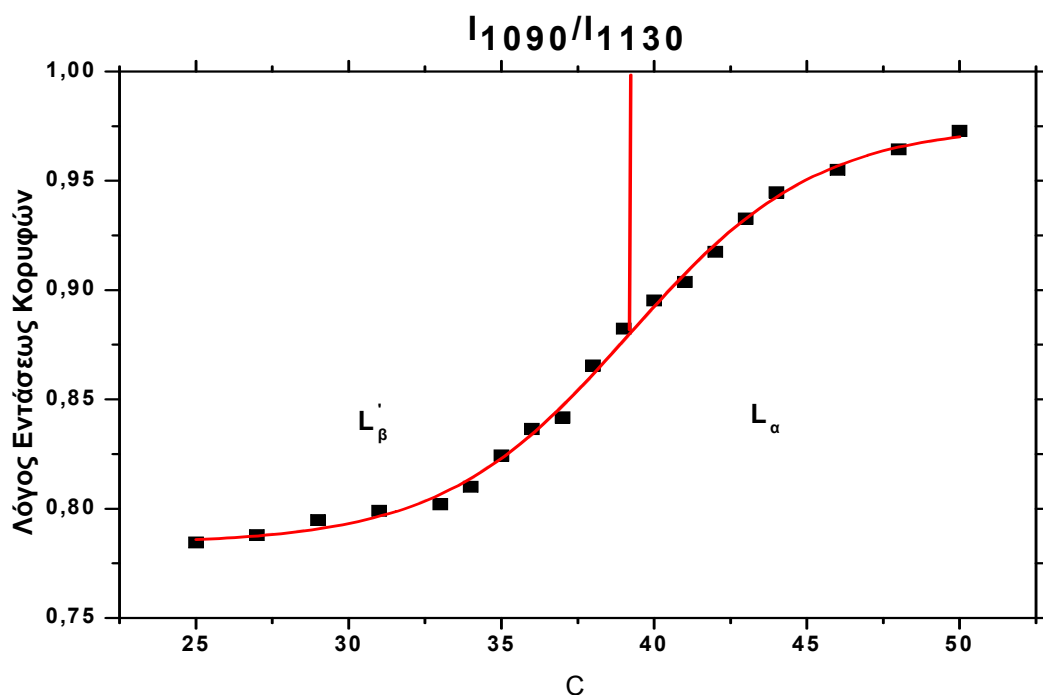
- Περιοχή 1200 – 1500 cm^{-1} :** Στο σχήμα 4.31 παρατηρείται ότι η κορυφή στους 1294 cm^{-1} μετατοπίζεται κατά 0.6 cm^{-1} ενώ αυτή στους 1436 cm^{-1} κατά 0.4 cm^{-1} , παρατήρηση που πιστοποιεί το γεγονός ότι η αύξηση της ποσότητας φαρμάκου προκαλεί περαιτέρω αταξία στις αλειφατικές αλυσίδες. Η μελέτη του λόγου I_{1457}/I_{1436} (Σχήμα Π.21) έπεται από τον διαχωρισμό της κορυφής στους 1436 cm^{-1} (Σχήμα Π.22), επιβεβαιώνει την εξασθένιση των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων αλλά και την αύξηση της ρευστότητας της λιπιδικής διπλοστιβάδας.



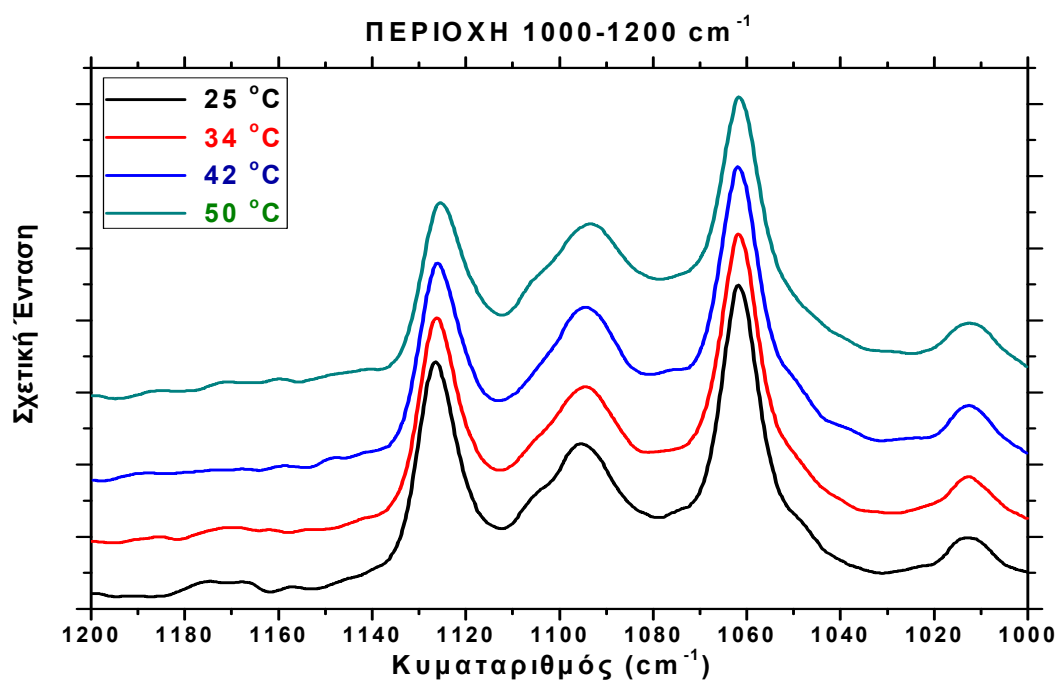
Σχήμα 4.31: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17 στην περιοχή 1200 – 1500 cm^{-1} .

- Περιοχή 1000 – 1200 cm^{-1} :** Ο λόγος I_{1090}/I_{1130} απεικονίζεται με μια σιγμοειδή καμπύλη, το σημείο καμπής της οποίας προσδιορίζεται στους 39.18 ± 0.17 °C (σχήμα 4.32). Το εύρος των τιμών του λόγου αυτού στο εξεταζόμενο σύστημα είναι $\Delta R_{1090/1130}^{65:10:25} = 0.17$. Επιπλέον, η μετατόπιση της κορυφής στους 1090 cm^{-1} υπολογίζεται στους 1.7 cm^{-1} ενώ αυτή στους 1130 cm^{-1} 0.7 cm^{-1} σε χαμηλότερες συχνότητες (σχήμα 4.33). Η συμπεριφορά αυτή εξηγείται από την μεγάλη αλληλεπίδραση

του φαρμακευτικού μορίου με τις λιπιδικές αλυσίδες των διπλοστιβάδων.

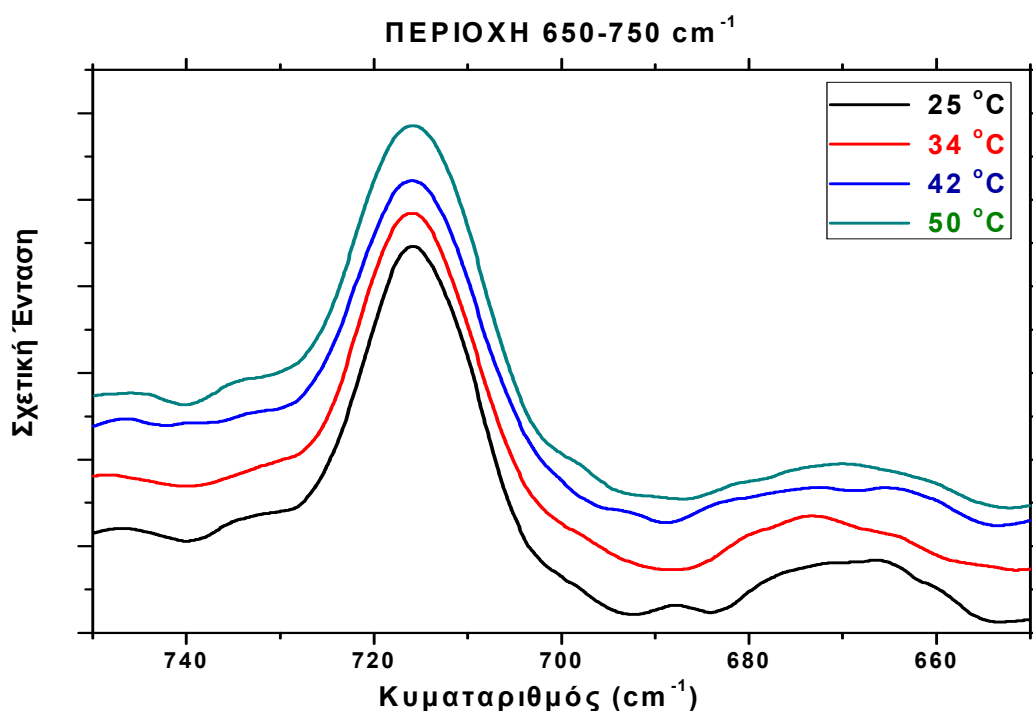


Σχήμα 4.32: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17.



Σχήμα 4.33: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17 στην περιοχή 1000 – 1200 cm^{-1} .

- **Περιοχή 650 – 750 cm^{-1} :** Η κορυφή στους 715 cm^{-1} παρουσιάζει μια μετατόπιση της τάξης των 0.2 cm^{-1} με αύξηση της θερμοκρασίας σε υψηλότερες συχνότητες (σχήμα 4.34). Η θετική μετατόπιση αυτή εκφράζει την ισχυρή αλληλεπίδραση της βιγκριστίνης με τις πολικές κεφαλές.



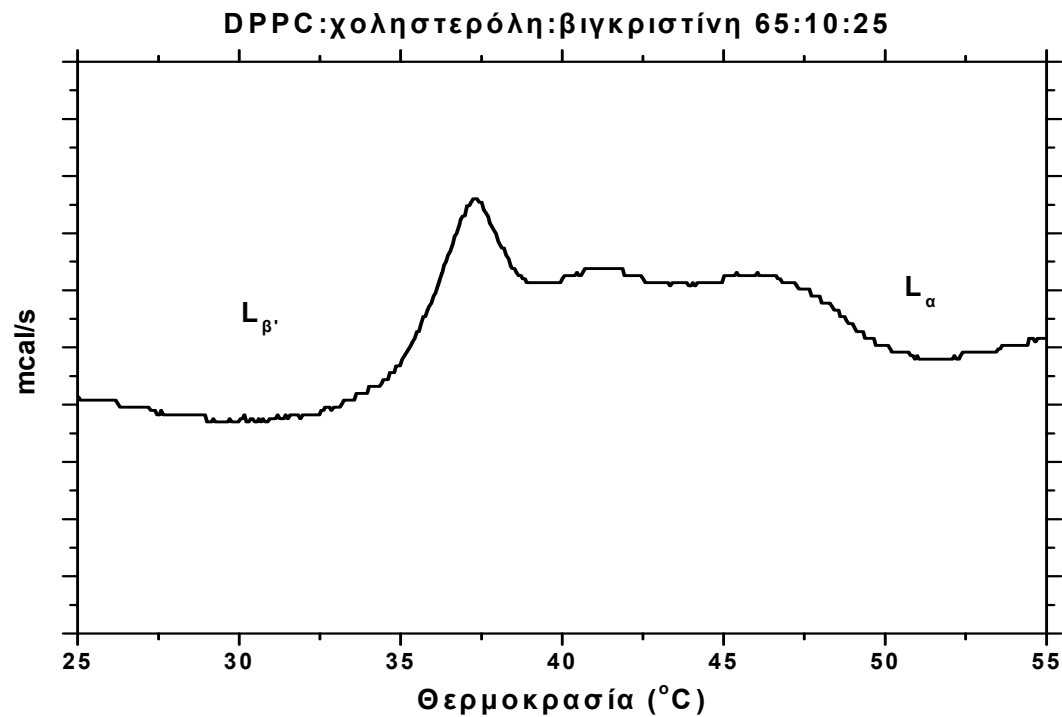
Σχήμα 4.34: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17 στην περιοχή 650 – 750 cm^{-1} .

4.5 Αποτελέσματα δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25.

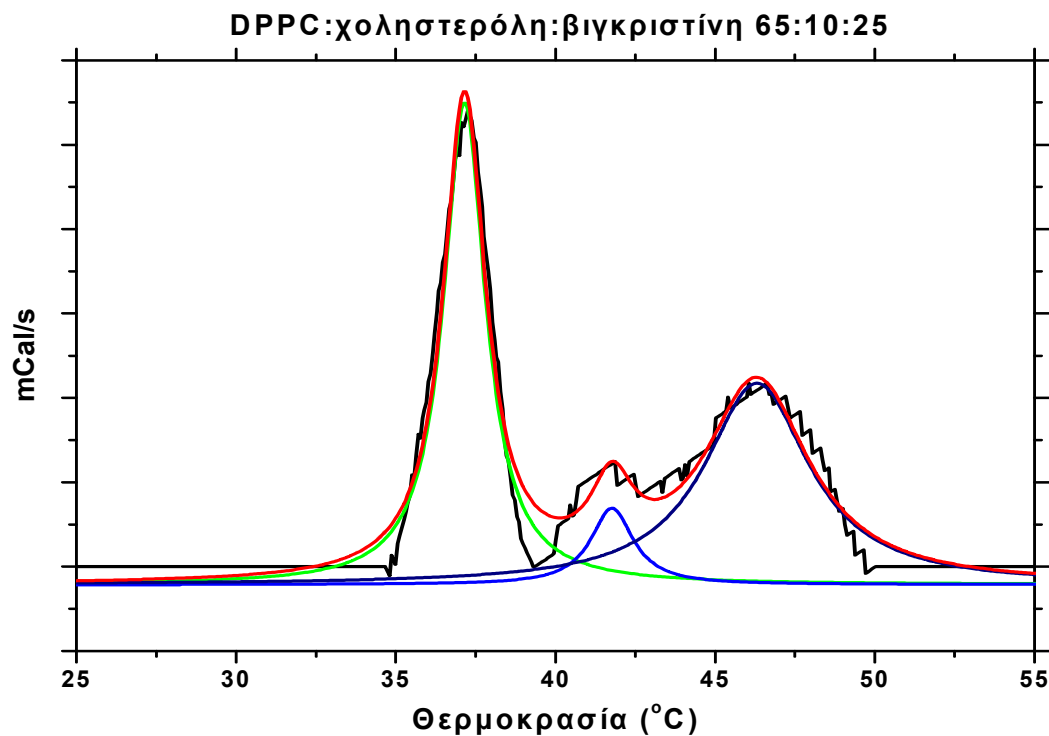
4.5.1 Θερμική Ανάλυση

Στο σχήμα 4.35 παρατηρείται το θερμογράφημα για το υπό εξέταση δείγμα, για το οποίο προσδιορίζεται θερμοκρασία μεταβολής φάσης $T_m = 37.12\text{ }^{\circ}\text{C}$ και μεταβολή ενθαλπίας μεταβολής φάσης $\Delta H_m = 4.28 \pm 0.21\text{ kcal/mol}$. Λόγω της υφής του θερμογραφήματος,

πραγματοποιείται αποσυγκερασμός της καμπύλης θέρμανσης του δείγματος και προκύπτει το σχήμα 4.36.



Σχήμα 4.35: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25.



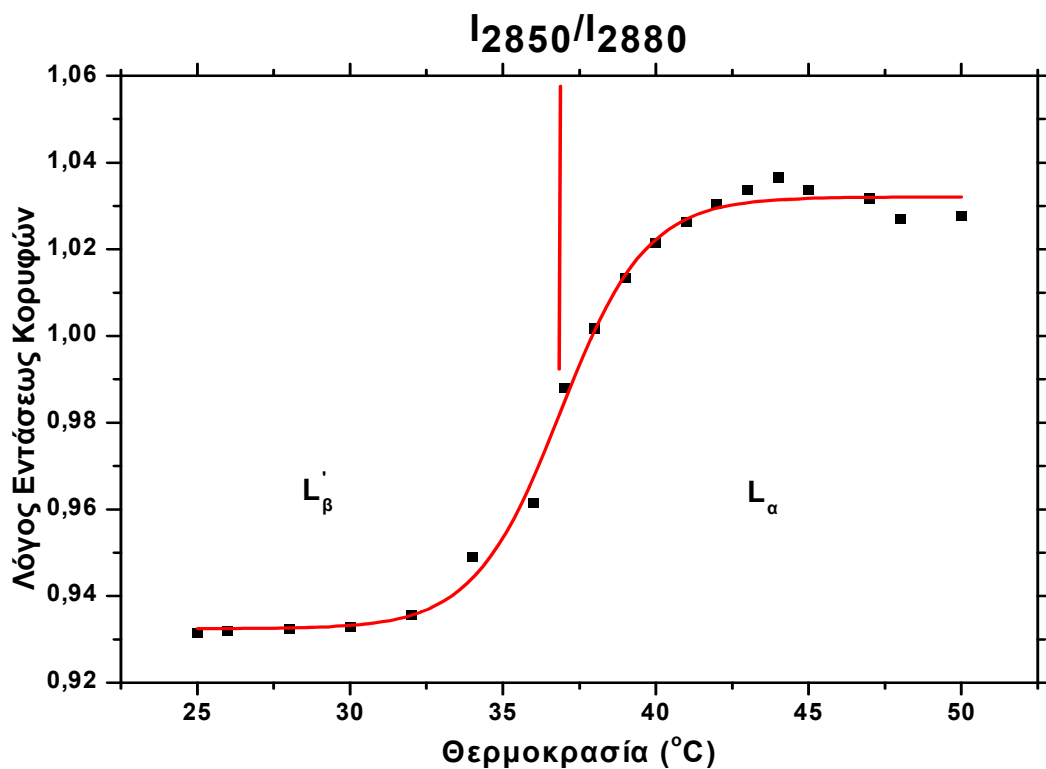
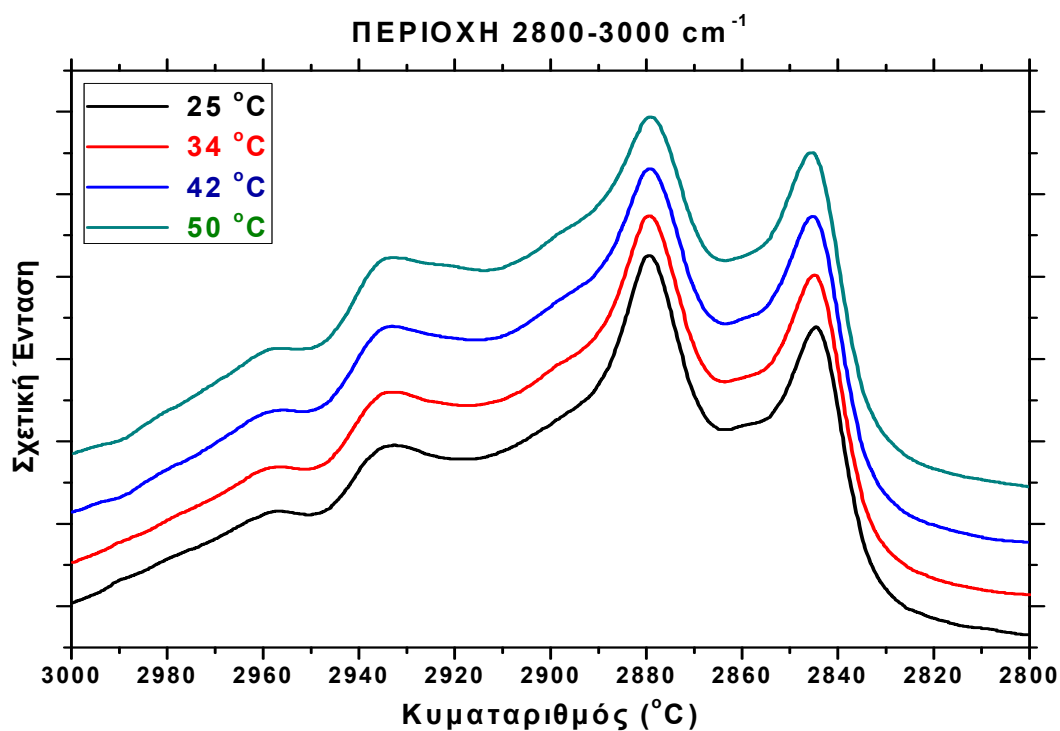
Σχήμα 4.36: Θερμογράφημα του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25 με διαχωρισμό κορυφών.

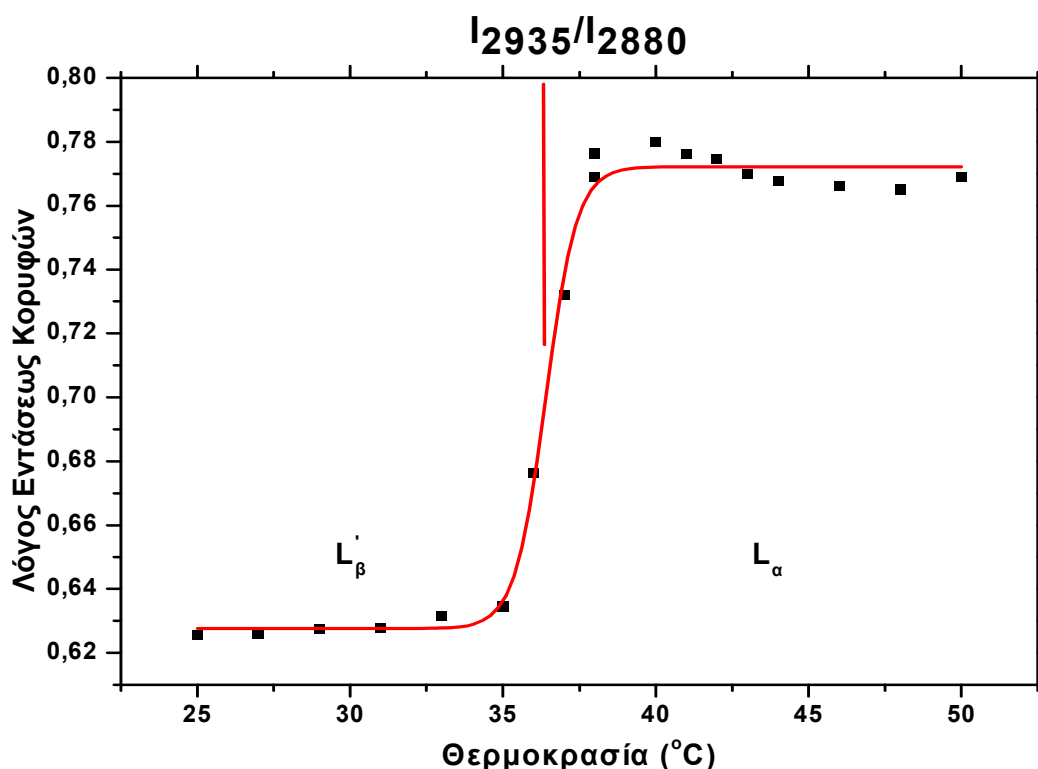
Για πρώτη φορά το αποτέλεσμα του αποσυγκερασμού αποτελείται από τρεις διαφορετικές κορυφές. Η πρώτη κορυφή παρατηρείται στους $T_{m1} = 37.15 \pm 0.01$ °C με μεταβολή ενθαλπίας $\Delta H_{m1} = 1.95 \pm 0.10 \text{ kcal/mol}$ και αντιστοιχεί σε τμήμα της διπλοστιβάδας με χοληστερόλη και με τη μεγαλύτερη ποσότητα βιγκριστίνης. Η ενδιάμεση κορυφή παρατηρείται στους $T_{m2} = 41.76 \pm 0.07$ °C με μεταβολή ενθαλπίας $\Delta H_{m2} = 0.31 \pm 0.01 \text{ kcal/mol}$ και αντιπροσωπεύει τμήμα της διπλοστιβάδας με αρκετή ποσότητα βιγκριστίνης. Τέλος, η Τρίτη κορυφή παρουσιάζεται στους $T_{m3} = 46.30 \pm 0.04$ °C με μεταβολή ενθαλπίας $\Delta H_{m3} = 2.02 \pm 0.10 \text{ kcal/mol}$.

4.5.2 Φασματοσκοπία Raman

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τις τέσσερις διαφορετικές φασματικές περιοχές.

- Περιοχή 2800 – 3000 cm^{-1} :** Στο σχήμα 4.37 παρουσιάζονται τα φάσματα Raman του συστήματος μεμβράνης:χοληστερόλης:βιγκριστίνης 65:10:25 σε τέσσερις (4) διαφορετικές θερμοκρασίες. Από τις εντάσεις των κορυφών αυτών υπολογίζονται οι λόγοι εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} και I_{2935}/I_{2880} . Τα σημεία καμπής των σιγμοειδών καμπυλών που προκύπτουν είναι 36.87 ± 0.13 και 36.40 ± 0.07 °C αντίστοιχα (σχήματα 4.38, 4.39). Το εύρος των τιμών των μελετούμενων λόγων είναι $\Delta R_{I_{2850}/I_{2880}}^{65:10:25} = 0.11$ και $\Delta R_{I_{2935}/I_{2880}}^{65:10:25} = 0.11$, ενώ τέλος οι μελετούμενες κορυφές 2850 και 2880 cm^{-1} παρουσιάζουν μετατόπιση σε υψηλότερες συχνότητες κατά 1.5 και 0.2 cm^{-1} αντίστοιχα (σχήμα 4.37). Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα αυτά με εκείνα του δείγματος 73:10:17, συμπεραίνεται η ανταγωνιστική δράση μεταξύ της χοληστερόλης και της βιγκριστίνης, αφού και το εύρος τιμών των λόγων εντάσεως κορυφών αλλά και οι επιμέρους μετατοπίσεις είναι μεγαλύτερες στο δείγμα 65:10:25.

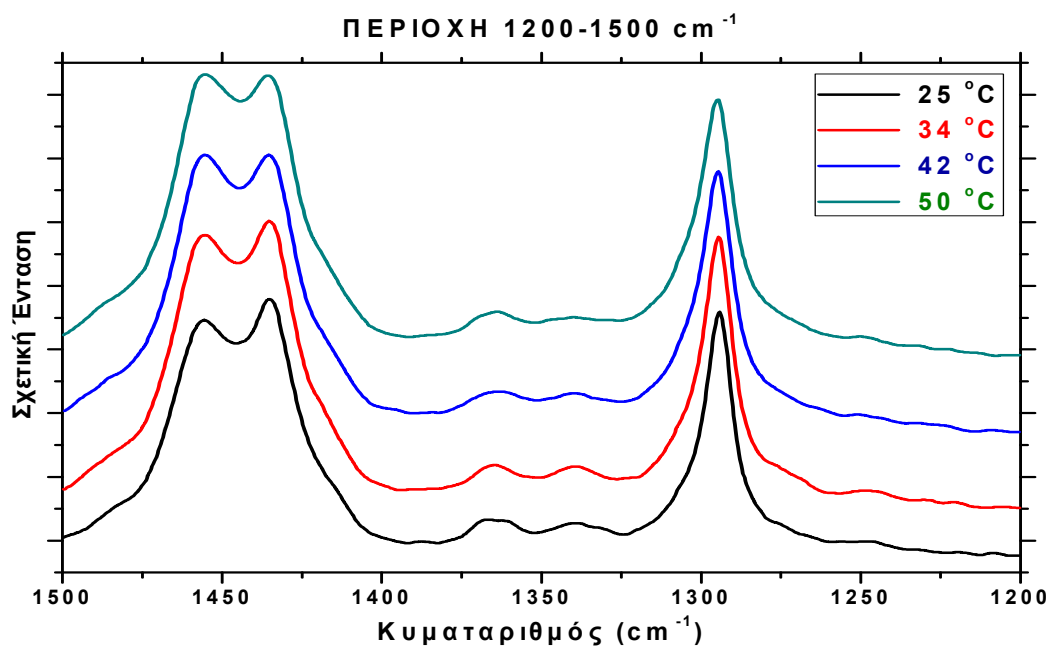




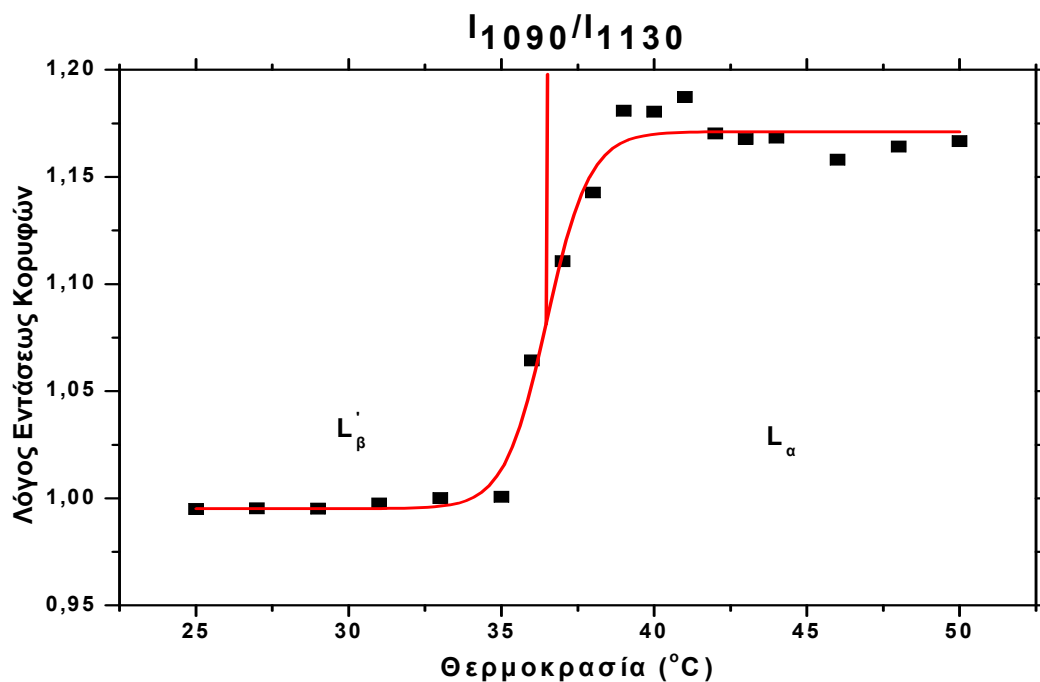
Σχήμα 4.39: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2935}/I_{2880} του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25.

