



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ**

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας

Σχηματισμός, φυσικός χαρακτηρισμός και μελέτη φυσικής σταθερότητας ελαστικών λιποσωμάτων

Διπλωματική εργασία

*Για την απόκτηση μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης «Βιομηχανική
Φαρμακευτική»*

Λυδία Γ. Χατζηνικολή

Χημικός Μηχανικός

Επιβλέπων

Καθηγητής Κωνσταντίνος Δεμέτζος

Εργαστήριο Φαρμακευτικής Νανοτεχνολογίας

ΑΘΗΝΑ 2019

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακευτικής Νανοτεχνολογίας της Φαρμακευτικής Σχολής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Φαρμακευτικής Νανοτεχνολογίας Ε.Κ.Π.Α κ. Κωνσταντίνου Δεμέτζου, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2018 – 2019. Η ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας σηματοδοτεί την ολοκλήρωση των ακαδημαϊκών υποχρεώσεών μου, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος ειδίκευσης «Βιομηχανική Φαρμακευτική». Ως εκ τούτου, θα ήθελα να ευχαριστήσω ορισμένους ανθρώπους, των οποίων η βοήθεια υπήρξε σημαντική σε αυτήν την προσπάθειά μου.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Κωνσταντίνο Δεμέτζο, Καθηγητή Φαρμακευτικής Νανοτεχνολογίας Ε.Κ.Π.Α, για τον χρόνο του, τις συμβουλές του και την γενικότερη καθοδήγησή του, προκειμένου να ολοκληρωθεί επιτυχώς η διπλωματική μου εργασία.

Επίσης, ευχαριστίες αρμόζουν και στην Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Φαρμακευτικής κα Νατάσσα Πίππα, για τον χρόνο της, την καθοδήγησή της και τις καίριες παρεμβάσεις της καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης την Επίκουρη Καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας Ε.Κ.Π.Α κα Μαριλένα Βλάχου, καθώς και τον Διευθυντή Ερευνών στο Ε.Ι.Ε κ. Αστέριο (Στέργιο) Πίσπα, για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή και τον χρόνο που διέθεσαν για την κριτική ανάγνωση της εργασίας μου.

Λυδία Χατζηνικολή

Αθήνα 2019

Περίληψη

Τα λιποσώματα είναι λιπιδικές κυστιδικές νάνο-δομές, αποτελούμενες κυρίως από φωσφολιπίδια τα οποία όταν βρεθούν μέσα σε ένα υδατικό μέσο διασποράς αυτο-οργανώνονται αυθόρμητα κάτω από κατάλληλες συνθήκες σε δομές διπλοστιβάδων, οι οποίες περικλύουν στο εσωτερικό τους το υδατικό μέσο. Χάρη στην αμφιφιλική δομή τους και τη βιοσυμβατότητά τους με τις βιολογικές μεμβράνες, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως συστήματα στοχευμένης μεταφοράς και ελεγχόμενης αποδέσμευσης, τόσο υδρόφιλων όσο και λιπόφιλων βιοδραστικών μορίων.

Τα ελαστικά λιποσώματα, διαφορετικά τρανσφεροσώματα, έχουν ερευνηθεί εκτενώς ως διαδερμικά συστήματα χορήγησης φαρμάκων, αποφεύγοντας το φαινόμενο πρώτης διόδου από το ήπαρ. Αποτελούνται από φωσφολιπίδια και επιφανειοδραστική ουσία, η οποία βελτιώνει την ελαστικότητα της διπλοστιβάδας, ενισχύοντας την διείσδυση στις βαθύτερες στιβάδες του δέρματος έως τη συστηματική κυκλοφορία, υπό την επίδραση της βαθμίδας ενυδάτωσης, σε σύγκριση με τα συμβατικά άκαμπτα λιποσώματα.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η παρασκευή ελαστικών λιποσωμάτων, με τη μέθοδο ενυδάτωσης λεπτού λιπιδικού υμενίου, χρησιμοποιώντας διαφορετικά λιπίδια και επιφανειοδραστικά, ώστε να μελετηθεί η επίδραση των συστατικών στα φυσικά χαρακτηριστικά και τη φυσική σταθερότητά τους.

Τα φυσικά χαρακτηριστικά των ελαστικών λιποσωμάτων μετρήθηκαν μέσω της μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS). Το μέγεθός τους την ημέρα παρασκευής τους, κυμαινόταν από μικρά έως μεγάλα μονοστιβαδικά κυστίδια (SUVs και LUVs), ανάλογα με την υδροφιλία του επιφανειοδραστικού από το οποίο αποτελούνταν, ενώ η τιμή του δείκτη πολυδιασποράς ήταν κοντά στο μηδέν, υποδηλώνοντας μονοδιασπορά μεγέθους. Η φυσική σταθερότητα αξιολογήθηκε μέσω μετρήσεων του μεγέθους, ως μία σημαντική φυσική ιδιότητα, ανά τακτά χρονικά διαστήματα, σε βάθος χρόνου 30 ημερών και σε συνθήκες αποθήκευσης: i) 4°C, ii) 25°C, iii) 45°C και διαπιστώθηκε ότι η αποθήκευση στους 4°C προάγει την εις βάθος χρόνου φυσική σταθερότητα, ενώ οι υψηλές θερμοκρασίες προτρέπουν την συσσωμάτωση. Τέλος, σύμφωνα με τη μελέτη φυσικής σταθερότητας, κατά πλειοψηφία, τα ελαστικά λιποσώματα αποτελούμενα από το Tween80 ήταν πιο σταθερά όσον αφορά το μέγεθός τους, σε σύγκριση με τα ελαστικά λιποσώματα αποτελούμενα από το Span80, στις συνθήκες δοματίου.

Λέξεις κλειδιά: ελαστικά λιποσώματα, φυσική σταθερότητα, δυναμική σκέδαση φωτός, συσσωμάτωση

Abstract

Liposomes are lipid vesicular nano-structures; consist principally of phospholipids which spontaneously are self-assembled in an aqueous medium under specified circumstances, to form bilayer structures which entrap the aqueous medium, where they are dispersed. Due to their biocompatible and amphiphilic character, they have been extensively used as targeted controlled release delivery systems of both hydrophilic and lipophilic active ingredients.

Elastic liposomes, also called transfersomes, have been widely investigated as transdermal drug delivery systems, surpassing the first-pass effect of the liver and providing an alternative and noninvasive route. Transfersomes consist of phospholipids and a surfactant which increases the elasticity of the bilayer, improving the capability to penetrate efficiently into the deeper skin layers until systemic circulation, under the influence of the hydration gradient, in comparison of conventional rigid liposomes.

The aim of the present study is the formation of elastic liposomes by thin film hydration method, using different lipids and surfactants, in order to determine the effect of the components on their physical characteristics and physical stability.

Physical properties of elastic liposomes were evaluated using dynamic light scattering method (DLS). The particle size at the day of their preparation, was ranged between small and large unilamellar vesicles (SUVs and LUVs), dependent on the hydrophilicity of the surfactant used, while their PDI value was close to zero, indicating monodispersed systems. Physical stability study involved the measure of particle size, as a quantifiable physical property, at selected times over a 30-days period, at storage conditions: i) 4°C, ii) 25°C, iii) 45°C, suggested that refrigerated conditions promote physical stability, while high temperatures induce aggregation. Finally according to physical stability study primarily Tween80 based elastic liposomes were more stable in terms of aggregation, in comparison of Span80 based transfersomes, at ambient conditions.

Keywords: elastic liposomes; physical stability; dynamic light scattering; aggregation

Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες	2
Περίληψη	3
Abstract	4
Κατάλογος εικόνων.....	8
Κατάλογος πινάκων	10
Κεφάλαιο 1. Λιποσώματα.....	11
1.1 Εισαγωγή	11
1.2 Δομή λιποσωμάτων.....	11
1.3 Δομικά συστατικά των λιποσωμάτων.....	13
1.3.1 Φωσφολιπίδια	13
1.3.2 Χοληστερόλη	15
1.4 Κατηγορίες λιποσωμάτων.....	15
1.4.1 Ταξινόμηση με βάση τον αριθμό διπλοστιβάδων και το μέγεθος	15
1.4.2 Ταξινόμηση με βάση την σύσταση.....	17
1.5 Μέθοδοι παρασκευής των λιποσωμάτων.....	19
1.6 Μηχανισμοί εισόδου των λιποσωμάτων στα κύτταρα.....	19
1.7 Εφαρμογές των λιποσωμάτων	20
1.7.1 Στη βιομηχανία φαρμάκων	21
1.7.2 Στη βιομηχανία καλλυντικών	22
1.7.3 Στη βιομηχανία τροφίμων.....	23
Κεφάλαιο 2. Δέρμα και φορείς διαδερμικής χορήγησης.....	24
2.1 Εισαγωγή	24
2.2 Διαδερμική χορήγηση	25
2.2.1 Οδοί διαδερμικής διείσδυσης.....	25
2.2.2 Πλεονεκτήματα διαδερμικής χορήγησης.....	26
2.3 Βελτιστοποίηση διαδερμικής διαπερατότητας	27
2.3.1 Κυστιδικές δομές	28
Κεφάλαιο 3. Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός λιποσωματικών συστημάτων και φυσική σταθερότητα.....	31
3.1 Μέγεθος	31

3.2 Δείκτης πολυδιασποράς (PDI).....	31
3.3 ζ-δυναμικό.....	32
3.4 Σταθερότητα λιποσωμακών συστημάτων.....	33
3.4.1 Φυσική σταθερότητα λιποσωμάτων – Θεωρία DLVO.....	34
Κεφάλαιο 4. Σκοπός της εργασίας.....	37
Κεφάλαιο 5. Πειραματικό μέρος	38
5.1 Υλικά & Αντιδραστήρια	38
5.2 Όργανα & Συσκευές	40
5.3 Παρασκευή ελαστικών λιποσωμάτων (τρανσφεροσωμάτων).....	41
5.3.1 Παρασκευή διαλυμάτων επιφανειοδραστικών σε χλωροφόρμιο και μεθανόλη, συγκέντρωσης 5 mg/ml.....	41
5.3.2 Παρασκευή ελαστικών λιποσωμάτων αποτελούμενα από λιπίδιο και Tween80, σε αναλογία 80:20 w/w.....	41
5.3.3 Παρασκευή ελαστικών λιποσωμάτων αποτελούμενα από λιπίδιο και Span80 σε αναλογία 80:20 w/w.....	42
5.3.4 Παρασκευή ελαστικών λιποσωμάτων αποτελούμενα από λιπίδιο και μίγμα Tween80 και Span80 σε αναλογία 80:10:10 w/w.....	43
5.4 Μέγεθος, κατανομή μεγέθους (ή δείκτης πολυδιασποράς) και ζ-δυναμικό των ελαστικών λιποσωμάτων	46
5.4.1 Αρχή λειτουργίας μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)	47
5.5 Μελέτης της φυσικής σταθερότητας των ελαστικών λιποσωμάτων	48
Κεφάλαιο 6. Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	49
6.1 Χαρακτηρισμός φυσικών ιδιοτήτων των ελαστικών λιποσωμάτων.....	49
6.2 Μελέτη φυσικής σταθερότητας των ελαστικών λιποσωμάτων	54
6.2.1 Μελέτη φυσικής σταθερότητας των ελαστικών λιποσωμάτων DOPC:Επιφανειοδραστικό (80:20 w/w).....	55
6.2.2 Μελέτη φυσικής σταθερότητας των ελαστικών λιποσωμάτων DMPC:Επιφανειοδραστικό (80:20 w/w)	57
6.2.3 Μελέτη φυσικής σταθερότητας των ελαστικών λιποσωμάτων DPPC:Επιφανειοδραστικό (80:20 w/w)	60
6.2.4 Μελέτη φυσικής σταθερότητας των ελαστικών λιποσωμάτων HSPC:Επιφανειοδραστικό (80:20 w/w)	62

6.2.5 Μελέτη φυσικής σταθερότητας των ελαστικών λιποσωμάτων DSPC:Επιφανειοδραστικό (80:20 w/w)	65
6.2.6 Μελέτη φυσικής σταθερότητας των ελαστικών λιποσωμάτων DOPC:DSPC:Επιφανειοδραστικό (40:40:20 w/w).....	67
Κεφάλαιο 7. Συμπεράσματα	70
Βιβλιογραφία	72

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1 Δομή Λιποσωμάτων (MLV). (Αναπαραγωγή από Grumezescu, A. (Ed.). (2016). Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics: Applications of Nanobiomaterials. William Andrew.).....	12
Εικόνα 2 Η δομή των φωσφολιπιδίων. (Αναπαραγωγή από Grumezescu, A. (Ed.). (2016). Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics: Applications of Nanobiomaterials. William Andrew.).....	13
Εικόνα 3 Χημική δομή των φωσφολιπιδίων DOPC, DSPC, DPPC. ^[10]	14
Εικόνα 4. Κατάταξη λιποσωμάτων με βάση το μέγεθος και τον αριθμό των διπλοστιβάδων τους.....	16
Εικόνα 5. Κατηγορίες λιποσωμάτων με βάση την σύστασή τους. Λιπόσωμα παρατεταμένης αποδέσμευσης (πάνω αριστερά), ανοσολιπόσωμα (πάνω δεξιά), κατιονικό λιπόσωμα (κάτω δεξιά), συμβατικό λιπόσωμα (κάτω αριστερά).	18
Εικόνα 6. Οι στιβάδες του δέρματος. (Αναπαραγωγή από Grumezescu, A. (Ed.), (2016). Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics: Applications of Nanobiomaterials. William Andrew).....	25
Εικόνα 7. Απλοποιημένο μοντέλο της κεράτινης στιβάδας που απεικονίζει τις πιθανές οδούς διείσδυσης του φαρμάκου. (Αναπαραγωγή από Attwood, D., & Florence, A. T. (2012). FASTtrack Physical Pharmacy. Pharmaceutical Press).....	26
Εικόνα 8 Σχηματική αναπαράσταση της δομής των τρανσφεροσωμάτων.	30
Εικόνα 9 Ηλεκτρική διπλοστιβάδα και ζ-δυναμικό.	33
Εικόνα 10 Ηλεκτροστατική και στερεοχημική παρεμπόδιση. (Αναπαραγωγή από ENERGY, P. I. (2009). Physical Stability of Disperse Systems).....	36
Εικόνα 11 Πειραματική διαδικασία παρασκευής ελαστικών λιποσωμάτων με τη μέθοδο ενυδάτωσης λεπτού λιπιδικού υμενίου.....	44
Εικόνα 12 Το μέγεθος των ελαστικών λιποσωμάτων, αποτελούμενα από λιπίδιο και επιφανειοδραστικό σε αναλογία 80:20 w/w, την ημέρα παρασκευής τους.....	50
Εικόνα 13 Η πολυδιασπορά των ελαστικών λιποσωμάτων, αποτελούμενα από λιπίδιο και επιφανειοδραστικό σε αναλογία 80:20 w/w, την ημέρα παρασκευής τους.....	52
Εικόνα 14 ζ-δυναμικό ελαστικών λιποσωμάτων, αποτελούμενα από λιπίδιο και επιφανειοδραστικό σε αναλογία 80:20 w/w, την ημέρα παρασκευής τους.....	53
Εικόνα 15 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DOPC:Tween80 (80:20 w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης.....	55
Εικόνα 16 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DOPC:Span80 (80:20 w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης.....	56
Εικόνα 17 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DOPC:Tween80:Span80 (80:10:10 w/w) σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης.....	56

Εικόνα 18 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DMPC:Span80 (80:20w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης.....	57
Εικόνα 19 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DMPC:Tween80 (80:20w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης.....	58
Εικόνα 20 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DMPC:Tween80:Span80 (80:10:10w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης.....	59
Εικόνα 21 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DPPC:Span80 (80:20w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης.....	60
Εικόνα 22 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DPPC:Tween80 (80:20 w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης.....	60
Εικόνα 23 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DPPC:Tween80:Span80 (80:10:10 w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης.....	61
Εικόνα 24 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων HSPC:Tween80 (80:20 w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης.....	62
Εικόνα 25 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων HSPC:Span80 (80:20 w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης.....	63
Εικόνα 26 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων HSPC:Tween80:Span80 (80:10:10 w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης.....	64
Εικόνα 27 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DSPC:Span80 (80:20w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης.....	65
Εικόνα 28 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DSPC:Tween80 (80:20 w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης.....	66
Εικόνα 29 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DSPC:Tween80:Span80 (80:10:10 w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης.....	66
Εικόνα 30 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DOPC:DSPC:Tween80 (40:40:20 w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης.....	67

Εικόνα 31 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DOPC:DSPC:Span80 (40:40:20 w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης.....	68
Εικόνα 32 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DOPC:DSPC:Tween80:Span80 (40:40:10:10 w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης.....	69

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1 Μέθοδοι παρασκευής λιποσωμάτων ^[18-20]	19
Πίνακας 2 Εγκεκριμένα λιποσωμιακά φάρμακα ^[25]	22
Πίνακας 3. Εγκεκριμένα λιποσωμιακά καλλυντικά προϊόντα ^[19]	23
Πίνακας 4 Μέθοδοι ενίσχυσης της διαδερμικής διαπερατότητας	27
Πίνακας 5 Προβλήματα σταθερότητας των λιποσωμάτων. ^[2]	34
Πίνακας 6 Υλικά & αντιδραστήρια της πειραματικής διαδικασίας.	38
Πίνακας 7 Χημική δομή, μοριακός τύπος, μοριακό βάρος, T _m , καθαρό φορτίο, των φωσφολιπιδίων που χρησιμοποιήθηκαν. ^[9, 46]	39
Πίνακας 8 Χημική δομή, Μοριακός τύπος, Μοριακό βάρος, τιμή HLB, των επιφανειοδραστικών Tween 80 και Span 80. ^[47]	40
Πίνακας 9 Όργανα & συσκευές της πειραματικής διαδικασίας.	40
Πίνακας 10 Ποσότητες φωσφολιπιδίων και επιφανειοδραστικών που χρησιμοποιήθηκαν στο κάθε σύστημα.	45
Πίνακας 11 Μέση υδροδυναμική διάμετρος και δείκτης πολυδιασποράς των ελαστικών λιποσωμάτων την ημέρα παρασκευής τους.....	49
Πίνακας 12 ζ-δυναμικό των ελαστικών λιποσωμάτων την ημέρα παρασκευής τους	52

Κεφάλαιο 1. Λιποσώματα

1.1 Εισαγωγή

Τα λιποσώματα, περιγράφηκαν για πρώτη φορά από τον Bangham και τους συνεργάτες του το 1965, ως φωσφολιπιδικά συστήματα τα οποία καθιέρωσαν τις βάσεις για να χρησιμοποιηθούν ως μοντέλα μελέτης των κυτταρικών μεμβρανών. Μέσα σε λίγα χρόνια, πρωτοπόροι όπως ο Γρηγόρης Γρηγοριάδης αναγνώρισε ότι τα λιποσώματα θα μπορούσαν να ενσωματώσουν ουσίες και κατά συνέπεια να χρησιμοποιηθούν ως συστήματα μεταφοράς και παράδοσης δραστικών ουσιών. Στην δεκαετία του 1970 υπήρξε ιδιαίτερο ενδιαφέρον γύρω από την ενδοφλέβια χορήγηση των λιποσωμάτων, ωστόσο ένα μεγάλο πρόβλημα της ενδοφλέβιας έγχυσης λιποσωμάτων στην συστηματική κυκλοφορία αποτελούσε η γρήγορη κάθαρση αυτών από το ήπαρ. Αργότερα στράφηκε το ενδιαφέρον στη χρήση των λιποσωμάτων για τοπική θεραπεία καθώς είναι βιοσυμβατά με τη κεράτινη στιβάδα και παρουσιάζουν το πλεονέκτημα της στοχευμένης θεραπείας στους ασθενείς ιστούς. ^[1,2]

Τα τελευταία χρόνια τα λιποσώματα χρησιμοποιούνται εκτεταμένα ως φορείς βιοδραστικών μορίων στη βιομηχανία φαρμάκων αλλά και καλλυντικών. Λόγω της σύστασής τους, της δομής τους και του μεγέθους τους, παρουσιάζουν ένα μεγάλο αριθμό πλεονεκτημάτων που τα καθιστούν υποσχόμενα συστήματα στοχευμένης μεταφοράς και ελεγχόμενης αποδέσμευσης βιοδραστικών μορίων. Επιπλέον οι βιομηχανίες τροφίμων και γεωργίας έχουν μελετήσει εκτενώς την χρήση των λιποσωμάτων ως συστήματα μεταφοράς ασταθών ενώσεων (π.χ. αντιμικροβιακών, αντιοξειδωτικών, γεύσεων) με σκοπό την προστασία τους από εξωτερικούς παράγοντες. ^[1-4]

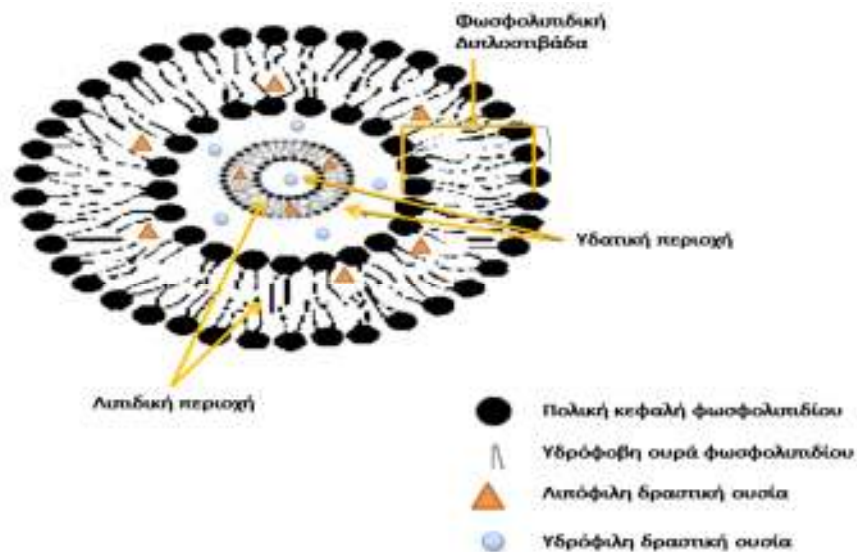
1.2 Δομή λιποσωμάτων

Τα λιποσώματα είναι κλειστές σφαιρικές λιπιδικές δομές λυοτροπικών υγρών κρυστάλλων σε διασπορά, που αποτελούνται από μία ή περισσότερες λιπιδικές διπλοστιβάδες, οι οποίες περικλύουν στο εσωτερικό τους το υδατικό μέσο στο οποίο είναι διεσπαρμένες. Αποτελούνται κυρίως από φυσικά ή συνθετικά φωσφολιπίδια τα οποία όταν βρεθούν μέσα σε ένα υδατικό μέσο διασποράς, κάτω από κατάλληλες συνθήκες και με συγκεκριμένη διαδικασία, συσσωματώνονται αυθόρμητα (αυτο-οργανώνονται), σχηματίζοντας λιπιδικές διπλοστιβάδες. Ο σχηματισμός λιπιδικών διπλοστιβάδων εξαρτάται τόσο από τη συγκέντρωση των φωσφολιπιδίων όσο κι από την χημική τους δομή. ^[3,5]

Ο σχηματισμός των λιποσωμάτων είναι το αποτέλεσμα της κάμψης και της συνένωσης των υδρόφοβων άκρων της λιπιδικής διπλοστιβάδας και απαιτεί προσφορά ενέργειας, με

τη μορφή υπερήχων ή θερμότητας. Για τον σχηματισμό των λιποσωμάτων παίζουν ρόλο οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των λιπιδίων και των λιπιδίων με τα μόρια του ύδατος. Όταν οι υδρόφοβες λιπιδικές αλυσίδες των διπλοστιβάδων έρθουν σε μη ευνοϊκή ενεργειακά επαφή με το υδατικό περιβάλλον, αρχίζουν και κάμπτονται ώστε να συνενωθούν μεταξύ τους, μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, ελαχιστοποιώντας έτσι την έκθεση των λιπιδικών αλυσίδων στο υδατικό μέσο. Η ενέργεια που απαιτείται για την κάμψη της διπλοστιβάδας καλύπτεται από (α) την προσφορά ενέργειας στο σύστημα και (β) την αύξηση της ενέργειας που επιφέρει στο σύστημα η έκθεση των υδρόφοβων τμημάτων της διπλοστιβάδας στο υδατικό περιβάλλον. [5]

Χάρη στην ιδιαίτερη σφαιρική δομή τους, αποτελούμενη από διπλοστιβάδες φωσφολιπιδίων, τα λιποσώματα έχουν την ικανότητα να δρουν σαν φορείς τόσο υδρόφιλων όσο και λιπόφιλων βιοδραστικών μορίων. Τα πολικά μόρια μπορούν να διαλυθούν στον υδατικό πυρήνα που βρίσκεται στο εσωτερικό των διπλοστιβάδων, ενώ τα υδρόφοβα μόρια μπορούν να ενσωματωθούν στις λιπόφιλες περιοχές της διπλοστιβάδας (Εικόνα 1). Ωστόσο το ποσοστό εγκλεισμού εξαρτάται από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του βιοδραστικού μορίου, των φωσφολιπιδίων και της μεθόδου παρασκευής. [3,6]



Εικόνα 1 Δομή Λιποσωμάτων (MLV). (Αναπαραγωγή από Grumezescu, A. (Ed.). (2016). Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics: Applications of Nanobiomaterials. William Andrew.)

1.3 Δομικά συστατικά των λιποσωμάτων

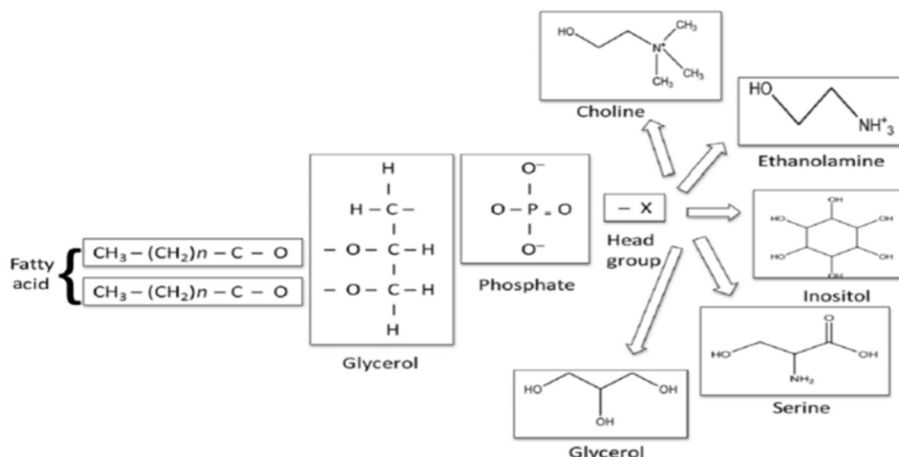
Τα λιποσώματα αποτελούνται κατά κύριο λόγο από φυσικά ή συνθετικά φωσφολιπίδια καθώς και από άλλα συστατικά που βρίσκονται στις βιολογικές μεμβράνες, όπως η χοληστερόλη, αλλά και από άλλα λιπιδικά μόρια. Η φωσφατιδυλοχολίνη (γνωστή και ως λεκιθίνη) και η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη αποτελούν τα δύο κύρια δομικά συστατικά των περισσότερων βιολογικών μεμβρανών και χρησιμοποιούνται ευρέως για την παραγωγή λιποσωμάτων.

1.3.1 Φωσφολιπίδια

Τα φωσφολιπίδια είναι αμφιφιλικά μόρια, αποτελούμενα από μία πολική κεφαλή και δύο υδρόφοβες αλκυλικές αλυσίδες (υδρόφοβη ουρά) και απαρτίζουν το βασικότερο συστατικό της διπλοστιβάδας των λιποσωμάτων. Αποτελούνται από δύο λιπαρά οξέα, ένα μόριο γλυκερόλης και μία ομάδα φωσφόρου τα οποία συνδέονται στη συνέχεια με την ομάδα της κεφαλής (Εικόνα 2). Η πολική κεφαλή μπορεί να αποτελείται από χολίνη, αιθανολαμίνη, γλυκερόλη, ινοσιτόλη ή σερίνη (Εικόνα 2). ^[1,2]

Όταν τα φωσφολιπίδια βρεθούν μέσα σε ένα υδατικό περιβάλλον, συσσωματώνονται αυθόρμητα εξαιτίας του αμφιφιλικού χαρακτήρα τους, σχηματίζοντας λιπιδικές κυστιδικές δομές. Το είδος των λιπιδικών κυστιδικών δομών (π.χ. Διπλοστιβάδες, κυβικές δομές, εξαγωνικές δομές) εξαρτάται από: ^[2]

- Την χημική δομή της πολικής κεφαλής
- Το βαθμό ακορεστότητας και το μήκος των αλκυλικών αλυσίδων
- Το pH και την ιονική ισχύ του υδατικού μέσου



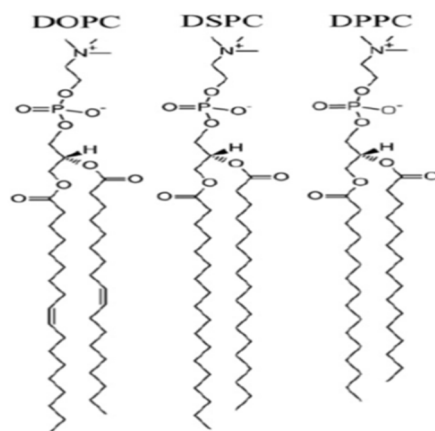
Εικόνα 2 Η δομή των φωσφολιπιδίων. (Αναπαραγωγή από Grumezescu, A. (Ed.). (2016). Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics: Applications of Nanobiomaterials. William Andrew.)

