

1837  
2017  
YEARS



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος  
Ειδίκευσης «Βιομηχανική Φαρμακευτική» με τίτλο:

**«Ορθολογικός σχεδιασμός, ανάπτυξη και  
αξιολόγηση χιμαιρικών pH-ευαίσθητων  
λιποσωμάτων με ενσωματωμένη  
Διμεθοξυκουρκουμίνη»**

ΜΑΡΙΑ ΧΟΥΝΤΟΥΛΕΣΗ

ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2017

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Ευχαριστώ θερμά:

Τον κ. Κωνσταντίνο Δεμέτζο, Καθηγητή Φαρμακευτικής Νανοτεχνολογίας, του τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, επιβλέποντα καθηγητή, για την ανάθεση του θέματος, τις πολύτιμες συμβουλές κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, αλλά και στη διαμόρφωση της παρούσας εργασίας, τις εύστοχες παρατηρήσεις, τη συμπαράσταση, τη συνεχή καθοδήγηση και τη βοήθειά του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Την κα. Μαριλένα Βλάχου-Κωνσταντινίδου, Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, για τις εποικοδομητικές συμβουλές της.

Τον κ. Δρ. Αστέριο Πίσα, Διευθυντή Ερευνών - Ερευνητή Α του Ινστιτούτου Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής για τις εύστοχες παρατηρήσεις του, αλλά και για την παροχή του συμπολυμερούς κατά συστάδες, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία.

Την κα. Κωνσταντίνα Γαλανοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας-Λιπιδίων και Κυτταρικής Σηματοδότησης του τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για τη συνδρομή της κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Την Δρ. Αγγελική Μπουρτσάλα του τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών για τη συνδρομή της κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Τη Δρ. Κωνσταντία Γκραίκου, Ε.ΔΙ.Π του Τομέα Φαρμακογνωσίας & Χημείας Φυσικών Προϊόντων του τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για τη συνδρομή της κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Τη Δρ. Νατάσσα Πίππα, Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια του τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την πολύτιμη βοήθειά της, τη συνεχή καθοδήγηση και τις συμβουλές της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Τον Υποψήφιο Διδάκτορα Νίκο Ναζίρη του Εργαστηρίου Φαρμακευτικής Νανοτεχνολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και τη Μεταπτυχιακή φοιτήτρια Αιμιλία Κυριλή για την άψογη συνεργασία καθ' όλο το διάστημα της εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
Ευχαριστίες	2
Περιεχόμενα	4
<b>1.</b> Θεωρητικό Μέρος	9
<b>1.1</b> Διμεθοξυκουρκουμίνη (dimethoxycurcumin, DMC)	10
<b>1.1.1</b> Γενικά	10
<b>1.1.2</b> Φαρμακολογικές δράσεις της DMC	11
<b>1.1.3</b> Πιθανές εφαρμογές της DMC	12
<b>1.1.4</b> Ενσωμάτωση της DMC σε νανοτεχνολογικές πλατφόρμες	13
<b>1.2</b> Λιποσώματα	15
<b>1.2.1</b> Γενικά	15
<b>1.2.2</b> Φυσικοχημικά και Βιολογικά χαρακτηριστικά των λιποσωμάτων	16
<b>1.2.3</b> Λειτουργικότητα των λιποσωμάτων	18
<b>1.2.4</b> Μηχανισμοί Στόχευσης των λιποσωμάτων	19
<b>1.3</b> Πολυμερή	22
<b>1.3.1</b> Κατάταξη πολυμερών	22
<b>1.3.2</b> Ιδιότητες συμπολυμερών κατά συστάδες	23
<b>1.3.3</b> "Εξυπνα" πολυμερή που αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα (stimuli- responsive polymers)	25
<b>1.3.3.1</b> Γενικά	25
<b>1.3.3.2</b> pH-αποκρινόμενα πολυμερή	26
<b>1.4</b> advanced Drug Delivery nanosystems (aDDnSs)	31
<b>1.5</b> pH-ευαίσθητα λιποσώματα (pH-sensitive liposomes)	31
<b>1.5.1</b> Γενικά	31
<b>1.5.2</b> Μορφοποίηση pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων	32
<b>1.5.3</b> Μηχανισμός δράσης pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων με ενσωματωμένα pH-ευαίσθητα πολυμερή	34
<b>1.5.3.1</b> Πολυανιόντα	34
<b>1.5.3.2</b> Πολυκατιόντα	37
<b>1.5.4</b> Αλληλεπίδραση των pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων με τον οργανισμό	37

<b>1.5.4.1</b>	Παθολογικοί ιστοί	37
<b>1.5.4.2</b>	Ενδοκυττάριο περιβάλλον	38
<b>1.5.4.3</b>	Βιοκατανομή	39
<b>1.5.5</b>	Εφαρμογές pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων	40
<b>1.5.5.1</b>	Μεταφορά φαρμακομορίων	40
<b>1.5.5.2</b>	Γονιδιακή θεραπεία	42
<b>1.5.5.3</b>	Ανάπτυξη εμβολίων	43
<b>1.5.5.4</b>	Μεταφορά παραγόντων αντίθεσης MRI	44
<b>1.6</b>	Θερμική Ανάλυση (Thermal Analysis)	46
<b>1.6.1</b>	Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry, DSC)	46
<b>1.6.1.1</b>	Βασικές Αρχές	46
<b>1.6.1.2</b>	Η εφαρμογή της DSC στη λιποσωματική νανοτεχνολογία	49
<b>2.</b>	Πειραματικό μέρος	52
	Σκοπός της παρούσας εργασίας	53
<b>2.1</b>	Γενικά	55
<b>2.1.1</b>	Το φωσφολιπίδιο HSPC	55
<b>2.1.2</b>	Το pH-αποκρινόμενο συμπολυμερές κατά συστάδες PnBA-b-PAA (15/85)	56
<b>2.1.3</b>	Το φαρμακομόριο διμεθοξυκουρκουμίνη/ dimethoxycurcumin (DMC)	57
<b>2.2</b>	Παρασκευή των χημικών διπλοστοιβάδων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85)	58
<b>2.3</b>	Εφαρμογή της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry - DSC) στις παρασκευασθείσες χημικές διπλοστοιβάδες HSPC:PnBA-b-PAA (15/85)	59
<b>2.4</b>	Παρασκευή και φυσικοχημικός προσδιορισμός των κενών χημικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85), καθώς και των χημικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85): DMC	61
<b>2.5</b>	Εφαρμογή Χρωματογραφίας Στήλης Μοριακού Αποκλεισμού στα χημικά συστήματα HSPC:PnBA-b-PAA (15/85): DMC	67

<b>2.6</b>	Ποσοτικοποίηση της ενσωματωμένης DMC στα χμαιορικά συστήματα HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC	70
<b>2.7</b>	Ποσοτικοποίηση του λιπιδίου HSPC στα χμαιορικά συστήματα HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC	72
<b>2.8</b>	Υπόλοιπα Χαρακτηριστικά Ενσωμάτωσης των χμαιορικών συστημάτων HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC	75
<b>2.9</b>	Όξινο πρωτόκολλο στα κενά χμαιορικά συστήματα HSPC:PnBA-b-PAA (15/85) και στα χμαιορικά συστήματα HSPC:PnBA-b-PAA (15/85): DMC	76
<b>2.10</b>	Μελέτη αποδέσμευσης του βιοδραστικού μορίου DMC από τα χμαιορικά συστήματα HSPC:PnBA-b-PAA (15/85): DMC	77
<b>3.</b>	Αποτελέσματα και Συζήτηση	80
<b>3.1</b>	Εφαρμογή της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry - DSC) στις χμαιορικές διπλοστοιβάδες HSPC:PnBA-b-PAA (15/85)	81
<b>3.1.1</b>	Η θερμοτροπική συμπεριφορά των χμαιορικών διπλοστοιβάδων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85) που ενυδατώθηκαν σε Phosphate Buffered Saline (PBS), pH=7.4	81
<b>3.1.2</b>	Η θερμοτροπική συμπεριφορά των χμαιορικών διπλοστοιβάδων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85) που ενυδατώθηκαν σε Citrate Buffer, pH=4.0	90
<b>3.2</b>	Φυσικοχημικά Αποτελέσματα των κενών χμαιορικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85)	99
<b>3.2.1</b>	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των κενών χμαιορικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85) την ημέρα παρασκευής t=0 days	99
<b>3.2.2</b>	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των κενών χμαιορικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85) σε βάθος χρόνου (μελέτη σταθερότητας των συστημάτων ξεχωριστά)	102
<b>3.2.2.1</b>	HSPC: PnBA-b-PAA (15/85) 9:0.1	102
<b>3.2.2.2</b>	HSPC: PnBA-b-PAA (15/85) 9:0.5	103
<b>3.2.2.3</b>	HSPC: PnBA-b-PAA (15/85) 9:1.0	104
<b>3.2.2.4</b>	HSPC: PnBA-b-PAA (15/85) 9:2.0	105

<b>3.2.2.5</b>	HSPC: PnBA-b-PAA (15/85) 9:3:0	106
<b>3.2.3</b>	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των κενών χιμαιρικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85) σε βάθος χρόνου (συγκριτική μελέτη σταθερότητας)	107
<b>3.2.4</b>	Η φυσικοχημική συμπεριφορά των κενών χιμαιρικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85)	109
<b>3.3</b>	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των κενών χιμαιρικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85) σε Citrate Buffer (pH=4.0) (όξινο πρωτόκολλο)	115
<b>3.4</b>	Φυσικοχημικά Αποτελέσματα των χιμαιρικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85):DMC	119
<b>3.4.1</b>	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των χιμαιρικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85):DMC την ημέρα παρασκευής t=0 days	119
<b>3.4.2</b>	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των χιμαιρικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85):DMC σε βάθος χρόνου (μελέτη σταθερότητας των συστημάτων ξεχωριστά)	122
<b>3.4.2.1</b>	HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC 9:0.0:0.1	122
<b>3.4.2.2</b>	HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC 9:0.1:0.1	123
<b>3.4.2.3</b>	HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC 9:1.0:0.1	124
<b>3.4.3</b>	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των χιμαιρικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85):DMC σε βάθος χρόνου (συγκριτική μελέτη σταθερότητας)	125
<b>3.5</b>	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των χιμαιρικών λιποσωμάτων HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC σε Citrate Buffer (pH=4.0) (όξινο πρωτόκολλο)	129
<b>3.6</b>	Ποσοτικοποίηση της ενσωματωμένης DMC και του λιπιδίου HSPC στα χιμαιρικά συστήματα HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC	131
<b>3.7</b>	Χαρακτηριστικά ενσωμάτωσης DMC στα χιμαιρικά λιποσώματα HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC	132
<b>3.8</b>	Αποτελέσματα της μελέτης αποδέσμευσης του βιοδραστικού μορίου DMC από τα χιμαιρικά συστήματα HSPC:PnBA-b-	139

ΡΑΑ (15/85): DMC

Συμπεράσματα

146

Βιβλιογραφία

148



# **1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1.1 Διμεθοξικουρκουμίνη (dimethoxycurcumin, DMC)

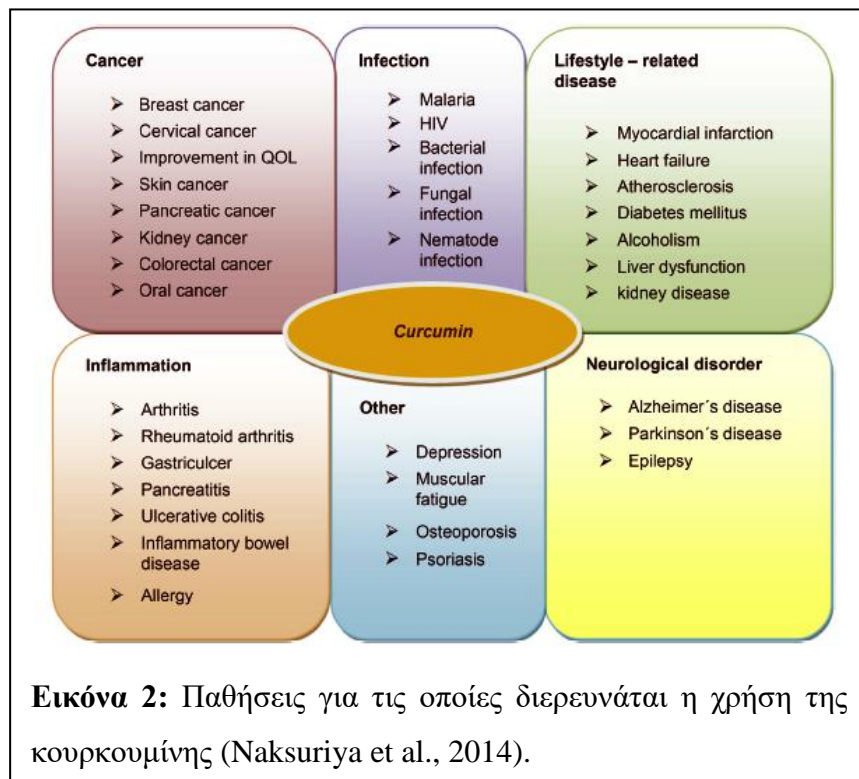
### 1.1.1 Γενικά

Η κουρκουμίνη (curcumin ή diferuloylmethane) είναι μια φυσική πολυφαινόλη, που προέρχεται από την



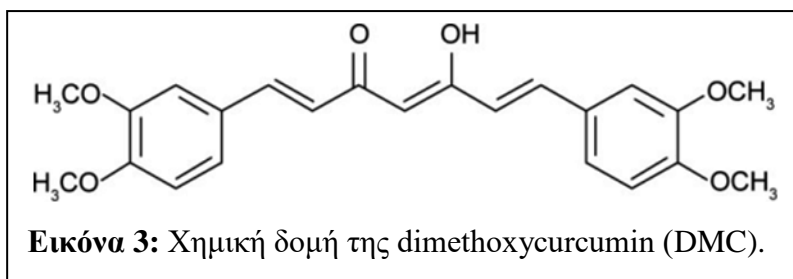
κουρκούμη, η οποία είναι ένα δημοφιλές καρύκευμα κίτρινου χρώματος, που συλλέγεται από τη ρίζα του φυτού *Curcuma longa*, οικ. *Zingiberaceae* (**Εικόνα 1**). Μέχρι τώρα, έχει υπάρξει ένας τεράστιος αριθμός δημοσιεύσεων σχετικά με κουρκουμίνη, που παρουσιάζουν το ευρύ φάσμα των βιολογικών και των κυτταρικών δραστηριοτήτων της. Η θεραπευτική αποτελεσματικότητα της κουρκουμίνης έχει επίσης αποδειχθεί εναντίον μιας ποικιλίας παθολογικών καταστάσεων, όπως οι μυοσκελετικές παθήσεις, οι παθήσεις του καρδιομεταβολικού συστήματος, οι κακοήθειες, οι φλεγμονές, το οξειδωτικό stress, οι ηπατικές, οι ψυχολογικές, καθώς και ασθένειες του αναπνευστικού συστήματος (**Εικόνα 2**).

Ωστόσο, η χρήση της κουρκουμίνης εξακολουθεί να παρουσιάζει δυσκολίες στην πράξη, όπως αποδεικνύεται από in vivo και κλινικές δοκιμές.



Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει, ότι η κλινική εφαρμογή της κουρκουμίνης χωλαίνει από τις ανεπιθύμητες φυσικοχημικές και φαρμακοκινητικές ιδιότητές της,

όπως η χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, η μεταβολική αστάθεια και η κακή βιοδιαθεσιμότητα (Naksuriya et al.,



2014). Για την αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων, έχουν προταθεί πολλές στρατηγικές, με σκοπό την ανάδειξη των επιθυμητών φαρμακολογικών ιδιοτήτων της κουρκουμίνης. Μια από αυτές τις στρατηγικές είναι και η σύνθεση παραγώγων της κουρκουμίνης, που παρουσιάζουν βελτιωμένη μεταβολική σταθερότητα, ενισχυμένες και περισσότερο εξειδικευμένες βιολογικές ιδιότητες. Ανάμεσα στα ανάλογα αυτά, συγκαταλέγεται και η διμεθοξικουρκουμίνη (dimethoxycurcumin, DMC) [1,7-bis (3,4-dimethoxyphenyl)- 1,6-heptadiene-3,5-dione], που φέρει μια συμμετρική δομή, στην οποία, τα -OH στις δύο φαινολικές ομάδες αντικαθίσταται με μεθόξυ ομάδες CH<sub>3</sub>O- (Εικόνα 3).

### 1.1.2 Φαρμακολογικές δράσεις της DMC (Teymouri et al., 2016)

#### ➤ Κυτταροτοξική επιλεκτικότητα, όσον αφορά τον καρκίνο

Ένα από τα ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά των κουρκουμινοειδών είναι η επιλεκτική κυτταροτοξικότητα τους εναντίον καρκινικών κυτταρικών σειρών, χωρίς να επηρεάζουν τα φυσιολογικά κύτταρα.

Η υπερπαραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) και ιδιαίτερα μιτοχονδριακών υπεροξειδίων, που συνοδεύεται από την αναστολή του πρωτεοσώματος, αποτελεί στόχος της DMC. Η DMC παρουσιάζει μάλιστα ιδιαίτερη κυτταροτοξική επιλεκτικότητα στα καρκινικά κύτταρα μέσω της παράπτωσης (paraptosis), ένα εναλλακτικό μονοπάτι προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, που ενεργοποιείται από τη DMC και περιλαμβάνει τα μιτοχόνδρια και το ενδοπλασματικό δίκτυο. Συγκεκριμένα, η DMC αποφεύγει π.χ. τα φυσιολογικά κύτταρα του μαστού ή τα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα, υποδεικνύοντας επιλεκτική παράπτωση στα καρκινικά κύτταρα και μάλιστα με εξαιρετικά μεγαλύτερη εξειδίκευση από την κουρκουμίνη (Yoon et al., 2014). Παράλληλα, η DMC παρουσιάζει και εντονότερες αποπτωτικές ιδιότητες από την κουρκουμίνη,

χρησιμεύοντας ως ανταγωνιστής του υποδοχέα των ανδρογόνων σε ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου του προστάτη in vivo (Tamvakopoulos et al., 2007).

#### ➤ **Αντιοξειδωτική δράση**

Τα κουρκουμινοειδή παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, αντιδρώντας με τις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου ROS. Καθώς τα λιπίδια είναι ένα από τους κύριους στόχους των ROS, η παρουσία ενός λιπόφιλου αντιοξειδωτικού, όπως η DMC, είναι απαραίτητη για να διατηρηθεί η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης.

Η κεντρική ομάδα  $-CH_2$  στην  $\alpha,\beta$  ημιακόρεστη δικετονική περιοχή της DMC είναι υπεύθυνη για να παγιδεύσει τις ρίζες οξυγόνου και να τις εξουδετερώσει μέσω σταθεροποίησης συντονισμού (Kunwar et al., 2011a). Το γεγονός ότι, η μεθόξυ ομάδα είναι πιο λιπόφιλη σε σχέση με την ομάδα  $-OH$ , καθιστά τη DMC πιο λιπόφιλη από την κουρκουμίνη και άρα η DMC παραμένει περισσότερο χρόνο σε μεμβράνες λιπιδίων, εφαρμόζοντας την αντιοξειδωτική της δράση παρά την έλλειψη φαινολικών  $-OH$ . (Kunwar et al., 2011a; Tamvakopoulos et al., 2007; Hassan et al., 2015).

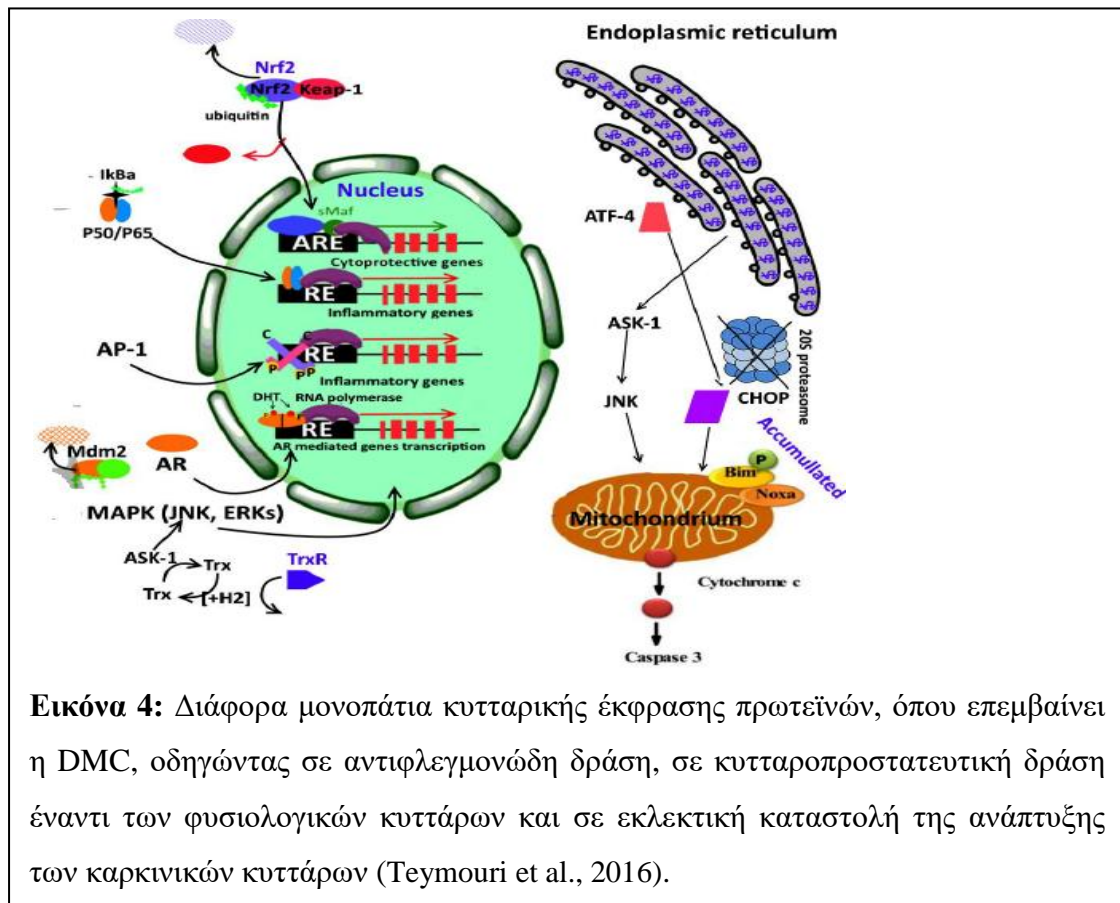
#### ➤ **Κυτταροπροστατευτική δράση**

Η DMC παρουσιάζει κυτταροπροστατευτική δράση έναντι πολλών παθήσεων, κυρίως μέσω της ρύθμισης των ROS. Αυτές περιλαμβάνουν τη βελτιωτική επίδραση στην ηπατοτοξικότητα του αρσενικού (As), την αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS), τη φλεγμονή και την ανοσοκαταστολή. Έχει αναφερθεί, ότι και η DMC και η κουρκουμίνη προκαλούν σημαντική μείωση των βασικών επιπέδων των ROS και της GSH (γλουταθειόνης) σε T-λεμφοκύτταρα λευχαιμίας, συνοδευόμενη από καταστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών T-κυττάρων, μειωμένη έκκριση προφλεγμονωδών κυτοκινών (π.χ. IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12 και INF- $\gamma$ ) και προφλεγμονωδών ενζύμων (π.χ. COX-2 και iNOS). Ο συνδυασμός των ανοσοκατασταλτικών επιδράσεων και της ρυθμιστικής δράσης της DMC έναντι των ROS, την καθιστούν ένα πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό βιοδραστικό μόριο για νόσους που σχετίζονται με αυτοάνοσες αποκρίσεις (Patwardhan et al., 2011a).

### **1.1.3 Πιθανές εφαρμογές της DMC**

- Απόπτωση των κυττάρων του καρκίνου του μαστού MCF7.

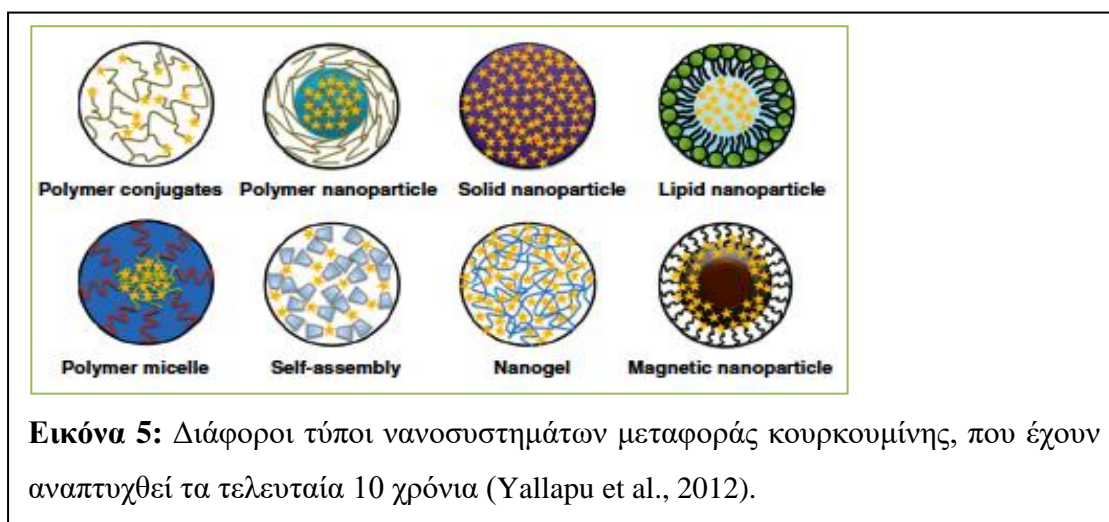
- Απόπτωση των κυττάρων του καρκίνου του πνεύμονα A549 και του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (non-small cell lung cancer, NSCLC).
- Ανταγωνισμός στον υποδοχέα ανδρογόνων (androgen receptor, AR) (αντί-πολλαπλασιαστική δράση σε κύτταρα του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, στο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα και σε καρκίνους του προστάτη).
- Μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του ενεργοποιητή πρωτεΐνης-1 (AP-1) και των γονιδιακών προϊόντων της AP-1, π.χ. psoriasisin και cyclin D1 στα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα (αντιμετώπιση της ακμής *acne vulgaris*) (Εικόνα 4) (Teymouri et al., 2016).



#### 1.1.4 Ενσωμάτωση της DMC σε νανοτεχνολογικές πλατφόρμες

Παρά τις σημαντικές φαρμακολογικές ιδιότητες της DMC, υπάρχουν σημαντικά προβλήματα, που εμποδίζουν την έγκρισή της ως θεραπευτικού παράγοντα, όπως η χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, η σχετικά μικρή βιοδιαθεσιμότητα, ο γρήγορος μεταβολισμός σε ορισμένο εύρος τιμών pH και η χαμηλή απορρόφηση, καθώς

περιορίζουν εν τέλει τη βιολογική της δραστηριότητα. Για την εξάλειψη των παραπάνω προβλημάτων, έχει προταθεί η ενσωμάτωση της DMC σε νανοσυστήματα μεταφοράς φαρμακομορίων. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν ήδη προτάσεις, που αφορούν την ενσωμάτωσή της DMC σε δενδριμερή από poly(amidoamine) (PAMAM) (Markatou et al., 2007), σε λιποσώματα (Hadjidemetriou et al., 2013) και πολυμερικά μικκύλια (Liu et al., 2015). Αναμένεται η δοκιμή ενσωμάτωσης και σε άλλα συστήματα, στα οποία έχει ήδη δοκιμαστεί να ενσωματωθεί κουρκουμίνη με θετικά αποτελέσματα, όπως νιοσώματα, λιπιδικά, μεταλλικά ή πολυμερικά νανοσωματίδια, μικρο/νανογαλακτώματα και σύμπλοκα κυκλοδεξτρίνης (**Εικόνα 5**) (Yallapu et al., 2012; Mehanny et al., 2016; Teymouri et al., 2016).

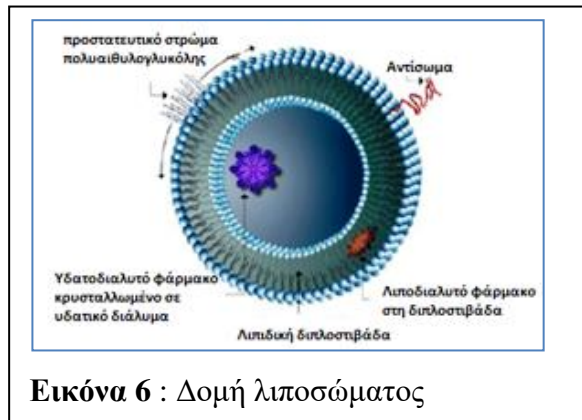


**Εικόνα 5:** Διάφοροι τύποι νανοσυστημάτων μεταφοράς κουρκουμίνης, που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία 10 χρόνια (Yallapu et al., 2012).

## 1.2 Λιπосώματα

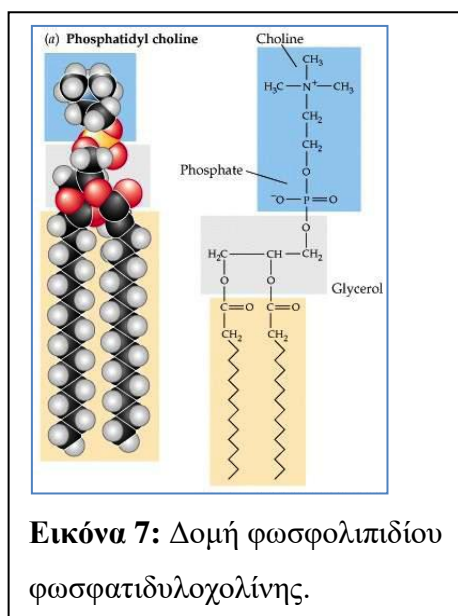
### 1.2.1 Γενικά

Λιπосώματα ορίζονται οι κλειστές σφαιρικές δομές μιας ή περισσοτέρων λιπιδικών διπλοστοιβάδων (**Εικόνα 6**), οι οποίες περικλείουν το μέσο διασποράς των φωσφολιπιδίων. Ο σχηματισμός αυτός προσδίδει στα λιπосώματα την πολύτιμη ιδιότητα, να αποτελούνται τόσο από υδρόφοβο



**Εικόνα 6 :** Δομή λιπосώματος

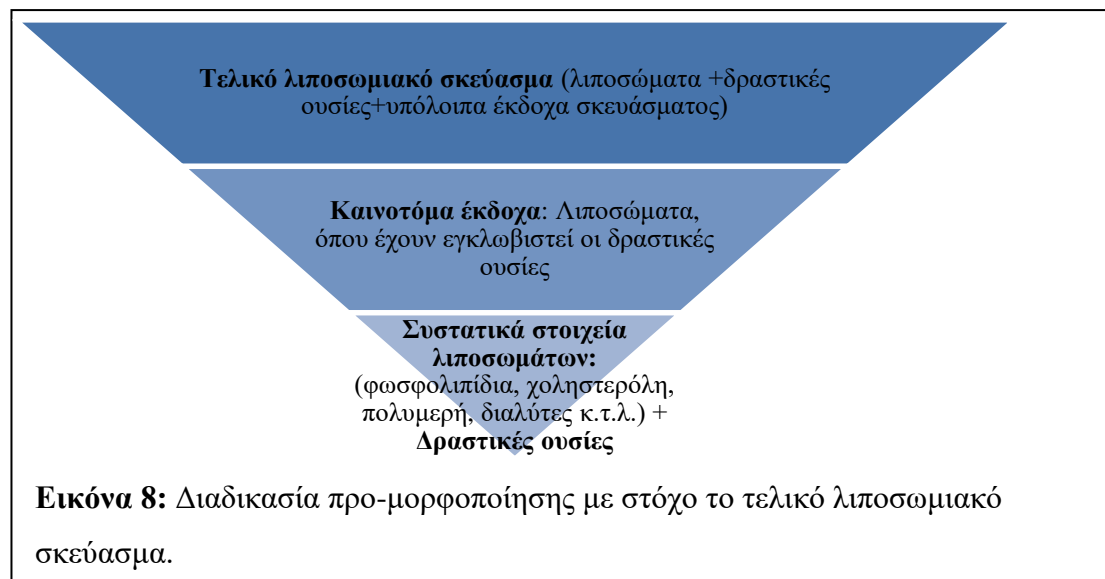
όσο και υδρόφιλο εσωτερικό περιβάλλον, το οποίο καθορίζεται από τις λιπιδικές αλυσίδες των φωσφολιπιδίων και το υδατικό μέσο διασποράς αντίστοιχα. Το γεγονός ότι, τα φωσφολιπίδια είναι αμφίφιλες οργανικές ενώσεις (**Εικόνα 7**) και αποτελούν το δομικό υλικό της κυτταρικής μεμβράνης, προσδίδει στα λιπосώματα την απαραίτητη βιοσυμβατότητα. Η λιπιδική σύσταση μεμβράνη εσωκλείει τον υδατικό πυρήνα, όπου εγκλωβίζονται υδρόφιλα μόρια, ενώ τα λιπόφιλα μόρια ενσωματώνονται στην ίδια τη μεμβράνη (Bangham et al., 1965).