- Περιοχή $1200 - 1500 \text{ cm}^{-1}$:** Στο σχήμα 4.40 παρατηρούμε ότι η κορυφή στους 1294 cm^{-1} μετατοπίζεται κατά 0.9 cm^{-1} ενώ αυτή στους 1436 cm^{-1} κατά 0.9 cm^{-1} , παρατήρηση που πιστοποιεί το γεγονός ότι η αύξηση της ποσότητας φαρμάκου προκαλεί περαιτέρω αταξία στις αλειφατικές αλυσίδες. Και σε αυτή την περίπτωση, ο διαχωρισμός της κορυφής (Σχήμα Π.23) και η μελέτη του λόγου I_{1457}/I_{1436} (Σχήμα Π.24) αποδεικνύει την αύξηση της αταξίας και της ρευστότητας της διπλοστιβάδας.
- Περιοχή $1000 - 1200 \text{ cm}^{-1}$:** Ο λόγος I_{1090}/I_{1130} απεικονίζεται με μια σιγμοειδή καμπύλη, το σημείο καμπής της οποίας προσδιορίζεται στους $36.49 \pm 0.13 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (σχήμα 4.41). Το εύρος των τιμών του λόγου αυτού στο εξεταζόμενο σύστημα είναι $\Delta R_{I_{1090}/I_{1130}}^{65:10:25} = 0.19$. Επιπλέον, η μετατόπιση της κορυφής στους 1090 cm^{-1} υπολογίζεται στους 2.3 cm^{-1} ενώ αυτή στους 1130 cm^{-1} 0.7 cm^{-1} σε χαμηλότερες συχνότητες (σχήμα

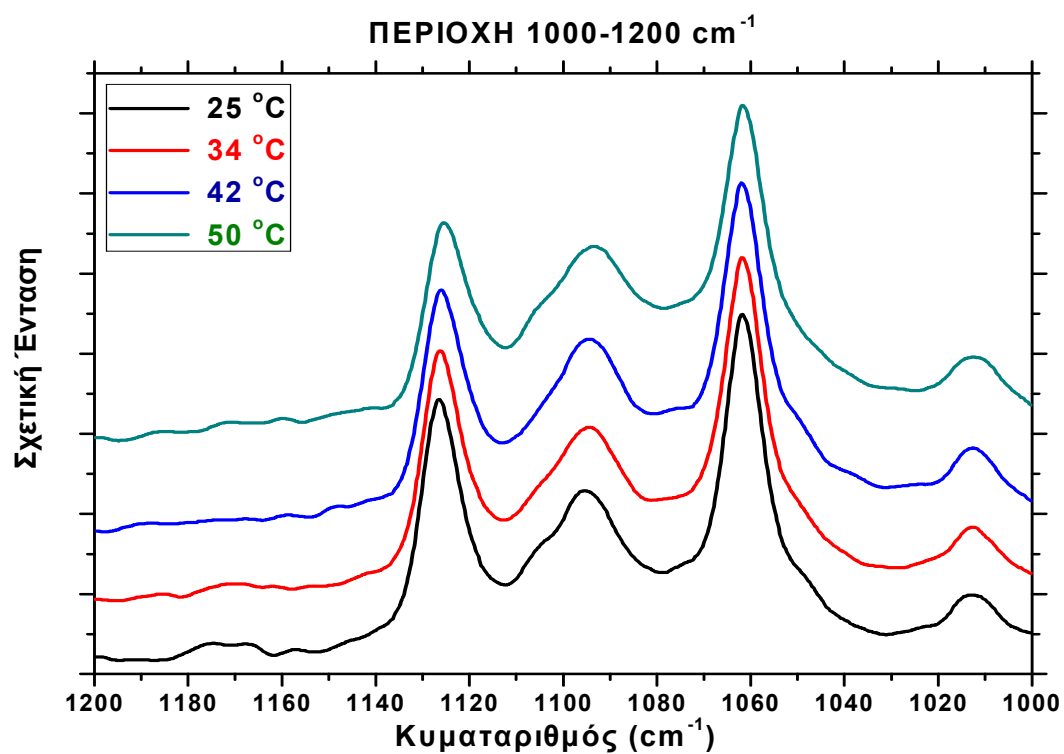
4.42). Η συμπεριφορά αυτή εξηγείται από την μεγάλη αλληλεπίδραση του φαρμακευτικού μορίου με τις αλιπιδικές αλυσίδες των διπλοστιβάδων.



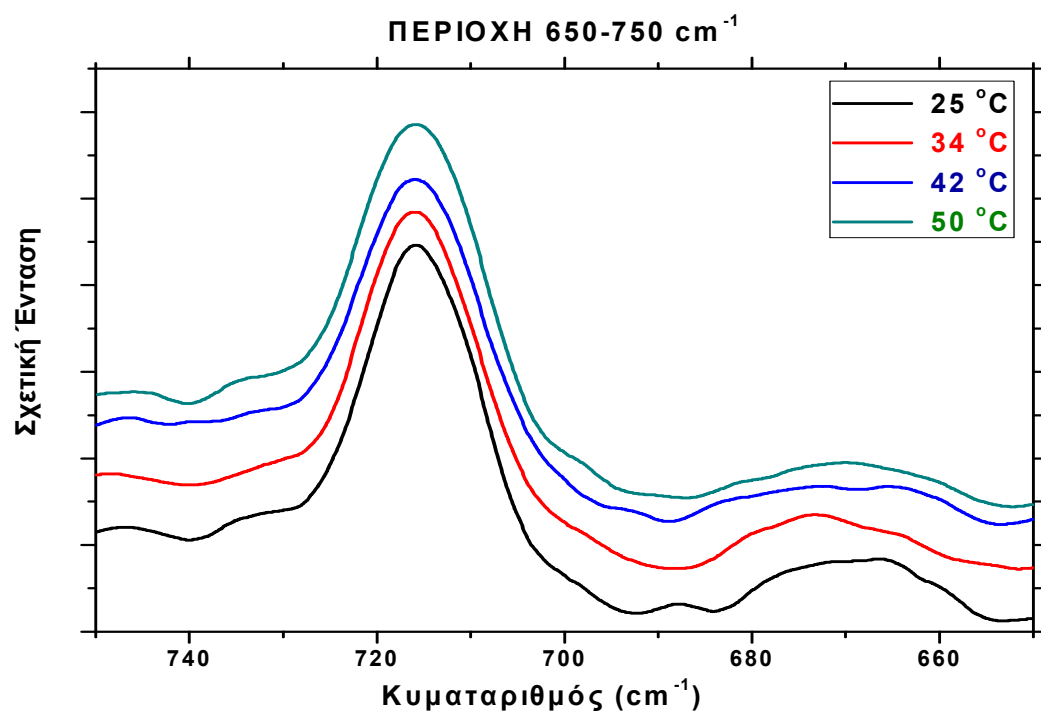
Σχήμα 4.40: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25 στην περιοχή 1200 – 1500 cm^{-1} .



Σχήμα 4.41: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25.



Σχήμα 4.42: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25 στην περιοχή 1000 – 1200 cm^{-1} .



Σχήμα 4.43: Κανονικοποιημένα φάσματα Raman σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25 στην περιοχή 650 – 750 cm^{-1} .

- **Περιοχή 650 – 750 cm^{-1}** : Η κορυφή στους 715 cm^{-1} παρουσιάζει μια μετατόπιση της τάξης των 0.5 cm^{-1} με αύξηση της θερμοκρασίας σε χαμηλότερες συχνότητες (σχήμα 4.43). Η αρνητική μετατόπιση αυτή εκφράζει την εξασθένιση της αλληλεπίδρασης της βιγκριστίνης με τις πολικές κεφαλές αφού αυτή διεισδύει περισσότερο στις αλειφατικές αλυσίδες.

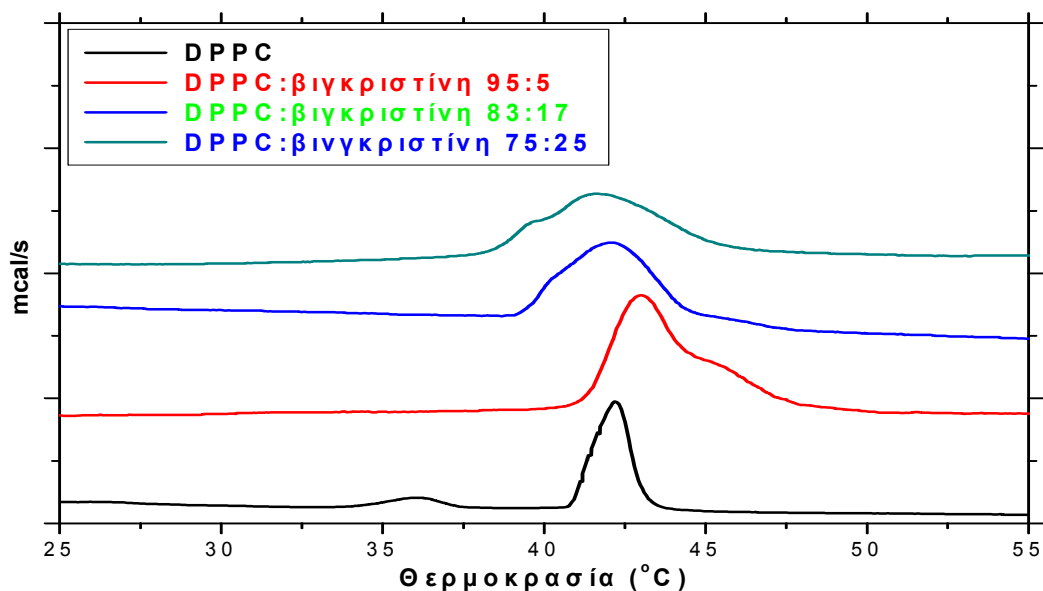
ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Σε όλα τα δείγματα τα οποία περιείχαν το φαρμακευτικό μόριο της βιγκριστίνης εκτός από αυτό του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 95:5, παρατηρήθηκαν επιπλέον κορυφές στα φάσματα Raman των δειγμάτων. Αυτές προσδιορίστηκαν στους 1012 (δακτυλικό βενζολικό αποτύπωμα), 1546 (έκταση δεσμού N – H) και 1614 (δακτυλικό βενζολικό αποτύπωμα) cm^{-1} . Οι παραπάνω κορυφές οφείλονται σε δονήσεις του μορίου της βιγκριστίνης, η παρατήρηση των οποίων επιβεβαιώνει την εισδοχή (ενσωμάτωση) του μορίου στις λιπιδικές διπλοστιβάδες.

4.6 Συνολικά αποτελέσματα δειγμάτων DPPC:βιγκριστίνης.

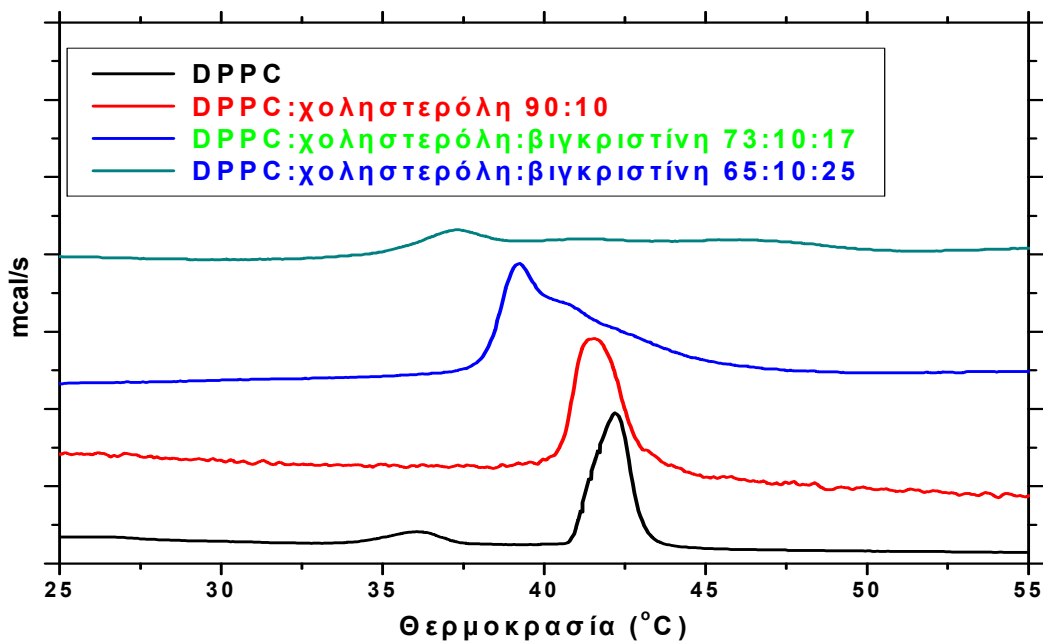
4.6.1 Αποτελέσματα Θερμικής Ανάλυσης.

Στο σχήμα 4.44 παρουσιάζονται τα θερμογράφημα των λιπιδικών διπλοστιβάδων που προέκυψαν έπειτα από την εισδοχή διαφορετικών μοριακών αναλογιών του φαρμακευτικού μορίου της βιγκριστίνης σε αυτές. Από το σχήμα αυτό παρατηρούνται τα εξής: i) η εξαφάνιση της προμετάβασης φάσης των λιπιδικών διπλοστιβάδων ακόμα και μετά την εισδοχή της μικρότερης μοριακής αναλογίας φαρμάκου, γεγονός που αποδεικνύει την έντονη αλληλεπίδραση αυτού με τις πολικές κεφαλές της χολίνης των διπλοστιβάδων, ii) η αύξηση της θερμοκρασίας κύριας μεταβολής φάσης στη μοριακή αναλογία 95:5, γεγονός που συμβαδίζει με την αλληλεπίδραση που περιγράφηκε παραπάνω, iii) την ασυμμετρία των παρατηρούμενων κορυφών σε όλες τις μοριακές αναλογίες, γεγονός που σχετίζεται με τη μη ομογενή

εισδοχή της βιγκριστίνης στις λιπιδικές διπλοστιβάδες και τη δημιουργία τμημάτων “πλούσιων” και “φτωχών” σε ποσότητα βιγκριστίνης και iv) λόγω της μείωσης της θερμοκρασίας κύριας αλλαγής φάσης αποδεικνύεται η εισδοχή του μορίου προς το υδρόφοβο τμήμα των αλειφατικών αλυσίδων.



Σχήμα 4.44: Θερμογραφήματα των δειγμάτων DPPC, DPPC:βιγκριστίνη 95:5, DPPC:βιγκριστίνη 83:17 και DPPC:βιγκριστίνη 75:25.



Σχήμα 4.45: Θερμογραφήματα των δειγμάτων DPPC, DPPC:χοληστερόλη 90:10, DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17 και DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25.

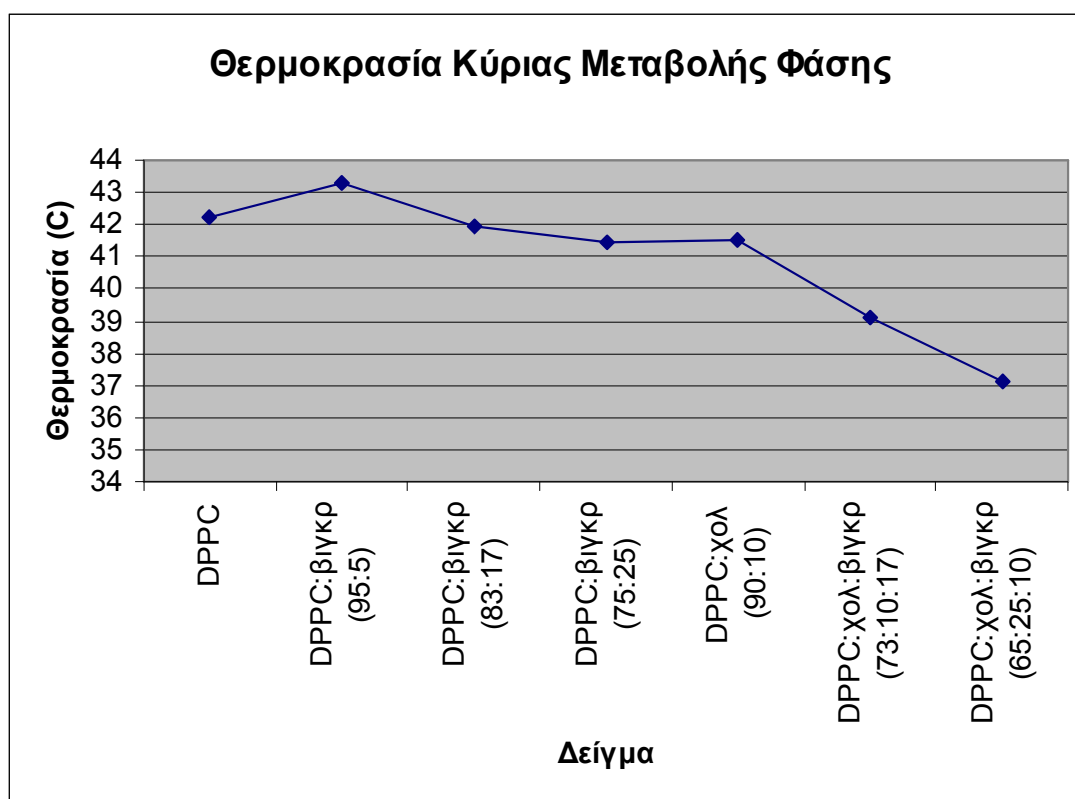
Στο σχήμα 4.45 παρουσιάζονται τα θερμογραφήματα των μελετούμενων δειγμάτων τα οποία εμπεριείχαν το μόριο της χοληστερόλης, δηλαδή τα δείγματα DPPC, DPPC:χοληστερόλη 90:10, DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17 και DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25.

Από το σχήμα αυτό εξάγονται τα εξής συμπεράσματα: i) η συνεχής μείωση της θερμοκρασίας κύριας μεταβολής φάσης με την προσθήκη της χοληστερόλης αλλά και της βιγκριστίνης, ii) η ασυμμετρία των κορυφών των συστημάτων μεμβράνη:χοληστερόλη:βιγκριστίνη, γεγονός που αποκαλύπτει τη δημιουργία περιοχών “πλούσιων” και “φτωχών” σε περιεκτικότητα φαρμάκου. Σε αυτά τα δείγματα είναι επιτακτική η χρήση του αποσυγκερασμού, η οποία αποδεικνύει ότι τα rafts της χοληστερόλης εμπεριέχουν τη μεγαλύτερη ποσότητα βιγκριστίνης λόγω της μείωσης της θερμοκρασίας κύριας μεταβολής φάσης. Επίσης, αποδεικνύεται και η δημιουργία διάφορων τμημάτων (domains) τα οποία περιέχουν ποσότητα βιγκριστίνης σε μικρότερη αναλογία με αποτέλεσμα η θερμοκρασία κύριας μεταβολής φάσης να είναι αυξημένη λόγω της αλληλεπίδρασής της με τη μεσεπιφάνεια της διπλοστιβάδας.

Στον πίνακα 4.1 συνοψίζονται τα αποτελέσματα τα οποία λαμβάνονται από τη θερμική ανάλυση των υπό εξέταση δειγμάτων. Οι τιμές θερμοκρασίας κύριας μεταβολής φάσης των δειγμάτων που εξετάστηκαν, σε συνάρτηση με την αύξηση της ποσότητας του φαρμάκου που ενσωματώνεται στις λιπιδικές διπλοστιβάδες παρουσιάζονται στο διάγραμμα 4.1. Από αυτό φαίνεται η αύξηση της θερμοκρασίας για το δείγμα DPPC:βιγκριστίνη 95:5 λόγω της αλληλεπίδρασης του φαρμάκου με τις πολικές κεφαλές όπως και τη μείωση αυτής στα δείγματα DPPC:βιγκριστίνη 83:17 και DPPC:βιγκριστίνη 75:25 λόγω της ισχυρής αλληλεπίδρασης με τις λιπιδικές αλυσίδες της διπλοστιβάδας. Ομοίως, εξετάζοντας τις θερμοκρασίες κύριας μεταβολής φάσης των δειγμάτων που περιέχουν βιγκριστίνη και σταθερή ποσότητα χοληστερόλης στο διάγραμμα 4.1, παρατηρείται σχεδόν γραμμική μείωση αυτής στα υπό εξέταση δείγματα. Αυτό δηλώνει ότι η χοληστερόλη δεν παρεμποδίζει τη γραμμική αύξηση της ρευστότητας που προκαλούν οι δύο συγκεντρώσεις βιγκριστίνης που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα, γεγονός που αποδεικνύει την εισδοχή της βιγκριστίνης στα rafts της χοληστερόλης.

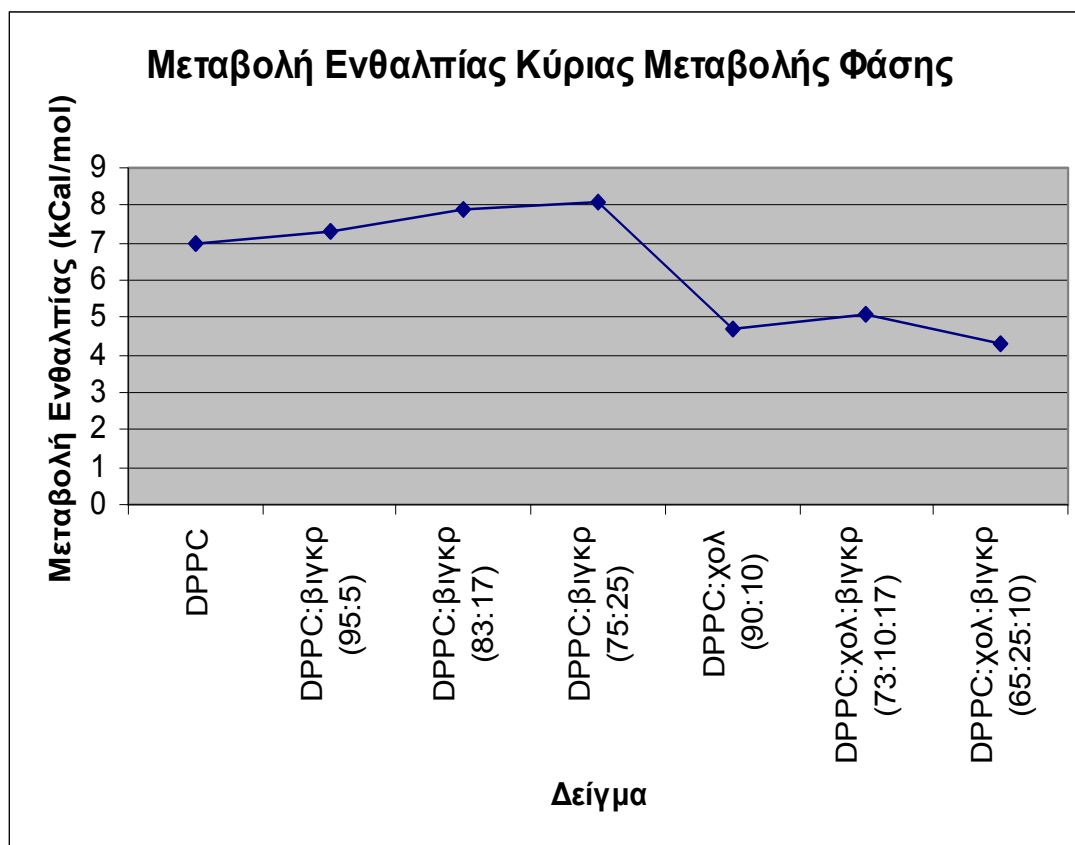
Πίνακας 4.1: Αποτελέσματα θερμικής ανάλυσης δειγμάτων βιγκριστίνης.

ΔΕΙΓΜΑ	T_m (°C)	ΔH_m (<i>kcal / mol</i>)
DPPC	42.2	6.95
DPPC:βιγκριστίνη (95:5)	43.30	7.33
DPPC:βιγκριστίνη (83:17)	41.95	7.92
DPPC:βιγκριστίνη (75:25)	41.45	8.11
DPPC:χοληστερόλη (90:10)	41.5	4.72
DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη (73:10:17)	39.11	5.11
DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη (65:25:10)	37.12	4.28



Διάγραμμα 4.1: Εξάρτηση της θερμοκρασίας κύριας μεταβολής φάσης σε συνάρτηση της ποσότητας φαρμάκου.

Από την άλλη, εξετάζοντας τις τιμές της διαφοράς μεταβολής ενθαλπίας της κύριας μεταβολής φάσης, δημιουργείται το διάγραμμα 4.2. Από αυτό παρατηρείται η αύξηση της απαιτούμενης ενθαλπίας για τα δείγματα που περιέχουν βιγκριστίνη λόγω του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης των αλειφατικών αλυσίδων των λιπιδικών διπλοστιβάδων. Επίσης, παρατηρώντας τις τιμές των δειγμάτων που περιέχουν χοληστερόλη, συμπεραίνεται η δραστική μείωση της απαιτούμενης ενθαλπίας κύριας μεταβολής φάσης, γεγονός που πιστοποιεί τη δράση της χοληστερόλης ως αναστολέας του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης. Επιπρόσθετα, λόγω της περαιτέρω μείωσης της ενθαλπίας με αύξηση της ποσότητας φαρμάκου, γίνεται κατανοητή η συναγωνιστική δράση της χοληστερόλης και της βιγκριστίνης όταν αυτές δρουν ταυτόχρονα στις λιπιδικές διπλοστιβάδες.



Διάγραμμα 4.2: Εξάρτηση της μεταβολής ενθαλπίας κύριας μεταβολής φάσης σε συνάρτηση της ποσότητας φαρμάκου.

Ανακεφαλαιώνοντας, τα αποτελέσματα της Θερμικής Ανάλυσης για τα δείγματα DPPC:βιγκριστίνης και DPPC:χοληστερόλης:βιγκριστίνης είναι τα ακόλουθα:

- ✓ Η βιγκριστίνη παρουσιάζει ισχυρή αλληλεπίδραση με τις πολικές κεφαλές της χολίνης των λιπιδικών διπλοστιβάδων στη μεσεπιφάνεια αυτών με φορά προς τα μέσα, αφού με αύξηση των μοριακών αναλογιών επηρεάζει και τις αλειφατικές αλυσίδες.
- ✓ Η εισδοχή της βιγκριστίνης στις λιπιδικές διπλοστιβάδες σε μοριακή αναλογία μεγαλύτερη από 83:17, προκαλεί το φαινόμενο της αλληλοεισχώρησης των απέναντι αλειφατικών αλυσίδων των διπλοστιβάδων.
- ✓ Η χοληστερόλη δρα ως αναστολέας του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης σε μεγάλη συγκέντρωση βιγκριστίνης.
- ✓ Η ταυτόχρονη εισδοχή χοληστερόλης και βιγκριστίνης στις λιπιδικές μεμβράνες σε μεγάλες συγκεντρώσεις επιφέρουν συναγωνιστικά αποτελέσματα.

4.6.2 Αποτελέσματα φασματοσκοπίας Raman.

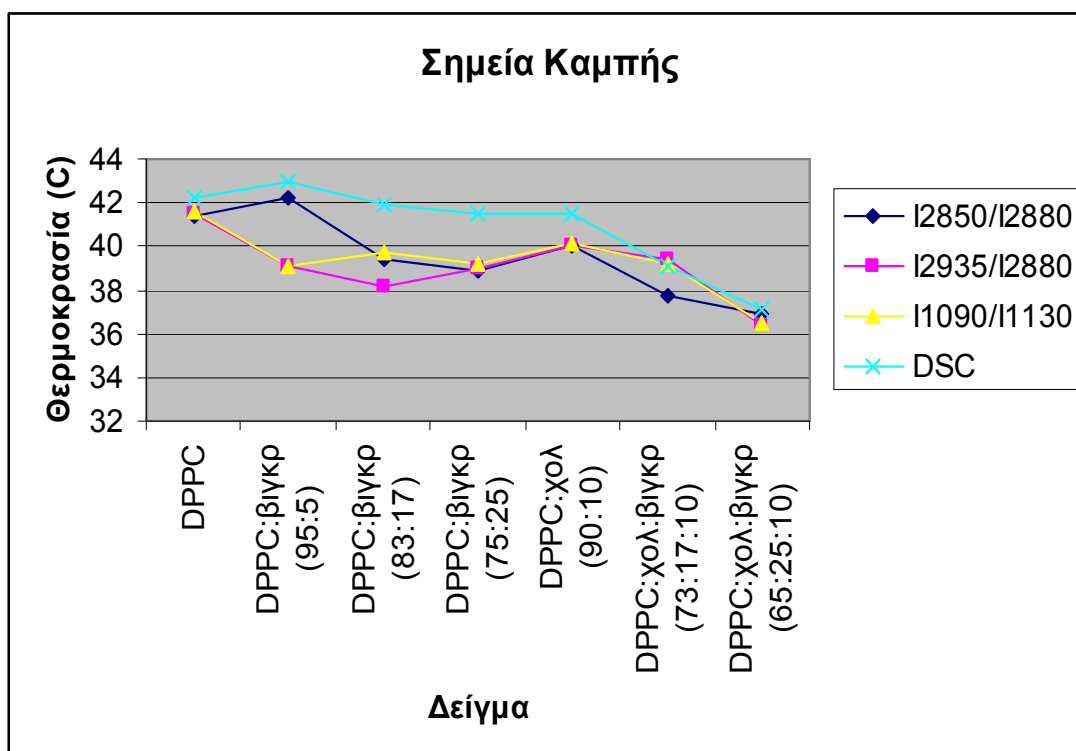
Στο σημείο αυτό για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων Raman των εξεταζόμενων δειγμάτων, θα αναλύσουμε την εξάρτηση κάθε παραμέτρου που προσδιορίστηκε σε σχέση με την ποσότητα του φαρμάκου και της χοληστερόλης, με σκοπό τον προσδιορισμό των δομικών αλλαγών που συμβαίνουν στις λιπιδικές διπλοστιβάδες.