Οι φωσφολιπιδικές διπλοστιβάδες ανάλογα με τη σύστασή τους μπορεί να βρίσκονται είτε σε κατάσταση «γέλης» (gel state), που χαρακτηρίζεται από άκμπτες και μη ανθεκτικές διπλοστιβάδες, είτε στην «υγρή κρυσταλλική» κατάσταση (liquid crystalline), όπου είναι πιο εύκαμπτες και παρουσιάζουν μεγαλύτερη ρευστότητα. Οι μεσομορφές που μπορούν να λάβουν κατά την μετάβαση φάσεων, οφείλονται στην λυοτροπική συμπεριφορά των λιποσωμάτων και σχετίζονται με την θερμική καταπόνηση που αυτά υφίστανται, είτε κατά την αποθήκευσή τους, είτε κατά την χορήγηση στον άνθρωπο. Τα λιποσωματικά σκευάσματα που βρίσκονται σε κατάσταση «γέλης» παρουσιάζουν μειωμένη διαπερατότητα από το δέρμα και συνήθως παρατηρείται συσσώρευση της δραστικής ουσίας στις ανώτερες στιβάδες του δέρματος, σε σύγκριση με αυτά που βρίσκονται στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση. [7,8]

Η μετάβαση μεταξύ αυτών των δύο φάσεων είναι αντιστρεπτή και η θερμοκρασία μετάπτωσης T_m των φωσφολιπιδίων, από την φάση γέλης στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση, εξαρτάται από:

1. Την ομάδα της πολικής κεφαλής του φωσφολιπιδίου
2. Το μήκος των λιπόφιλων υδρογονανθρακικών αλυσίδων
3. Τον βαθμό κορεσμού των υδρογονανθρακικών αλυσίδων
4. Την ύπαρξη διακλαδώσεων.

Πιο αναλυτικά, φωσφολιπίδια με μακρύτερες υδρογονανθρακικές αλυσίδες έχουν υψηλότερο T_m από αυτά με τις πιο «κοντές». Για παράδειγμα το T_m του DSPC είναι 55°C , ενώ του DPPC είναι 41°C . Τα φωσφολιπίδια με την ίδια ομάδα πολικής κεφαλής και μήκος αλειφατικών αλυσίδων, έχουν υψηλότερο T_m όσο αυξάνεται ο βαθμός κορεσμού. Για παράδειγμα το T_m του DSPC είναι 55°C , ενώ του DOPC -20°C (Εικόνα 3). [9]



Εικόνα 3 Χημική δομή των φωσφολιπιδίων DOPC, DSPC, DPPC. [10]

1.3.2 Χοληστερόλη

Οι διπλοστιβάδες των λιποσωμάτων περιέχουν επίσης και άλλα συστατικά όπως είναι η χοληστερόλη. Η χοληστερόλη ως βιομόριο δεν μπορεί να σχηματίσει από μόνη της δομές διπλοστιβάδων, ωστόσο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλες συγκεντρώσεις ως δομικό συστατικό των λιποσωμάτων με σκοπό να βελτιώσει τα χαρακτηριστικά των φωσφολιπιδικών διπλοστιβάδων. Σε πολλές έρευνες που είχαν γίνει στο παρελθόν, διαπιστώθηκε ότι τα λιποσώματα που αποτελούνταν μόνο από φωσφολιπίδια παρουσίαζαν προβλήματα διαρροής στον ορό του αίματος ή στο πλάσμα, εξαιτίας της αλληλεπίδρασής τους με λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας. Το πρόβλημα αυτό λύθηκε σε μεγάλο βαθμό με την ενσωμάτωση της χοληστερόλης στις φωσφολιπιδικές διπλοστιβάδες. Συγκεκριμένα η χοληστερόλη επιλέχθηκε για την βελτίωση της ρευστότητας και της σταθερότητας της λιπιδικής διπλοστιβάδας, που είναι απαραίτητα για την λειτουργική της έκφραση. Επιπλέον η χοληστερόλη μειώνει την ελευθερία περιστροφής των υδρογονανθρακικών αλυσίδων των φωσφολιπιδίων γεγονός που συμβάλλει στη μείωση της απώλειας υδρόφιλων μορίων μέσω της διπλοστιβάδας. ^[1,6,11]

1.4 Κατηγορίες λιποσωμάτων

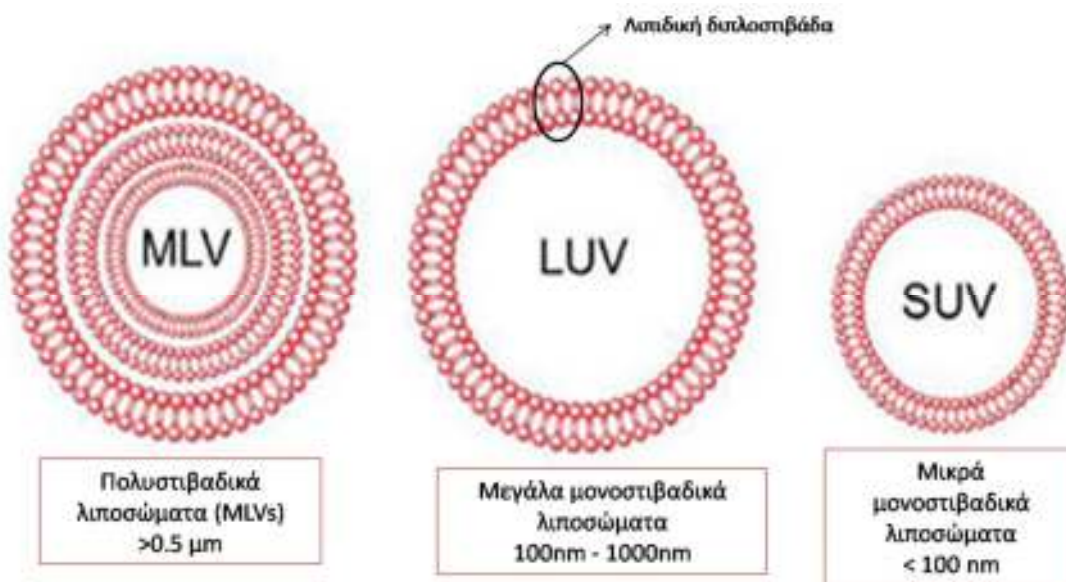
Τα λιποσώματα ανήκουν στην κατηγορία των λιπιδικών κυστιδικών δομών και έχουν μέγεθος από 30 nm μέχρι κάποια μικρόμετρα. Η ταξινόμηση των λιποσωμάτων έχει καθιερωθεί να γίνεται με βάση (α) το μέγεθός τους, (β) τον αριθμό διπλοστιβάδων και (γ) την σύστασή τους.

1.4.1 Ταξινόμηση με βάση τον αριθμό διπλοστιβάδων και το μέγεθος

Το μέγεθος και ο αριθμός των φωσφολιπιδικών διπλοστιβάδων αποτελούν κρίσιμες παραμέτρους των λιποσωμάτων καθώς επηρεάζουν τον χρόνο ημιζωής τους μέσα στη συστηματική κυκλοφορία και επιπλέον επηρεάζουν την έκταση της απόδοσης εγκλεισμού. ^[12] Τα λιποσώματα με βάση τον αριθμό των φωσφολιπιδικών διπλοστιβάδων που αποτελούνται ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες:

1. **Πολυστιβαδικά κυστίδια (MLVs).** Τα MLVs αποτελούνται από περισσότερες από μία διπλοστιβάδες και το μέγεθός τους είναι μεγαλύτερο από 0.5 μm . Είναι αποτελεσματικότερα στον εγκλεισμό υδρόφοβων μορίων, καθώς αποτελούνται από μεγάλη συνολικά υδρόφοβη επιφάνεια. Παρουσιάζουν αυξημένη σταθερότητα σε βάθος χρόνου κατά την αποθήκευσή τους, ωστόσο απομακρύνονται εύκολα από την κυκλοφορία του αίματος, λόγω του ότι γίνονται αντιληπτά από τα φαγοκύτταρα. Παρασκευάζονται μέσω της μεθόδου ενυδάτωσης λεπτού λιπιδικού υμενίου ή την εξάτμιση αντιστρόφου φάσεως.

2. **Μονοστιβαδικά κυστίδια (ULVs).** Τα μονοστιβαδικά κυστίδια (ULVs) αποτελούνται από μία μόνο διπλοστιβάδα και μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω με βάση το μέγεθος τους σε:
- Μικρά μονοστιβαδικά κυστίδια (SUVs).** Τα SUVs αποτελούνται από μία μόνο φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα, έχουν μέγεθος μικρότερο από 100nm και γενικά παρουσιάζουν μεγάλη ομοιομορφία μεγέθους. Ωστόσο είναι θερμοδυναμικά ασταθή και για αυτό είναι επιρρεπή στην συσσωμάτωση προς σχηματισμό μεγαλύτερων λιποσωμάτων. Λόγω του μεγέθους τους, παρουσιάζουν περιορισμό στην ενσωμάτωση μεγάλων μακρομορίων και επίσης έχουν μικρότερη υδατική επιφάνεια σε σύγκριση με την λιπιδική επιφάνεια. Επιπλέον χάρη στο μέγεθός τους εμφανίζουν μεγάλο χρόνο ημιζωής στην κυκλοφορία του αίματος, καθώς γίνονται δύσκολα ανιληπτά από τα φαγοκύτταρα. Παρασκευάζονται με μείωση του μεγέθους των LUVs και των MLVs, μέσω εξώθησης από εκβολέα ή κατεργασίας με υπερήχους (probe sonication).
 - Μεγάλα μονοστιβαδικά κυστίδια (LUVs).** Αποτελούνται από μία μόνο φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα η οποία περικλύει στο εσωτερικό της το υδατικό μέσο διασποράς και το μέγεθός τους κυμαίνεται από 100nm – 1000nm. Είναι αποτελεσματικότερα στον εγκλεισμό υδρόφιλων μορίων, καθώς η επιφάνεια που καλύπτει ο υδρόφιλος πυρήνας είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη λιπιδική επιφάνεια. Λόγω του μεγάλου μεγέθους τους αναγνωρίζονται εύκολα από τα φαγοκύτταρα με αποτέλεσμα την γρήγορη κάθαρσή τους όπως και τα MLVs. Παρασκευάζονται μέσω της έγχυσης αιθέρα ή της εξάτμισης αντιστρόφου φάσεως. [4,12,13]



Εικόνα 4. Κατάταξη λιποσωμάτων με βάση το μέγεθος και τον αριθμό των διπλοστιβάδων τους

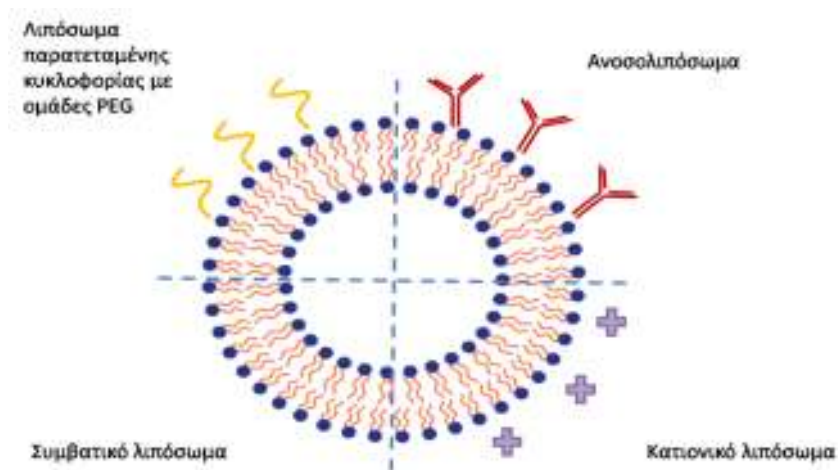
1.4.2 Ταξινόμηση με βάση την σύσταση

Τα λιποσώματα αποτελούνται κατά κύριο λόγο από φυσικά ή συνθετικά φωσφολιπίδια, όμως μπορεί να περιέχουν και άλλα συστατικά όπως χοληστερόλη, υδρόφιλα πολυμερή, λιπίδια, φορτισμένες ομάδες, επιφανειοδραστικά μόρια, με σκοπό την βελτίωση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών της διπλοστιβάδας και στόχευση συγκεκριμένων ιστών/κυττάρων. Ακολουθώς τα λιποσώματα μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω με βάση την σύσταση τους στις εξής κατηγορίες:

- **Συμβατικά (conventional).** Τα λιποσώματα αυτά αποτελούνται από ουδέτερα φωσφολιπίδια (δηλαδή φωσφολιπίδια που το συνολικό τους φορτίο είναι μηδενικό, λόγω ισάριθμων θετικών και αρνητικών φορτίων) ή ανιονικά φορτισμένα φωσφολιπίδια. ^[12]
- **Κατιονικά (cationic).** Ως κατιονικά, χαρακτηρίζονται τα λιποσώματα που φέρουν καθαρό θετικό φορτίο. Αυτού του είδους τα λιποσώματα εφαρμόζονται σχεδόν αποκλειστικά στην ενδοκυττάρια μεταφορά αρνητικά φορτισμένων μακρομορίων, όπως των νουκλεϊκών οξέων DNA και RNA, αλλά και ολιγονουκλεοτιδίων. Η κύρια εφαρμογή αυτών των λιποσωμάτων είναι η γονιδιακή θεραπεία. ^[12,14]
- **Ανοσολιποσώματα (Immunoliposomes).** Τα ανοσολιποσώματα φέρουν στην επιφάνειά τους ένα αντίσωμα, το οποίο λειτουργεί ως κέντρο αναγνώρισης από αντιγόνα που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων στόχων. Συνήθως το αντίσωμα συνδέεται ομοιοπολικά με δραστική ομάδα στην επιφάνεια της διπλοστιβάδας, η οποία είναι συνήθως το μόριο του μαλεϊμιδίου. Η χρήση των ανοσολιποσωμάτων στοχεύει στην μεταφορά του εγκλωβισμένου μορίου στο κύτταρο στόχο, μειώνοντας έτσι την τοξικότητα και τις ανεπιθύμητες παρενέργειες εκτός κυττάρων-στόχων. ^[12,14]
- **Παρατεταμένης κυκλοφορίας (long circulation ή stealth®).** Τα πολικά άκρα των φωσφολιπιδίων της διπλοστιβάδας αυτών των λιποσωμάτων είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένα με το υδρόφιλο πολυμερές, πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG). Η υδρόφιλη φύση της πολυαιθυλενογλυκόλης έχει σαν αποτέλεσμα την παρεμπόδιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ αυτών των λιποσωμάτων και των πρωτεϊνών του πλάσματος (οψονίνες), μειώνοντας έτσι την πιθανότητα αναγνώρισης από τα φαγοκύτταρα. Έτσι τα λιποσώματα αυτά παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στην κυκλοφορία του αίματος, χωρίς να απαιτείται να έχουν αναγκαστικά μικρό μέγεθος. Τα λιποσώματα των οποίων η επιφάνεια είναι συνδεδεμένη με μόρια πολυαιθυλενογλυκόλης, ονομάστηκαν αργότερα Stealth®, λόγω της ικανότητάς τους να ξεφεύγουν από το ανοσοποιητικό σύστημα. ^[4,12,14]
- **pH-ευαίσθητα (pH-sensitive).** Τα λιποσώματα αυτής της κατηγορίας είναι χρήσιμα σε εφαρμογές στοχευμένης θεραπείας σε περιοχές του σώματος όπου το pH είναι χαμηλότερο από το φυσιολογικό. Τέτοιες περιοχές είναι οι όγκοι, οι

φλεγμονές και οι μολύνσεις. Τιμές pH χαμηλότερες από 6.5 μπορούν να αποσταθεροποιήσουν την λιπιδική διπλοστιβάδα των pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του εγκλωβισμένου φαρμάκου στην πάσχουσα περιοχή. [12,14]

- **Θερμο-ευαίσθητα (Temperature-sensitive).** Τα θερμο-ευαίσθητα λιποσώματα σε θερμοκρασία υψηλότερη από την θερμοκρασία μετάπτωσης των λιπιδίων τους, μεταβαίνουν από την φάση γέλης στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση, όπου αυξάνεται η ρευστότητα και η διαπερατότητα της διπλοστιβάδας, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της εγκλωβισμένης δραστικής ουσίας. Τα θερμο-ευαίσθητα λιποσώματα βρίσκουν εφαρμογή στη θεραπεία του καρκίνου. Η στόχευση των όγκων μέσω των θερμο-ευαίσθητων λιποσωμάτων οφείλεται στην τοπική υπερθερμία που παρουσιάζουν τα καρκινικά κύτταρα. Συγκεκριμένα χρησιμοποιούνται λιποσώματα αποτελούμενα από λιπίδια με T_m υψηλότερη από την φυσιολογική θερμοκρασία των υγιών οργανιδίων, τα οποία όταν συναντήσουν τους όγκους, λόγω της υψηλότερης θερμοκρασίας που επικρατεί σε αυτές τις περιοχές, μεταβαίνουν από την κατάσταση γέλης στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση και αποδεσμεύουν την εγκλωβισμένη δραστική ουσία. [6,12,14]
- **Τρανσφεροσώματα (transfersomes).** Αποτελούνται από φωσfolιπίδια και επιφανειοδραστικές ουσίες, οι οποίες βελτιώνουν την ελαστικότητα της διπλοστιβάδας, σε σύγκριση με τα συμβατικά άκαμπα λιποσώματα, γεγονός που τα κάνει κατάλληλα για διαδερμική χορήγηση δραστικών ουσιών. Εκτενέστερη αναφορά στα τρανσφεροσώματα γίνεται στο κεφάλαιο 2.3.1. [15-17]



Εικόνα 5 Κατηγορίες λιποσωμάτων με βάση την σύστασή τους. Λιπόσωμα παρατεταμένης αποδέσμευσης (πάνω αριστερά), ανοσολιπόσωμα (πάνω δεξιά), κατιονικό λιπόσωμα (κάτω δεξιά), συμβατικό λιπόσωμα (κάτω αριστερά).

1.5 Μέθοδοι παρασκευής των λιποσωμάτων

Οι τεχνικές που μπορούν να εφαρμοσθούν για την παραγωγή των λιποσωμάτων είναι ποικίλες και απαιτούν την παροχή ενέργειας, ώστε οι φωσφολιπιδικές διπλοστιβάδες να καμφθούν και να σχηματίσουν κλειστές σφαιρικές δομές.^[5] Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εξαρτάται από τα επιθυμητά χαρακτηριστικά και το επιθυμητό μέγεθος των λιποσωμάτων που θα προκύψουν. Οι μέθοδοι παρασκευής μπορούν να ταξινομηθούν στις κλασικές μεθόδους και στις καινοτόμες οι οποίες είναι κατάλληλες για παραγωγή μεγάλης κλίμακας και αναφέρονται συνοπτικά στον πίνακα 1.

Πίνακας 1 Μέθοδοι παρασκευής λιποσωμάτων^[18-20]

Μέθοδοι παρασκευής λιποσωμάτων			
Κλασικές μέθοδοι		Καινοτόμες μέθοδοι μεγάλης κλίμακας	
1. Ενυδάτωση λεπτού λιπιδικού υμενίου		1. Θερμική μέθοδος	
2. Εξάτμιση αντιστρόφου φάσεως		2. Ξήρανση με ψεκασμό (Spray drying)	
3. Έγχυση οργανικού διαλύτη		3. Λυοφιλοποίηση	
4. Διάλυση με επιφανειοδραστικές ουσίες		4. Υπερκρίσιμη εξάτμιση αντιστρόφου φάσεως	

1.6 Μηχανισμοί εισόδου των λιποσωμάτων στα κύτταρα

Τα λιποσώματα αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα και έχουν το πλεονέκτημα της μεταφοράς των βιοδραστικών μορίων στο εσωτερικό των κυττάρων, μέσω διαφόρων μηχανισμών. Από *in vivo* και *in vitro* μελέτες που έχουν διεξαχθεί, διαπιστώθηκε ότι ένας κύριος μηχανισμός αλληλεπίδρασης των λιποσωμάτων με τα κύτταρα, είναι η απλή προσρόφηση. Τα λιποσώματα προσροφώνται στα κύτταρα μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων ή υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με τα συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης. Ένας άλλος πολύ συχνός μηχανισμός εισόδου των λιποσωμάτων στα κύτταρα είναι η φαγοκύτωση, από τα φαγοκύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος, όπως είναι τα μακροφάγα κύτταρα και τα ουδετερόφιλα. Τρίτος μηχανισμός εισόδου των λιποσωμάτων είναι η σύντηξη με την μεμβράνη των κυττάρων του πλάσματος. Η λιπιδική σύσταση των λιποσωμάτων μπορεί να μεταβάλλει την ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης και να συντηχθεί με τα κύτταρα. Κατά τη σύντηξη των λιποσωμάτων με την κυτταρική μεμβράνη η λιπιδική διπλοστιβάδα εισάγεται στη μεμβράνη του πλάσματος και ταυτόχρονα απελευθερώνεται το εγκλωβισμένο μόριο στο κυτταρόπλασμα.^[4,21]

1.7 Εφαρμογές των λιποσωμάτων

Τα λιποσώματα χρησιμοποιούνται εκτεταμένα ως φορείς βιοδραστικών μορίων στη βιομηχανία φαρμάκων αλλά και καλλυντικών. Επιπλέον οι βιομηχανίες τροφίμων και γεωργίας έχουν μελετήσει εκτενώς την χρήση των λιποσωμάτων ως συστήματα μεταφοράς ασταθών ενώσεων (π.χ. αντιμικροβιακών, αντιοξειδωτικών, γεύσεων) με σκοπό την προστασία τους από εξωτερικούς παράγοντες. [4,22]

Συνοπτικά τα πλεονεκτήματα χρήσης των λιποσωμάτων είναι τα εξής:

- *Βιοσυμβατότητα.* Τα λιποσώματα αποτελούνται από συστατικά που υπάρχουν στις βιολογικές μεμβράνες των κυττάρων (π.χ. λιπίδια, στερόλες), γεγονός που τους δίνει την ιδιότητα να είναι βιοαποικοδομήσιμα, χαμηλής εγγενούς τοξικότητας και σχεδόν καθόλου ανοσογόνα.
- *Εγκλωβισμός τόσο υδρόφιλων όσο και λιπόφιλων βιοδραστικών μορίων.* Χάρη στην ιδιαίτερη κλειστή σφαιρική δομή τους, αποτελούμενη από διπλοστιβάδες φωσφολιπιδίων, τα λιποσώματα έχουν την ικανότητα να δρουν σαν φορείς βιοδραστικών μορίων με διαφορετικές λιποφιλίες. Τα πολικά μόρια μπορούν να εγκλωβιστούν στον υδατικό πυρήνα που βρίσκεται στο εσωτερικό των διπλοστιβάδων, ενώ τα υδρόφοβα μόρια μπορούν να ενσωματωθούν στις λιπόφιλες περιοχές της διπλοστιβάδας. Ενώ τα μόρια με ενδιάμεσο logP εγκλωβίζονται μεταξύ των υδατικών και λιπαρών περιοχών.
- *Στοχευμένη θεραπεία.* Τροποποιώντας τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των λιποσωμάτων, (όπως το μέγεθος, το φορτίο, τη σύσταση της επιφάνειας της διπλοστιβάδας, τη λιπιδική σύσταση), μπορούν να δράσουν ως φορείς βιοδραστικών μορίων σε συγκεκριμένα κύτταρα-στόχους. Με αυτό τον τρόπο αποφεύγεται η συσσώρευση του βιοδραστικού μορίου στους υγιείς ιστούς-κύτταρα μειώνοντας έτσι τις ανεπιθύμητες παρενέργειες και την τοξικότητα.
- *Ελεγχόμενη αποδέσμευση του βιοδραστικού μορίου.* Τα λιποσώματα μπορούν να δράσουν ως δεξαμενές συσσώρευσης του βιοδραστικού μορίου (micro-reservoir concept), το οποίο αποδεσμεύουν σταδιακά με ελεγχόμενο ρυθμό, τροποποιώντας έτσι την φαρμακοκινητική και την φαρμακοδυναμική του. Έτσι βελτιώνεται το θεραπευτικό αποτέλεσμα και παράλληλα μειώνεται η τοξικότητα του μορίου.
- *Τροποποίηση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του εγκλωβισμένου βιοδραστικού μορίου.* Τα λιποσώματα βελτιώνουν την διαλυτότητα και τον συντελεστή διάχυσης των εγκλωβισμένων μορίων. Πολύ σημαντική είναι η βελτίωση της διαλυτότητας υδρόφοβων μορίων.
- *Προστασία εγκλωβισμένου βιοδραστικού μορίου.* Τα λιποσώματα συμβάλλουν στην προστασία του εγκλωβισμένου μορίου τόσο από εξωτερικούς παράγοντες, όσο και από αποικοδομητικά ένζυμα του οραγνισμού. Έτσι το εγκλωβισμένο

μόριο προστατεύεται από την οξείδωση και την αποικοδόμηση έως ότου φτάσει στον στόχο.

- *Διάφοροι οδοί χορήγησης.* Τα λιποσώματα μπορούν να χορηγηθούν μέσω διαφόρων οδών χορήγησης όπως από το στόμα, οφθαλμικά, ρινικά, ενδομυϊκά, υποδόρια, τοπικά και ενδοφλέβια. ^[2,4,23]

Στις επομένους παραγράφους παρουσιάζεται η εφαρμογή των λιποσωμάτων στους επιμέρους τομείς.

1.7.1 Στη βιομηχανία φαρμάκων

Τα λιποσώματα μπορούν να παρασκευαστούν σε διάφορες φαρμακοτεχνολογικές μορφές, όπως υδατικές διασπορές, στερεές μορφές (ξηρή πούδρα) ή ημιστερεές μορφές (γέλες, κρέμες) και ανάλογα από τη μορφή που έχουν μπορούν να χορηγηθούν είτε στη συστηματική κυκλοφορία, είτε τοπικά.

Μετά από ενδοφλέβια χορήγηση, τα λιποσώματα αναγνωρίζονται ως ξένα σωματίδια, με αποτέλεσμα την φαγοκύτωσή τους από τα μακροφάγα κύτταρα του δικτυοενδοθυλιακού συστήματος. Έτσι τα λιποσώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συστήματα μεταφοράς βιοδραστικών μορίων στα προαναφερθέντα κύτταρα. Αντιθέτως τα στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα, δεν αναγνωρίζονται από τα φαγοκύτταρα, με αποτέλεσμα την συσσώρευσή τους σε περιοχές όπου υπάρχουν όγκοι, λοίμωξη ή φλεγμονή. Η συσσώρευσή τους αυτή οφείλεται στην παρατεταμένη κυκλοφορία και/ή στο μικρό τους μέγεθος. ^[19]

Τα λιποσώματα έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στην στοχευμένη θεραπεία και ειδικά στη θεραπεία του καρκίνου μειώνοντας έτσι την τοξικότητα και τις παρενέργειες στους υγιείς ιστούς. Τα αιμοφόρα αγγεία των όγκων, είναι περισσότερο διαπερατά από αυτά των υγιών ιστών, επειδή αναπτύσσονται με ταχύ ρυθμό για να μπορέσουν να υποστηρίξουν την γρήγορη ανάπτυξη του όγκου. Έτσι τα λιποσώματα με διάμετρο έως 600 nm μπορούν να διαπεράσουν τα αιμοφόρα αγγεία του όγκου και να συσσωρευτούν στα καρκινικά κύτταρα (παθητική στόχευση). Παραδείγματα διαθέσιμων φαρμακευτικών σκευασμάτων που υπάρχουν στην αγορά είναι το Doxil® και το DaunoXome®. Το πρώτο περιέχει δοξορουβικίνη εγκλωβισμένη σε στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα με πολυαιθυλενογλυκόλη και χορηγείται για την θεραπεία του σαρκώματος Kaposi, και διαφόρων τύπων καρκίνου. Το DaunoXome® περιέχει δαουνορουβικίνη εγκλωβισμένη σε μικρά λιποσώματα και χορηγείται για την θεραπεία του σαρκώματος Kaposi. ^[19,23,24]

Επιπλέον τα λιποσώματα χρησιμοποιούνται για την βελτίωση της διαλυτότητας δυσδιάλυτων βιοδραστικών μορίων. Ένα παράδειγμα αποτελεί το AmBisome® το οποίο περιέχει αμφοτερικίνη Β εγκλωβισμένη σε μικρά λιποσώματα και διατίθεται στο εμπόριο στην Ευρώπη και στην Αμερική από το 1990 και το 1997 αντίστοιχα. Η αμφοτερικίνη Β

χρησιμοποιείται για την θεραπεία μυκητιασικών λοιμώξεων, εξαιτίας όμως της χαμηλής διαλυτότητάς της, περιορίζεται η χρήση της. Έτσι με τον εγκλωβισμό της αμφοτερικίνης B σε λιποσώματα, βελτιώνεται η διαλυτότητά της, και η θεραπευτική αποτελεσματικότητά της και μειώνεται η τοξικότητά της. [6,19,25]

Τέλος τα λιποσώματα είναι χρήσιμα «οχήματα» μεταφοράς βιοδραστικών μορίων μέσω του δέρματος, με σκοπό την θεραπεία διαφόρων δερματικών παθήσεων. Χάρη στην ομοιότητα των βιολογικών μεμβρανών με τα λιπίδια της διπλοστιβάδας των λιποσωμάτων, τα τελευταία όταν εφαρμόζονται τοπικά, έχουν την ικανότητα να αποσταθεροποιούν την συμπαγή λιπιδική δομή της κεράτινης στιβάδας, μεταβάλλοντας έτσι την λειτουργία φραγμού. Επιπλέον τα λιποσώματα έχουν την ιδιότητα να ενισχύουν την ενυδάτωση της κεράτινης στιβάδας με αποτέλεσμα την αύξηση της διαδερμικής απορρόφησης βιοδραστικών μορίων. Ως εκ τούτου, τα λιποσώματα είναι ένας πολλά υποσχόμενος φορέας για την ενσωμάτωση δραστικών μορίων για τοπική χορήγηση, όπως τα κορτικοειδή, τα ρετινοειδή και τα τοπικά αναισθητικά, με σκοπό την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητάς τους και τη μείωση των παρενεργειών. [19]

Πίνακας 2 Εγκεκριμένα λιποσωματικά φάρμακα [25]

Εμπορική ονομασία	Δραστική ουσία	Σύσταση	Ένδειξη	Οδός χορήγησης
Doxil® / Caelyx®	Δοξορουβικίνη	HSPC-χοληστερόλη-PEG2000DSPE	Σάρκωμα Kaposi, καρκίνους μαστού και ωοθηκών	ενδοφλέβια
Myocet®	Δοξορουβικίνη	EPC-χοληστερόλη	Καρκίνος μαστού	ενδοφλέβια
DaunoXome®	Δαουνορουβικίνη	DSPC-χοληστερόλη	Σάρκωμα Kaposi	ενδοφλέβια
Lipo-dox®	Δοξορουβικίνη	DSPC-χοληστερόλη-PEG2000DSPE	Σάρκωμα Kaposi, καρκίνους μαστού και ωοθηκών	ενδοφλέβια
Ambisome®	Αμφοτερικίνη B	HSPC-DSPG-χοληστερόλη	Σοβαρές μυκητιασικές λοιμώξεις	ενδοφλέβια
Marqibo®	Θειικό άλας βινικριστίνης	Αυγό σφιγγομελίνης-χοληστερόλη	Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία	ενδοφλέβια

1.7.2 Στη βιομηχανία καλλυντικών

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης των λιποσωμάτων βρίσκουν εφαρμογή και στη βιομηχανία των καλλυντικών. Τα λιποσώματα αποτελούν πολύτιμες πρώτες ύλες για την ανάπλαση του δέρματος μέσω της αναπλήρωσης λιπιδικών μορίων και υγρασίας. Ακόμα και τα κενά λιποσώματα είναι καλά ενυδατωμένα, συμβάλλοντας έτσι στην ενυδάτωση του δέρματος. Πολλές φορές η ενυδάτωση είναι αρκετή για την βελτίωση της ελαστικότητας του δέρματος και την ενίσχυση της λειτουργίας του φραγμού, που

αποτελούν κύριες αιτίες για την γήρανση του δέρματος. Επιπλέον τα λιποσώματα όταν εφαρμόζονται τοπικά, είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία ενός λεπτού λιπιδικού φιλμ πάνω στο δέρμα, το οποίο ενισχύει την ενυδάτωσή του, μειώνοντας την άδηλη απώλεια υγρασίας. Τέλος τα λιποσώματα μπορούν να μειώσουν την τραχύτητα του δέρματος, καθώς αλληλεπιδρούν με τα κερατινοκύτταρα με αποτέλεσμα το δέρμα να γίνεται πιο λείο και απαλό.