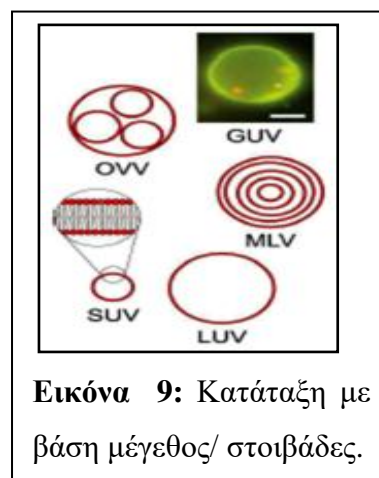
Στις πρώτες ύλες των λιπосωμιακών συστημάτων συγκαταλέγονται, εκτός από τα συστατικά των λιπосωμάτων (π.χ. φωσφολιπίδια), οι δραστικές ουσίες, που πρόκειται να εγκλειστούν και οποιοδήποτε άλλο έκδοχο (π.χ. χοληστερόλη κ.τ.λ.) απαιτείται για την τελική σύνθεση του λιπосωμιακού σκευάσματος. Σύμφωνα όμως με την τελευταία βιβλιογραφία, και ο λιπосωμιακός φορέας αυτός καθ' εαυτός θεωρείται έκδοχο, καθώς δεν αποτελεί την τελική μορφή του σκευάσματος, αλλά παρασκευάζεται κατά τη διαδικασία της

προ-μορφοποίησης (pre-formulation) και μαζί με τα υπόλοιπα έκδοχα, που προστίθενται μετά, συνθέτουν την τελική μορφή του λιπосωμιακού σκευάσματος (π.χ. ενέσιμο διάλυμα) (**Εικόνα 8**). Μάλιστα θεωρείται καινοτόμο έκδοχο (innovative excipient) σε σχέση με τη συστηματική προσέγγιση άλλων πιο παραδοσιακών

εκδόχων π.χ. λακτόζη. Είναι δε εξαιρετικά σημαντικός ο έλεγχος της καθαρότητας (purity) όλων των πρώτων υλών, συμβατικών και καινοτόμων, των λιποσωματικών σκευασμάτων, μέσω διαδικασιών που υφίστανται πιστοποίηση (process validation).



Τα λιποσώματα, ανάλογα το μέγεθός τους και τον αριθμό των διπλοστοιβάδων τους, μπορούν να ταξινομηθούν σε πολυκυστιδικά λιποσώματα (Multi Vesicular Vesicles, MVVs), πολυστοιβαδικά λιποσώματα (Multi Lamellar Vesicles/ MLVs, 500-5000nm), μεγάλα μονοστοιβαδικά λιποσώματα (Large Unilamellar Vesicles/ LUVs, 200-800nm) και μικρά μονοστοιβαδικά λιποσώματα (Small Unilamellar Vesicles/ SUVs, ~100nm) (**Εικόνα 9**) (Δεμέτζος 2014).



### **1.2.2 Φυσικοχημικά και Βιολογικά χαρακτηριστικά των λιποσωμάτων**

Τα λιποσώματα προορίζονται για διάφορες θεραπευτικές εφαρμογές και χορήγηση στον άνθρωπο, και γι αυτό κατά την παρασκευαστική διεργασία και πριν τη χρήση τους, πρέπει πάντα να ελέγχονται οι φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες, που έχουν επίδραση στις φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού. Μερικές από τις βασικότερες ιδιότητες αυτές συνοψίζονται στον **Πίνακα 1**, μαζί με τις αντίστοιχες μεθόδους, που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των ιδιοτήτων αυτών.



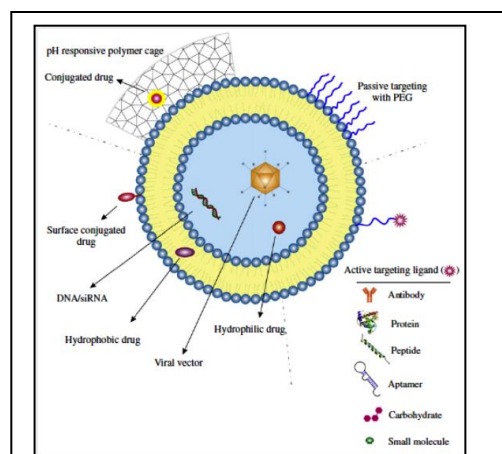
Χαρακτηριστικά Λιπосωμάτων	Μέθοδοι
<b>Φυσικά Χαρακτηριστικά Λιπосωμάτων</b>	
Σχήμα και μορφολογία επιφάνειας	Near-field scanning optical microscopy (NSOM), Scanning electron microscopy(SEM), Transmission electron microscopy (TEM), Scanning tunneling microscopy (STM), Atomic force microscopy (AFM), X-ray diffraction (XRD) και Small-angle X-ray scattering (SAXS).
Μέγεθος	Dynamic light scattering (DLS), Raman scattering (RS), Surface enhanced Raman(SERS), Near-field scanning optical microscopy (NSOM), Scanning electron microscopy(SEM), Transmission electron microscopy (TEM), Scanning tunneling microscopy (STM), Atomic force microscopy (AFM), Nuclear magnetic resonance (NMR), X-ray diffraction (XRD) και Small-angle X-ray scattering (SAXS)
ζ -δυναμικό	Electrophoretic Light Scattering (ELS)
Ποσοστό ελεύθερου βιοδραστικού μορίου %	Φυγοκέντρωση με στήλη διαχωρισμού, χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων, ραδιοσήμανση
Αποδέσμευση βιοδραστικού μορίου	Διάχυση των κυττάρων/ διαπίδυση
Ωσμωτικότητα	Ωσμόμετρο
<b>Χημικά Χαρακτηριστικά Λιπосωμάτων</b>	
Συγκέντρωση φωσφολιπιδίου	Μέθοδος Barlett, Μέθοδος Stewart, HPLC
Συγκέντρωση χοληστερόλης	Μέθοδος με χρήση οξειδάσης της χοληστερόλης και HPLC
Υπεροξείδωση των φωσφολιπιδίων	Απορρόφηση UV, GLC
Υδρόλυση φωσφολιπιδίων, Αυτοοξειδωση χοληστερόλης	HPLC, TLC-FID, GC-LC
<b>Βιολογικά Χαρακτηριστικά Λιπосωμάτων</b>	
Στεριότητα	Αερόβιες ή Αναερόβιες καλλιέργειες
Πυρετογένεση	Limulus Amebocyte Lysate (LAL) test
Τοξικότητα στα ζώα	Παρακολούθηση ποσοτών επιβίωσης, ιστολογίας και παθολογίας

**Πίνακας 1:** Φυσικά, Χημικά, Βιολογικά Χαρακτηριστικά Λιπосωμάτων και οι Μέθοδοι/ Όργανα με τα οποία μετρώνται (Sriram et al., 1995; Elizondo et al., 2011; Δεμέτζος 2014; Lin et al., 2014; Patil et al., 2014; Nogueira et al., 2015).

### 1.2.3 Λειτουργικότητα των λιποσωμάτων

Τα λιποσώματα θεωρούνται ως ένα από τα πιο εξελιγμένα συστήματα μεταφοράς φαρμακομορίων. Παρουσιάζουν εξαιρετικά υψηλή θεραπευτική αποτελεσματικότητα, απουσία ανοσογονικότητας, δυνατότητα στοχευόμενης μεταφοράς φαρμακομορίων αποκλειστικά σε παθολόγους ιστούς, προστασία των περιεχομένων μορίων από το περιβάλλον του οργανισμού, καθώς και περιορισμό των τοξικών παράπλευρων ανεπιθύμητων ενεργειών. Ωστόσο, τα συμβατικά λιποσώματα εξακολουθούν να παρουσιάζουν ορισμένα μειονεκτήματα, όπως η γρήγορη αναγνώριση και πρόσληψη από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα (reticuloendothelial system, RES), γεγονός που μειώνει το χρόνο ζωής τους στο πλάσμα, καθώς και η αποδόμηση τους από τα ένζυμα του λιποσώματος, μετά την είσοδό τους στο κύτταρο. Τα γεγονότα αυτά μειώνουν το ποσοστό του περιεχόμενου βιοδραστικού μορίου που παραλαμβάνεται τελικώς από το κύτταρο, με αποτέλεσμα τη μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του μορίου.

Τα παραπάνω μειονεκτήματα οδήγησαν στην ανάπτυξη περισσότερο εξελιγμένων μορφών λιποσωμάτων, μέσω της τροποποίησης της δομής τους, όπως με την προσθήκη αλυσίδων πολυμερών στην επιφάνειά τους (στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα/ stealth liposomes), αντισωμάτων και διαφόρων ειδών μακρομορίων επιφανείας (Sharma et al., 1997; Vasir et al., 2005). Τα επιμέρους αυτά στοιχεία προσδίδουν στα λιποσώματα επιπλέον ικανότητες, εκτός από τη μεταφορά φαρμακομορίων. Έτσι λοιπόν,

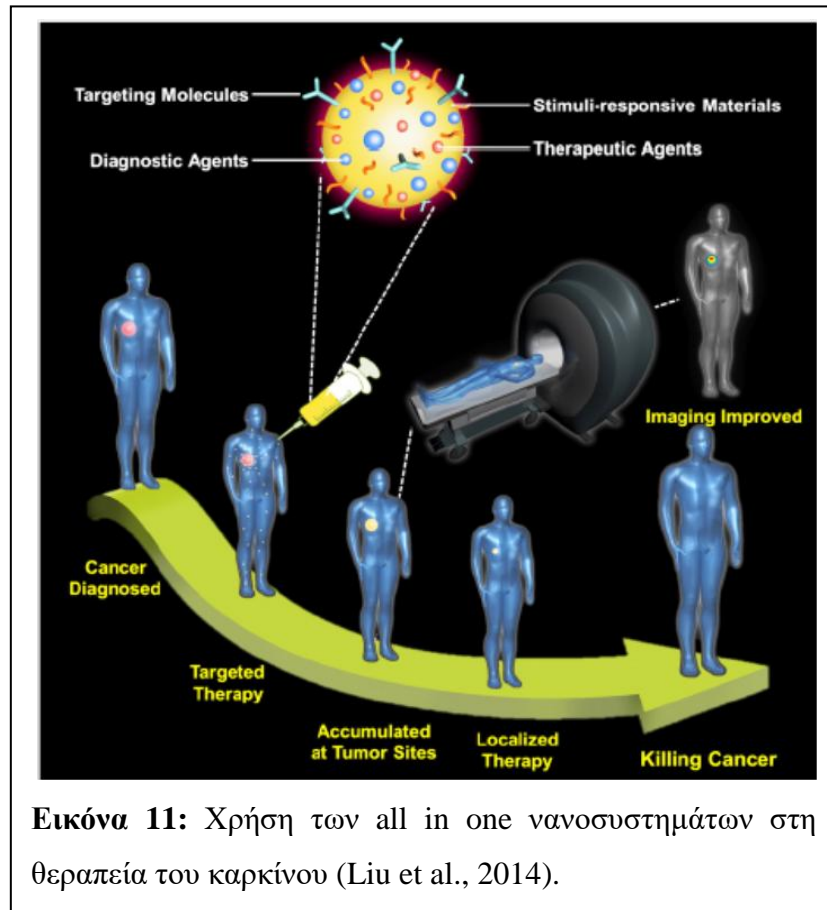


**Εικόνα 10:** Πολύ- λειτουργικό λιπόσωμα.

χρησιμοποιούνται στην παρασκευή λιποσωματικών εμβολίων, στη μεταφορά γονιδίων/ νουκλεϊκών οξέων (γονιδιακή θεραπεία), ως διαγνωστικά μέσα σε απεικονιστικές μεθόδους π.χ. μαγνητική τομογραφία, καθώς και στην κοσμητολογία. Ιδανική δε είναι η επίτευξη της δημιουργίας πολύ-λειτουργικών λιποσωμάτων, όπως π.χ. η δομή που παρουσιάζεται στην **Εικόνα 10**.

Όλα τα επιπλέον λειτουργικά στοιχεία καθιστούν τα λιποσώματα χρήσιμα σε συνδυαστικές θεραπείες (combinational therapy by multi-functional formulations/ all in one therapy). Τέτοιου είδους συστήματα (all-in-one), που συνδυάζουν

διαγνωστικούς και  
θεραπευτικούς  
παράγοντες,  
μπορούν να  
καταστήσουν ικανή  
την οπτική  
παρακολούθηση  
της θεραπείας  
σοβαρών  
παθήσεων, όπως  
του καρκίνου  
(Εικόνα 11).  
Μάλιστα, στο  
κοντινό μέλλον  
αναμένουμε, ότι η  
χρήση των  
πολυλειτουργικών



**Εικόνα 11:** Χρήση των all in one νανοσυστημάτων στη  
θεραπεία του καρκίνου (Liu et al., 2014).

νανοσυστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων θα ενταχθεί στην καθημερινή κλινική αντιμετώπιση του καρκίνου (Allen et al., 2013; Eloy et al., 2014; Liu et al., 2014).

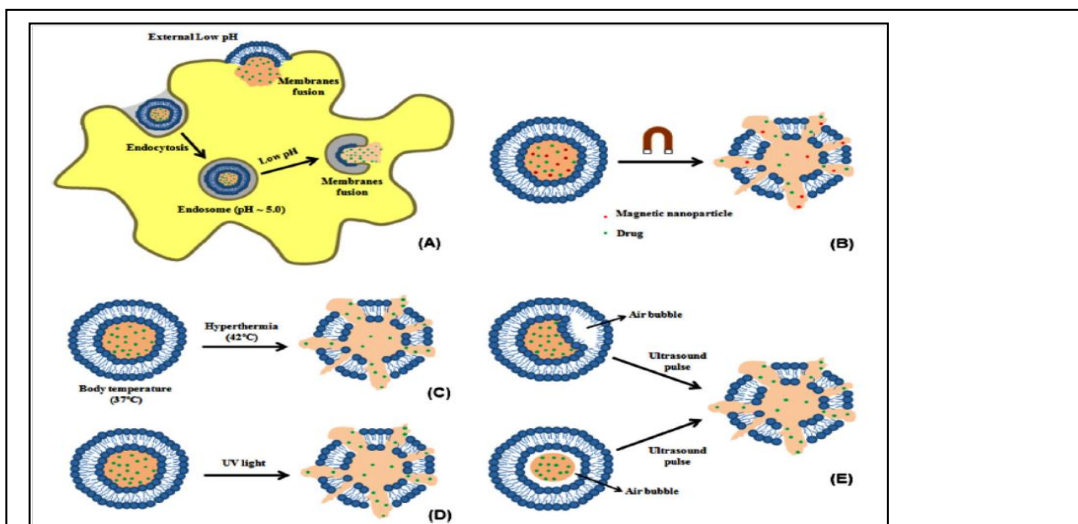
#### **1.2.4 Μηχανισμοί Στόχευσης των λιποσωμάτων**

Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα των λιποσωμάτων είναι αυτό της στόχευσης και θα μας απασχολήσει ιδιαίτερα παρακάτω στην ειδική κατηγορία των pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων. Τα λιποσώματα παρουσιάζουν τους εξής μηχανισμούς στόχευσης:

- Παθητική στόχευση, που αφορά:
  - παθοφυσιολογικούς παράγοντες, όπως το φαινόμενο ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης (Enhanced Permeability and Retention effect/ EPR effect), που διέπει τους ιστούς των όγκων, προωθώντας τη συσσώρευση λιποσωμάτων, καθώς και το φαινόμενο της φλεγμονής, της οποίας οι χημειοτακτικοί παράγοντες προκαλούν την εξαγγείωση των λιποσωμάτων μόνο στον τόπο της φλεγμονής, σε συνδυασμό με τα μακροφάγα κύτταρα της φλεγμονής, που παγιδεύουν έτσι κι αλλιώς τα λιποσώματα.

- ανατομικούς παράγοντες, όπως διακριτά ανατομικά διαμερίσματα, όπου τα λιποσώματα μπορούν να εισαχθούν με καθετήρες και κατ' ευθείαν ενέσεις, για να περιορίσουμε τη συστηματική κυτταροτοξική δράση ορισμένων φαρμακομορίων π.χ. αντινεοπλασματικών (συγκεκριμένα για τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό υπάρχουν τεχνικές μικροέγχυσης).
- το pH του οργανισμού, καθώς οι παθολογικοί ιστοί (καρκινικοί όγκοι, φλεγμονές, ισχαιμία) εμφανίζουν διαφορετικές τιμές pH από τους φυσιολογικούς, γεγονός που εκμεταλλεύονται τα pH-ευαίσθητα λιποσώματα, τα οποία και θα περιγράψουμε παρακάτω.
- φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των λιποσωμάτων, όπως το μέγεθος και το επιφανειακό φορτίο.
- τα μακροφάγα κύτταρα του μονοκύτταρου φαγοκυτταρικού συστήματος, που αποτελούν παθητικό στόχο, καθώς τα λιποσώματα αναγνωρίζονται και συσσωρεύονται φυσιολογικά στα κύτταρα αυτά, που έχουν την τάση να λειτουργούν ως ωσόνιες. Η αποδέσμευση του φαρμακομορίου εντός των μακροφάγων μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία φλεγμονωδών και αυτό-άνοσων παθήσεων, καθώς και καρκινικών όγκων των μακροφάγων [tumor-associated macrophage (TAM)].
- Ενεργητική εσωτερική στόχευση, που αφορά:
  - υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, που επιτρέπουν εξειδικευμένη αλληλεπίδραση των λιποσωμάτων με τα κύτταρα, προωθώντας την πρόσληψή τους μέσω ενδοκύττωσης. Τέτοιοι είναι ο υποδοχέας φολικού οξέος, οι υποδοχείς LDL και οι πεπτιδικοί υποδοχείς.
  - λιπιδικά στοιχεία της κυτταρικής μεμβράνης, που επιτρέπουν αλληλεπίδραση των συνθετικών αναλόγων των φωσφολιπιδίων των λιποσωμάτων με την κυτταρική μεμβράνη, αυξάνοντας τη ρευστότητα, τη διαπερατότητά της και τον αποπτωτικό θάνατο.
  - αντιγόνα/ πρωτεΐνες επιφανείας, που στοχεύονται από ανοσολιποσώματα, που φέρουν τα αντίστοιχα αντισώματα [π.χ. πρωτεΐνη ενεργοποίησης φιμπροβλαστών (FAP)].
  - προσδέματα στόχευσης, που φέρουν πάνω τους τα λιποσώματα (targeting ligands) και συνδέονται στους αντίστοιχους υποδοχείς των κυττάρων, μεταξύ των οποίων είναι: φολικό οξύ, σάκχαρα (γαλακτόση, ασιαλογλυκοπρωτεΐνη), λεκτίνες, τροποποιημένη αλβουμίνη, πεπτίδια και αντισώματα.

- ο μεταγραφική στόχευση, με promoters, που εισαγόμενοι μέσω λιποσωμάτων, μειώνουν τη γονιδιακή έκφραση στα κύτταρα στόχευσης π.χ. καρκινικά κύτταρα. Παραδείγματα αποτελούν οι promoters για το γονίδιο της τελομεράσης και της α-fetoprotein.
- ο ενζυμική αποδέσμευση του περιεχομένου, που ενεργοποιείται τοπικά από ένζυμα του οργανισμού, όπως φωσφολιπάση A<sub>2</sub>, αλκαλική φωσφατάση και μεταλλοπρωτεϊνάσες.
- Ενεργητική εξωτερική στόχευση, που αφορά εφαρμογή:
  - ο υπέρηχων, που εστιάζουν στον ιστό του όγκου, ενεργοποιούν την αποδέσμευση του περιεχομένου τοπικά μόνο στον όγκο, ενισχύοντας την κυτταρική πρόσληψη.
  - ο ακτινοβολίας, στην οποία εκτίθεται ο ιστός του όγκου και ενεργοποιεί την αποδέσμευση του περιεχομένου από φωτοευαίσθητα λιποσώματα, που έχουν εισαχθεί στον όγκο.
  - ο μαγνητικού πεδίου, που προσελκύει μαγνητικούς παράγοντες και άρα τα λιποσώματα που περιέχουν τους παράγοντες αυτούς σε συγκεκριμένη τοποθεσία, αλλά και που τα συγκρατεί εκεί, μέχρι να ολοκληρωθεί η θεραπεία.
  - ο θερμότητας (μεταβολή θερμοκρασίας), που προσφέρεται στους όγκους, ώστε να ενεργοποιήσει την αποδέσμευση από θερμοευαίσθητα λιποσώματα, που έχουν εισαχθεί σε αυτούς (**Εικόνα 12**) (Vasir et al., 2005; Pradhan et al., 2010; Allen et al., 2013; Eloy et al., 2014; Kneidl et al., 2014; Nehoff et al., 2014).

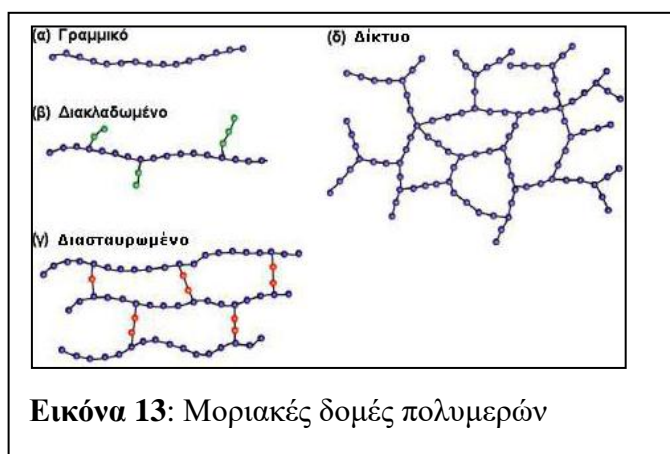


**Εικόνα 12:** Μηχανισμοί εσωτερικής και εξωτερικής στόχευσης: (A) ενδοκυτταρική πτώση του pH, (B) εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, (C) υπερθερμίας, (D) ακτινοβολίας, (E) υπερήχησης (Eloy et al., 2014).

## 1.3 Πολυμερή

### 1.3.1 Κατάταξη πολυμερών

Τα πολυμερή είναι ουσίες υψηλού μοριακού βάρους, οι οποίες αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες μονάδες, τα μονομερή, τα οποία συνδέονται σε μια μακριά αλυσίδα. Οι δομικές μονάδες της αλυσίδας συνδέονται μεταξύ τους με ομοιοπολικούς δεσμούς, ενώ οι ίδιες οι αλυσίδες-μακρομόρια αλληλοσυνδέονται είτε με απλούς δεσμούς υδρογόνου ή van der Waals (φυσικοί δεσμοί), είτε με crosslinks, και είναι υπεύθυνες για τη δομή και συνεπαγωγικά τις ιδιότητες του πολυμερούς. Τα



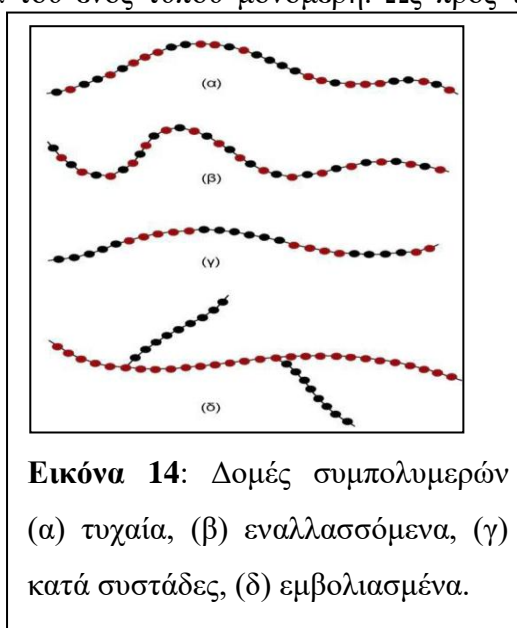
Εικόνα 13: Μοριακές δομές πολυμερών

πολυμερικά μόρια μπορεί να είναι γραμμικά (α) ή διακλαδισμένα (β) ενώ διακριτές γραμμικές ή διακλαδισμένες αλυσίδες μπορούν να συνδεθούν με ομοιοπολικούς δεσμούς προς διασταυρωμένα (γ) και δικτυωμένα πολυμερή (δ)

(Εικόνα 13).

Τα πολυμερή χωρίζονται επίσης σε ομοπολυμερή (homopolymers), όπου τα μονομερή από τα οποία αποτελούνται είναι όλα πανομοιότυπα και σε συμπολυμερή (copolymers), όπου υπάρχουν περισσότερα του ενός τύπου μονομερή. Ως προς τη σύνθεση τους, τα συμπολυμερή μπορεί να είναι:

- **Τυχαία** (random copolymers), με τυχαία κατανομή των μονομερών κατά μήκος της αλυσίδας.
- **Εναλλασσόμενα** (alternating copolymers), με εναλλαγή δύο μονομερών με απόλυτη κανονικότητα.
- **Συμπολυμερή κατά συστάδες** (block copolymers), δηλαδή γραμμικά μακρομόρια αποτελούμενα από



Εικόνα 14: Δομές συμπολυμερών (α) τυχαία, (β) εναλλασσόμενα, (γ) κατά συστάδες, (δ) εμβολιασμένα.

εναλλασσόμενες συστάδες (blocks) ομοπολυμερών. Υπάρχουν δισυσταδικά (AB diblocks) και τρισυσταδικά (ABA ή BAB triblocks).

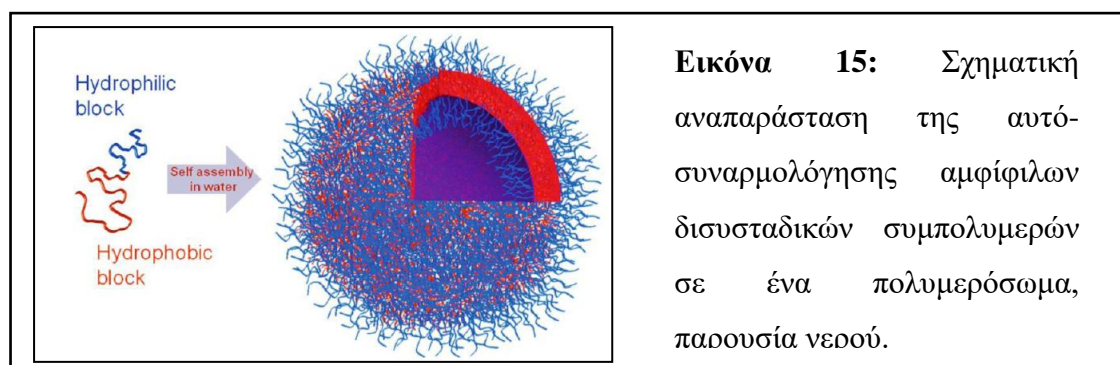
- **Εμβολιασμένα** (graft copolymers), όπου κατά μήκος μιας αλυσίδας ομοπολυμερούς «εμβολιάζονται» ως διακλαδώσεις μακρομόρια άλλου ομοπολυμερούς (**Εικόνα 14**) (Δεμέτζος 2014; Florence et al., 2008).

### 1.3.2 Ιδιότητες συμπολυμερών κατά συστάδες

#### ➤ Σχηματισμός πολυμεροσωμάτων

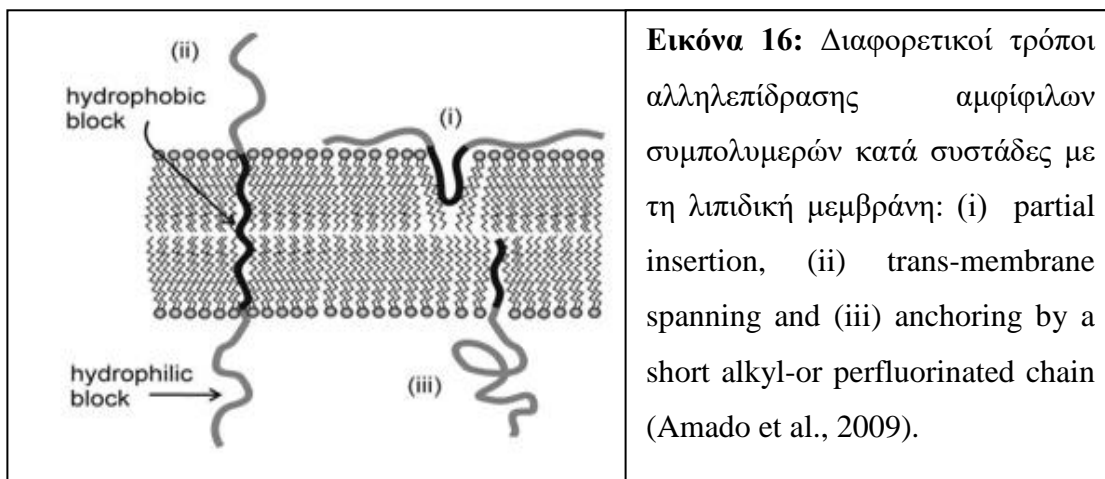
Τα τελευταία χρόνια, τα συμπολυμερή κατά συστάδες έχουν αποκτήσει μεγάλο ενδιαφέρον, λόγω της ποικιλίας και των δυνατοτήτων που προσφέρουν στο σχεδιασμό μακρομορίων. Οι ερευνητές μπορούν να έχουν τον έλεγχο των μακρομοριακών χαρακτηριστικών τους, όπως το μέγεθος των συστάδων, την αρχιτεκτονική τους, τη μοριακή πολυδιασπορά, ενώ ανέπτυξαν ειδικές διαδικασίες σύνθεσης γνωστές ως "ζωντανός πολυμερισμός" (living polymerization). Μέσω αυτών των μεθόδων μπορεί να δημιουργηθεί μεγάλη ποικιλία αρχιτεκτονικών.

Μια από τις μοναδικές τους ιδιότητες είναι ο σχηματισμός πολυμεροσωμάτων, τα οποία προκύπτουν, όταν αμφίφιλα συσταδικά συμπολυμερή αυτό-συναρμολογούνται (self-assemble) σε πολυμερικά κυστίδια (μεγέθους από 10nm έως 10μm), τα οποία στο εσωτερικό και το εξωτερικό της κύστης είναι υδρόφιλα, ενώ στην πολυμερική διπλοστοιβάδα παρουσιάζουν υδροφοβική συμπεριφορά (**Εικόνα 15**). Η ικανότητά τους να εγκλωβίζουν υδρόφιλα, αλλά και να ενσωματώνουν και υδρόφοβα βιοδραστικά μόρια, τα καθιστά ελκυστικά συστήματα για τη μεταφορά τους. Αντίστοιχα με τα λιποσώματα, μπορούν με κατάλληλες προσθήκες βιο-υλικών, να ανταποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα (θερμοκρασία, pH, ιοντική ισχύς, φως), να μεταφέρουν εκτός από βιοδραστικά μόρια, πρωτεΐνες, DNA και αντισώματα, καθώς και να χρησιμοποιούνται σε απεικονιστικές μεθόδους (NIR, MRI) (Δεμέτζος 2014).



➤ **Ενσωμάτωση των συμπολυμερών κατά συστάδες σε λιποσώματα**

Η αυτό-συναρμολόγηση αμφίφιλων συμπολυμερών κατά συστάδες εντός των λιποσωμάτων αναμένεται, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, να βοηθήσει να διατηρηθεί η διπλοστιβαδική δομή των κυστιδίων, καθώς και να ενισχύσει τη φυσική τους σταθερότητα. Η ενσωμάτωση γίνεται ως εξής: οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις προκαλούν τη διείσδυση της υδρόφοβης συστάδας (block) εντός της διπλοστοιβάδας ανάμεσα στις ουρές των λιπιδίων, ενώ οι υδρόφιλες συστάδες εκτείνονται προς το υδρόφιλο εξωτερικό περιβάλλον. Υπάρχουν διαφόρων μορφών αλληλεπιδράσεις μεταξύ του συμπολυμερούς κατά συστάδες και της λιπιδικής διπλοστοιβάδας, ανάλογα με τη συγκεκριμένη μοριακή αρχιτεκτονική και το μέγεθος της υδρόφοβης συστάδας σε σχέση με το πάχος της διπλοστοιβάδας της μεμβράνης, όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 16** (Amado et al., 2009). Η βιβλιογραφία αναφέρει ότι τα λιποσώματα που προκύπτουν, παρουσιάζουν σημαντικά αυξημένη σταθερότητα κατά



**Εικόνα 16:** Διαφορετικοί τρόποι αλληλεπίδρασης αμφίφιλων συμπολυμερών κατά συστάδες με τη λιπιδική μεμβράνη: (i) partial insertion, (ii) trans-membrane spanning and (iii) anchoring by a short alkyl- or perfluorinated chain (Amado et al., 2009).

την αποθήκευση, αντοχή έναντι θραύσης και σύντηξης και μοναδικά χαρακτηριστικά διείσδυσης. Το συμπολυμερές κατά συστάδες προκαλεί δομικές αλλαγές στη διπλοστοιβάδα, με την υδρόφοβη συστάδα του συμπολυμερούς να χρησιμεύει ως διαχωριστικό (spacer) και να γεμίζει τα κενά μεταξύ των λιπιδίων και την υδρόφιλη ομάδα να παρέχει θέσεις (arms) για προσέλκυση μορίων νερού και άρα να δημιουργεί αποθητικές δυνάμεις ενυδάτωσης. Μάλιστα μια μεγαλύτερη υδρόφιλη αλυσίδα σε μήκος παρέχει ιδιαίτερα ενισχυμένη σταθερότητα στα λιποσώματα σε σχέση με αλυσίδες μικρότερου μήκους (Shen et al., 2014).