- **Σημεία καμπής σιγμοειδών καμπυλών:** Στον πίνακα 4.2 παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα των σημείων καμπής των σιγμοειδών καμπυλών των δειγμάτων που αναλύθηκαν για τους λόγους εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} , I_{2935}/I_{2880} και I_{1090}/I_{1130} .

Πίνακας 4.2: Σημεία καμπής των σιγμοειδών καμπυλών που αντιστοιχούν στους λόγους εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} , I_{2935}/I_{2880} και I_{1090}/I_{1130} .

ΔΕΙΓΜΑ	Σημεία Καμπής (°C)			T_m (°C)
	I_{2850}/I_{2880}	I_{2935}/I_{2880}	I_{1090}/I_{1130}	
DPPE	41.43	41.46	41.63	42.20
DPPE:βιγερ (95:5)	42.22	39.13	39.06	43.00
DPPE:βιγερ (83:17)	39.44	38.14	39.68	41.95
DPPE:βιγερ (75:25)	38.92	39.00	39.18	41.45
DPPE:χολ (90:10)	40.07	40.07	40.12	41.50
DPPE:χολ:βιγερ (73:17:10)	37.75	39.41	39.18	39.11
DPPE:χολ:βιγερ (65:25:10)	36.87	36.40	36.49	37.12

Χρησιμοποιώντας τα δεδομένα του πίνακα 4.2, προκύπτει το διάγραμμα 4.3 στο οποίο καταγράφεται η συμπεριφορά των σημείων καμπής των σιγμοειδών καμπυλών των λόγων εντάσεως κορυφών Raman.



Διάγραμμα 4.3: Εξάρτηση των σημείων καμψής των σιγμοειδών καμπυλών των λόγων εντάσεως κορυφών Raman σε σχέση με την ποσότητα φαρμάκου.

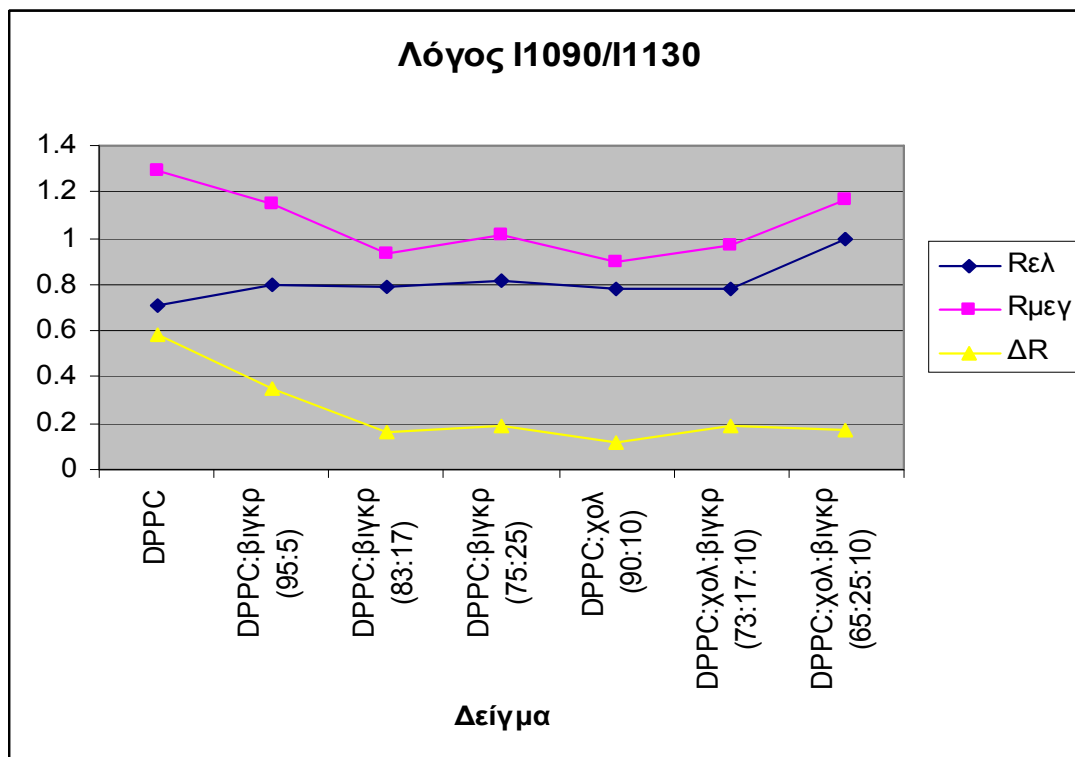
- Εύρος τιμών των λόγων εντάσεως κορυφών Raman:** Στον πίνακα 4.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δειγμάτων που εξετάστηκαν για την ελάχιστη και τη μέγιστη τιμή που παρουσίασαν οι λόγοι εντάσεως κορυφών Raman σε όλο το εύρος θερμοκρασιών της πειραματικής διαδικασίας.
 - Η τιμή του λόγου I_{1090}/I_{1130} δείχνει την αναλογία *gauche* και *trans* διαμορφωμερών των λιπιδικών αλυσίδων των διπλοστιβάδων καθώς και τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται. Όσο μεγαλύτερη η τιμή του λόγου αυτού, τόσο περισσότερες είναι οι δομές *gauche* που επικρατούν, τόσο μικρότερες οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις και άρα παρατηρείται μεγαλύτερη ρευστότητα για τη διπλοστιβάδα.

Πίνακας 4.3: Ελάχιστες και μέγιστες παρατηρούμενες τιμές των λόγων εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} , I_{2935}/I_{2880} και I_{1090}/I_{1130} .

	I_{2850}/I_{2880}			I_{2935}/I_{2880}			I_{1090}/I_{1130}		
ΔΕΙΓΜΑ	$R_{ελ}$	$R_{μεγ}$	ΔR	$R_{ελ}$	$R_{μεγ}$	ΔR	$R_{ελ}$	$R_{μεγ}$	ΔR
DPPC	0.82	1	0.18	0.46	0.73	0.27	0.71	1.29	0.58
DPPC:βιγκρ (95:5)	0.81	0.95	0.14	0.43	0.56	0.13	0.8	1.15	0.35
DPPC:βιγκρ (83:17)	0.81	0.94	0.13	0.41	0.6	0.19	0.79	0.93	0.16
DPPC:βιγκρ (75:25)	0.76	0.88	0.12	0.42	0.49	0.07	0.82	1.01	0.19
DPPC:χολ (90:10)	0.84	0.91	0.07	0.51	0.59	0.08	0.78	0.9	0.12
DPPC:χολ:βιγκρ (73:17:10)	0.82	0.93	0.11	0.53	0.64	0.11	0.78	0.97	0.19
DPPC:χολ:βιγκρ (65:25:10)	0.93	1.03	0.1	0.63	0.77	0.14	1	1.17	0.17

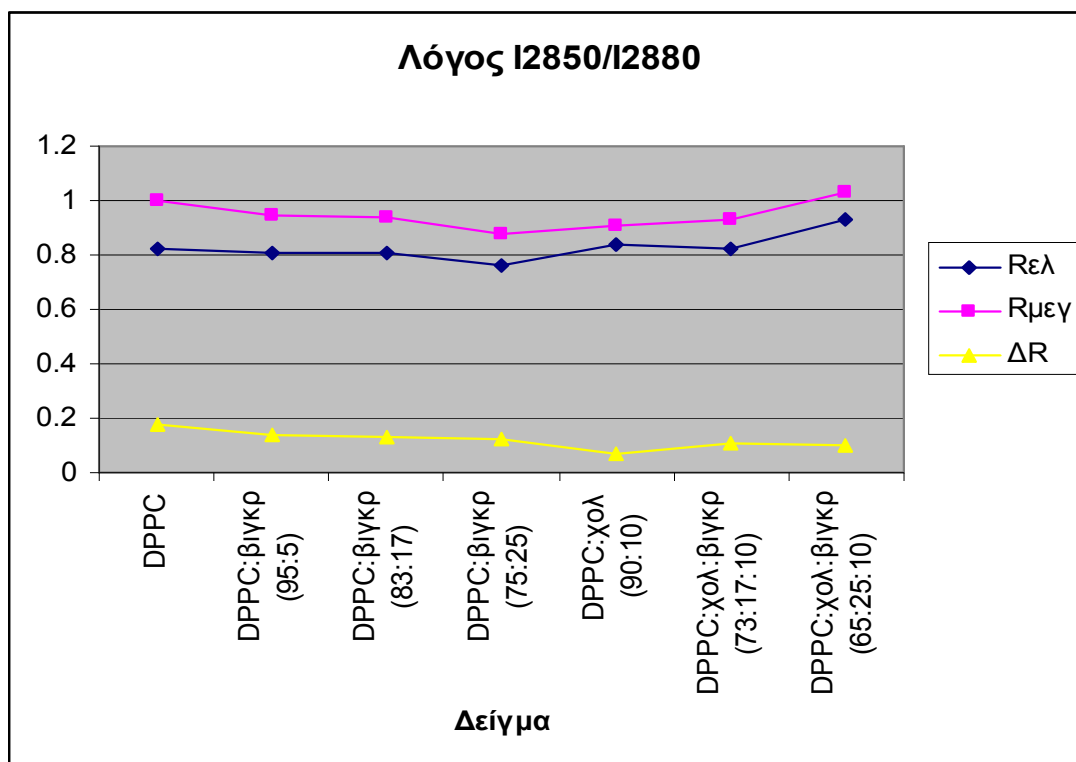
Παρατηρείται λοιπόν, ότι η εισδοχή της βιγκριστίνης αποδιοργανώνει τις αλυσίδες στην κατάσταση γέλης λόγω της αλληλεπίδρασής της με αυτές μέχρι την κύρια αλλαγή φάσης ενώ μετά από αυτήν προκαλεί μείωση της ρευστότητας λόγω της εμφάνισης του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης. Η προσθήκη της χοληστερόλης στις διπλοστιβάδες προκαλεί αποδιοργάνωση της κατάστασης γέλης αλλά πιο «σφικτό» ή συνεκτικό πακετάρισμα της υγρής κρυσταλλικής φάσης. Η ταυτόχρονη όμως προσθήκη χοληστερόλης και βιγκριστίνης προκαλεί περαιτέρω αποδιοργάνωση της υγρής κρυσταλλικής

φάσης, αύξηση της ρευστότητας, αποδεικνύοντας έτσι την ανταγωνιστική τους δράση (διάγραμμα 4.4).

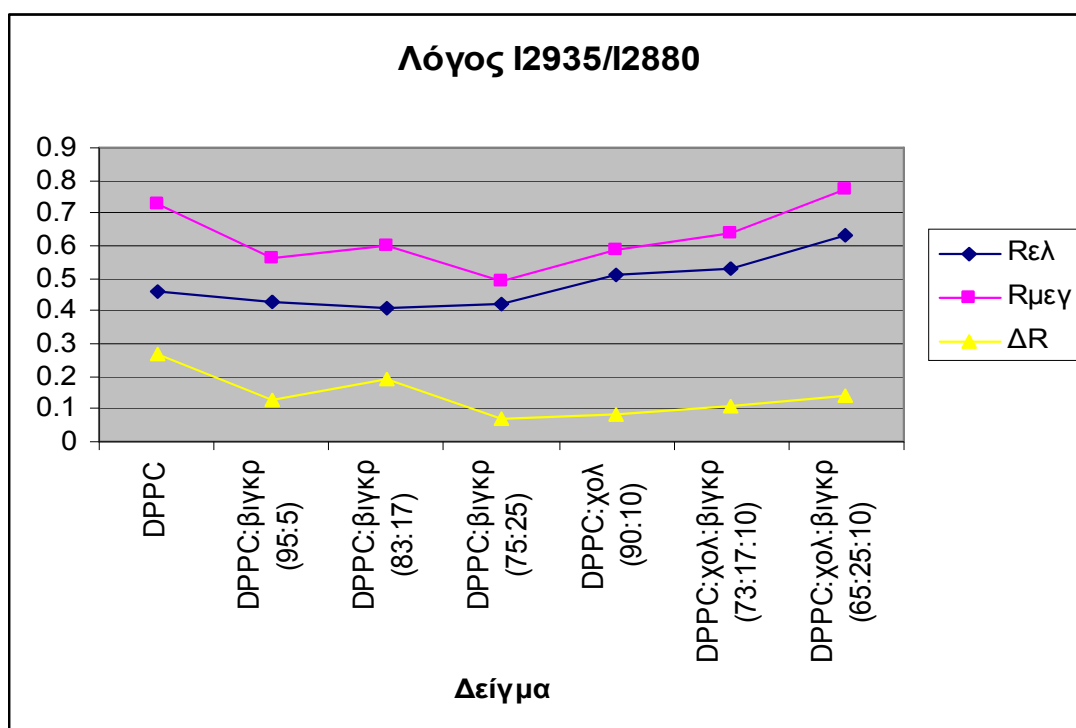


Διάγραμμα 4.4: Εξάρτηση των τιμών του λόγου I_{1090}/I_{1130} από την ποσότητα φαρμάκου.

➤ Η τιμή του λόγου I_{2850}/I_{2880} αποτελεί μέτρο των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων που επικρατούν στις διπλοστιβάδες. Όσο μικρότερη η τιμή του, τόσο μεγαλύτερες είναι αυτές ενώ αντίθετα αύξηση της τιμής του αποκαλύπτει μείωση των αλληλεπιδράσεων αυτών. Από το διάγραμμα 4.5 παρατηρούμε ότι η ενσωμάτωση της βιγκριστίνης στις διπλοστιβάδες προκαλεί αύξηση των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων λόγω της εμφάνισης του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης ενώ η ταυτόχρονη είσοδος χοληστερόλης και βιγκριστίνης προκαλεί αύξηση της τιμής του λόγου αυτού αφού: i) η χοληστερόλη αποτρέπει τη δημιουργία αλληλοεισχώρησης και ii) η επιπλέον προσθήκη της βιγκριστίνης προκαλεί περαιτέρω αποδιοργάνωση των αλειφατικών αλυσίδων.



Διάγραμμα 4.5: Εξάρτηση των τιμών του λόγου I_{2850}/I_{2880} από την ποσότητα φαρμάκου.



Διάγραμμα 4.6: Εξάρτηση των τιμών του λόγου I_{2935}/I_{2880} από την ποσότητα φαρμάκου.

➤ Η τιμή του λόγου I_{2935}/I_{2880} αποτελεί μέτρο της αταξίας (αποδιοργάνωση) των λιπιδικών διπλοστιβάδων. Μικρότερη τιμή του λόγου αυτού σημαίνει ισχυρότερη οργάνωση (είσοδος βιγκριστίνης) και μεγαλύτερη τιμή αποκαλύπτει ασθενέστερο πακετάρισμα των αλυσίδων (εισδοχή χοληστερόλης και βιγκριστίνης) (διάγραμμα 4.6).

- **Μετατοπίσεις κορυφών Raman:** Στον πίνακα 4.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δειγμάτων που εξετάστηκαν για τη μετατόπιση που εμφανίζουν οι παρατηρούμενες κορυφές λόγω της αλληλεπίδρασης της χοληστερόλης και του φαρμάκου με τις λιπιδικές διπλοστιβάδες.

Πίνακας 4.4: Μετατοπίσεις των παρατηρούμενων κορυφών Raman.

	Μετατοπίσεις Κορυφών Raman (cm ⁻¹)						
ΔΕΙΓΜΑ	715	1090	1130	1294	1436	2850	2880
DPPC	-2.8	-10.7	-2.9	2.4	3.1	3.9	3.7
DPPC:βιγκρ (95:5)	0.8	-0.3	-1.0	0.5	0.4	0.6	0.6
DPPC:βιγκρ (83:17)	0.2	-1.7	-0.7	0.5	0.4	1.1	0.3
DPPC:βιγκρ (75:25)	-0.2	-6.2	-2.7	1.9	2.6	3.2	1.7
DPPC:χολ (90:10)	-1.8	-2.7	-0.9	0.6	0.9	1.1	0.3
DPPC:χολ:βιγκρ (73:17:10)	0.2	-1.7	-0.7	0.6	0.4	1.1	0.2
DPPC:χολ:βιγκρ (65:25:10)	-0.5	-2.3	-0.7	0.9	0.9	1.5	0.2

Από τις τιμές της μετατόπισης της κορυφής στους 715 cm^{-1} γίνεται σαφής η ισχυρή αλληλεπίδραση της βιγκριστίνης με την πολική κεφαλή της χολίνης σε όλες τις μοριακές αναλογίες ενώ από τις τιμές μετατόπισης των κορυφών στους 1090, 1130, 1294, 1436, 2850 και 2880 cm^{-1} γίνεται σαφής η ολοένα ισχυρότερη αλληλεπίδραση της βιγκριστίνης με τις αλειφατικές αλυσίδες με αύξηση της μοριακής αναλογίας αυτής στις λιπιδικές διπλοστιβάδες.

Ανακεφαλαιώνοντας, τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας Raman για τα δείγματα DPPC:βιγκριστίνης και DPPC:χοληστερόλης:βιγκριστίνης είναι τα ακόλουθα:

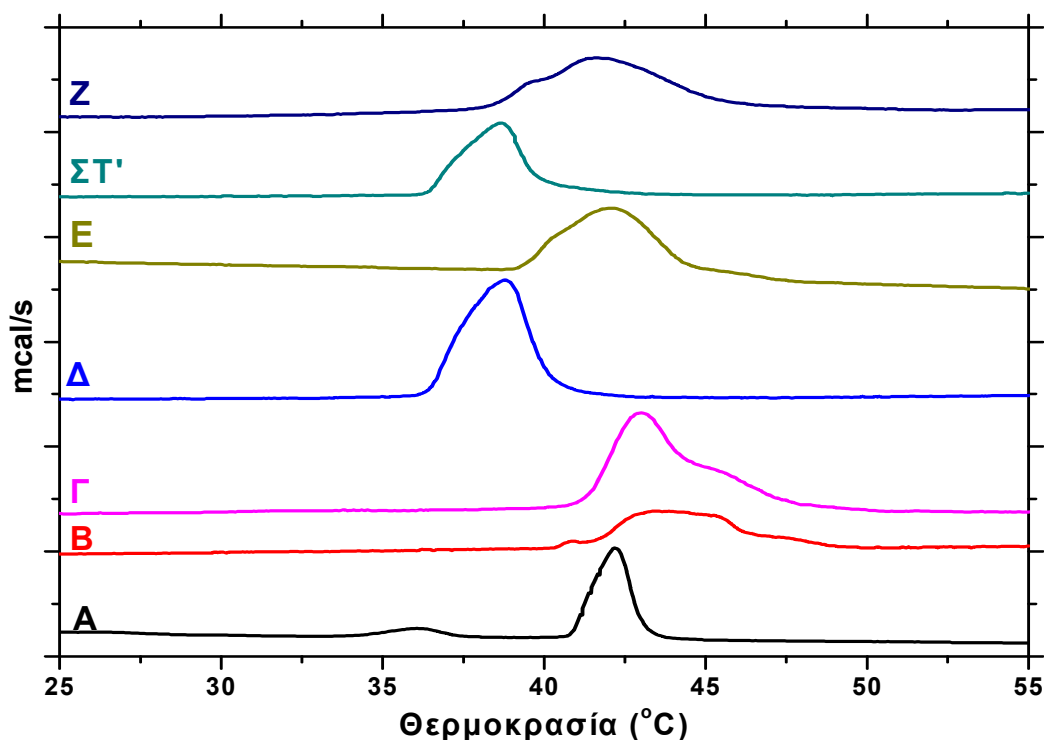
- ✓ Η βιγκριστίνη παρουσιάζει ισχυρή αλληλεπίδραση με τις πολικές κεφαλές της χολίνης των λιπιδικών διπλοστιβάδων στη μεσεπιφάνεια αυτών με φορά προς τα μέσα, αφού σε μεγάλες συγκεντρώσεις επηρεάζει και τις αλειφατικές αλυσίδες.
- ✓ Η εισδοχή της βιγκριστίνης στις λιπιδικές διπλοστιβάδες σε μοριακή αναλογία μεγαλύτερη από 83:17, προκαλεί το φαινόμενο της αλληλοεισχώρησης των απέναντι αλειφατικών αλυσίδων των διπλοστιβάδων.
- ✓ Η χοληστερόλη δρα ως αναστολέας του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης.
- ✓ Η ταυτόχρονη εισδοχή χοληστερόλης και βιγκριστίνης στις λιπιδικές μεμβράνες επιφέρουν συναγωνιστικά και ανταγωνιστικά αποτελέσματα.
- ✓ Η ύπαρξη της χοληστερόλης προκαλεί ρευστοποίηση των διπλοστιβάδων στη φάση πηκτής με αποτέλεσμα να επιτρέπεται η πλευρική διάχυση της βιμπλαστίνης από την περιοχή της μεσεπιφάνειας προς το υδρόφοβο τμήμα, και την περαιτέρω ρευστοποίησή τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΩΝ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΒΙΜΠΛΑΣΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΒΙΓΚΡΙΣΤΙΝΗΣ ΜΕ ΤΙΣ ΛΙΠΙΔΙΚΕΣ ΔΙΠΛΟΣΤΙΒΑΔΕΣ DPPC

5.1. Αποτελέσματα Θερμικής Ανάλυσης (DSC) για τα συστήματα DPPC:φάρμακο στις διάφορες αναλογίες

Στο σχήμα 5.1, παρουσιάζονται τα θερμογραφήματα των λιπιδικών διπλοστιβάδων τα οποία προέκυψαν μετά την εισδοχή των φαρμακευτικών μορίων βιμπλαστίνης και βιγκριστίνης σε αυτές, σε διάφορες μοριακές αναλογίες.



Σχήμα 5.1: Θερμογραφήματα των συστημάτων διπλοστιβάδα:φάρμακο σε διάφορες μοριακές αναλογίες. Α) DPPC (μαύρο), Β) DPPC:βιμπλαστίνη 95:5 (κόκκινο), Γ) DPPC:βιγκριστίνη 95:5 (ροζ), Δ) DPPC:βιμπλαστίνη 83:17 (γαλάζιο), Ε) DPPC:βιγκριστίνη 83:17 (καφέ), ΣΤ) DPPC:βιμπλαστίνη 75:25 (πράσινο), Ζ) DPPC:βιγκριστίνη 75:25 (μπλε).

Από το σχήμα αυτό γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι παρόλο που η βιμπλαστίνη και η βιγκριστίνη είναι παρόμοια μόρια ως προς τη χημική τους δομή, αυτά παρουσιάζουν ισχυρές διαφορές στη συμπεριφορά και στις αλληλεπιδράσεις που δημιουργούν με τις λιπιδικές διπλοστιβάδες. Αυτό είναι σημαντικό εύρημα γιατί η παρατήρηση αυτή δείχνει ότι τα δύο μόρια αποτυπώνουν ένα διαφορετικό δακτυλικό αποτύπωμα αλληλεπιδράσεων στις λιπιδικές διπλοστιβάδες το οποίο μπορεί να αντανakλά και στο φαρμακολογικό προφίλ τους.

Για παράδειγμα, εξετάζοντας τη μοριακή αναλογία 95:5 και των δυο φαρμάκων (Σχήμα 5.1B και 5.1Γ) παρατηρούμε την ισχυρή αλληλεπίδραση που παρουσιάζουν η βιμπλαστίνη και η βιγκριστίνη με την πολική κεφαλή της χολίνης λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας κύριας αλλαγής φάσης αλλά και της εξαφάνισης της προμετάβασης φάσης, με ισχυρότερη αυτή της βιμπλαστίνης. Στην περίπτωση αυτή έχουμε τη δημιουργία διάφορων τμημάτων (domains) διαφορετικής περιεκτικότητας σε φάρμακο, αφού από την υφή των θερμογραφημάτων εξιφαίνεται η ανομοιόμορφη εισδοχή της ποσότητας των φαρμάκων στην αναλογία αυτή. Τα τμήματα τα οποία έχουν μικρότερη θερμοκρασία τήξης (εύτηκτα) είναι πλούσια σε ποσότητα φαρμάκου ενώ αυτά με τη μεγαλύτερη θερμοκρασία (δύστηκτα) περιέχουν λιγότερη ποσότητα φαρμάκου. Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονιστεί ότι υπάρχει η περίπτωση μέρος της ποσότητας του φαρμάκου να περυσιάζεται επιδιαλυτωμένη στο υδατικό περιβάλλον της λιπιδικής διπλοστιβάδας με αποτέλεσμα να μην ενσωματώνεται σε αυτήν. Επίσης, ως προς τα ενεργειακά τους αποτελέσματα, η βιμπλαστίνη και η βιγκριστίνη αυξάνουν ελαφρώς την απαιτούμενη μεταβολή ενθαλπίας του συστήματος κατά την κύρια μεταβολή φάσης, δείχνοντας έτσι πως η συμπεριφορά τους στη μοριακή αναλογία αυτή είναι πανομοιότυπη.

Η πρώτη κύρια διαφορά στην αλληλεπίδραση της βιμπλαστίνης και της βιγκριστίνης εμφανίζεται στη μοριακή αναλογία 83:17 (Σχήμα 5.1Δ και 5.1Ε). Στην περίπτωση της βιμπλαστίνης παρουσιάζεται δραστικότερη μείωση της θερμοκρασίας κύριας μεταβολής φάσης σε σχέση με αυτή που επιφέρει η βιγκριστίνη, συμπεραίνοντας την ισχυρότερη αλληλεπίδραση της βιμπλαστίνης με το λιπόφιλο τμήμα των λιπιδικών διπλοστιβάδων. Επίσης, η

βιμπλαστίνη στη μοριακή αναλογία αυτή δείχνει μεγαλύτερη συνεκτικότητα και εισδοχή από την βιγκριστίνη. Τα ενεργειακά αποτελέσματα και των δύο φαρμάκων είναι περίπου της ίδιας ισχύος (αύξηση της μεταβολής της ενθαλπίας), γεγονός που οφείλεται στη δημιουργία του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης των αλυσίδων των λιπιδικών διπλοστιβάδων.

Το ίδιο περίπου συμπέρασμα εξάγεται ακι από τη μελέτη των δειγμάτων της μοριακής αναλογίας 75:25. Η βασικότερη διαφορά όμως εντοπίζεται στην περαιτέρω δράση των φαρμάκων λόγω της αύξησης της ποσότητάς τους. Η βιμπλαστίνη δείχνει να μην επηρεάζει περαιτέρω τις θερμοδυναμικές ιδιότητες της διπλοστιβάδας με αύξηση της αναλογίας πάνω από 83:17, γεγονός που αποδεικνύει τον κορεσμό της δράσης της. Αντίθετα, η βιγκριστίνη συνεχίζει να επιφέρει επιπτώσεις με αύξηση της αναλογίας της. Αυτό συμβαίνει διότι στην περίπτωση της βιμπλαστίνης παρουσιάζεται μεγαλύτερη συνεκτικότητα μεταξύ των μορίων της και των μορίων της διπλοστιβάδας ενώ η δράση της βιγκριστίνης επηρεάζεται εμφανώς από στερεοχημικές παρεμποδίσεις που έχουν σαν αποτέλεσμα τη μικρή συνεκτικότητα.

Σε αυτό το σημείο, θα αναλυθεί ένα χαρακτηριστικό της κύριας μεταβολής φάσης το οποίο είναι η μονάδα συνεργατικότητας (cooperative unit, C.U.). Με τον όρο εννοείται η συνεργατικότητα ή συμμετοχή των μορίων των λιπιδικών διπλοστιβάδων στην κύρια μεταβολή φάσης. Όσο μεγαλύτερος ο αριθμός C.U. τόσο μεγαλύτερο το μέγεθος της συνεργατικότητας. Για παράδειγμα η μονάδα συνεργατικότητας του δείγματος των λιπιδικών διπλοστιβάδων της DPPC υπολογίζεται $C.U. = 384$ μόρια. Ο πίνακας 5.1 περιέχει τα αποτελέσματα του χαρακτηριστικού αυτού για τα συστήματα DPPC:βιμπλαστίνη και DPPC:βιγκριστίνη στις διάφορες μοριακές αναλογίες.

Πίνακας 5.1: Αποτελέσματα C.U. για τα εξεταζόμενα δείγματα βιμπλαστίνης.