Το πρώτο λιποσωμιακό καλλυντικό προϊόν που κυκλοφόρησε ήταν η αντιγηραντική κρέμα “Capture”, της εταιρείας Christian Dior, το 1986. Από τότε έως σήμερα έχουν κυκλοφορήσει στην αγορά πολλά λιποσωμιακά καλλυντικά προϊόντα, που κυμαίνονται από απλές λιποσωμιακές πάστες έως πιο περίπλοκα σκευάσματα που περιέχουν διάφορα εκχυλίσματα, διυγρानτικά και άλλα πολύτιμα συστατικά. ^[19]

Πίνακας 3. Εγκεκριμένα λιποσωμιακά καλλυντικά προϊόντα ^[19]

Εμπορική ονομασία	Κατασκευαστής	Ενεργά συστατικά
Capture®	Christian Dior	Λιποσώματα σε γέλη
Effect du Soleil®	L'Oréal	Παράγοντες μαυρίσματος σε λιποσώματα
Future perfect skin gel®	Estée Lauder	Βιταμίνη E, A, κεραμίδιο
Eye perfector®	Avon	Κρέμα για τον ερεθισμό του ματιού
Flawless Finish®	Elisabeth Arden	Υγρό make-up

1.7.3 Στη βιομηχανία τροφίμων

Οι επιστήμονες τροφίμων ερευνούν τη χρήση των λιποσωμάτων ως συστήματα μεταφοράς, ελεγχόμενης αποδέσμευσης και προστασίας των λειτουργικών συστατικών, όπως είναι οι πρωτεΐνες, τα ένζυμα, οι βιταμίνες, τα αντιοξειδωτικά και οι γεύσεις.

Ο εγκλωβισμός ενζύμων μέσα σε λιποσώματα και η παρατεταμένη απελευθέρωσή τους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διάφορες διεργασίες ζύμωσης, με σκοπό την σημαντική μείωση του χρόνου ζύμωσης και την βελτίωση της ποιότητας του προϊόντος. Ένα κλασικό παράδειγμα είναι η παραγωγή τυριού. Από μελέτες που έγιναν αποδείχθηκε ότι ο λιποσωμιακός εγκλωβισμός ενζύμων μείωσε τον χρόνο που απαιτείται για την ωρίμανση του τυριού από 30% έως 50%. Αυτό επιφέρει μεγάλο οικονομικό κέρδος, καθώς ο χρόνος ωρίμανσης πολλών τυριών, όπως το cheddar, κυμαίνεται περίπου στον ένα χρόνο και απαιτεί ελεγχόμενες συνθήκες. ^[19,26]

Κεφάλαιο 2. Δέρμα και φορείς διαδερμικής χορήγησης

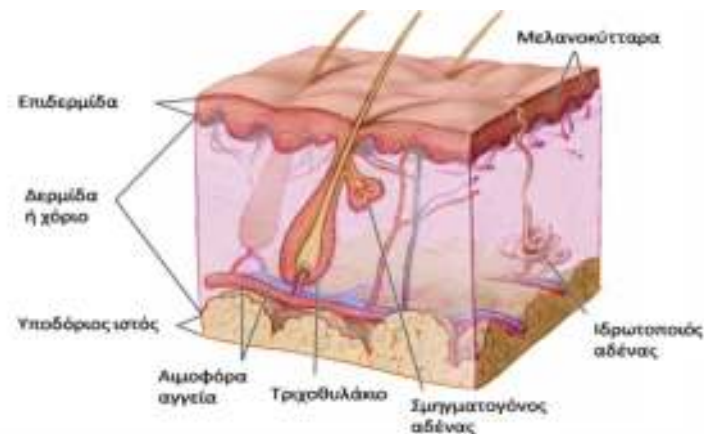
2.1 Εισαγωγή

Το δέρμα αποτελεί μία εναλλακτική οδό χορήγησης δραστικών ουσιών και παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα. Οι φαρμακτοτεχνικές μορφές που εφαρμόζονται τοπικά στο δέρμα, χωρίζονται σε αυτές που έχουν τοπική δράση (δρουν στην επιφάνεια ή κάτω από το σημείο εφαρμογής) και σε αυτές που έχουν συστηματική δράση (δηλαδή διοχετεύονται στη γενική κυκλοφορία, μέσω των στιβάδων του δέρματος. Το δέρμα είναι το μεγαλύτερο όργανο του ανθρώπινου σώματος. Αποτελεί το προστατευτικό κάλυμμα του σώματος και έχει την ικανότητα να αναγεννάται και να αυτο-επιδιορθώνεται όταν βλάπτεται. Η κύρια λειτουργία του δέρματος είναι ο φραγμός. [7,27]

Το δέρμα σε κάθετη τομή, αποτελείται από τρεις στιβάδες: (α) την επιδερμίδα, (β) την δερμίδα ή χόριο και (γ) τον υποδόριο ιστό (Εικόνα 6). Η επιδερμίδα χωρίζεται και αυτή με τη σειρά της στις εξής στιβάδες: τη βασική, την ακανθωτή, την κοκκιώδη, τη διαφανή και την κεράτινη στιβάδα. Η τελευταία ανήκει στη μη-ζώσα επιδερμίδα, επειδή αποτελείται από κερατινοποιημένα κύτταρα, ενώ οι υπόλοιπες στιβάδες απαρτίζουν τη ζώσα επιδερμίδα.

Η κεράτινη στιβάδα αποτελεί την εξωτερική στιβάδα της επιδερμίδας. Φυσιολογικά, ακόμα και ενυδατωμένη, είναι μία εξαιρετικά αδιαπέραστη μεμβράνη, προσδίδοντας στο δέρμα τη λειτουργία του φραγμού και ελέγχοντας την διαπερατότητα διαφόρων ουσιών από αυτό. Η αντίσταση που εμφανίζει η κεράτινη στιβάδα, οφείλεται τόσο στη δομή της όσο και στη χημική της σύσταση. Σχηματίζεται από την κερατινοποίηση των επιδερμικών κυττάρων και ο βασικός πληθυσμός κυττάρων της είναι τα κερατινοκύτταρα, που την καθιστούν άκαμπτη και αδιαπέραστη.

Κάτω από την επιδερμίδα βρίσκεται η στιβάδα του δέρματος που ονομάζεται χόριο ή δερμίδα και είναι 10 με 20 φορές πιο παχιά από την επιδερμίδα. Στο χόριο βρίσκονται αιμοφόρα αγγεία, νευρικές απολήξεις, ιδρωτοποιοί αδένες και σμηγματογόνοι αδένες. Επίσης το χόριο αποτελείται από τη θεμέλια ουσία, τις ίνες κολλαγόνου και ελαστίνης και από διάφορους τύπους κυττάρων. Ο κύριος πληθυσμός κυττάρων είναι οι ινοβλάστες. Το χόριο είναι συνήθως η περιοχή – στόχος των δερματολογικών φαρμάκων. [2, 28, 29]



Εικόνα 6 Οι στιβάδες του δέρματος. (Αναπαραγωγή από Grumezescu, A. (Ed.), (2016). Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics: Applications of Nanobiomaterials. William Andrew)

2.2 Διαδερμική χορήγηση

Ανάλογα με τον τόπο δράσης του τοπικού φαρμακοτεχνικού σκευάσματος και την κατανομή της δραστικής ουσίας στο σώμα, η χορήγηση βιοδραστικών μορίων μέσω του δέρματος χωρίζεται στην τοπική χορήγηση και στη διαδερμική χορήγηση. Στην τοπική χορήγηση η δραστική/χημική ουσία δρα στην επιφάνεια του δέρματος (π.χ ενυδάτωση, θεραπεία ακμής), ή ακριβώς κάτω από την περιοχή εφαρμογής (π.χ αντιφλεγμονώδη).^[30]

Η διαδερμική χορήγηση είναι η παθητική διάχυση φαρμακευτικών ή χημικών μορίων διαμέσου του δέρματος, με σκοπό να διοχετευτούν στη συστηματική κυκλοφορία. Ο μηχανισμός που ελέγχει τη διέλευση των δραστικών ουσιών μέσω των στιβάδων του δέρματος είναι η διάχυση. Ο ρυθμός διάχυσης ελέγχεται από τη βαθμίδα συγκέντρωσης στην περιοχή γύρω από τη μεμβράνη (φράγμα). Το ελέγχον στάδιο (βραδύτερο στάδιο) στην πορεία της διαδερμικής χορήγησης είναι η διαπέραση της κεράτινης στιβάδας. Η κεράτινη στιβάδα αποτελεί τον φραγμό του δέρματος, καθώς προβάλλει τη μεγαλύτερη αντίσταση στη διάβαση της ουσίας μέσα από αυτήν, ελέγχοντας έτσι την παθητική διάχυση ουσιών μέσω του δέρματος.^[2,27,31]

2.2.1 Οδοί διαδερμικής διείσδυσης

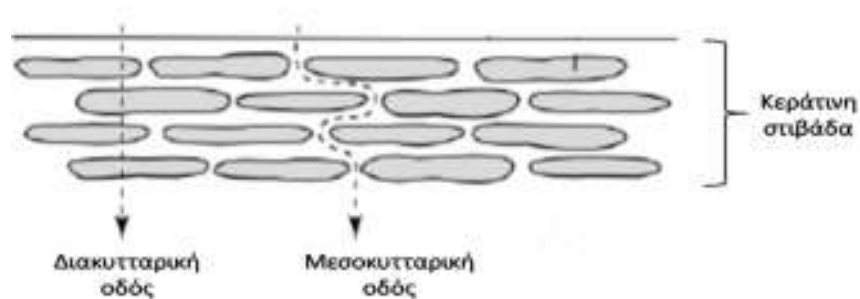
Η διείσδυση των δραστικών ουσιών από το δέρμα μπορεί να γίνει μέσω τριών διαφορετικών οδών:

1. Μέσω της κεράτινης στιβάδας
2. Μέσω των ιδρωτοποιών αδένων
3. Μέσω των τριχοθυλακίων

Η διέλευση των δραστικών ουσιών μέσω των πόρων της επιδερμίδας (δηλαδή μέσω των ιδροτοποίων αδένων και των τριχοθυλακίων), είναι ευκολότερη συγκριτικά με αυτήν μέσω της κεράτινης στιβάδας. Όμως το ποσοστό της επιφάνειας της επιδερμίδας που καλύπτεται από πόρους είναι πολύ μικρό (περίπου 0.1%), με αποτέλεσμα η κεράτινη στιβάδα να αποτελεί την κύρια οδό διέλευσης μέσω της επιδερμίδας. Μόνο στην περίπτωση μορίων που κινούνται πού αργά μέσω της κεράτινης στιβάδας, μπορεί να υπερισχύσει η απορρόφηση μέσω των πόρων.^[31] Η διείσδυση των δραστικών ουσιών μέσω της κεράτινης στιβάδας μπορεί να γίνει και αυτή με δύο τρόπους (Εικόνα 7):

- Διαμέσου των κυττάρων (Διακυτταρικά, Transcellular)
- Μεταξύ των κυττάρων (Μεσοκυτταρικά, Intercellular)

Η οδός της διαδερμικής χορήγησης μέσω της κεράτινης στιβάδας εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της δραστικής ουσίας. Η κύρια οδός χορήγησης των υδατοδιαλυτών μορίων είναι διαμέσου των κυττάρων της κεράτινης στιβάδας, ενώ τα λιπόφιλα μόρια διεισδύουν μέσω των λιπιδικών περιοχών μεταξύ των κερατινοκυττάρων. Η μεσοκυττάρια οδός μεταξύ των κερατινοκυττάρων αποτελεί την κύρια οδό διαπέρασης της κεράτινης στιβάδας.^[1,31]



Εικόνα 7 Απλοποιημένο μοντέλο της κεράτινης στιβάδας που απεικονίζει τις πιθανές οδούς διείσδυσης του φαρμάκου. (Αναπαραγωγή από Attwood, D. & Florence, A. T. (2012). FASTtrack Physical Pharmacy. Pharmaceutical Press)

2.2.2 Πλεονεκτήματα διαδερμικής χορήγησης

Η διαδερμική χορήγηση χρησιμοποιεί το δέρμα ως μία εναλλακτική οδό συστηματικής χορήγησης δραστικών ουσιών. Στόχος της είναι η κατανομή της δραστικής ουσίας στη γενική κυκλοφορία, διαμέσου των στιβάδων του δέρματος. Συνεπώς η διαδερμική χορήγηση αποτελεί μία εναλλακτική οδό χορήγησης με πολλά πλεονεκτήματα, όπως:^[32,33]

- Στοχευμένη θεραπεία στον ασθενή ιστό-στόχο
- Σταθερή ελεγχόμενη αποδέσμευση του βιοδραστικού μορίου για μεγάλο χρονικό διάστημα (έως και μία εβδομάδα)
- Αποφυγή του φαινομένου πρώτης διόδου

- Ελάττωση των παρενεργειών στους υγιείς ιστούς
- Παράκαμψη των μεταβλητών που σχετίζονται με τη γαστρεντερική προσρόφηση (όπως το pH, η λήψη τροφής, ο μεταβολισμός από το ήπαρ)
- Καλύτερη συμμόρφωση του ασθενούς με το θεραπευτικό σχήμα
- Άμεσος τερματισμός της θεραπείας
- Σχετικά οικονομική οδός χορήγησης, μη επώδυνη και μη επεμβατική

2.3 Βελτιστοποίηση διαδερμικής διαπερατότητας

Λόγω της συνεχώς αυξανόμενης επιλογής της διαδερμικής χορήγησης βιοδραστικών μορίων, ως εναλλακτική οδό χορήγησης, έχουν γίνει ποικίλες μελέτες γύρω από την ανάπτυξη καινοτόμων διαδερμικών θεραπευτικών συστημάτων, με σκοπό την βελτιστοποίηση της διαδερμικής διαπερατότητας. Για την βελτιστοποίηση της διαδερμικής διαπερατότητας έχουν μελετηθεί διάφορες μέθοδοι όπως: μέθοδοι που σχετίζονται με τη δραστική ουσία ή με την αλληλεπίδραση φορέα – δραστικής ουσίας, μέθοδοι που στοχεύουν στην τροποποίηση της κεράτινης στιβάδας, μέθοδοι που στοχεύουν στην παράκαμψη της κεράτινης στιβάδας, ενεργειακά υποβοηθούμενες μέθοδοι και μέθοδοι που χρησιμοποιούν κυστίδια ως φορείς. Οι μέθοδοι ενίσχυσης της διαδερμικής διαπερατότητας παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 4. Στην παρούσα εργασία γίνεται εκτενέστερη αναφορά μόνο στις κυστιδικές δομές. [33,34]

Πίνακας 4 Μέθοδοι ενίσχυσης της διαδερμικής διαπερατότητας

Μέθοδοι ενίσχυσης διαδερμικής διαπερατότητας				
Δραστική ουσία & φορέας	Τροποποίηση της κεράτινης στιβάδας	Παράκαμψη της κεράτινης στιβάδας	Ενεργειακά υποβοηθούμενες μέθοδοι	Κυστιδικές δομές
• Επιλογή κατάλληλης δραστικής ουσίας ή προ-δραστικής ουσίας • Θερμοδυναμική ενεργότητα • Ιονικό ζεύγος • Ευτηκτικά συστήματα	• Ενυδάτωση κεράτινης στιβάδας • Ενισχυτές διαπερατότητας	• Διάταξη μικροβελώνων	• Υπερήχηση • Ιοντοφόρηση • Ηλεκτροφόρηση	• Λιποσώματα • Αιθοσώματα • Νιοσώματα • Τρανσφεροσώματα

2.3.1 Κυστιδικές δομές

Η εφαρμογή των κυστιδικών δομών ως συστήματα μεταφοράς και αποδέσμευσης βιοδραστικών μορίων για τοπική ή διαδερμική χορήγηση έχει τραβήξει έντονα το ενδιαφέρον των ερευνητών. Χάρη στη δομή τους, μπορούν να βελτιώσουν τη διαλυτότητα δυσδιάλυτων στο νερό βιοδραστικών μορίων και επίσης μπορούν να δράσουν ως ενισχυτές διαπερατότητας. Επιπροσθέτως μπορούν να δράσουν ως δεξαμενή ελεγχόμενης παρατεταμένης αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας, μειώνοντας έτσι την τοξικότητά της και βελτιώνοντας το θεραπευτικό αποτέλεσμα, σε σύγκριση με τις συμβατικές τοπικές φαρμακοτεχνικές μορφές. Στη συνέχεια γίνεται μία πιο αναλυτική περιγραφή των κυστιδικών δομών. ^[16,35]

❖ Αιθοσώματα

Τα αιθοσώματα είναι λιπιδικά κυστίδια που χρησιμοποιούνται για την βελτίωση της διαδερμικής διαπερατότητας βιοδραστικών μορίων. Αποτελούνται από φωσφολιπίδια, νερό και αιθανόλη σε υψηλή συσγκέντρωση (20% - 45%). ^[35]

❖ Λιποσώματα

Τα λιποσώματα λόγω της σύστασής τους παρουσιάζουν συγγένεια με τις βιολογικές μεμβράνες, αλληλεπιδρώντας με αυτές. Μπορούν να δράσουν ως δεξαμενές ελεγχόμενης αποδέσμευσης στο σημείο εφαρμογής, είτε ως ενισχυτές διαπερατότητας, μεταβάλλοντας τη λιπιδική σύσταση της κεράτινης στιβάδας, συμβάλλοντας έτσι στη μείωση της λειτουργίας του φραγμού, είτε τέλος απορροφώνται και συντήκονται στην επιφάνεια του δέρματος. Τα λιποσώματα που βρίσκονται στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση παρουσιάζουν βελτιωμένη διαπερατότητα από το δέρμα σε σύγκριση με αυτά που βρίσκονται στην κατάσταση γέλης. Επιπλέον τα λιποσώματα που αποτελούνται από λιπίδια του δέρματος εμφανίζουν βελτιωμένη αποτελεσματικότητα ως φορείς δραστικών ουσιών μέσω του δέρματος. Ωστόσο τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί ότι τα συμβατικά λιποσώματα παρουσιάζουν πολύ μικρή αξία (έως και καθόλου), ως φορείς διαδερμικής χορήγησης δραστικών ουσιών, καθώς δεν καταφέρνουν να διεισδύουν στις βαθύτερες στιβάδες του δέρματος, αλλά παραμένουν στην κεράτινη στιβάδα. ^[35,36]

❖ Νιοσώματα

Τα νιοσώματα είναι κυστιδικές δομές και χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση της διαδερμικής διαπερατότητας βιοδραστικών μορίων μέσω του δέρματος. Αποτελούνται από μία ή περισσότερες μη ιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες, οι οποίες έχουν την ικανότητα να αυτο-οργανώνονται όταν βρίσκονται σε υδατικά μέσα, σχηματίζοντας δομές διπλοστιβάδων που περικλύουν στο εσωτερικό τους το υδατικό μέσο στο οποίο είναι διεσπαρμένες. Παράγονται με τον ίδιο τρόπο με τα συμβατικά λιποσώματα και

εμφανίζουν τα ίδια φυσικά χαρακτηριστικά και πλεονεκτήματα με τα τελευταία. Επίσης μπορούν να σχηματίσουν μονοστιβαδικές ή πολυστιβαδικές δομές.

Τα νιοσώματα χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά βιοδραστικών μορίων μέσω του δέρματος, καθώς λειτουργούν ως ενισχυτές της διαδερμικής διαπερατότητας. Έχουν την ικανότητα να τροποποιούν τη συμπαγή λιπιδική δομή μεταξύ των κερατινοκυττάρων, με αποτέλεσμα η μεσοκυττάρια λιπιδική περιοχή της κεράτινης στιβάδας να γίνεται πιο χαλαρή και πιο διαπερατή. Επιπλέον τα νιοσώματα μπορούν να προσροφηθούν στην επιφάνεια του δέρματος και να συντηχθούν με τα κύττρα της επιδερμίδας, με αποτέλεσμα την αύξηση της βαθμίδας θερμοδυναμικής ενεργότητας στην ενδοεπιφάνεια, η οποία συνεισφέρει στην αύξηση την διαδερμικής διαπερατότητας. Τα νιοσώματα έχουν προωθηθεί ιδιαίτερος από τη βιομηχανία καλλυντικών που τα ονομάζει «μαγικά συστατικά». [7,32]

❖ Τρανσφεροσώματα

Τα ελαστικά λιποσώματα ή διαφορετικά τρανσφεροσώματα, όπως έχουν ονομαστεί, αποτελούν την πρώτη γενιά ελαστικών κυστιδίων και αναφέρθηκαν για πρώτη φορά από τους Cenc και Blume το 1992. Έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες που αποδεικνύουν την ικανότητα των τρανσφεροσωμάτων να διεισδύουν στις βαθύτερες στιβάδες του δέρματος, και να φτάνουν ακόμα και στη συστηματική κυκλοφορία. Επιπλέον άλλες μελέτες αναφέρουν ότι τα ελαστικά λιποσώματα είναι ικανά να διεισδύσουν στο δέρμα *in vivo*, μεταφέροντας κατάλληλη ποσότητα δραστικής ουσίας, επιτυγχάνοντας θεραπευτικό αποτέλεσμα συγκρίσιμο με αυτό της υποδόριας χορήγησης.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των τρανσφεροσωμάτων είναι ίδιες με αυτές που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των συμβατικών λιποσωμάτων και η πιο κοινή μέθοδος είναι η ενυδάτωση λεπτού λιπιδικού υμενίου. Επίσης μπορούν να σχηματίσουν μονοστιβαδικές ή πολυστιβαδικές δομές. Τέλος εμφανίζουν την ίδια δομή, τα ίδια φυσικά χαρακτηριστικά και πλεονεκτήματα με τα συμβατικά λιποσώματα.

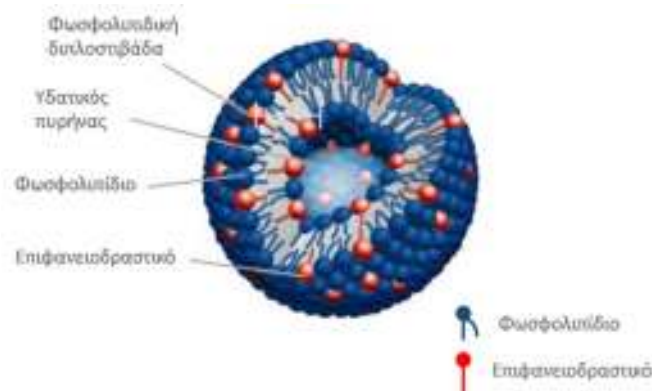
Τα τρανσφεροσώματα αποτελούνται από φωσφολιπίδα και επιφανειοδραστικά. Τα πιο συνήθη επιφανειοδραστικά για την παρασκευή αυτών είναι το χολικό νάτριο, το δεόξυχολικό νάτριο, το Span 60, Span 65, Span80, το Tween 20, Tween 60, Tween 80. Η παρουσία του επιφανειοδραστικού αποσταθεροποιεί τη λιπιδική διπλοστιβάδα, με αποτέλεσμα την αύξηση της ρευστότητάς της. Ως εκ τούτου η ελαστικότητα των τρανσφεροσωμάτων οφείλεται στην ύπαρξη του επιφανειοδραστικού.

Τα κύρια χαρακτηριστικά των τρανσφεροσωμάτων είναι η ελαστικότητά τους και η υδροφιλία τους. Χάρη στην μεγάλη υδροφιλία τους μπορούν να διαπερνούν αυθόρμητα τις στιβάδες του δέρματος, λόγω της βαθμίδας ενυδάτωσης. Επιπροσθέτως χάρη στην ελαστικότητά τους, μπορούν να παραμορφώνονται, με αποτέλεσμα να διεισδύουν στις βαθύτερες στιβάδες του δέρματος, φτάνοντας έως τη συστηματική κυκλοφορία, σε

αντίθεση με τα συμβατικά άκαμπτα λιποσώματα. Τα χαρακτηριστικά αυτά τα καθιστούν κατάλληλα συστήματα διαδερμικής χορήγησης βιοδραστικών μορίων. [35,37]

Έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί δράσης των τρανσφεροσώματων κατά την διαδερμική χορήγηση. Σύμφωνα με τον πρώτο μηχανισμό δράσης, τα τρανσφεροσώματα δρουν ως φορείς μεταφοράς βιοδραστικών μορίων. Η κινητήρια δύναμη για την είσοδο των τρανσφεροσώματων στο δέρμα είναι η τάση αποφυγής του ξηρού περιβάλλοντος. Τα τρανσφεροσώματα χάρη στην ικανότητά τους να παραμορφώνονται μπορούν να συμπιέζονται μεταξύ των κυττάρων της κεράτινης στιβάδας, περνώντας έτσι ανέπαφα και αυθόρμητα μέσα από αυτή λόγω της βαθμίδας ενυδάτωσης, καθώς η συγκέντρωση του νερού αυξάνεται από την κεράτινη στιβάδα προς τη ζώσα επιδερμίδα. Η βαθμίδα ενυδάτωσης δεν είναι επαρκής για να μετακινήσει και τα συμβατικά λιποσώματα μέσω του δέρματος καθώς απαιτείται υψηλή ενέργεια για να παραμορφωθούν. Αυτή είναι και η βασική τους διαφορά σε σχέση με τα τρανσφεροσώματα. Σύμφωνα με τον δεύτερο μηχανισμό δράσης τα τρανσφεροσώματα μπορούν να δράσουν και ως ενισχυτές διαπερατότητας. Λόγω της βιοσυμβατότητάς τους με τις βιολογικές μεμβράνες μπορούν να τροποποιήσουν την λιπιδική δομή μεταξύ των κερατινοκυττάρων, βελτιώνοντας έτσι τη διαδερμική διαπερατότητα. [35,38,39]

Συνοπτικά τα τρανσφεροσώματα χάρη στον ασυνήθιστο μηχανισμό διείσδυσης μέσω του δέρματος μπορούν να δράσουν ως δεξαμενές ελεγχόμενης αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας στην επιφάνεια του δέρματος, ή να μεταφέρουν τη δραστική ουσία στις βαθύτερες στιβάδες του δέρματος, είτε να μεταφέρουν τη δραστική ουσία στη συστηματική κυκλοφορία. [35,37]



Εικόνα 8 Σχηματική αναπαράσταση της δομής των τρανσφεροσώματων.

Κεφάλαιο 3. Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός λιποσωμακών συστημάτων και φυσική σταθερότητα

3.1 Μέγεθος

Ένα από τα πιο βασικά φυσικά χαρακτηριστικά των σωματιδίων είναι το μέγεθός τους. Το μέγεθος των λιποσωμάτων κυμαίνεται συνήθως από 30 nm μέχρι κάποια μικρόμετρα και γενικά τα λιποσώματα ανήκουν στην τάξη της νανοκλίμακας και χαρακτηρίζονται ως νανοσωματίδια. Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν το μέγεθος των λιποσωμάτων είναι η σύστασή τους και η μέθοδος παρασκευής τους.