### 1.3.3 "Έξυπνα" πολυμερή που αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα (stimuli-responsive polymers)

#### 1.3.3.1 Γενικά

Τα "έξυπνα" πολυμερή (smart) συμμετέχουν σε μεγάλο βαθμό σε ποικίλες εφαρμογές. Συγκεκριμένα, τα "έξυπνα" πολυμερικά συστήματα μεταφοράς φαρμακομορίων μπορούν να χαρακτηριστούν ως ευφυή συστήματα, ικανά να αποδεσμεύουν το

Περιβαλλοντικό ερέθισμα	Αποκρινόμενο υλικό
<b>Θερμοκρασία</b>	Poloxamers Poly(N-alkylacrylamide)s Poly(N-vinylcaprolactam)s Cellulose, Xyloglucan Chitosan
<b>pH</b>	Poly(methacrylicacid)s Poly(vinylpyridine)s Poly(vinylimidazole)s
<b>Ακτινοβολία</b>	Modified poly(acrylamide)s
<b>Ηλεκτρικό πεδίο</b>	Sulfonated polystyrenes Poly(thiophene)s Poly(ethyloxazoline)
<b>Υπέρηχοι</b>	Ethylenevinylacetate

**Πίνακας 2:** Διάφορα ερεθίσματα και αποκρινόμενα υλικά (Honey et al., 2014).

περιεχόμενό τους σε κατάλληλο χρόνο και τόπο, σε απάντηση συγκεκριμένων φυσιολογικών ερεθισμάτων. Ένα ευαίσθητο ή "έξυπνο" (smart) πολυμερές υφίσταται μια απότομη αλλαγή των φυσικών του ιδιοτήτων σε απάντηση μικρών περιβαλλοντικών ερεθισμάτων (**Πίνακας 2**). Τα πολυμερή αυτά αποκαλούνται επίσης ευφυή, επειδή παρουσιάζουν μικρές αλλαγές, που συμβαίνουν ως απόκριση σε ένα εξωτερικό ερέθισμα, μέχρι αυτό να φθάσει σε ένα κρίσιμο σημείο, ενώ παράλληλα έχουν την ικανότητα να επιστρέψουν στην αρχική τους κατάσταση μόλις το ερέθισμα διακοπεί.

Τα πολυμερή αυτά παρουσιάζουν μια μη γραμμική απόκριση σε μικρά ερεθίσματα, οδηγώντας σε αξιοσημείωτη μακροσκοπική μεταβολή της δομής ή των ιδιοτήτων τους. Οι μεταβολές αυτές είναι αναστρέψιμες και συμπεριλαμβάνουν αλλαγές κατάστασης, σχήματος, διαλυτότητας, αγωγιμότητας, αλληλεπιδράσεις διαλυτών, καθώς και υδρόφιλες/λιπόφιλες ισορροπίες. Οι κινητήριες δυνάμεις πίσω από αυτές τις μεταβάσεις περιλαμβάνουν εξουδετέρωση των φορτισμένων ομάδων με την προσθήκη αντίθετα φορτισμένων πολυμερών ή με μετατόπιση του pH και την αλλαγή

στην υδρόφιλη / λιπόφιλη ισορροπία ή με μεταβολές στην σύνδεση υδρογόνου λόγω αύξησης ή μείωσης της θερμοκρασίας.

Τα κύρια οφέλη των έξυπνων συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων με βάση τα πολυμερή περιλαμβάνουν μειωμένη συχνότητα δοσολογίας, ευκολία παρασκευής, διατήρηση της επιθυμητής θεραπευτικής συγκέντρωσης με μια μόνο δόση (single dose), παρατεταμένη αποδέσμευση του ενσωματωμένου φαρμακομορίου, περιορισμό των παράπλευρων ανεπιθύμητων ενεργειών, καθώς και βελτιωμένη σταθερότητα. Τα εντυπωσιακά χαρακτηριστικά των "έξυπνων" πολυμερών οφείλονται στην ευελιξία τους και τη ρυθμιζόμενη ευαισθησία τους. Η σημαντικότερη αδυναμία, ωστόσο, όλων των εξωτερικά διεγερόμενων-ευαίσθητων πολυμερών αποτελεί ο αργός χρόνος απόκρισης. Η ευελιξία των πολυμερικών υλικών και η δυνατότητα της συνδυαστικής σύνθεσής τους μπορεί να βοηθήσει στη ρύθμιση της ευαισθησίας τους, ώστε να παρουσιάζουν ένα στενό εύρος απόκρισης στο ερέθισμα, ενώ η ανάπτυξη των "έξυπνων" πολυμερικών συστημάτων μπορεί να οδηγήσει σε περισσότερο ακριβή και προγραμματισμένη μεταφορά των φαρμακομορίων.

Οι απαντήσεις των "έξυπνων" πολυμερών μπορεί να είναι διαφόρων τύπων. Η απόκριση στα φυσικά ή χημικά ερεθίσματα περιορίζεται στην καταστροφή και το σχηματισμό διάφορων δευτερογενών δυνάμεων, συμπεριλαμβανομένων των δεσμών υδρογόνου, υδρόφοβων δυνάμεων, δυνάμεων van der Waals και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Οι χημικές εκδηλώσεις περιλαμβάνουν απλές αντιδράσεις, όπως οξείδωση, εξουδετέρωση, αναγωγή και υδρόλυση τμημάτων, που συνδέονται με την αλυσίδα του πολυμερούς. Σε ορισμένες περιπτώσεις, παρουσιάζεται δραματική διαμορφωτική αλλαγή στην πολυμερική δομή, π.χ. αποικοδόμηση της πολυμερικής δομής, που οφείλεται σε μη αναστρέψιμη θραύση δεσμών ως απόκριση στο εξωτερικό ερέθισμα.

Το "έξυπνο" πολυμερές πρέπει να παρουσιάζει ιδιότητες όπως βιοαποικοδομησιμότητα και βιοσυμβατότητα, δυνατότητα ελεγχόμενης αποδέσμευσης, σταθερότητα, καθώς και υψηλή ικανότητα φόρτωσης των φαρμακομορίων, ενώ πρέπει να απέχει από συστηματική τοξικότητα, ανοσογονικότητα, καρκινογένεση και αναπαραγωγική τοξικότητα (Honey et al., 2014; Zhu et al., 2017).

### **1.3.3.2 pH-αποκρινόμενα πολυμερή**

Στην παρούσα εργασία θα ασχοληθούμε με pH-αποκρινόμενα πολυμερή. Τα pH-αποκρινόμενα πολυμερή αποτελούνται από μια ρυθμιστική όξινη ή βασική ομάδα, που μπορεί ιονιζόμενη, είτε να αποδεχθεί ή να αποδώσει ένα πρωτόνιο, ως απάντηση στις αλλαγές του περιβαλλοντικού pH.

Πολυμερή με ένα μεγάλο αριθμό ιονίσιμων ομάδων είναι γνωστά ως πολυηλεκτρολύτες. Οι ιδιότητες των φορτισμένων πολυμερών απορρέουν από την ύπαρξη των αντισταθμικών ιόντων (δηλαδή ιόντα αντίθετου φορτίου), εντός των διαλυμάτων, καθώς και στα σταθερά φορτία επί της αλυσίδας. Κατά τη διάλυση ηλεκτρικά φορτισμένων μακρομορίων εντός πολικών διαλυτών, οι ιοντιζόμενες ομάδες τους δίστανται, δημιουργώντας φορτία στην πολυμερική αλυσίδα και αποδεσμεύοντας αντισταθμιστικά ιόντα στο διάλυμα.

Ανάλογα με την ισοδύναμη ποσότητα των αντισταθμικών ιόντων μικρού μοριακού βάρους, διακρίνονται σε ισχυρούς και σε ασθενείς πολυηλεκτρολύτες. Έχει αναφερθεί, ότι οι ασθενείς πολυηλεκτρολύτες συμπεριφέρονται διαφορετικά ανάλογα με το pH, ιδιότητα την οποία εκμεταλλευόμαστε για την παρασκευή pH-αποκρινόμενων πολυμερών. Έτσι, οι ασθενείς πολυηλεκτρολύτες ταξινομούνται σε δύο τύπους: ασθενή πολυ-οξέα/ πολυανιόντα και ασθενείς πολυ-βάσεις/ πολυκατιόντα. Ο ιονισμός της μακρομοριακής αλυσίδας, που φέρει ασθενείς βάσεις ή οξέα στη δομή της, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το pH του περιβάλλοντος. Όταν εντός των διαλυμάτων οι ομάδες που ιοντίζονται είναι θετικά φορτισμένες, το πολυμερές είναι πολύ-κατιόν, ενώ, όταν φέρουν αρνητικό φορτίο τότε πρόκειται για πολύ-ανιόν. Όταν το πολυμερές κατά τη διάλυσή του φέρει και θετικά και αρνητικά φορτία στο μακρομόριο του, τότε χαρακτηρίζεται ως πολύ-αμφολύτης. Βασικές ιδιότητες των υδατικών διαλυμάτων των πολυηλεκτρολυτών είναι η αγωγιμότητα, η οσμωτική πίεση και βέβαια το pH.

Δεδομένου ότι το pH του περιβάλλοντος μεταβάλλεται, η ρυθμιστική ιονίσιμη ομάδα ιονίζεται σε συγκεκριμένες τιμές pH, που ονομάζεται pKa. Αυτή η ταχεία αλλαγή στο καθαρό φορτίο της συνημμένης ομάδας προκαλεί μεταβολή της μοριακής δομής της πολυμερικής αλυσίδας. Αυτή η μετάβαση στη διογκωμένη/εκτεταμένη (swelling) κατάσταση διαμεσολαβείται από την οσμωτική πίεση, που ασκείται από τα κινούμενα αντίθετα ιόντα, που εξουδετερώνονται από τα ιόντα του φορτίου του pH-αποκρινόμενου πολυμερούς. Όταν η ρυθμιστική ομάδα χάσει το φορτίο της, το πολυμερές επανέρχεται στην προηγούμενη κατάσταση, χάνοντας την εκτεταμένη

διαμόρφωσή του (shrinkage). Η απόκριση αυτή μεταβάλλει και τη διαλυτότητα του πολυμερούς στο διάλυμα.

Έχει αναπτυχθεί ποικιλία νανοσυστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων με βάση τα pH-αποκρινόμενα πολυμερή, όπως μικκύλια, πολυμεροσώματα, νανοσφαίρες, υδρογέλες, λιποσώματα και δενδριμερή, ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί εξίσου πολυανιόντα και πολυκατιόντα.

### ➤ Πολυανιόντα

Μεταξύ των πιο συχνά χρησιμοποιούμενων πολυανιόντων, είναι αυτά που περιέχουν καρβοξυλικές ομάδες όπως τα poly(acrylic acid) (PAA), poly(methacrylic acid) (PMAA), poly(ethylacrylic acid) (PEAA), poly(propylacrylic acid) (PPAA), poly(butylacrylic acid) (PBAA), poly(N-isopropylacrylamide) (NIPAM) και poly(glutamic acid) (PGA). Σε όξινες συνθήκες, αυτά τα πολυμερή είναι πρωτονιωμένα και κυρίως υδρόφοβα. Αντίθετα, αποπρωτονιώνονται σε ουδέτερο ή υψηλό pH και γίνονται υδρόφιλα.

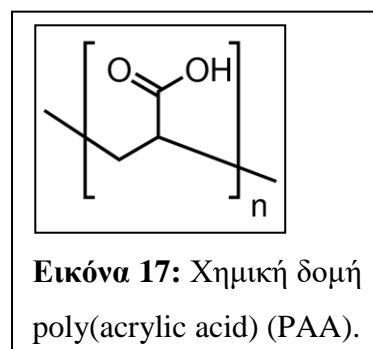
Ανιονικά πολυμερή, που μεταβαίνουν από αρνητικά φορτισμένα σε θετικά με την πτώση του pH, χαρακτηρίζονται ως charge-reversal copolymers. Τα πολυμερή αυτά μπορούν να βελτιώσουν την αποτελεσματικότητα της μεταφοράς φαρμάκων και γονιδίων με την ενίσχυση της ενδοσωμικής διαφυγής. Ένα παράδειγμα είναι το poly(allylamine hydrochloride)-citraconic anhydride (PAH-Cit).

Τα pH-αποκρινόμενα πολυμερή, που περιέχουν μια ομάδα σουλφοναμίδης, είναι ένα άλλο παράδειγμα πολυανιόντων. Αυτά τα πολυμερή παρουσιάζουν τιμές pKa 3-11 και το άτομο υδρογόνου του αμιδικού αζώτου ιονίζεται άμεσα για να σχηματίσει πολυ-οξέα. Η συμπεριφορά του μπορεί να ελεγχθεί σε ένα στενότερο εύρος pH από ότι των πολυμερών με καρβοξυλομάδες, καθιστώντας τα πιο ευαίσθητα.

#### Παράγωγα πολυακρυλικού οξέος poly(acrylic acid)

##### (PAA)

Το πολύ(ακρυλικό οξύ) (poly(acrylic acid) (PAA) (**Εικόνα 17**) λειτουργεί ως ένας ασθενής ανιονικός πολύ-ηλεκτρολύτης/ πολυ-οξύ και είναι ένα τυπικό παράδειγμα pH-αποκρινόμενου πολυμερούς. Το PAA και τα παράγωγά του, περιέχουν μια καρβοξυλική ομάδα (-COOH) και αποδίδουν το υδρογονοκατιόν τους (ιονίζονται) σε ουδέτερο ή

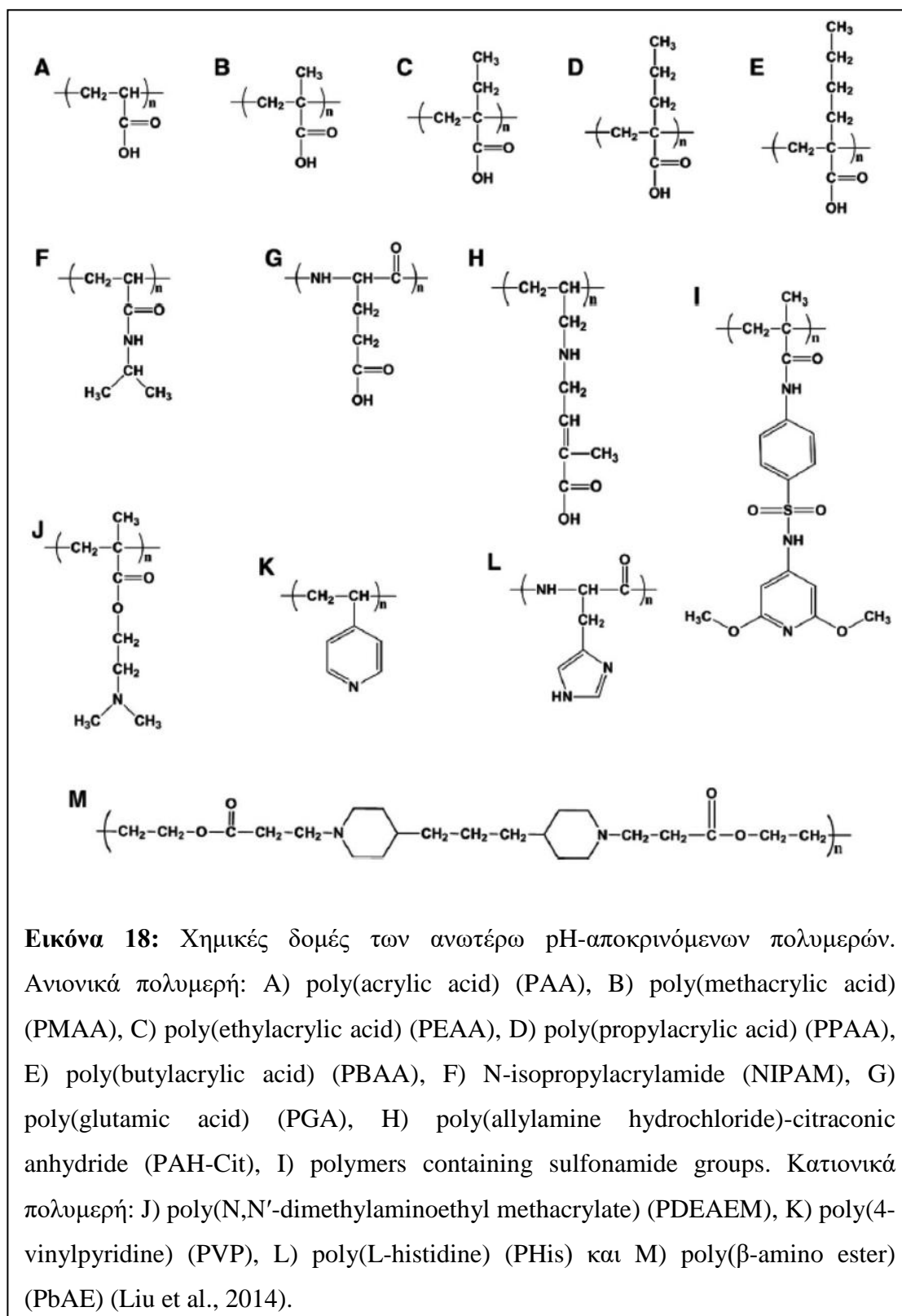


βασικό pH ( $pK_a \sim 4-5$ ), αποκτώντας αρνητικό φορτίο, οδηγώντας σε διόγκωση, λόγω της αυξημένης πυκνότητας φορτίου στο πολυμερές, ενώ αντίθετα πρωτονιώνονται σε όξινο μειώνοντας τον όγκο τους. Στενό εύρος pH και καλή ευαισθησία είναι τα κύρια πλεονεκτήματα των πολυμερών, που βασίζονται πάνω στην ομάδα του καρβοξυλικού οξέος. Συγκεκριμένα, σε  $pH=10$  το μεγαλύτερο μέρος των καρβοξυλικών ομάδων του PAA αποπρωτονιώνονται και οι πολυμερικές αλυσίδες του PAA είναι υδρόφιλες, σε pH κοντά στο  $pK_a$  του οξέος είναι μερικώς ιονισμένες, ενώ σε  $pH=2.5$  όλες οι καρβοξυλικές ομάδες πρωτονιώνονται, εξουδετερώνοντας το φορτίο στο μακρομόριο. Παράλληλα, όταν το πολυμερές είναι ουδέτερο, οι πολυμερικές του αλυσίδες εμφανίζουν υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, με αποτέλεσμα το πολυμερές να γίνεται πιο υδρόφοβο.

### ➤ Πολυκατιόντα

Τα pH-αποκρινόμενα κατιονικά πολυμερή έχουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα ανιονικά, όπως το θετικό επιφανειακό φορτίο, που ενισχύει την κυτταρική πρόσληψη. Σε υψηλό pH, τα πολυκατιόντα είναι ουδέτερα, αλλά αποκτούν θετικό φορτίο, καθώς το pH μειώνεται. Η πιο συνηθισμένη ρυθμιστική τους ομάδα είναι η αμινομάδα, όπως επίσης οι χημικές ομάδες πυριδίνη και ιμιδαζόλιο. Το τριτοταγές άτομο αζώτου της αμινομάδας παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην pH-απόκριση των κατιονικών πολυμερών. Σημαντικοί εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής είναι τα poly(N,N'-diethylaminoethyl methacrylate), poly(vinyl pyridine) (PVP), poly-L-lysine (PLL), poly(amidoamine) (PAMAM), polyethylenimine (PEI), το poly(N,N'-dimethylaminoethyl methacrylate) (PDMAEMA), poly(L-histidine) (PHis), poly( $\beta$ -amino ester) (PbAE), καθώς και βιοαποικοδομήσιμοι πολυσακχαρίτες, όπως η χιτοσάνη.

Αυτή η κατηγορία πολυμερών υποβάλλεται σε μια υδρόφοβη προς υδρόφιλη μετάπτωση φάσης, καθώς το pH τείνει στο όξινο, και μπορούν έτσι ταχέως να διαλυτοποιηθούν σε τιμές pH μικρότερες από το  $pK_a$  τους. Ως εκ τούτου, στο όξινο μικροπεριβάλλον του όγκου, οι δομές των πολυμερών αυτών διαλύονται γρήγορα με μια ταυτόχρονη αποδέσμευση των περιεχομένων τους. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει, ότι χαρακτηρίζονται από μη-κυτταροτοξικότητα και αυξημένη αποτελεσματικότητα μεταφοράς γονιδίων και φαρμακομορίων (Zhao et al., 2011; Liu et al., 2014; Honey et al., 2014; Liu et al., 2017).



#### **1.4 advanced Drug Delivery nanosystems (aDDnSs)**

Στην ειδική αυτή κατηγορία ανήκουν νανοσυστήματα συμπεριλαμβανομένων και των λιποσωμάτων, τα οποία αφ' ενός χαρακτηρίζονται από ρυθμιστική ελεγχόμενη αποδέσμευση του περιεχομένου (modulatory controlled release), αφ' ετέρου από μίξη περισσότερων του ενός νανοσυστημάτων (advanced  $\neq$  conventional όπου δεν υπάρχει μίξη). Περαιτέρω ταξινόμηση γίνεται με βάση τη φύση των βιο-υλικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρασκευή των aDDnSs. Εάν η φύση είναι ίδια για όλα τα υλικά χαρακτηρίζονται υβριδικά, εάν όμως είναι διαφορετική, όπως π.χ. λιπίδια και πολυμερή, χαρακτηρίζονται χημικακά (Demetzos et al., 2014). Μια κατηγορία χημικακών λιποσωμάτων πρόκειται να μελετήσουμε και στη συνέχεια, αυτή των pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων (pH-sensitive liposomes).

#### **1.5 pH-ευαίσθητα λιποσώματα (pH-sensitive liposomes)**

##### **1.5.1 Γενικά**

Παρά την πληθώρα πλεονεκτημάτων που αναφέρθησαν, τα κλασσικά λιποσώματα εξακολουθούν να παρουσιάζουν σημαντικά μειονεκτήματα, όπως η γρήγορη αναγνώριση από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα (RES), που μειώνει το χρόνο ημιζωής στο πλάσμα, όπως επίσης και η αποδόμηση από τα λυσοσωμικά ένζυμα κατά την ενδοκύττωση τους. Τα φαινόμενα αυτά, μειώνουν την ποσότητα του βιοδραστικού μορίου, που λαμβάνεται τελικώς από το κύτταρο και ως εκ τούτου τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα του μορίου. Κατά τη διάρκεια των προσπαθειών για την επίλυση των προβλημάτων αυτών, έχουν αναπτυχθεί πολλές μορφές λιποσωμάτων, που αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα (stimuli sensitive liposomes), ανάμεσα σε αυτές και τα pH-ευαίσθητα λιποσώματα (pH-sensitive liposomes), αντιπροσωπεύοντας μια πολλά υποσχόμενη και ελκυστική κατηγορία λιποσωμάτων. Τα pH-ευαίσθητα λιποσώματα είναι σταθερά υπό φυσιολογικό pH, αλλά αποκτούν συντηκογόνες ιδιότητες (fusogenic) υπό τις συγκεκριμένες τιμές pH του εκάστοτε ιστού στόχου, οδηγώντας έτσι στην αποτελεσματική αποδέσμευση του περιεχομένου τους απευθείας στο κυτταρόπλασμα. Ως εκ τούτου, επιτυγχάνεται ένα υψηλό ποσοστό βιοδραστικού μορίου π.χ. φαρμακομορίου, τοπικά στη θέση του στόχου, λόγω της ελεγχόμενης αυτής αποδέσμευσης. Επίσης, εισέρχονται στο κύτταρο κυρίως μέσω ενός ενδοκυτταρικού μονοπατιού, αποσταθεροποιούνται στο χαμηλό pH του ενδοσώματος και ως εκ τούτου, τα φαρμακομόρια μπορούν εύκολα

να αποδεσμεύονται στο κυτταρόπλασμα ή ενεργώς στοχευόμενα σε βλάβες. Ακόμα, το περιεχόμενο τους μπορεί να διαφύγει αποτελεσματικά της λυσοσωμικής παγίδευσης και αποδόμησης (Liu et al., 2013).

### 1.5.2 Μορφοποίηση pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων

#### ➤ Συνδυασμός πολυμορφικών λιπιδίων

Το τυπικό πολυμορφικό (polymorphic) λιπίδιο, που χρησιμοποιείται για την παρασκευή pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων, είναι η ακόρεστη φωσφατιδυλοαιθаноλαμίνη

(unsaturated

phosphatidylethanolamine, PE) και τα παράγωγά της, όπως η διακετυλενική-φωσφατιδυλ-αιθanolαμίνη (diacetylenic-phosphatidyl-

ethanolamine, DAPE), η παλμιτοϋλο-

ελαϋλο-φωσφατιδυλο-αιθanolαμίνη (palmitoyl-oleoyl-phosphatidyl-ethanolamine,

POPE) και η διελαοϋλ-φωσφατιδυλ-αιθanolαμίνη (dioleoyl-phosphatidyl-

ethanolamine, DOPE). Η DOPE συνδυάζεται συνήθως με ήπια όξινες αμφίφιλες

ενώσεις, που δρουν ως σταθεροποιητές σε ουδέτερο pH, όπως το ελαϊκό οξύ (oleic

acid, OA), το χοληστερυλ-ημιλεκτρικό (cholesteryl hemisuccinate, CHEMS)

(**Εικόνα 19**) και η παλμιτοϋλ-ομοκυστεΐνη (palmitoyl homocysteine, PHC), προς

δημιουργία pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων. Η καρβοξυλομάδα τους πρωτονιώνεται σε

όξινο περιβάλλον, όπως το pH του αυλού του ενδοσώματος ή του λυσοσώματος. Η

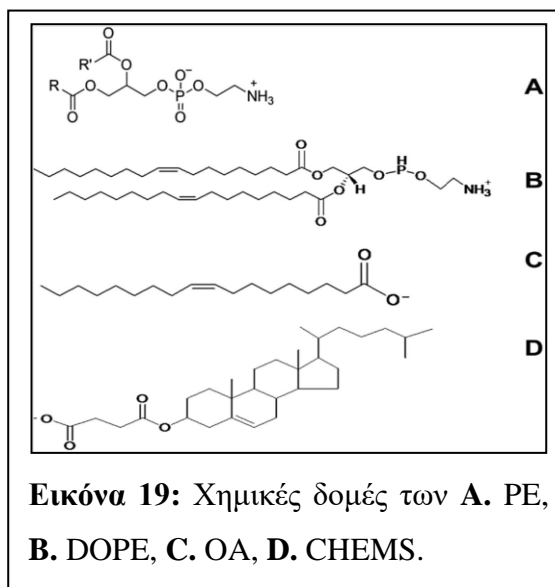
τρισιδιάστατη διαμόρφωση των υδρόφιλων ομάδων μεταβάλλεται, με αποτέλεσμα την

αποσταθεροποίηση της μεμβράνης του pH-ευαίσθητου λιποσώματος. Για

παράδειγμα, το λιπίδιο DOPE σε όξινο περιβάλλον μεταβαίνει σε εξαγωνική II φάση

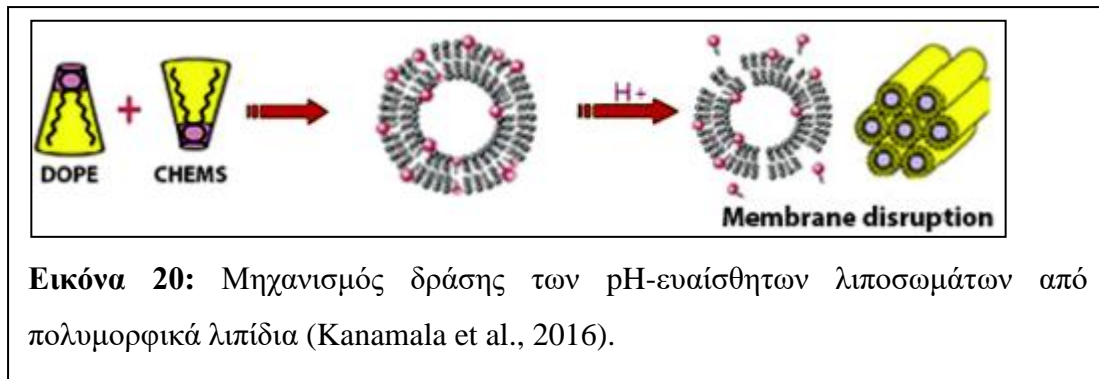
και το λιπόσωμα χάνει τη σφαιρική δομή του (**Εικόνα 20**). Στη συνέχεια, τα

έγκλειστα βιοδραστικά μόρια αποδεσμεύονται στο κυτταρόπλασμα.



**Εικόνα 19:** Χημικές δομές των **A.** PE, **B.** DOPE, **C.** OA, **D.** CHEMS.





➤ **Χρήση “cage” λιπιδικών αναλόγων (“cage” lipid derivatives)**

Το μεγαλύτερο μέρος αυτού του είδους των λιποσωμάτων περιλαμβάνει τα παράγωγα των PE ή δακτυλιοειδών λιπιδικών συνθέσεων με αλκυλ-αιθέρα όπως N-κιτρακόνυλ-διελαυλ-φωσφατίδυλ-αιθανολαμίνη (N-citraconyl-dioleoyl-phosphatidylethanolamine, C-DOPE) και N-κιτρακονυλ-διολεοϋλ-φωσφατιδυλοσερίνη (N-citraconyl-dioleoyl-phosphatidylserine, C-DOPS). Τα λιποσώματα, που περιέχουν τέτοιες συνθέσεις, μπορούν να παρουσιάζουν αναστρέψιμο την ικανότητα, να σχηματίζουν μη διπλοστοιβαδική φάση, απλά με το φαρμακομόριο να διαπερνά τις μεμβράνες ή να συντήκεται με αυτές. Επίσης, η πολυ(αιθυλένο-γλυκόλη)-N-διστεαρυλφωσφατιδυλ-αιθανολαμίνη (poly(ethylene-glycol)-N-distearolyphosphatidylethanolamine, PEG-DSPE) αποτελεί ένα νέο πιθανό λιπιδικό ανάλογο. Η προσθήκη της PEG στην επιφάνεια των λιποσωμάτων μείωσε την πρόσληψη από το RES και ταυτόχρονα παρέτεινε το χρόνο ζωής των λιποσωμάτων στο κυκλοφορικό σύστημα.

➤ **Χρήση συνθετικών συντηκογόνων πεπτιδίων/πρωτεϊνών**

Εισάγοντας pH-ευαίσθητα συντηκογόνα πεπτίδια/πρωτεΐνες, όπως το GALA, το N-τελικό άκρο της αιμαγλουτινίνης (πεπτίδιο INF) ή τη λιστεριολυσίνη O στα φωσφολιπίδια, δημιουργήθηκε ένα είδος νέων pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων. Το πεπτίδιο ή η πρωτεΐνη είναι ανενεργά, όταν τα λιποσώματα είναι στο ουδέτερο περιβάλλον. Αντίθετα, στο όξινο περιβάλλον, η διαμόρφωση του συντηκογόνου πεπτιδίου/πρωτεΐνης αλλάζει και προωθεί τη σύντηξη μεταξύ λιποσωμικής μεμβράνης και μεμβράνης κυττάρου. Με αυτό τον τρόπο, γίνεται η αποδέσμευση του περιεχομένου. Το GALA είναι ένα συνθετικό πεπτίδιο αποτελούμενο από 30 αμινοξέα, με μια επαναλαμβανόμενη μονάδα από γλουταμινικό οξύ-αλανίνη-λευκίνη-

αλανίνη (EALA). Η EALA υφίσταται μια εξαρτώμενη από το pH διαμορφωτική αλλαγή (coil to globule) και επάγει τη διαρροή του περιεχομένου σε όξινο pH.

#### ➤ Χρήση pH-αποκρινόμενων πολυμερών

Η ενσωμάτωση των pH-αποκρινόμενων πολυμερών, που αναφέρθηκαν παραπάνω, στα λιποσώματα, μας παρέχει χημικά pH-ευαίσθητα συστήματα. Συνήθως, χρησιμοποιούνται συμπολυμερή των πολυ(αλκυλ ακρυλικού οξέος) [poly (alkyl acrylic acid), PAA], succinylated PEG, και N-ισοπροπυλακρυλαμιδίου (NIPAM). Όπως αναφέρθηκε, τα πολυμερή αυτά έχουν τη μοναδική ικανότητα να αποκρίνονται στις αλλαγές του περιβαλλοντικού pH, μεταβάλλοντας τη φύση τους από stealth-like υδρόφιλη σε υδρόφοβη, που εν τέλει προκαλεί αποσταθεροποίηση της μεμβράνης. Ακόμα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί συνδυασμός των παραπάνω υλικών, όπως η χρήση pH- αποκρινόμενων πολυμερών σε λιποσώματα αποτελούμενα από το λιπίδιο DOPE. Στο παράδειγμα αυτό, το πολυμερές σε φυσιολογικές συνθήκες αλληλεπιδρά με το λιπίδιο, δημιουργώντας κυστίδια, ενώ αντίθετα σε όξινο περιβάλλον αφήνει το λιπίδιο να μεταβεί στην εξαγωνική του φάση, με αποτέλεσμα τη διαρροή περιεχομένου. Η χρήση του DOPE ενισχύει επίσης τη συντηκγόνο δράση του πολυμερούς (Drummod et al., 2000; Simoes et al., 2004; Ganta et al., 2008; Lin et al., 2010; Liu et al., 2013).