Δείγμα	C.U.
DPPC	384
DPPC:βιμπλ 95:5	116
DPPC:βιμπλ 83:17	161
DPPC:βιμπλ 75:25	158
DPPC:βιγκρ 95:5	164
DPPC:βιγκρ 83:17	136
DPPC:βιγκρ 75:25	87

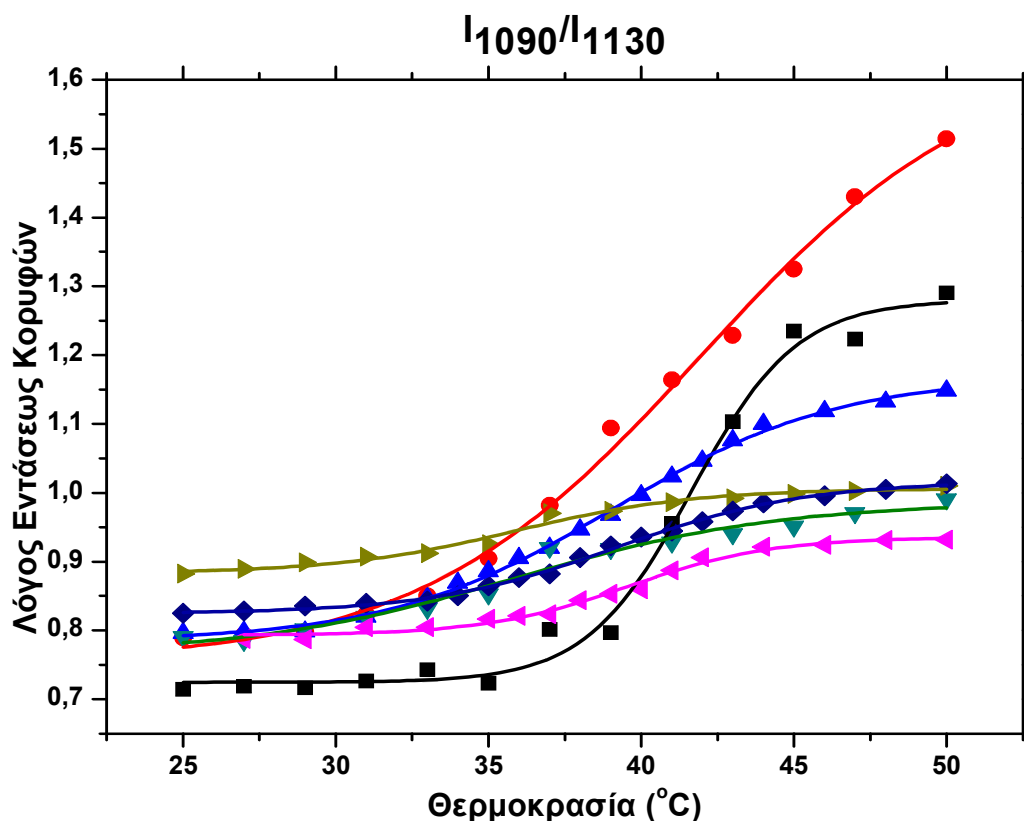
Από τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα γίνεται κατανοητό ότι αύξηση της μοριακής αναλογίας της βιμπλαστίνης στις λιπιδικές διπλοστιβάδες επιφέρει αύξηση του μεγέθους συνέργατικότητας αυτών, ενώ αντίθετα αύξηση της μοριακής αναλογίας της βιγκριστίνης επιφέρει μείωση αυτής. Λόγω της συμπεριφοράς αυτής των εξεταζόμενων χαρακτηριστικών, εξηγείται η αναγκαιότητα της χρήσης του αποσυγκερασμού κορυφών, όταν το θερμογράφημα παρουσιάζει πολύπλοκη μορφή. Έτσι με αυτόν τον τρόπο, αποδεικνύεται η δημιουργία διαφορετικών τμημάτων (domains) των λιπιδικών διπλοστιβάδων με διαφορετικές ποσότητες φαρμάκου ενσωματωμένες σε αυτές, αφού αυτά τα τμήματα παρουσιάζουν διαφορετικές θερμοκρασίες μεταβολής φάσης και διαφορετικά χαρακτηριστικά.

5.2. Αποτελέσματα φασματοσκοπίας Raman για τα συστήματα DPPC:φάρμακο στις διάφορες αναλογίες

Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της φασματοσκοπίας Raman των δειγμάτων που εξετάστηκαν, χρησιμοποιούνται τρεις (3) διαφορετικές

παράμετροι: α) ο λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} , β) ο λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} και γ) ο λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2935}/I_{2880} . Οι παραπάνω παράμετροι οδηγούν σε πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται μεταξύ των λιπιδικών διπλοστιβάδων και των φαρμακευτικών μορίων μετά την εισδοχή τους σε αυτές σε διάφορες μοριακές αναλογίες. Για το λόγο αυτό κάθε παράμετρος θα μελετηθεί χωριστά.

- **Λόγος εντάσεως κορυφών I_{1090}/I_{1130} :** Ο λόγος αυτός αποτελεί μέτρο της τάξης – αταξίας των αλειφατικών αλυσίδων του λιπιδίου καθώς επίσης αποτελεί μέτρο της αναλογίας μεταξύ *trans* και *gauche* διαμορφωμένων των αλυσίδων. Αύξηση της τιμής του λόγου αυτού, σημαίνει αύξηση της αταξίας των αλυσίδων και αύξηση των *gauche* διαμορφώσεων. Στο σχήμα 5.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του λόγου αυτού για τα εξεταζόμενα δείγματα. Γενικά, παρατηρούμε ότι σε όλα τα δείγματα η εισδοχή των φαρμάκων στις λιπιδικές διπλοστιβάδες, προκαλεί αύξηση της τιμής του λόγου αυτού, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα της αύξησης της αταξίας και του αριθμού των *gauche* διαμορφώσεων των αλυσίδων. Με τη σειρά της η παρατήρηση αυτή πιστοποιεί τη ρευστότερη κατάσταση γέλης που δημιουργείται από την εισδοχή των φαρμάκων σε σχέση με αυτήν των λιπιδικών διπλοστιβάδων πριν την εισδοχή.

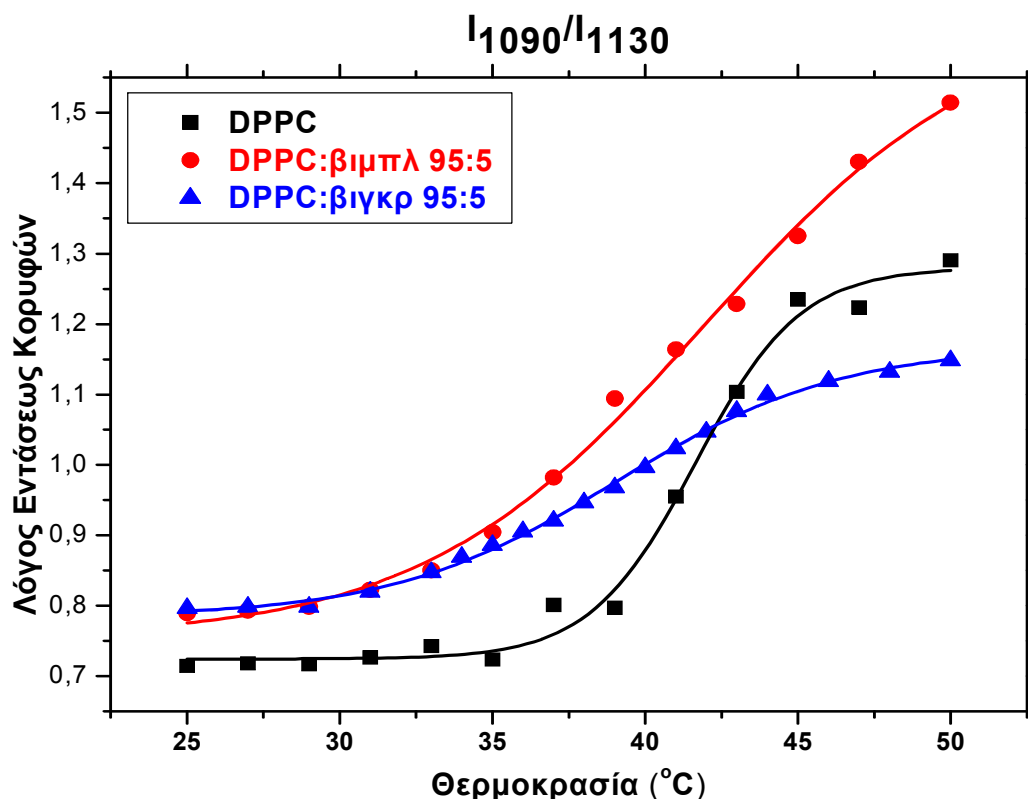


Σχήμα 5.2: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} των συστημάτων διπλοστιβάδα:φάρμακο σε διάφορες μοριακές αναλογίες. Α) DPPC (μαύρο), Β) DPPC:βιμπλαστίνη 95:5 (κόκκινο), Γ) DPPC:βιγκριστίνη 95:5 (ροζ), Δ) DPPC:βιμπλαστίνη 83:17 (γαλάζιο), Ε) DPPC:βιγκριστίνη 83:17 (καφέ), ΣΤ) DPPC:βιμπλαστίνη 75:25 (πράσινο), Ζ) DPPC:βιγκριστίνη 75:25 (μπλε).

Αντίθετα, σε όλα τα δείγματα εκτός του δείγματος DPPC:βιμπλαστίνη 95:5, παρατηρείται μείωση του λόγου αυτού μετά την κύρια μεταβολή φάσης, γεγονός που συνεπάγεται μεγαλύτερη οργάνωση της υγρής κρυσταλλικής κατάστασης των λιπιδικών διπλοστιβάδων. Αυτό συμβαίνει διότι ο αριθμός των διαμορφωμένων με δομή *trans* είναι αυξημένος, λόγω του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης των απέναντι αλειφατικών αλυσίδων.

Συγκρίνοντας απ'ευθείας την μοριακή αναλογία 95:5 της βιμπλαστίνης και της βιγκριστίνης φαίνεται ότι η δράση τους είναι διαφορετική μετά την κύρια αλλαγή φάσης. Στην περίπτωση της βιμπλαστίνης, έχουμε αυξημένη τιμή του λόγου I_{1090}/I_{1130} στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση γεγονός που επιβεβαιώνει την είσοδό της προς το υδρόφοβο τμήμα της

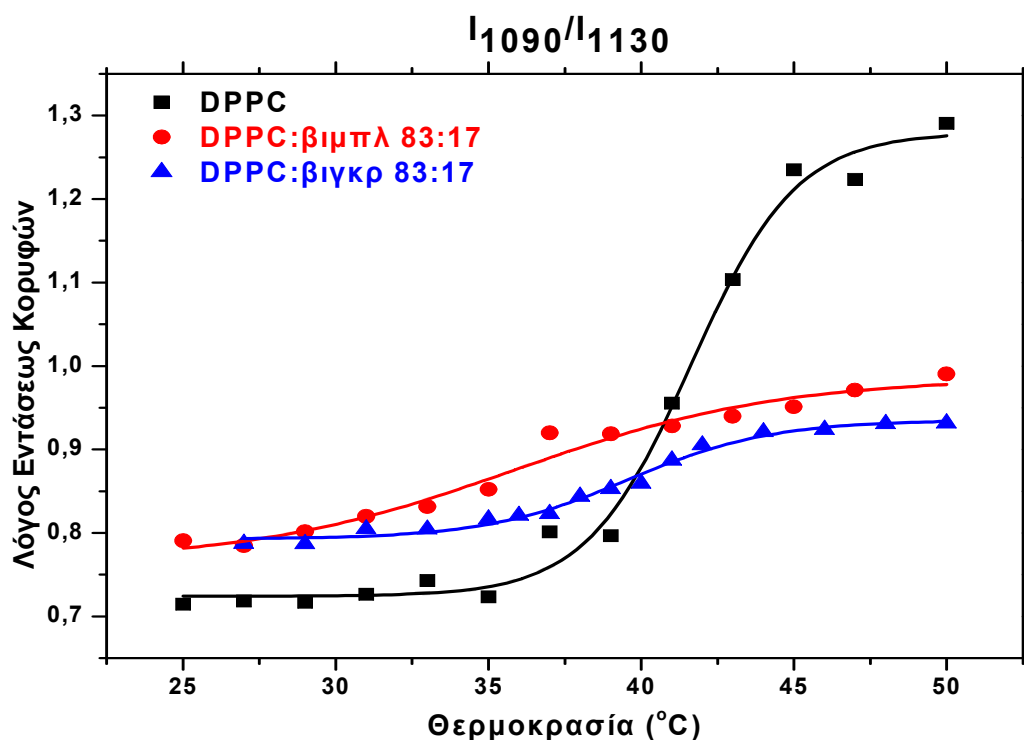
διπλοστιβάδας ακόμα και σε αυτή τη μικρή μοριακή αναλογία. Αντίθετα, η βιγκριστίνη δείχνει να προτιμά την περιοχή της μεσεπιφάνειας προκαλώντας καλύτερη οργάνωση της υγρής κρυσταλλικής κατάστασης (Σχήμα 5.3).



Σχήμα 5.3: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} για το σύστημα DPPC:φάρμακο 95:5.

Εξετάζοντας τη μοριακή αναλογία 83:17, παρατηρείται ότι η βιμπλαστίνη και η βιγκριστίνη έχουν πανομοιότυπη συμπεριφορά. Προκαλούν ρευστοποίηση της κατάστασης πηκτώματος πριν την κύρια αλλαγή φάσης και οργάνωση της υγρής κρυσταλλικής κατάστασης μετά από αυτήν. Αυτό οφείλεται στην εμφάνιση του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης αφού σε σύγκριση με άλλα φαρμακευτικά μόρια που δεν παρουσιάζουν το φαινόμενο αυτό, η τιμή του λόγου αυτού συνεχώς αυξάνει. Επίσης, παρατηρείται ότι η βιμπλαστίνη ενσωματώνεται περισσότερο ή/και ισχυρότερα στις λιπιδικές

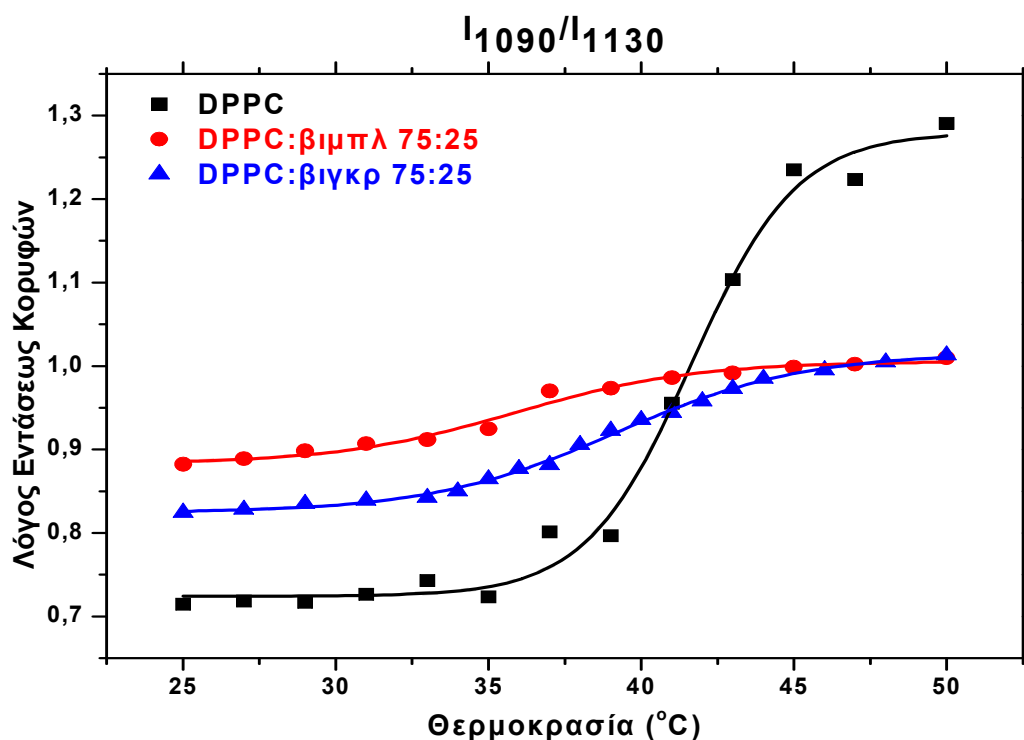
διπλοστιβάδες, αφού δείχνει ισχυρότερη αλληλεπίδραση με τις αλειφατικές αλυσίδες σε σύγκριση με το μόριο της βιγκριστίνης (Σχήμα 5.4). Οι παραπάνω παρατηρήσεις έρχονται σε πλήρη συμφωνία με τα αντίστοιχα αποτελέσματα της θερμικής ανάλυσης, τα οποία δείχνουν μεγαλύτερη συνεργασιμότητα στην περίπτωση της βιμπλαστίνης.



Σχήμα 5.4: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} για το σύστημα DPPC:φάρμακο 83:17.

Ομοίως, για την μοριακή αναλογία 75:25, παρατηρείται μεγαλύτερη αλληλεπίδραση της βιμπλαστίνης με τις αλκυλικές αλυσίδες των διπλοστιβάδων στην κατάσταση γέλης λόγω περαιτέρω ρευστοποίησής της ενώ στην υγρή κρυσταλλική φάση η δράση τους είναι περιμενερής (Σχήμα 5.5).

Συμπερασματικά, η παραπάνω ανάλυση έρχεται να επιβεβαιώσει τα αποτελέσματα της θερμικής ανάλυσης, αφού ο λόγος I_{1090}/I_{1130} αποδεικνύει την εμφάνιση της αλληλοεισχώρησης των λιπιδικών αλυσίδων της διπλοστιβάδας μετά την κύρια αλλαγή φάσης, τη δημιουργία ρευστότερων καταστάσεων γέλης για όλα τα δείγματα, τη μείωση των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων και τη μεγαλύτερη οργάνωση των συστημάτων αυτών στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση.

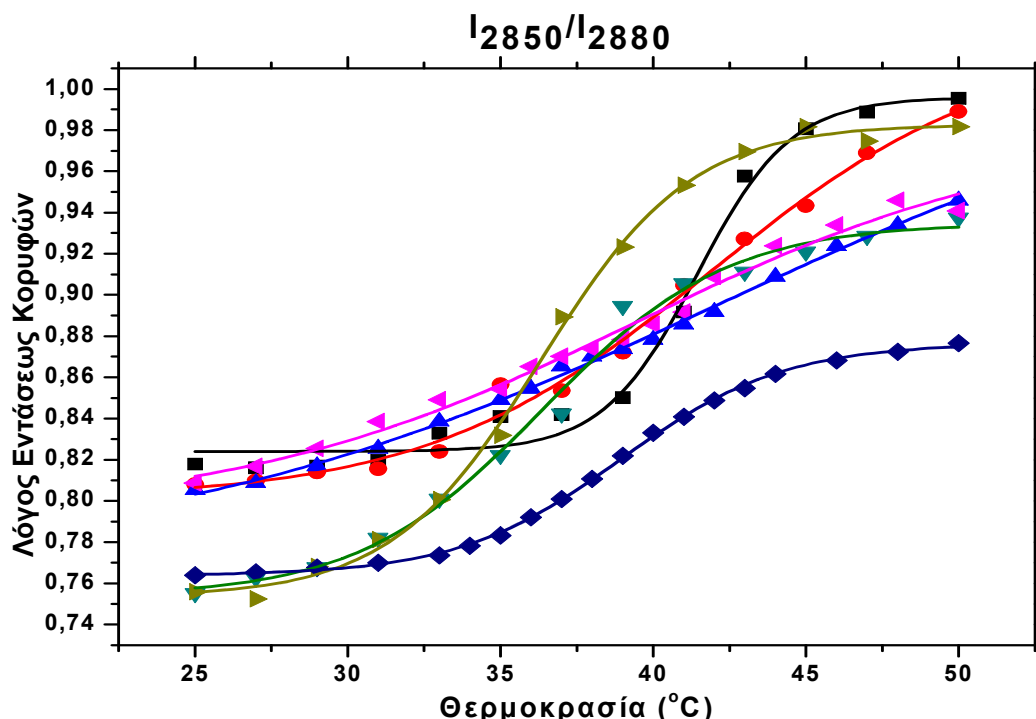


Σχήμα 5.5: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} για το σύστημα DPPC:φάρμακο 75:25.

- **Λόγος εντάσεως κορυφών I_{2850}/I_{2880} :** Ο λόγος εντάσεως κορυφών αυτός δίνει πληροφορίες για τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλειφατικών αλυσίδων είτε αυτές είναι του ίδιου μορίου λιπιδίου (*sn*-1 και *sn*-2) είτε αυτές είναι των απέναντι μορίων λιπιδίου. Μείωση της τιμής του λόγου αυτού δεικνύει αύξηση των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων των αλυσίδων. Από το σχήμα 5.6 γίνεται αντιληπτό ότι η εισδοχή των φαρμάκων βιμπλαστίνης και βιγκριστίνης σε όλες τις μοριακές αναλογίες επιφέρουν μείωση της τιμής του λόγου αυτού στην κατάσταση γέλης, γεγονός που αποκαλύπτει αύξηση των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων. Επίσης, μετά την κύρια αλλαγή φάσης, η τιμή του λόγου εμφανίζεται μικρότερη σε σύγκριση με αυτήν των διπλοστιβάδων της DPPC πριν την είσοδο των μορίων, γεγονός που αναδεικνύει αυξημένες αλληλεπιδράσεις λόγω του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης.

Από το σχήμα 5.7, παρατηρείται πως στην κατάσταση γέλης τόσο η βιμπλαστίνη όσο και η βιγκριστίνη δεικνύουν την ίδια συμπεριφορά,

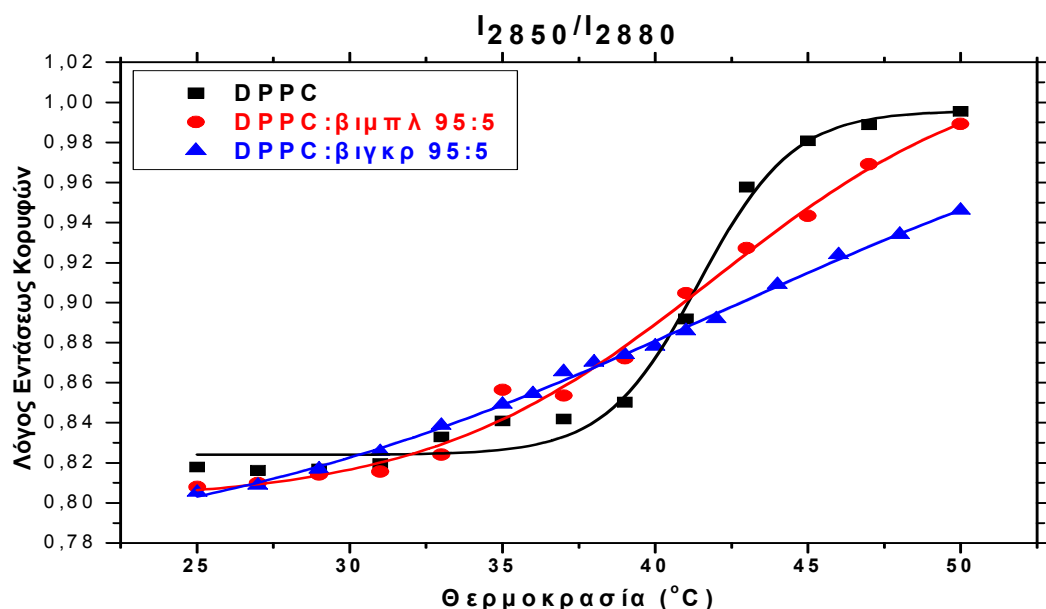
αυξάνοντας τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, αφού στην μοριακή αναλογία 95:5 παρουσιάζουν αυξημένη αλληλεπίδραση με την πολική κεφαλή της χολίνης στην μεσεπιφάνεια. Το ίδιο συμβαίνει και μετά την κύρια μεταβολή φάσης, όμως στην περίπτωση της βιμπλαστίνης αυτές εξασθενούν, αφού αυτή καταλαμβάνει χώρο ανάμεσα στις γειτονικές αλυσίδες με αποτέλεσμα να αυξάνει την μεταξύ τους απόσταση και να μειώνονται οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις.



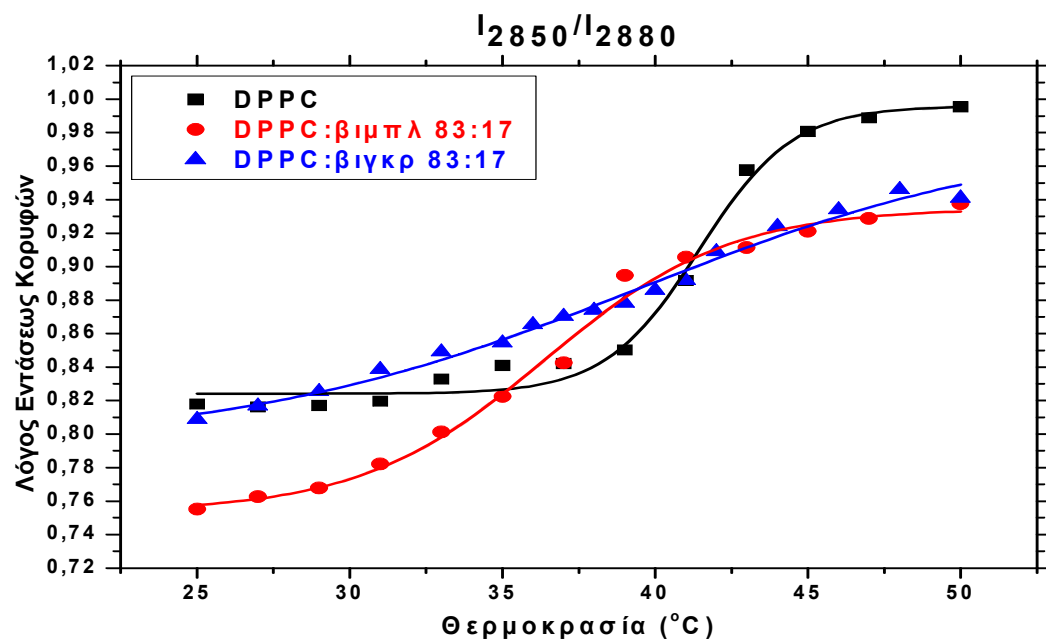
Σχήμα 5.6: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} των συστημάτων διπλοστιβάδα:φάρμακο σε διάφορες μοριακές αναλογίες. Α) DPPC (μαύρο), Β) DPPC:βιμπλαστίνη 95:5 (κόκκινο), Γ) DPPC:βιγκριστίνη 95:5 (ροζ), Δ) DPPC:βιμπλαστίνη 83:17 (γαλάζιο), Ε) DPPC:βιγκριστίνη 83:17 (καφέ), ΣΤ) DPPC:βιμπλαστίνη 75:25 (πράσινο), Ζ) DPPC:βιγκριστίνη 75:25 (μπλε).

Στην μοριακή αναλογία 83:17 (σχήμα 5.8), παρατηρείται μια εμφανής διαφορά στο φασματικό αποτύπωμα των δύο ουσιών. Από τη μια, στην περίπτωση της κατάστασης γέλης, η βιμπλαστίνη προκαλεί μεγαλύτερη αύξηση των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων λόγω ισχυρότερου φαινομένου αλληλοεισχώρησης των απέναντι αλυσίδων. Από την άλλη, στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση η συμπεριφορά τους ομοιάζει λόγω

της αυξημένης ενσωμάτωσης της βιμπλαστίνης προς το λιπιδικό πυρήνα των διπλοστιβάδων με αποτέλεσμα την απομάκρυνση των γειτονικών αλυσίδων. Η ερμηνεία αυτή είναι συμβατή με το αποτέλεσμα της θερμικής ανάλυσης, όπου η μεταβολή της ενθαλπίας αλλαγής φάσης είναι μεγαλύτερη για το σύστημα DPPC:βιμπλαστίνη 83:17.

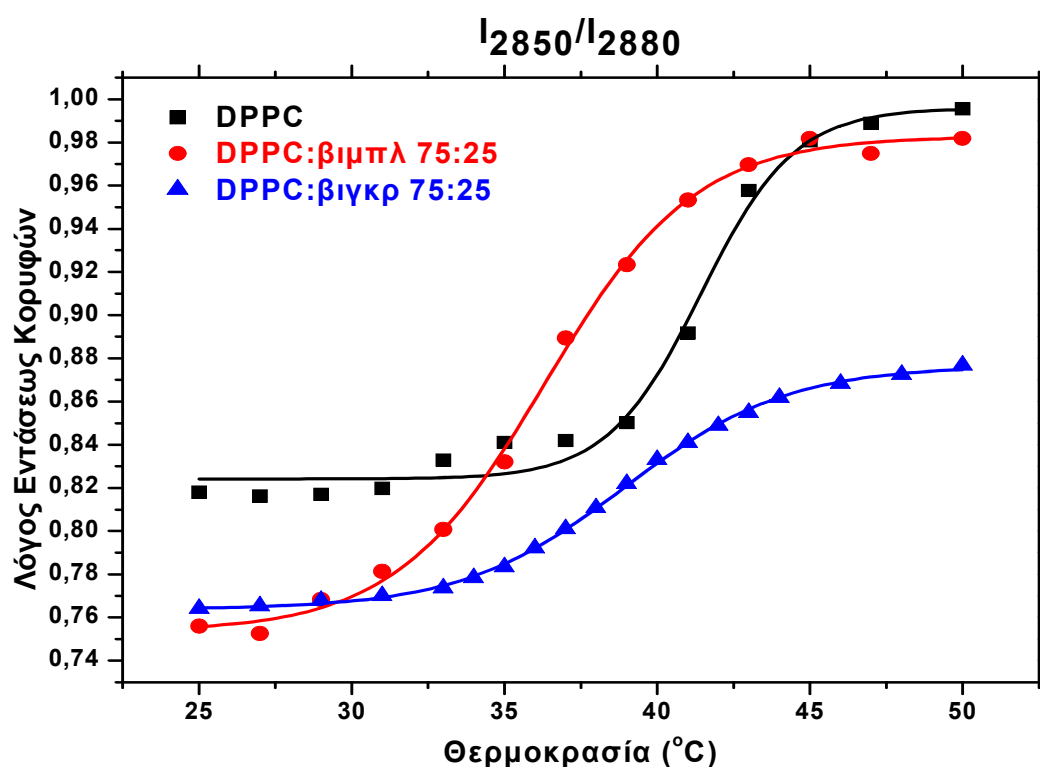


Σχήμα 5.7: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} για το σύστημα DPPC:φάρμακο 95:5.



Σχήμα 5.8: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} για το σύστημα DPPC:φάρμακο 83:17.

Εξετάζοντας τα αποτελέσματα για τη μοριακή αναλογία 75:25, προκύπτει ότι στην κατάσταση γέλης η εισδοχή των δύο ουσιών προκαλεί παρεμφερή αποτελέσματα (σχήμα 5.9). Μετά την κύρια μεταβολή φάσης, στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση, στην περίπτωση της βιμπλαστίνης παρατηρείται μεγαλύτερη μείωση των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων λόγω της αύξησης της τιμής του λόγου αυτού, ως αποτέλεσμα της μεγαλύτερης ενσωμάτωσης της ποσότητας του μορίου στις λιπιδικές διπλοστιβάδες και μιας πλευρικής διάχυσης του μορίου από την πολική κεφαλή της χολίνης και την περιοχή της μεσεπιφάνειας προς τον λιπόφιλο πυρήνα αυτών.