Το μέγεθος και η κατανομή μεγέθους αποτελεί μία πολύ σημαντική παράμετρο, ειδικά όταν τα λιποσώματα προορίζονται για θεραπευτικό σκοπό και πρόκειται να χορηγηθούν παρεντερικά ή μέσω εισπνοής. Γενικά το μέγεθος και η κατανομή μεγέθους επηρεάζει πολλές από τις ιδιότητες και τη συμπεριφορά των λιποσωμακών συστημάτων όπως:

- *Τον ρυθμό αποδέσμευσης του εγκλωβισμένου δραστικού μορίου.* Όσο πιο μικρό είναι το μέγεθος (μεγάλο εμβαδόν επιφάνειας ανά μονάδα μάζας) πιθανώς οδηγεί σε πιο μεγάλες ταχύτητες αποδέσμευσης.
- *Την απομάκρυνση από το δικτυοενδοθυλιακό σύστημα μέσω φαγοκύτωσης.* Όσο πιο μικρό είναι το μέγεθός τους δεν γίνονται ορατά από τα μακροφάγα κύτταρα.
- *Τη βιοδιαθεσιμότητα του εγκλωβισμένου βιοδραστικού μορίου.* Όσο ελαττώνεται το μέγεθος των λιποσωμάτων μπορεί να επιτευχθεί καλύτερη στόχευση εναντίον των όγκων.
- *Τη διάχυση.* Σε απλά συστήματα ο συντελεστής διάχυσης είναι αντιστρόφως ανάλογος προς την ακτίνα του σωματιδίου.
- *Τη ροή μέσα στα τριχοειδή αγγεία (μετά από εγχυση) και την πιθανότητα αποκλεισμού των τριχοειδών αγγείων με αποτέλεσμα τη πρόκληση εμβολής.*

[19,31,40]

3.2 Δείκτης πολυδιασποράς (PDI)

Μία ακόμα πολύ σημαντική παράμετρος που σχετίζεται με την κατανομή μεγέθους των διασπεραμένων σωματιδίων μέσα σε ένα μέσο διασποράς, είναι ο δείκτης πολυδιασποράς (polydispersity index, PDI). Ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI) είναι μέτρο της ομοιομορφίας της κατανομής μεγέθους των σωματιδίων που υπάρχουν σε ένα εναιώρημα. Μία τιμή κοντά στο μηδέν υποδεικνύει μικρή διακύμανση στο μέγεθος των σωματιδίων (μονοδιασπορά). Ενώ τιμές κοντά στη μονάδα υποδεικνύουν ευρεία κατανομή μεγέθους των σωματιδίων (πολυδιασπορά). Το πλεονέκτημα ενός συστήματος μονοδιασποράς σχετίζεται με την ικανότητά του να παρέχει μια σταθερή ποσότητα του

εγκλωβισμένου βιοδραστικού μορίου, σε σύγκριση με ένα μίγμα από πολυδιασπαρμένα σωματίδια. Επιπλέον η πολυδιασπορά του μεγέθους μπορεί να επηρεάσει και τη στόχευση, καθώς τα σωματίδια διαφορετικών μεγεθών έχουν ενδεχομένως διαφορετικές πορείες στον οργανισμό. [31,41]

3.3 ζ-δυναμικό

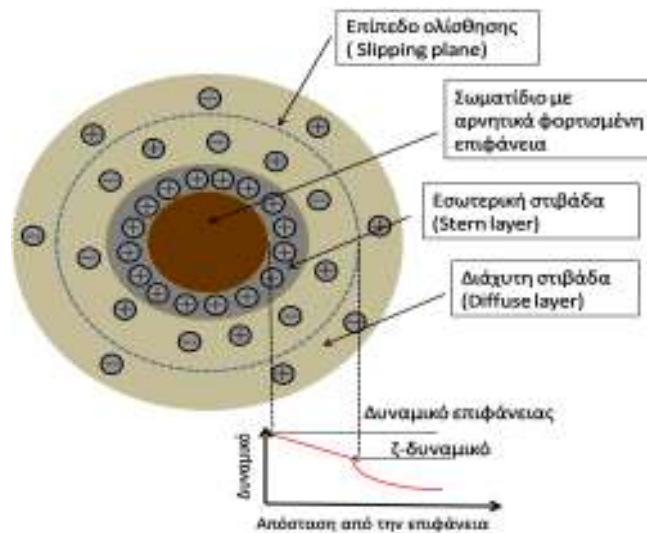
Το ζ-δυναμικό είναι μία πολύ σημαντική φυσική παράμετρος, καθώς αποτελεί αξιόπιστο δείκτη του μεγέθους των ηλεκτροστατικών απωστικών δυνάμεων μεταξύ των σωματιδίων, σε ένα κολλοειδές σύστημα διασποράς και συνήθως χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη της σταθερότητας των κολλοειδών συστημάτων διασποράς. Ένα υψηλό (θετικό ή αρνητικό) ζ-δυναμικό υποδεικνύει ότι οι ηλεκτροστατικές απωστικές δυνάμεις μεταξύ των σωματιδίων είναι ισχυρότερες από τις ελκτικές δυνάμεις Van der Waals, επομένως υπάρχει μικρή πιθανότητα για τα σωματίδια να συσσωματωθούν. Ως εκ τούτου υψηλές τιμές του ζ-δυναμικού σχετίζονται με πιο σταθερά συστήματα μακροπρόθεσμα.

Η τιμή του ζ-δυναμικού επηρεάζεται από το φορτίο της επιφάνειας των σωματιδίων και από τις παραμέτρους του μέσου διασποράς, όπως το pH και η ιονική ισχύς. Συνήθως τα περισσότερα σωματίδια όταν διασπείρονται σε υδατικά μέσα φέρουν ένα ηλεκτρικό φορτίο. Το ηλεκτρικό φορτίο της επιφάνειας των σωματιδίων οφείλεται είτε σε ιοντισμό των επιφανειακών ομάδων (π.χ. διάσταση όξινων ομάδων στην επιφάνεια του σωματιδίου δίνει μία αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια) είτε σε προσρόφηση φορτισμένων ομάδων (π.χ. προσρόφηση κατιονικών επιφανειοδραστικών ουσιών οδηγεί σε μία θετικά φορτισμένη επιφάνεια). [19,41]

Το ζ-δυναμικό ορίζεται ως η διαφορά δυναμικού μεταξύ της στιβάδας ιόντων στην επιφάνεια των σωματιδίων και του επιπέδου ολίσθησης. Είναι ένας επιστημονικός όρος για το ηλεκτροκινητικό δυναμικό (ΕΚΠ) στα κολλοειδή συστήματα διασποράς.

Όταν ένα φορτισμένο σωματίδιο διασπείρεται σε ένα υδατικό μέσο, δημιουργούνται δύο παράλληλες στιβάδες, η εσωτερική στιβάδα (stern layer) και η εξωτερική στιβάδα ή στιβάδα διάχυσης (diffuse layer). Οι δύο αυτές παράλληλες στιβάδες αποτελούν την ηλεκτρική διπλοστιβάδα. Η εσωτερική στιβάδα αποτελείται από στενά συνδεδεμένα ιόντα που έχουν αντίθετο φορτίο από αυτό της επιφάνειας του σωματιδίου. Η στιβάδα διάχυσης, αποτελείται από χαλαρά συνδεδεμένα ιόντα, εκ των οποίων τα περισσότερα έχουν αντίθετο φορτίο από τα ιόντα της εσωτερικής στιβάδας. Όταν το διεσπαρμένο κολλοειδές σωματίδιο εκτίθεται σε ένα ηλεκτρικό πεδίο τότε το σωματίδιο, η στενά συνδεδεμένη εσωτερική στιβάδα και ένα μέρος από την στιβάδα διάχυσης, έλκονται ή απωθούνται από τους πόλους του ηλεκτρικού πεδίου ανάλογα με το φορτίο του σωματιδίου. Η κίνηση αυτή των φορτισμένων σωματιδίων κάτω από την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου ονομάζεται ηλεκτροφόρηση. Επειδή η στιβάδα διάχυσης είναι χαλαρά

συνδεδεμένη με το σωματίδιο, ένα μέρος της στιβάδας αυτής θα κινηθεί μαζί με το σωματίδιο και ένα μέρος της δεν θα κινηθεί, σχηματίζοντας έτσι το επίπεδο ολίσθησης (slipping plane). Το επίπεδο ολίσθησης είναι δηλαδή ένα θεωρητικό σύνορο, που καθορίζει αν τα ιόντα θα κινηθούν μαζί με το σωματίδιο ή όχι, ανάλογα σε ποια πλευρά του συνόρου βρίσκονται. Στο επίπεδο ολίσθησης μετριέται η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των σωματιδίων, και με βάση αυτή υπολογίζεται το ζ-δυναμικό (Εικόνα 9). [42]



Εικόνα 9 Ηλεκτρική διπλοστιβάδα και ζ-δυναμικό.

3.4 Σταθερότητα λιποσωματικών συστημάτων

Μια σημαντική παράμετρος που πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν για την χρήση των λιποσωμάτων ως φαρμακευτικά προϊόντα, είναι η σταθερότητά τους από τον χρόνο εγκλεισμού του δραστικού μορίου μέχρι την εφαρμογή τους *in vivo*. Η σταθερότητα των λιποσωματικών συστημάτων διασποράς σε βάθος χρόνου, σχετίζεται με τη φυσική, τη χημική και τη βιολογική σταθερότητά τους. Για παράδειγμα όταν η κατανομή μεγέθους των λιποσωμάτων διατηρείται σταθερή σε βάθος χρόνου, τότε το λιποσωματικό εναιώρημα χαρακτηρίζεται ως φυσικά σταθερό και κατάλληλο για φαρμακευτική χρήση.

Η σύντομη -πολλές φορές- διάρκεια ζωής των λιποσωματικών προϊόντων λόγω προβλημάτων φυσικής, χημικής και μικροβιολογικής σταθερότητας, αποτελεί τον κύριο περιορισμό στη χρήση τους. Ωστόσο τα προβλήματα αυτά μπορούν να περιοριστούν ελέγχοντας την λιπιδική σύσταση και την τεχνική παρασκευής λιποσωμάτων. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5) παρουσιάζονται τα προβλήματα σταθερότητας των λιποσωμάτων. [2,43]

Ενώ η χημική σταθερότητα των λιποσωμάτων συνήθως βελτιώνεται με την ενσωμάτωση αντιοξειδωτικών, η φυσική σταθερότητα αποτελεί ένα πιο δύσκολο πρόβλημα. Μια πολύ διαδεδομένη τεχνική για την επίλυση προβλημάτων σταθερότητας σε βάθος χρόνου, είναι η λυοφιλοποίηση, δηλαδή η απομάκρυνση του νερού από το λιποσωματικό προϊόν, σε κατάσταση ψύξης, χρησιμοποιώντας πολύ χαμηλές πιέσεις. Ωστόσο είχε παρατηρηθεί, ότι μπορεί να υπάρξει διαρροή του εγκλωβισμένου μορίου κατά την λυοφιλοποίηση και την ανασύσταση. Για τον λόγο αυτό ενσωματώνονται στη σύσταση των λιποσωμάτων σάκχαρα ώστε να διατηρούνται οι αρχικές χημικές και φυσικές (μέγεθος) ιδιότητες αυτών. ^[4,11]

Πίνακας 5 Προβλήματα σταθερότητας των λιποσωμάτων. ^[2]

Επιπτώσεις	
Φυσική αστάθεια	▪ Μεταβολή μεγέθους νανοσωματιδίων (Συσσωμάτωση) ▪ Διαρροή εγκλωβισμένου βιοδραστικού μορίου
Χημική αστάθεια	▪ Υδρόλυση των εστερικών δεσμών των φωσφολιπιδίων ▪ Οξείδωση των ακόρεστων αλκυλικών αλυσίδων των λιπιδίων
Μικροβιολογική αστάθεια	▪ Βακτηριακή επιμόλυνση (ρυθμίζεται με αποστείρωση του λιποσωματικού προϊόντος)

3.4.1 Φυσική σταθερότητα λιποσωμάτων – Θεωρία DLVO

Τα λιποσώματα ως κολλοειδή συστήματα διασποράς, είναι θερμοδυναμικά ασταθή, με αποτέλεσμα να τείνουν να σχηματίσουν μεγάλα συσσωματώματα. Η συσσωμάτωση είναι μία αυθόρμητη διαδικασία που οφείλεται στις ελκτικές δυνάμεις Van der Waals. Κάθε σύστημα προκειμένου να ελαχιστοποιήσει την ελεύθερη ενέργειά του, τείνει να μειώσει την συνολική επιφάνειά του, μέσω του σχηματισμού συσσωματωμάτων. ^[44,45] Επιπλέον η συχνότητα των συγκρούσεων μεταξύ των διεσπαρμένων σωματιδίων που μπορεί να οδηγήσει σε συσσωμάτωση εξαρτάται από: (α) την κατανομή μεγέθους, (β) τη συγκέντρωση των διεσπαρμένων σωματιδίων, (γ) το ιξώδες του μέσου διασποράς και (δ) τη θερμοκρασία.

Η θεωρία DLVO αποτελεί ποιοτική προσέγγιση της σταθερότητας των κολλοειδών συστημάτων διασποράς και σχετίζεται με τη φυσική σταθερότητά τους. Προσπαθεί να εξηγήσει το φαινόμενο της συσσωμάτωσης των κολλοειδών διεσπαρμένων σωματιδίων που φέρουν φορτίο στην επιφάνειά τους. Σύμφωνα με την κλασική θεωρία DLVO υπάρχουν δύο τύποι αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κολλοειδών διεσπαρμένων σωματιδίων, οι ελκτικές δυνάμεις Van der Waals (V_A) και οι ηλεκτροστατικές απωστικές

δυνάμεις (V_R). Το άθροισμα των δύο αυτών δυνάμεων είναι ισοδύναμο με τη συνολική ενέργεια (V_T) του συστήματος και μπορεί να προβλέψει τη σταθερότητά του:

$$V_T = V_R + V_A$$

Όταν οι ελκτικές δυνάμεις υπερτερούν των απωστικών δυνάμεων, τα σωματίδια συνενώνονται και προκύπτουν συσσωματώματα ή κροκίδες και το σύστημα χαρακτηρίζεται από θερμοδυναμική αστάθεια, οδηγείτε σε κατάρρευση. Αντιθέτως όταν υπερτερούν οι απωστικές δυνάμεις έναντι των ελκτικών, τα σωματίδια παράμενουν διεσπαρμένα, το ένα σε απόσταση από το άλλο.

Όμως η κλασική θεωρία DLVO αδυνατεί να εξηγήσει τι συμβαίνει στην περίπτωση διεσπαρμένων σωματιδίων χωρίς επιφανειακό φορτίο, όπως είναι ορισμένα ουδέτερα φωσφολιπίδια, όπου απουσιάζουν οι ηλεκτροστατικές απωστικές δυνάμεις. Για την περιγραφή της φυσικής σταθερότητας τέτοιου είδους κολλοειδών συστημάτων προστέθηκαν στη θεωρία DLVO και άλλες μορφές δυνάμεων, όπως οι δυνάμεις ενυδάτωσης. Οι αλληλεπιδράσεις ενυδάτωσης δρουν κατά κύριο λόγο απωθητικά, όταν η επιφάνεια των σωματιδίων είναι έντονα υδρόφιλη. Σε αντίθετη περίπτωση, που η επιφάνεια των σωματιδίων είναι υδρόφοβη, οι αλληλεπιδράσεις ενυδάτωσης δρουν ελκτικά. Έτσι το συνολικό δυναμικό του συστήματος δίνεται από την εξίσωση:

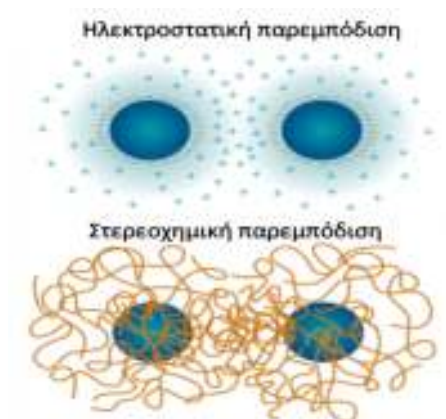
$$V_T = V_R + V_A + V_{Hyd}^R + V_{Hyd}^A$$

Επιπλέον τα κολλοειδή συστήματα διασποράς μπορούν να σταθεροποιηθούν και στερεοχημικά, μέσω των απωστικών δυνάμεων που προκύπτουν από την προσρόφηση μακρομορίων και επιφανειοδραστικών ουσιών στην επιφάνειά τους. Σε υδατικά μέσα διασποράς όμως, τα προσροφημένα μόρια θα είναι ενυδατωμένα, συνεπώς η στερεοχημική σταθεροποίηση προκύπτει λόγω εντροπικού ή ωσμωτικού φαινομένου ή ενθαλπικής σταθεροποίησης. Σύμφωνα με τον θερμοδυναμικό νόμο η άπωση μεταξύ των σωματιδίων χαρακτηρίζεται από αύξηση της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος (ΔG):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Κατά το εντροπικό φαινόμενο η απώλεια ελευθερίας κίνησης των αλυσίδων των προσροφημένων μορίων, έχει ως αποτέλεσμα αρνητική μεταβολή της εντροπίας ($-\Delta S$) και συνεπώς αυξάνεται η ελεύθερη ενέργεια του συστήματος (ΔG), οδηγώντας σε άπωση. Κατά την ενθαλπική σταθεροποίηση η απώλεια μορίων ύδατος από τα προσροφημένα μόρια, οδηγεί σε αύξηση της ενθαλπίας (ΔH), με αποτέλεσμα την αύξηση της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος.

Συνοπτικά τα κolloειδή συστήματα διασποράς μπορούν να σταθεροποιηθούν ηλεκτροστατικά ή στερεοχημικά (Εικόνα 10). [5,31,45]



Εικόνα 10 Ηλεκτροστατική και στερεοχημική παρεμπόδιση. (Αναπαραγωγή από ENERGY, P. I. (2009). Physical Stability of Disperse Systems)

Κεφάλαιο 4. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η παρασκευή και η μελέτη ελαστικών λιποσωμάτων. Τα συμβατικά λιποσώματα χάρη στην ιδιαίτερη δομή και βιοσυμβατότητά τους με τις βιολογικές μεμβράνες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς μεταφοράς και ελεγχόμενης αποδέσμευσης, τόσο υδρόφιλων όσο και λιπόφιλων βιοδραστικών ουσιών, βελτιώνοντας τη βιοδιαθεσιμότητά τους και προστατεύοντάς τα από αποικοδομητικούς παράγοντες. Μπορούν να χορηγηθούν μέσω διαφόρων οδών χορήγησης, μία από τις οποίες είναι και το δέρμα, αποτελώντας μία εναλλακτική οδό χορήγησης με πολλά πλεονεκτήματα. Ωστόσο η ακαμψία των συμβατικών λιποσωμάτων εμποδίζει τη διείσδυσή τους στις βαθύτερες στιβάδες του δέρματος περιορίζοντας τη χρήση τους ως διαδερμικά συστήματα χορήγησης. Για τον λόγο αυτό αναπτύχθηκαν τα ελαστικά λιποσώματα ή τρανσφεροσώματα, τα οποία αποτελούνται από φωσφολιπίδια και επιφανειοδραστικά. Η ενσωμάτωση των επιφανειοδραστικών στη φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα συμβάλλει στην αύξηση της ελαστικότητάς της, με αποτέλεσμα να μπορούν να παραμορφώνονται και να διεισδύουν στις βαθύτερες στιβάδες του δέρματος. Το γεγονός αυτό τα καθιστά ικανά συστήματα διαδερμικής χορήγησης ουσιών.

Πιο αναλυτικά οι στόχοι της διπλωματικής εργασίας είναι οι εξής:

- ✓ Η παρασκευή ελαστικών λιποσωμάτων με τη μέθοδο ενυδάτωσης λεπτού λιπιδικού υμενίου, χρησιμοποιώντας διαφορετικά φωσφολιπίδια, όπως DOPC, DMPC, DPPC, HSPC, DSPC και μίγμα DOPC:DSPC (1:1 w/w) και διαφορετικά επιφανειοδραστικά, όπως Tween 80, Span 80 και μίγμα Tween 80 : Span 80 (1:1 w/w), κρατώντας σταθερή την αναλογία λιπιδίου προς επιφανειοδραστικό και ίση με 80:20 (w/w).
- ✓ Ο φυσικός χαρακτηρισμός των ελαστικών λιποσωμάτων ως προς το μέγεθος (μέση υδροδυναμική διάμετρος, D_h), τον δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό, με χρήση της μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS) και Ηλεκτροφορετικής Σκέδασης Φωτός (ELS) αντίστοιχα.
- ✓ Η μελέτη φυσικής σταθερότητας των ελαστικών λιποσωμάτων, μετρώντας το μέγεθός τους με την μέθοδο της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός, ανά τακτά χρονικά διαστήματα, σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα της παρασκευής τους, όπου διατηρήθηκαν στις εξής συνθήκες αποθήκευσης: α) ψυγείο (4°C), β) θερμοκρασία περιβάλλοντος (25°C) και γ) συνθήκες επιταχυνόμενης γήρανσης (45°C).
- ✓ Η μελέτη της επίδρασης των διαφορετικών φωσφολιπιδίων και επιφανειοδραστικών στη φυσική σταθερότητα και στα φυσικά χαρακτηριστικά.

Κεφάλαιο 5. Πειραματικό μέρος

5.1 Υλικά & Αντιδραστήρια

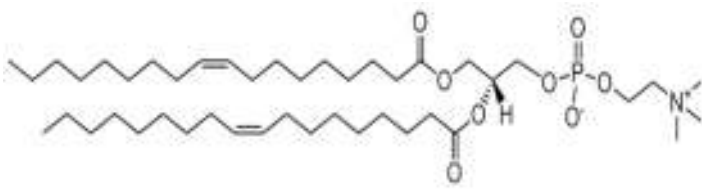
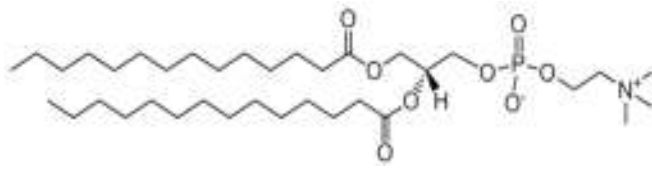
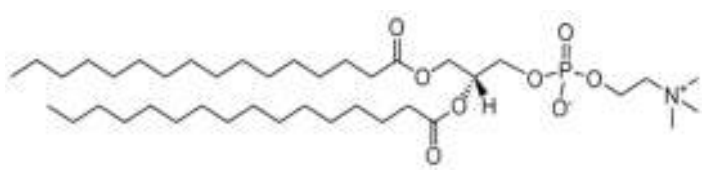
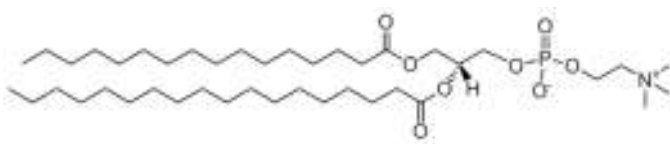
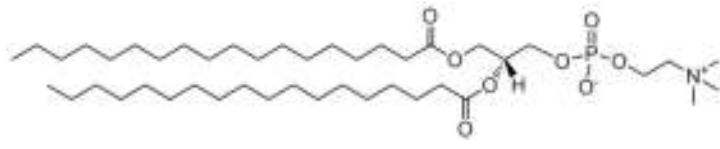
Τα υλικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή και τον χαρακτηρισμό των ελαστικών λιποσωμάτων συνοψίζονται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6 Υλικά & αντιδραστήρια της πειραματικής διαδικασίας.

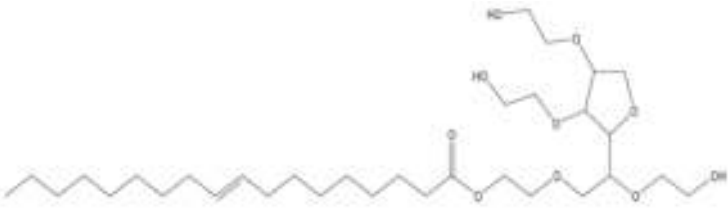
Υλικά & Αντιδραστήρια	Προμηθευτής
Χλωροφόρμιο HPLC grade	Fisher Chemical
Μεθανόλη HPLC grade	Fisher Chemical
H₂O HPLC grade	Fisher Chemical
Tween 80	CHEMCO
Span 80	Fagron
Διολεϋλοφωσφατιδυλογολίνη (DOPC)	Avanti Polar Lipids, Inc.
Διμυριστοϋλοφωσφατιδυλογολίνη (DMPC)	Avanti Polar Lipids, Inc.
Διπαλμιτοϋλοφωσφατιδυλογολίνη (DPPC)	Avanti Polar Lipids, Inc.
Υδρογονωμένη φωσφατιδυλογολίνη σόγιας (HSPC)	Avanti Polar Lipids, Inc.
Διστεαροϋλοφωσφατιδυλογολίνη (DSPC)	Avanti Polar Lipids, Inc.
Κυψελίδες πολυστυρενίου 10x10x48 mm	Kartell S.p.A

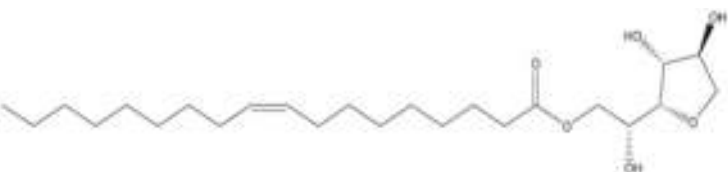
Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται συνοπτικές πληροφορίες, όπως ο μοριακός τύπος, η χημική δομή, το μοριακό βάρος (MW), η τιμή HLB και η θερμοκρασία μετάπτωσης, για τα επιφανειοδραστικά και τα λιπίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία.

Πίνακας 7 Χημική δομή, μοριακός τύπος, μοριακό βάρος, T_m , καθαρό φορτίο, των φωσφολιπιδίων που χρησιμοποιήθηκαν. ^[9, 46]

DOPC			
Χημική δομή			
	Μοριακός τύπος	C ₄₄ H ₈₄ NO ₈ P	
	Μοριακό βάρος	786.11 g/mol	
	T _m	-22°C	
	Καθαρό φορτίο	0	
DMPC			
Χημική δομή			
	Μοριακός τύπος	C ₃₆ H ₇₂ NO ₈ P	
	Μοριακό βάρος	677.93 g/mol	
	T _m	23°C	
	Καθαρό φορτίο	0	
DPPC			
Χημική δομή			
	Μοριακός τύπος	C ₄₀ H ₈₀ NO ₈ P	
	Μοριακό βάρος	734.04 g/mol	
	T _m	41°C	
	Καθαρό φορτίο	0	
HSPC			
Χημική δομή			
	Μοριακό βάρος	783.77 g/mol	
	T _m	52°C	
	Καθαρό φορτίο	0	
DSPC			
Χημική δομή			
	Μοριακός τύπος	C ₄₄ H ₈₈ NO ₈ P	
	Μοριακό βάρος	790.14 g/mol	
	T _m	55°C	
	Καθαρό φορτίο	0	

Πίνακας 8 Χημική δομή, Μοριακός τύπος, Μοριακό βάρος, τιμή HLB, των επιφανειοδραστικών Tween 80 και Span 80. ^[47]

Tween 80		
Χημική δομή		
	Μοριακός τύπος	C ₃₂ H ₆₀ O ₁₀
	Μοριακό βάρος	604.82 g/mol
	Τιμή HLB	15

Span 80		
Χημική δομή		
	Μοριακός τύπος	C ₂₄ H ₄₄ O ₆
	Μοριακό βάρος	428.60 g/mol
	Τιμή HLB	4.3

5.2 Όργανα & Συσκευές

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία παρασκευής και χαρακτηρισμού των ελαστικών λιποσωμάτων συνοψίζονται στον πίνακα 9.

Πίνακας 9 Όργανα & συσκευές της πειραματικής διαδικασίας.

Όργανα & Συσκευές	Μοντέλο	Κατασκευαστής
Ζυγός ακριβείας	AG 135	Mettler Toledo
Περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης	Laborota 4000	Heidolph
Συσκευή υπερήχησης (Probe Sonicator)	UP 200 s	Hielscher
Μαγνητικός αναδευτήρας	RCT basic	IKA
Φασματοφωτόμετρο συσχέτισης φωτονίων	Zetasizer 3000 HSA	Malvern

5.3 Παρασκευή ελαστικών λιποσωμάτων (τρανσφεροσωμάτων)

Τα ελαστικά λιποσώματα ή αλλιώς τρανσφεροσώματα, παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο της ενυδάτωσης λεπτού λιπιδικού υμενίου, χρησιμοποιώντας διαφορετικά φωσφολιπίδια, όπως DOPC, DMPC, DPPC, HSPC, DSPC και μίγμα DOPC:DSPC (1:1 w/w) και διαφορετικά επιφανειοδραστικά, όπως Tween 80, Span 80 και μίγμα Tween 80 : Span 80 (1:1 w/w), κρατώντας σταθερή την αναλογία λιπιδίου προς επιφανειοδραστικό και ίση με 80:20 (w/w). Στη συνέχεια περιγράφονται αναλυτικά τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας.

5.3.1 Παρασκευή διαλυμάτων επιφανειοδραστικών σε χλωροφόρμιο και μεθανόλη, συγκέντρωσης 5 mg/ml

- Παρασκευή διαλύματος Span 80 σε μίγμα χλωροφορμίου – μεθανόλης (1:1 v/v), συγκέντρωσης 5 mg/ml.

Αρχικά παρασκευάστηκε διάλυμα της επιφανειοδραστικής ουσίας Span 80 σε μίγμα συνδιαλυτών χλωροφορμίου και μεθανόλης (1:1 v/v), συγκέντρωσης 5 mg/ml. Για την παρασκευή του διαλύματος ζυγίζεται μέσα σε γυάλινο φιαλίδιο ποσότητα από το Span 80 και έπειτα διαλύεται σε μίγμα χλωροφορμίου – μεθανόλης, με αναλογία 1:1 v/v, ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύματος να είναι 5 mg/ml. Η διάλυση γίνεται με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα.

- Παρασκευή διαλύματος Tween 80 σε μίγμα χλωροφορμίου - μεθανόλης (1:1 v/v), συγκέντρωσης 5 mg/ml.

Επιπλέον παρασκευάστηκε διάλυμα της επιφανειοδραστικής ουσίας Tween 80 σε μίγμα συνδιαλυτών χλωροφορμίου και μεθανόλης (1:1 v/v), συγκέντρωσης 5 mg/ml. Ομοίως για την παρασκευή του δεύτερου διαλύματος, ζυγίζεται ποσότητα από το Tween 80 μέσα σε γυάλινο φιαλίδιο και έπειτα διαλύεται σε μίγμα χλωροφορμίου – μεθανόλης 1:1 v/v, ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύματος να είναι 5 mg/ml. Η διάλυση γίνεται με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα.