### **1.5.3 Μηχανισμός δράσης pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων με ενσωματωμένα pH-αποκρινόμενα πολυμερή**

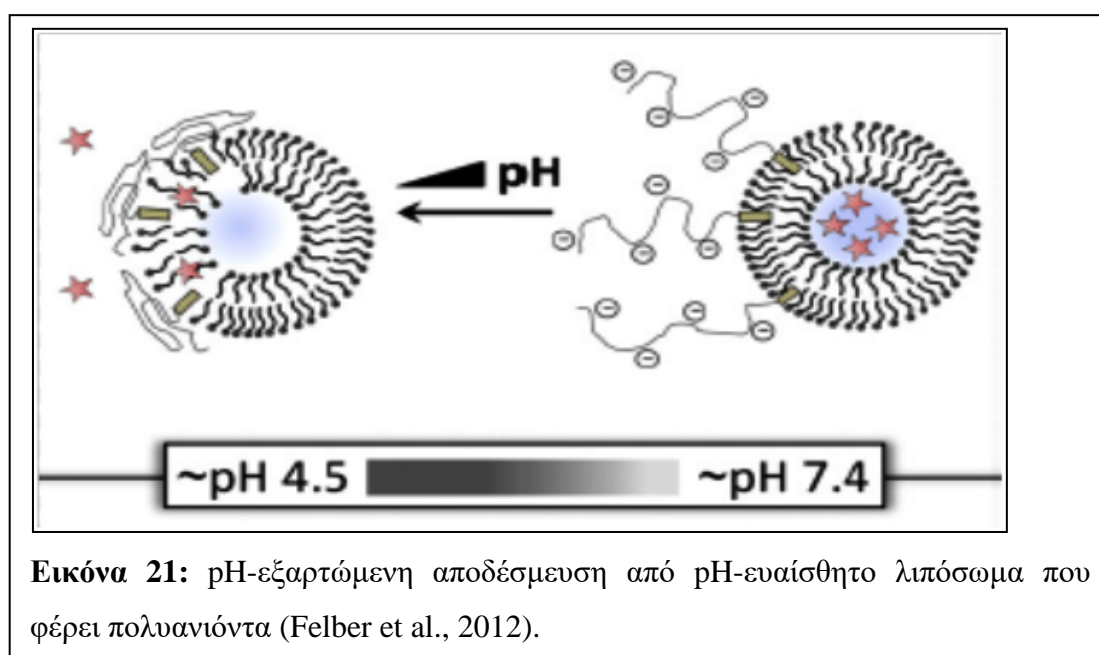
#### **1.5.3.1 Πολυανιόντα**

Η ενσωμάτωση πολυανιόντων στα λιποσώματα προκαλεί αποδέσμευση περιεχομένου σε όξινο περιβάλλον. Τυπικοί εκπρόσωποι της κατηγορίας είναι το πολυ(αλκυλ ακρυλικό οξύ) [poly (alkyl acrylic acid), PAA] και το πολυ(N-ισοπροπυλακρυλαμίδιο) [Poly(N-isopropylacrylamide), PNIPAM].

#### ➤ **pH-ευαίσθητα λιποσώματα με ενσωματωμένα παράγωγα του πολυ(αλκυλ ακρυλικού οξέος) (PAA)**

Ένα μεγάλο μέρος της βιβλιογραφίας αναφέρεται σε pH-ευαίσθητα λιποσώματα με ενσωματωμένα pH-αποκρινόμενα πολυμερή, που φέρουν αρνητικό φορτίο σε

φυσιολογικό pH. Ας εξετάσουμε ένα τυπικό παράδειγμα pH-ευαίσθητου λιποσώματος με ενσωματωμένο ένα pH-αποκρινόμενο πολυμερές, που περιέχει την ομάδα του καρβοξυλικού οξέος (-COOH), όπως το πολυ-ακρυλικό οξύ (PAA). Το πολυμερές μπορεί να ιονίζεται σε ουδέτερο και βασικό διάλυμα, οπότε παράγονται ομάδες  $\text{-COO}^-$ , που προσροφώνται ηλεκτροστατικά στα συμβατικά λιποσώματα, προς δημιουργία pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων. Το φορτίο, που φέρουν οι ιονισμένες καρβοξυλομάδες  $\text{-COO}^-$ , προκαλεί ηλεκτροστατική απώθηση και αποτρέπει τα λιποσώματα από τη σύντηξη μεταξύ τους, με τελικό αποτέλεσμα να παραμένουν σταθερά στο φυσιολογικό pH~7.4 του οργανισμού. Όταν όμως το pH μειώνεται κοντά στο pKa, οι  $\text{-COO}^-$  μετατρέπονται σε COOH (πρωτονίωση) και η ηλεκτροστατική απώθηση εξαφανίζεται. Η πολυμερική αλυσίδα συρρικνώνεται και η λιποσωματική διπλοστοιβάδα διαρρηγνύεται, οδηγώντας τελικά σε αποδέσμευση του περιεχομένου (Εικόνα 21).

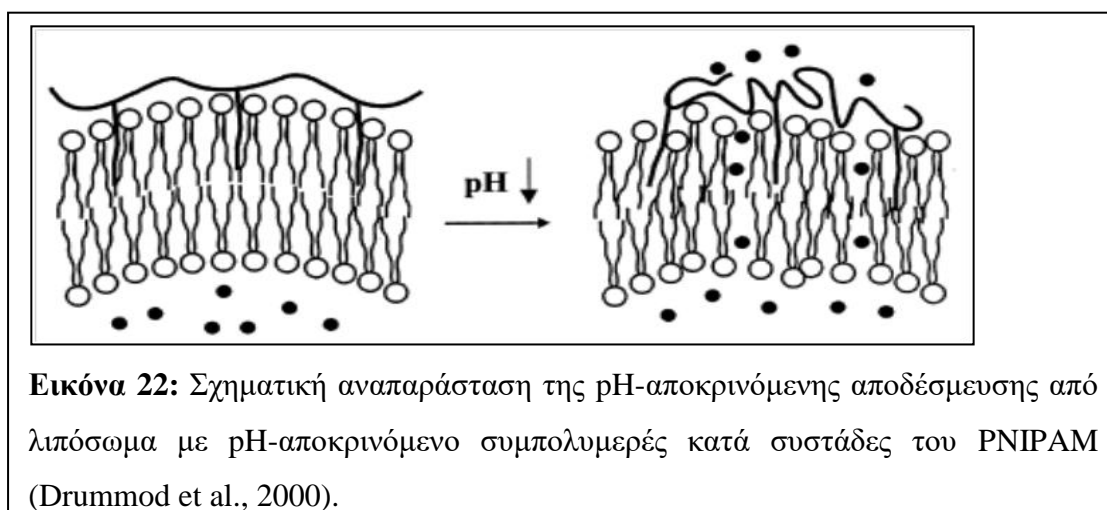


Συγκεκριμένα, τα υδρόφοβα πλέον τμήματα του πολυμερούς διεισδύουν εντός της λιπιδικής διπλοστοιβάδας, προκαλούν ελαττώματα στη μεμβράνη αποσταθεροποιώντας την. Ακολούθως, η εισαγωγή των υδρόφοβων τμημάτων στα γειτονικά λιποσώματα και/ή στο ενδόσωμα μπορεί να οδηγήσει σε στενή επαφή των κυστιδίων, δημιουργώντας μια τοπική αφυδάτωση στο σημείο επαφής, προκαλώντας επίσης ελαττώματα στον τρόπο πακεταρίσματος της μεμβράνης και τελικώς σύντηξη. Εν αντιθέσει, σε περιβάλλον κοντά στις φυσιολογικές τιμές pH~7.4, όπου η πολυμερική αλυσίδα διαθέτει εκτεταμένη μορφή, επικρατεί η άπωση που

περιγράψαμε πριν. Η έκταση των προσροφημένων στο λιπόσωμα πολυμερικών αλυσίδων προς το περιβάλλον διατηρεί την σταθερότητα και άρα την ακεραιότητα του pH-ευαίσθητου λιποσώματος, με αποτέλεσμα την αποκλειστική αποδέσμευση του περιεχομένου σε όξινο pH (ακριβώς στους παθολογικούς ιστούς) και όχι σε ουδέτερο προς βασικό pH (δηλαδή στο φυσιολογικό ιστό), αποτρέποντας την εμφάνιση παράπλευρων ανεπιθύμητων ενεργειών.

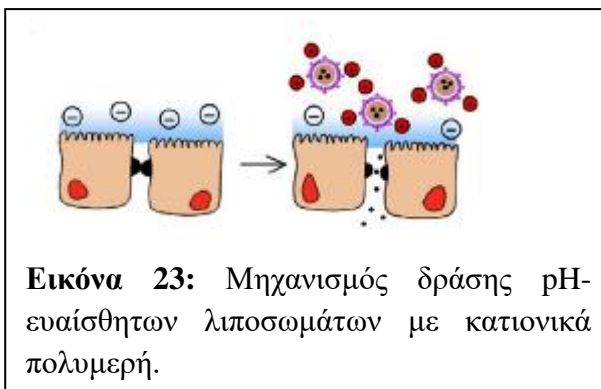
➤ **pH-ευαίσθητα λιποσώματα με ενσωματωμένα παράγωγα του πολυ-N-ισοπροπυλακρυλαμιδίου (PNIPAM)**

Η ομάδα PNIPAM ανήκει στα θερμοαποκρινόμενα πολυμερή, δηλαδή σε αυτά που ανταποκρίνονται στην αλλαγή της θερμοκρασίας, μεταβάλλοντας τη φύση τους από υδρόφιλη σε υδρόφοβη πάνω από μια χαρακτηριστική θερμοκρασία, την LCST. Για το PNIPAM συγκεκριμένα ορίζεται  $LCST=32^{\circ}C$ . Σε  $T < LCST$  οι αλυσίδες του πολυμερούς έχουν υδρόφιλες ιδιότητες, υψηλό βαθμό ενυδάτωσης και άρα εκτεταμένη μορφή, ενώ αντίθετα σε  $T > LCST$  οι πολυμερικές αλυσίδες γίνονται υδρόφοβες, αφυδατώνονται και συσπειρώνονται. Την ιδιότητα αυτή εκμεταλλευόμαστε για την εξωτερική καθοδήγηση των λιποσωμάτων μέσω της ρύθμισης της θερμοκρασίας. Εκτός από τη θερμοαπόκριση, το PNIPAM μπορεί να αποκτήσει και ιδιότητες pH-ευαισθησίας, μέσω της προσθήκης ενός ιονίσιμου μονομερούς [δημιουργία συμπολυμερούς κατά συστάδες του τροποποιημένου poly(PNIPAM)]. Παράδειγμα αποτελεί το συμπολυμερές κατά συστάδες PNIPAM, με MAA (pH-ευαίσθητο τμήμα) και octadecylacrylate (ODA) (υδρόφοβο τμήμα/ anchor) (Εικόνα 22) (Fujiwara 1996; Drummod et al., 2000; Felber et al., 2012; Lin et al., 2010; Wanga et al., 2014; Kanamala et al., 2016).



### 1.5.3.2 Πολυκατιόντα

Σε υψηλό pH, τα πολυκατιόντα είναι ουδέτερα, αλλά αποκτούν θετικό φορτίο καθώς το pH μειώνεται. Το θετικό φορτίο, που αποκτούν με τον ιονισμό τους, τα καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμα για τη σύμπλεξη και μεταφορά αρνητικά φορτισμένων βιοδραστικών μορίων,



**Εικόνα 23:** Μηχανισμός δράσης pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων με κατιονικά πολυμερή.

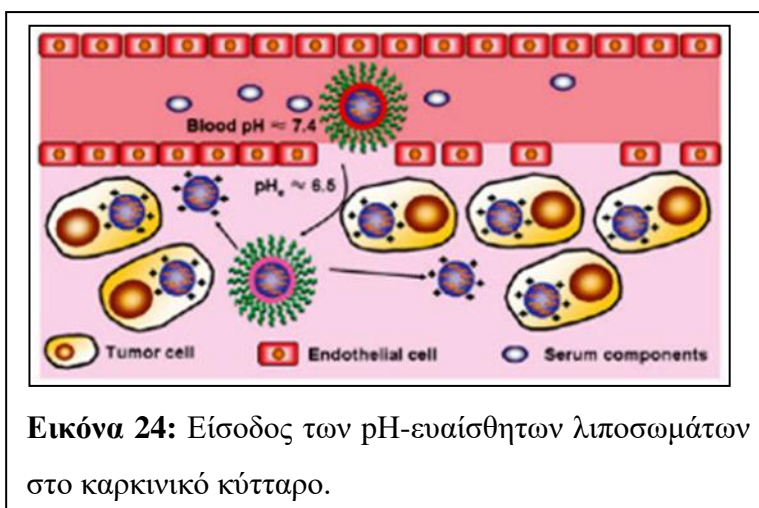
όπως DNA, RNA και πρωτεΐνες. Η χρήση τους συνιστάται κυρίως, όταν είναι επιθυμητή η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση των λιποσωμάτων με αρνητικά φορτισμένες κυτταρικές μεμβράνες. Συγκεκριμένα, το ιονισμένο πολυμερές μπορεί να αλληλεπιδράσει με αρνητικά φορτισμένες μεμβράνες, διαταράσσοντας έτσι το πακετάρισμα των λιπιδίων, προάγοντας τη συσσωμάτωση και τη σύντηξη των λιποσωμάτων (**Εικόνα 23**). Η έκταση και το pH της σύντηξης εξαρτώνται κυρίως από το pKa του πολυμερούς. Πολυμερή με υψηλότερα pKa προάγουν σύντηξη σε υψηλότερο pH από τα πολυμερή με χαμηλότερο pKa. Βασικό πλεονέκτημά τους αποτελεί η δυνατότητα διαφυγής από το ενδόσωμα και τα λυσοσώματα. Γι αυτό, η βιβλιογραφία αναφέρει τη χρήση των παραπάνω πολυκατιόντων για την παρασκευή pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων, με σκοπό την κυτταροπλασματική μεταφορά γονιδίων και φαρμακομορίων με αποδεκτή κυτταροτοξικότητα. Τα πολυκατιόντα εμφανίζουν ισχυρές συντηκογόνες και ενδο-ωσμωλυτικές ιδιότητες, καθώς και αυξημένη κυτταροτοξικότητα, γεγονός που εκμεταλλευόμαστε στη λιποσωματική θεραπεία του καρκίνου. Το θετικό φορτίο δε, που φέρουν στην επιφάνεια τους, ενισχύει την πρόσληψη τους από τα κύτταρα (Fujiwara 1996; Drummod et al., 2000; Felber et al., 2012; Lin et al., 2010; Wanga et al., 2014; Kanamala et al., 2016; Kim et al., 2016).

### 1.5.4 Αλληλεπίδραση των pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων με τον οργανισμό

#### 1.5.4.1 Παθολογικοί ιστοί

Υπάρχουν πολλές παθολογικές καταστάσεις, που συνδέονται με μεταβολές του pH σε σχέση με το φυσιολογικό ιστό, όπως ισχαιμία, λοίμωξη, φλεγμονή και καρκινικοί όγκοι. Συγκεκριμένα, στους καρκινικούς ιστούς η τιμή του pH μειώνεται έως και στο 5.7. Η αγγείωση του όγκου είναι αποδιοργανωμένη και δεν μπορεί να ικανοποιήσει

τις ανάγκες του αυξημένου πληθυσμού κυττάρων σε οξυγόνο. Συνεπώς, παρατηρείται υποξεία, παραγωγή γαλακτικού οξέος, υδρόλυση του ATP και αύξηση του ρυθμού γλυκόλυσης με συνολική αύξηση των

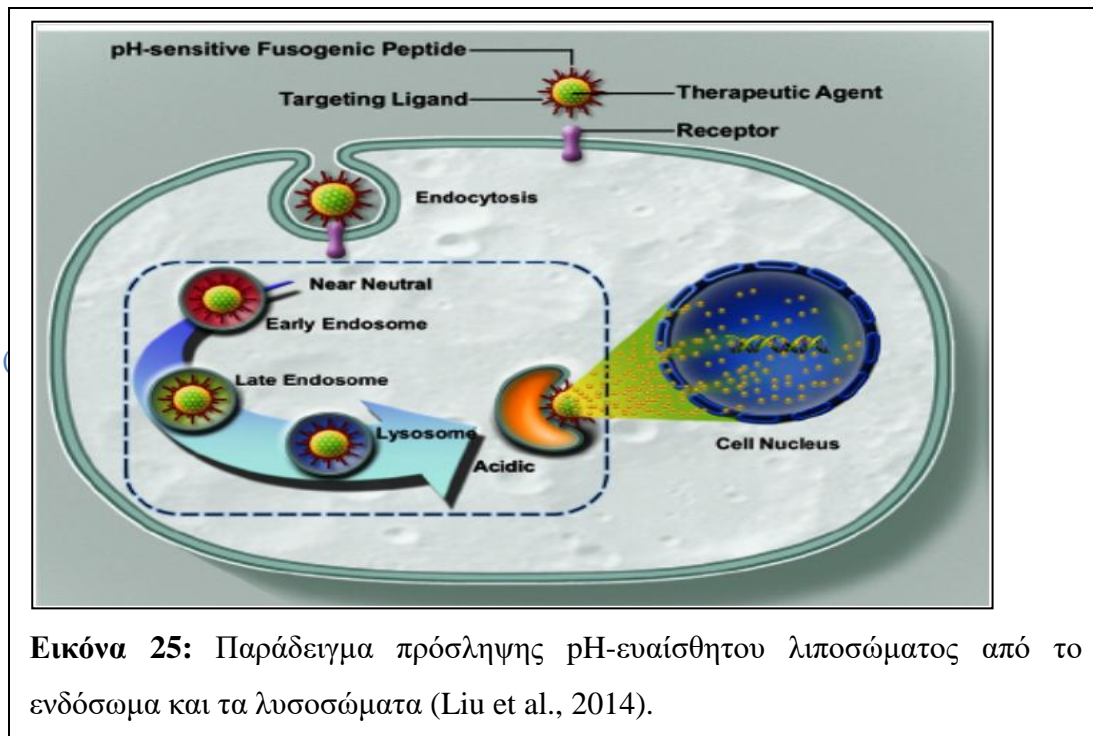


**Εικόνα 24:** Είσοδος των pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων στο καρκινικό κύτταρο.

πρωτονίων. Επίσης, η ελαττωμένη λεμφική παροχέτευση του καρκινικού ιστού, που προκαλεί ελαττωμένη απέκκριση των πρωτονίων, συντελεί στην ανάπτυξη όξινου μικροπεριβάλλοντος (**Εικόνα 24**) (Felber et al., 2012; Pang et al., 2016).

#### **1.5.4.2 Ενδοκυττάριο περιβάλλον**

Ακόμα μεγαλύτερες μεταβολές pH μπορούν να εντοπιστούν σε κυτταρικό επίπεδο μεταξύ εξωκυτταρικού περιβάλλοντος (pH 7.4) και ενδοκυτταρικών διαμερισμάτων, όπως τα ενδοσώματα και τα λυσοσώματα (pH 4.5–6.5). Το δυναμικό του pH αυτό είναι ιδιαίτερης σημασίας, καθώς πολλά φαρμακομόρια και μεταφορείς φαρμακομορίων λαμβάνονται μέσω ενδοκυττάρωσης και εγκλωβίζονται εντός των ενδοσωμάτων και τα λυσοσωμάτων. Η ενδοκυττάρωση είναι μια διαδικασία, με την οποία τα κύτταρα εσωτερικεύουν τα μακρομόρια εντός της μεμβράνης μέσω εγκόλπωσης. Ανάλογα με την ακριβή διαδρομή της εισόδου και των πρωτεϊνών που εμπλέκονται, το υλικό που εσωτερικεύεται θα έχει διαφορετική κατάληξη. Μετά την ενδοκυττάρωση, το υλικό διακινείται στα λυσοσώματα, τα διαμερίσματα όπου γίνεται η τελική αποδόμησή του. Τα λυσοσώματα δεν διατηρούν μόνο εσωτερικό όξινο pH (pH 4.5-5.0), αλλά επίσης περιέχουν και ένα μεγάλο αριθμό υδρολυτικών ενζύμων (π.χ. νουκλεάσες, πρωτεάσες, φωσφολιπάσες, εστεράσες, και γλυκοσιδάσες) για την αποικοδόμηση του παγιδευμένου μορίου. Επομένως, η ανάπτυξη συστημάτων που αξιοποιούν το όξινο pH των ενδοσωμάτων και τα λυσοσωμάτων, συντελεί στην στοχευμένη αποδέσμευση φαρμακομορίων στο κυτοσόλιο και επομένως στο κυτταρόπλασμα, ειδικά όταν η κυτοσολική αποδέσμευση είναι απαραίτητη (**Εικόνα 25**).



**Εικόνα 25:** Παράδειγμα πρόσληψης pH-ευαίσθητου λιποσώματος από το ενδόσωμα και τα λυσοσώματα (Liu et al., 2014).

Ο ακριβής μηχανισμός διαφοροποιείται από το πολυμερές που χρησιμοποιείται, αφού κάποια πολυμερή αποσταθεροποιούν απλώς τη μεμβράνη (εκροή περιεχομένου στο ενδόσωμα) και άλλα πολυμερή παράλληλα προωθούν τη σύντηξη με τη μεμβράνη του ενδοσώματος/λυσοσώματος (εκροή περιεχομένου στο κυτοσόλιο) (Felber et al., 2012; Pang et al., 2016).

#### 1.5.4.3 Βιοκατανομή

Όπως γνωρίζουμε τα stealth λιποσώματα έχουν μεγάλο χρόνο κυκλοφορίας στο αίμα, λόγω της επιφανειακής τροποποίησης που υφίστανται από την προσθήκη πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) στην εξωτερική επιφάνειά τους. Οι ομάδες PEG εμφανίζουν υψηλή υδροφιλία και ευελιξία, εμποδίζουν την αλληλεπίδραση με τα στοιχεία του αίματος και άρα τις πρωτεΐνες και καταστέλλουν την αναγνώριση από τα κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος. Οι ομάδες PEG μπορούν να αντικατασταθούν και από άλλα συνθετικά πολυμερή με παρόμοια χαρακτηριστικά όπως poly(AAM), poly(vinyl pyrrolidone), poly(2-methyl-2-oxazoline) and poly(2-ethyl-2-oxazoline). Στα pH-ευαίσθητα λιποσώματα αντίστοιχα, το ρόλο αυτό μπορεί να παίξει το pH-ευαίσθητο πολυμερές που περιέχεται σε αυτά, ανάλογα το pH. Στο pH, όπου οι πολυμερικές αλυσίδες είναι ενυδατωμένες και εκτεταμένες, το λιπόσωμα μπορεί να διαφύγει του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος μέχρι να φθάσει στον στόχο του, όπου με τη μεταβολή του pH, οι πολυμερικές υδρόφοβες πλέον αλυσίδες

συσπειρώνονται, εκθέτοντας έτσι τη λιπιδική επιφάνεια του λιποσώματος και καθιστώντας εύκολη την αλληλεπίδρασή του με τα στοιχεία του αίματος, αλλά και με τα κύτταρα. Άρα η βιοκατανομή των λιποσωμάτων μπορεί να ελεγχθεί από το pH (Felber et al., 2012; Pang et al., 2016).

### **1.5.5 Εφαρμογές pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων**

Τα pH-ευαίσθητα λιποσώματα μπορούν να σχεδιαστούν κατάλληλα, ώστε να μεταφέρουν βιολογικά μακρομόρια, όπως φαρμακομόρια, ένζυμα, αντισώματα, ολιγονουκλεοτίδια, πλασμίδια, πρωτεΐνες και πεπτίδια εντός του κυτταροπλάσματος και προτού παραληφθούν από τα λιποσώματα, ώστε να εξασφαλισθεί η δράση των μορίων. Έτσι λοιπόν, ερευνάται η ανάπτυξη διαφόρων εφαρμογών των pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων, όπως η μεταφορά και στοχευμένη παράδοση πιθανών φαρμάκων (για τη θεραπεία του καρκίνου, πνευμονικών και μολυσματικών ασθενειών), η ανάπτυξη εμβολίων, η απεικόνιση (φορείς παραγόντων αντίθεσης), καθώς και η μεταφορά γονιδιακών παραγόντων για γονιδιακή θεραπεία (Liu et al., 2013).

#### **1.5.5.1 Μεταφορά φαρμακομορίων**

##### **➤ Αντικαρκινική θεραπεία**

Η συστηματική χημειοθεραπεία είναι σχεδόν αδύνατον να επιτύχει θεραπευτικά επίπεδα στους συμπαγείς όγκους, χωρίς να επηρεάσει τα υγιή όργανα και τους ιστούς. Αν και οι νανοφορείς με μέγεθος μικρότερο από 200 nm μπορούν να στοχεύουν παθητικά σε ιστό του όγκου, λόγω του φαινομένου ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης (EPR effect), τα μειονεκτήματα των συμβατικών νανοσυστημάτων είναι η γρήγορη απομάκρυνση από το αίμα και η πρόσληψη τους από τα κύτταρα του RES, κυρίως στο ήπαρ. Γι αυτό και η χρήση των pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων, που αποκρίνονται στο όξινο μικροπεριβάλλον των όγκων, έρχεται να διορθώσει τα μειονεκτήματα αυτά.

Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί η χρήση pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων, συντιθέμενα από το λιπίδιο DOPE, με επιπλέον στερική σταθεροποίηση με χρήση PEGs. Το αποτέλεσμα της σύνθεσης αυτής ήταν ο αυξημένος ενδοκυττάριος ρυθμός αποδέσμευσης δοξορουβικίνης, με συνέπεια τη βελτίωση της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας του λεμφώματος B. Επίσης, η φόρτωση σισπλατίνης σε



λιποσώματα από DOPE/CHEMS/DSPE-PEG, που χρησιμοποιήθηκε για το μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα είχε καλύτερα αποτελέσματα από το ελεύθερο φάρμακο, ειδικά σε κύτταρα που είχαν δείξει ανοχή στη σισπλατίνη (Carvalho et al., 2007).

Τροποποιημένα pH-ευαίσθητα λιποσώματα με μονοκλωνικά αντισώματα επίσης μπορούν να στοχεύσουν σε περιοχές με χαμηλό pH. Η θεραπευτική αποτελεσματικότητα pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων με εγκλωβισμένο αντικαρκινικό φαρμακομόριο μπορεί να αυξηθεί ακόμα πιο πολύ, με την προσθήκη μονοκλωνικών αντισωμάτων, που καθοδηγούν τα λιποσώματα στον κατάλληλο κυτταρικό υποδοχέα. Έχουν ήδη αναπτυχθεί pH-ευαίσθητα λιποσώματα γεμισταβίνης από DOPE και CHEMS, με αντίσωμα για τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR). Η δοκιμή σε όγκους ποντικών έδειξε ιδιαίτερα αυξημένη απόπτωση των καρκινικών κυττάρων και επιβράδυνση της αύξησης του όγκου (Kim et al., 2009). Έχουν αναφερθεί επίσης, pH-ευαίσθητα ανοσολιποσώματα με συμπολυμερές κατά συστάδες του PNIPAM και το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-CD33, που στοχεύουν σε κύτταρα λευχαιμίας (Simard et al., 2009). Τέλος, νουκλεϊκά οξέα, πλασμιδικό DNA ή ολιγονουκλεοτίδια μπορούν επίσης να φορτωθούν σε pH-ευαίσθητα λιποσώματα και να χρησιμοποιηθούν στη θεραπεία του καρκίνου.

#### ➤ Αντιμολυσματική θεραπεία

Η ενδοκυτταρική μόλυνση από βακτήρια παρουσιάζει δυσκολίες στο να διαχειριστεί κλινικά και συχνά η μόλυνση είναι ανθεκτική στη συμβατική χημειοθεραπευτική στρατηγική, λόγω της ελλιπούς διείσδυσης του φαρμάκου στα κύτταρα. Τα λιποσώματα έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς ενάντια των προαιρετικά και υποχρεωτικά ενδοκυτταρικών παθογόνων, στη θεραπεία των λοιμωδών νόσων, κυρίως αυτών με τάση να μολύνουν τα κύτταρα του μονοκυτταρικού φαγοκυτταρικού συστήματος (mononuclear phagocytic system, MPS), καθώς επίσης και σε μολύνσεις από ενδοκυτταρικά βακτήρια. Σε περίπτωση όμως, που η μόλυνση έγκειται εκτός του MPS, τα συμβατικά λιποσώματα έχουν μειωμένη αποτελεσματικότητα και πρέπει να περιοριστεί η πρόσληψη τους από τα κύτταρα αυτά.

Τα pH-ευαίσθητα λιποσώματα μπορούν όμως να ενεργοποιηθούν, για να αποδεσμεύσουν το περιεχόμενό τους και να συντηχθούν με τη βιομεμβράνη σε απόκριση του όξινου περιβάλλοντος των μολυσμένων από τη φλεγμονή ιστών. Έτσι, η στοχευμένη αποδέσμευση του φαρμακομορίου και η ταχεία συσσώρευση στα

όργανα-στόχους (ήπαρ και τον σπλήνα), καθιστά τα pH-ευαίσθητα λιποσώματα ιδανικά για την εφαρμογή αντιμυκητιακής, όπως επίσης και αντιβακτηριδιακής θεραπείας. Στη βιβλιογραφία, έχουν αναφερθεί pH-ευαίσθητα λιποσώματα με ενκαψυλιωμένη γενταμισίνη, από DOPE-N-succinyl-DOPE και DOPE-N-glutaryl-DOPE για τη θεραπεία μακροφάγων κύτταρων, μολυσμένων από βακτήρια. Το αποτέλεσμα ήταν η βελτίωση της θεραπείας από το αντιβιοτικό αυτό, που ελεύθερο δεν μπορεί να διαπεράσει τη μεμβράνη του κυττάρου. Ακόμα, αυξημένα θεραπευτικά αποτελέσματα έδειξαν pH-ευαίσθητα λιποσώματα νυστατίνης εναντίον του *Cryptococcus neoformans*, λόγω της αποδέσμευσης του μορίου στο χαμηλό pH του περιβάλλοντος των λυσοσωμάτων. Επίσης, φορείς από DOPE/DPPC/CHEMS με συντηκογόνες ιδιότητες, μπόρεσαν να αποδεσμεύσουν το περιεχόμενο τους (αντιβιοτικό μόριο), εντός των Gram(-) βακτηρίων, διαπερνώντας το φράγμα της εξωτερικής μεμβράνης (Nicolosi et al., 2010).

#### **1.5.5.2 Γονιδιακή θεραπεία**

Η γονιδιακή θεραπεία έχει αναδειχθεί ως μια νέα προσέγγιση για τη θεραπεία μιας ποικιλίας γενετικών και επίκτητων ασθενειών. Το κλειδί της επιτυχίας για οποιαδήποτε στρατηγική γονιδιακής θεραπείας είναι να σχεδιαστεί ένα σύστημα, που να είναι σε θέση να χρησιμεύσει ως ένα ασφαλές και αποτελεσματικό όχημα παράδοσης γονιδίων. Προς το παρόν, η κλινική εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας περιλαμβάνει συνήθως ικούς και μη-ικούς φορείς. Ο ικός φορέας έχει τη φυσική ικανότητα να μολύνει κύτταρα, αλλά υπάρχει πιθανός κίνδυνος δημιουργίας μόλυνσης με την ικανότητα αντιγραφής του ιού κατά τη διάρκεια της γονιδιακής μετα-μόλυνσης. Αντίθετα, ο μη-ικός φορέας δεν έχει ανοσογονικότητα και παρασκευάζεται εύκολα, έτσι ώστε να έχει υψηλότερη ασφάλεια *in vivo*. Γι αυτό και τα λιποσώματα και συνήθως τα κατιονικά, έχουν προταθεί ως μη ανοσογονικοί φορείς. Ωστόσο, οι μη-ικοί φορείς, όπως τα κατιονικά λιπίδια / λιποσώματα, παρουσιάζουν ορισμένα μειονεκτήματα, όπως η έλλειψη ειδικότητας και οι κυτταροτοξικές αντιδράσεις. Εκτός αυτού, οι αποδόσεις της μεταφοράς των γονιδίων με συμβατικά λιποσώματα είναι αρκετά χαμηλές. Αντίθετα, τα pH-ευαίσθητα λιποσώματα μπορούν να αποδεσμεύσουν το φορτωμένο σύστημα γονιδιακής έκφρασης ακριβώς στο κυτταρόπλασμα, πριν εισέλθουν στα λυσοσώματα.

Ιδιαίτερα τα κατιονικά pH-ευαίσθητα λιποσώματα, επειδή φέρουν θετικό φορτίο, μπορούν αποτελεσματικά να συμπλεχτούν με γονίδια. Για παράδειγμα, πλασμιδικό

DNA με κατιονικό επιφανειοδραστικό παράγοντα arginine-N-lauroyl amide dihydrochloride (ALA) δοκιμάστηκε να ενσωματωθεί σε κατιονικά pH-ευαίσθητα λιποσώματα από Chol, DOPE, CHEMS και DOTAP (dioleoyl trimethylammonio propane) με θετικά αποτελέσματα (Rosa et al., 2008). Προβλήματα σταθερότητας των ανωτέρω λιποσωμάτων μπορούν επίσης να διορθωθούν με στερική τροποποίηση, χρησιμοποιώντας PEGs.