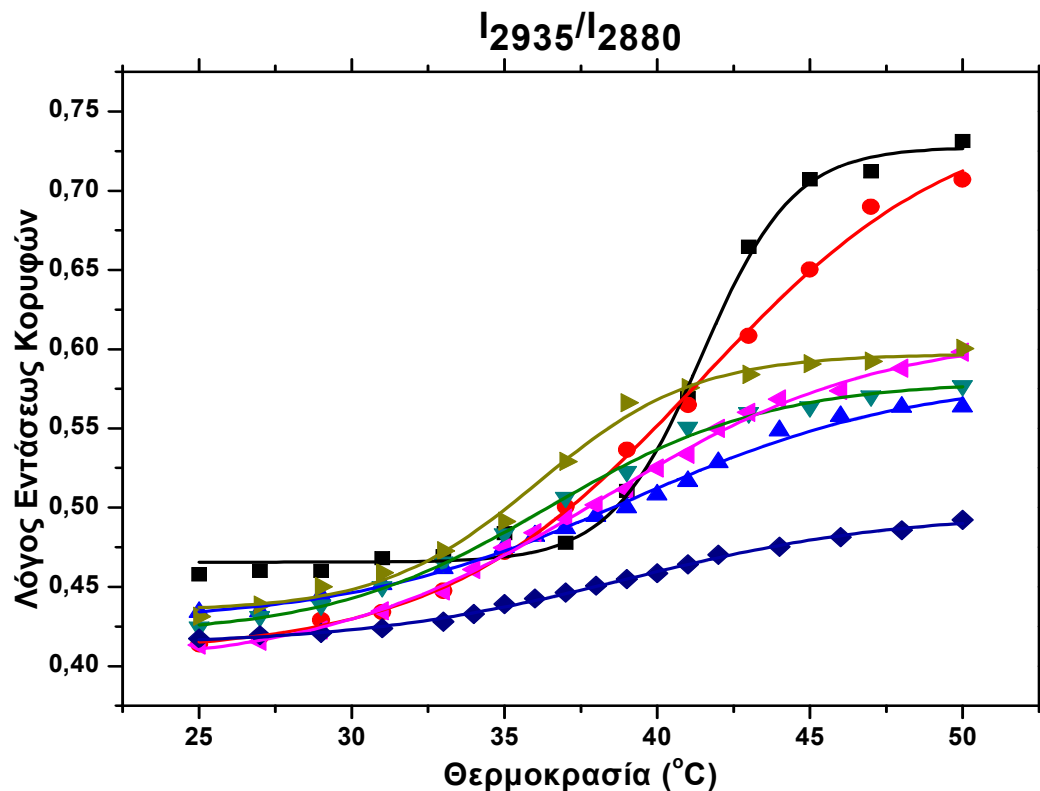


Σχήμα 5.9: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} για το σύστημα DPPC:φάρμακο 75:25.

Συμπερασματικά, ο λόγος αυτός αποκαλύπτει τις ισχυρότερες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις που προκαλεί η ενσωμάτωση της βιμπλαστίνης και της βιγκριστίνης στις λιπιδικές διπλοστιβάδες λόγω της αλληλοεισδοχής των απέναντι αλυσίδων των λιπιδίων, αλλά και τη

μεγαλύτερη ενσωμάτωση της βιμπλαστίνης σε αυτές λόγω της εντονότερης διαταραχής των γειτονικών αλυσίδων, αποτελέσματα τα οποία συμβαδίζουν με αυτά της θερμικής ανάλυσης αλλά και με τις παρατηρήσεις του λόγου εντάσεως κορυφών I_{1090}/I_{1130} .

- **Λόγος εντάσεως κορυφών I_{2935}/I_{2880} :** Ο μελετούμενος λόγος αυτός αντανακλά αθροιστικά τις ενδομοριακές και διαμοριακές αλληλεπιδράσεις ταυτόχρονα. Μειωμένη τιμή του λόγου αυτού αποκαλύπτει ισχυρές αλληλεπιδράσεις ενώ αντίθετα, αύξηση της τιμής του αντιστοιχεί σε μείωση της ισχύος των αλληλεπιδράσεων αυτών.



Σχήμα 5.10: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2935}/I_{2880} των συστημάτων διπλοστιβάδα:φάρμακο σε διάφορες μοριακές αναλογίες. Α) DPPC (μαύρο), Β) DPPC:βιμπλαστίνη 95:5 (κόκκινο), Γ) DPPC:βιγκριστίνη 95:5 (ροζ), Δ) DPPC:βιμπλαστίνη 83:17 (γαλάζιο), Ε) DPPC:βιγκριστίνη 83:17 (καφέ), ΣΤ) DPPC:βιμπλαστίνη 75:25 (πράσινο), Ζ) DPPC:βιγκριστίνη 75:25 (μπλε).

Από το σχήμα 5.10, παρατηρείται αύξηση των αλληλεπιδράσεων στην κατάσταση γέλης και μείωση αυτών στην υγρή κρυσταλλική φάση για όλες τις μοριακές αναλογίες. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι η συμπεριφορά του λόγου αυτού καθορίζεται από το είδος και την ισχύ των αλληλεπιδράσεων οι οποίες επικρατούν στα δείγματα. Από τη μια, οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις παρουσιάζονται ασθενέστερες (I_{1090}/I_{1130}) ενώ από την άλλη οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις ισχυρότερες (I_{2850}/I_{2880}), στην κατάσταση γέλης. Το θερμοκρασιακό προφίλ του λόγου I_{2935}/I_{2880} ακολουθεί αυτό του λόγου I_{2850}/I_{2880} , παρατήρηση που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις είναι αυτές που επικρατούν.

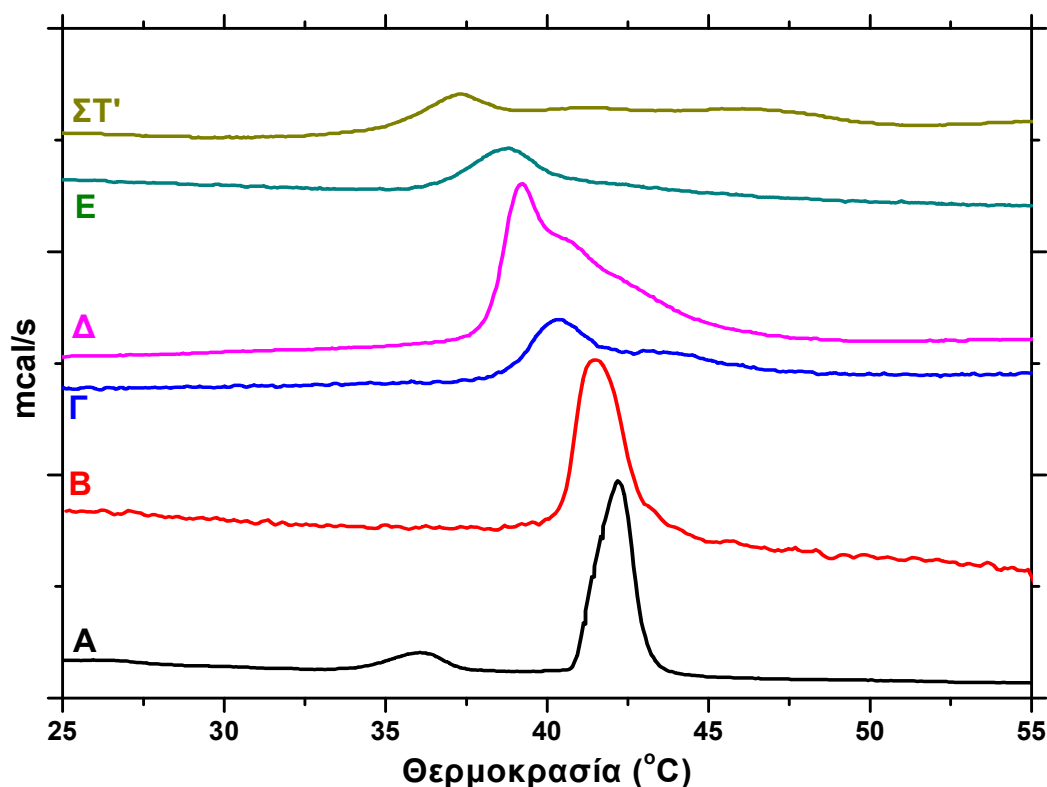
Συνοπτικά τα αποτελέσματα της εξέτασης των λόγων εντάσεως κορυφών Raman είναι τα ακόλουθα:

- ✓ Πιστοποίηση της έκφρασης του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης των απέναντι λιπιδικών αλυσίδων.
- ✓ Εξασθένιση των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων.
- ✓ Ρευστοποίηση των καταστάσεων γέλης.
- ✓ Ισχυροποίηση των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων.
- ✓ Οργάνωση των υγρών κρυσταλλικών καταστάσεων.
- ✓ Καλύτερη (πιο ομοιογενής) ενσωμάτωση της βιμπλαστίνης σε σύγκριση με αυτήν της βιγκριστίνης.
- ✓ Διαφοροποίηση στον τρόπο δράσης των φαρμάκων αυτών στις λιπιδικές διπλοστιβάδες, παρά το γεγονός ότι πρόκειται για παρεμφερή μόρια από χημική και δομική άποψη.

5.3. Αποτελέσματα Θερμικής Ανάλυσης (DSC) για τα συστήματα DPPC:χοληστερόλη:φάρμακο στις διάφορες αναλογίες.

Στο σχήμα 5.11 παρουσιάζονται τα θερμογράφημα τα οποία παρατηρήθηκαν για τα δείγματα DPPC:χοληστερόλη και DPPC:χοληστερόλη:φάρμακο στις διάφορες μοριακές αναλογίες. Από την υφή των θερμογραφημάτων γίνεται κατανοητή η διαφορά που παρουσιάζουν στη

δράση τους η βιμπλασίνη και η βιγκριστίνη παρουσία της χοληστερόλης στις λιπιδικές διπλοστιβάδες. Στον πίνακα 5.2 συνοψίζονται τα αποτελέσματα των δειγμάτων για την παράμετρο C.U.



Σχήμα 5.11: Θερμογραφήματα των συστημάτων διπλοστιβάδα:χοληστερόλη:φάρμακο σε διάφορες μοριακές αναλογίες. A) DPPC (μαύρο), B) DPPC:χοληστερόλη 90:10 (κόκκινο), Γ) DPPC:χοληστερόλη:βιμπλασίνη 73:10:17 (γαλάζιο), Δ) DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17 (ροζ), E) DPPC:χοληστερόλη:βιμπλασίνη 65:10:25 (πράσινο) και ΣΤ') DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25 (καφέ).

Η προσθήκη της χοληστερόλης στις λιπιδικές διπλοστιβάδες, επιφέρει εξαφάνιση της προμετάβασης φάσης, πιστοποιώντας την αναμενόμενη αλληλεπίδραση της χοληστερόλης με την πολική κεφαλή της χολίνης στην περιοχή της μεσεπιφάνειας. Επίσης, από θερμοκρασιακή άποψη, προκαλεί μείωση της θερμοκρασίας κύριας μεταβολής φάσης κατά 0.7 °C ενώ από ενεργειακή άποψη μειώνει την απαιτούμενη διαφορά ενθαλπίας κατά 32%. Τέλος, αυξάνει τη συνεργατικότητα γεγονός που οφείλεται στον παράλληλο

προσανατολισμό ως προς τα μόρια των λιπιδίων που λαμβάνει η χοληστερόλη.

Πίνακας 5.2: Αποτελέσματα C.U. για τα εξεταζόμενα δείγματα βιγκριστίνης.

Δείγμα	C.U.
DPPC	384
DPPC:χολ	420
DPPC:χολ:βιμπλ 73:10:17	290
DPPC:χολ:βιμπλ 65:10:25	187
DPPC:χολ:βιγκρ 73:10:17	350
DPPC:χολ:βιγκρ 65:10:25	323

Στη μοριακή αναλογία DPPC:χοληστερόλη:φάρμακο 73:10:17, παρατηρούνται ομοιότητες και διακριτές διαφορές στη δράση των δύο φαρμακευτικών μορίων. Τόσο στην περίπτωση της βιμπλαστίνης, όσο και στην περίπτωση της βιγκριστίνης, η κορυφή της κύριας μεταβολής φάσης αποτελείται από επιμέρους κορυφές οι οποίες αντιστοιχούν σε διαφορετικά τμήματα λιπιδικών διπλοστιβάδων τα οποία έχουν δημιουργηθεί. Και στις δύο περιπτώσεις, από τα αποτελέσματα του αποσυγκερασμού κορυφών που έχουν αναλυθεί στα προηγούμενα κεφάλαια, δημιουργούνται τα “raft” τα οποία περιέχουν την ποσότητα της χοληστερόλης αλλά και τη μεγαλύτερη ποσότητα φαρμάκου καθώς επίσης και διάφορα “domains” τα οποία περιέχουν την υπολειπόμενη ποσότητα φαρμάκου.

Η διαφορά στη δράση των δύο φαρμάκων έγκειται στο ότι η βιγκριστίνη παρουσία της χοληστερόλης ενσωματώνεται καλύτερα στις λιπιδικές

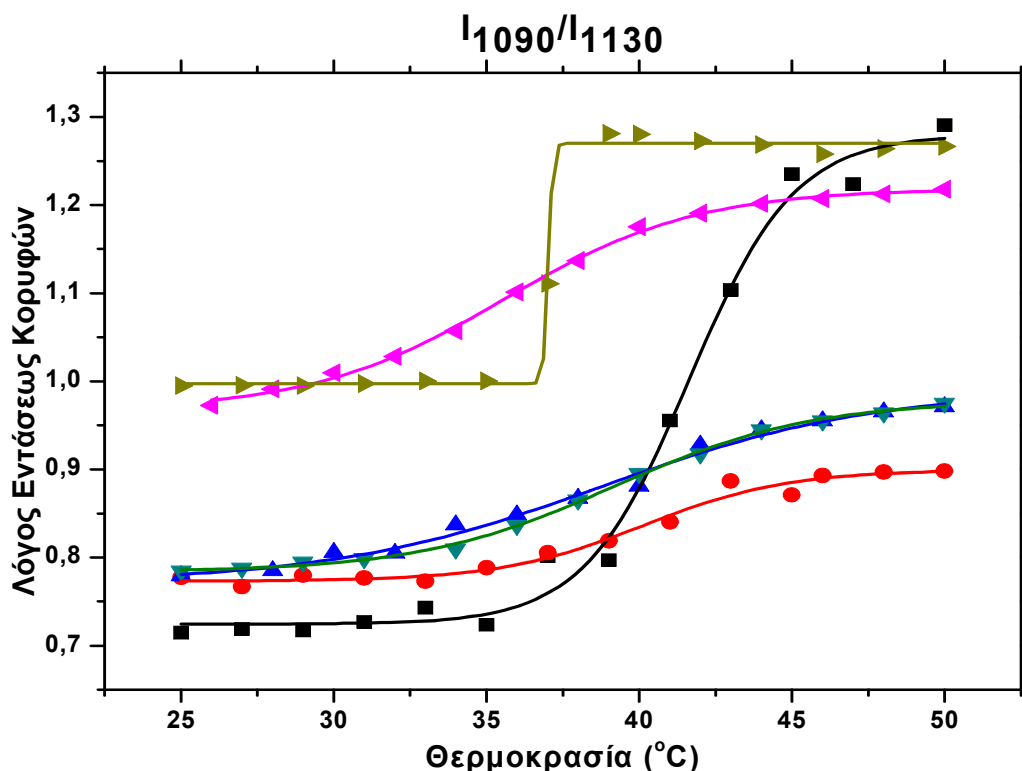
διπλοστιβάδες σε σχέση με τη βιμπλαστίνη στη μοριακή αναλογία αυτή, παρατήρηση αντίθετη από αυτήν των ίδιων δειγμάτων χωρίς την προσθήκη της χοληστερόλης. Η προσθήκη της βιγκριστίνης μειώνει τη θερμοκρασία κύριας μεταβολής φάσης κατά 2.4 °C ενώ αυτή της βιμπλαστίνης κατά 1.4 °C. Το μέγεθος της συνεργατικότητας στην περίπτωση DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη είναι 350, αρκετά μεγαλύτερο από τον αριθμό 290 του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη στην ίδια μοριακή αναλογία. Με βάση τα παραπάνω γίνεται κατανοητή η μεγαλύτερη ενσωμάτωση της βιγκριστίνης στο σύστημα DPPC:χοληστερόλη σε σχέση με αυτήν της βιμπλαστίνης.

Εξετάζοντας το σύστημα DPPC:χοληστερόλη:φάρμακο στην μοριακή αναλογία 65:10:25, δεν παρατηρούνται αξιοσημείωτες μεταβολές. Η αύξηση της ποσότητας των δυο φαρμάκων ελαττώνει τη θερμοκρασία κύριας μεταβολής φάσης κατά 1.5 – 2 °C, όπως επίσης μειώνονται οι ενθαλπικές απαιτήσεις αυτής. Το μέγεθος ελαττώνεται από 350 σε 323 για την περίπτωση της βιγκριστίνης και από 290 σε 187 για την περίπτωση της βιμπλαστίνης. Όμως η κορυφή της μεταβολής φάσης του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25, μετά τον αποσυγκερασμό της αποκαλύπτει τρεις διαφορετικές κορυφές. Αυτό σημαίνει, ότι υπάρχει δημιουργία τριών διαφορετικών τμημάτων στις λιπιδικές διπλοστιβάδες. Αυτό εξηγείται ως εξής: το “raft” της χοληστερόλης κορέννεται σε μικρότερη μοριακή αναλογία από τη χρησιμοποιούμενη, με αποτέλεσμα η υπολειπόμενη ποσότητα φαρμάκου να δημιουργεί διαφορετικά “domains”.

5.4. Αποτελέσματα φασματοσκοπίας Raman στις διάφορες αναλογίες για τα συστήματα DPPC:χοληστερόλη:φάρμακο.

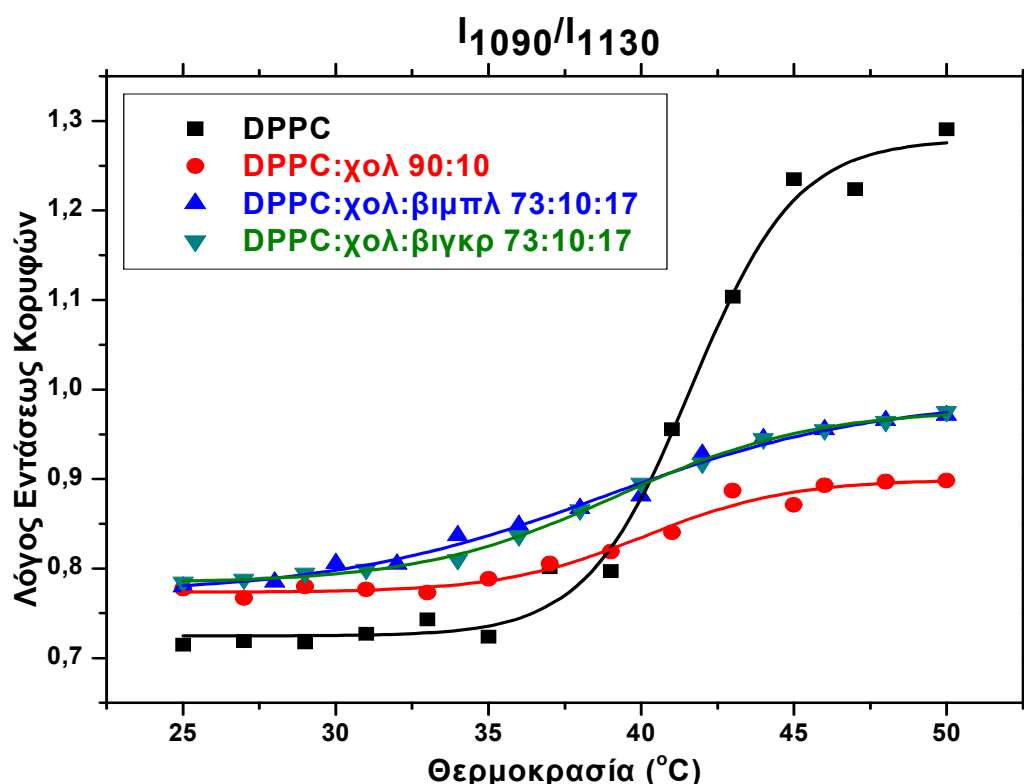
Όπως και στην περίπτωση των συστημάτων DPPC:φάρμακο, έτσι και εδώ θα χρησιμοποιηθούν οι λόγοι εντάσεως κορυφών Raman για να εξηγηθούν οι δομικές αλλαγές που υφίστανται οι λιπιδικές διπλοστιβάδες από την ταυτόχρονη εισδοχή χοληστερόλης και φαρμακευτικού μορίου.

- **Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} :** Στο σχήμα 5.12 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του λόγου αυτού για τα εξεταζόμενα συστήματα. Από αυτό φαίνεται πως η προσθήκη της χοληστερόλης ρευστοποιεί την κατάσταση γέλης αυξάνοντας την αναλογία των *gauche* διαμορφώσεων των λιπιδικών αλυσίδων, ενώ αντίθετα προκαλεί περαιτέρω οργάνωση της υγρής κρυσταλλικής φάσης μέσω της αύξησης των διαμορφώσεων *trans*. Η συμπεριφορά αυτή οφείλεται στον προσανατολισμό που λαμβάνει η χοληστερόλη μέσα στις λιπιδικές μεμβράνες.



Σχήμα 5.12: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} των συστημάτων διπλοστιβάδα:χοληστερόλη:φάρμακο σε διάφορες μοριακές αναλογίες. Α) DPPC (μαύρο), Β) DPPC:χοληστερόλη 90:10 (κόκκινο), Γ) DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17 (γαλάζιο), Δ) DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17 (πράσινο), Ε) DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 65:10:25 (ροζ) και ΣΤ') DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25 (καφέ).

Εξετάζοντας τα συστήματα DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17 και DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη στην ίδια μοριακή αναλογία, παρατηρείται πως έχουν ίδιο θερμοκρασιακό προφίλ (σχήμα 5.13). Από τη μια, η είσοδος της χοληστερόλης στα δείγματα αποτρέπει τη δημιουργία του φαινομένου της αλληλοεισχώρησης των απέναντι αλυσίδων των λιπιδίων, και από την άλλη η ενσωμάτωση των φαρμακευτικών μορίων προκαλεί ρευστότερες καταστάσεις γέλης και υγρές κρυσταλλικές καταστάσεις. Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τόσο η βιμπλαστίνη όσο και η βιγκριστίνη προτιμούν να ενσωματώνονται στα “rafts” της χοληστερόλης, με αποτέλεσμα να δεικνύουν την ίδια συμπεριφορά.

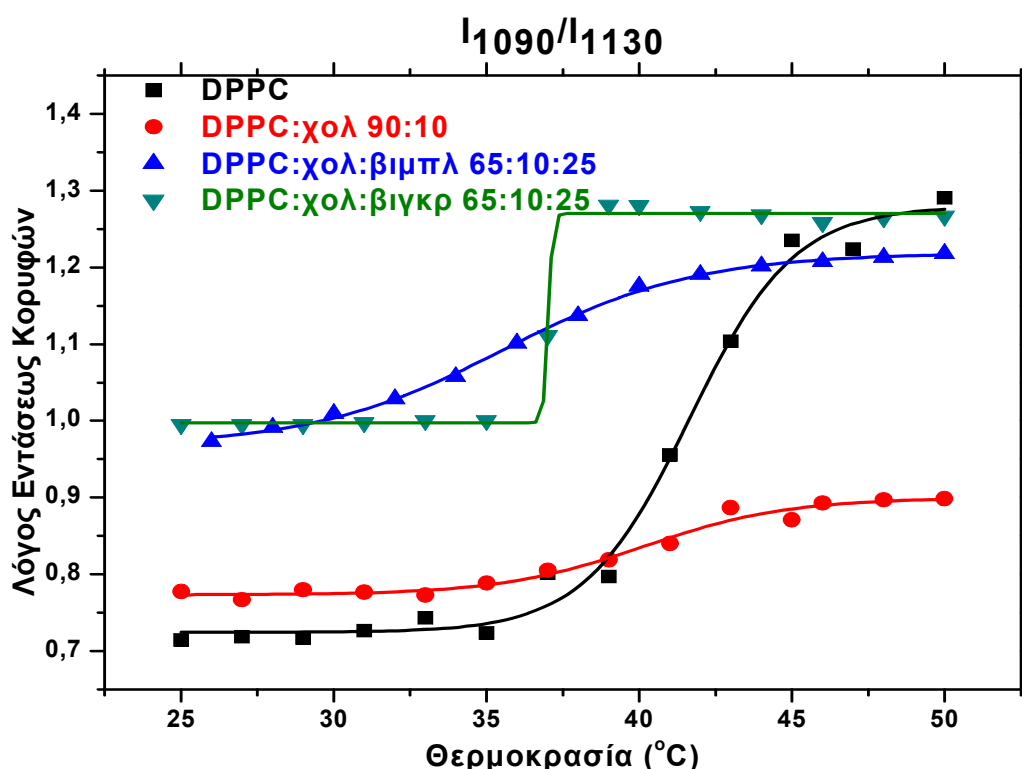


Σχήμα 5.13: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} για το σύστημα DPPC:χοληστερόλη:φάρμακο 73:10:17.

Ομοίως, αναλύοντας τα συστήματα DPPC:χοληστερόλη:φάρμακο 65:10:25 (σχήμα 5.14), παρατηρείται επίσης πως η δράση των δυο

ενώσεων είναι πανομοιότυπη και ανάλογη με αυτή που παρουσίασαν στην προηγούμενη σύστασή τους. Όμως, η σιγμοειδής καμπύλη που αντιπροσωπεύει το δείγμα DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη δείχνει την εν γένει αυξημένη ενσωμάτωση της βιγκριστίνης στις λιπιδικές διπλοστιβάδες σε σχέση με τη βιμπλαστίνη, αφού παρατηρείται αύξηση της αποδιοργάνωσης των καταστάσεων των διπλοστιβάδων.

Συμπερασματικά, στα συστήματα DPPC:χοληστερόλη:φάρμακο, παρατηρείται αύξηση των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων καθώς επίσης και ρευστοποίηση των καταστάσεων που απαντώνται οι λιπιδικές διπλοστιβάδες. Γίνεται σαφής η εισδοχή των μορίων βιμπλαστίνης και βιγκριστίνης στα τμήματα τα οποία περιέχουν χοληστερόλη, και μάλιστα μεγαλύτερη ενσωμάτωση παρουσιάζει το μόριο της βιγκριστίνης.

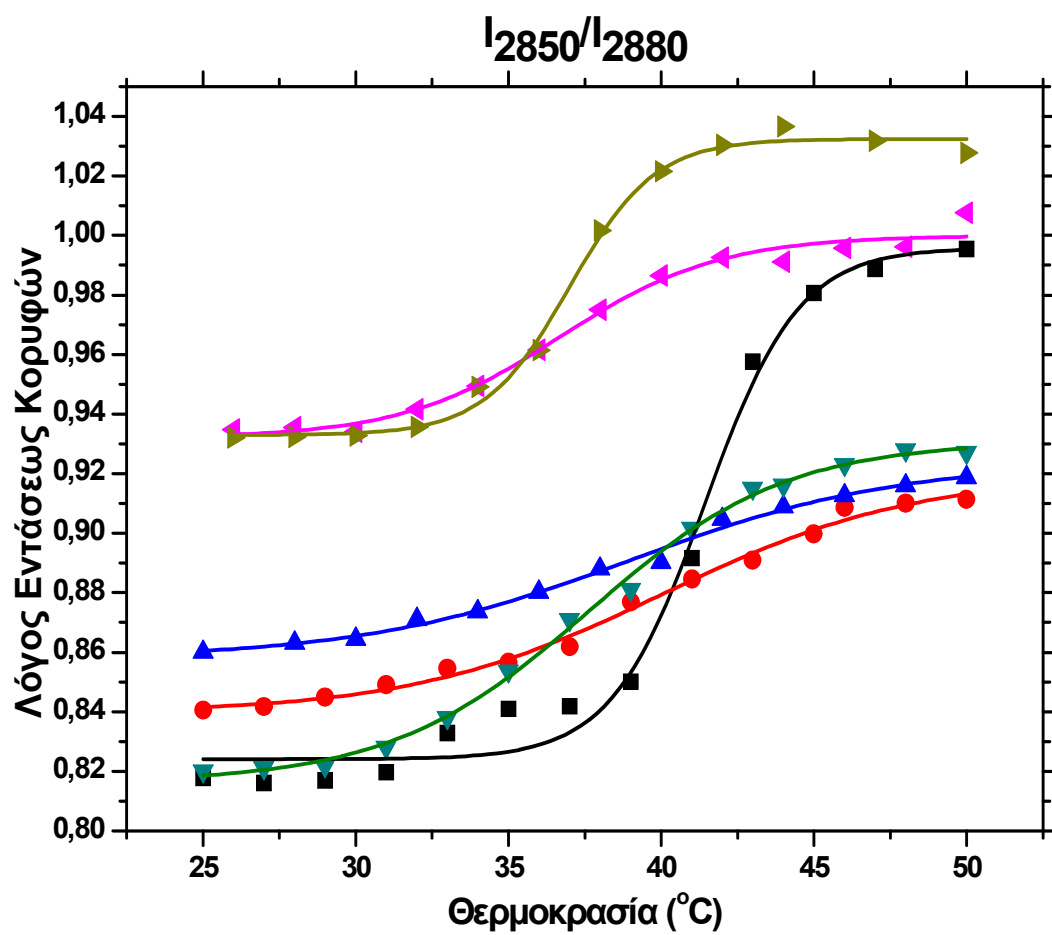


Σχήμα 5.14: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1090}/I_{1130} για το σύστημα DPPC:χοληστερόλη:φάρμακο 65:10:25.