5.3.2 Παρασκευή ελαστικών λιποσωμάτων αποτελούμενα από λιπίδιο και Tween80, σε αναλογία 80:20 w/w.

Τα ελαστικά λιποσώματα παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο ενυδάτωσης λεπτού λιπιδικού υμενίου, χρησιμοποιώντας διαφορετικά φωσφολιπίδια και την επιφανειοδραστική ουσία Tween 80, σε αναλογία 80:20 w/w.

Αρχικά ζυγίζονται 80 mg φωσφολιπιδίου και στη συνέχεια διαλύονται σε 4 ml διαλύματος Tween80, συγκέντρωσης 5 mg/ml. Η διάλυση πραγματοποιείται μέσα σε σφαιρική φιάλη των 100 ml. Ακολουθεί εξάτμιση υπό κενό του οργανικού διαλύτη, σε

περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης, στους 40°C, με γρήγορη περιστροφή της φιάλης, έως ότου σχηματιστεί ομοιογενές λιπιδικό υμένιο. Το σχηματισμένο λιπιδικό υμένιο φυλάσσεται στο ψυγείο (4°C) για 24 ώρες. Οι ποσότητες φωσφολιπιδίου και επιφανειοδραστικού που χρησιμοποιήθηκαν στο κάθε σύστημα, ώστε η αναλογία φωσφολιπιδίου προς επιφανειοδραστικό να είναι ίση με 80:20 w/w, παρουσιάζονται στον πίνακα 10.

Στη συνέχεια ακολουθεί η ενυδάτωση του λεπτού λιπιδικού υμενίου, με προσθήκη 10 ml H₂O καθαρότητας HPLC, ώστε η κολλοειδής διασπορά που θα προκύψει να έχει συγκέντρωση 10 mg/ml. Η ενυδάτωση πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο, σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία μετάπτωσης (T_m) των φωσφολιπιδίων, με αργή περιστροφή της φιάλης, για μία ώρα. Μετά την ενυδάτωση μετριέται ο όγκος της κολλοειδούς διασποράς με τη βοήθεια πιπέτας και προστίθεται όση ποσότητα H₂O HPLC καθαρότητας απαιτείται, ώστε να συμπληρωθεί ο όγκος του H₂O που απωλέσθηκε λόγω εξάτμισης.

Τα πολυστιβαδικά λιπιδικά κυστίδια (MLVs), που προέκυψαν μετά την ενυδάτωση, υποβάλλονται σε δύο κύκλους υπερήχησης των 5 λεπτών, με 5 λεπτά ενδιάμεση διακοπή, χρησιμοποιώντας συσκευή υπερήχων με αισθητήρα (Probe sonicator), με σκοπό τη μείωση του μεγέθους τους. Η συσκευή ρυθμίστηκε στο 70% της συνολικής έντασης του οργάνου. Μετά την κατεργασία με υπερήχους προκύπτουν μονοστιβαδικά ελαστικά λιποσώματα (SUVs ή/και LUVs), τα οποία φυλάσσονται για τους περαιτέρω χαρακτηρισμούς στις εξής συνθήκες: α) 4°C, β) 25°C και γ) 45°C.

5.3.3 Παρασκευή ελαστικών λιποσωμάτων αποτελούμενα από λιπίδιο και Span80 σε αναλογία 80:20 w/w

Τα ελαστικά λιποσώματα παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο ενυδάτωσης λεπτού λιπιδικού υμενίου, χρησιμοποιώντας διαφορετικά φωσφολιπίδια και την επιφανειοδραστική ουσία Span 80, σε αναλογία 80:20 w/w.

Αρχικά ζυγίζονται 80 mg φωσφολιπιδίου και στη συνέχεια διαλύονται σε 4 ml διαλύματος Span80, συγκέντρωσης 5 mg/ml. Η διάλυση πραγματοποιείται μέσα σε σφαιρική φιάλη των 100 ml. Ακολουθεί εξάτμιση υπό κενό του οργανικού διαλύτη, σε περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης, στους 40°C, με γρήγορη περιστροφή της φιάλης, έως ότου σχηματιστεί ομοιογενές λιπιδικό υμένιο. Το σχηματισμένο λιπιδικό υμένιο φυλάσσεται στο ψυγείο (4°C) για 24 ώρες. Οι ποσότητες φωσφολιπιδίου και επιφανειοδραστικού που χρησιμοποιήθηκαν στο κάθε σύστημα, ώστε η αναλογία φωσφολιπιδίου προς επιφανειοδραστικό να είναι ίση με 80:20 w/w, παρουσιάζονται στον πίνακα 10.

Ακολουθεί η ενυδάτωση του λεπτού λιπιδικού υμενίου, με προσθήκη 10 ml H₂O καθαρότητας HPLC, ώστε η κολλοειδής διασπορά που θα προκύψει να έχει

συγκέντρωση 10 mg/ml. Η ενυδάτωση πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο, σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία μετάπτωσης (T_m) των φωσφολιπιδίων, με αργή περιστροφή της φιάλης, για μία ώρα. Μετά την ενυδάτωση μετρίεται ο όγκος της κολλοειδούς διασποράς με τη βοήθεια πιπέτας και προστίθεται όση ποσότητα H_2O HPLC καθαρότητας απαιτείται, ώστε να συμπληρωθεί ο όγκος του H_2O που απωλέσθηκε λόγω εξάτμισης.

Τα πολυστιβαδικά λιπιδικά κυστίδια (MLVs), που προέκυψαν μετά την ενυδάτωση, υποβάλλονται σε δύο κύκλους υπερήχησης των 5 λεπτών, με 5 λεπτά ενδιάμεση διακοπή, χρησιμοποιώντας συσκευή υπερήχων με αισθητήρα (Probe sonicator), με σκοπό τη μείωση του μεγέθους τους. Η συσκευή ρυθμίστηκε στο 70% της συνολικής έντασης του οργάνου. Μετά την κατεργασία με υπερήχους προκύπτουν μονοστιβαδικά ελαστικά λιποσώματα (SUVs ή/και LUVs), τα οποία φυλάσσονται για τους περαιτέρω χαρακτηρισμούς στις εξής συνθήκες: α) 4°C, β) 25°C και γ) 45°C.

5.3.4 Παρασκευή ελαστικών λιποσωμάτων αποτελούμενα από λιπίδιο και μίγμα Tween80 και Span80 σε αναλογία 80:10:10 w/w

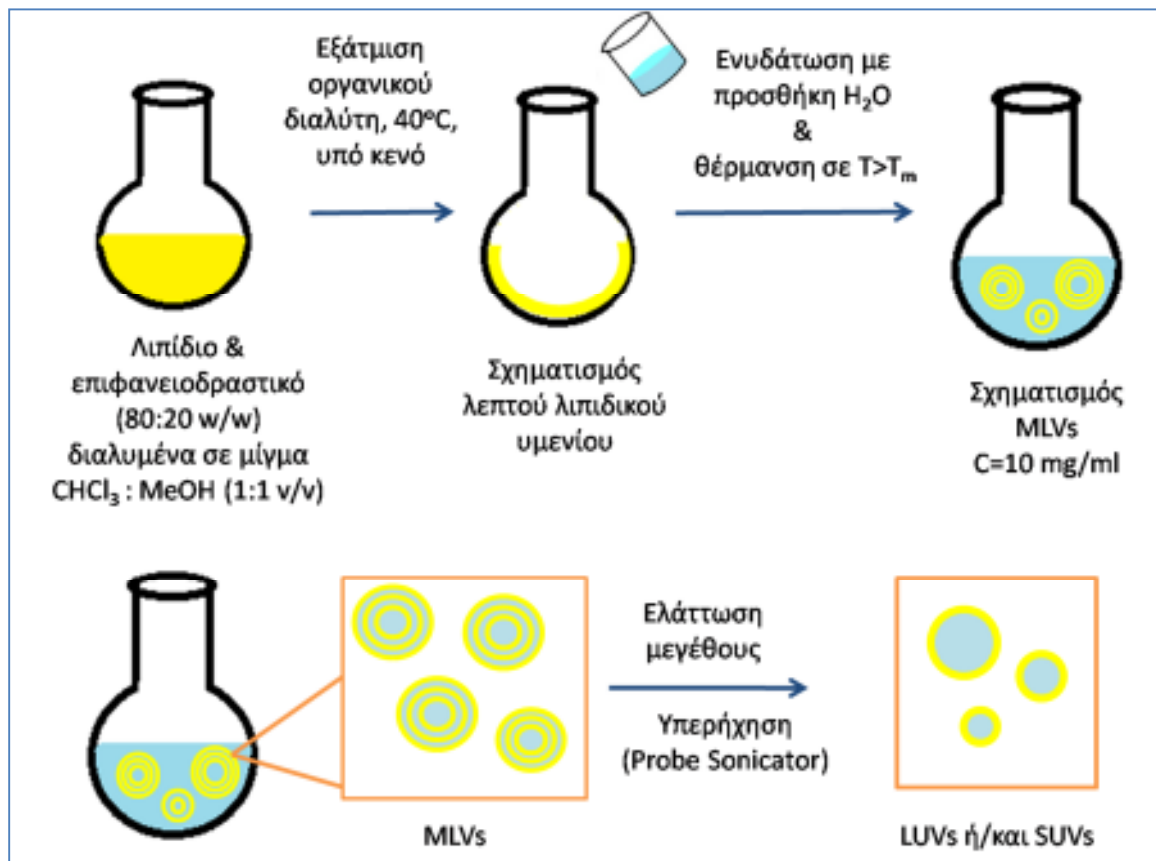
Τα ελαστικά λιποσώματα παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο ενυδάτωσης λεπτού λιπιδικού υμενίου, χρησιμοποιώντας διαφορετικά φωσφολιπίδια και μίγμα των επιφανειοδραστικών ουσιών Span 80 και Tween 80, σε αναλογία 80:10:10 w/w.

Αρχικά ζυγίζονται 80 mg φωσφολιπιδίου και στη συνέχεια διαλύονται σε 2 ml διαλύματος Span80, συγκέντρωσης 5 mg/ml και 2 ml διαλύματος Tween80, συγκέντρωσης 5mg/ml. Η διάλυση πραγματοποιείται μέσα σε σφαιρική φιάλη των 100 ml. Ακολουθεί εξάτμιση υπό κενό του οργανικού διαλύτη, σε περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης, στους 40°C, με γρήγορη περιστροφή της φιάλης, έως ότου σχηματιστεί ομοιογενές λιπιδικό υμένιο. Το σχηματισμένο λιπιδικό υμένιο φυλάσσεται στο ψυγείο (4°C) για 24 ώρες. Οι ποσότητες φωσφολιπιδίου και επιφανειοδραστικού που χρησιμοποιήθηκαν στο κάθε σύστημα, ώστε η αναλογία φωσφολιπιδίου προς επιφανειοδραστικό να είναι ίση με 80:20 w/w, παρουσιάζονται στον πίνακα 10.

Ακολουθεί η ενυδάτωση του λεπτού λιπιδικού υμενίου, με προσθήκη 10 ml H_2O καθαρότητας HPLC, ώστε η κολλοειδής διασπορά που θα προκύψει να έχει συγκέντρωση 10 mg/ml. Η ενυδάτωση πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο, σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία μετάπτωσης (T_m) των φωσφολιπιδίων, με αργή περιστροφή της φιάλης, για μία ώρα. Μετά την ενυδάτωση μετρίεται ο όγκος της κολλοειδούς διασποράς με τη βοήθεια πιπέτας και προστίθεται όση ποσότητα H_2O HPLC καθαρότητας απαιτείται, ώστε να συμπληρωθεί ο όγκος του H_2O που απωλέσθηκε λόγω εξάτμισης.

Τα πολυστιβαδικά λιπιδικά κυστίδια (MLVs), που προέκυψαν μετά την ενυδάτωση, υποβάλλονται σε δύο κύκλους υπερήχησης των 5 λεπτών, με 5 λεπτά ενδιάμεση διακοπή,

χρησιμοποιώντας συσκευή υπερήχων με αισθητήρα (Probe sonicator), με σκοπό τη μείωση του μεγέθους τους. Η συσκευή ρυθμίστηκε στο 70% της συνολικής έντασης του οργάνου. Μετά την κατεργασία με υπερήχους προκύπτουν μονοστιβαδικά ελαστικά λιποσώματα (SUVs ή/και LUVs), τα οποία φυλάσσονται για τους περαιτέρω χαρακτηρισμούς στις εξής συνθήκες: α) 4°C, β) 25°C και γ) 45°C.



Εικόνα 11 Πειραματική διαδικασία παρασκευής ελαστικών λιποσωμάτων με τη μέθοδο ενυδάτωσης λεπτού λιπιδικού υμενίου

Πίνακας 10 Ποσότητες φωσφολιπιδίων και επιφανειοδραστικών που χρησιμοποιήθηκαν στο κάθε σύστημα.

Αναλογία φωσφολιπιδίου προς επιφανειοδραστικό (w/w)	Λιπίδιο	Ποσότητες	
		Διάλυμα Tween80, C=5mg/ml	Διάλυμα Span80, C=5mg/ml
DOPC:Tween80 (80:20)	DOPC 80 mg	4 ml διαλύματος (20 mg Tween80)	-
DOPC:Span80 (80:20)	DOPC 80 mg	-	4 ml διαλύματος (20 mg Span80)
DOPC:Tween80:Span80 (80:10:10)	DOPC 80 mg	2 ml διαλύματος (10 mg Tween80)	2 ml διαλύματος (10 mg Span80)
DMPC:Tween80 (80:20)	DMPC 80 mg	4 ml διαλύματος (20 mg Tween80)	-
DMPC:Span80 (80:20)	DMPC 80 mg	-	4 ml διαλύματος (20 mg Span80)
DMPC:Tween80:Span80 (80:10:10)	DMPC 80 mg	2 ml διαλύματος (10 mg Tween80)	2 ml διαλύματος (10 mg Span80)
DPPC:Tween80 (80:20)	DPPC 80 mg	4 ml διαλύματος (20 mg Tween80)	-
DPPC:Span80 (80:20)	DPPC 80 mg	-	4 ml διαλύματος (20 mg Span80)
DPPC:Tween80:Span80 (80:10:10)	DPPC 80 mg	2 ml διαλύματος (10 mg Tween80)	2 ml διαλύματος (10 mg Span80)
HSPC:Tween80 (80:20)	HSPC 80 mg	4 ml διαλύματος (20 mg Tween80)	-
HSPC:Span80 (80:20)	HSPC 80 mg	-	4 ml διαλύματος (20 mg Span80)
HSPC:Tween80:Span80 (80:10:10)	HSPC 80 mg	2 ml διαλύματος (10 mg Tween80)	2 ml διαλύματος (10 mg Span80)
DSPC:Tween80 (80:20)	DSPC 80 mg	4 ml διαλύματος (20 mg Tween80)	-
DSPC:Span80 (80:20)	DSPC 80 mg	-	4 ml διαλύματος (20 mg Span80)
DSPC:Tween80:Span80 (80:10:10)	DSPC 80 mg	2 ml διαλύματος (10 mg Tween80)	2 ml διαλύματος (10 mg Span80)
DOPC:DSPC:Tween80 (40:40:20)	DOPC 40 mg & DSPC 40 mg	4 ml διαλύματος (20 mg Tween80)	-
DOPC:DSPC:Span80 (40:40:20)	DOPC 40 mg & DSPC 40 mg	-	4 ml διαλύματος (20 mg Span80)
DOPC:DSPC:Tween80:Span80 (40:40:20)	DOPC 40 mg & DSPC 40 mg	2 ml διαλύματος (10 mg Tween80)	2 ml διαλύματος (10 mg Span80)

5.4 Μέγεθος, κατανομή μεγέθους (ή δείκτης πολυδιασποράς) και ζ-δυναμικό των ελαστικών λιποσωμάτων

Για τον προσδιορισμό του μεγέθους, της κατανομής μεγέθους και του ζ-δυναμικού των ελαστικών λιποσωμάτων που παρήχθησαν, επιλέχθηκε η μέθοδος φασματοσκοπίας συσχέτισης φωτονίων ή διαφορετικά δυναμική σκέδαση φωτός (DLS). Το μέσο μέγεθος των ελαστικών λιποσωμάτων, το οποίο ορίζεται ως η μέση υδροδυναμική διάμετρος αυτών, ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI), που αποτελεί μέτρο της ομοιομορφίας της κατανομής μεγέθους και το ζ-δυναμικό, μετρήθηκαν άμεσα με τη βοήθεια του οργάνου Zetasizer 3000 HSA της Malvern.

Αρχικά γίνεται προετοιμασία του δείγματος. Ογκομετρούνται 100 μl από το δείγμα της κολλοειδούς διασποράς των ελαστικών λιποσωμάτων και αραιώνονται 30 φορές, σε 2900 μl νερό βαθμού καθαρότητας HPLC. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δύο ειδών μετρήσεις, μία για τον προσδιορισμό του μεγέθους και του δείκτη πολυδιασποράς και μία για τον προσδιορισμό του ζ-δυναμικού. Για κάθε είδος μέτρησης πραγματοποιούνται τρία σετ μετρήσεων των 10 επαναλήψεων και λαμβάνεται ο μέσος όρος αυτών.

- Για τη μέτρηση του μεγέθους και του δείκτη πολυδιασποράς (PDI), το αραιωμένο δείγμα μεταφέρεται μέσα σε πλαστική κυψελίδα μίας χρήσης από πολυστυρένιο, χωρητικότητας 3 ml. Στη συνέχεια η κυψελίδα τοποθετείται στην ειδική υποδοχή του οργάνου Zetasizer, για τον χαρακτηρισμό των ελαστικών λιποσωμάτων.
- Για τον προσδιορισμό του ζ-δυναμικού το αραιωμένο δείγμα εγχύεται με σταθερό ρυθμό, μέσω μίας σύριγγας, στην ειδική υποδοχή του οργάνου, η οποία οδηγεί το λιποσωματικό εναιώρημα στην εσωτερική κυψελίδα του οργάνου, όπου με τη βοήθεια ηλεκτροδίων εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο στη διασπορά των σωματιδίων και έτσι μετριέται το ζ-δυναμικό.

Στο Zetasizer η μονοχρωματική ακτίνα λέιζερ παράγεται από λυχνία He-Ne και το μήκος κύματος αυτής είναι 633nm. Τα δείγματα σκεδιάζονται υπό γωνία 90° και οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία 25 °C.

Πριν από την μέτρηση του μεγέθους και του ζ-δυναμικού απαιτείται η δημιουργία μίας τυποποιημένης διαδικασίας λειτουργίας (Standard Operating Procedure ή SOP). Για κάθε δείγμα δημιουργούνται δύο αρχεία SOP, ένα για τις μετρήσεις μεγέθους και ένα για τις μετρήσεις ζ-δυναμικού. Σε ένα αρχείο SOP συμπληρώνονται πληροφορίες για το δείγμα (π.χ pH, δείκτης διάθλασης της διασποράς, θερμοκρασία), την κυψελίδα και το πρωτόκολλο μέτρησης (π.χ αριθμός μετρήσεων, αριθμός επαναλήψεων).

5.4.1 Αρχή λειτουργίας μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)

Η δυναμική σκέδαση φωτός ή διαφορετικά φασματοσκοπία συσχέτισης ηλεκτρονίων είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για τον προσδιορισμό του μεγέθους των σωματιδίων, της κατανομής του μεγέθους (δείκτης πολυδιασποράς) και της σταθερότητάς τους. Η μέθοδος είναι αξιόπιστη, απλή, γρήγορη, επαναλήψιμη και σχετικά οικονομική. Η δυναμική σκέδαση φωτός μπορεί να δώσει πληροφορίες για σωματίδια με διάμετρο από μερικά νανόμετρα μέχρι 5 μικρόμετρα.

Όσον αφορά τον προσδιορισμό του μεγέθους και της κατανομής μεγέθους των σωματιδίων, η αρχή λειτουργίας της μεθόδου βασίζεται στον προσδιορισμό του συντελεστή διάχυσης των σωματιδίων. Πιο αναλυτικά μονοχρωματική ακτίνα λέιζερ, συγκεκριμένου μήκους κύματος, φωτοβολεί το δείγμα που βρίσκεται σε διασπορά μέσα στην κυψελίδα και τα διεσπαρμένα σωματίδια σκεδάζουν τμήμα της ακτινοβολίας. Όταν τα σωματίδια διασπείρονται σε ένα μέσο διασποράς ακολουθούν την κίνηση Brown, εξαιτίας των θερμικά παρακινούμενων συγκρούσεων μεταξύ των μορίων διαλύτη και των σωματιδίων. Η ταχύτητα κίνησης των σωματιδίων εξαρτάται από το μέγεθός τους. Η κίνηση Brown των σωματιδίων έχει ως αποτέλεσμα την διακύμανση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε συνάρτηση με τον χρόνο. Τα πειραματικά δεδομένα έντασης – χρόνου αξιοποιούνται με την βοήθεια στατιστικών συναρτήσεων συσχέτισης. Υπάρχουν ποικίλες συναρτήσεις, ανάλογα με την φύση του δείγματος, από τις οποίες υπολογίζεται ο συντελεστής διάχυσης και τελικά με εφαρμογή της εξίσωσης Stokes-Einstein υπολογίζεται η υδροδυναμική διάμετρος των διεσπαρμένων σωματιδίων. [48, 49]

Εξίσωση Stokes-Einstein:
$$d_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_T}$$

όπου:

k_B : σταθερά Boltzman

T: απόλυτη θερμοκρασία

η : ιξώδες του μέσου διασποράς

D_T : συντελεστής διάχυσης

Όσον αφορά τον υπολογισμό του ζ-δυναμικού, η αρχή λειτουργίας της μεθόδου βασίζεται στην μέτρηση της κινητικότητας των σωματιδίων, παρουσία ηλεκτρικού πεδίου. Πιο αναλυτικά η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου αναγκάζει τα φορτισμένα σωματίδια να κινηθούν προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο. Η αυθόρμητη αυτή κίνηση των σωματιδίων δυσχεραίνεται από ιξώδεις δυνάμεις. Όταν οι δυνάμεις

εξισορροπηθούν, τα σωματίδια κινούνται με σταθερή ταχύτητα. Η ταχύτητα των σωματιδίων σε ένα ηλεκτρικό πεδίο αναφέρεται και ως ηλεκτροφορετική κινητικότητα και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί συσχετίζονται με την ηλεκτροφορετική κινητικότητα μέσω της εξίσωσης Henry: ^[42]

$$U_E = \frac{2 \varepsilon z f(ka)}{3 \eta}$$

Όπου,

U_E : η ηλεκτροφορετική κινητικότητα των σωματιδίων

ε : η διηλεκτρική σταθερά του μέσου διασποράς

z : το ζ-δυναμικό των σωματιδίων

η : το ιξώδες του μέσου διασποράς

$f(ka)$: αποτελεί μία συνάρτηση, η οποία παίρνει την τιμή 1.5 για υδατικά διαλύματα και ονομάζεται προσέγγιση Smoluchowski και την τιμή 1 για μη πολικούς διαλύτες και αναφέρεται ως προσέγγιση Huckel

5.5 Μελέτης της φυσικής σταθερότητας των ελαστικών λιποσωμάτων

Τα λιποσώματα κατά την αποθήκευσή τους, τείνουν να συνενώνονται, σχηματίζοντας μεγαλύτερα λιπιδικά κυστίδια, τα οποία βρίσκονται θερμοδυναμικά σε πιο σταθερή κατάσταση. Συνεπώς για την εκτίμηση της φυσικής σταθερότητας των ελαστικών λιποσωμάτων μετρήθηκε το μέγεθός τους, ως σημαντική φυσική ιδιότητα, σε τακτά χρονικά διαστήματα, σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους.

Το μέγεθος των ελαστικών λιποσωμάτων (μέση υδροδυναμική διάμετρος) μετρήθηκε με τη βοήθεια του οργάνου Zetasizer της Malvern, χρησιμοποιώντας την μέθοδο της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός. Αναλυτικότερα 100 μl από το δείγμα της κολλοειδούς διασποράς των ελαστικών λιποσωμάτων, αραιώνονται 30 φορές, σε 2900 μl νερό βαθμού καθαρότητας HPLC. Το αραιωμένο δείγμα μεταφέρεται μέσα σε πλαστική κυψελίδα μίας χρήσης από πολυστυρένιο, χωρητικότητας 3 ml. Στη συνέχεια η κυψελίδα τοποθετείται στην ειδική υποδοχή του οργάνου Zetasizer, για τον προσδιορισμό του μεγέθους, που ορίζεται ως η μέση υδροδυναμική διάμετρος των σωματιδίων. Οι παράμετροι λειτουργίας του οργάνου καθώς και η αρχή λειτουργίας της μεθόδου έχουν περιγραφεί εκτενώς στο κεφάλαιο 5.4. Οι μετρήσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν σε τακτά χρονικά διαστήματα, π.χ. περίπου 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 ημέρες, από την ημέρα παρασκευής του δείγματος, ώστε να παρατηρηθούν μεταβολές στη μέση υδροδυναμική διάμετρο των διεσπαρμένων σωματιδίων – ελαστικών λιποσωμάτων.

Κεφάλαιο 6. Αποτελέσματα – Συζήτηση

6.1 Χαρακτηρισμός φυσικών ιδιοτήτων των ελαστικών λιποσωμάτων

Τα ελαστικά λιποσώματα χαρακτηρίστηκαν ως προς το μέγεθος, τον δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό τους. Το μέγεθος ορίζεται ως η μέση υδροδυναμική διάμετρος (D_h) των ελαστικών λιποσωμάτων, ο δείκτης πολυδιασποράς αποτελεί μέτρο της ομοιομορφίας της κατανομής μεγέθους, και το ζ-δυναμικό αποτελεί αξιόπιστο δείκτη του μεγέθους των ηλεκτροστατικών απωστικών δυνάμεων μεταξύ των διασπεραμένων ελαστικών λιποσωμάτων. Το μέγεθος και ο δείκτης πολυδιασποράς, μεταξύ άλλων φυσικών ιδιοτήτων, επηρεάζονται από τη μέθοδο παρασκευής των ελαστικών λιποσωμάτων καθώς και από τη σύστασή τους (λιπιδική σύσταση και ύπαρξη άλλων μορίων στη διπλοστιβάδα).

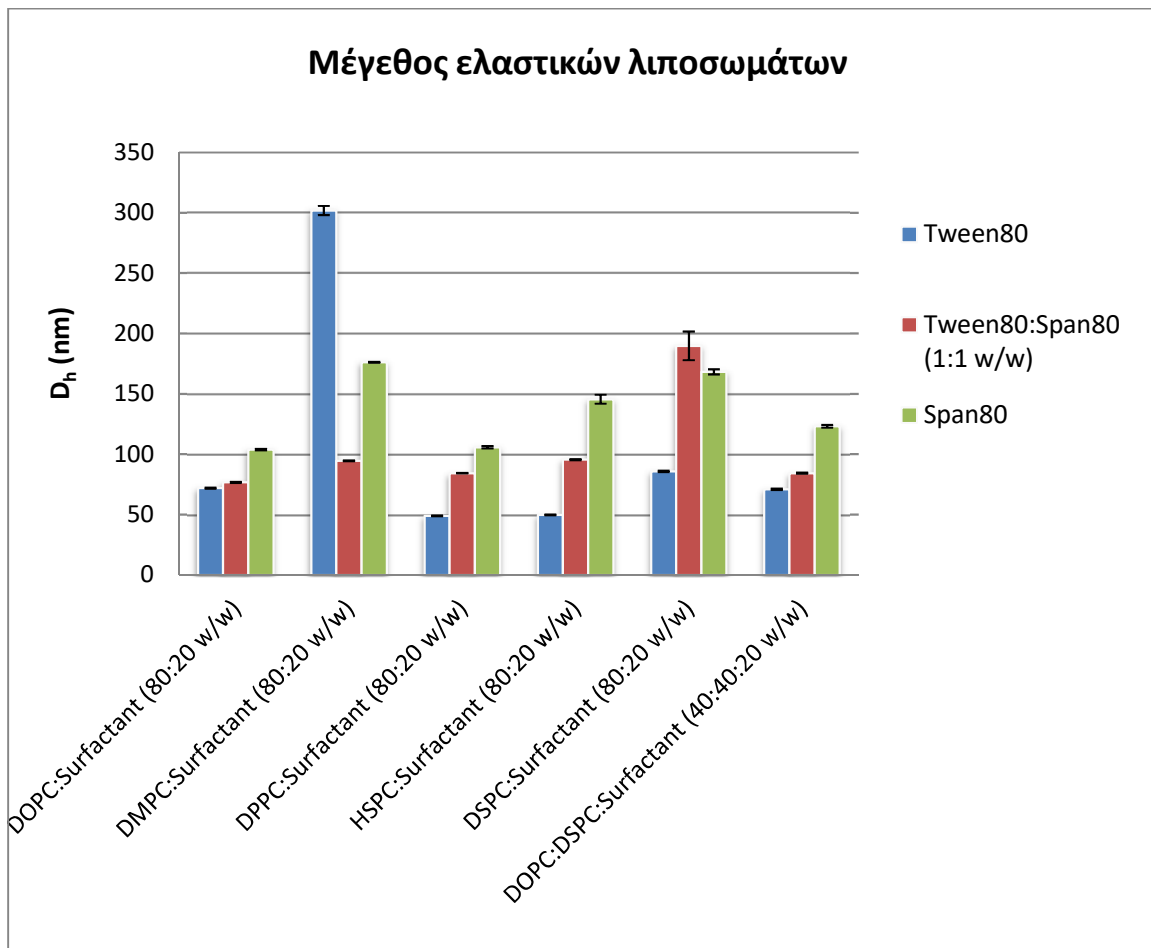
Ο χαρακτηρισμός των ελαστικών λιποσωμάτων ως προς το μέγεθος, τον δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και το ζ-δυναμικό πραγματοποιήθηκε με χρήση της μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS). Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρία σετ των δέκα επαναλήψεων το καθένα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος αυτών. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Πίνακας 11 Μέση υδροδυναμική διάμετρος και δείκτης πολυδιασποράς των ελαστικών λιποσωμάτων την ημέρα παρασκευής τους

Day 0				
Ελαστικά λιποσώματα	D_h (nm)	SD ($\pm$)	PDI	SD ($\pm$)
DOPC:Tween80(80:20 w/w)	71.9	0.5	0.297	0.002
DOPC:Span80(80:20 w/w)	103.8	0.7	0.2	0.004
DOPC:Tween80:Span80 (80:10:10 w/w)	76.7	0.5	0.305	0.014
DMPC:Tween80(80:20 w/w)	301.9	3.8	0.374	0.08
DMPC:Span80(80:20 w/w)	176.1	0.3	0.553	0.015
DMPC:Tween80:Span80(80:10:10 w/w)	94.5	0.4	0.25	0.011
DPPC:Tween80(80:20 w/w)	49	0.4	0.407	0.004
DPPC:Span80(80:20 w/w)	105.7	1	0.266	0.008
DPPC:Tween80:Span80(80:10:10 w/w)	84.3	0.2	0.273	0.012
HSPC:Tween80(80:20 w/w)	49.8	0.4	0.373	0.012
HSPC:Span80(80:20 w/w)	145.5	3.7	0.402	0.041
HSPC:Span80:Tween80(80:10:10 w/w)	95.5	0.5	0.287	0.019
DSPC:Tween80(80:20 w/w)	85.7	0.6	0.335	0.01
DSPC:Span80(80:20 w/w)	168.2	2.1	0.191	0.004
DSPC:Tween80:Span80(80:10:10 w/w)	189.7	11.9	0.281	0.039
DOPC:DSPC:Tween80(40:40:20 w/w)	70.9	0.7	0.307	0.018
DOPC:DSPC:Span80(40:40:20 w/w)	123.1	1.1	0.322	0.005
DOPC:DSPC:Tween80:Span80(40:40:10:10w/w)	84.3	0.5	0.367	0.001

* Οι τιμές που δίνονται είναι μέσοι όροι τριών σετ των δέκα επαναλήψεων για το κάθε δείγμα.

Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζονται το μέγεθος των ελαστικών λιποσωμάτων, που ορίζεται ως η μέση υδροδυναμική διάμετρος (D_h) και ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI), την ημέρα παρασκευής τους. Οι τιμές που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι τριών σετ των δέκα επαναλήψεων για το κάθε δείγμα, από όπου προκύπτει και η τυπική απόκλιση που φαίνεται στα διαγράμματα.



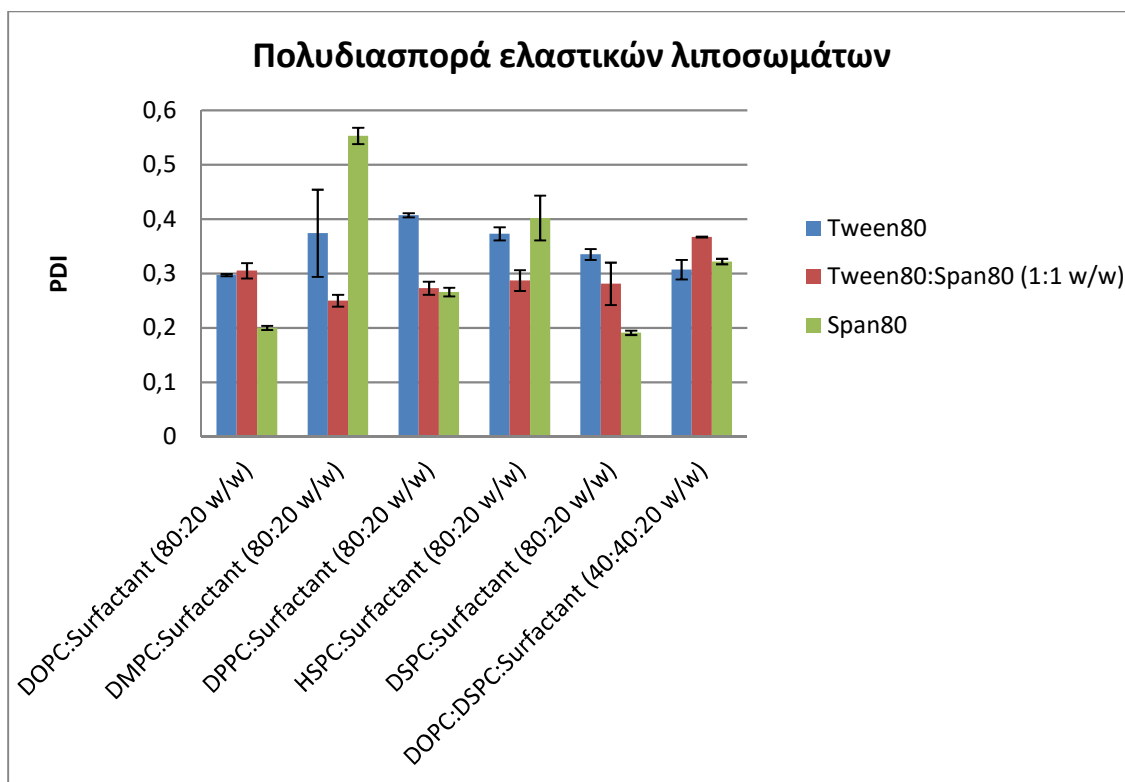
Εικόνα 12 Το μέγεθος των ελαστικών λιποσωμάτων, αποτελούμενα από λιπίδιο και επιφανειοδραστικό σε αναλογία 80:20 w/w, την ημέρα παρασκευής τους

Από το διάγραμμα που απεικονίζει το μέγεθος των ελαστικών λιποσωμάτων την ημέρα παρασκευής τους, προκύπτει ότι τα ελαστικά λιποσώματα που παρήχθησαν κυμαίνονται από μικρά μινωστιβαδικά (SUVs), με μέση υδροδυναμική διάμετρο μικρότερη από 100 nm, έως μεγάλα μονοστιβαδικά (LUVs), με μέση υδροδυναμική διάμετρο μεγαλύτερη από 100 nm.

Επιπλέον όπως παρατηρείται από το παραπάνω διάγραμμα, οι διαφορετικοί τύποι επιφανειοδραστικών ουσιών, που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των ελαστικών λιποσωμάτων, επηρεάζουν το μέγεθος των λιπιδικών κυστιδίων. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν ποικίλες μελέτες, οι οποίες επισημαίνουν ότι η ενσωμάτωση επιφανειοδραστικών στα λιπιδικά κυστίδια, όπως τα λιποσώματα, έχει εμφανή επίδραση στο μέγεθος αυτών. Παράμετροι όπως η συγέντρωση του επιφανειοδραστικού, ο αριθμός και το μήκος των υδρογονανθρακικών αλυσίδων και ο βαθμός υδροφιλίας, έχουν αποδειχθεί ότι επηρεάζουν το μέγεθος των ελαστικών λιποσωμάτων. ^[47]

Στην παρούσα διπλωματική εργασία παρατηρήθηκε μείωση του μεγέθους των ελαστικών λιποσωμάτων, με αύξηση της τιμής HLB της επιφανειοδραστικής ουσίας. Πράγματι σχεδόν όλα τα συστήματα που αποτελούνταν από λιπίδιο και το υδρόφιλο επιφανειοδραστικό Tween80, την ημέρα της παρασκευής τους ήταν μικρά μονοστιβαδικά (SUVs), με μέση υδροδυναμική διάμετρο μικρότερη από 100 nm και στενή κατανομή μεγέθους γύρω από τη μέση τιμή (μονοδιασπορά). Αντιθέτως τα ελαστικά λιποσώματα που αποτελούνταν από την επιφανειοδραστική ουσία Span80 ήταν μεγαλύτερα σε μέγεθος, με μέση υδροδυναμική διάμετρο μεγαλύτερη από 100 nm. Το γεγονός αυτό πιθανόν οφείλεται στο διαφορετικό βαθμό υδροφιλίας του Tween80 και του Span80. Το Tween80 (τιμή HLB 15) είναι πιο υδρόφιλο από το Span80 (τιμή HLB 4.3), όπως προκύπτει από τις τιμές HLB αυτών. Συνεπώς το μέγεθος των ελαστικών λιποσωμάτων πιθανόν μειώνεται με αύξηση του βαθμού υδροφιλίας του επιφανειοδραστικού.

Παρόμοια αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση του βαθμού υδροφιλίας στο μέγεθος των λιπιδικών κυστιδίων, έχουν παρατηρηθεί και σε άλλες ερευνητικές εργασίες, βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων. ^[47]



Εικόνα 13 Η πολυδιασπορά των ελαστικών λιποσωμάτων, αποτελούμενα από λιπίδιο και επιφανειοδραστικό σε αναλογία 80:20 w/w, την ημέρα παρασκευής τους

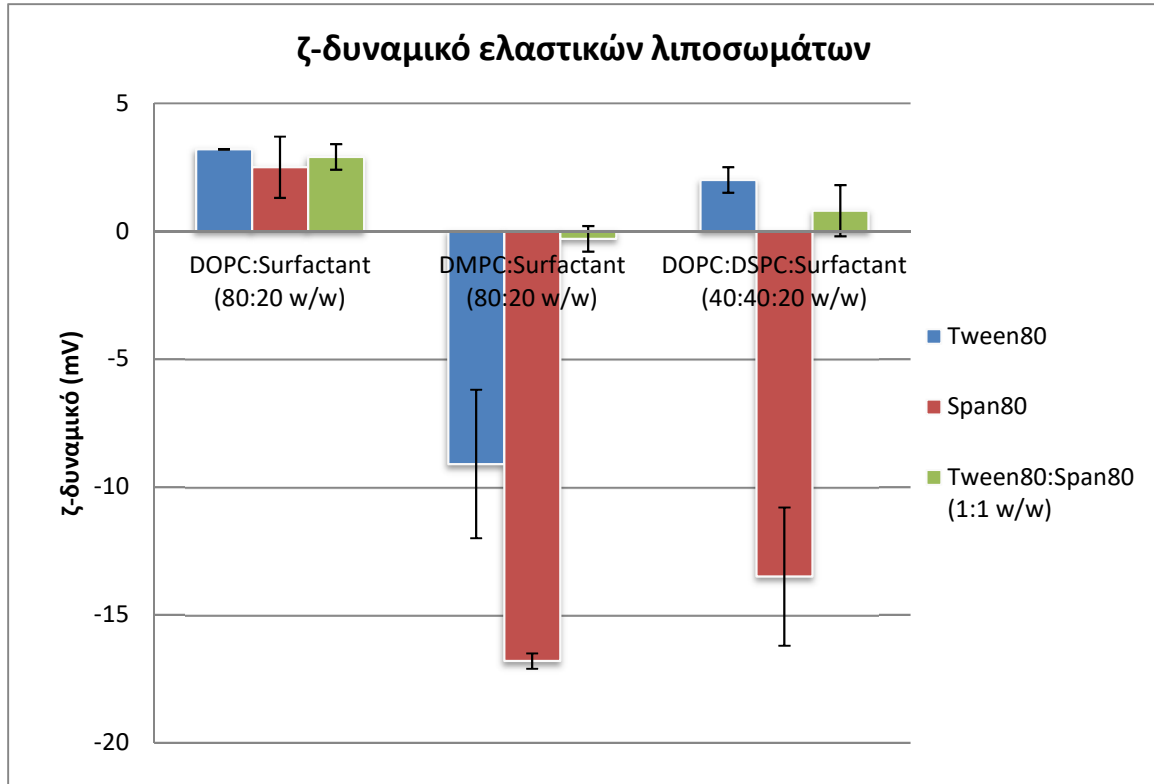
Ο δείκτης πολυδιασποράς, ως μέτρο της ομοιομορφίας της κατανομής μεγέθους, υπολογίστηκε την ημέρα παρασκευής των ελαστικών λιποσωμάτων, ότι ήταν μικρότερος από 0.5 σχεδόν για όλα τα συστήματα. Η χαμηλή τιμή του δείκτη πολυδιασποράς (PDI), κοντά στο 0, υποδηλώνει μικρή διακύμανση του μεγέθους των διεσπαρμένων ελαστικών λιποσωμάτων (μονοδιασπορά) και στενή κατανομή του μεγέθους γύρω από τη μέση τιμή.

Πίνακας 12 ζ-δυναμικό των ελαστικών λιποσωμάτων την ημέρα παρασκευής τους

Day 0		
Ελαστικά λιποσώματα	ζ-δυναμικό (mV)	SD (±)
DOPC:Tween80 (80:20 w/w)	3.2	0
DOPC:Span80 (80:20 w/w)	2.5	1.2
DOPC:Tween80:Span80 (80:10:10 w/w)	2.9	0.5
DMPC:Tween80 (80:20 w/w)	-9.1	2.9
DMPC:Span80 (80:20 w/w)	-16.8	0.3
DMPC:Tween80:Span80 (80:10:10 w/w)	-0.3	0.5
DOPC:DSPC:Tween80 (40:40:20 w/w)	2	0.5
DOPC:DSPC:Span80 (40:40:20 w/w)	-13.5	2.7
DOPC:DSPC:Tween80:Span80 (40:40:10:10 w/w)	0.8	1

* Οι τιμές που δίνονται είναι μέσοι όροι τριών σετ των δέκα επαναλήψεων για το κάθε δείγμα.

Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζεται το ζ-δυναμικό των ελαστικών λιποσωμάτων, την ημέρα παρασκευής τους. Οι τιμές που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι τριών σετ των δέκα επαναλήψεων για το κάθε δείγμα, από όπου προκύπτει και η τυπική απόκλιση που φαίνεται στο διάγραμμα.



Εικόνα 14 ζ-δυναμικό ελαστικών λιποσωμάτων, αποτελούμενα από λιπίδιο και επιφανειοδραστικό σε αναλογία 80:20 w/w, την ημέρα παρασκευής τους

Το ζ-δυναμικό των ελαστικών λιποσωμάτων DOPC:Tween80 (80:20 w/w), DOPC:Span80 (80:20 w/w), DOPC:Tween80:Span80 (80:10:10 w/w), DOPC:DSPC:Tween80 (40:40:20w/w) και DOPC:DSPC:Tween80:Span80 (40:40:10:10 w/w), την ημέρα της παρασκευής τους, παρουσίασε πολύ χαμηλές θετικές τιμές. Οι χαμηλές θετικές τιμές του ζ-δυναμικού υποδηλώνουν ότι οι ηλεκτροστατικές απωστικές δυνάμεις δεν είναι αρκετά ισχυρές για να «νικήσουν» τις ελκτικές δυνάμεις Van der Waals και τα διεσπαρμένα κolloειδή σωματίδια τείνουν να συνενωθούν δημιουργώντας συσσωματώματα. Οι τιμές αυτές ήταν αναμενόμενες και μπορεί να οφείλονται στο καθαρό φορτίο του λιπιδίου και του επιφανειοδραστικού που συνθέτουν τα εν λόγω ελαστικά λιποσωμάτα, καθώς αποτελούνται από φωσφολιπίδια με μηδενικό καθαρό φορτίο (DOPC ή/και DSPC) και μη ιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες (Tween80 ή/και Span80), οι οποίες δεν δίστανται σε υδατικά διαλύματα. Επιπλέον τα ελαστικά λιποσώματα DMPC:Tween80:Span80 (80:10:10 w/w) την ημέρα της παρασκευής τους,

παρουσίασαν πολύ χαμηλή αρνητική τιμή ζ-δυναμικού (-0.3 mV), η οποία υποδηλώνει την απουσία ισχυρών ηλεκτροστατικών απωστικών δυνάμεων.

Ωστόσο τα ελαστικά λιποσώματα DMPC:Tween80 (80:20 w/w), DOPC:DSPC:Span80 (40:40:20 w/w) και DMPC:Span80 (80:20 w/w) την ημέρα της παρασκευής τους, παρουσίασαν πιο υψηλή, αρνητική τιμή ζ-δυναμικού, που κυμαινόταν από -9.1 mV έως -16.8 mV αντίστοιχα και η οποία μπορεί να επηρεάσει την εις βάθος χρόνου φυσική σταθερότητά τους.

6.2 Μελέτη φυσικής σταθερότητας των ελαστικών λιποσωμάτων

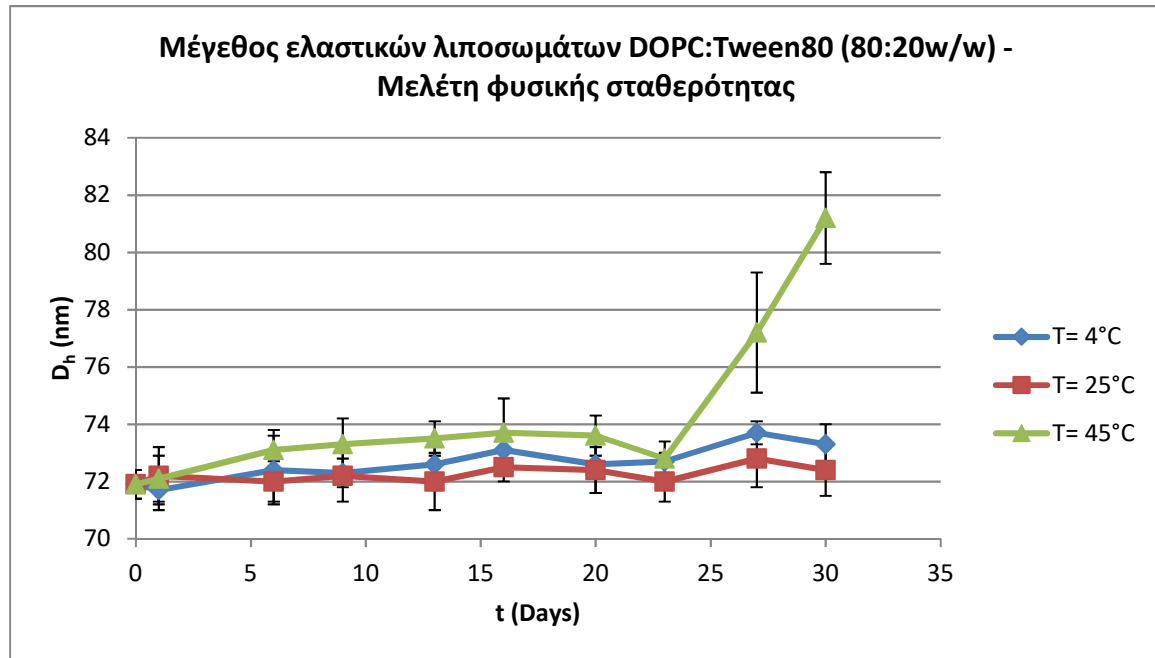
Μια σημαντική παράμετρος που πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν για την χρήση των λιποσωμάτων ως φαρμακευτικά προϊόντα, είναι η εις βάθος χρόνου σταθερότητά τους. Τα λιποσώματα κατά την αποθήκευσή τους, τείνουν να συνενώνονται, σχηματίζοντας μεγαλύτερα λιπιδικά κυστίδια, με αποτέλεσμα τη μείωση της συνολικής επιφάνειας του συστήματος και την ελαχιστοποίηση της συνολικής ενέργειάς του.

Τα ελαστικά λιποσώματα που παρασκευάστηκαν, διατηρήθηκαν στις εξής συνθήκες αποθήκευσης α) ψυγείο (4°C), β) θερμοκρασία περιβάλλοντος (25°C) και γ) συνθήκες επιταχυνόμενης γήρανσης (45°C) και προσδιορίστηκε η φυσική σταθερότητά τους, σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους. Για την εκτίμηση της φυσικής σταθερότητας των ελαστικών λιποσωμάτων, μετρήθηκε η μέση υδροδυναμική διάμετρος τους με τη μέθοδο της δυναμικής σκέδασης φωτός, ως μία σημαντική φυσική ιδιότητα που επηρεάζεται από τη σταθερότητα του συστήματος, σε τακτά χρονικά διαστήματα και σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους.

Στα επόμενα κεφάλαια συνοψίζονται τα αποτελέσματα της μελέτης φυσικής σταθερότητας των ελαστικών λιποσωμάτων που παρήχθησαν, στις διάφορες συνθήκες αποθήκευσης.

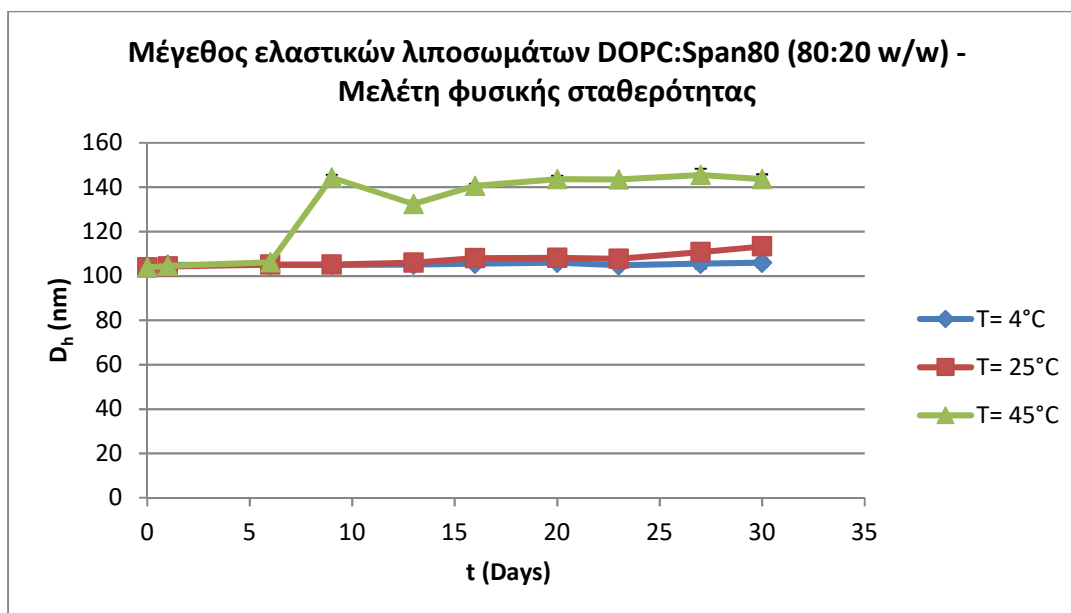
Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζονται οι μεταβολές στο μέγεθος των ελαστικών λιποσωμάτων, κατά τη χρονική περίοδο αποθήκευσής τους στις παραπάνω συνθήκες. Οι τιμές που παρουσιάζονται είναι μέσοι όροι τριών σετ των δέκα επαναλήψεων, από όπου προκύπτει και η τυπική απόκλιση που φαίνεται στα διαγράμματα.

6.2.1 Μελέτη φυσικής σταθερότητας των ελαστικών λιποσωμάτων DOPC:Επιφανειοδραστικό (80:20 w/w)



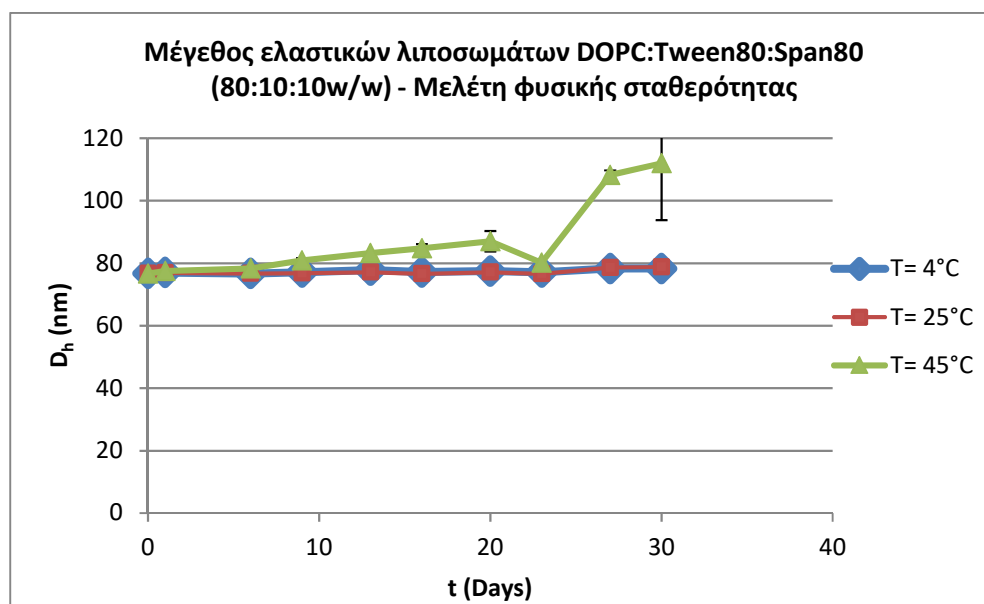
Εικόνα 15 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DOPC:Tween80 (80:20 w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης

Η μέση υδροδυναμική διάμετρος των ελαστικών λιποσωμάτων DOPC:Tween80 (80:20 w/w) που αποθηκεύτηκαν στους 4°C και 25°C, δεν παρουσίασε αξιοσημείωτη μεταβολή μετά από 30 ημέρες και μπορεί να χαρακτηριστεί ως σταθερή, (από 71.9 nm σε 73.3 nm και σε 72.4 nm αντίστοιχα). Αντιθέτως τα ελαστικά λιποσωμάτα DOPC:Tween80 (80:20 w/w) που αποθηκεύτηκαν στους 45°C, παρουσίασαν μετά την 23^η ημέρα της αποθήκευσής τους μικρή αύξηση της μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου τους κατά 10 nm περίπου.



Εικόνα 16 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DOPC:Span80 (80:20 w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης

Τα ελαστικά λιποσώματα DOPC:Span80 (80:20w/w) μπορούν να χαρακτηριστούν σταθερά, όσον αφορά το μέγεθός, μετά από 30 ημέρες αποθήκευσης στους 4°C. Επιπλέον παρατηρήθηκε μικρή, αλλά μη αξιόλογη, αύξηση της μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου μετά από 20 ημέρες αποθήκευσης στους 25°C. Αντιθέτως το μέγεθος των ελαστικών λιποσωμάτων DOPC:Span80 (80:20 w/w) αυξήθηκε σημαντικά κατά 40 nm μετά από 9 ημέρες παραμονής στους 45°C.



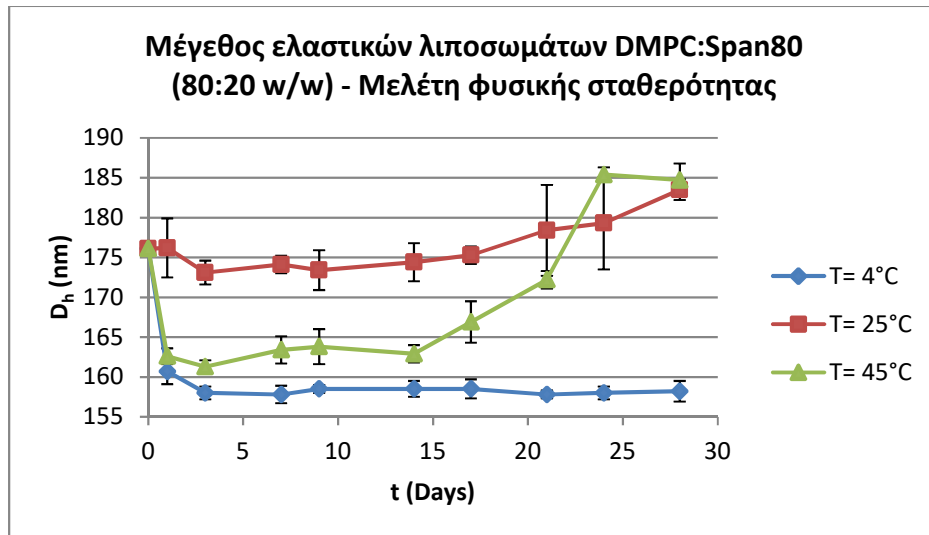
Εικόνα 17 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DOPC:Tween80:Span80 (80:10:10 w/w) σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης

Μετά από 30 ημέρες το μέγεθος των ελαστικών λιποσωμάτων DOPC:Tween80:Span80 (80:10:10 w/w) που διατηρήθηκαν στους 4°C και 25°C, παρέμεινε σταθερό (από 76.7 nm σε 78.3 nm και 78.8 nm αντίστοιχα). Ενώ το μέγεθος αυτών που διατηρήθηκαν στους 45°C παρουσίασε αξιοσημείωτη αύξηση κατά 30 nm μετά την 23^η ημέρα.

Συνοπτικά από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρήθηκε ότι οι συνθήκες αποθήκευσης επηρεάζουν τη φυσική σταθερότητα των ελαστικών λιποσωμάτων, καθώς αυτά που διατηρήθηκαν στους 4°C παρέμειναν σταθερά, όσον αφορά το μέγεθος τους, κατά το χρονικό διάστημα των 30 ημερών. Αντιθέτως τα ελαστικά λιποσώματα που διατηρήθηκαν στους 45°C παρουσίασαν αξιοσημείωτη αύξηση της υδροδυναμικής διαμέτρου τους (D_h), μετά από μερικές μέρες.

Επιπλέον παρατηρήθηκε μεγαλύτερη αύξηση της μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου των ελαστικών λιποσωμάτων DOPC:Span80 (80:20 w/w) κατά την αποθήκευσή τους στους 25°C, σε σύγκριση με τα ελαστικά λιποσώματα DOPC:Tween80 (80:20 w/w) και DOPC:Tween80:Span80 (80:10:10 w/w) στις ίδιες συνθήκες αποθήκευσης. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στην στερεοχημική σταθεροποίηση που προσδίδει το υδρόφιλο επιφανειοδραστικό Tween80 στα ελαστικά λιποσώματα που αποτελούνται από αυτό.