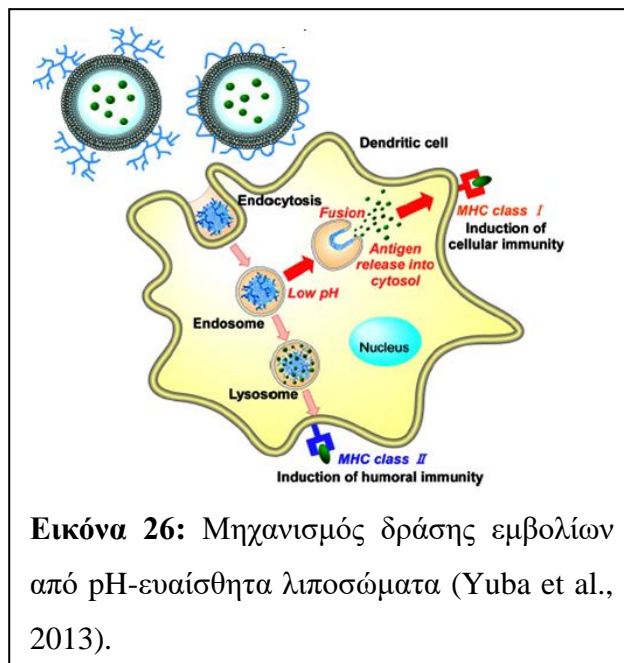
### **1.5.5.3 Ανάπτυξη εμβολίων**

Την ιδιότητα των λιποσωμάτων να αναγνωρίζονται γρήγορα από το ανοσοποιητικό σύστημα εκμεταλλευόμαστε για τη χρήση τους στην παρασκευή εμβολίων. Ωστόσο, η ενδοκύττωση, που υφίστανται ορισμένες φορές, προκαλεί αποικοδόμηση των βιοδραστικού περιεχομένου, πριν φθάσει στον στόχο του. Αντίθετα, τα pH-ευαίσθητα λιποσώματα μπορούν να ρυθμιστούν, ώστε να αποδεσμεύουν το περιεχόμενό τους στο κυτταρόπλασμα, πριν τα λιποσώματα και το αντιγόνο να μεταφέρεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, με αποτέλεσμα να έχουμε αυξημένη αποτελεσματικότητα. Η αλληλεπίδραση με τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (antigen presenting cells /APCs) παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη λιποσωματικών εμβολίων. Λιποσώματα, που παρουσιάζουν συντηχογόνες ιδιότητες με τις μεμβράνες των APCs (τα λεγόμενα συντηχογόνα λιποσώματα) αποδίδουν το περιεχόμενό τους στο κυτταρόπλασμα των APCs, γεγονός που πιθανόν ενισχύει τη συμμετοχή του συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης I και των Tc λεμφοκυττάρων. Έτσι, συστήματα, που αποτελούνται από κατιονικά λιπίδια ή λιπίδια με αποτελεσματική συντηχογόνο δράση (όπως π.χ. το DOPE, που έχει προταθεί για την ανάπτυξη pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων) εμφανίζουν δύο από τις σημαντικότερες ιδιότητες ενός λιποσωματικού εμβολίου, την αλληλεπίδραση με το φορτωμένο γενετικό υλικό και την ευκολία εισαγωγής του φορτίου στο στόχο (Perrie et al., 2016).

Τα pH-ευαίσθητα λιποσώματα έχουν χρησιμοποιηθεί ως φορείς βακτηρίων, ιών, πρωτόζωων, καρκινικών και άλλων αντιγόνων. Για παράδειγμα, έχουν παρασκευασθεί pH-ευαίσθητα λιποσώματα από λιπίδιο EPC και oleyl alcohol (OAlc), που φέρουν το καρβόξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης επιφανείας-1 του *Plasmodium falciparum*, αποδίδοντας άριστη ανοσογονική δράση, ενισχύοντας την αρχική του ελεύθερου αντιγόνου. Ακόμα, οι Yuba et co. παρασκεύασαν pH-ευαίσθητα λιποσώματα από παράγωγα poly (glycidol), όπως τα succinylated poly (glycidol) και 3-methylglutarylated poly (glycidol), που εισήγαγαν την αντιγονική

πρωτεΐνη ovalbumin (OVA) στο κυτταρόπλασμα των δενδριτικών κυττάρων (DCs) του ανοσοποιητικού συστήματος, επάγοντας ικανή αντιγονοπαρουσιαστική δράση μέσω του συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης I (Εικόνα 26) (Yuba et al., 2013).

Τα λιποσωμιακά εμβόλια, που φέρουν DNA, μπορούν να προκαλέσουν ανοσολογικές αποκρίσεις, διευκολύνοντας την πρόσληψη των πλασμιδίων από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται συγκεκριμένα, η ανάπτυξη αντικαρκινικού εμβολίου για την αποδέσμευση siRNA στα δενδριτικά κύτταρα του μυελού των οστών, από pH-ευαίσθητα

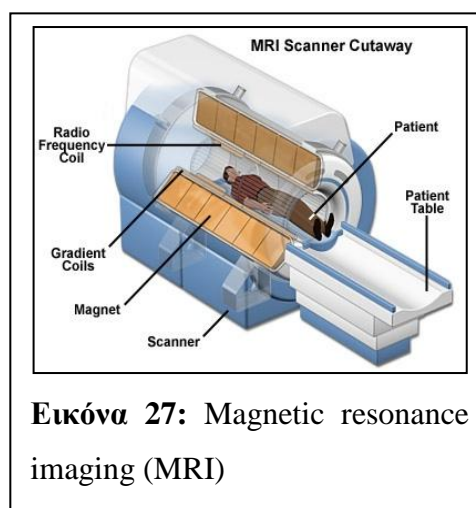


**Εικόνα 26:** Μηχανισμός δράσης εμβολίων από pH-ευαίσθητα λιποσώματα (Yuba et al., 2013).

λιποσώματα, που έχουν συντεθεί από το συντηκογόνο πεπτίδιο GALA (Akita et al., 2010).

#### 1.5.5.4 Μεταφορά παραγόντων αντίθεσης MRI

Η τεχνική της μαγνητικής τομογραφίας (Magnetic resonance imaging, MRI) κατατάσσεται στα πιο σημαντικά διαγνωστικά εργαλεία (Εικόνα 27). Η πλειονότητα των παραγόντων αντίθεσης MRI, που χρησιμοποιούνται σήμερα στην κλινική πράξη, βασίζονται σε παραμαγνητικά σύμπλοκα γαδολινίου, που μειώνουν το χρόνο χαλάρωσης των ελεύθερων πρωτονίων νερού. Οι παράγοντες αντίθεσης σε συνδυασμό με τη



**Εικόνα 27:** Magnetic resonance imaging (MRI)

μαγνητική τομογραφία υπήρξαν αποτελεσματικά εργαλεία για την απεικόνιση της φλεγμονής, του εμφράγματος, του όγκου, της αθηροσκληρωτικής πλάκας, για την παρακολούθηση ζωντανών βλαστικών κυττάρων, της αιμάτωσης του εγκεφάλου και για πολλές άλλες εφαρμογές.

Οι περισσότεροι από αυτούς τους παράγοντες αντίθεσης MRI είναι σύμπλοκα γαδολινίου (Gd III), καθώς αυτό το είδος των ιόντων έχει υψηλή μαγνητική ροπή και ένα μεγάλο ηλεκτρονικό χρόνο χαλάρωσης. Μπορούν αποτελεσματικά να περνούν μέσα από το κατεστραμμένο αιματοεγκεφαλικό φραγμό, ενώ αποβάλλονται γρήγορα από τους νεφρούς. Μειονεκτήματα των παραγόντων αντίθεσης αποτελεί το γεγονός ότι, είναι όλοι τοξικοί και μη-εξειδικευμένοι.

Ως οι νέοι φορείς των παραγόντων αντίθεσης, τα λιποσώματα χαρακτηρίζονται από μεγάλο χρόνο παραμονής στην κυκλοφορία του αίματος και καλά φαρμακολογικά χαρακτηριστικά. Ωστόσο, ο παράγοντας αντίθεσης των συμβατικών λιποσωμάτων εύκολα διαρρηγνύεται και απορροφάται από το RES, γεγονός το οποίο μπορεί να μειώσει την επίδραση της αντίθεσης. Επίσης, εύκολα επηρεάζονται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος, όπως ο μαγνητισμός και το pH. Η pH-αποκρινόμενη αποδέσμευση του φαρμάκου θα μπορούσε να συνδυαστεί με τη μαγνητική τομογραφία και άρα την απεικόνιση των όγκων, της μόλυνσης και της τοπικής ισχαιμίας. Τα παραμαγνητικά pH-ευαίσθητα λιποσώματα, που συσσωρεύονται στο όξινο περιβάλλον εντός των παθολογικών ιστών, ενεργοποιούνται από δομικές αναδιατάξεις και έτσι αποδεσμεύουν τους ενθυλακωμένους παράγοντες αντίθεσης μέσα στο κυτταρόπλασμα, ενισχύοντας σημαντικά την ισχύ του παράγοντα αντίθεσης.

Έχει ήδη δοκιμαστεί η φόρτωση pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων, που έχουν συντεθεί από το συντηκογόνο φωσφολιπίδιο POPE (1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine) και το σταθεροποιητικό μεμβράνης D- $\alpha$ -tocopherol-hemisuccinate, με διάφορα πιθανά παραμαγνητικά σύμπλοκα, αποφέροντας θετικά αποτελέσματα ως προς την απεικόνιση των διαδικασιών μεταφοράς και αποδέσμευσης φαρμακομορίων (Lokling et al., 2010).

## **1.6 Θερμική Ανάλυση (Thermal Analysis) (Δεμέτζος 2014)**

Οι θερμικές μεταβολές που συμβαίνουν στη διάρκεια της ζωής των νανοσυστημάτων είναι πολύ σημαντικές. Η θερμοτροπική συμπεριφορά τους σχετίζεται με τη θερμοδυναμική συμπεριφορά του νανοσωματιδιακού συστήματος διασποράς και επηρεάζεται από τις μεταβολές της θερμοκρασίας. Είναι προφανές, ότι οι μέθοδοι με τις οποίες μπορούμε να μελετήσουμε τις μεταβολές αυτές είναι σημαντικές και συνεισφέρουν στον ορθολογικό σχεδιασμό των νανοσωματιδίων. Θερμική Ανάλυση σύμφωνα με την ICTAC (International Confederation for Thermal Analysis and Calorimetry) είναι: «Ένα σύνολο αναλυτικών τεχνικών στις οποίες μετράται μια ιδιότητα του δείγματος ή των προϊόντων αντίδρασης αυτού σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία, ενώ το δείγμα υποβάλλεται σε μια προγραμματισμένη θερμική διεργασία, υπό καθορισμένο περιβάλλον».

Ανάλογα με τη μετρούμενη ιδιότητα, οι μέθοδοι θερμικής ανάλυσης διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες, μεταξύ οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενες είναι:

- Θερμοσταθμική Ανάλυση (Thermo Gravimetry, TG)/ Διαφορική Θερμοσταθμική Ανάλυση (Differential TG, DTG),
- Διαφορική Θερμική Ανάλυση (Differential Thermal Analysis, DTA),
- Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry, DSC),
- Θερμομηχανική Ανάλυση (Thermomechanical Analysis, TMA),
- Δυναμική Μηχανική Ανάλυση (Dynamic Mechanical Analysis, DMA),
- Ανάλυση Εκλυόμενων Αερίων (Evolved Gas Analysis, EGA).

### **1.6.1 Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry, DSC)**

#### **1.6.1.1 Βασικές Αρχές**

Το υπό μελέτη δείγμα καθώς και το δείγμα αναφοράς, στο οποίο μπορεί να επιτελούνται ή μπορεί να και να μην επιτελούνται θερμικά φαινόμενα στο προεπιλεγμένο εύρος θερμοκρασιών, θερμαίνονται ταυτόχρονα με τον ίδιο ρυθμό. Η θερμοκρασία τόσο του υπό μελέτη δείγματος, όσο και του δείγματος αναφοράς, αυξάνεται γραμμικά με το χρόνο και η διαφορά της μεταξύ τους θερμοκρασίας είναι ίση με μηδέν. Αν το υπό μελέτη δείγμα υπόκειται σε θερμικά φαινόμενα, το σύστημα ελέγχου ευαισθητοποιείται και παρέχει μεγαλύτερη ή μικρότερη θερμότητα στο υπό

μελέτη δείγμα, προκειμένου να διατηρηθεί η θερμοκρασία του ισοδύναμη με την αντίστοιχη του δείγματος αναφοράς. Η παράμετρος, που καταγράφεται από το θερμιδόμετρο, είναι η διαφορική θερμότητα ως συνάρτηση της θερμοκρασίας. Η διαφορά στην ενέργεια που παρέχεται στο σύστημα υπό μορφή θερμότητας στη μονάδα του χρόνου ( $dq/dt$ ) είναι ανάλογη με τη θερμοχωρητικότητα του δείγματος προς ανάλυση. Όταν συμβαίνει ένα θερμικό φαινόμενο, η διαφορική θερμότητα, η οποία καταγράφεται συναρτήσει της θερμοκρασίας, παίρνει τη μορφή μία καμπύλης η οποία έχει στραμμένα τα κοίλα προς τα κάτω ή προς τα άνω, ανάλογα αν το φαινόμενο είναι ενδόθερμο ή εξώθερμο αντίστοιχα, ενώ μπορεί να ισχύει και το αντίθετο ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο όργανο και το πακέτο λογισμικού. Οι καμπύλες που καταγράφονται, αποτελούν το αντίστοιχο θερμόγραμμα του υπό μελέτη δείγματος.

Η ενθαλπία της μετάβασης ( $\Delta H$ ) από τη μία κατάσταση στην άλλη αποτελεί το ποσό της ενέργειας, που μεταφέρεται ως θερμότητα υπό σταθερή πίεση και συνδέεται με τη θερμοχωρητικότητα του συστήματος ( $C_p$ ). Υπολογίζεται δε από το ολοκλήρωμα της καμπύλης, που προκύπτει από τη διαφορική θερμότητα συναρτήσει της θερμοκρασίας και καταγράφεται από το θερμιδόμετρο:  $\Delta H = C_p \, dT$ .

Εκτός από την ενθαλπία μετάβασης ( $\Delta H$ ), η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης επιτρέπει τον προσδιορισμό σημαντικών θερμοδυναμικών παραμέτρων. Η μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια του Gibbs μίας διεργασίας αντιστοιχεί στην εξίσωση:  $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$ , όπου  $\Delta H$  η μεταβολή στην ενθαλπία και  $\Delta S$  η μεταβολή στην εντροπία αντίστοιχα, που επιτελείται κατά τη διεργασία.

Όταν η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs ( $\Delta G$ ) λαμβάνει μηδενική τιμή, το σύστημα απαντάται ως μίγμα δύο ισοδύναμων καταστάσεων. Η θερμοκρασία, όπου οι δύο καταστάσεις είναι ισοδύναμες, αποτελεί τη θερμοκρασία  $T_m$ . Στη θερμοκρασία αυτή, εφόσον η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs ( $\Delta G$ ) μεταξύ των δύο καταστάσεων έχει μηδενική τιμή, ισχύει:  $T_m = \Delta H / \Delta S$ .

Η θερμοκρασία μετάβασης  $T_m$  αποτελεί τη θερμοκρασία, όπου το σύστημα εμφανίζει τη μέγιστη θερμοχωρητικότητα. Σε μεταβάσεις φάσεων, οι οποίες επάγουν συμμετρικές καμπύλες, η αντίστοιχη θερμοκρασία μετάβασης  $T_m$  αντιπροσωπεύει τη θερμοκρασία, στην οποία το φαινόμενο έχει ολοκληρωθεί στο ήμισυ. Ωστόσο, σε καμπύλες οι οποίες χαρακτηρίζονται από ασυμμετρία, η θερμοκρασία  $T_m$  δεν αντιστοιχεί στο μέσον της καμπύλης μετάβασης φάσης, αλλά αντί αυτού

χρησιμοποιείται ο όρος  $T_{1/2}$ , ο οποίος αποτελεί την πραγματική θερμοκρασία στην οποία το φαινόμενο έχει ολοκληρωθεί κατά το ήμισυ.

Το σχήμα της καμπύλης της διαφορικής θερμότητας συναρτήσει της θερμοκρασίας παρέχει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη μετάβαση φάσης που επιτελείται. Το εύρος θερμοκρασίας, που αντιστοιχεί στο ήμισυ του ύψους της καμπύλης, σχετίζεται με την καθαρότητα του συστήματος, όσο αφορά στην ποιότητα, καθώς και με τη συνεργασιμότητα των βιοϋλικών ή των υλικών του συστήματος κατά τη μετάβαση ή τις μεταβάσεις φάσεων σε συνάρτηση με τις μεταβολές της θερμοκρασίας. Η παρουσία πρόσθετων (μη συνεργάσιμα θερμοδυναμικά βιοϋλικά) έχει ως αποτέλεσμα τη διεύρυνση της καμπύλης μετάβασης φάσης (π.χ. ασυμμετρία, πολλαπλότητα) και το αποτέλεσμα είναι ενδεικτικό του είδους αλληλεπίδρασης του πρόσθετου με το υπό μελέτη νανοσύστημα. Συνήθως, η μετάβαση φάσεων, π.χ. σε μία διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων των λιποσωμάτων, περιλαμβάνει αλληλουχία ενδιάμεσων φάσεων μέχρι να μεταπέσει από τη μία φάση σε άλλη θερμοδυναμικά σταθερή για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα και σε συγκεκριμένο εύρος μεταβολής της θερμοκρασίας.

Οι ενδιάμεσες αυτές φάσεις, οι μεσομορφές (mesophases) οφείλονται στο σχηματισμό περιοχών με διαφορετικούς προσανατολισμούς των δομικών μονάδων του νανοσυστήματος π.χ. των φωσφολιπιδίων στην περίπτωση των λιποσωμάτων εξαιτίας των φαινομένων flip-flop και της πλάγιας μετατόπισης και διάχυσής τους (lateral motion and diffusion) στη διπλοστοιβάδα. Οι ενδιάμεσες αυτές φάσεις μπορούν να δημιουργηθούν και λόγω ύπαρξης πρόσθετων μολύνσεων, δηλαδή υλικών ή βιοϋλικών τα οποία δεν έχουν την απαιτούμενη συνεργασιμότητα με τα πραγματικά δομικά βιοϋλικά και δημιουργούν μη ευνοϊκές θερμοδυναμικές μεσομορφές. Η λογική αυτή μπορεί να συσχετισθεί με την ύπαρξη πρόσθετων βιοϋλικών ή βιομορίων από το περιβάλλον, τα οποία μπορούν να δημιουργήσουν σε κυτταρικό επίπεδο "ανεπιθύμητες" μεσομορφές στην κυτταρική μεμβράνη, να εμποδίζουν τη λειτουργικότητά της και να οδηγήσουν σε νόσους με βάση τη βιοφυσική προσέγγιση.

Ο αριθμός των φωσφολιπιδίων στην περίπτωση των λιποσωμάτων, που απαντώνται στην κάθε φάση, καθώς και η διασπορά των φάσεων, που συνυπάρχουν στη φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα, καθορίζουν το εύρος της συνολικής μετάβασης (transition), το οποίο εκφράζεται ως συνεργασιμότητα (cooperativity) μεταξύ των βιοϋλικών. Η συνεργασιμότητα των βιοϋλικών κατά τις μεταβάσεις φάσεων

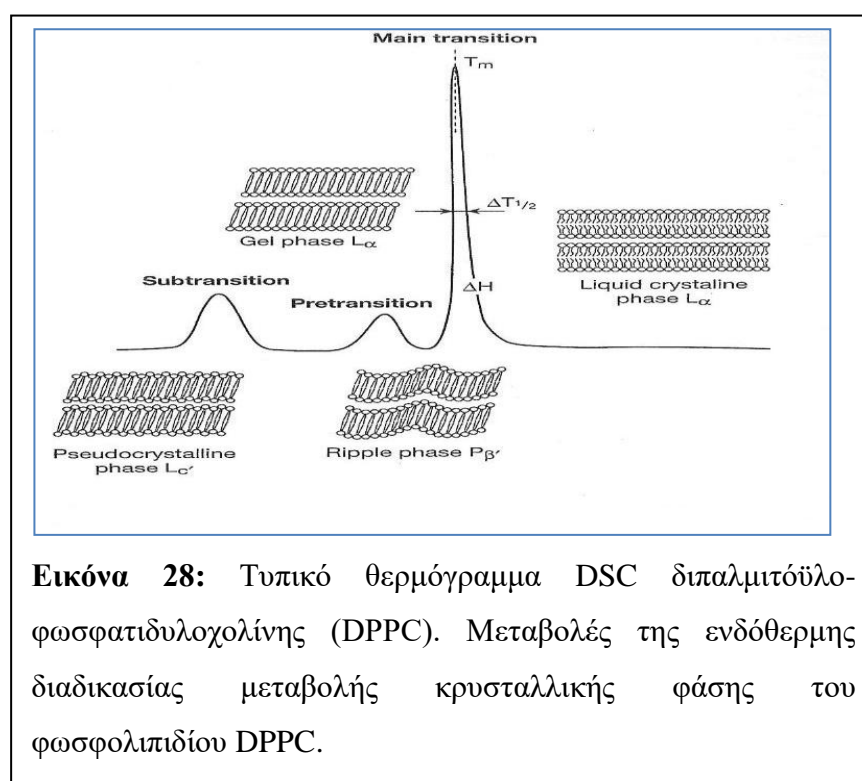


εκφράζεται συνήθως αριθμητικά ως η θερμοκρασία, που αντιστοιχεί στο μισό ύψος της καμπύλης και χαρακτηρίζεται ως  $\Delta T_{1/2}$ .

Η εκκίνηση του θερμικού φαινομένου αποτελεί τη θερμοκρασία, στην οποία η προέκταση της ευθείας γραμμής βάσης τέμνεται με την προέκταση της ευθείας από την κορυφή της καμπύλης, η οποία αντιστοιχεί στο  $T_m$  προς τη γραμμή βάσης και χαρακτηρίζεται ως  $T_{onset}$ , ενώ το τέλος του θερμικού φαινομένου χαρακτηρίζεται ως  $T_{endset}$ .

### 1.6.1.2 Η εφαρμογή της DSC στη λιπιδιομηχανική νανοτεχνολογία

Η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης αποτελεί μία θερμοδυναμική τεχνική, η οποία

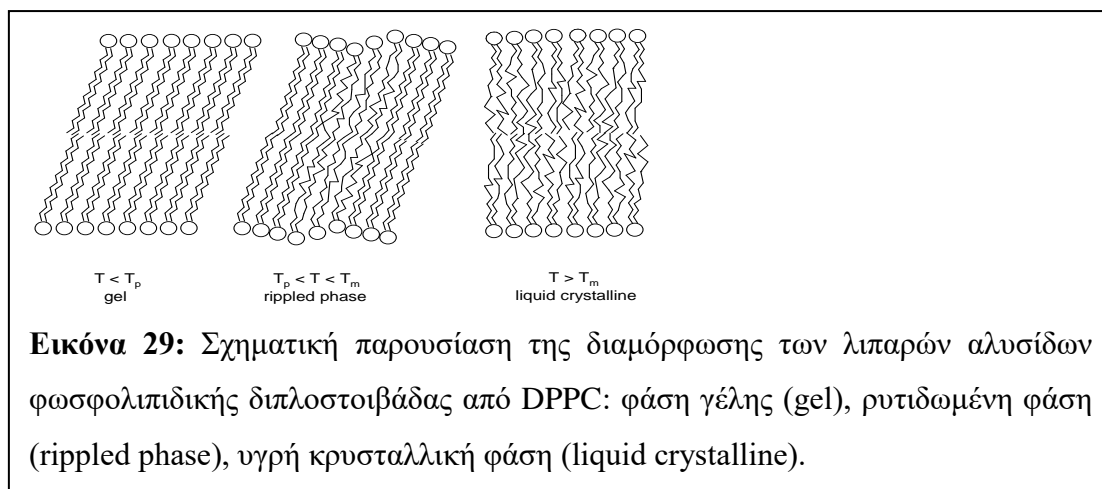


**Εικόνα 28:** Τυπικό θερμόγραμμα DSC διπαλμιτόϋλο-φωσφατιδυλοχολίνης (DPPC). Μεταβολές της ενδόθερμης διαδικασίας μεταβολής κρυσταλλικής φάσης του φωσφολιπιδίου DPPC.

χρησιμοποιείται εκτεταμένα στη μελέτη της θερμοτροπικής συμπεριφοράς λιπιδίων σε μοντέλα και βιολογικά συστήματα. Οι διπλοστοιβάδες φωσφολιπιδίων υπόκεινται σε θερμικές μεταβολές, οι οποίες περιλαμβάνουν μεταβάσεις από την κατάσταση τάξης στην κατάσταση αταξίας και οι οποίες χαρακτηρίζουν αντίστοιχα τις κρυσταλλικές δομές της διπλοστοιβάδας. Οι θερμοτροπικές ιδιότητες σε διπλοστοιβάδες, που σχηματίζονται από φωσφολιπίδια χολίνης, έχουν μελετηθεί εκτενώς και αποτελούν το συνηθέστερο μοντέλο στη μελέτη αλληλεπίδρασης βιοδραστικών μορίων σε μεμβράνες. Οι φωσφατιδυλοχολίνες χαρακτηρίζονται από πλούσιο πολυμορφισμό και υπόκεινται σε μεταβάσεις μεταξύ των φάσεών τους, η

ύπαρξη των οποίων εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Στην **Εικόνα 28** παρατηρούμε ένα τυπικό θερμογράμμα, το οποίο αντιστοιχεί σε μεταβάσεις φάσεων διπλοστοιβάδας αποτελούμενης από διπαλμιτόϋλο-φωσφατιδυλοχολίνη (DPPC), όπου διακρίνονται τρεις ενδόθερμες μεταβάσεις. Η κορυφή μικρής ενθαλπίας μετάβασης, η οποία παρατηρείται στις χαμηλότερες θερμοκρασίες (κορυφή 1) αντιστοιχεί σε μετάβαση φάσεων γνωστή ως υπομετάπτωση (subtransition). Η κορυφή, επίσης μικρής ενθαλπίας μετάβασης, σε ενδιάμεσες θερμοκρασίες (κορυφή 2) είναι γνωστή ως προμετάπτωση (pretransition), ενώ η κορυφή υψηλής ενθαλπίας μετάβασης (κορυφή 3) αποτελεί την κύρια μετάπτωση (main transition).

Η εμφάνιση των τριών αυτών ευδιάκριτων μεταβάσεων συναρτήσει της θερμοκρασίας καθορίζουν την ύπαρξη τεσσάρων φάσεων σε πλήρως ενυδατωμένες διπλοστιβάδες DPPC (**Εικόνα 29**). Οι φάσεις αυτές αποτελούν την πλακοειδή κρυσταλλική ( $L_c$ ), τη φάση γέλης με κάμψη των λιπιδικών αλυσίδων ( $L_{\beta'}$ ), τη ρυτιδωμένη φάση ( $P_{\beta'}$ ) και την υγρή κρυσταλλική φάση ( $L_a$ ), ενώ οι μεταβάσεις απεικονίζονται αντίστοιχα ως  $L_c \rightarrow L_{\beta'}$ ,  $L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$ ,  $P_{\beta'} \rightarrow L_a$ .



Επίσης, τα λιποσώματα ανήκουν στα κολλοειδή συστήματα διασποράς και χαρακτηρίζονται ως λυοτροπικοί υγροί κρύσταλλοι. Η λυοτροπική κατάσταση των λιποσωμάτων ευθύνεται για τις μεσομορφές, που αυτά μπορούν να λάβουν κατά τις μεταβολές φάσεων (phase transitions) και που σχετίζονται με την ονομαζόμενη θερμική τους καταπόνηση (thermal stress) κατά τη διάρκεια των μεταβολών φάσεων. Η θερμική τους καταπόνηση συμβαίνει κατά την αποθήκευση του λιποσωματικού συστήματος διασποράς, είτε κατά τη διάρκεια της χορήγησης στον άνθρωπο. Οι θερμοδυναμικές παράμετροι, που επηρεάζονται και κατ' επέκταση συμμετέχουν στη φυσική σταθερότητα και συνεπώς στη φαρμακευτική αποτελεσματικότητα, είναι οι

$T_m$ ,  $\Delta T_{1/2}$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta C_p$ . Η μελέτη και ταυτοποίηση των μεσομορφών των λιπιδικών διπλοστοιβάδων των λιποσωμακών συστημάτων διασποράς δίνει τη δυνατότητα ελέγχου των παραπάνω θερμοδυναμικών παραμέτρων, ώστε να σχεδιαστεί ορθολογικά λιποσωμακό σύστημα με την πιο ικανοποιητική φυσική και θερμοδυναμική σταθερότητα.

Ο ορθολογικός σχεδιασμός λιποσωμακών νανοσυστημάτων, η αξιολόγηση σε επίπεδο τεχνολογίας, αλλά και *in vivo* συμπεριφοράς είναι άρρηκτα συνδεδεμένα με τη θερμοδυναμική τους συμπεριφορά. Η θερμική ανάλυση και συγκεκριμένα η DSC είναι πολύτιμα αναλυτικά εργαλεία στην πρόβλεψη της φυσικής σταθερότητας των λιποσωμάτων και την ερμηνεία της φυσικοχημικής τους συμπεριφοράς. Ο προσδιορισμός των μεταβάσεων φάσεων σχετίζεται με χαρακτηριστικά συμπεριφοράς τους, όπως π.χ. η δυνατότητα εγκλωβισμού και αποδέσμευσης βιοδραστικών μορίων.

## **2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα εργασία εστιάζει στον ορθολογικό σχεδιασμό και την παρασκευή λιποσωμάτων, στα οποία ενσωματώθηκε ένα pH-αποκρινόμενο συμπολυμερές κατά συστάδες, παράγωγο του πολυ-ακρυλικού οξέος, καθώς και το βιοδραστικό μόριο διμεθοξυκουρκουμίνη. Τόσο τα λιποσώματα, όσο και τα συμπολυμερή κατά συστάδες, όπως αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία, είναι εξελεγμένες και πολλά υποσχόμενες δομές, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συστήματα μεταφοράς φαρμακομορίων. Ο συνδυασμός των δύο αυτών συστημάτων σε ένα μπορεί να δώσει χημικά pH-ευαίσθητα λιποσώματα, που φέρουν ιδιότητες και από τα δύο συστήματα και έχουν πλέον αναβαθμισμένο χαρακτήρα. Η διμεθόξυκουρκουμίνη είναι ένα μόριο, που εμφανίζει προβλήματα διάλυσης και επομένως βιοδιαθεσιμότητας, οπότε ο επιτυχής εγκλωβισμός του σε ένα σύστημα μεταφοράς βιοδραστικού μορίου προηγμένης τεχνολογίας, όπως τα pH-ευαίσθητα λιποσώματα, ίσως βελτιώσει τη συμπεριφορά του.

Συγκεκριμένα η παρούσα εργασία αποσκοπεί:

- Στη μελέτη προμορφοποίησης των παραπάνω λιποσωματικών συστημάτων μέσω της διερεύνησης των θερμοτροπικών ιδιοτήτων λιπιδικών διπλοστοιβάδων. Πιο συγκεκριμένα εφαρμόστηκε η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry - DSC) σε χημικές λιπιδικές διπλοστοιβάδες με ενσωματωμένο το pH-αποκρινόμενο συμπολυμερές κατά συστάδες PnBA-b-PAA, ώστε από τη θερμοτροπική συμπεριφορά τους, να εξαχθούν πληροφορίες για τη συνεργασιμότητα τα δύο υλικών. Εξετάστηκαν έξι διαφορετικές μοριακές αναλογίες (9:0.0, 9:0.1, 9:0.5, 9:1.0, 9:2.0, 9:3.0) τόσο σε ουδέτερο, όσο και σε όξινο περιβάλλον.
- Στην παρασκευή κενών χημικών pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων με ενσωματωμένο το pH-αποκρινόμενο συμπολυμερές κατά συστάδες PnBA-b-PAA 15/85 σε πέντε μοριακές αναλογίες με διαφορετικό ποσοστό συμπολυμερούς (9:0.1, 9:0.5, 9:1.0, 9:2.0, 9:3.0), ώστε να διακρίνουμε το ρόλο της ποσότητας του συμπολυμερούς στη φυσικοχημική συμπεριφορά του συστήματος.
- Στη σύγκριση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των παραπάνω πέντε κενών χημικών pH-ευαίσθητων λιποσωματικών συστημάτων, την ημέρα παρασκευής, καθώς και σε βάθος χρόνου 30 ημερών (μελέτη φυσικοχημικής σταθερότητας σε βάθος χρόνου).

- Στη σύγκριση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των παραπάνω πέντε κενών χημικών pH-ευαίσθητων λιποσωματικών συστημάτων σε όξινο περιβάλλον, ώστε να επιβεβαιώσουμε την ιδιότητα της pH-απόκρισης του συμπολυμερούς (pH-responsiveness test).
- Στην παρασκευή χημικών pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων με ενσωματωμένο το pH-αποκρινόμενο συμπολυμερές κατά συστάδες PnBA-b-PAA 15/85 σε τρεις μοριακές αναλογίες με διαφορετικό ποσοστό συμπολυμερούς (9:0.0:0.1, 9:0.1:0.1, 9:1.0:0.1) και ενσωματωμένο το βιοδραστικό μόριο διμεθοξυκουρκουμίνη.
- Στη σύγκριση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των παραπάνω τριών χημικών pH-ευαίσθητων λιποσωματικών συστημάτων, που φέρουν το βιοδραστικό μόριο διμεθοξυκουρκουμίνη, την ημέρα παρασκευής, σε βάθος χρόνου 30 ημερών (μελέτη φυσικοχημικής σταθερότητας σε βάθος χρόνου), καθώς και σε όξινο περιβάλλον.
- Στην ποσοτικοποίηση του βιοδραστικού μορίου διμεθοξυκουρκουμίνη και του συστατικού λιπιδίου των παραπάνω τριών χημικών pH-ευαίσθητων λιποσωματικών συστημάτων, ώστε να υπολογιστούν τα χαρακτηριστικά ενσωμάτωσης του βιοδραστικού μορίου.
- Στη μελέτη αποδέσμευσης του βιοδραστικού μορίου διμεθοξυκουρκουμίνη από τα τρία χημικά pH-ευαίσθητά λιποσωματικά συστήματα τόσο σε ουδέτερο, όσο και σε όξινο περιβάλλον.