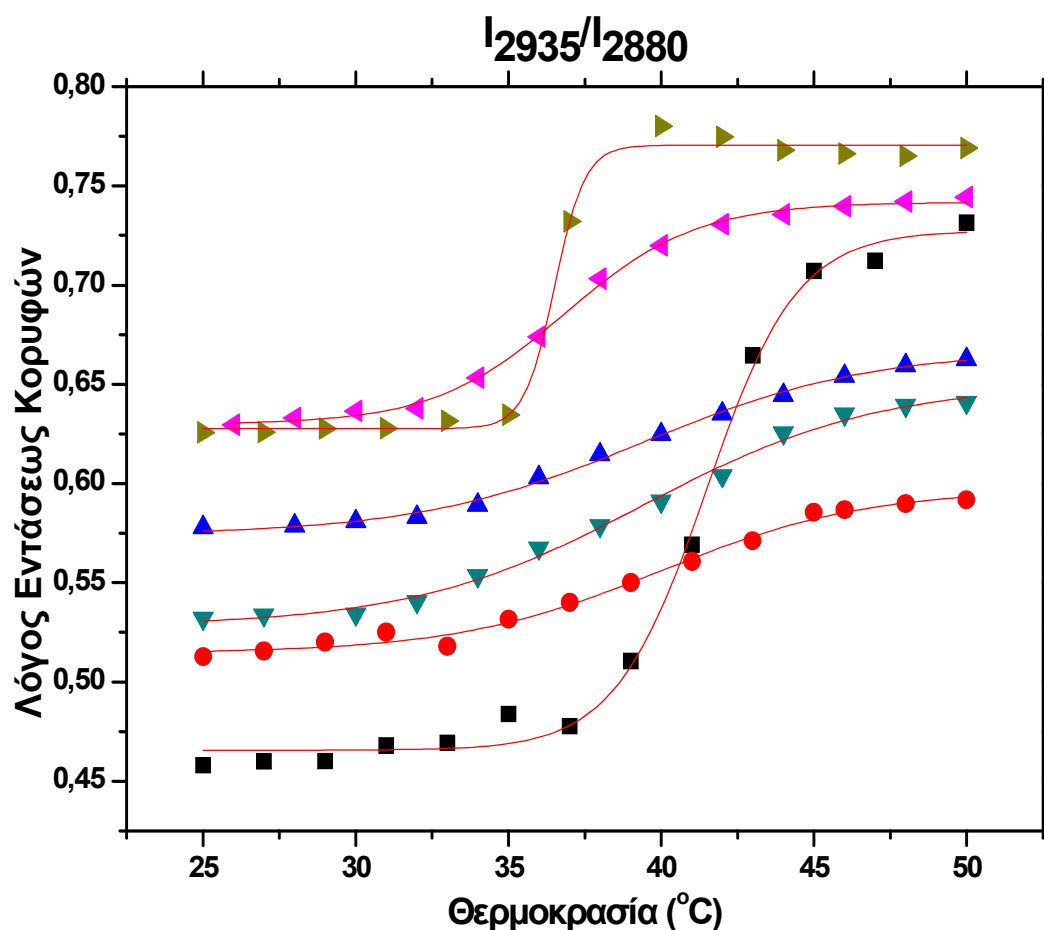
- **Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} :** Στο σχήμα 5.15 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του λόγου αυτού, για τα συστήματα τα οποία εξετάζονται. Γενικά, παρατηρείται ότι η ταυτόχρονη εισδοχή της χοληστερόλης και των φαρμακευτικών μορίων επιφέρει εξασθένιση των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, αφού δεν εκδηλώνεται αλληλοεισχώρηση των απέναντι αλειφατικών αλυσίδων.

Για τη μοριακή αναλογία 73:10:17, γίνεται σαφής η εξασθένιση των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ των αλυσίδων μέσω της αύξησης της τιμής του λόγου I_{2850}/I_{2880} μετά την εισδοχή της βιμπλαστίνης και της βιγκριστίνης, τόσο στην κατάσταση γέλης όσο και στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση. Περαιτέρω αύξηση της μοριακής αναλογίας σε 65:10:17 προκαλεί ακόμα μεγαλύτερη εξασθένιση των παρατηρούμενων αλληλεπιδράσεων. Επίσης, στην περίπτωση της βιγκριστίνης, η αύξηση της τιμής του λόγου είναι πολύ μεγαλύτερη, συμπεριφορά που επιβεβαιώνει την μεγαλύτερη ενσωμάτωσή της στα “rafts” της χοληστερόλης.

- **Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2935}/I_{2880} :** Στο σχήμα 5.16 παρουσιάζεται η θερμοκρασιακή συμπεριφορά του λόγου αυτού για τα συστήματα DPPC:χοληστερόλη και DPPC:χοληστερόλη:φάρμακο στις διάφορες αναλογίες. Είναι εμφανές, πως αύξηση τόσο της θερμοκρασίας όσο και της ποσότητας βιμπλαστίνης και βιγκριστίνης, επιφέρει αύξηση της τιμής του λόγου εντάσεως κορυφών, και άρα μείωση της ισχύος των αναπτυσσόμενων αλληλεπιδράσεων. Επειδή όμως, το θερμοκρασιακό προφίλ του μελετούμενου λόγου ακολουθεί αυτό του λόγου I_{1090}/I_{1130} , συμπεραίνεται πως στην περίπτωση των συστημάτων DPPC:χοληστερόλη:φάρμακο, οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις είναι ισχυρότερες και επικρατούν.



Σχήμα 5.15: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2850}/I_{2880} των συστημάτων διπλοστιβάδα:χοληστερόλη:φάρμακο σε διάφορες μοριακές αναλογίες. Α) DPPC (μαύρο), Β) DPPC:χοληστερόλη 90:10 (κόκκινο), Γ) DPPC:χοληστερόλη:βιμπλασίνη 73:10:17 (γαλάζιο), Δ) DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17 (πράσινο), Ε) DPPC:χοληστερόλη:βιμπλασίνη 65:10:25 (ροζ) και ΣΤ') DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25 (καφέ).



Σχήμα 5.16: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{2935}/I_{2880} των συστημάτων διπλοστιβάδα:χοληστερόλη:φάρμακο σε διάφορες μοριακές αναλογίες. Α) DPPC (μαύρο), Β) DPPC:χοληστερόλη 90:10 (κόκκινο), Γ) DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 73:10:17 (γαλάζιο), Δ) DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17 (πράσινο), Ε) DPPC:χοληστερόλη:βιμπλαστίνη 65:10:25 (ροζ) και ΣΤ') DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 65:10:25 (καφέ).

Συνοπτικά τα αποτελέσματα της εξέτασης των λόγων εντάσεως κορυφών Raman είναι τα ακόλουθα:

- ✓ Πιστοποίηση της δράσης της χοληστερόλης ως αναστολέα της αλληλοεισχώρησης των απέναντι λιπιδικών αλυσίδων.
- ✓ Εξασθένιση των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων.
- ✓ Ρευστοποίηση των καταστάσεων γέλης των συστημάτων.
- ✓ Εξασθένιση των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων.
- ✓ Ρευστοποίηση των υγρών κρυσταλλικών καταστάσεων.

- ✓ Περισσότερο ομοιογενής ενσωμάτωση της βιγκριστίνης σε σύγκριση με αυτή της βιμπλαστίνης.
- ✓ Αύξηση της ποσότητας των μορίων βιμπλαστίνης και βιγκριστίνης στις λιπιδικές διπλοστιβάδες επιφέρει γραμμική αύξηση της δράσης τους σε αυτές, λόγω της παρουσίας της χοληστερόλης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

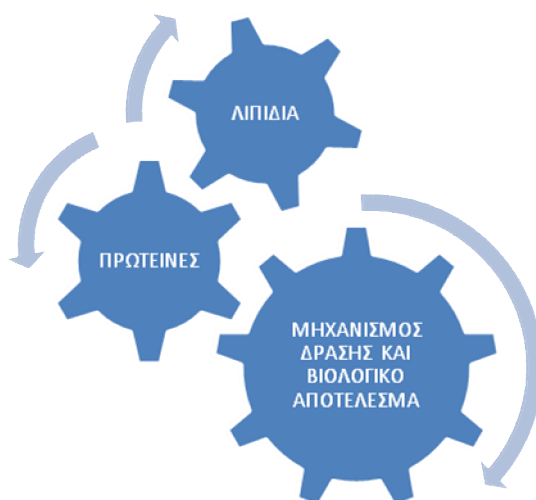
Οι βιολογικές μεμβράνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ζωής. Για το λόγο αυτό οι φυσικοχημικοί, βιολόγοι, βιοχημικοί, βιοφυσικοί όπως και φαρμακοχημικοί, φαρμακολόγοι και γιατροί διεξάγουν βασική έρευνα για να κατανοήσουν τα φαινόμενα στα οποία εμπλέκονται οι βιολογικές μεμβράνες. Οι φαρμακοχημικοί μελετούν τις βιολογικές μεμβράνες με στόχο την κατανόηση των δυνάμεων που καθορίζουν τις αλληλεπιδράσεις τους με τα βιοδραστικά μόρια και για την ανάπτυξη καινοτόμων φαρμακευτικών μορίων.

Δομικά οι μεμβράνες αποτελούν πολύπλοκα υγρά κρυσταλλικά συστήματα με στερεές περιοχές (domains) που περιέχουν κυρίως φωσφολιπίδια. Τα φωσφολιπίδια αυτά σχηματίζουν λιπιδικές διπλοστιβάδες στις οποίες άλλα βιομόρια είναι ενσωματωμένα όπως πρωτεΐνες και χοληστερόλη (rafts).

Τα σύγχρονα ερευνητικά δεδομένα ολοένα και προσδίδουν ένα δυναμικό ρόλο στα μεμβρανικά λιπίδια. Είναι γνωστό πια ότι τα μεμβρανικά λιπίδια εμπλέκονται στις χρήσιμες κυτταρικές λειτουργίες, οι οποίες δικαιολογούν την παρουσία διαφόρων τύπων φωσφολιπιδίων. Τα αυξανόμενα ερευνητικά δεδομένα συνηγορούν για το κεντρικό ρόλο του λιπιδικού στρώματος σε μυριάδες κυτταρικές διεργασίες αποδεικνύοντας ότι τα λιπίδια δεν είναι μόνο δομικά στοιχεία και πηγές μεταβολικής ενέργειας. Στην πραγματικότητα, τα λιπίδια είναι ουσιώδη κυτταρικά συστατικά τα οποία έχουν πολλαπλούς και διακριτούς ρόλους στις κυτταρικές και μεταβολικές λειτουργίες. Τα λιπίδια είναι τώρα γνωστό ότι δεν αποτελούν μόνο το φυσικό υπόστρωμα των μεμβρανικών πρωτεϊνών και το φράγμα που απομονώνει και προσδιορίζει τα κύτταρα και οργάνδια, αλλά συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με τον κυτταρικό φραγμό και ελέγχουν την κατανομή και τοπογραφική θέση των περιφερικών πρωτεϊνών στις μεμβρανικές περιοχές όπου μπορούν να αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες που λειτουργούν ως σηματοδότες. Επιπρόσθετα, οι μεταβολές της λιπιδικής σύνθεσης στις μεμβράνες σχετίζονται με την εμφάνιση διαφόρων ασθενειών.

Η συνεχής αναγνώριση του σημαντικού ρόλου των λιπιδίων, τα καθιστά στόχους για τα φαρμακευτικά μόρια των οποίων η φαρμακολογική δράση θα σχετίζεται με την τροποποίηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των μεμβρανών. Εφόσον η δράση των μεμβρανικών πρωτεϊνών ελέγχεται από τα λιπίδια, είναι αντιληπτό ότι φάρμακα τα οποία είναι ικανά να επηρεάζουν τη λιπιδική οργάνωση θα μπορούσαν να τροποποιήσουν τις δράσεις των μεμβρανικών πρωτεϊνών και το μηχανισμό σηματοδότησης.

Επομένως, οι αλληλεπιδράσεις φαρμακευτικών μορίων με μεμβράνες αποτελούν ένα ευρύ και πολύπλοκο πεδίο της φαρμακευτικής Χημείας και μπορεί να εμπλέκει μελέτες φαρμάκων τα οποία είναι ικανά να επηρεάζουν την πρωτεϊνική λειτουργία άμεσα ή έμμεσα με τροποποίηση του λιπιδικού υποστρώματος. Ο πρωτεϊνικός έλεγχος ο οποίος επιτυγχάνεται λόγω των αλληλεπιδράσεων των φαρμακευτικών μορίων με τις μεμβράνες μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στη κυτταρική σηματοδότηση και έκφραση γονιδίων τα οποία θα μπορούσαν να αναστρέψουν την παθολογική κατάσταση .



Σχήμα 6.1: Η δράση των λιπιδίων συμπλέκεται με αυτή των πρωτεϊνών για να παραχθεί ένα βιολογικό αποτέλεσμα.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις με λιπιδικές διπλοστιβάδες των δύο αλκαλοειδών της βίγκας, της βιμπλαστίνης και βιγκριστίνης. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε η θερμική ανάλυση Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης και φασματοσκοπία Raman.

Τα αλκαλοειδή της βίγκας ως αμφοτερικά και ογκώδη μόρια είναι γνωστό ότι διαταράσσουν (perturbation) τις λιπιδικές διπλοστιβάδες και ότι αυτή η διαταραχή μπορεί να εμπλέκεται με τη βιολογική τους δράση. Με τη χρήση των δύο φυσικοχημικών τεχνικών αποδείχτηκε ότι τα δύο δομικά παρεμφερή μόρια εμπλέκονται σε διακριτές αλληλεπιδράσεις με τις λιπιδικές διπλοστιβάδες με ή χωρίς χοληστερόλη.

Το σημαντικότερο εύρημα αυτής της διδακτορικής διατριβής είναι ότι προκαλούν όμοια αποτελέσματα (π.χ. σε μικρές συγκεντρώσεις αλληλεπιδρούν ισχυρά με τις πολικές κεφαλές) αλλά και διακριτά αποτελέσματα (π.χ. δημιουργούν διακριτά είδη domains). Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να δικαιολογήσουν την όμοια κατάταξη τους ως προς τη βιολογική δράση αλλά διαφορετικό φαρμακευτικό προφίλ.

Τα αποτελέσματα αυτά δεν είναι μόνο σημαντικά από άποψη Φαρμακευτικής Χημείας αλλά και Φυσικοχημείας. Οι δύο μεθοδολογίες αποδεικνύονται ότι είναι πολύτιμες στην κατανόηση των αλληλοεπιδράσεων δύο ογκωδών μορίων παρόμοιων σε χημική δομή. Οι δύο μεθοδολογίες ήταν ικανές να ανιχνεύσουν διαφορές τόσο στη συμπεριφορά τους ως «μοριακές οντότητες» αλλά και σε «ατομικό επίπεδο». Συγκεκριμένα, με τη Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης κατέστη δυνατή η διαφοροποίηση στις θερμικές αλλαγές μεταξύ των δύο μορίων οι οποίες είναι απόρροια του διαφορετικού εντοπισμού και προσανατολισμού των δύο μορίων στις λιπιδικές διπλοστιβάδες. Με τη φασματοσκοπία Raman εντοπίστηκαν διαφορές σε τμήματα των λιπιδικών διπλοστιβάδων (π.χ. στις πολικές κεφαλές ή στις αλκυλικές αλυσίδες).

Για τα δύο μόρια παρατηρήθηκε ότι προκαλούν αλληλοεισχώρηση στις λιπιδικές διπλοστιβάδες. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να είναι άμεσα συνδεδεμένο με το τρόπο δράσης τους γιατί η αλληλοεισχώρηση επηρεάζει τις φυσικοχημικές ιδιότητες των μεμβρανών (π.χ. πυκνότητα, ρευστότητα) όπως επίσης μπορεί να επηρεάζει τη λειτουργία άλλων δομικών συστατικών των βιολογικών μεμβρανών (π.χ. αδρανοποίηση των ενσωματωμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών).

Γενικά, κύριες αιτίες παρατήρησης της αλληλοεισχώρησης των αλειφατικών αλυσίδων των λιπιδίων είναι: α) απωστικές αλληλεπιδράσεις των πολικών κεφαλών της χολίνης και β) ελκτικές αλληλεπιδράσεις ηλεκτροστατικής φύσεως και van der Waals μεταξύ των υδρόφοβων αλυσίδων. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές παρουσιάζουν μια αντίστροφη σχέση μεταξύ τους δηλαδή ισχυροποίηση των απωστικών δυνάμεων ισοδυναμεί με εξασθένηση των ελκτικών δυνάμεων.

Όπως αναφέρθηκε στα προηγούμενα κεφάλαια, η εισδοχή των αλκαλοειδών της βίγκας βιμπλαστίνης και βιγκριστίνης σε όλες τις μοριακές αναλογίες, επηρεάζει την πολική της χολίνης των διπλοστιβάδων, με αποτέλεσμα οι απωστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους να εξασθενούν. Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα, τις ισχυρότερες ελκτικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλυσίδων και τη δημιουργία αλληλοεισχώρησης αυτών. Αύξηση της μοριακής αναλογίας των φαρμακευτικών μορίων ισχυροποιεί το φαινόμενο αυτό (αύξηση μεταβολής ενθαλπίας ΔH) και συγκεκριμένα η δράση της βιμπλαστίνης δείχνει να ολοκληρώνεται στη μοριακή αναλογία 17% ενώ η αύξηση της ποσότητας της βιγκριστίνης προκαλεί διακριτά θερμικά αποτελέσματα σε όλες τις μοριακές αναλογίες που μελετήθηκαν.

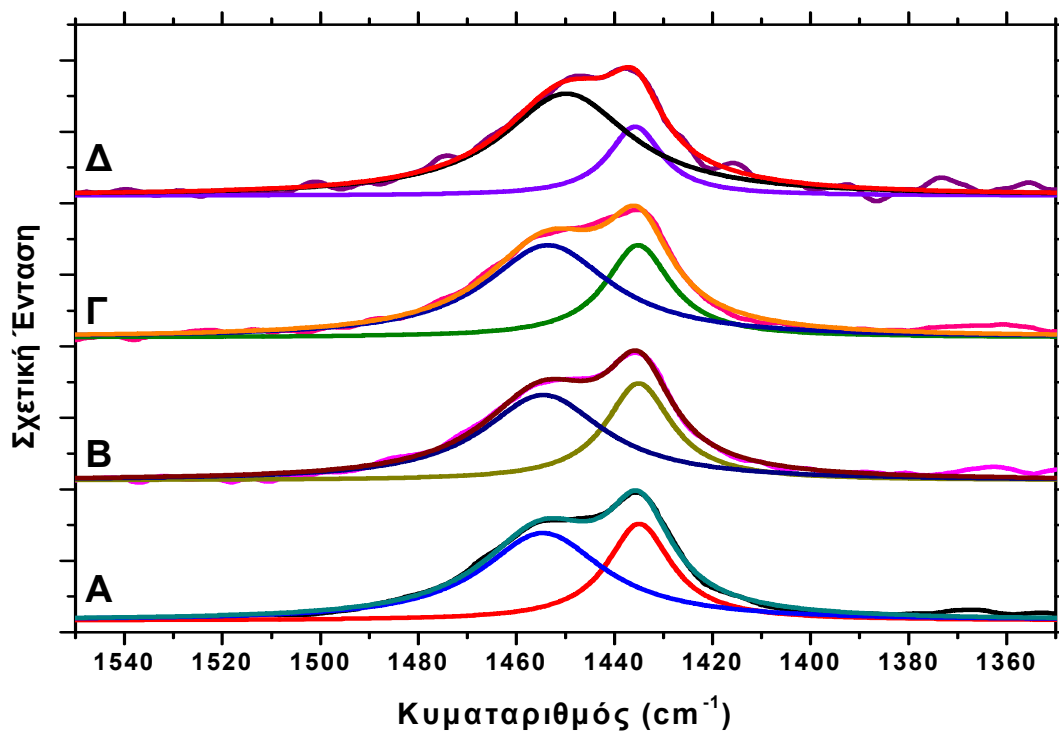
Αντίθετα, η ταυτόχρονη προσθήκη χοληστερόλης και φαρμακευτικών μορίων προκαλεί αντίστροφα αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται εξασθένηση των ελκτικών αλληλεπιδράσεων αφού η εισδοχή της χοληστερόλης απομακρύνει τις αλειφατικές αλυσίδες και ισχυροποίηση των απωστικών αλληλεπιδράσεων των πολικών κεφαλών. Για το λόγο στα δείγματα DPPC:χοληστερόλη:φάρμακο δεν παρατηρείται αλληλοεισχώρηση των λιπιδικών αλυσίδων, με αποτέλεσμα η ποσότητα των φαρμάκων να διαταράσσει ισχυρότερα τον λιπόφιλο πυρήνα των διπλοστιβάδων.

Επιπρόσθετα, θα πρέπει να τονιστεί η συμπληρωματικότητα που εμφανίζουν οι φυσικοχημικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν. Από τη μια, η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης ανέδειξε τα θερμικά αποτελέσματα που προκαλεί η εισδοχή των φαρμακευτικών μορίων με ή χωρίς την προσθήκη χοληστερόλης στις λιπιδικές μεμβράνες, μέσω παρατήρησης της θερμοκρασίας κύριας μεταβολής φάσης, της μεταβολής ενθαλπίας κύριας μεταβολής φάσης και του μεγέθους της συνεργατικότητας. Από την άλλη, η χρήση της φασματοσκοπίας

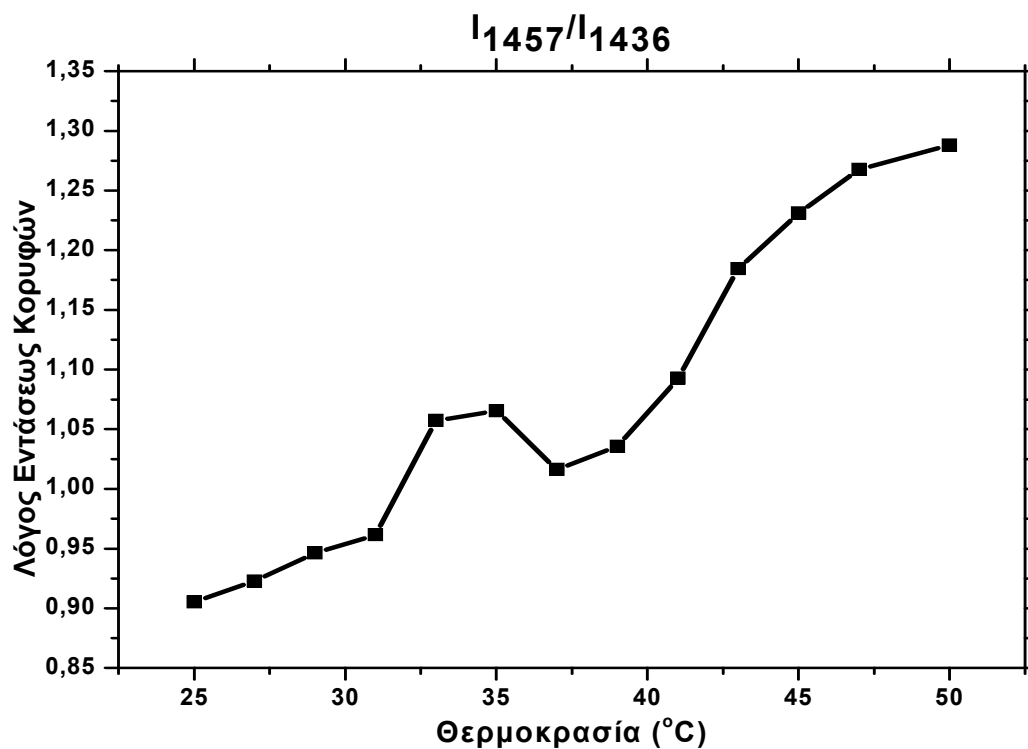
Raman, βοήθησε στη μελέτη των διαμορφωτικών μεταβολών οι οποίες λαμβάνουν χώρα στα εξεταζόμενα δείγματα, με αποτέλεσμα να γίνεται σαφής η μεγάλη ομοιότητα στη δράση των αλκαλοειδών της βίγκας βιμπλαστίνης και βιγκριστίνης αλλά και η διαφορετικότητα στο φαρμακευτικό προφίλ τους.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

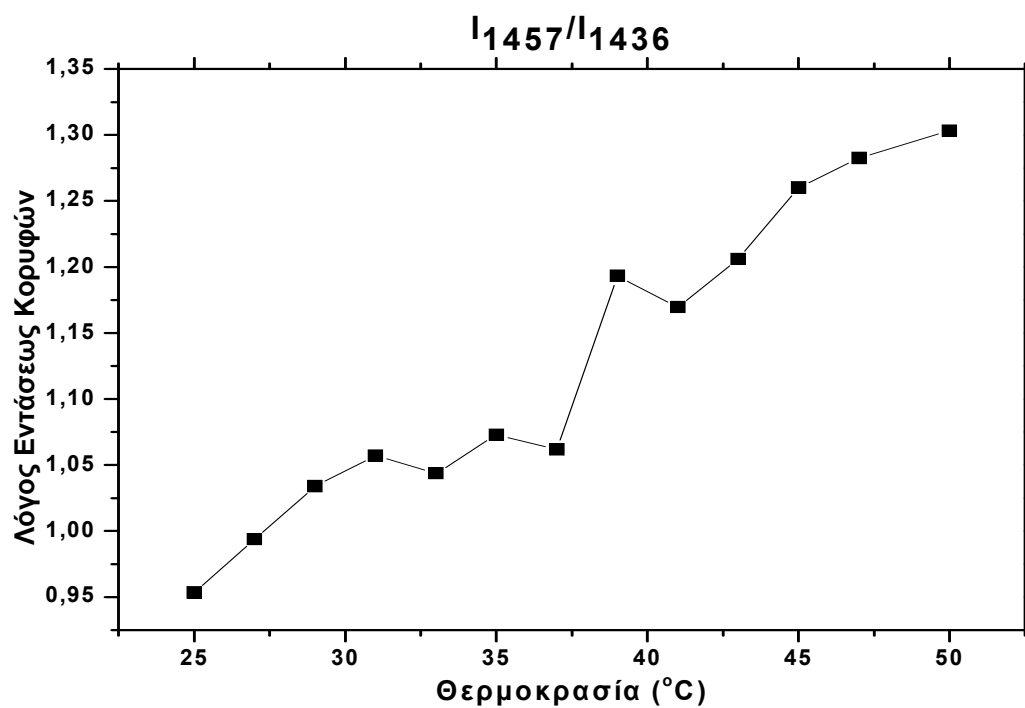
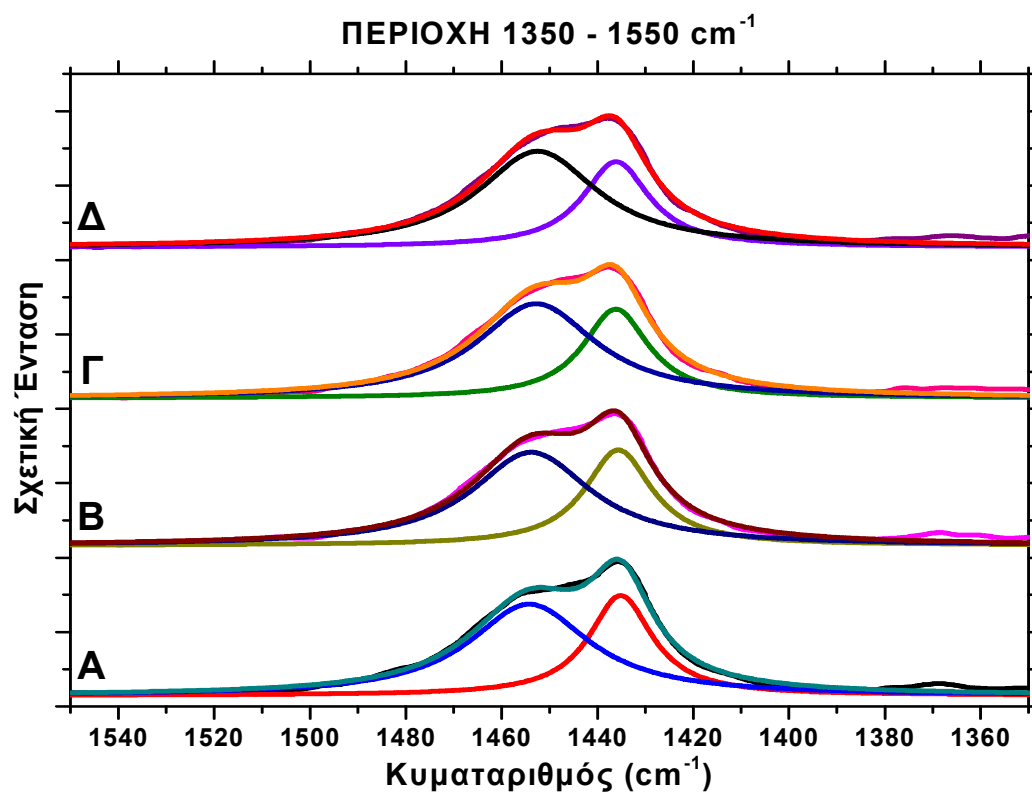
ΠΕΡΙΟΧΗ 1350 - 1550 cm^{-1}