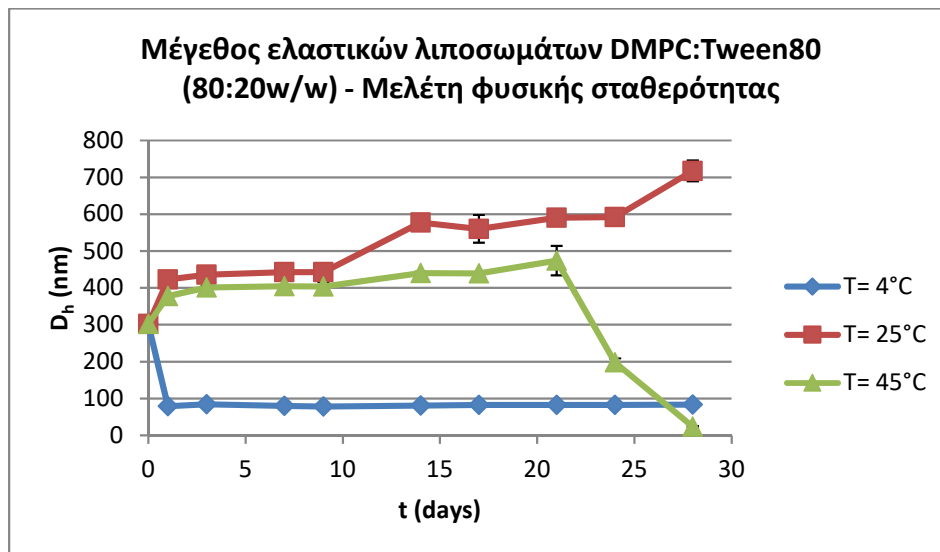
6.2.2 Μελέτη φυσικής σταθερότητας των ελαστικών λιποσωμάτων DMPC:Επιφανειοδραστικό (80:20 w/w)



Εικόνα 18 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DMPC:Span80 (80:20w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης

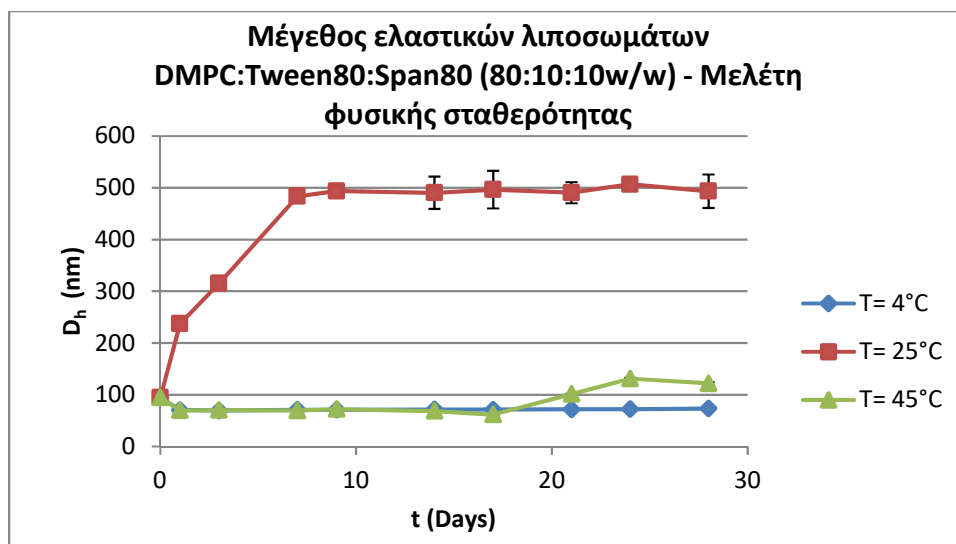
Αρχικά παρατηρήθηκε μείωση του μεγέθους των ελαστικών λιποσωμάτων DMPC:Span80 (80:20 w/w) από 176.1 nm σε 158.2 nm και 162.6 nm, την 1^η ημέρα παραμονής τους στους 4°C και στους 45°C αντίστοιχα. Στη συνέχεια τα ελαστικά λιποσώματα που διατηρήθηκαν στους 4°C, παρέμειναν σταθερά ως προς τη μέση

υδροδυναμική διάμετρό τους, έως το πέρας των μετρήσεων. Ενώ τα ελαστικά λιποσώματα που διατηρήθηκαν στους 45°C, παρουσίασαν αξιοσημείωτη αύξηση του μεγέθους τους μετά την 1^η ημέρα έως το πέρας των μετρήσεων. Τέλος τα ελαστικά λιποσώματα που διατηρήθηκαν στους 25°C, παρουσίασαν μικρή αύξηση του μεγέθους τους μετά από 30 ημέρες.



Εικόνα 19 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DMPC:Tween80 (80:20w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης

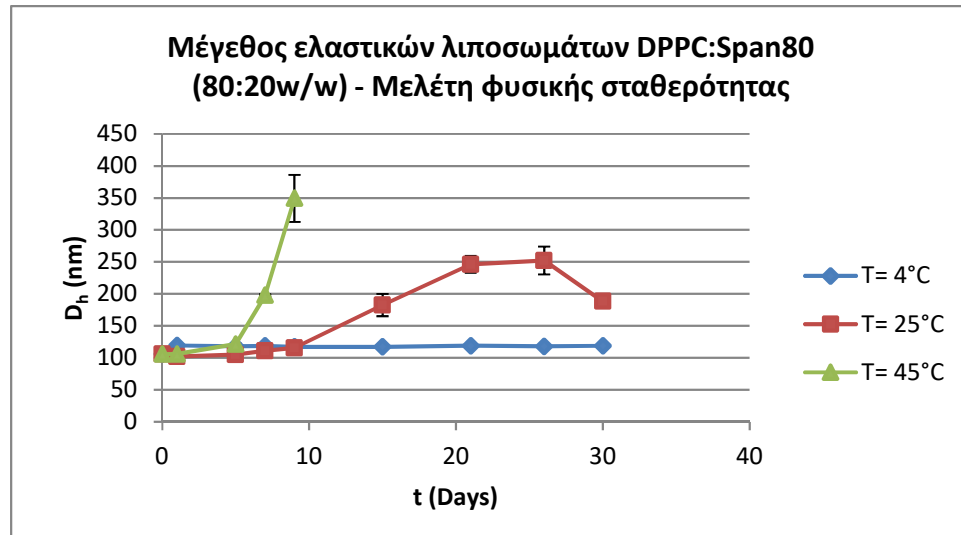
Αρχικά παρατηρήθηκε μείωση του μεγέθους των ελαστικών λιποσωμάτων DMPC:Tween80 (80:20 w/w), την 1^η ημέρα παραμονής τους στους 4°C και στη συνέχεια το μέγεθός τους διατηρήθηκε σταθερό, έως το πέρας των μετρήσεων. Η μέση υδροδυναμική διάμετρος των ελαστικών λιποσωμάτων που διατηρήθηκαν στους 25°C, παρουσίασε μετά τις 30 ημέρες σημαντική αύξηση από 301.9 nm σε 717.4 nm. Τέλος το μέγεθος των ελαστικών λιποσωμάτων, που διατηρήθηκαν στους 45°C, παρουσίασε αρχικά αξιοσημείωτη αύξηση έως την 24^η ημέρα, όπου μειώθηκε ραγδαία. Η μείωση αυτή πιθανόν οφείλεται στο σπάσιμο των ελαστικών λιποσωμάτων και υποδηλώνει την κατάρρευση του συστήματος.



Εικόνα 20 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DMPC:Tween80:Span80 (80:10:10w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης

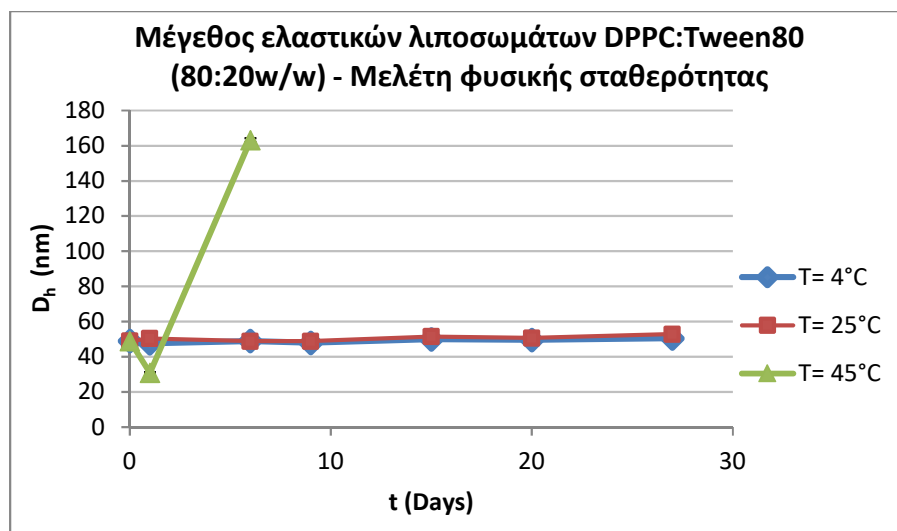
Αρχικά παρατηρήθηκε μείωση του μεγέθους των ελαστικών λιποσωμάτων DMPC:Tween80:Span80 (80:10:10 w/w) από 94.5 nm σε 70.6 nm και 69.9 nm την 1^η ημέρα παραμονής τους στους 4°C και στους 45°C αντίστοιχα. Μετά την 1^η ημέρα, τα λιποσώματα που διατηρήθηκαν στους 4°C παρέμειναν σταθερά ως προς το μέγεθός τους, μέχρι το πέρας των 30 ημερών, ενώ τα λιποσώματα που διατηρήθηκαν στους 45°C, παρουσίασαν αύξηση του μεγέθους τους μετά την 17^η ημέρα. Τέλος τα ελαστικά λιποσώματα που διατηρήθηκαν στους 25°C παρουσίασαν αξιοσημείωτη αύξηση του μεγέθους τους, μετά από 30 ημέρες από την ημέρα παρασκευής τους.

6.2.3 Μελέτη φυσικής σταθερότητας των ελαστικών λιποσωμάτων DPPC:Επιφανειοδραστικό (80:20 w/w)



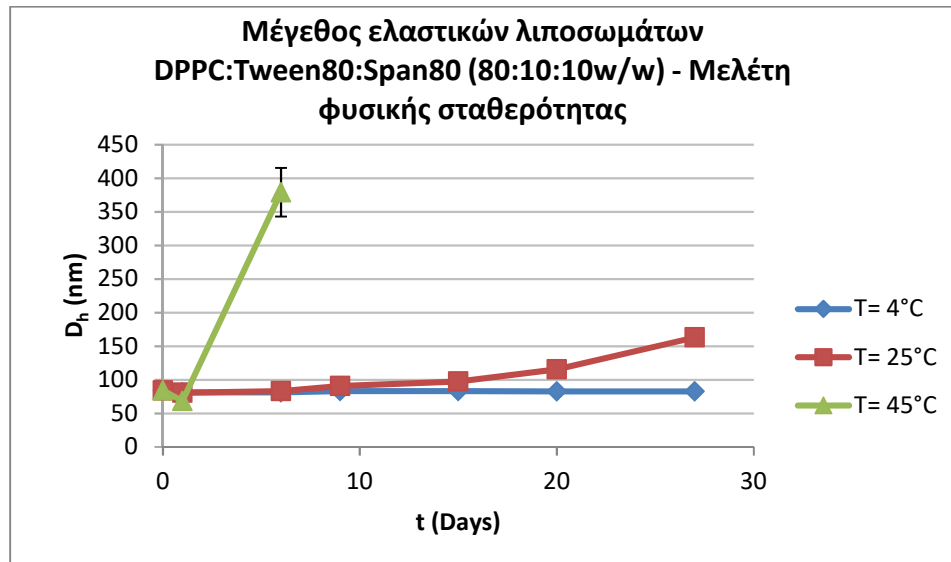
Εικόνα 21 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DPPC:Span80 (80:20w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης

Μετά την 9^η ημέρα παραμονής στους 45°C, παρατηρήθηκε ραγδαία αύξηση του μεγέθους, η οποία υποδηλώνει τη συσσωμάτωση των διεσπαρμένων ελαστικών λιποσωμάτων και για αυτό σταμάτησαν οι μετρήσεις μεγέθους σε αυτή τη θερμοκρασία. Το μέγεθος των ελαστικών λιποσωμάτων DPPC:Span80 (80:20 w/w) που διατηρήθηκαν στους 25°C παρουσίασε αξιοσημείωτη αύξηση μετά την 7^η ημέρα, ενώ το μέγεθος των ελαστικών λιποσωμάτων που διατηρήθηκαν στους 4°C παρέμεινε σταθερό έως το πέρας των μετρήσεων.



Εικόνα 22 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DPPC:Tween80 (80:20 w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης

Μετά την 6^η ημέρα παραμονής στους 45°C, παρατηρήθηκε ραγδαία αύξηση του μεγέθους, η οποία υποδηλώνει τη συσσωμάτωση των διεσπαρμένων ελαστικών λιποσωμάτων και για αυτό σταμάτησαν οι μετρήσεις μεγέθους σε αυτή τη θερμοκρασία. Αντιθέτως τα ελαστικά λιποσώματα DPPC:Tween80 (80:20 w/w), που διατηρήθηκαν στους 4°C και 25°C, παρέμειναν σταθερά όσον αφορά το μέγεθός τους, κατά το χρονικό διάστημα των 30 ημερών.



Εικόνα 23 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DPPC:Tween80:Span80 (80:10:10 w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης

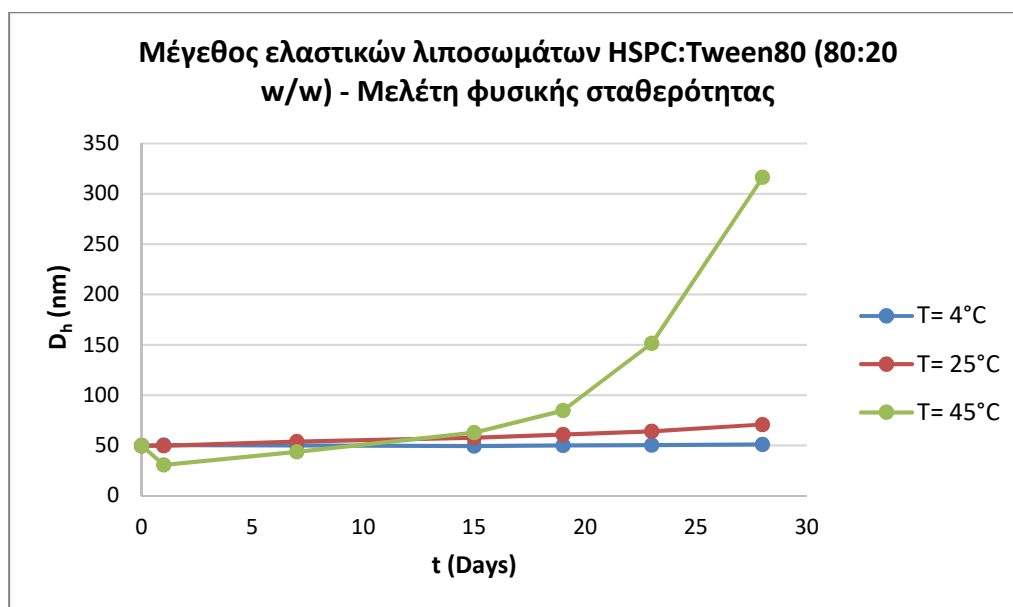
Μετά την 6^η ημέρα παραμονής στους 45°C, παρατηρήθηκε ραγδαία αύξηση του μεγέθους, η οποία υποδηλώνει τη συσσωμάτωση των διεσπαρμένων ελαστικών λιποσωμάτων και για αυτό σταμάτησαν οι μετρήσεις μεγέθους σε αυτή τη θερμοκρασία. Ειπλέον η μέση υδροδυναμική διάμετρος των ελαστικών λιποσωμάτων DPPC:Tween80:Span80 (80:10:10 w/w) που διατηρήθηκαν στους 25°C παρουσίασε αξιοσημείωτη αύξηση κατά 80 nm, μετά από 20 ημέρες. Αντιθέτως τα ελαστικά λιποσώματα που αποθηκεύτηκαν στους 4°C, παρέμειναν σταθερά όσο αφορά το μέγεθός τους, κατά το χρονικό διάστημα των 30 ημερών.

Συνοπτικά από τα παραπάνω διαγράμματα, παρατηρήθηκε ότι οι συνθήκες αποθήκευσης επηρεάζουν τη φυσική σταθερότητα των ελαστικών λιποσωμάτων. Πράγματι τα ελαστικά λιποσώματα που διατηρήθηκαν στους 4°C παρέμειναν σταθερά όσον αφορά το μέγεθός τους, κατά το χρονικό διάστημα των 30 ημερών, από την ημέρα παρασκευής τους. Αντιθέτως παρατηρήθηκε ραγδαία αύξηση της μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου των ελαστικών λιποσωμάτων που αποθηκεύτηκαν στους 45°C, μόνο λίγες μέρες μετά την παρασκευή τους, υποδηλώνοντας τη συνένωση των ελαστικών λιποσωμάτων και τον σχηματισμό συσσωματωμάτων.

Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι τα ελαστικά λιποσώματα DPPC:Tween80 (80:20w/w) παρουσίασαν ασήμαντη αύξηση της μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου τους, κατά το χρονικό διάστημα διατήρησής τους στους 25°C, σε σύγκριση με τα ελαστικά λιποσώματα DPPC:Span80 (80:20 w/w) στις ίδιες συνθήκες αποθήκευσης. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στην στερεοχημική σταθεροποίηση που προσδίδει το υδρόφιλο επιφανειοδραστικό Tween80 στα ελαστικά λιποσώματα που αποτελούνται από αυτό. Το υδατικό μέσο διασποράς των ελαστικών λιποσωμάτων, αποτελεί καλό διαλύτη για το υδρόφιλο επιφανειοδραστικό Tween80 και προκαλεί την έκταση της πολικής κεφαλής του μέσα στο μέσο διασποράς. Η εκτεταμένη πολική κεφαλή του λειτουργεί σαν ένα στερεοχημικό εμπόδιο (υδρόφιλη κορόνα), η οποία εμποδίζει τη συνένωση των διεσπαρμένων ελαστικών λιποσωμάτων.

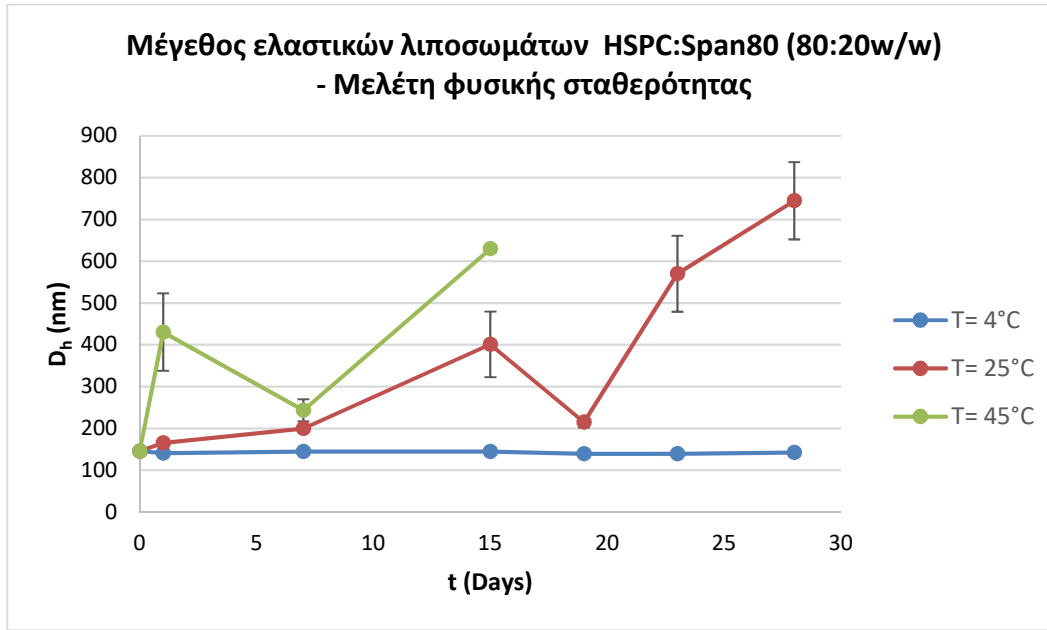
Ακολουθώς η φυσική σταθερότητα, ως προς το μέγεθος, που παρουσιάζουν τα ελαστικά λιποσώματα αποτελούμενα από το υδρόφιλο επιφανειοδραστικό Tween80, μπορεί να οφείλεται και στο φαινόμενο της ενθαλπικής σταθεροποίησης. Αναλυτικότερα κατά την προσέγγιση των διεσπαρμένων ελαστικών λιποσωμάτων, τα ενυδατωμένα μόρια νερού που βρίσκονται στην πολική κεφαλή του Tween80, αποδεσμεύονται, με αποτέλεσμα την αύξηση της ενθαλπίας, η οποία οδηγεί σε άπωση λόγω της αύξησης της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος.

6.2.4 Μελέτη φυσικής σταθερότητας των ελαστικών λιποσωμάτων HSPC:Επιφανειοδραστικό (80:20 w/w)



Εικόνα 24 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων HSPC:Tween80 (80:20 w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης

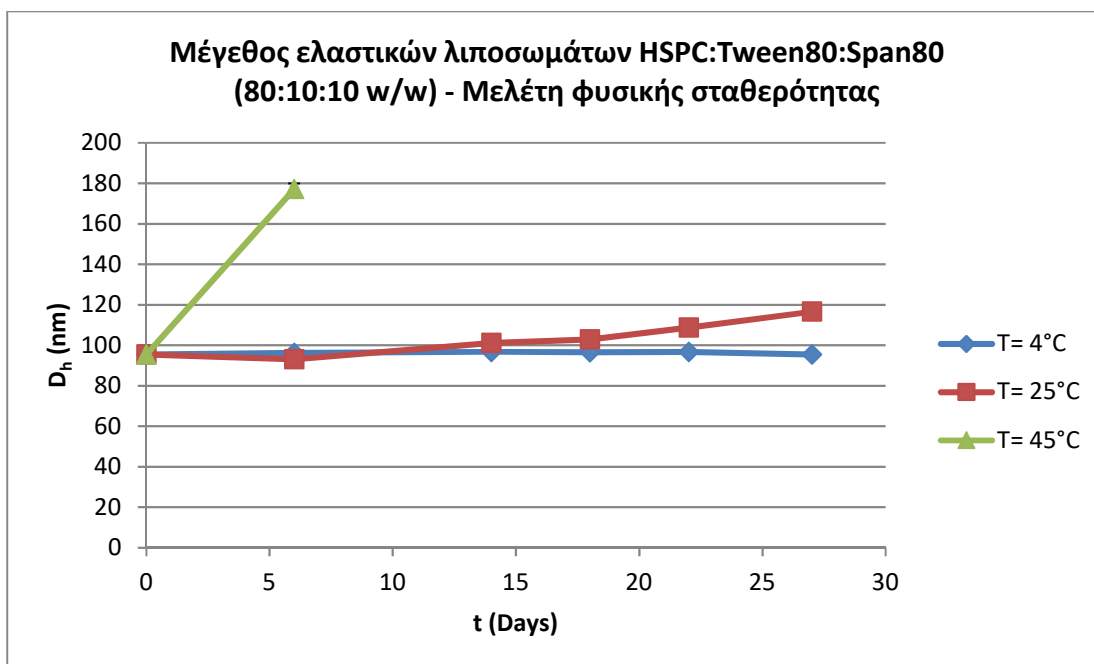
Μετά από 30 ημέρες η μέση υδροδυναμική διάμετρος των ελαστικών λιποσωμάτων HSPC:Tween80 (80:20w/w) που διατηρήθηκαν στους 4°C και 25°C παρέμεινε σταθερή. Αντιθέτως η μέση υδροδυναμική διάμετρος των ελαστικών λιποσωμάτων που διατηρήθηκαν στους 45°C, αυξήθηκε σημαντικά από 49.8 nm σε 316.5 nm μετά από 28 ημέρες.



Εικόνα 25 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων HSPC:Span80 (80:20 w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης

Μετά την 15^η ημέρα παραμονής στους 45°C, παρατηρήθηκε ραγδαία αύξηση του μεγέθους, η οποία υποδηλώνει τη συσσωμάτωση των διεσπαρμένων ελαστικών λιποσωμάτων και για αυτό σταμάτησαν οι μετρήσεις μεγέθους σε αυτή τη θερμοκρασία.

Επιπλέον η μέση υδροδυναμική διάμετρος των ελαστικών λιποσωμάτων που διατηρήθηκαν στους 25°C παρουσίασε σημαντική αύξηση, της τάξης των 600 nm, μετά από 30 ημέρες. Αντιθέτως τα ελαστικά λιποσώματα HSPC:Span80 (80:20w/w) που διατηρήθηκαν στους 4°C παρέμειναν σταθερά όσον αφορά το μέγεθός τους, κατά το χρονικό διάστημα των 30 ημερών. Τέλος παρατηρήθηκε μείωση του μεγέθους των ελαστικών λιποσωμάτων HSPC:Span80 (80:20 w/w), την 19^η ημέρα αποθήκευσής τους στους 25°C, και την 7^η ημέρα αποθήκευσής τους στους 45°C, η οποία μπορεί να οφείλεται στις ισχυρές υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του λιπόφιλου Span80 και της λιπιδικής διπλοστιβάδας.



Εικόνα 26 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων HSPC:Tween80:Span80 (80:10:10 w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης

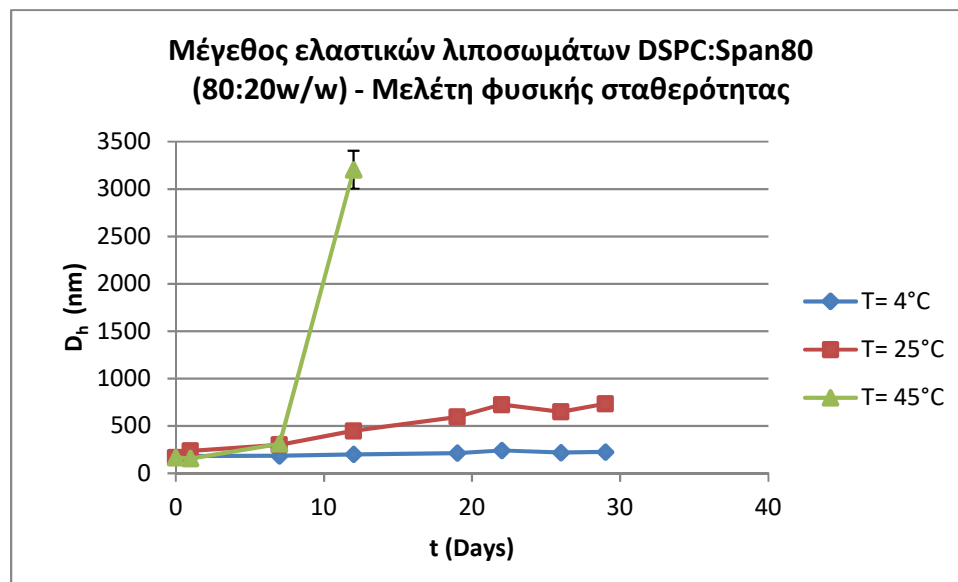
Μετά την 6^η ημέρα παραμονής στους 45°C, παρατηρήθηκε ραγδαία αύξηση του μεγέθους, η οποία υποδηλώνει τη συσσωμάτωση των διεσπαρμένων ελαστικών λιποσωμάτων HSPC:Tween80:Span80 (80:10:10 w/w) και για αυτό σταμάτησαν οι μετρήσεις μεγέθους σε αυτή τη θερμοκρασία. Τα ελαστικά λιποσώματα HSPC:Tween80:Span80 (80:10:10 w/w) που αποθηκεύτηκαν στους 25°C παρουσίασαν μικρή αλλά ασήμαντη αύξηση της μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου τους μετά από 30 ημέρες, ενώ το μέγεθος των ελαστικών λιποσωμάτων που διατηρήθηκαν στους 4°C παρέμεινε σταθερό σε βάθος χρόνου 30 ημερών.

Συνοπτικά από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται επίδραση των συνθηκών αποθήκευσης στη φυσική σταθερότητα των ελαστικών λιποσωμάτων. Πράγματι η παραμονή των ελαστικών λιποσωμάτων στους 4°C συμβάλλει στη φυσική σταθερότητα τους, όσο αφορά το μέγεθός τους, σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους. Ενώ οι συνθήκες επιταχυνόμενης γήρανσης (45°C), προάγουν τη συνένωση των διεσπαρμένων ελαστικών λιποσωμάτων με αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση της μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου τους σε σύντομο χρονικό διάστημα.

Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι τα ελαστικά λιποσώματα HSPC:Tween80 (80:20w/w) και HSPC:Tween80:Span80 (80:10:10 w/w) δεν παρουσίασαν αξιοσημείωτη αύξηση της μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου τους, κατά το χρονικό διάστημα παραμονής τους στους 25°C, σε σύγκριση με τα ελαστικά λιποσώματα HSPC:Span80 (80:20 w/w) στις ίδιες συνθήκες αποθήκευσης. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στη μελέτη φυσικής σταθερότητας των ελαστικών λιποσωμάτων DPPC:Επιφανειοδραστικό

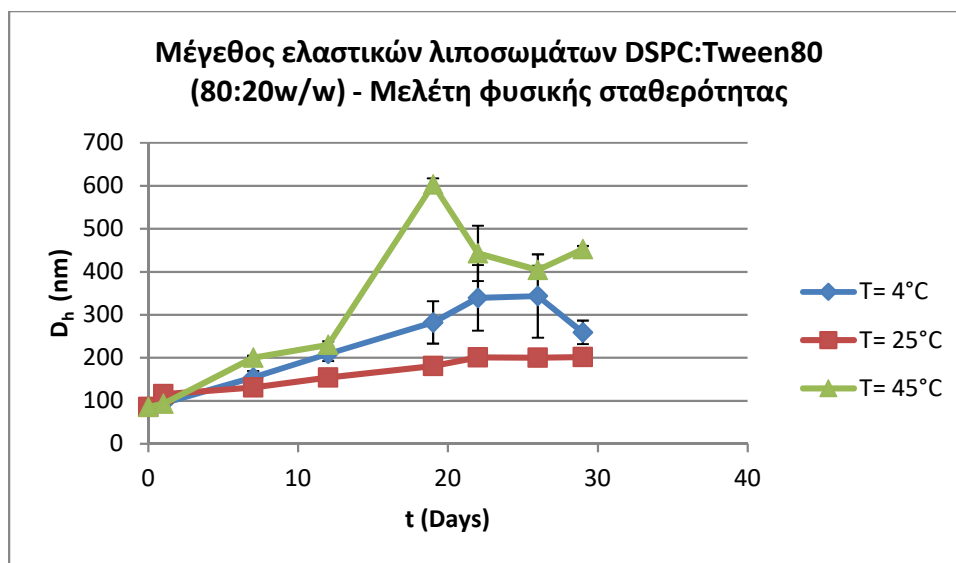
(80:20w/w). Η εις βάθος χρόνου φυσική σταθερότητα που προάγεται από την ενσωμάτωση του πιο υδρόφιλου επιφανειοδραστικού Tween80, μπορεί να οφείλεται στην στερεοχημική και ενθαλπική σταθεροποίηση που προσδίδει στα διεσπαρμένα ελαστικά λιποσώματα.