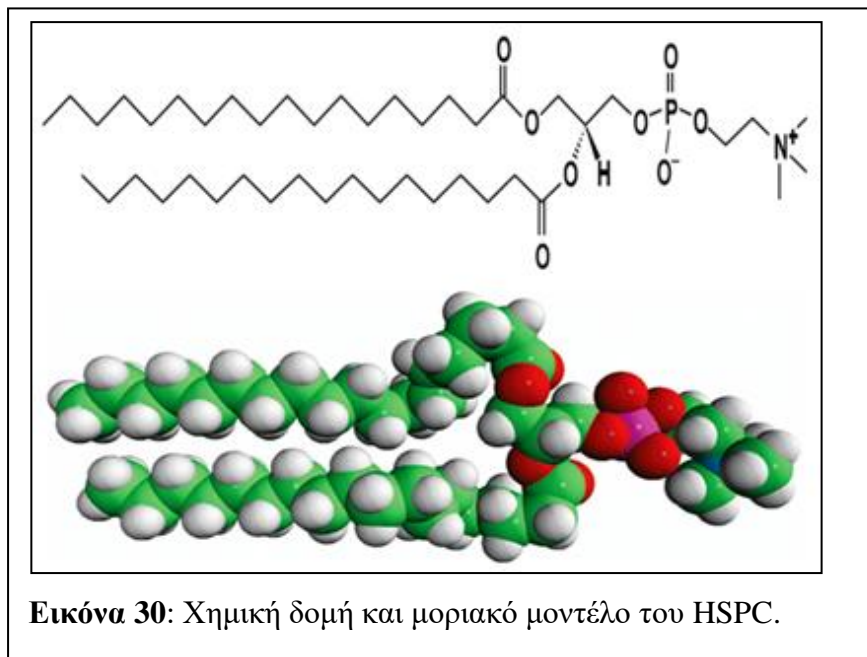
## 2.1 Γενικά

### 2.1.1 Το φωσφολιπίδιο HSPC

Το **φωσφολιπίδιο** που χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική διαδικασία είναι το **HSPC L- $\alpha$ -phosphatidylcholine, hydrogenated (Soy)**. Το HSPC έχει την εξής δομή και χαρακτηριστικά:

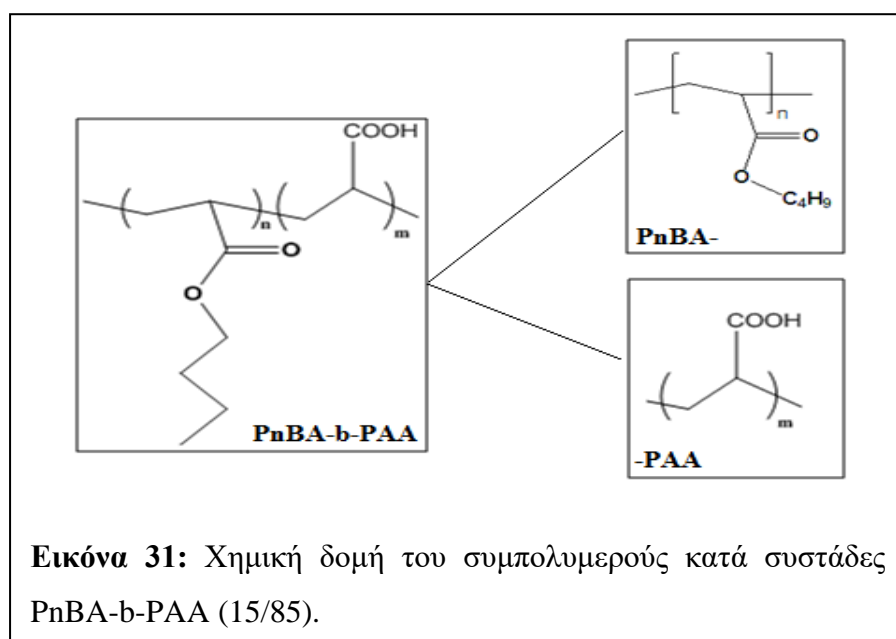
<b>Molecular Formula</b>	$C_{44}H_{88}NO_8P$ (Predominant Species)
<b>Molecular Weight</b>	783.774 g/mol
<b>Storage</b>	-20°C
<b>Transition Temperature</b>	54.3° C
<b>Solubility</b>	Soluble to chloroform, insoluble to water.

**Πίνακας 3:** Χαρακτηριστικά του HSPC (Avanti Polar Lipids Inc.)



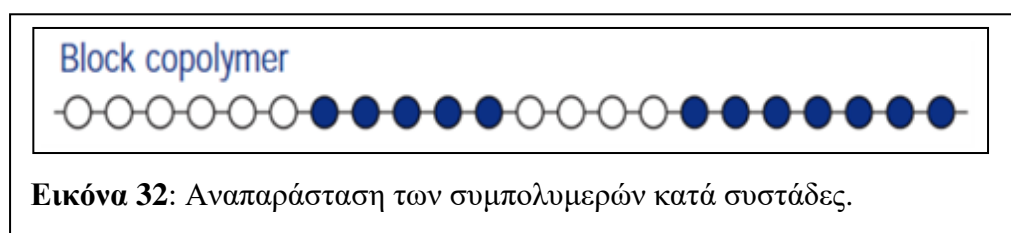
### 2.1.2 Το pH-αποκρινόμενο συμπολυμερές κατά συστάδες PnBA-b-PAA (15/85)

Το **pH-αποκρινόμενο πολυμερές** που χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική διαδικασία είναι το συμπολυμερές κατά συστάδες (block copolymer) **PnBA-b-PAA (15/85) [poly (n- butylacrylate) -b- poly (acrylic acid)]** με MW: 20000 (85% wt PA) και την κάτωθι δομή:



#### ο **Το PnBA-b-PAA ως pH-αποκρινόμενο συμπολυμερές κατά συστάδες**

Όπως αναφέρθηκε, το PnBA-b-PAA (15/85) είναι ένα συμπολυμερές κατά συστάδες (block copolymer). Είναι συμπολυμερές, διότι αποτελείται από δύο μονομερή το PnBA και το PAA διαφορετικής δομής μεταξύ τους. Είναι ακόμα συμπολυμερές κατά συστάδες (block copolymer), διότι τα διαφορετικά είδη επαναλαμβανόμενων μονάδων εντοπίζονται σε διακριτές συστάδες (blocks), γραμμικά διατεταγμένες και εναλλάξ κατά μήκος της πολυμερικής αλυσίδας, ενωμένες με ομοιοπολικό δεσμό και πιο συγκεκριμένα είναι δισυσταδικό (diblock copolymers) (Florence et al 2008). Ακολουθεί δηλαδή την παρακάτω δομή:

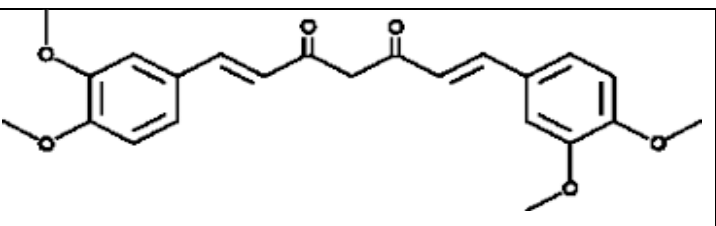




Ακόμα, η παρουσία της pH-αποκρινόμενης συστάδας PAA του προσδίδει την ιδιότητα της pH-απόκρισης. Για τις ιδιότητες του PAA έγινε εκτενής αναφορά στην παράγραφο 1.3.3.2.

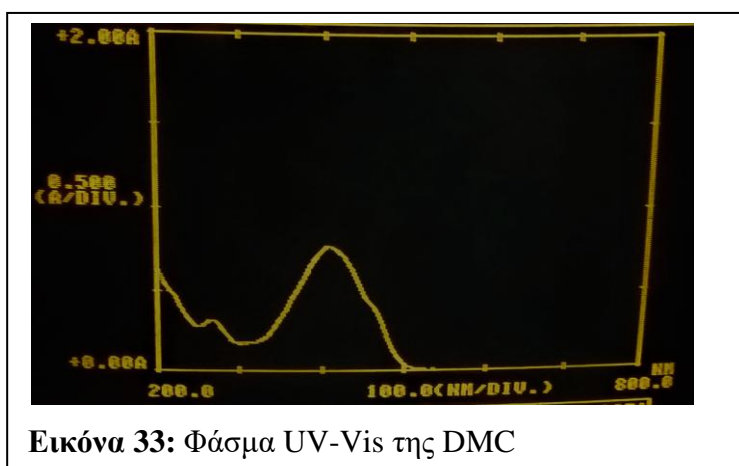
### 2.1.3 Το βιοδραστικό μόριο διμεθοξυκουρκουμίνη/ dimethoxycurcumin (DMC)

Το βιοδραστικό μόριο, που χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική διαδικασία, είναι η διμεθοξυκουρκουμίνη/ dimethoxycurcumin (DMC) [1,7-bis (3,4-dimethoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione] με τα ακόλουθα χαρακτηριστικά και χημική δομή:

	
<b>Molecular Formula</b>	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>
<b>Molecular Weight</b>	396,4 g/mol
<b>UV/Vis</b>	$\lambda_{\max}$ = 418nm
<b>Solvents</b>	DMSO, ethanol, DMF
<b>clogP</b>	3.97590 (εξαιρετικά λιπόφιλο)

**Πίνακας 4:** Χημική δομή και Χαρακτηριστικά της DMC.

Με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου υπεριώδους ορατού (UV-160A SHIMADZU UV-Visible recording spectrophotometer), λάβαμε το φάσμα UV-Vis της DMC (Εικόνα 33), επιβεβαιώνοντας ότι



το  $\lambda_{\max}$  = 418nm και στο οποίο διεξήχθησαν όλες οι μετρήσεις. Για τις ιδιότητες της DMC έγινε εκτενής αναφορά στην παράγραφο 1.1.

## **2.2 Παρασκευή των χημικών διπλοστοιβάδων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85)**

### **I. Υλικά**

- Χλωροφόρμιο  $\text{CHCl}_3$  (Fischer Chemical)
- Μεθανόλη  $\text{MeOH}$  (Carlo Erba)
- L- $\alpha$ -phosphatidylcholine, hydrogenated (Soy) (HSPC) (Avanti Polar Lipids Inc., Albaster, AL, USA)
- poly(n-butylacrylate)-b-poly(acrylic acid) (PnBA-b-PAA 15/85) σε διάλυμα χλωροφόρμιο:μεθανόλη 9:1 συγκέντρωσης  $c=1.67 \text{ mg/mL}$

### **II. Όργανα**

- Ζυγός (College B154, Mettler-Toledo, Switzerland)
- Μικροσύριγγες 100 $\mu\text{L}$  και 1000 $\mu\text{L}$  Hamilton microliter<sup>TM</sup> syringes (Bonaduz AG, Switzerland)
- Συσκευή εξάτμισης (Techne Dri-Block DB<sub>3</sub> Thermostat with Teche Sample Concentrator)

### **III. Παρασκευή διαλυμάτων**

#### **Διάλυμα PnBA-b-PAA (15/85)**

Για την παρασκευή του διαλύματος παρακαταθήκης (stock solution) συμπολυμερούς κατά συστάδες PnBA-b-PAA (15/85), ζυγίζεται η ποσότητα του πολυμερούς και διαλύεται σε σύστημα διαλυτών χλωροφόρμιο: μεθανόλη 9:1, ώστε να αποκτήσουμε συγκέντρωση συγκέντρωσης  $c=1.67 \text{ mg/mL}$  [π.χ. 100mg PnBA-b-PAA (15/85) διαλύονται σε 59.88mL σύστημα διαλυτών χλωροφόρμιο: μεθανόλη 9:1]. Ακολουθεί υπερήχηση στη συσκευή λουτρού υπερήχων για 10 min, μέχρι πλήρους διάλυσης του στερεού.

### **IV. Διαδικασία**

Παρασκευάστηκαν έξι συστήματα χημικών διπλοστοιβάδων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85) στις εξής μοριακές αναλογίες: 9:0.0, 9:0.1, 9:0.5, 9:1.0, 9:2.0, 9:3.0.

Αναμειγνύονται το λιπίδιο L- $\alpha$ -phosphatidylcholine, hydrogenated (Soy) (HSPC) διαλυμένο σε χλωροφόρμιο και το διάλυμα πολυμερούς poly(n-

butylacrylate)-b-poly(acrylic acid) (PnBA-b-PAA 15/85) σε χλωροφόρμιο: μεθανόλη 9:1 συγκέντρωσης 1.67 mg/mL σε κατάλληλες ποσότητες, ώστε να παραλάβουμε τις παραπάνω μοριακές αναλογίες.

Τα φιαλίδια προσαρμόστηκαν στη συσκευή εξάτμισης (Techne Dri-Block DB<sub>3</sub>Thermostat with Teche Sample Concentrator) στους 50°C, για 30min, μέχρι πλήρους εξάτμισης των διαλυτών.

Οι διπλοστοιβάδες που παρελήφθησαν, διατηρήθηκαν στο ψυγείο σε θερμοκρασία 4°C.

### **2.3 Εφαρμογή της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry - DSC) στις παρασκευασθείσες χμιαϊκές διπλοστοιβάδες HSPC:PnBA-b-PAA (15/85)**

#### **I. Υλικά**

- Διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline) με pH=7.4
- Citric Acid, Sigma Aldrich
- Sodium Citrate, Sigma Aldrich
- pH-μετρικό χαρτί (Machery Nagel)
- παρασκευασθείσες χμιαϊκές διπλοστοιβάδες HSPC:PnBA-b-PAA (15/85) (παράγραφος 2.2)

#### **II. Όργανα**

- Ζυγός (College B154, Mettler-Toledo, Switzerland)
- Μικροσύριγγες 100μL και 1000μL Hamilton microliter™ syringes (Bonaduz AG, Switzerland)
- Sealed aluminum 40μL crucibles
- Πιεστήριο Mettler Toledo
- DSC 822° Mettler Toledo (Schwerzenbach, Switzerland)

#### **III. Παρασκευή διαλυμάτων**

- **Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος/κιτρικού νατρίου (Citrate Buffer) με pH=4.0**

2.1g κιτρικού οξέος και 2.9g κιτρικού νατρίου διαλύονται σε 100mL H<sub>2</sub>O HPLC grade. Το pH μετριέται με τη χρήση pH-μετρικού χαρτιού. Αν δεν ισούται με 4.0, τότε προσθέτουμε ανάλογα κιτρικό οξύ ή κιτρικό νάτριο.

#### IV. Προετοιμασία δειγμάτων για τη Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry - DSC)

Στα crucible τοποθετούμε ορισμένη ποσότητα διπλοστοιβάδας. Η ποσότητα αυτή δεν πρέπει να ζυγίζει πάνω από 8,000mg.

Ακολουθεί προσθήκη του μέσου διασποράς. Ο όγκος του μέσου διασποράς που προστέθηκε είναι τέτοιος, ώστε για κάθε mg διπλοστοιβάδας να προστίθενται 10μL μέσου διασποράς. Η ενυδάτωση έγινε 30min πριν την μέτρηση.

Οι διπλοστοιβάδες της κάθε μοριακής αναλογίας ενυδατώθηκαν σε δύο διαφορετικά μέσα διασποράς PBS (Phosphate Buffer Saline) με pH=7.4 και Citrate Buffer με pH=4.0.

Το crucible σφραγίστηκε με εφαρμογή πίεσης στο πιεστήριο.

#### V. Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry - DSC)

Τα πειράματα της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry - DSC) έγιναν με τη χρήση του οργάνου DSC 822<sup>e</sup> Mettler-Toledo (Schwerzenbach, Switzerland), το οποίο βαθμονομήθηκε με καθαρό ίνδιο ( $T_m=156.6^{\circ}\text{C}$ ).

Δυόμισι κύκλοι ψύξης-θέρμανσης διεξήχθησαν με σκοπό να εξασφαλιστεί η καλή επαναληψιμότητα των δεδομένων. Το εύρος θερμοκρασιών ήταν από 20°C έως 60°C και ο ρυθμός σάρωσης 5°C /min.

Πριν από κάθε κύκλο τα δείγματα υποβλήθηκαν σε μία σταθερή θερμοκρασία 20°C για την εξασφάλιση της εξισορρόπησης, ενώ ένα άδειο χωνευτήριο (crucible) από αλουμίνιο χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα αναφοράς.

Οι δεύτεροι κύκλοι θέρμανσης και ψύξης ελήφθησαν επίσης υπόψη και τα δεδομένα (θερμοτροπικοί παράμετροι), που πήραμε από τη μέτρηση, (χαρακτηριστικές θερμοκρασίες μετάβασης  $T_m/s/^{\circ}\text{C}$ , μεταβολή της ενθαλπίας  $\Delta H_m / s / \text{J mol}^{-1}$ , το εύρος θερμοκρασίας που αντιστοιχεί στο μισό ύψος της

καμπύλης μετάβασης  $\Delta T_{1/2_{m/s}} / ^\circ\text{C}$ , καθώς και η θερμοκρασία όπου αρχίζει το θερμικό φαινόμενο  $T_{\text{onset}} / ^\circ\text{C}$ ) αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Mettler-Toledo STAR<sup>c</sup> (Mettler-Toledo LLC, Columbus, OH).

## **2.4 Παρασκευή και φυσικοχημικός προσδιορισμός των κενών χιμαιρικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85), καθώς και των χιμαιρικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85): DMC**

### **I. Υλικά**

- Χλωροφόρμιο  $\text{CHCl}_3$  (Fischer Chemical)
- Μεθανόλη  $\text{MeOH}$  (Carlo Erra)
- Αιθανόλη  $\text{EtOH}$  (Carlo Erra)
- Διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline) με  $\text{pH}=7.4$
- $\text{H}_2\text{O}$  HPLC (PRO<sup>TM</sup>PS Labconco System)
- L- $\alpha$ -phosphatidylcholine, hydrogenated (Soy) (HSPC) (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA)
- poly(n-butylacrylate)-b-poly(acrylic acid) (PnBA-b-PAA 15/85) σε διάλυμα χλωροφόρμιο:μεθανόλη 9:1 συγκέντρωσης  $c=1.67 \text{ mg/mL}$  (παράγραφος 2.1)
- Dimethoxycurcumin (DMC) σε διάλυμα μεθανόλη:αιθανόλη 9:1 συγκέντρωσης  $c=0.5 \text{ mg/mL}$

### **II. Όργανα**

- Ζυγός (College B154, Mettler-Toledo, Switzerland)
- Μικροσύριγγες 100 $\mu\text{L}$  και 1000 $\mu\text{L}$  Hamilton microliter<sup>TM</sup> syringes (Bonaduz AG, Switzerland)
- Περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό κενό (Laborota 40 A00, Heidolph Instruments)
- Συσκευή Vortex (Velp scientifica)
- Συσκευή λουτρού υπερήχων/ Bath sonication (Elma S<sub>30</sub> Emasonic)
- Συσκευή Υπερήχησης με αισθητήρα (UP200s Ultraschallprozessor dr. Hielscher GmbH, Berlin, Germany)
- Κυψελίδες 10x10 x48 mm (Sarstedt, Germany)

- Φασματοφωτόμετρο συσχέτισης φωτονίων (Zetasizer 3000 HAS, Malvern UK)

### III. Παρασκευή διαλυμάτων

- Διάλυμα Dimethoxycurcumin (DMC)

Για την παρασκευή του διαλύματος παρακαταθήκης (stock solution) DMC, ζυγίζεται η ποσότητα της DMC και διαλύεται σε σύστημα διαλυτών μεθανόλη: αιθανόλη 9:1, ώστε να αποκτήσουμε συγκέντρωση συγκέντρωσης  $c=0.5 \text{ mg/mL}$  [π.χ. 1mg PnBA-b-PAA (15/85) διαλύονται σε 2mL συστήματος διαλυτών μεθανόλη: αιθανόλη 9:1]. Ακολουθεί υπερήχηση στη συσκευή λουτρού υπερήχων για 5 min μέχρι πλήρους διάλυσης του στερεού.

### IV. Οργανολογία

#### ➤ Probe Sonicator (Αισθητήρας υπερήχων)

Μοντέλο: UP 200 S (Ultrasonic processor for stationary operation)

Εταιρεία: Dr Hielscher GmbH

Αρχή λειτουργίας: Από τον αισθητήρα του οργάνου (την ακίδα τιτανίου Ti) γίνεται μεταφορά ενέργειας μέσω των υπερήχων στο δείγμα (π.χ. λιποσωμιακό εναιώρημα). Οι συνθήκες λειτουργίας του οργάνου, δηλαδή η συχνότητα και η ένταση των υπερήχων, ρυθμίζονται ανάλογα με το είδος του δείγματος, μέσω δύο ποτενσιομέτρων από τον χειριστή του οργάνου.

#### Συνθήκες λειτουργίας:

Εκπεμπόμενη ενέργεια: 200W (150W σε υγρό μέσο)

Ένταση ισχύος εκπεμπόμενης ενέργειας (amplitude): 20% - 100%

Συχνότητα εκπεμπόμενου παλμού: 0.1 -1 κύκλοι/sec (cycle)

Συχνότητα λειτουργίας: 24kHz

Μεταβαλλόμενο εύρος συχνότητας:  $\pm 1\text{kHz}$

#### Συνθήκες λειτουργίας κατά τη διάρκεια των πειραμάτων:

Εκπεμπόμενη ενέργεια: 200W (150W σε υγρό μέσο)

Ένταση ισχύος εκπεμπόμενης ενέργειας(amplitude):100%

Συχνότητα εκπεμπόμενου παλμού: 0.7 κύκλοι/sec (cycle)

Συχνότητα λειτουργίας: 24kHz

Μεταβαλλόμενο εύρος συχνότητας:  $\pm 1$ kHz

➤ **Όργανο Φασματοσκοπίας Συσχέτισης Φωτονίων**

Πρόκειται για ένα όργανο μέτρησης της κατανομής μεγέθους και του ζ-δυναμικού των σωματιδίων.

Μοντέλο: Zetasizer Particle Size and Zeta Potential Analyser 3000

Εταιρεία: Malvern Instruments Ltd.

Αρχή λειτουργίας: Σωματίδια μεγέθους από 1-5000nm μπορούν να μετρηθούν με τη μέθοδο φασματοσκοπίας συσχετισμού φωτονίων (photon correlation spectroscopy – PCS). Ένα από τα χαρακτηριστικά των σωματιδίων είναι ότι βρίσκονται σε συνεχή τυχαία θερμική κίνηση (κίνηση Brown). Αυτή η κίνηση έχει ως αποτέλεσμα, η ένταση του σκεδαζόμενου από τα σωματίδια φωτός να σχηματίζει ένα μοντέλο κινούμενου στίγματος. Αυτή η κινητικότητα ανιχνεύεται ως αλλαγή της έντασης σε σχέση με το χρόνο, από έναν ανιχνευτή και έναν φωτοπολλαπλασιαστή. Τα μεγάλα σωματίδια κινούνται πιο αργά από τα μικρά και συνεπώς ο ρυθμός της διακύμανσης του σκεδαζόμενου φωτός είναι πιο βραδύς. Η φασματοσκοπία συσχετισμού φωτονίων χρησιμοποιεί το ρυθμό μεταβολής των διακυμάνσεων του φωτός, για να προσδιορίσει την κατανομή μεγέθους των σωματιδίων, που προκαλούν το σκεδασμό του φωτός.

Στο όργανο αυτό η παραγωγή της δέσμης του εκπεμπόμενου φωτός γίνεται από λυχνία He-Ne και το μήκος κύματος του φωτός είναι 633nm. Η ακτινοβολία προσπίπτει στα σωματίδια (π.χ. λιποσώματα), σκεδάζεται και στη συνέχεια, τα σκεδαζόμενα φωτόνια ανιχνεύονται από έναν φωτοπολλαπλασιαστή.

Στο λογισμικό του οργάνου, υπάρχει πρόγραμμα αλγορίθμων, που επεξεργάζεται τις μεταβολές της έντασης του σκεδαζόμενου φωτός και καταλήγει στην κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων, που περιέχονται στο δείγμα. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένη μαθηματική ανάλυση, η οποία συνίσταται από την ISO 13321 διεθνή μέθοδο, προκύπτει και ο μέσος όρος των μεγεθών. Κατά τις μετρήσεις αυτές, το

μέγεθος ορίζεται η υδροδυναμική διάμετρος των σωματιδίων – λιποσωμάτων, ενώ ως δείκτης διασποράς το εύρος κατανομής.

Το ζ-δυναμικό των σωματιδίων που μετρά το όργανο είναι το ζ-δυναμικό της επιφάνειας κάλυψης του σωματιδίου, που δημιουργείται μεταξύ του φορτίου του σωματιδίου και του μέσου, και όχι το φορτίο επιφάνειας του σωματιδίου.

### Εφαρμογή του δείγματος

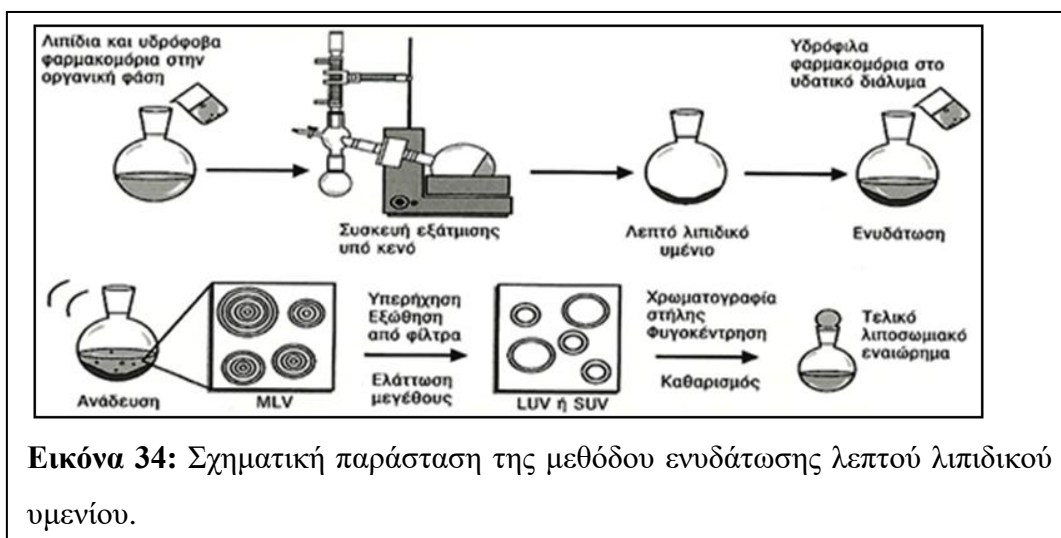
Το δείγμα αραιώνεται με H<sub>2</sub>O HPLC καθαρότητας διηθημένο (από φίλτρο Millipore με διάμετρο πόρων 200nm) και

- a) μεταφέρεται σε κυψελίδα μιας χρήσης από πολυστυρένιο. Αυτή τοποθετείται σε ειδική υποδοχή του οργάνου, η οποία κλείνει με καπάκι ώστε να μην διαχέεται το σκεδαζόμενο φως και μετράται το μέγεθος
- b) ενίεται με σταθερό ρυθμό στην ειδική υποδοχή του οργάνου, προς αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων, που θα εμπόδιζαν τη σωστή μέτρηση του ζ-δυναμικού, που οδηγεί το λιποσωματικό εναιώρημα στην εσωτερική κυψελίδα του οργάνου και μετράται τα ζ-δυναμικό

## V. Μέθοδος

- **Παρασκευή των κενών χμιαϊρικών λιποσωμάτων σύστασης HSPC: PnBA-b-PAA (15/85) σε πέντε μοριακές αναλογίες, καθώς και των χμιαϊρικών λιποσωμάτων σύστασης HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC σε τρεις μοριακές αναλογίες**

Σε όλες τις παρασκευές των λιποσωμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ενυδάτωσης του λεπτού υμενίου (Εικόνα 34).



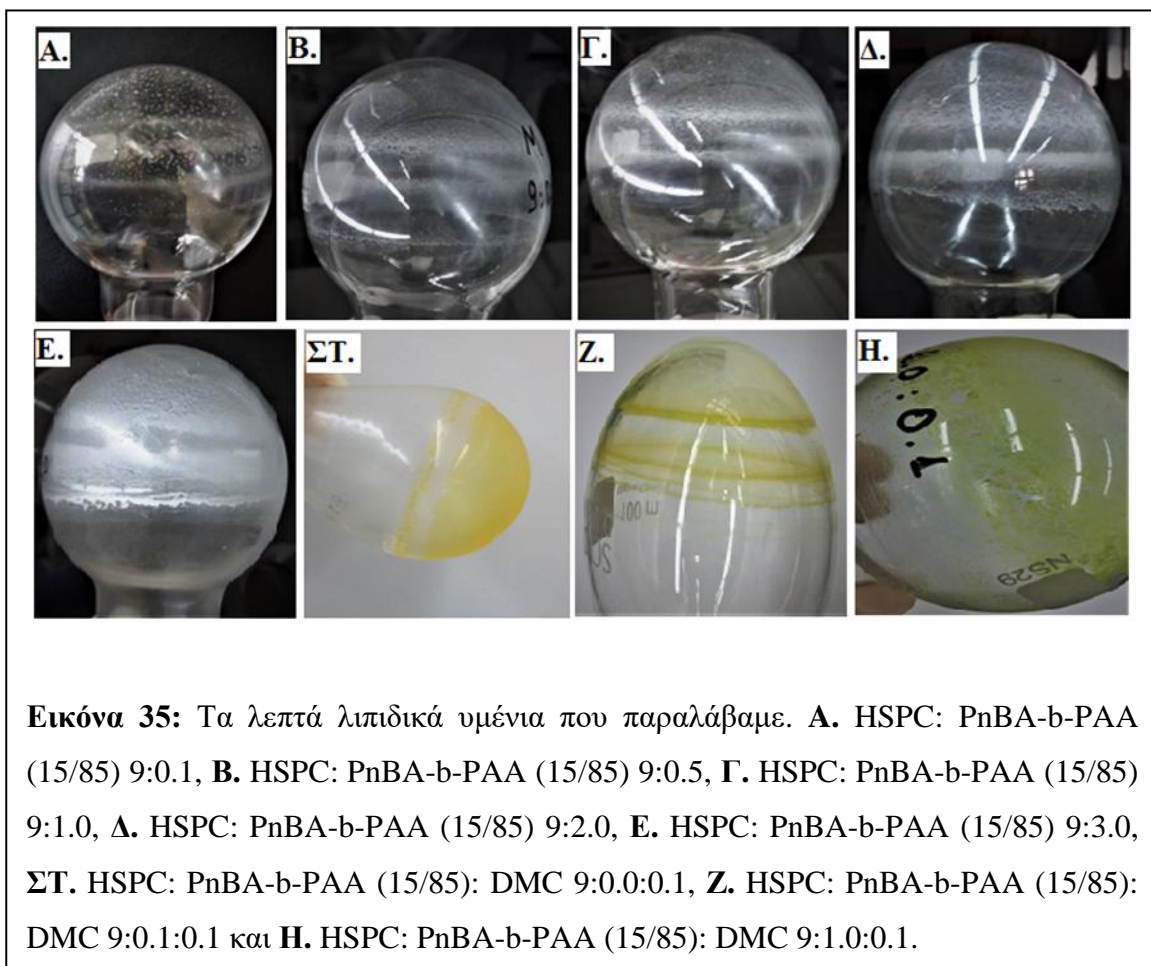


### 1. Παρασκευή λεπτού λιπιδικού υμενίου

Για τα κενά χμαιορικά λιποσώματα HSPC: PnBA-b-PAA (15/85), αναμειγνύονται το λιπίδιο HSPC διαλυμένο σε χλωροφόρμιο και το διάλυμα πολυμερούς PnBA-b-PAA 15/85 σε χλωροφόρμιο: μεθανόλη 9:1 συγκέντρωσης 1.67 mg/mL σε εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη των 100mL, στις εξής πέντε μοριακές αναλογίες: 9:0.1, 9:0.5, 9:1.0, 9:2.0 και 9:3.0.

Για τα χμαιορικά λιποσώματα HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC αναμειγνύονται το λιπίδιο HSPC διαλυμένο σε χλωροφόρμιο και το διάλυμα πολυμερούς PnBA-b-PAA 15/85 σε χλωροφόρμιο: μεθανόλη 9:1 συγκέντρωσης  $c=1.67$  mg/mL στις εξής τρεις μοριακές αναλογίες 9:0.0, 9:0.1 και 9:1.0. Στη συνέχεια προστίθεται και το διάλυμα της DMC σε μεθανόλη: αιθανόλη 9:1 συγκέντρωσης  $c=0.5$  mg/mL, ώστε να είναι σε αναλογία 9:0.1 με το λιπίδιο. Με αυτόν τον τρόπο παραλαμβάνουμε τις εξής αναλογίες: 9:0.0:0.1, 9:0.1:0.1 και 9:1.0:0.1.

Η κάθε φιάλη προσαρμόζεται σε περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό κενό (Rota vapor), ώστε να εξατμιστεί αργά ο διαλύτης, στους 42° C, για 20 min και σε υψηλό ρυθμό περιστροφών, μέχρι το σχηματισμό ομοιογενούς υμενίου (**Εικόνα 35**). Τα υμένια, που σχηματίστηκαν, αφέθηκαν για τουλάχιστον 24 ώρες στο ψυγείο στους 4° C.