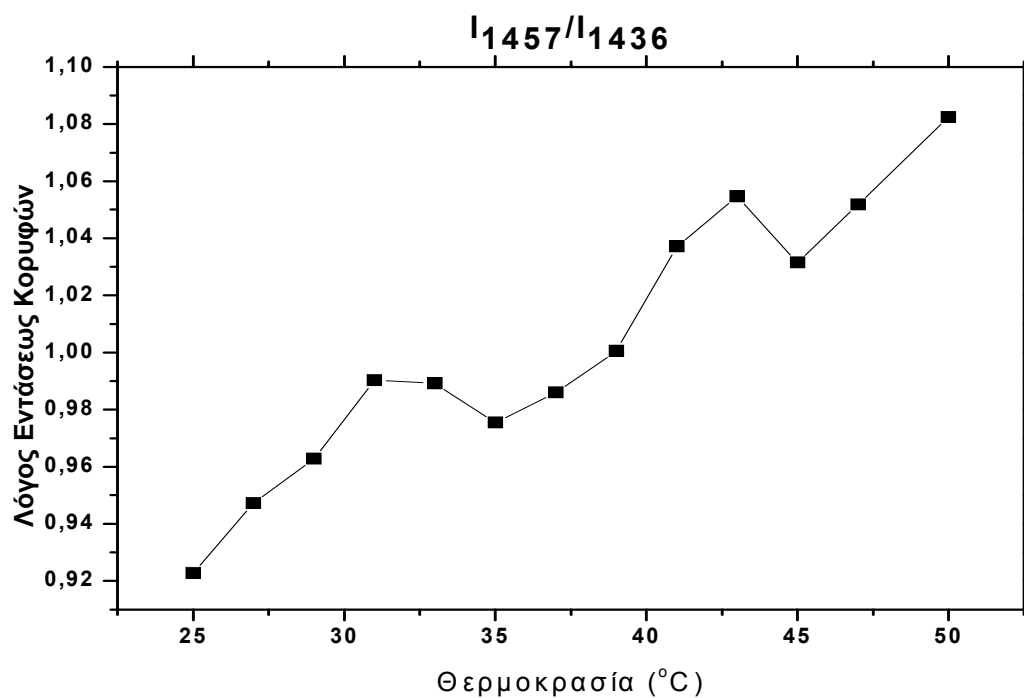
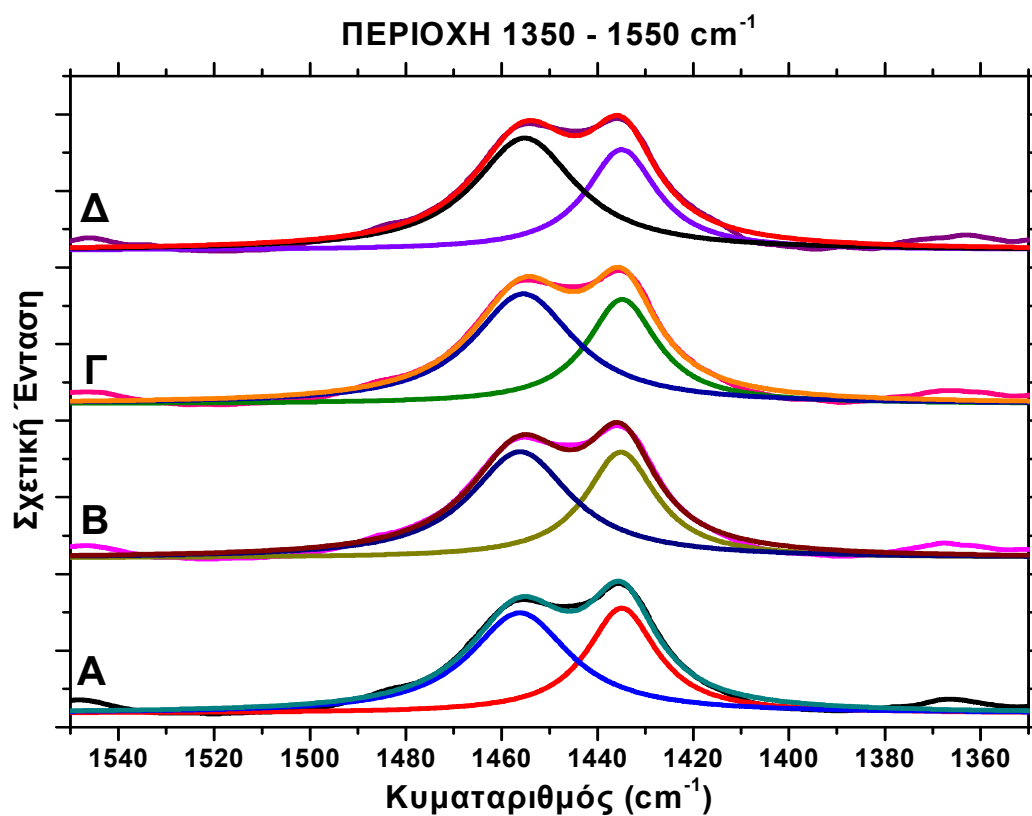


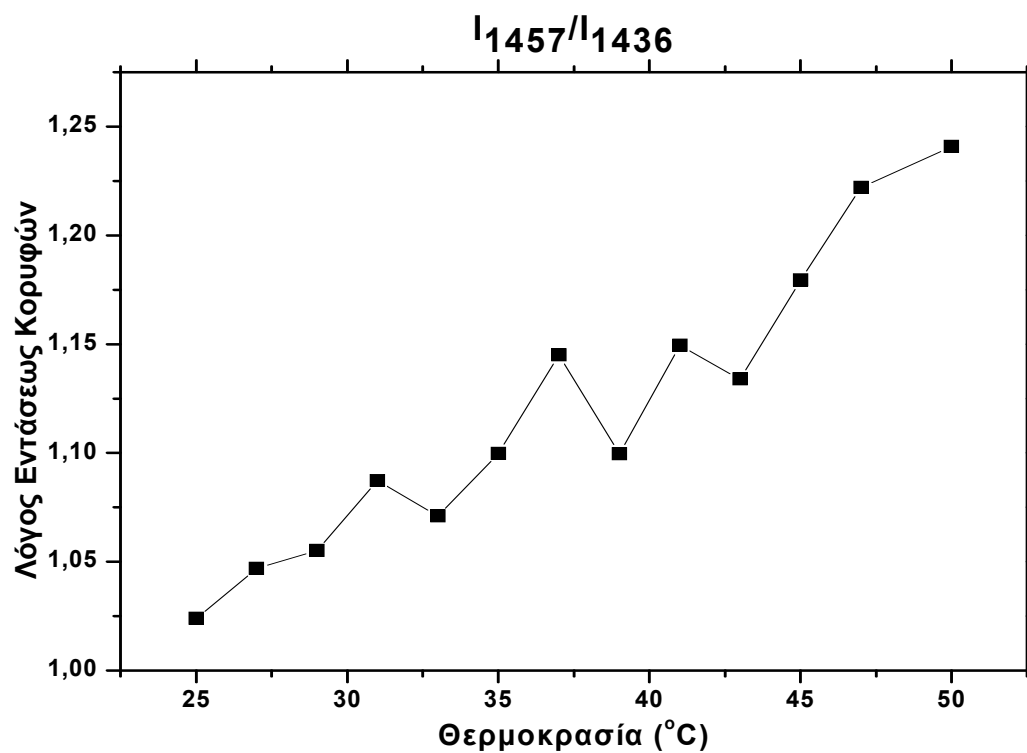
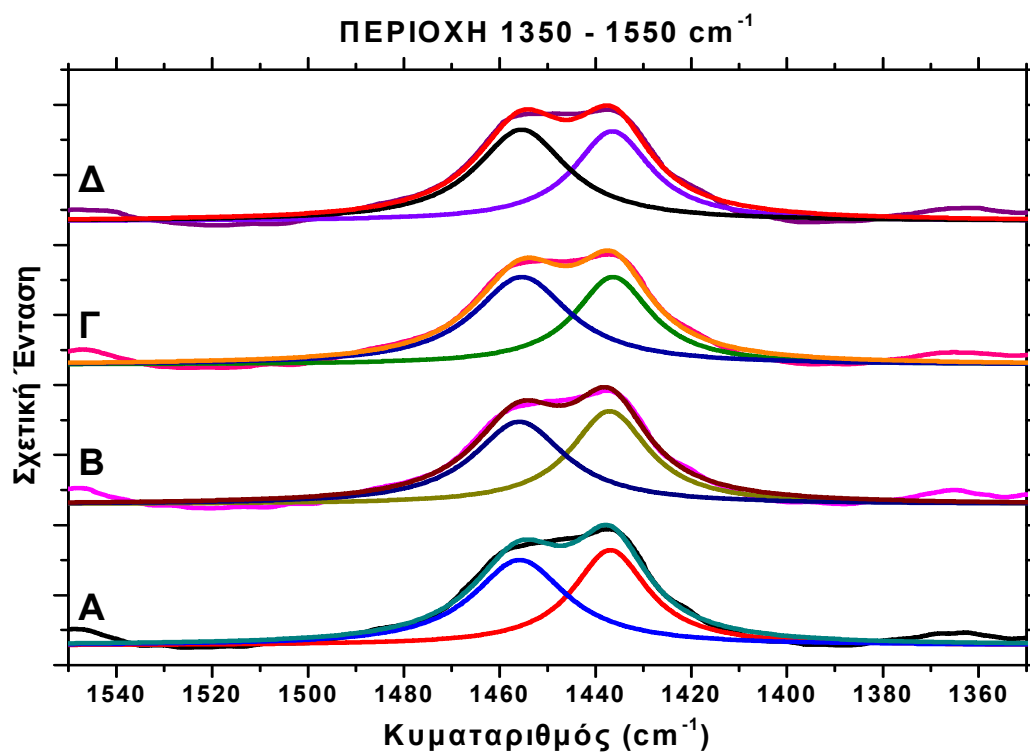
Σχήμα Π.1: Διαχωρισμός της κορυφής στους 1436 cm^{-1} του δείγματος DPPC και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες. Α) 25°C , Β) 34°C , Γ) 42°C , Δ) 50°C .



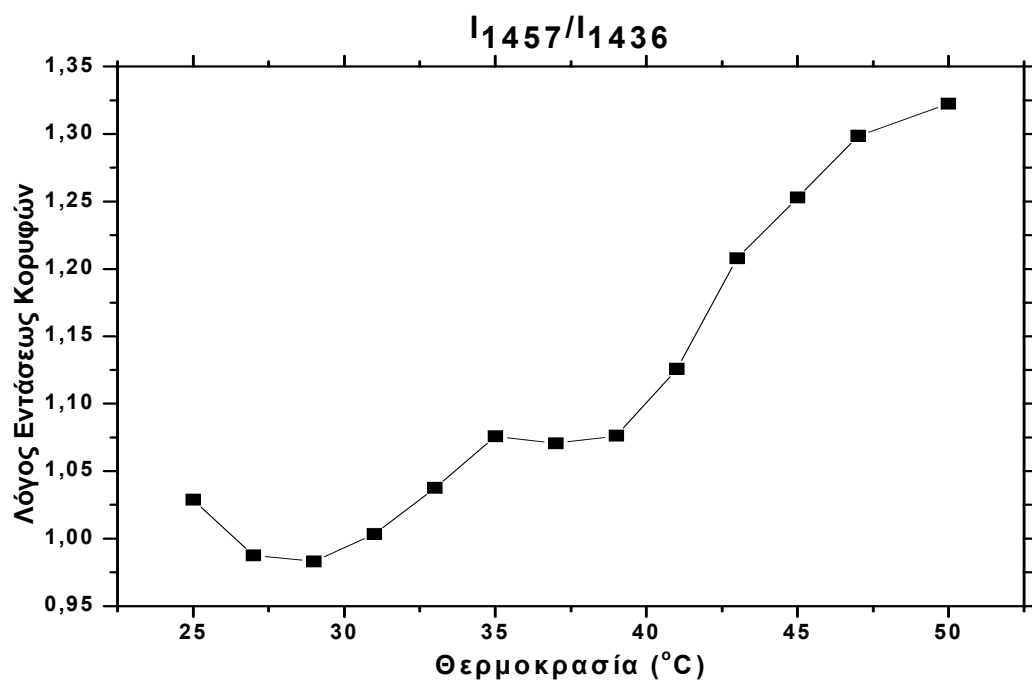
Σχήμα Π.2: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1457}/I_{1436} του δείγματος DPPC.



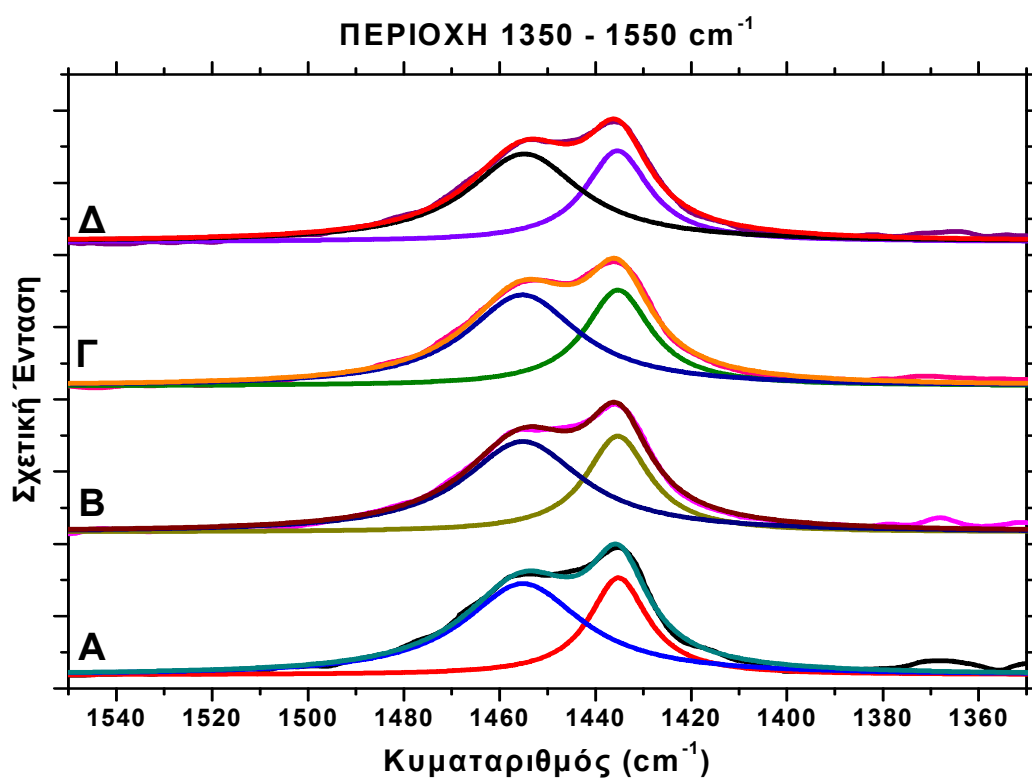




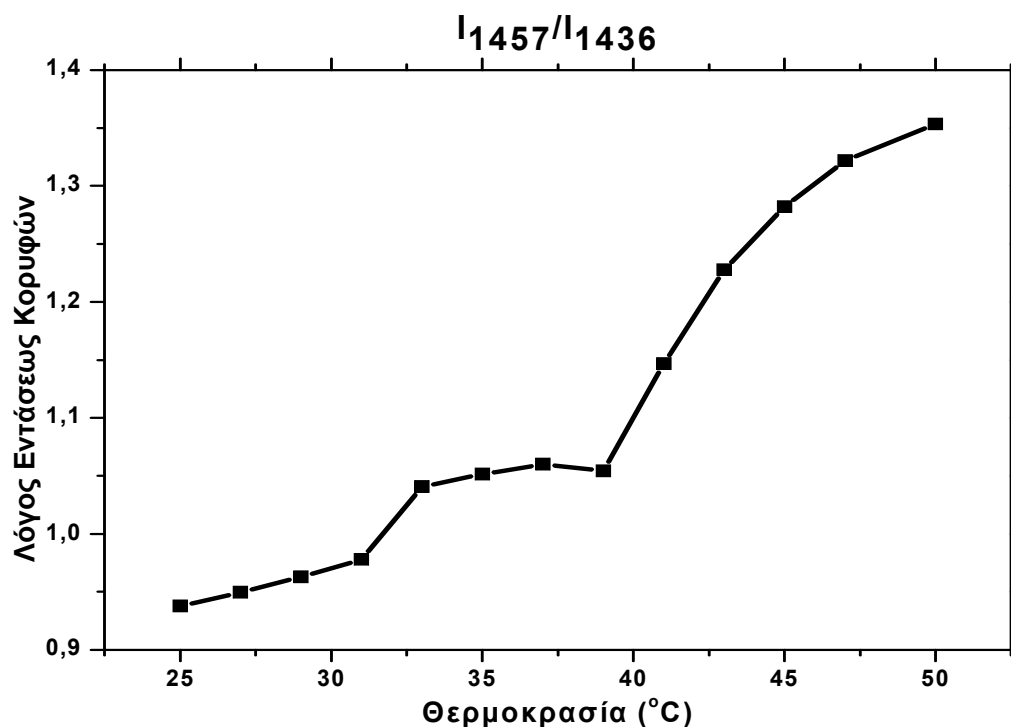
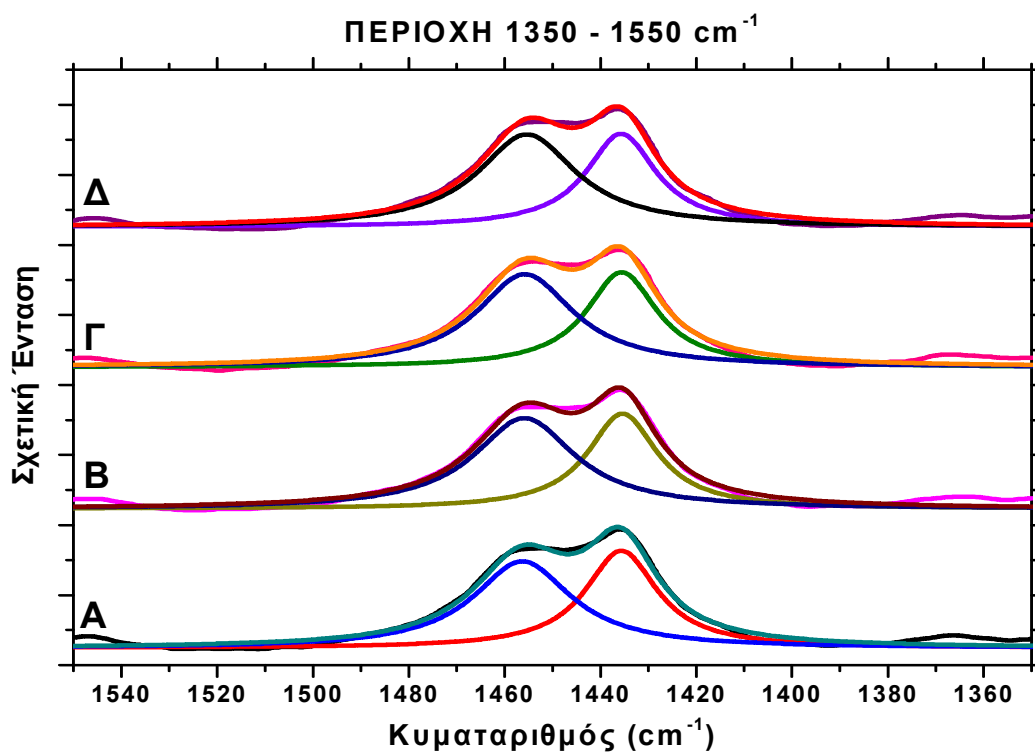
Σχήμα Π.8: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1457}/I_{1436} του δείγματος DPPC:βιμπλασίνη 75:25.

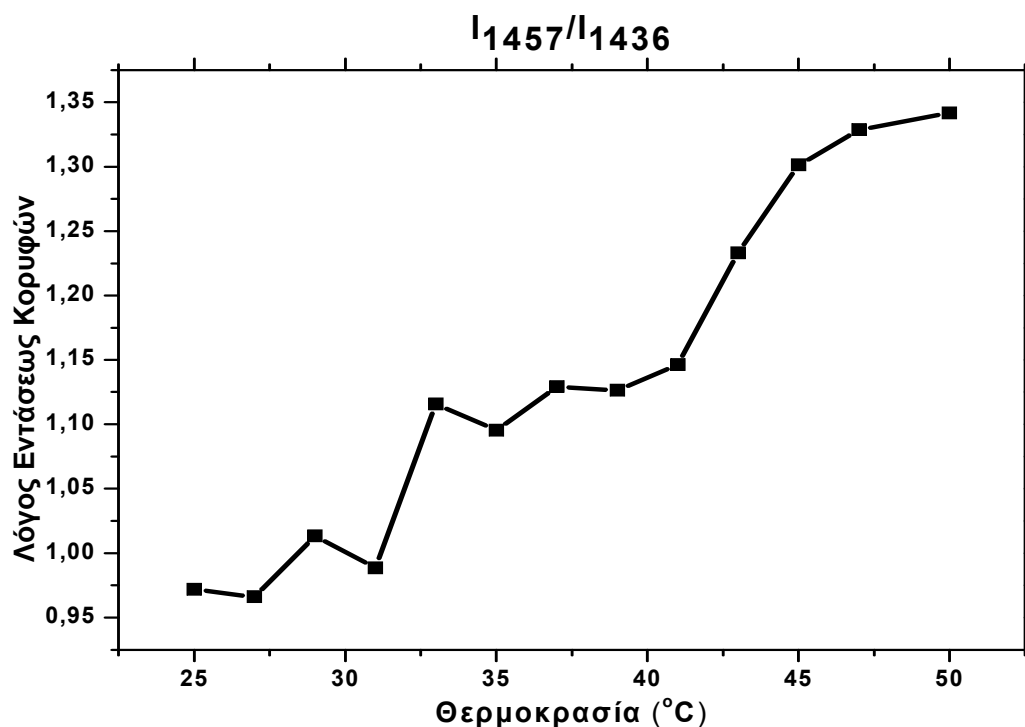
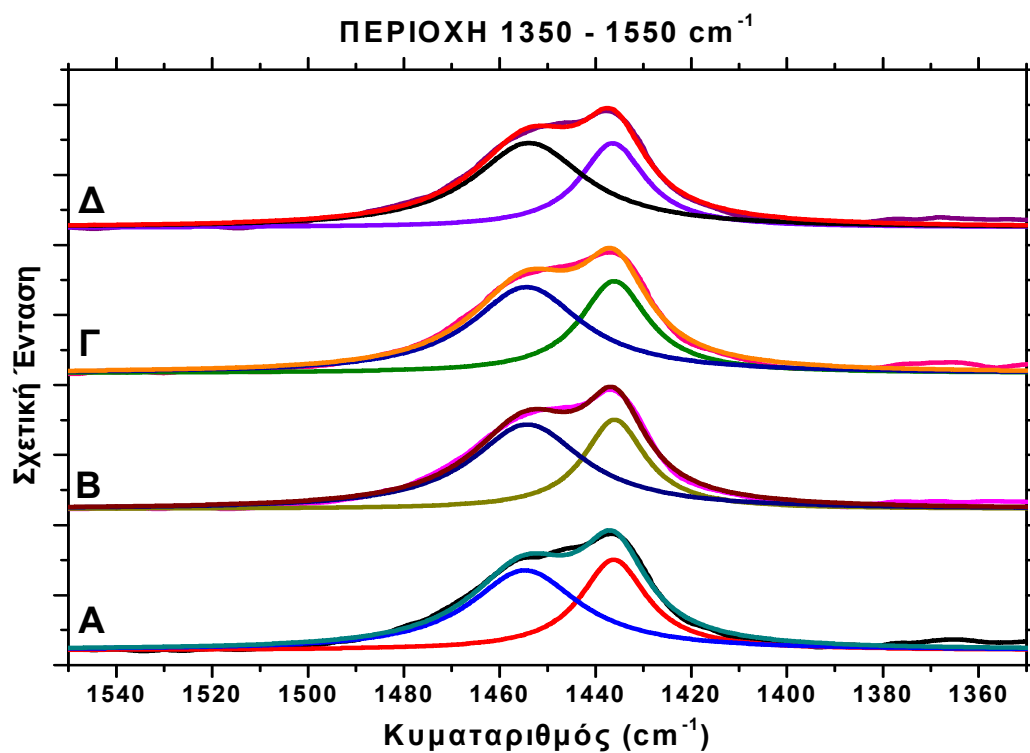


Σχήμα Π.9: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1457}/I_{1436} του δείγματος DPPC:χοληστερόλη 90:10.

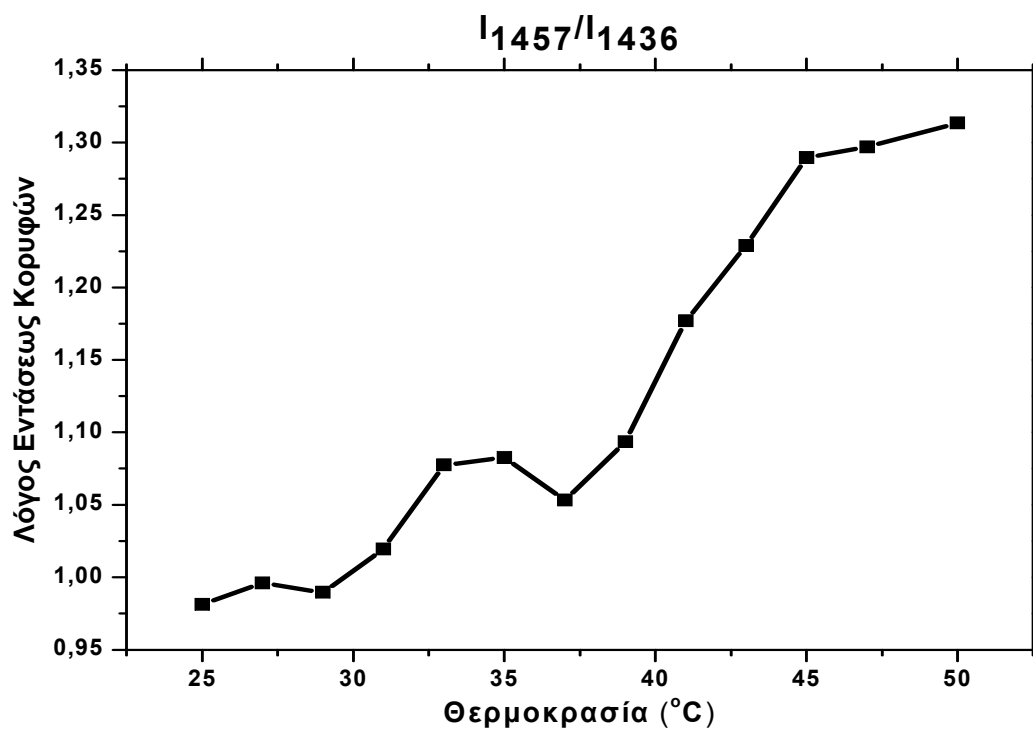
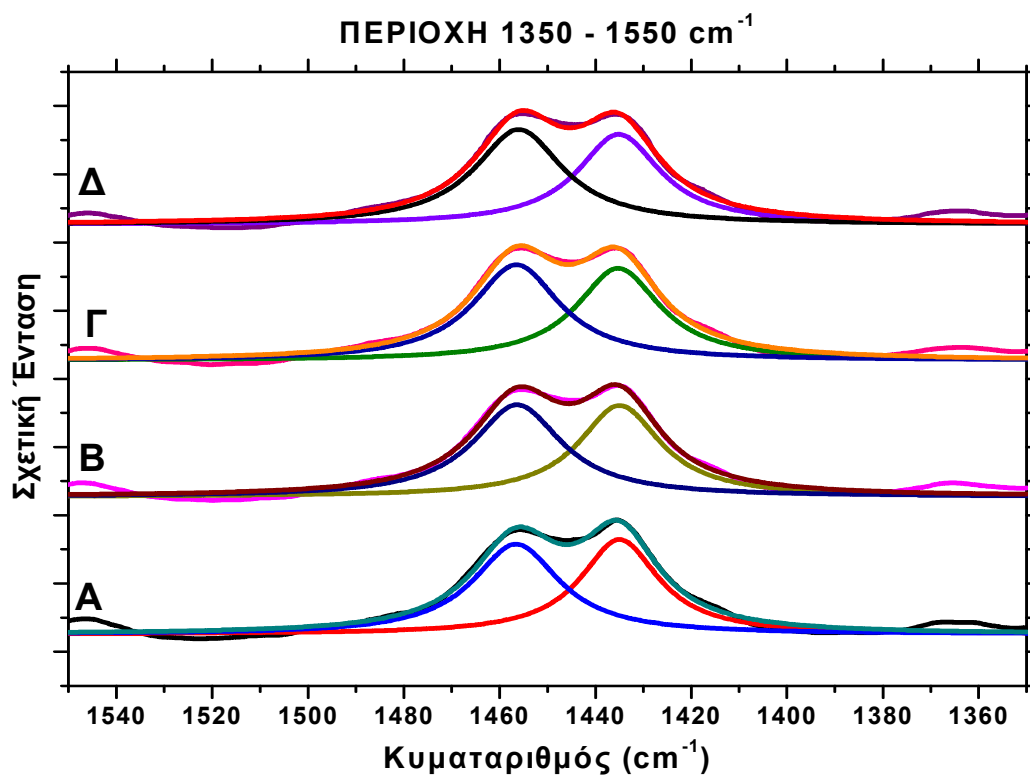


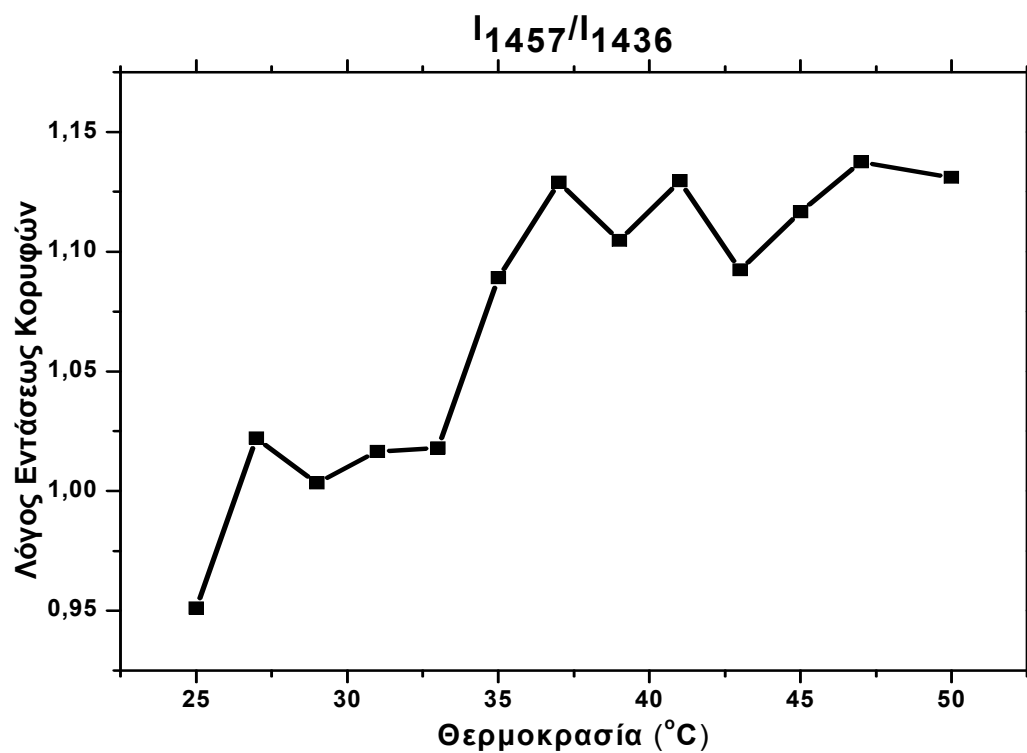
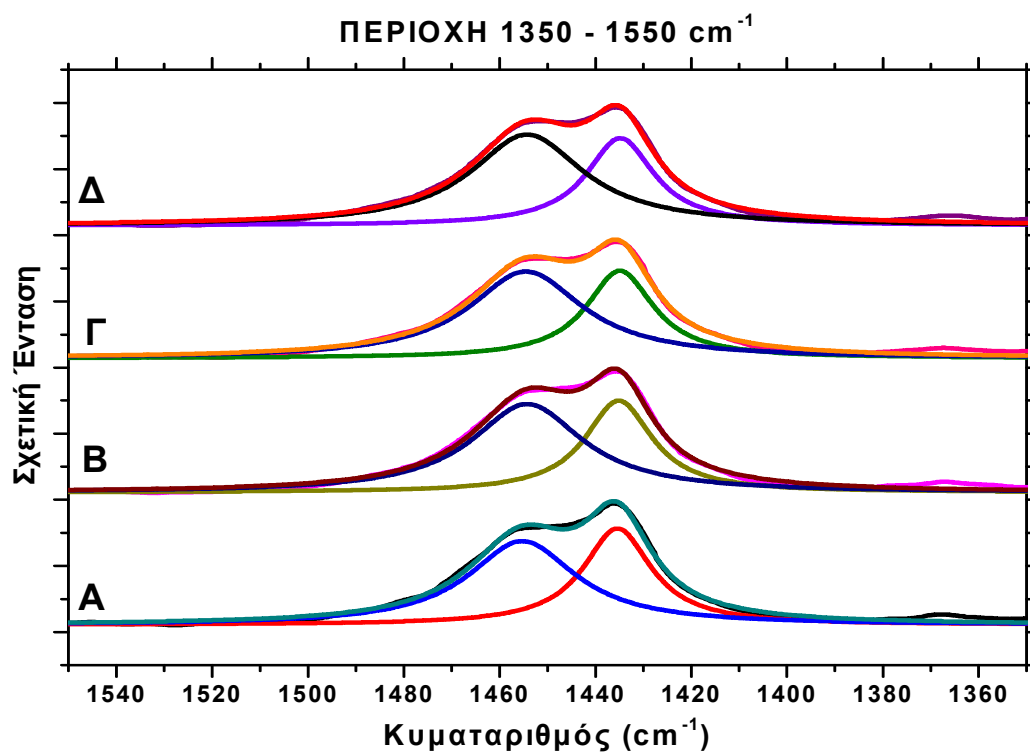
Σχήμα Π.10: Διαχωρισμός της κορυφής στους 1436 cm^{-1} του δείγματος DPPC:χοληστερόλη 90:10 και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες. Α) 25°C , Β) 34°C , Γ) 42°C , Δ) 50°C .