6.2.5 Μελέτη φυσικής σταθερότητας των ελαστικών λιποσωμάτων DSPC:Επιφανειοδραστικό (80:20 w/w)



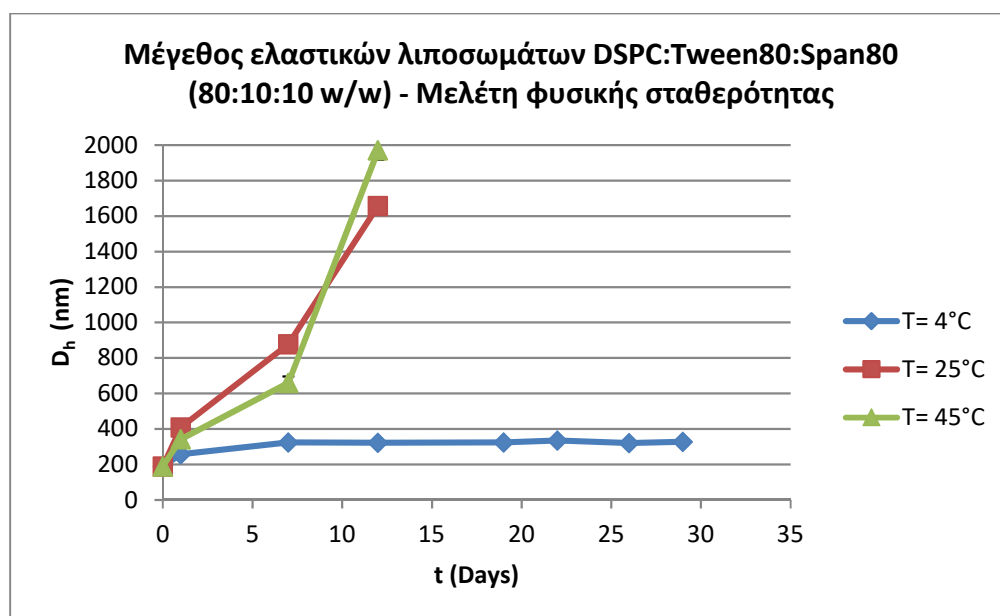
Εικόνα 27 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DSPC:Span80 (80:20w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης

Μετά την 12^η ημέρα παραμονής στους 45°C, παρατηρήθηκε ραγδαία αύξηση του μεγέθους, η οποία υποδηλώνει τη συσσωμάτωση των διεσπαρμένων ελαστικών λιποσωμάτων DSPC:Span80 (80:20 w/w) και για αυτό σταμάτησαν οι μετρήσεις μεγέθους σε αυτή τη θερμοκρασία. Επιπλέον παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη αύξηση της μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου μετά από 30 ημέρες διατήρησης στους 25°C, ενώ το μέγεθος των ελαστικών λιποσωμάτων που διατηρήθηκαν στους 4°C παρέμεινε σταθερό σε βάθος χρόνου 30 ημερών.



Εικόνα 28 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DSPC:Tween80 (80:20 w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης

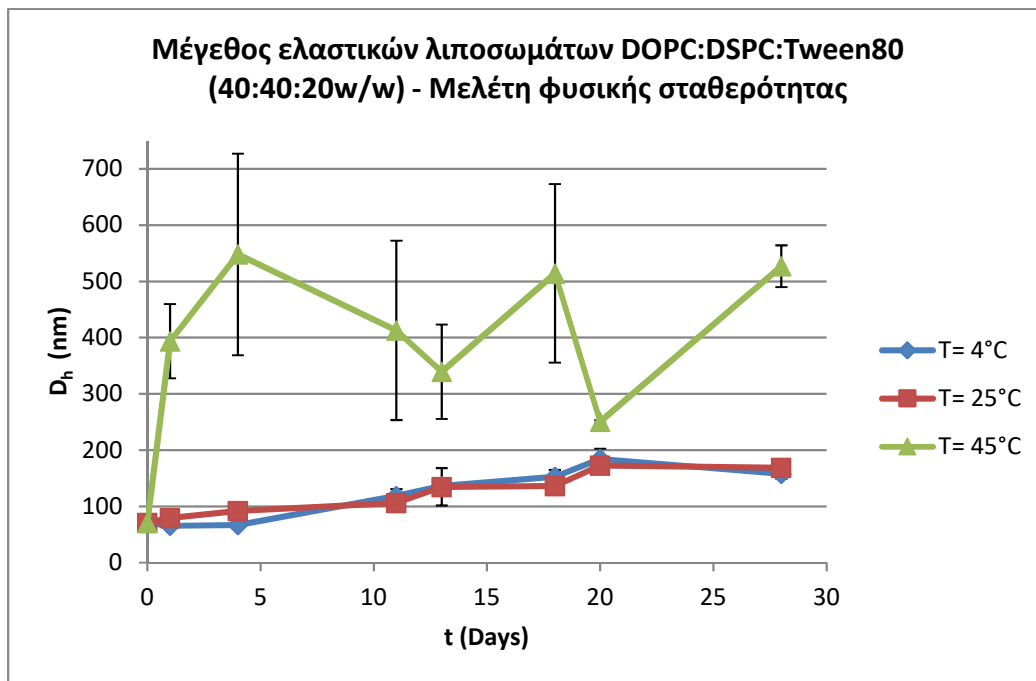
Παρατήρηθηκε σημαντική αύξηση της μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου των ελαστικών λιποσωμάτων DSPC:Tween80 (80:20w/w) μετά από 30 ημέρες διατήρησης στους 4°C και 25°C. Επιπλέον το μέγεθος των ελαστικών λιποσωμάτων που διατηρήθηκαν στους 45°C αυξήθηκε ραγδαία μετά από μερικές μόνο ημέρες. Ωστόσο στο πέρας των 30 ημερών παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη μείωση του μεγέθους των ελαστικών λιποσωμάτων που αποθήκευτηκαν στους 4°C και 45°C. Η μείωση αυτή πιθανόν οφείλεται στο σπάσιμο των ελαστικών λιποσωμάτων και στην κατάρρευση του συστήματος.



Εικόνα 29 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DSPC:Tween80:Span80 (80:10:10 w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης

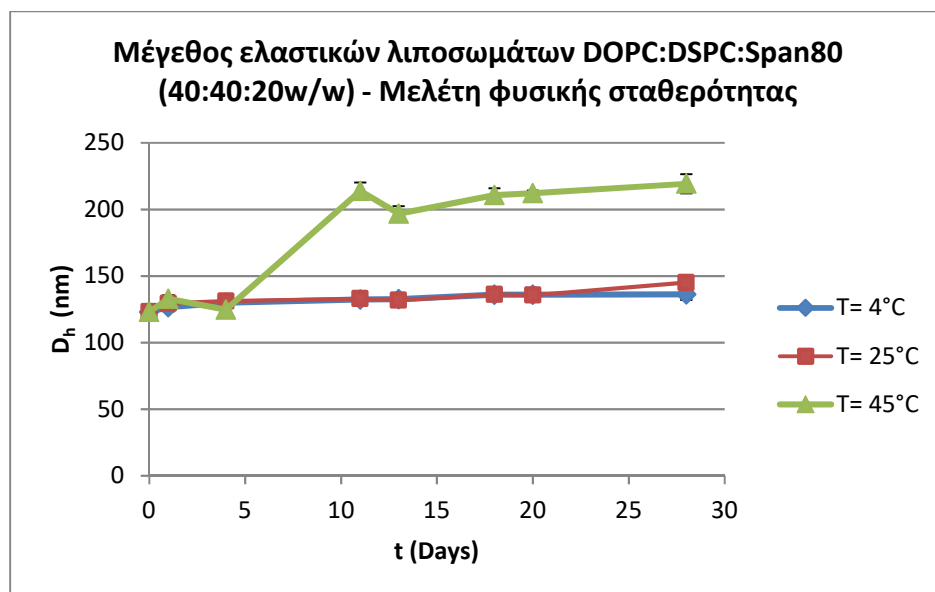
Μετά την 12^η ημέρα παραμονής στους 25°C και στους 45°C, παρατηρήθηκε ραγδαία αύξηση του μεγέθους, η οποία υποδηλώνει τη συσσώματωση των διεσπαρμένων ελαστικών λιποσωμάτων DSPC:Tween80:Span80 (80:10:10 w/w) και για αυτό σταμάτησαν οι μετρήσεις μεγέθους σε αυτές τις θερμοκρασίες. Αντιθέτως η μέση υδροδυναμική διάμετρος των ελαστικών λιποσωμάτων που διατηρήθηκαν στους 4°C, παρουσίασε μικρή αύξηση (από 189.7nm σε 328.6 nm) μετά από 30 ημέρες.

6.2.6 Μελέτη φυσικής σταθερότητας των ελαστικών λιποσωμάτων DOPC:DSPC:Επιφανειοδραστικό (40:40:20 w/w)



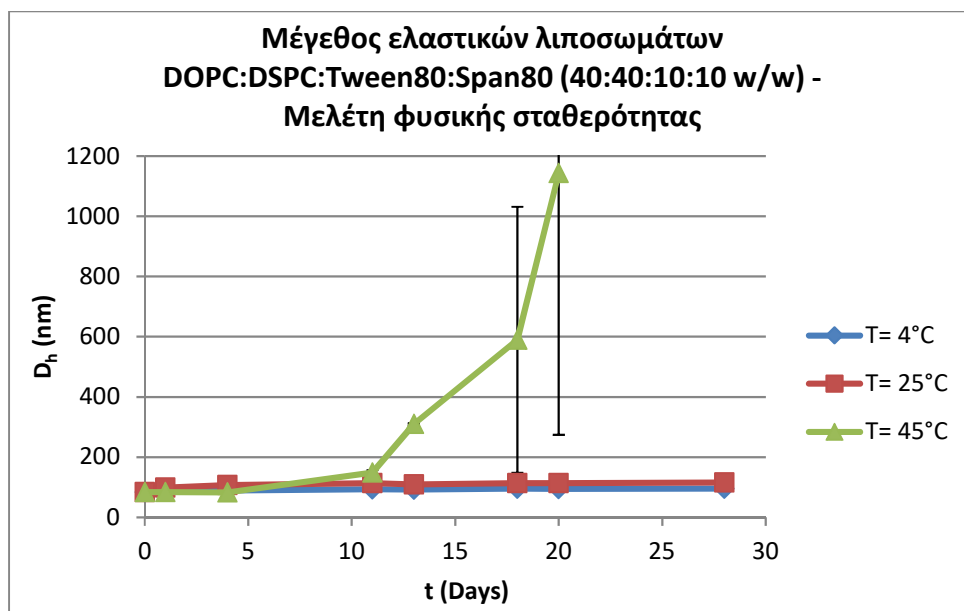
Εικόνα 30 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DOPC:DSPC:Tween80 (40:40:20 w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης

Μετά από 30 ημέρες παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη αύξηση του μεγέθους των ελαστικών λιποσωμάτων DOPC:DSPC:Tween80 (40:40:20 w/w), που διατηρήθηκαν στους 4°C και 25°C. Επιπλέον παρατηρήθηκαν έντονες διακυμάνσεις της μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου κατά το χρονικό διάστημα παραμονής των ελαστικών λιποσωμάτων στους 45°C. Οι διακυμάνσεις αυτές μπορεί να οφείλονται στην πολυδιασπορά του μεγέθους, η οποία φαίνεται και από την υψηλή τιμή του δείκτη πολυδιασποράς (1 ± 0). Η πολυδιασπορά του μεγέθους που παρατηρήθηκε στους 45°C, πιθανόν να οφείλεται στην οξειδωση των διπλών δεσμών του ακόρεστου φωσφολιπιδίου DOPC.



Εικόνα 31 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DOPC:DSPC:Span80 (40:40:20 w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης

Η μέση υδροδυναμική διάμετρος των ελαστικών λιποσωμάτων DOPC:DSPC:Span80 (40:40:20 w/w), που διατηρήθηκαν στους 4°C και στους 25°C, παρουσίασε μικρή αλλά μη αξιολογήσιμη αύξηση μετά από 30 ημέρες. Το γεγονός αυτό πιθανώς δικαιολογείται και από την σχετικά υψηλή τιμή του ζ-δυναμικού, που παρουσίασαν τα εν λόγω ελαστικά λιπώματα, την ημέρα της παρασκευής τους. Αντιθέτως τα ελαστικά λιπώματα DOPC:DSPC:Span80 (40:40:20 w/w), που διατηρήθηκαν στους 45°C, παρουσίασαν αξιοσημείωτη αύξηση της μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου, μετά την 11^η ημέρα αποθήκευσής τους στις παραπάνω συνθήκες.



Εικόνα 32 Μέγεθος ελαστικών λιποσωμάτων DOPC:DSPC:Tween80:Span80 (40:40:10:10 w/w), σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης

Μετά την 20^η ημέρα παραμονής στους 45°C, παρατηρήθηκε ραγδαία αύξηση του μεγέθους, η οποία υποδηλώνει τη συσσωμάτωση των διεσπαρμένων ελαστικών λιποσωμάτων DOPC:DSPC:Tween80:Span80 (40:40:10:10 w/w) και για αυτό σταμάτησαν οι μετρήσεις μεγέθους σε αυτές τις θερμοκρασίες. Αντιθέτως διαπιστώθηκε ότι η διατήρηση των ελαστικών λιποσωμάτων στους 4°C και στους 25°C, συμβάλλει στη φυσική σταθερότητά τους, καθώς το μέγεθός τους παρέμεινε σταθερό σε βάθος χρόνου 30 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους.

Κεφάλαιο 7. Συμπεράσματα

Τα ελαστικά λιποσώματα, γνωστά και ως τρανσφεροσώματα, έχουν μελετηθεί ευρέως ως διαδερμικά συστήματα στοχευμένης μεταφοράς και ελεγχόμενης αποδέσμευσης βιοδραστικών μορίων. Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας παρασκευάστηκαν ελαστικά λιποσώματα με την τεχνική της ενυδάτωσης λεπτού λιπιδικού υμενίου, χρησιμοποιώντας διαφορετικά λιπίδια και επιφανειοδραστικά, ώστε να μελετηθεί η επίδρασή τους στα φυσικά χαρακτηριστικά και τη φυσική σταθερότητά τους. Τα φυσικά χαρακτηριστικά των ελαστικών λιποσωμάτων, όπως το μέγεθος και η κατανομή μεγέθους, μετρήθηκαν με τη μέθοδο της δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS). Η μελέτη φυσικής σταθερότητας περιλάμβανε τη μέτρηση του μεγέθους, ως μία μετρήσιμη φυσική ιδιότητα, ανά τακτά χρονικά διαστήματα, σε βάθος χρόνου 30 ημερών, στις ακόλουθες συνθήκες αποθήκευσης: α) 4°C, β) 25°C, γ) 45°C.

Το μέγεθος των ελαστικών λιποσωμάτων την ημέρα παρασκευής τους, κυμαινόταν από μικρά μονοστιβαδικά κυστίδια, SUVs, (<100nm) έως μεγάλα μονοστιβαδικά κυστίδια, LUVs, (>100nm), ανάλογα με το επιφανειοδραστικό από το οποίο αποτελούνταν. Πράγματι παρατηρήθηκε μείωση του μεγέθους με αύξηση της τιμής HLB της επιφανειοδραστικής ουσίας. Επιπλέον η τιμή του δείκτη πολυδιασποράς ήταν κοντά στο μηδέν, για όλα τα συστήματα την ημέρα παρασκευής τους, υποδηλώνοντας στενή κατανομή του μεγέθους γύρω από τη μέση τιμή (μονοδιασπορά).

Σημαντικά συμπεράσματα προέκυψαν από τη μελέτη φυσικής σταθερότητας. Τα ελαστικά λιποσώματα αποτελούμενα από το φωσφολιπίδιο DOPC και την επιφανειοδραστική ουσία Tween80 ή/και Span80 παρέμειναν σταθερά όσον αφορά το μέγεθός τους, μετά από 30 ημέρες αποθήκευσης στους 4°C και 25°C, ενώ στους 45°C παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη αύξηση του μεγέθους. Τα ελαστικά λιποσώματα DMPC:Span80 (80:20 w/w) και DMPC:Tween80:Span80 (80:10:10 w/w) παρουσίασαν αξιοσημείωτη μείωση του μεγέθους την 1^η ημέρα παραμονής τους στους 4°C και 45°C. Ομοίως το μέγεθος των ελαστικών λιποσωμάτων DMPC:Tween80 (80:20 w/w) μειώθηκε την 1^η ημέρα παραμονής στους 4°C, ενώ το μέγεθος αυτών που διατηρήθηκαν στους 45°C αρχικά αυξήθηκε και στη συνέχεια μειώθηκε ραγδαία, γεγονός που πιθανόν οφείλεται στο σπάσιμο των ελαστικών λιποσωμάτων. Το μέγεθος των ελαστικών λιποσωμάτων DPPC:Tween80 (80:20 w/w), DPPC:Span80 (80:20 w/w) και DPPC:Tween80:Span80 (80:10:10 w/w) παρουσίασε ραγδαία αύξηση μετά από λίγες μόνο ημέρες παραμονής στους 45°C, υποδηλώνοντας τη δημιουργία συσσωματωμάτων, ενώ παρέμεινε σταθερό μετά από 30 ημέρες στους 4°C. Επιπλέον το μέγεθος των ελαστικών λιποσωμάτων DPPC:Tween80 (80:20 w/w) μετά από 30 ημέρες διατήρησης στους 25°C παρέμεινε εξίσου σταθερό με τους 4°C. Παρόμοια συμπεράσματα προκύπτουν και για τα ελαστικά λιποσώματα HSPC:Tween80 (80:20 w/w), HSPC:Span80 (80:20 w/w) και HSPC:Tween80:Span80 (80:10:10 w/w), τα οποία

παρέμειναν σταθερά όσον αφορά το μέγεθός τους μετά από 30 ημέρες διατήρησης στους 4°C, ενώ παρουσίασαν σημαντική αύξηση μεγέθους μετά από λίγες μόνο ημέρες διατήρησης στους 45°C. Επιπλέον το μέγεθος των ελαστικών λιποσωμάτων HSPC:Span80 (80:20 w/w) παρουσίασε αξιοσημείωτη αύξηση μετά από 30 ημέρες αποθήκευσης στους 25°C. Το μέγεθος των ελαστικών λιποσωμάτων DSPC:Span80 (80:20 w/w) και DSPC:Tween80:Span80 (80:10:10 w/w) παρουσίασε αξιοσημείωτη αύξηση στους 25°C και 45°C σε σύγκριση με τους 4°C, ενώ τα ελαστικά λιποσώματα DSPC:Tween80 (80:20 w/w) παρουσίασαν αξιοσημείωτη αύξηση μεγέθους σε όλες τις συνθήκες αποθήκευσης. Τα ελαστικά λιποσώματα DOPC:DSPC:Tween80 (40:40:20 w/w) παρουσίασαν έντονες διακυμάνσεις στο μέγεθος κατά τη διατήρησή τους στους 45°C, η οποία πιθανόν οφείλεται στη πολυδιασπορά μεγέθους λόγω της οξείδωσης των διπλών δεσμών του DOPC. Τέλος το μέγεθος των ελαστικών λιποσωμάτων DOPC:DSPC:Span80 (40:40:20 w/w) και DOPC:DSPC:Tween80:Span80 (40:40:10:10 w/w) παρέμεινε σταθερό μετά από 30 ημέρες διατήρησης στους 4°C και 25°C, σε σύγκριση με τους 45°C.

Συμπερασματικά από τη μελέτη φυσικής σταθερότητας διαπιστώθηκε η επίδραση των συνθηκών αποθήκευσης στη φυσική σταθερότητα του συστήματος. Πράγματι προέκυψε ότι η διατήρηση στους 4°C προάγει την εις βάθος χρόνου φυσική σταθερότητα, ενώ οι υψηλές θερμοκρασίες προτρέπουν τη συσσωμάτωση. Τέλος διαπιστώθηκε αξιοσημείωτη επίδραση των συστατικών στη φυσική σταθερότητα του συστήματος. Κατά πλειοψηφία τα ελαστικά λιποσώματα αποτελούμενα από το υδρόφιλο επιφανειοδραστικό Tween80 παρέμειναν πιο σταθερά όσον αφορά το μέγεθός τους, κατά τη διατήρησή τους στους 25°C, σε σύγκριση με τα ελαστικά λιποσώματα αποτελούμενα από το πιο λιπόφιλο Span80. Το γεγονός αυτό πιθανόν οφείλεται στη στερεοχημική και ενθαλπική σταθεροποίηση που προσδίδει το υδρόφιλο επιφανειοδραστικό Tween80.

Βιβλιογραφία

- [1] Grumezescu, A. (Ed.). (2016). Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics: Applications of Nanobiomaterials. William Andrew.
- [2] Braun-Falco, O., Korting, H. C., & Maibach, H. I. (Eds.). (2012). Liposome Dermatics: Griesbach Conference. Springer Science & Business Media.
- [3] Montenegro, L. (2014). Nanocarriers for skin delivery of cosmetic antioxidants. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 2(4).
- [4] Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., & Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale research letters*, 8(1), 102.
- [5] Demetzos, C. (2016). *Pharmaceutical nanotechnology: fundamentals and practical applications*. Springer.
- [6] Eloy, J. O., de Souza, M. C., Petrilli, R., Barcellos, J. P. A., Lee, R. J., & Marchetti, J. M. (2014). Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: strategies to enhance encapsulation and delivery. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 123, 345-363.
- [7] Ashtikar, M., Nagarsekar, K., & Fahr, A. (2016). Transdermal delivery from liposomal formulations–Evolution of the technology over the last three decades. *Journal of Controlled Release*, 242, 126-140.
- [8] Blume, G. (2008). Flexible liposomes for topical applications in cosmetics. *Science and applications of skin delivery systems*, 269-282.
- [9] Li, J., Wang, X., Zhang, T., Wang, C., Huang, Z., Luo, X., & Deng, Y. (2015). A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 10(2), 81-98.
- [10] Baykal-Caglar, E., Hassan-Zadeh, E., Saremi, B., & Huang, J. (2012). Preparation of giant unilamellar vesicles from damp lipid film for better lipid compositional uniformity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1818(11), 2598-2604.
- [11] Mayer, L. D., Bally, M. B., Hope, M. J., & Cullis, P. R. (1986). Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes. *Chemistry and physics of lipids*, 40(2-4), 333-345.
- [12] Sharma, A., & Sharma, U. S. (1997). Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *International journal of pharmaceuticals*, 154(2), 123-140.
- [13] Patil, Y. P., & Jadhav, S. (2014). Novel methods for liposome preparation. *Chemistry and physics of lipids*, 177, 8-18.
- [14] Kim, J. S. (2016). Liposomal drug delivery system. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 46(4), 387-392.
- [15] Ahad, A., Al-Saleh, A. A., Al-Mohizea, A. M., Al-Jenoobi, F. I., Raish, M., Yassin, A. E. B., & Alam, M. A. (2017). Formulation and characterization of

- novel soft nanovesicles for enhanced transdermal delivery of eprosartan mesylate. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(7), 1040-1046.
- [16] Ghanbarzadeh, S., & Arami, S. (2013). Enhanced transdermal delivery of diclofenac sodium via conventional liposomes, ethosomes, and transfersomes. *BioMed research international*, 2013.
 - [17] Badran, M., Shalaby, K., & Al-Omrani, A. (2012). Influence of the flexible liposomes on the skin deposition of a hydrophilic model drug, carboxyfluorescein: dependency on their composition. *The Scientific World Journal*, 2012.
 - [18] Mozafari, M. R. (2005). Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 10(4), 711.
 - [19] Laouini, A., Jaafar-Maalej, C., Limayem-Blouza, I., Sfar, S., Charcosset, C., & Fessi, H. (2012). Preparation, characterization and applications of liposomes: state of the art. *Journal of colloid Science and Biotechnology*, 1(2), 147-168.
 - [20] Huang, Z., Li, X., Zhang, T., Song, Y., She, Z., Li, J., & Deng, Y. (2014). Progress involving new techniques for liposome preparation. *asian journal of pharmaceutical sciences*, 9(4), 176-182.
 - [21] Banerjee, R., Tyagi, P., Li, S., & Huang, L. (2004). Anisamide-targeted stealth liposomes: A potent carrier for targeting doxorubicin to human prostate cancer cells. *International journal of cancer*, 112(4), 693-700.
 - [22] Di Nezza, F., Zeppa, L., Costagliola, C., Bufalo, G., & Ambrosone, L. (2019). A physicochemical study of ophthalmological vital dyes: From dimerization equilibrium in buffer solution to their liposomal dispersions. *Dyes and Pigments*, 162, 680-687.
 - [23] Gireesh, T., Kuldeep, C., & Pramod, K. (2013). Liposomal current status, evaluation and recent advances. *Int J Curr Pharm Res*, 5, 4-14.
 - [24] Fielding, R. M. (1991). Liposomal drug delivery. *Clinical pharmacokinetics*, 21(3), 155-164.
 - [25] Fan, Y., & Zhang, Q. (2013). Development of liposomal formulations: From concept to clinical investigations. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 8(2), 81-87.
 - [26] Mozafari, M. R., Flanagan, J., Matia-Merino, L., Awati, A., Omri, A., Suntres, Z. E., & Singh, H. (2006). Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2038-2045.
 - [27] Μ.Δ. Βλάχου-Κωνσταντινίδου, (2017-2018). Φυσική Φαρμακευτική, Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών «Βιομηχανική Φαρμακευτική».
 - [28] Walters, K. A., & Roberts, M. S. (2002). The structure and function of skin. *Drugs and the pharmaceutical Sciences*, 119, 1-40.

- [29] Venus, M., Waterman, J., & McNab, I. (2010). Basic physiology of the skin. *Surgery (Oxford)*, 28(10), 469-472.
- [30] Honeywell-Nguyen, P. L., & Bouwstra, J. A. (2005). Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery. *Drug Discovery Today: Technologies*, 2(1), 67-74.
- [31] Attwood, D., & Florence, A. T. (2012). *FASTtrack Physical Pharmacy*. Pharmaceutical Press.
- [32] Choi, M. J., & Maibach, H. I. (2005). Liposomes and niosomes as topical drug delivery systems. *Skin pharmacology and physiology*, 18(5), 209-219.
- [33] Prausnitz, M. R., & Langer, R. (2008). Transdermal drug delivery. *Nature biotechnology*, 26(11), 1261.
- [34] Barry, B. W. (2001). Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European journal of pharmaceutical sciences*, 14(2), 101-114.
- [35] Elsayed, M. M., Abdallah, O. Y., Naggar, V. F., & Khalafallah, N. M. (2007). Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research. *International journal of pharmaceutics*, 332(1-2), 1-16.
- [36] Betz, G., Aeppli, A., Menshutina, N., & Leuenberger, H. (2005). In vivo comparison of various liposome formulations for cosmetic application. *International journal of pharmaceutics*, 296(1-2), 44-54.
- [37] Cevc, G. (2003). Transdermal drug delivery of insulin with ultradeformable carriers. *Clinical pharmacokinetics*, 42(5), 461-474.
- [38] Maghraby, G. M. E., Williams, A. C., & Barry, B. W. (2006). Can drug-bearing liposomes penetrate intact skin?. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58(4), 415-429.
- [39] Cevc, G., Schätzlein, A., & Richardsen, H. (2002). Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1564(1), 21-30.
- [40] ENERGY, P. I. (2009). *Physical Stability of Disperse Systems*.
- [41] Zigoneanu, I. G., Astete, C. E., & Sabliov, C. M. (2008). Nanoparticles with entrapped α -tocopherol: synthesis, characterization, and controlled release. *Nanotechnology*, 19(10), 105606.
- [42] Olson, E. (2012). Zeta potential and colloid chemistry. *Journal of GXP Compliance*, 16(1), 81.
- [43] Guldiken, B., Gibis, M., Boyacioglu, D., Capanoglu, E., & Weiss, J. (2018). Physical and chemical stability of anthocyanin-rich black carrot extract-loaded liposomes during storage. *Food Research International*, 108, 491-497.
- [44] Manoharan, C., Basarkar, A., & Singh, J. (2010). Various pharmaceutical disperse systems. In *Pharmaceutical Suspensions* (pp. 1-37). Springer, New York, NY.

- [45] Squitieri, E., & Mujica, V. (2006). A computational study of the stability ratios of spherical colloidal particles. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 769(1-3), 165-170.
- [46] <https://avantilipids.com>
- [47] Bnyan, R., Khan, I., Ehtezazi, T., Saleem, I., Gordon, S., O'Neill, F., & Roberts, M. (2018). Surfactant effects on lipid-based vesicles properties. *Journal of pharmaceutical sciences*, 107(5), 1237-1246.
- [48] Skoog, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R., "Principles of instrumental analysis." Thomson Brooks/Cole, 2007
- [49] Brar S. K., Verma, M., "Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques." *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2011, 30, 4-17.