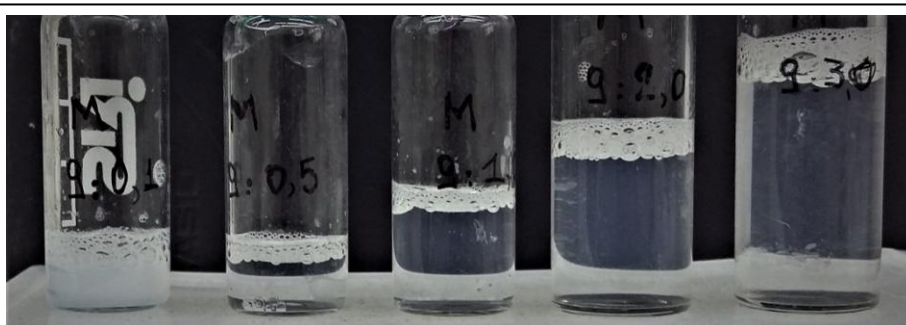
**Εικόνα 35:** Τα λεπτά λιπιδικά υμένια που παραλάβαμε. **A.** HSPC: PnBA-b-PAA (15/85) 9:0.1, **B.** HSPC: PnBA-b-PAA (15/85) 9:0.5, **Γ.** HSPC: PnBA-b-PAA (15/85) 9:1.0, **Δ.** HSPC: PnBA-b-PAA (15/85) 9:2.0, **Ε.** HSPC: PnBA-b-PAA (15/85) 9:3.0, **ΣΤ.** HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC 9:0.0:0.1, **Ζ.** HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC 9:0.1:0.1 και **Η.** HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC 9:1.0:0.1.

## 2. Ενυδάτωση του λεπτού λιπιδικού υμενίου

Σε κάθε φιάλη με το υμένιο [HSPC: PnBA-b-PAA (15/85) και HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC] προστίθεται PBS (Phosphate Buffer Saline, pH=7.4), ώστε να αποκτήσουμε τελική συγκέντρωση 10 mg/mL κολλοειδούς διασποράς. Το κάθε λιπιδικό υμένιο ενυδατώνεται σε PBS. Η ενυδάτωση πραγματοποιείται στο Rotavapor, στους 55°C, σε χαμηλό ρυθμό περιστροφών, για 1 h. Ενδιάμεσα της διαδικασίας ενυδάτωσης, εφαρμόζαμε ισχυρό Vortex στη φιάλη, ώστε να αποκολληθούν πλήρως όλα τα υπολείμματα υμενίου από τα τοιχώματα της και να ενυδατωθεί ολόκληρο το υμένιο.

## 3. 5min-5min probe sonication

Τα σχηματιζόμενα πολυστοιβαδικά λιποσώματα (MLVs) [HSPC: PnBA-b-PAA (15/85) και HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC] αφήνονται σε ηρεμία για 30 λεπτά, πριν υποβληθούν σε δύο κύκλους υπερήχησης των 5 λεπτών, με διακοπή 5 λεπτών στο ενδιάμεσο, χρησιμοποιώντας αισθητήρα υπερήχησης (πλάτος ταλάντωσης 100%, διάρκεια παλμού 0.7 sec). Τα μονοστοιβαδικά λιποσώματα, που σχηματίζονται με την υπερήχηση, αφήνονται σε ηρεμία για 30 λεπτά.



**Εικόνα 36:** Οι κολλοειδείς διασπορές των παρασκευασθέντων λιποσωματικών συστημάτων HSPC: PnBA-b-PAA (15/85) στις 9:0.1, 9:0.5, 9:1.0, 9:2.0, 9:3.0 μοριακές αναλογίες αντίστοιχα. Παρατηρούμε ότι, όσο αυξάνεται το ποσοστό του πολυμερούς στην αναλογία, η διασπορά γίνεται πιο διάφανη.

### ➤ Φυσικοχημικός έλεγχος των παρασκευασθέντων λιποσωματικών συστημάτων

Χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων (Dynamic Light Scattering, DLS) για τη μέτρηση μεγέθους και δείκτη πολυδιασποράς, καθώς και

ηλεκτροφορητική σκέδαση φωτός (Electrophoretic Light Scattering, ELS) για τη μέτρηση του ζ-δυναμικού. Χρησιμοποιήθηκε το όργανο Zetasizer Particle Size and Zeta Potential Analyser 3000 της Malvern Instruments Ltd.

Το μέγεθος (μέση υδροδυναμική διάμετρος [ $D_h$  (nm)]) και ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI) των λιποσωμάτων μετράται άμεσα μετά την παρασκευή των λιποσωμάτων ως ακολούθως. Αραιώνουμε 100μL από το λιποσωματικό εναιώρημα με 2900 μL H<sub>2</sub>O HPLC.

Η μέση υδροδυναμική διάμετρος [ $D_h$  (nm)] και ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI) των λιποσωμάτων μετρώνται με φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων (Dynamic Light Scattering, DLS). Τα δείγματα σκεδιάζονται (633nm) υπό γωνία 90° και οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία 25°C.

Τα παρασκευασθέντα λιποσώματα διατηρούνται στο ψυγείο σε θερμοκρασία 4°C. Επανάληψη των μετρήσεων γίνονται στις ημέρες t (days)= 1,8,13,16,20,28,30 από την ημέρα παρασκευής, ώστε να μελετήσουμε την σταθερότητα του συστήματος σε βάθος χρόνου.

Το ζ δυναμικό [ζ-pot (mV)] μετρήθηκε μόνο την ημέρα παρασκευής t=0 σε όλες τις διαφορετικές μοριακές αναλογίες με ηλεκτροφορητική σκέδαση φωτός (Electrophoretic Light Scattering, ELS).

Πρέπει να σημειωθεί, ότι η τυπική απόκλιση (standard deviation) SD [(SD( $D_h$ ), SD(PDI), SD(ζ-pot)] και των τριών φυσικοχημικών παραμέτρων ( $D_h$ , PDI, ζ-pot) υπολογίστηκε ενδοδειγματικά, μετρώντας 3 σετ των 10 μετρήσεων. Τα αποτελέσματα αναλύονται με τη μέθοδο CONTIN του πακέτου λογισμικού MALVERN.

## **2.5 Εφαρμογή Χρωματογραφίας Στήλης Μοριακού Αποκλεισμού στα γυμναστικά συστήματα HSPC:PnBA-b-PAA (15/85): DMC**

### **I. Υλικά**

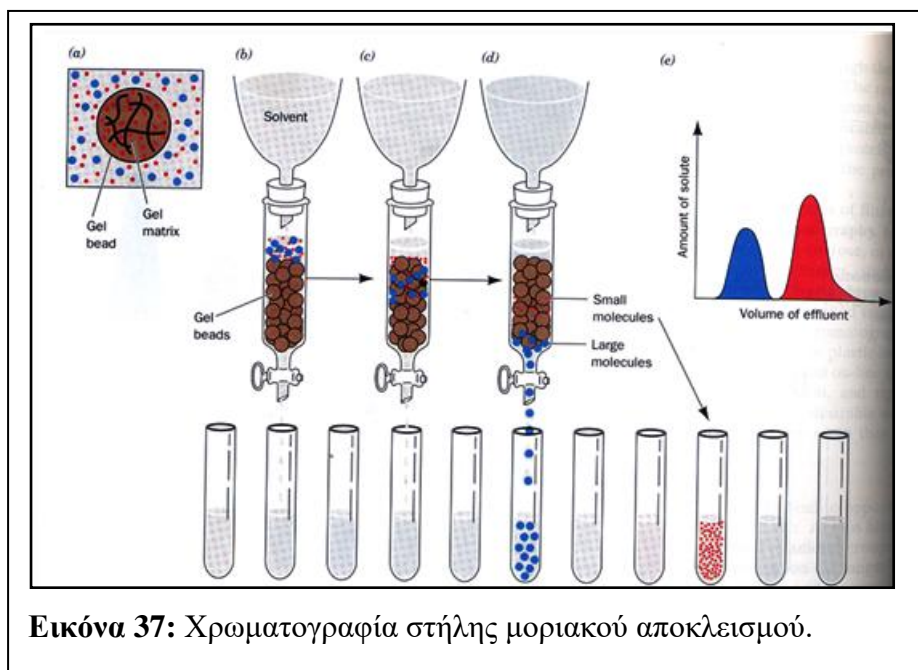
- Sephadex G75 Medium (Sigma Aldrich)
- Διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline) με pH=7.4
- H<sub>2</sub>O HPLC (PRO<sup>TM</sup>PS Labconco System)
- Βαμβάκι
- παρασκευασθέντα συστήματα HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC

## II. Όργανα

- Ζυγός (College B154, Mettler-Toledo, Switzerland)
- Υάλινη πιπέτα Pasteur Hirschmann©
- Μικροσύριγγες 100μL και 1000μL Hamilton microliter™ syringes (Bonaduz AG, Switzerland)
- Συσκευή λουτρού υπερήχων/ Bath sonication (Elma S<sub>30</sub> Emasonic)

## III. Μέθοδος

Στα παρασκευασθέντα συστήματα HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC πρέπει να διαχωρίσουμε τα λιπосώματα με ενσωματωμένη DMC από την ελεύθερη DMC, που τυχόν υπάρχει στην κolloειδή διασπορά. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιούμε τη Χρωματογραφία Στήλης Μοριακού Αποκλεισμού (molecular exclusion chromatography), όπου τα μόρια του δείγματος διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος τους, με τα μεγάλα μόρια (λιπосώματα) να εξέρχονται πρώτα. Αντίθετα, τα μικρά μόρια (ελεύθερο μόριο) εγκλωβίζονται στους πόρους του πληρωτικού υλικού (Sephadex G75) και συγκρατούνται για περισσότερο χρόνο, με αποτέλεσμα να εκλούνται αργότερα (**Εικόνα 37**).



## IV. Διαδικασία

Παρασκευάζουμε το διάλυμα Sephadex G75, διαλύοντας 14g Sephadex G75 σε 500mL H<sub>2</sub>O HPLC. Αφήνουμε το διάλυμα στο ψυγείο στους 4°C για 24h, ώστε να διογκωθεί το υλικό.

Για την παρασκευή της στήλης: Αφήνουμε το παρασκευασμένο διάλυμα Sephadex G75 να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και εφαρμόζουμε υπερήχηση στο λουτρό υπερήχων για 20min. Στη συνέχεια μεταφέρουμε 2mL διαλύματος σε υάλινη πιπέτα Pasteur, στο ρύγχος της οποίας έχουμε εφαρμόσει μικρή ποσότητα βαμβακιού. Το Sephadex G75 αποτελεί το υλικό πλήρωσης της στατικής φάσης. Εκπλένουμε τη στήλη με H<sub>2</sub>O HPLC τρεις φορές.

Για το πακετάρισμα της στήλης: η στήλη πακετάρεται με την κινητή φάση, που στην προκειμένη περίπτωση είναι το διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline) με pH=7.4

Προετοιμάζονται τρεις στήλες, μια διαφορετική για κάθε σύστημα HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC.



Στη συνέχεια εισάγεται το κάθε δείγμα (100μL) (**Εικόνα 38**) και προστίθεται η κινητή φάση (PBS).

Στη συνέχεια, επέρχεται ο διαχωρισμός των λιποσωμάτων με ενσωματωμένη DMC από την ελεύθερη DMC της κολλοειδούς διασποράς. Συλλέγουμε το κλάσμα εκείνο, που εμφανίζει θολερότητα (και άρα περιέχει τα λιποσώματα) και μετράμε τον όγκο του.

Ο διαχωρισμός των λιποσωμάτων με τη Χρωματογραφία Στήλης μοριακού αποκλεισμού έπαιξε πολύ σημαντικό ρόλο στην επιλογή του ποσοστού του βιοδραστικού μορίου στη μοριακή αναλογία. Δοκιμάστηκαν να παρασκευαστούν χημικά συστήματα σε αναλογίες HSPC: PnBA-b-PAA

(15/85): DMC 9:x:1.0 και 9:x:5.0 αντίστοιχα. Ωστόσο και στα δύο αυτά συστήματα, λόγω της αυξημένης λιποφιλίας της DMC, το εισαχθέν δείγμα

σχημάτισε εντός της στήλης μια πορτοκαλόχρωμη στοιβάδα (**Εικόνα 39**), εμποδίζοντας το δείγμα να διαχωριστεί και να κατέλθει το κλάσμα των λιποσωμάτων.

## **2.6 Ποσοτικοποίηση της ενσωματωμένης DMC στα χημικά συστήματα HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC**

### **I. Υλικά**

- Μεθανόλη MeOH (Carlo Erra)
- Αιθανόλη EtOH (Carlo Erra)
- H<sub>2</sub>O HPLC (PRO<sup>TM</sup>PS Labconco System)
- Κυψελίδες 10x10 x48 mm (Sarstedt, Germany)
- Dimethoxycurcumin (DMC)

### **II. Όργανα**

- Ζυγός (College B154, Mettler-Toledo, Switzerland)
- Μικροσύριγγες 100μL και 1000μL Hamilton microliter<sup>TM</sup> syringes (Bonaduz AG, Switzerland)
- Συσκευή λουτρού υπερήχων/ Bath sonication (Elma S<sub>30</sub> Emasonic)
- Ογκομετρική φιάλη 10mL
- Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ορατού (UV-160A SHIMADZU UV-Visible recording spectrophotometer)

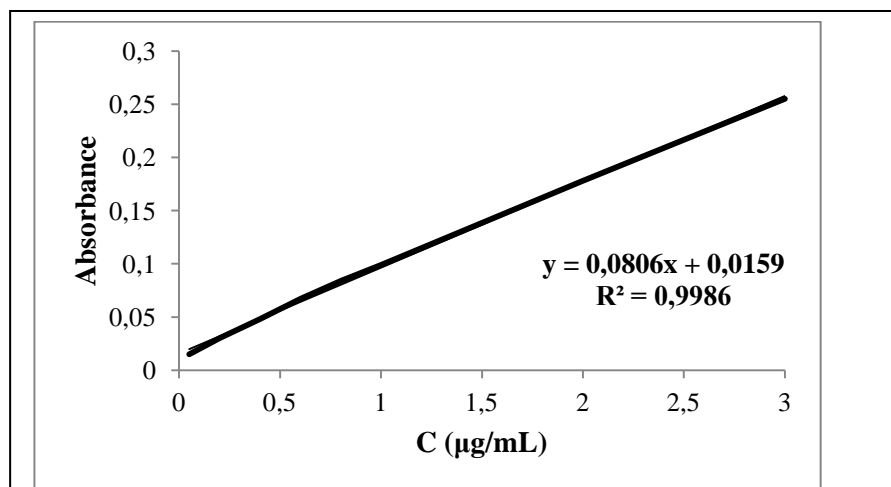
### **III. Κατασκευή καμπύλης αναφοράς**

Για την παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης DMC 100 μg/mL: Ζυγίζουμε 1mg DMC και διαλύουμε σε 2mL διαλύματος MeOH: EtOH 9:1. Εφαρμόζουμε υπερήχηση στο λουτρό υπερήχων για 5 min. Προσθήκη στάγδην H<sub>2</sub>O HPLC μέχρι εμφάνισης θολώματος. Αραίωση μέχρι τη χαραγή (10mL) με διάλυμα MeOH: EtOH 9:1. Ανακίνηση και παραλαβή διαυγούς κίτρινου διαλύματος.

Για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων: Από το διάλυμα παρακαταθήκης DMC 100 μg/mL μεταφέρουμε συγκεκριμένες ποσότητες στην κυψελίδα και αραιώνουμε ως τα 3mL με H<sub>2</sub>O HPLC.

Φασματοφωτομέτρηση των πρότυπων διαλυμάτων στο Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ορατού, αφού μηδενίσουμε με τυφλό (H<sub>2</sub>O HPLC), στα 418nm, όπου

σύμφωνα με το φάσμα (Εικόνα 33) εμφανίζει η DMC μέγιστη



**Εικόνα 40:** Καμπύλη αναφοράς DMC.

απορρόφηση ( $\lambda_{\max}=418\text{nm}$ ).

Κατασκευή καμπύλης αναφοράς (Εικόνα 40).

Ακολούθως μετρούνται τα δείγματα από τις καθαρισμένες (αφού έχουν περάσει από στήλη) διασπορές των συστημάτων HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC και με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς, υπολογίζεται η συγκέντρωση (µg/mL) της ενσωματωμένης στα λιποσώματα DMC.

Από το συνολικό όγκο (mL) των κλασμάτων της καθαρισμένης διασποράς και από τη συγκέντρωση (µg/mL) αυτή βρίσκουμε την πειραματική μάζα (mg) (η μάζα της DMC που περιέχεται στην κάθε διασπορά μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας- παρασκευή και διαπέραση από στήλη).

#### IV. Υπολογισμοί

$$\text{Ανάκτηση DMC (\%)} = \frac{\text{Πειραματική μάζα DMC}}{\text{Θεωρητική μάζα DMC}} (\%) \quad (1)$$

Όπου, **Θεωρητική μάζα DMC (mg)**: η μάζα (mg) DMC, που είχε ζυγιστεί πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας (παρασκευή και διαπέραση από στήλη) και **Πειραματική μάζα DMC (mg)**: η μάζα (mg) DMC, που ποσοτικοποιήθηκε μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας (παρασκευή και διαπέραση από στήλη).

Το ποσοστό αυτό του βιοδραστικού μορίου DMC, είναι αυτό που βρέθηκε να έχουμε στα συστήματα στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας (παρασκευή και διαπέραση από στήλη), ως προς την αρχική μάζα βιοδραστικού μορίου που είχαμε ζυγίσει πριν την παρασκευή.

Για κάθε σύστημα χρησιμοποιήθηκαν τρία δείγματα (τρία διαφορετικά κλάσματα από τη στήλη), όπου ποσοτικοποιήθηκε η περιεχομένη DMC. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε στο Excel, ώστε να βρεθούν η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των τριών δειγμάτων.

## **2.7 Ποσοτικοποίηση του λιπιδίου HSPC στα γυμναστικά συστήματα HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC**

### **Μέθοδος Stewart**

Η μέθοδος Stewart χρησιμοποιείται, προκειμένου να προσδιοριστεί η ακριβής συγκέντρωση του λιπιδίου στα λιποσωμιακά δείγματα. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα των φωσφολιπιδίων, να σχηματίζουν σύμπλοκο με το σιδηροθειοκυανιούχο αμμώνιο σε οργανικό διάλυμα. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι, ότι η παρουσία ανόργανου φωσφόρου (π.χ. στην προκειμένη περίπτωση του PBS) δεν παρεμποδίζει την ανάλυση. Η συσχέτιση των τιμών απορρόφησης με τη συγκέντρωση του φωσφολιπιδίου πραγματοποιείται με κατασκευή αντίστοιχης καμπύλης αναφοράς (Stewart 1980).

#### **I. Υλικά**

- $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  (Iron (III) chloride hexahydrate)
- $\text{NH}_4\text{SCN}$  (Ammonium thiocyanate)
- $\text{H}_2\text{O}$  HPLC (PRO<sup>TM</sup>PS Labconco System)
- Χλωροφόρμιο  $\text{CHCl}_3$  (Fischer Chemical)
- Θεϊκό Νάτριο Άνυδρο  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  Anhydrous (Merck)
- L- $\alpha$ -phosphatidylcholine, hydrogenated (Soy) (HSPC) (Avanti Polar Lipids Inc., Albaster, AL, USA)
- παρασκευασθέντα συστήματα HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC



## II. Όργανα

- Ζυγός (College B154, Mettler-Toledo, Switzerland)
- Μικροσύριγγες 100μL και 1000μL Hamilton microliter™ syringes (Bonaduz AG, Switzerland)
- Συσκευή ανάδευσης RCT basic IKA labotechnik
- Συσκευή Vortex (Velp scientifica)
- Φυγόκεντρος (RotoFix 32A)
- Υάλινη πιπέτα Pasteur Hieschmann©
- Υάλινες Κυψελίδες 10x10 x48 mm
- Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ορατού (UV-160A SHIMADZU UV-Visible recording spectrophotometer)

## III. Παρασκευή αντιδραστηρίου Stewart

Επειδή το  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  προσροφά εύκολα την υγρασία, σχηματίζοντας μεγάλους κρυστάλλους, λειοτριβούμε σε πορσελάνινη κάψα.

Ζυγίζουμε 27.03 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  και 30.4 g  $\text{NH}_4\text{SCN}$  και διαλύουμε σε 1L  $\text{H}_2\text{O}$  HPLC. Με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα στη συσκευή ανάδευσης, αφήνουμε το διάλυμα να αναδευτεί μέχρι πλήρους διάλυσης του ιζήματος.

Παραλαβή αιματέρυθρου αντιδραστηρίου Stewart (Ammonium Ferrothiocyanate). Το αντιδραστήριο Stewart φυλάσσεται σε πλαστική φιάλη, σε σκιερό μέρος (περιτύλιξη με αλουμινόχαρτο), σε θερμοκρασία δωματίου και είναι σταθερό για αρκετούς μήνες μετά την παρασκευή του.

## IV. Διαδικασία

Για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων χρησιμοποιείται ένα διάλυμα παρακαταθήκης (stock solution) του λιπιδίου HSPC συγκέντρωσης 0,1 mg/mL ή 100 μg/mL σε χλωροφόρμιο ( $\text{CHCl}_3$ ). Για την παρασκευή του ζυγίζονται 1mg και διαλύονται ποσοτικά σε 10mL  $\text{CHCl}_3$ .

Από το διάλυμα παρακαταθήκης μεταφέρονται συγκεκριμένες ποσότητες σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες και αραιώνονται με  $\text{CHCl}_3$  έως τα 3mL. Στη συνέχεια προστίθενται 3mL αντιδραστήριο Stewart σε κάθε πρότυπο διάλυμα.

Ακολουθεί δυνατό Vortex για 5min, max Hz (το βήμα αυτό είναι πολύ σημαντικό, γιατί εκεί γίνεται η χρωματομετρική αντίδραση και γι αυτό απαιτεί πολύ ισχυρή ανάδευση).

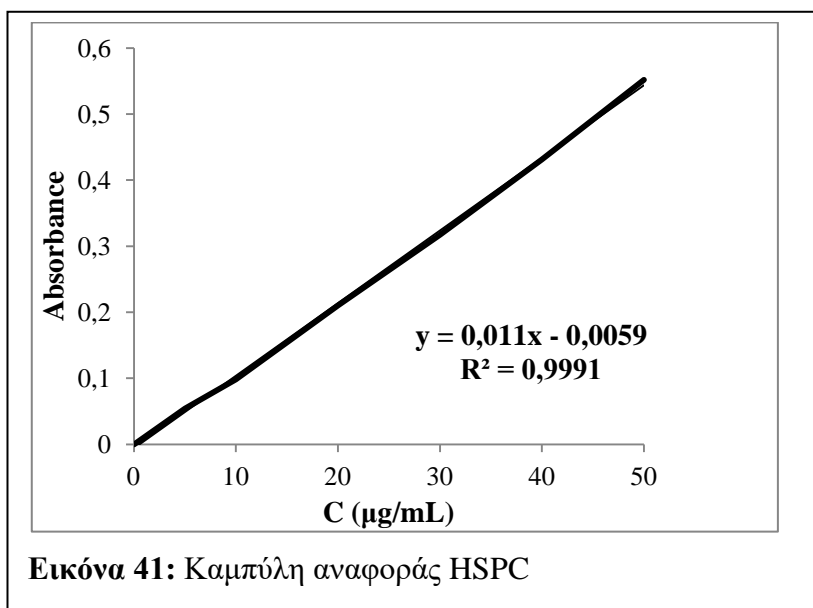
Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min στις 2000 rpm προς διαχωρισμό των δύο φάσεων.

Αφαιρούμε προσεκτικά την υπερκείμενη υδατική φάση με τη βοήθεια Υάλινης Πιπέτας Pasteur ή σύριγγας.

Προσθέτουμε μια μικρή ποσότητα  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  Anhydrous και εφαρμόζουμε λίγο Vortex.

Προκύπτει ίζημα, που έχει συγκρατήσει τυχόν υπολείμματα υδατικής φάσης.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5



min στις 1000 rpm, για να διαχωριστεί το ίζημα από την οργανική στοιβάδα.

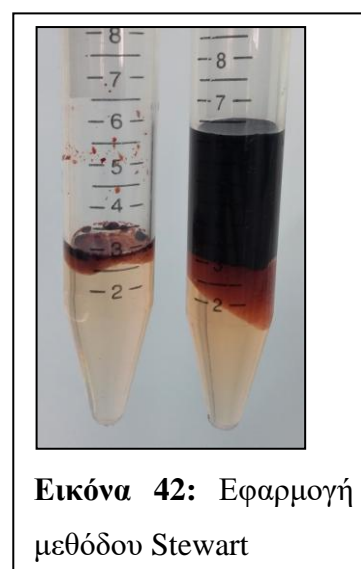
Με προσοχή παίρνουμε την οργανική στοιβάδα και τοποθετούμε σε υάλινη κυψελίδα.

Μετράμε την οπτική απορρόφηση στα 488nm.

Για το μηδενισμό, χρησιμοποιούμε τα τυφλά δείγμα που παρασκευάσαμε και κατασκευάζουμε καμπύλη αναφοράς  $A=f(\mu\text{g/mL})$  (**Εικόνα 41**).

Για τη μέτρηση των δειγμάτων, σε 30µL κολλοειδούς διασποράς (αφού έχει περάσει από στήλη) προσθέτουμε 3mL αντιδραστήριο Stewart και 3mL  $\text{CHCl}_3$  και ακολουθούμε την ίδια διαδικασία (**Εικόνα 42**).

Από την καμπύλη αναφοράς, βρίσκουμε τη συγκέντρωση του λιπιδίου HSPC στα



παρασκευασθέντα συστήματα HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC.

Από το συνολικό όγκο των κλασμάτων της καθαρισμένης διασποράς και από τη συγκέντρωση αυτή βρίσκουμε την πειραματική μάζα (η μάζα του HSPC που περιέχεται στην κάθε διασπορά μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας- παρασκευή και διαπέραση από στήλη).

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται τρεις φορές για κάθε σύστημα. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε στο Excel, ώστε να βρεθούν η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των τριών δειγμάτων.

#### V. Υπολογισμοί

- Υπολογισμός  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  HSPC από καμπύλη αναφοράς
- $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  HSPC  $\rightarrow$  /όγκος τελικού δείγματος (40 $\mu\text{L}$ )=  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
- $\mu\text{g}$  HSPC/ $\mu\text{L}$  (μέση τιμή των 3 τελικών δειγμάτων)=  $\mu\text{g}$  HSPC / $\mu\text{L}$  σε 30 $\mu\text{L}$  κ. διασποράς = mg HSPC /mL
- ( $\mu\text{g}$  HSPC / $\mu\text{L}$ )\*  $V_{(\text{μετά τη στήλη})}$ =  $\mu\text{g}$  HSPC (συνολικά στο δείγμα)
- Τελικά:

$$\text{Ανάκτηση HSPC (\%)} = \frac{\text{Πειραματική μάζα HSPC}}{\text{Θεωρητική μάζα HSPC}} (\%) \quad (2)$$

Όπου, **Θεωρητική μάζα HSPC (mg)**: η μάζα (mg) HSPC, που είχε ζυγιστεί πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας (παρασκευή και διαπέραση από στήλη) και **Πειραματική μάζα HSPC (mg)**: η μάζα (mg) HSPC, που ποσοτικοποιήθηκε μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας (παρασκευή και διαπέραση από στήλη).

Το ποσοστό αυτό του λιπιδίου HSPC, είναι αυτό που βρέθηκε να έχουμε στα συστήματα στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας (παρασκευή και διαπέραση από στήλη), ως προς την αρχική μάζα λιπιδίου που είχαμε ζυγίσει πριν την παρασκευή.

#### 2.8 Υπόλοιπα Χαρακτηριστικά Ενσωμάτωσης των γιμαιρικών συστημάτων HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC

$$\text{Ο.Π.Ε. (\%)} = \frac{\text{θεωρητικά moles βιοδραστικού μορίου DMC}}{\text{θεωρητικά moles λιπιδίου HSPC}} (\%) \quad (3)$$

Για τον υπολογισμό του Ο.Π.Ε. (%) (Ονομαστικού Ποσοστού Ενσωμάτωσης %) (ή Μοριακός Λόγος ή Drug Loading ή Drug Content %) υπολογίζονται αρχικά τα θεωρητικά moles, διαιρώντας τις θεωρητικές μάζες βιοδραστικού μορίου και λιπιδίου με τα αντίστοιχα Μοριακά Βάρη τους.

$$\text{Π.Ε. (\%)} = \frac{\text{πειραματικά moles βιοδραστικού μορίου DMC}}{\text{πειραματικά moles λιπιδίου HSPC}} (\%) \quad (4)$$

Για τον υπολογισμό του Π.Ε. (%) (Ποσοστού Ενσωμάτωσης %) (ή Μοριακός Λόγος ή Drug Loading ή Drug Content %) υπολογίζονται αρχικά τα πειραματικά moles, διαιρώντας τις πειραματικές μάζες βιοδραστικού μορίου και λιπιδίου με τα αντίστοιχα Μοριακά Βάρη τους.

$$\text{Α.Ε. (\%)} = \frac{\text{Π.Ε.}}{\text{Ο.Π.Ε.}} (\%) \quad (5)$$

όπου Α.Ε. (%) το Ποσοστό Αποτελεσματικής Ενσωμάτωσης Α.Ε. (%) (ή Entrapment Efficiency %).

## **2.9 Όξινο πρωτόκολλο στα κενά γμαιορικά συστήματα HSPC:PnBA-b-PAA (15/85) και στα γμαιορικά συστήματα HSPC:PnBA-b-PAA (15/85): DMC**

### **I. Υλικά**

- Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος/κιτρικού νατρίου (Citrate Buffer) με pH=4.0
- H<sub>2</sub>O HPLC (PRO<sup>TM</sup>PS Labconco System)
- παρασκευασθέντα συστήματα HSPC:PnBA-b-PAA (15/85) και HSPC:PnBA-b-PAA (15/85): DMC

### **II. Όργανα**

- Μικροσύριγγες 100μL και 1000μL Hamilton microliter<sup>TM</sup> syringes (Bonaduz AG, Switzerland)
- Κυψελίδες 10x10 x48 mm (Sarstedt, Germany)

- Φασματοφωτόμετρο συσχέτισης φωτονίων (Zetasizer 3000 HAS, Malvern UK)

### **III. Μέθοδος**

Για να μπορέσουμε να επιβεβαιώσουμε την ιδιότητα της pH-ευαισθησίας του πολυμερούς PnBA-b-PAA (15/85) εφαρμόσαμε το όξινο πρωτόκολλο (pH-responsiveness test), τόσο στα κενά συστήματα HSPC: PnBA-b-PAA (15/85) όσο και στα συστήματα HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC.

Στις κυψελίδες, σε 100μL κάθε συστήματος προστέθηκαν 900μL ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού οξέος/κιτρικού νατρίου [Citrate Buffer (pH=4.0)]. Οι διασπορές αφέθηκαν σε ηρεμία για 20min. Ύστερα αραιώθηκαν με 2mL H<sub>2</sub>O HPLC.

Χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων (Dynamic Light Scattering, DLS) για τη μέτρηση μεγέθους [μέση υδροδυναμική διάμετρο D<sub>h</sub> (nm)] και δείκτη πολυδιασποράς PDI, καθώς και ηλεκτροφορητική σκέδαση φωτός (Electrophoretic Light Scattering, ELS) για τη μέτρηση του ζ-δυναμικού [ζ-pot (mV)]. Χρησιμοποιήθηκε το όργανο Zetasizer Particle Size and Zeta Potential Analyser 3000 της Malvern Instruments Ltd.

Ακολούθως, συγκρίναμε τις μετρήσεις αυτές με τις αντίστοιχες τιμές, που παρουσίασαν τα λιποσώματα σε PBS (pH=7.4) (οι μετρήσεις και των δύο μέσων που συγκρίνονται, έλαβαν μέρος την ίδια μέρα από την ημέρα παρασκευής).

#### **2.10 Μελέτη αποδέσμευσης του βιοδραστικού μορίου DMC από τα χιμαιρικά συστήματα HSPC:PnBA-b-PAA (15/85): DMC**

##### **I. Υλικά**

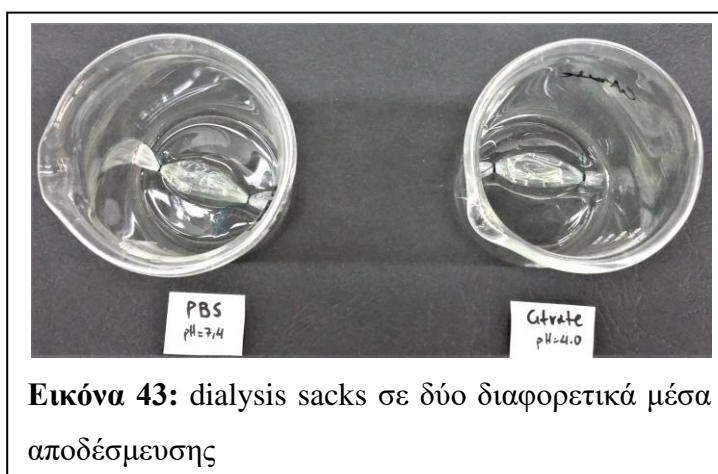
- Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος/κιτρικού νατρίου (Citrate Buffer) με pH=4.0
- Διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline) με pH=7.4
- παρασκευασθέντα συστήματα HSPC:PnBA-b-PAA (15/85): DMC
- Dialysis sacks molecular weight cut off 12.000 (Sigma Aldrich)

## II. Όργανα

- Υδατόλουτρο (Memmert WNB)
- Μικροσύριγγες 100μL και 1000μL Hamilton microliter™ syringes (Bonaduz AG, Switzerland)
- Κυψελίδες 10x10 x48 mm (Sarstedt, Germany)
- Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ορατού (UV-160A SHIMADZU UV-Visible recording spectrophotometer)

## III. Διαδικασία

Η αποδέσμευση της DMC από κάθε σύστημα μελετήθηκε σε δύο μέσα PBS (Phosphate Buffer Saline) με pH=7.4 και Citrate Buffer με pH=4.0. 300μL



από κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε dialysis sacks (**Εικόνα 43**).