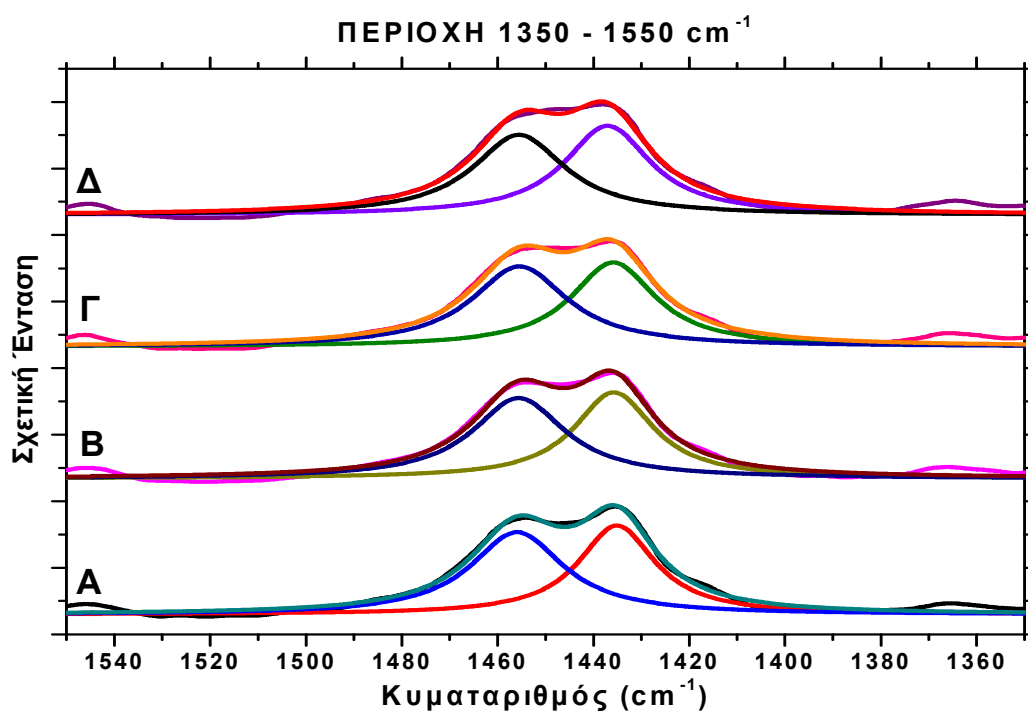


Σχήμα Π.14: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1457}/I_{1436} του δείγματος DPPC:χοληστερόλη:βιμπλασίνη 65:10:25.

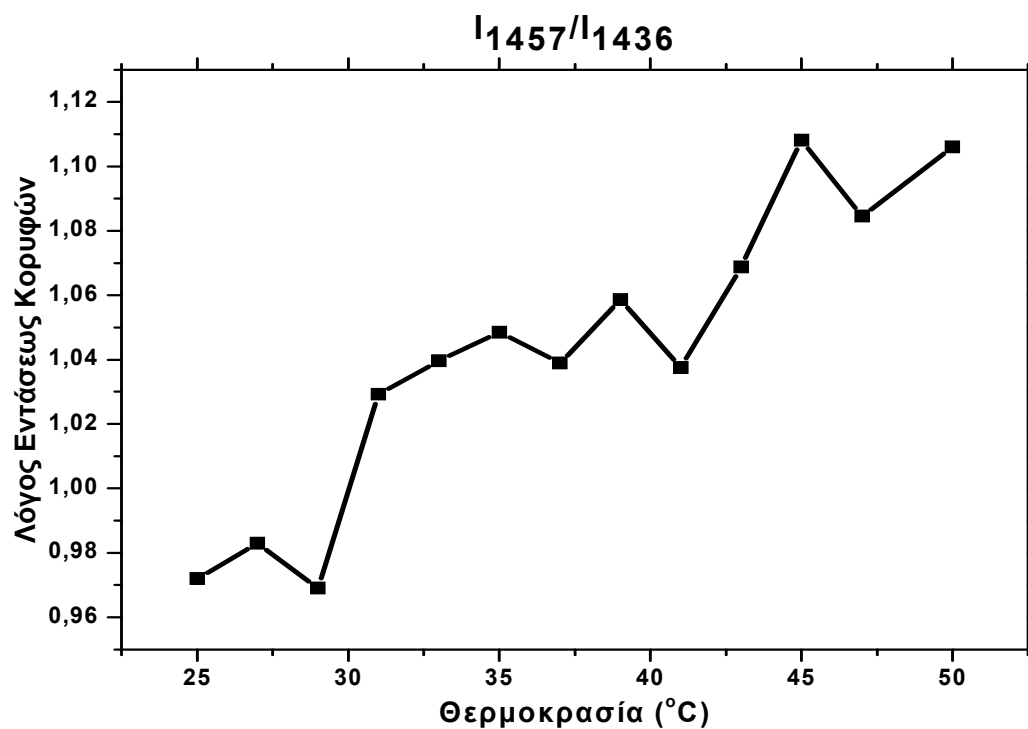




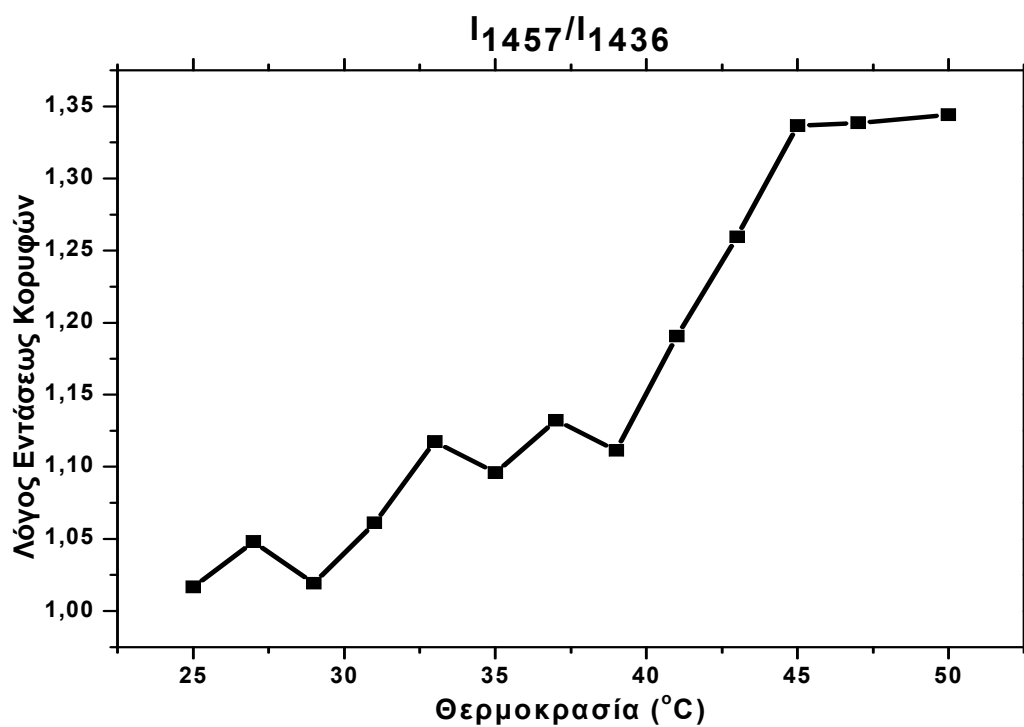
Σχήμα Π.18: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1457}/I_{1436} του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 83:17.



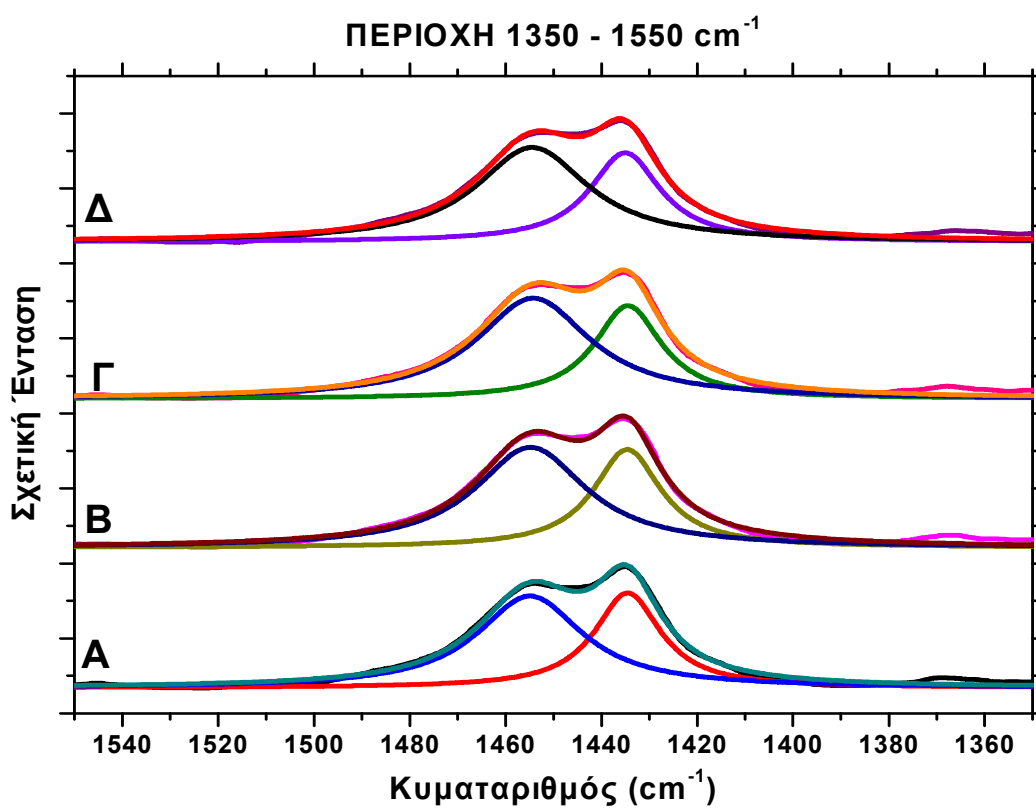
Σχήμα Π.19: Διαχωρισμός της κορυφής στους 1436 cm^{-1} του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 75:25 και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες. Α) 25°C , Β) 34°C , Γ) 42°C , Δ) 50°C .



Σχήμα Π.20: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1457}/I_{1436} του δείγματος DPPC:βιγκριστίνη 75:25.



Σχήμα Π.21: Λόγος εντάσεως κορυφών Raman I_{1457}/I_{1436} του δείγματος
DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17.



Σχήμα Π.22: Διαχωρισμός της κορυφής στους 1436 cm^{-1} του δείγματος
DPPC:χοληστερόλη:βιγκριστίνη 73:10:17 και σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.
Α) 25 °C, Β) 34 °C, Γ) 42 °C, Δ) 50 °C.

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. J. Darnell, H. Lodish, and D. Baltimore. Molecular Cell Biology. **1990**, (W.H. Freeman, San Francisco).
2. L. Stryer. Biochemistry. **1988**, (W.H. Freeman, San Francisco).
3. B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J.D. Watson. Molecular Biology of the Cell. **1983**, (Garland, New York).
4. M. Bessis, Living Blood Cells and Their Ultrastructure. **1973**, (Springer, New York).
5. R. Koynova, M. Caffrey. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, 1376, 91-145.
6. Λ. Χ. Μαργαρίτης, Β. Κ. Γαλανόπουλος, Κ. Ε. Κεραμάρης, Ε. Σ. Μαρίνος, Ι. Σ. Παπασιδέρη, Δ. Ι. Στραβοπόδης, Ι. Π. Τρουγκάκος. Βιολογία Κυττάρου. **2004**, (Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, 4^η έκδοση, Αθήνα).
7. A. M. Smondyrev, M. L. Berkowitz. Structure of Dipalmitoylphosphatidylcholine/Cholesterol bilayers at low and high cholesterol concentrations: Molecular Dynamic Simulation. **1999**, 77, 2075-2089.
8. M. J. Zuckermann, J. H. Ipsen, O. G. Mouritsen. Cholesterol and membrane models. **1993**, (CRC Press Inc., Florida).
9. D. A. Brown, E. London. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Ann. Rev. Cell Develop. Biol.*, **1998**, 14, 111-116.
10. Μ. Μαρσέλος, Συνοπτική Φαρμακολογία. **2006**, Ιωάννινα.
11. M. Enache, E. Volanschi. Spectroscopic investigations of the molecular interaction of anticancer drug mitoxantrone with non-ionic surfactant micelles. *J. P. P.*, **2012**, 64, 688-696.
12. T. T. Nguyen, K. Rembert, J. C. Conboy. Label-free detection of drug-membrane association using ultraviolet-visible sum-frequency generation. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131(4), 1401-1403.
13. H. H. Mantsch, R. N. McElhaney. Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids*, **1991**, 57(2-3), 213-226.

14. M. S. Braiman, K. J. Rothschild. Fourier Transform Infrared techniques for probing membrane protein structure. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **1988**, 17, 541-570.
15. L. Masotti, D. W. Urry, J. R. Krivacic, M. M. Long. Circular dichroism of biological membranes: II. Plasma membranes and sarcotubular vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, **1972**, 266(1), 7-17.
16. B. J. Litman. Effect of light scattering on the circular dichroism of biological membranes. *Biochemistry*, **1972**, 11(17), 3243-3247.
17. S. Sunder, H. J. Bernstein. Raman spectroscopic studies of biological membrane model systems: Dietherlecithins. *Chem. Phys. Lipids*, **1978**, 22(4), 279-283.
18. L. J. Lis, J. W. Kauffman, D. F. Shriver. Effect of ions on phospholipid layer structure as indicated by Raman Spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1975**, 406(4), 453-464.
19. J. Sikkema, J. A. M. de Bont, B. Poolman. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem*, **1994**, 269(11), 8022-8028.
20. L. A. Bagatolli. To see or not to see: Lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, 1758(10), 1541-1556.
21. P. Laggner. X-Ray studies on biological membranes using synchrotron radiation. *Topics in Curr. Chem*, **1988**, 145, 173-202.
22. J. K. Blasie, L. Herbet, J. Pachence. Biological membrane structure as "seen" by X-Ray and neutron diffraction techniques. *J. Mem. Biol.*, **1985**, 86, 1-7.
23. L. Zhao, S-S. Feng, N. Kocherginsky, I. Kostetski. DSC and EPR investigations on effects of cholesterol component on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within lipid bilayer membrane. *Int. J. Pharm.*, **2007**, 338(1-2), 258-266.
24. M. C. Sainz, J. R. Chantres, B. Elorza, M. A. Elorza. DSC study of the action of phenylbutazone on DMPC and DPPC bilayers. *Int. J. Pharm.*, **1993**, 89(3), 183-190.
25. T. Mavromoustakos, E. Theodoropoulou, D-P. Yang. The use of high-resolution solid-state NMR spectroscopy and differential scanning

- Calorimetry to study interactions of anaesthetic steroids with membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1997**, 1328(1), 65-73.
26. P. Zoumpoulakis, I. Daliani, M. Zervou, I. Kyrikou, E. Siapi, G. Lamprinidis, E. Mikros, T. Mavromoustakos. Losartan's molecular basis of interaction with membranes and AT₁ receptor. *Biochim. Biophys. Acta*, **2003**, 125(1), 13-25.
 27. B. Wunderlich. Thermal Analysis. **1990**, (Academic Press, London).
 28. A. P. Gray. Polymer crystallinity determinations by DSC. *Thermochim. Acta*, **1970**, 1, 563-579.
 29. M. J. Richardson. Comprehensive Polymer Science, C. Booth and C. Price Ed. V.1. **1989**. (Pergamon Press, London).
 30. A. P. Gray. Proc. Amer. Chem. Soc. Symp. Analytical Calorimetry. **1968**. (Plenum Press, New York).
 31. M. J. Richardson, N. G. Savill. Temperatures in Differential Scanning Calorimetry. *Thermochim. Acta*, **1975**, 12, 213-220.
 32. S. Stella and P. F. Erhardt. Rate effects in the measurements of polymer transitions by differential scanning Calorimetry. *J. Appl. Polym. Sci.*, **1969**, 13, 1373-1380.
 33. G. W. Hohne, W. Hemminger, H. J. Flammersheim, Differential Scanning Calorimetry. An Introduction for Practicioners. **1996**, (Springer, Berlin).
 34. M. J. Richardson. Developments in Polymer Characterization, J. V. Dawkins, Ed., **1978**, (Applied Science Publisher London).
 35. C. G. Biliaderis. Differential scanning Calorimetry in food research.-A review. *Food Chem.*, **1983**, 10, 239-265.
 36. S. D. Clas, C. R. Dalton, B. C. Hancock. *PSTT*, **1999**, 2, 311.
 37. B. Z. Chowdhry, S.C. Cole. *Tibtech*, **1989**, 7, 11.
 38. R. L. Biltonen, D. Lichtenberg. The use of differential scanning Calorimetry as a tool to characterize liposome preparation. *Chem. Phys. Lipids*, **1993**, 64, 129-142.
 39. R. Koynova, M. Caffrey. An index ox lipid phase diagrams. *Chem. Phys. Lipids*, **2002**, 115, 107-219.
 40. N. B. Colthup, L. H. Daly, S. E. Wiberley, Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy, 3rd Ed. **1990**. (Academic Press, London).
 41. D. A. Long. Raman Spectroscopy. **1977**. (Mc Graw-Hill, New York).

42. H. G. M. Edwards. *Spectroscopy*, **2002**, 17(2), 16.
43. B. J. Marquardt, J. P. Wold. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **2004**, 37, 1.
44. A. M. Herrero. Raman spectroscopy a promising technique for quality assessment of meat and fish: A review. *Food Chem.*, **2008**, 107, 1642-1651.
45. M. D. Keller, E. M. Kanter, A. Mahadevan-Jansen. Raman spectroscopy for cancer diagnosis. *Spectroscopy*, **2006**, 21(11), 33-41.
46. A. S. Haka, K. E. Shafer-Peltier, M. Fitzmaurice, J. Crowe, R. R. Dasari, M. S. Feld. Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2005**, 102(35), 12371-12376.
47. H. Susi, D. M. Byler, W. C. Damert. Raman intensities of carbon-carbon stretching modes in a model membrane. *Chem. Phys. Lipids*, **1980**, 27, 337-344.
48. E. Bicknell-Brown, K. G. Brown, W. B. Person. Configuration-dependent Raman bands of phospholipid surface. 1. Carbonyl stretching modes at the bilayer interface. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 5486-5491.
49. B. P. Gaber, W. L. Peticolas. On the quantitative interpretation of biomembrane structure by Raman spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1997**, 465, 260-274.
50. M. Gussoni, P. Jona, G. Zerbi. Characterization of the C-H bond in hydrocarbons by infrared intensities. *J. Mol. Struct.*, **1982**, 80, 355-358.
51. V. Chan, H. Q. Mao, K. W. Leong. Chitosan-induced perturbation of DPPC membrane bilayer. *Langmuir*. **2001**, 17, 3749-3756.
52. S. F. Bush, H. Levin, I. W. Levin. Cholesterol-lipid interactions: An infrared and Raman spectroscopic study of the carbonyl stretching mode region of DPPC bilayers. *Chem. Phys. Lipids*, **1980**, 27, 101.
53. M. Lafleur, J. L. Dasseux, M. Pigeon, J. Dufoureq, M. Pezolet. Study of the effect of melittin on the thermotropism of DPPC by Raman spectroscopy. *Biochemistry*. **1987**, 26, 1173-1179.
54. Y. Koyama, S. Toda, Y. Kyogoku. Raman spectra and conformation of the glycerophosphatidylcholine headgroup. *Chem. Phys. Lipids*. **1977**, 19, 74-92.

55. R. C. Spiker, I. W. Levin. Raman spectra and vibrational assignments for dipalmitoylphosphatidylcholine and structurally related molecules. *Biochim. Biophys. Acta.* **1975**, 388, 361-373.
56. I. Kyrikou, N. P. Benetis, P. Chatzigeorgiou, M. Zervou, K. Viras, C. Poulos, T. Mavromoustakos. Interactions of the dipeptide paralyisin β -Ala-Tyr and the aminoacid Glu with phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta.* **2008**, 1778, 113-124.
57. J. Bryan. Definition of three classes of binding sites in isolated microtubule crystals. *Biochemistry.* **1972**, 11, 2611-2616.
58. M. A. Jordan, R. H. Himes, Wilson, L. Comparison of the effects of vinblastine, vincristine, vindesine and vinepidine on microtubule dynamics and cell proliferation *in vitro*. *Cancer Res.* **1982**, 45, 2741-2747.
59. M. A. Jordan, D. Thrower, L. Wilson. Mechanism of inhibition of cell proliferation by vinca alkaloids. *Cancer Res.* **1991**, 51, 2212-2222.
60. I. Zhigaltsev, N. Maurer, Q-F. Akhong, R. Leone, E. Leng, J. Wang, S. C. Semple, P. R. Cullis. Liposome-encapsulated vincristine, vinblastine and vinorelbine: A comparative study of drug loading and retention. *J. Contr. Rel.* **2005**, 104, 103-111.
61. C. Toso, C. Lindley. Vinorelbine: a novel vinca alkaloid. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* **1995**, 52, 1287-1304.
62. I. S. Johnson, J. G. Armstrong, M. Gorman, J. P. Burnett. The vinca alkaloids: a novel class of oncolytic agents. *Cancer Res.* **1963**, 23, 1390-1427.
63. N. Neuss. *Bull. Soc. Chim. France.* **1963**. 1509
64. W. A. Creasey, K. G. Bensch, S. E. Malawista. *Biochem. Pharmac.* **1963**, 23, 1390.
65. R. J. Owellen, A. H. Owens, D. W. Donigian. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1972**, 47, 685.
66. R. J. Owellen, D. W. Donigian, C. A. Hartke, F. O. Hains. *Biochem. Pharmac.* **1977**, 26, 1213.
67. F. Berleur, V. Roman, D. Jaskierowicz, D. Davellose, F. Leterrier, L. M. T. Saraga, G. Madelmont. Interactions of vinblastine sulphate with

- artificial phospholipid membranes. *Biochem. Pharmac.* **1985**, *34*, 3081-3086.
68. L. T. M. Saraga, G. Madelmont, C. H. Legrand, S. Metral. Vinblastine and vincristine action on gel-fluid transition of hydrated-DPPC. *Biochem. Pharmac.* **1981**, *30*, 411-415.
 69. L. T. M. Saraga, G. Madelmont. Enhanced hydration of DPPC multibilayer by vinblastine sulphate. *Biochim. Biophys. Acta.* **1983**, *728*, 394-402.
 70. D. Ntountaniotis, G. Mali, S. G. Grdadolnik, M. Halabalaki, A. L. Skaltsounis, C. Potamitis, E. Siapi, P. Chatzigeorgiou, M. Rappolt, T. Mavromoustakos. Thermal, dynamic and structural properties of drug AT₁ antagonist olmesartan in lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, **2011**, *1808*, 2995-3006.
 71. C. Fotakis, S. Gega, E. Siapi, C. Potamitis, K. Viras, P. Moutevelis-Minakakis, C. G. Kokotos, S. Durdagi, S. G. Grdadolnik, B. Sartori, M. Rappolt, T. Mavromoustakos. Interactions at the bilayer interface and receptor site induced by the novel synthetic pyrrolidinone analog MMK3. *Biochim. Biophys. Acta*, **2010**, *1798*, 422-432.
 72. C. Koukoulitsa, I. Kyrikou, C. Demetzos, T. Mavromoustakos. The role of the anticancer drug vinorelbine in lipid bilayers using differential scanning calorimetry and molecular modeling. *Chem. Phys. Lipids*, **2006**, *144*, 85-95.
 73. I. Kyrikou, A. Georgopoulos, S. Hatziantoniou, T. Mavromoustakos, C. Demetzos. A comparative study of the effects of cholesterol and sclereol, a bioactive labdane type diterpene, on phospholipid bilayers. *Chem. Phys. Lipids*, **2005**, *133*, 125-134.
 74. I. Kyrikou, S. K. Hadjikakou, D. Kovala-Demertzi, K. Viras, T. Mavromoustakos. Effects of non-steroid anti-inflammatory drugs in membrane bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, **2004**, *132*, 157-169.
 75. J. M. Bogs, H. Y. Wang, G. Ranqaraj, B. Tummier. Interactions of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine mixed complexes of acidic lipids and polymyxin B or polymyxin B nonapeptide. *Biochim. Biophys. Acta*, **1989**, *985*, 199-210.

76. P. Nambi, E. S. Rowe, T. J. McIntosh. Studies of ethanol-induced interdigitated gel phase in phosphatidylcholines using the fluophore 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene. *Biochemistry*, **1988**, 27, 9175-9182.
77. S. A. Simons, T. J. McIntosh. Interdigitated hydrocarbon chain packing causes the biphasic transition behavior in lipid/alcohol suspensions. *Biochim. Biophys. Acta*, **1984**, 773, 169-172.
78. C. Koukoulitsa, I. Kyrikou, C. Demetzos, T. Mavromoustakos. The role of anticancer drug vinorelbine in lipid bilayers using differential scanning calorimetry and molecular modeling. *Chem. Phys. Lipids*, **2006**, 144, 85-95.
79. C. Matsingou, C. Demetzos. Calorimetric study on the induction of interdigitated phase in hydrated DPPC bilayers by bioactive labdanes and correlation to their liposome stability: The role of chemical structure. *Chem. Phys. Lipids*, **2007**, 145, 45-62.
80. C. Potamitis, P. Chatzigeorgiou, E. Siapi, K. Viras, T. Mavromoustakos, A. Hodzic, G. Pabst, F. Cacho-Nerin, P. Laggner, M. Rappolt. Interactions of the antagonist valsartan with dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, **2011**, 1808, 1753-1763.
81. T. Mavromoustakos, P. Chatzigeorgiou, C. Koukoulitsa, S. Durdagi. Partial interdigitation in lipid bilayers. *Int. J. Quant. Chem.*, **2011**, 111, 1172-1183.
82. T. Mavromoustakos, P. Moutevelis-Minakakis, G. Kokotos, E. Papavassilopoulou, C. Potamitis, C. Photakis, P. Chatzigeorgiou, K. Viras, C. Koukoulitsa, E. Kalatzis, S. Durdagi. Peptide mimetics drugs and their interdigitation with lipid bilayers. *Essays on Contemporary Peptide Science*, **2011**, Editor: Pal Cordopatis, ISBN:978-81-308-0428-6.