Στο ποτήρι ζέσης γύρω από το dialysis sack προστέθηκαν 3mL μέσου διασποράς. Οι συνθήκες της δοκιμασίας αποδέσμευσης ήταν 37°C και 1.5rpm, ώστε να προσομοιάζεται το ανθρώπινο κύτταρο. Η συνολική μελέτη διήρκησε 8h και τα δείγματα ελήφθησαν στους εξής χρόνους 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8 h.

Η ποσότητα δείγματος που αφαιρούνταν κάθε φορά, αναπληρώνονταν με καθαρό μέσο PBS ή Citrate Buffer διασποράς αντίστοιχα, ώστε να διατηρούνται σταθερές οι συνθήκες δεξαμενής.

Τα δείγματα που ελήφθησαν, μετρήθηκαν στο Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ορατού, στα 418nm και με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς (**Εικόνα 40**) βρέθηκε η συγκέντρωσή τους σε DMC.

Η παραπάνω δοκιμασία αποδέσμευσης διεξήχθη την  $t=0$  (ημέρα παρασκευής), ώστε να προληφθεί η διαρροή περιεχομένου, λόγω καταστροφή της διασποράς με το πέρασμα του χρόνου  $t$ .

#### IV. Υπολογισμοί

$$\% \text{ release} = \sum_{t=0}^t (C_t/C_0)\% \quad (6)$$

Όπου, **% release**: το αθροιστικό ποσοστό του βιοδραστικού μορίου που αποδεσμεύεται στο χρόνο **t (h)**,

**C<sub>t</sub>**: η συγκέντρωση της DMC (μg/mL) στο μέσο αποδέσμευσης την εκάστοτε χρονική στιγμή **t (h)** που γίνεται η μέτρηση,

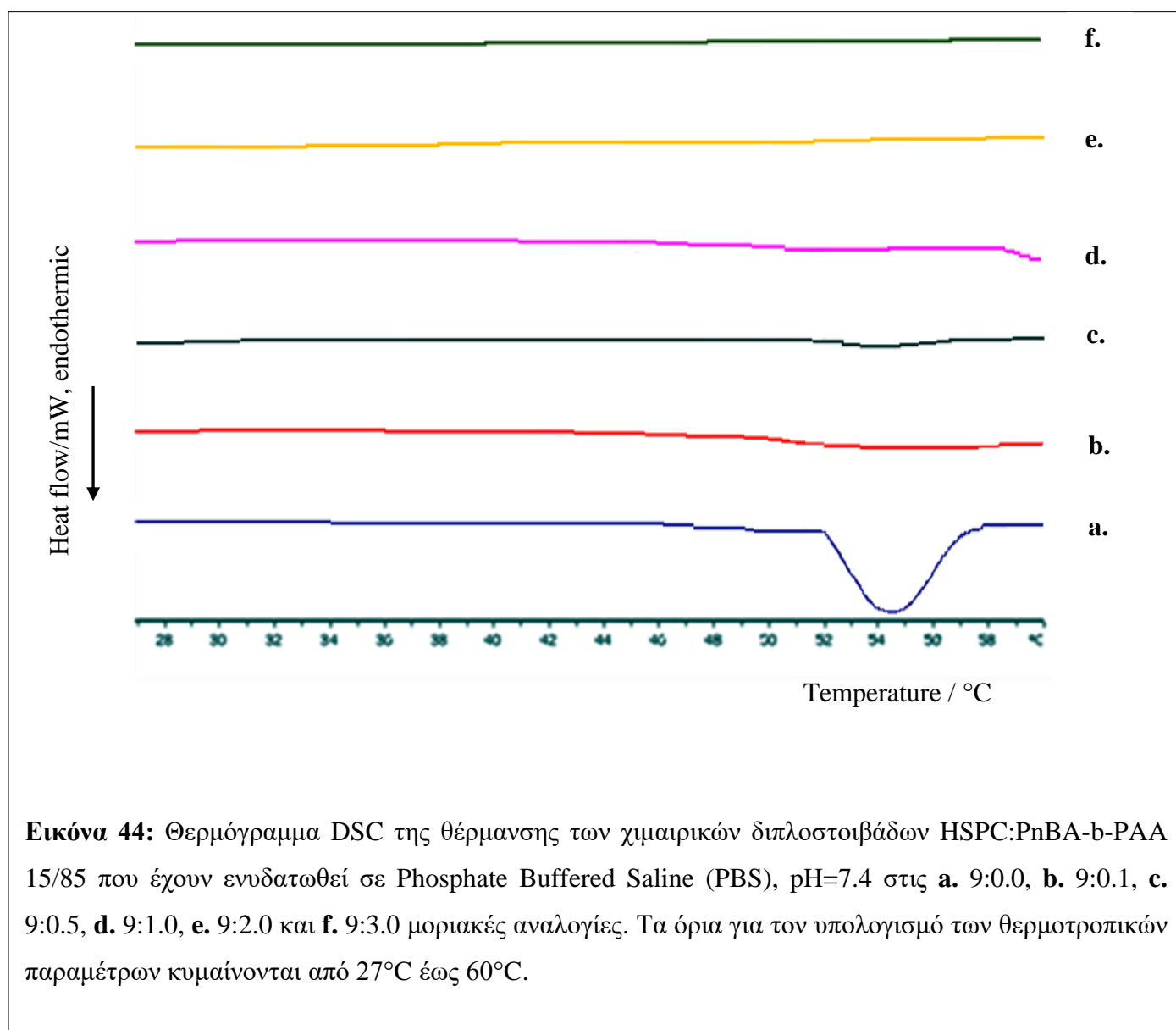
**C<sub>0</sub>**: η αρχική συγκέντρωση της DMC (μg/mL) στο dialysis sack τη χρονική στιγμή **t=0 (h)**.

# **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

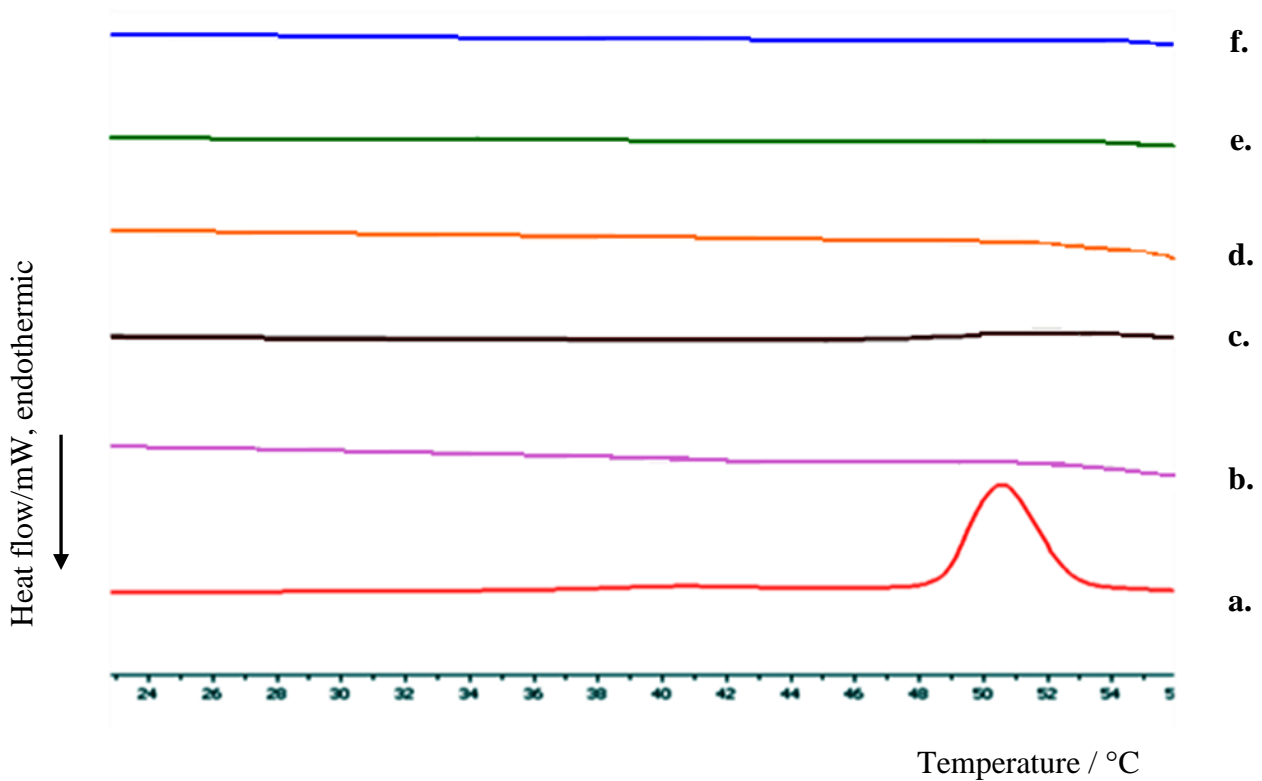


### 3.1 Εφαρμογή της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry - DSC) στις χημεικές διπλοστοιβάδες HSPC:PnBA-b-PAA (15/85)

#### 3.1.1 Η θερμοτροπική συμπεριφορά των χημεικών διπλοστοιβάδων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85) που ενυδατώθηκαν σε Phosphate Buffered Saline (PBS), pH=7.4



**Εικόνα 44:** Θερμόγραμμα DSC της θέρμανσης των χημεικών διπλοστοιβάδων HSPC:PnBA-b-PAA 15/85 που έχουν ενυδατωθεί σε Phosphate Buffered Saline (PBS), pH=7.4 στις **a.** 9:0.0, **b.** 9:0.1, **c.** 9:0.5, **d.** 9:1.0, **e.** 9:2.0 και **f.** 9:3.0 μοριακές αναλογίες. Τα όρια για τον υπολογισμό των θερμοτροπικών παραμέτρων κυμαίνονται από 27°C έως 60°C.



**Εικόνα 45:** Θερμόγραμμα DSC της ψύξης των χημικών διπλοστοιβάδων HSPC:PnBA-b-PAA 15/85 που έχουν ενυδατωθεί σε Phosphate Buffered Saline (PBS), pH=7.4 στις **a.** 9:0.0, **b.** 9:0.1, **c.** 9:0.5, **d.** 9:1.0, **e.** 9:2.0 και **f.** 9:3.0 μοριακές αναλογίες. Τα όρια για τον υπολογισμό των θερμοτροπικών παραμέτρων κυμαίνονται από 27°C έως 60°C.

Sample	molar ratio	Cycle	T <sub>onset,m</sub> /°C	T <sub>m</sub> /°C	ΔT <sub>1/2,m</sub> /°C	ΔH <sub>m</sub> / J mol <sup>-1</sup>	T <sub>onset,s</sub> /°C	T <sub>s</sub> /°C	ΔT <sub>1/2,s</sub> /°C	ΔH <sub>s</sub> / J mol <sup>-1</sup>
HSPC:PnBA-b-PAA	9:0.0	Heating	52.1	54.3	3.08	42.0	48.7	50.0	1.55	0.1
HSPC:PnBA-b-PAA	9:0.1	Heating	50.3	53.3	4.69	3.6	-	-	-	-
HSPC:PnBA-b-PAA	9:0.5	Heating	50.5	54.0	4.48	5.1	-	-	-	-
HSPC:PnBA-b-PAA	9:1.0	Heating	50.01	53.1	4.26	2.6	-	-	-	-
HSPC:PnBA-b-PAA	9:2.0	Heating	50.0	55.8	3.79	0.5	-	-	-	-
HSPC:PnBA-b-PAA	9:3.0	Heating	50.0	56.4	6.43	0.5	-	-	-	-
HSPC:PnBA-b-PAA	9:0.0	Cooling	52.8	50.5	2.43	46.7	-	-	-	-
HSPC:PnBA-b-PAA	9:0.1	Cooling	55.4	50.6	5.77	6.1	-	-	-	-
HSPC:PnBA-b-PAA	9:0.5	Cooling	55.4	51.8	3.73	5.3	-	-	-	-
HSPC:PnBA-b-PAA	9:1.0	Cooling	55.4	51.2	5.84	7.4	-	-	-	-
HSPC:PnBA-b-PAA	9:2.0	Cooling	55.4	53.5	5.13	1.8	-	-	-	-
HSPC:PnBA-b-PAA	9:3.0	Cooling	55.4	53.0	4.09	2.1	-	-	-	-

**Πίνακας 5:** Θερμοτροπικοί παράμετροι των χημικών διπλοστοιβάδων HSPC:PnBA-b-PAA 15/85 που έχουν ενυδατωθεί σε Phosphate Buffered Saline (PBS), pH=7.4.

T<sub>onset</sub>: η θερμοκρασία όπου αρχίζει το θερμικό φαινόμενο

T: η θερμοκρασία όπου η θερμοχωρητικότητα (ΔC<sub>p</sub>) υπό συνεχή πίεση είναι μέγιστη

ΔT<sub>1/2</sub>: το εύρος θερμοκρασίας που αντιστοιχεί στο μισό ύψος της καμπύλης μετάβασης

ΔH: η μεταβολή της ενθαλπίας κανονικοποιημένη ανά mol λιποσωματικού συστήματος

m: κύρια μετάβαση

s: δευτερεύουσα μετάβαση

Το λιπίδιο HSPC (Hydrogenated Soybean Phosphatidylcholine/ Υδρογονωμένη Φωσφατιδυλοχολίνη Σόγιας) αποτελείται από κορεσμένα λιπαρά οξέα (**Εικόνα 30**) και παρουσιάζει σχετικά υψηλές θερμοκρασίες μετάβασης φάσης, ακριβώς όπως και οι υπόλοιπες φωσφατιδυλοχολίνες, όπως π.χ. το λιπίδιο DPPC (dipalmitoylphosphatidylcholine/ διπαλμιτική φωσφατιδυλοχολίνη). Έτσι λοιπόν, το HSPC είναι κατάλληλο για την παρασκευή λιποσωμάτων (Kitayama et al., 2014). Το

PnBA-b-PAA 15/85 είναι ένα συμπολυμερές κατά συστάδες, που αποτελείται από το υδρόφιλο pH -ευαίσθητο τμήμα PAA και από το υδρόφοβο PnBA.

Οι αμιγείς διπλοστοιβάδες HSPC, που ενυδατώθηκαν σε PBS (Phosphate Buffer Saline), παρουσιάζουν δύο ενδόθερμες μεταβάσεις φάσης με την αύξηση της θερμοκρασίας στο εύρος θερμοκρασιών που εξετάστηκαν: μια ευρεία προμετάπτωση χαμηλής ενθαλπίας από τη φάση γέλης [gel phase ( $L_{\beta}$ )] στη ρυτιδωμένη [rippled ( $P_{\beta}$ )] στους 50.0 °C και μια οξεία κύρια μετάβαση από τη ρυτιδωμένη [rippled phase ( $P_{\beta}$ )] στην υγρή κρυσταλλική φάση [liquid crystal phase ( $L_a$ )] στους 54.3 °C. Οι θερμοτροπικοί παράγοντες της κύριας κορυφής (**Πίνακας 5**) είναι σύμφωνοι με την πρόσφατη βιβλιογραφία (Li et al., 2015; Kitayama et al. 2014; Chen et al., 2013; Chen et al., 2014).

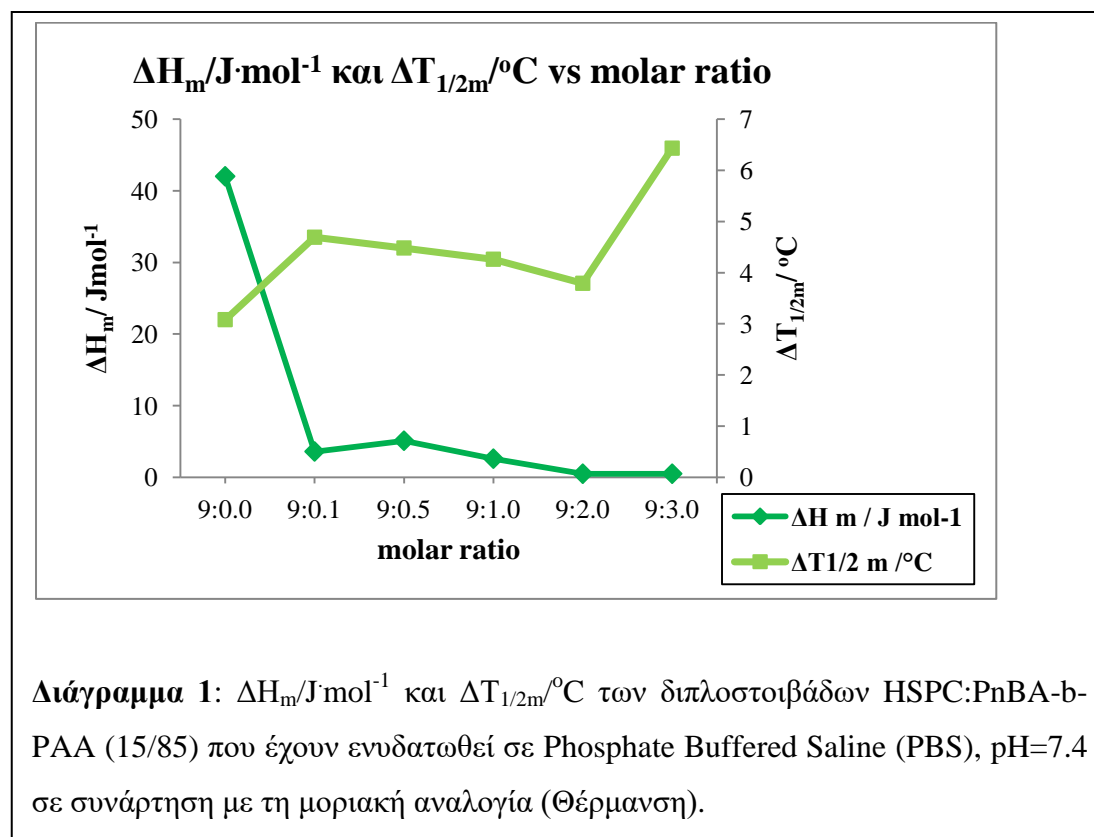
Στα θερμογράμματα των διπλοστοιβάδων PnBA-b-PAA 15/85, που έχουν ενυδατωθεί σε PBS, αντικατοπτρίζεται το γεγονός ότι η προμετάπτωση είναι πολύ ευαίσθητη στην παρουσία του πολυμερούς PnBA-b-PAA 15/85, με αποτέλεσμα να εξαφανίζεται ήδη από την αναλογία με το χαμηλότερο ποσοστό πολυμερούς (**Πίνακας 5, Εικόνα 44**), υποδηλώνοντας μια συνολική θερμική αποσταθεροποίηση της φάσης γέλης που υπήρχε στις διπλοστοιβάδες HSPC χωρίς πολυμερές. Οπότε, η παρουσία του συμπολυμερούς κατά συστάδες διαταράσσει το πακετάρισμα της κατάστασης γέλης, εξαφανίζοντας την προμετάπτωση (Benesch et al., 2016). Η εξαφάνιση της προμετάπτωσης μπορεί ίσως να αποδοθεί στην επαγωγή ενός  $L_{\beta}$ -like μοριακού προσανατολισμού από την παρουσία του συμπολυμερούς κατά συστάδες, όπως συμβαίνει και στην περίπτωση της ενσωμάτωσης της χοληστερόλης στη λιπιδική διπλοστοιβάδα (επειδή ο αμφίφιλος χαρακτήρας των συμπολυμερών μπορεί να παρομοιαστεί με την αμφίφιλη συμπεριφορά της χοληστερόλης). Είναι πιθανόν, τα μόρια του HSPC να διατάσσονται σχεδόν παράλληλα ως προς την κανονική διπλοστοιβάδα (Chen et al., 2013). Άλλη μια πιθανή εξήγηση είναι η εισχώρηση, τουλάχιστον σε μερικό ποσοστό, του συμπολυμερούς κατά συστάδες εντός των λιπιδικών διπλοστοιβάδων και ως συνέπεια της αλληλεπίδρασης αυτής, η διπλοστοιβάδα να αναγκάζεται σε μία μόνο διαμόρφωση πριν την κύρια μετάβαση, ενώ οι πολικές κεφαλές αλλάζουν την κινητικότητά τους και συνεπώς τη διάταξή τους, οδηγώντας σε εξαφάνιση της προμετάπτωσης (Bonora et al., 2003; Berényi et al., 2013). Επιπροσθέτως, το γεγονός ότι η προμετάπτωση εξαφανίζεται πλήρως, ήδη

από την αναλογία με το χαμηλότερο ποσοστό πολυμερούς, μας υποδεικνύει ότι η θέση του πολυμερούς ίσως βρίσκεται κοντά στη διεπιφάνεια της διπλοστοιβάδας (Matsingou et al., 2007). Πιθανόν, το πολυμερές βρίσκεται πολύ κοντά στην πολική κεφαλή της χολίνης, μέσω του σχηματισμού ισχυρών πολικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ομάδων  $-\text{COO}^-$  του πολυμερούς και των  $-\text{N}(\text{CH}_3)_3$  ομάδων του φωσφολιπιδίου (Di Foggia et al., 2016). Αυτό συμβαίνει, διότι το υδρόφοβο τμήμα PnBA, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, διαπερνά τη διπλοστοιβάδα, ενώ το υδρόφιλο PAA εκτείνεται εκτός διπλοστοιβάδας εξαιτίας της εκτεταμένης διαμόρφωσης, που παρουσιάζει στο ουδέτερο  $\text{pH}=7.4$  του PBS.

Η ενσωμάτωση του συμπολυμερούς κατά συστάδες μεταβάλλει τις τιμές των θερμοτροπικών χαρακτηριστικών (**Πίνακες 5, 6**). Αναλυτικά, η ενσωμάτωση του PnBA-b-PAA 15/85 προκάλεσε αλλαγές στη θερμοτροπική συμπεριφορά των διπλοστοιβάδων HSPC, επηρεάζοντας έντονα την ειδική ενθαλπία  $\Delta H_m$  της κύριας μετάβασης (**Εικόνα 44, Διάγραμμα 1**).

Συμφώνα με τη βιβλιογραφία, η  $\Delta H_m$  είναι η ενέργεια που απαιτείται για την trans-gausch διαμορφωτική αλλαγή των υδρογονανθρακικών αλυσίδων των φωσφολιπιδίων (chain melting), που λαμβάνει χώρα κατά την κύρια μετάβαση (Huang et al., 1999; Kitayama et al., 2014). Η ενθαλπία  $\Delta H_m$  της κύριας μετάβασης μειώθηκε σημαντικά στις διπλοστοιβάδες HSPC: PnBA-b-PAA 15/85 όλων των μοριακών αναλογιών, αλλά ειδικά στις δύο υψηλότερες αναλογίες 9:2.0 και 9:3.0. Σύμφωνα με το αντίστοιχο θερμόγραμμα (**Εικόνα 44**), καθώς αυξάνεται το ποσοστό του πολυμερούς στη μοριακή αναλογία, η κύρια κορυφή εξαφανίζεται, οδηγώντας ίσως σε μοντέλο με ιδιότητες ισότροπου υγρού (solution like model). Αναλυτικά, η ενσωμάτωση του συμπολυμερούς κατά συστάδες υγροποίησε τη μεμβράνη, με συνέπεια την καταστροφή της διπλοστοιβάδας. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι, το υδρόφοβο τμήμα PnBA παρεμβάλλεται μεταξύ των λιπιδίων, δρώντας ως "spacer", εξασθενώντας τις δυνάμεις van der Waals που ασκούνται μεταξύ των υδρόφοβων λιπιδικών αλυσίδων, προκαλώντας υδροφοβικά ελαττώματα, δημιουργώντας κενά ανεπιθύμητα από ενεργειακής απόψεως, εξωθώντας τη διπλοστοιβάδα να αλλάξει τη δομή της (εν τέλει καταστροφή της μεμβράνης) (Pirra et al., 2016). Η αλλαγή στη δομή συμβαίνει, ώστε να μπορέσει να ελαττώσει τα κενά αυτά και να ελαχιστοποιήσει τη συνολική ελεύθερη ενέργεια. Οπότε η ενέργεια, που απαιτείται

για να ρευστοποιηθεί η μεμβράνη, μειώνεται δραματικά (έντονη πτώση της  $\Delta H_m$ ) (Διάγραμμα 1) (Ceckler et al., 1997; Huang et al., 1999).



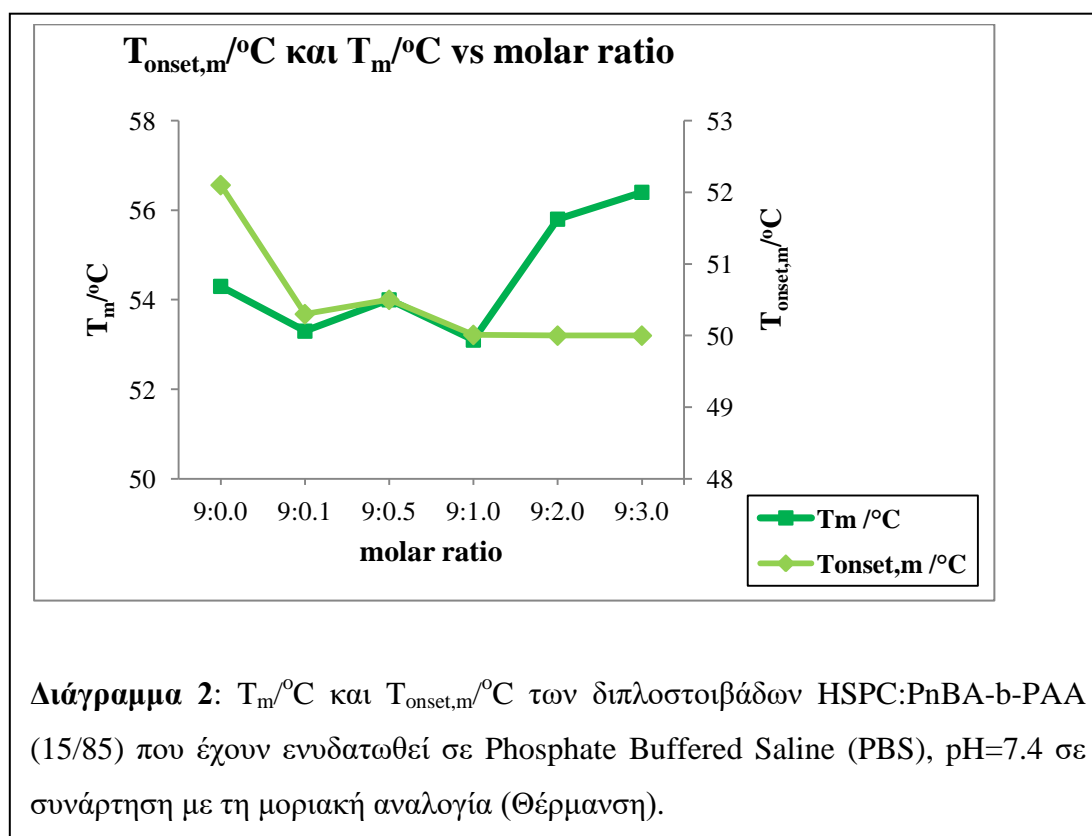
Η αύξηση του ποσοστού του πολυμερούς μείωσε σημαντικά τη συνεργασιμότητα μεταξύ του λιπιδίου HSPC και του πολυμερούς PnBA-b-PAA 15/85, γεγονός που αποδεικνύεται από την έντονη αύξηση των τιμών  $\Delta T_{1/2}$  (Πίνακας 5, Διάγραμμα 1). Επιπλέον, στην υψηλότερη μοριακή αναλογία η  $\Delta T_{1/2}$  διπλασιάστηκε. Αυτό είναι φανερό από την Εικόνα 44, όπου η οξεία κορυφή της διπλοστοιβάδας HSPC σταδιακά διαπλατύνθηκε και έχασε τη συμμετρία της. Αυτό οφείλεται στην εισαγωγή μια ξένης ουσίας (στην προκειμένη περίπτωση του πολυμερούς) μέσα στη λιπιδική διπλοστοιβάδα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η συνολική επιφάνεια των λιποσωμάτων μπορεί να υποδιαιρεθεί σε περιοχές ή «clusters», όπου όλα τα μόρια παρουσιάζουν τον ίδιο προσανατολισμό: η τήξη/ρευστοποίηση προκύπτει από τη συνεργασία και τη σύγχρονη αλλαγή φάσης όλων των μορίων μέσα σε κάθε cluster. Όσο πιο ομοιογενή και μεγάλου μεγέθους είναι τα «clusters», τόσο μεγαλύτερη είναι η συνεργασιμότητα της διαδικασίας τήξης και συνεπώς, οι κορυφές παρουσιάζονται πιο οξείες και πιο συμμετρικές. Η παρουσία ξένων ουσιών, που είναι σε θέση να διεισδύσουν στη διπλοστοιβάδα, προκαλεί αισθητή αύξηση των «clusters» σε αριθμό,

τα οποία γίνονται επίσης όλο και μικρότερα και με περισσότερες διακλαδώσεις, όπως συνάγεται από θεωρητικές μελέτες. Κατά συνέπεια, η συνεργασιμότητα της διαδικασίας τήξης μειώνεται, με επακόλουθες συνέπειες τη μετάπτωση των τιμών  $T_m$  σε χαμηλότερες, καθώς και τη διεύρυνση των καμπυλών μετάβασης (Di Foggia et al., 2016; Ohtake et al., 2015). Έτσι, αυτά τα υδρόφοβα ελαττώματα που αναφέρονται παραπάνω, θα μπορούσαν επίσης να χαρακτηριστούν ως nanoclusters, τα οποία κατανέμονται ανομοιογενώς στο εσωτερικό της διπλοστοιβάδας των λιπιδίων, σχηματίζοντας περιοχές υψηλής συγκέντρωσης σε PnBA, γνωστές και ως nanodomains, τα οποία εν τέλει μειώνουν τη συνεργασιμότητα του συστήματος δραματικά (γι αυτό και παρουσιάζονται δραματική αύξηση της  $\Delta T_{1/2}$  και ταυτόχρονα διεύρυνση της κύριας κορυφής μετάβασης). Η αναντιστοιχία μήκους μεταξύ της μακριάς αλυσίδας αλκυλίου και της μικρής συστάδας PnBA ενισχύει τη δημιουργία των κενών αυτών που περιγράφηκαν παραπάνω (Matsingou et al., 2007; Fujiwara et al., 1997). Το φαινόμενο αυτό δε, έγινε εντονότερο καθώς αυξήθηκε η ποσότητα του πολυμερούς στη μοριακή αναλογία, οδηγώντας σε πτώση της συνεργασιμότητας του συστήματος, εξηγώντας την έντονη μείωση των τιμών  $\Delta H_m$  στις υψηλότερες μοριακές αναλογίες (**Διάγραμμα 1**). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το φαινόμενο αυτό αντανakλά πιθανόν φαινόμενα ρευστοποίησης της διπλοστοιβάδας (solution-like model), που λαμβάνουν μέρος στις δύο υψηλότερες μοριακές αναλογίες. Παρουσία ξένων ουσιών, όπως σε αυτή την περίπτωση του πολυμερούς, που μπορούν και διαπερνούν στη διπλοστοιβάδα μετατρέποντας το σύστημα σε "solution like", προκαλείται μια τροποποίηση στο σχήμα και στην κατανομή μεγέθους των nanoclusters, ενώ παράλληλα ο αριθμός τους αυξάνεται αισθητά. Ταυτόχρονα, τα «clusters» γίνονται μικρότερα με περισσότερο διακλαδισμένη επιφάνεια. Συνεπώς, η συνεργασιμότητα της διαδικασίας τήξης μειώνεται και οι κορυφές μετάβασης διευρύνονται αισθητά (Bonora et al., 2003).

Σε αντίθεση με την  $\Delta H_m$ , τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά δε μεταβάλλονται τόσο έντονα. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι, η αλληλεπίδραση του συμπολυμερούς κατά συστάδες με τις διπλοστοιβάδες HSPC επηρεάζει την κινητικότητα των πολικών κεφαλών του λιπιδίου (δραματική μείωση της  $\Delta H_m$ ) πολύ περισσότερο από την κινητικότητα των υδρογονανθρακικών [παλμιτικών (16C) και στεαρικών (18C)] αλυσίδων του (μικρή μεταβολή της  $T_m$ , καθώς και των υπόλοιπων υπολογισμένων θερμοτροπικών παραμέτρων) (Pirra et al., 2014). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το

γεγονός ότι, το PBS αποτελεί ένα μέσο διασποράς με αυξημένη ιονική ισχύ, οπότε τα ιόντα αυτά αντιδρούν έντονα με τις λιπιδικές πολικές κεφαλές. Υπάρχουν ίσως αλληλεπιδράσεις, στην περιοχή της πολικής ομάδας της κεφαλής της λιπιδικής διπλοστοιβάδας, είτε επαγόμενες από ιόντα είτε από το δίκτυο δεσμών υδρογόνου (Κογοπονα et al., 1998). Επιπλέον το τμήμα PAA του πολυμερούς περιέχει μια καρβοξυλομάδα  $-\text{COOH}$  ( $\text{pK}_a \approx 4.2$ ) (Εικόνα 31), οπότε στο PBS ( $\text{pH}=7.4$ ) η  $-\text{COOH}$  πρωτονιώνεται σε  $-\text{COO}^-$ , αυξάνοντας όλο και περισσότερο την ιονική ισχύ, ενισχύοντας το παραπάνω φαινόμενο.

Αναλυτικά, η  $T_{\text{onset,m}}$  μειώνεται κατά  $2^\circ\text{C}$  περίπου σε όλες τις μοριακές αναλογίες, ενώ η  $T_m$  [ $T_m$ : η θερμοκρασία όπου η θερμοχωρητικότητα ( $\Delta C_p$ ) υπό σταθερή πίεση είναι μέγιστη] στις πρώτες μοριακές αναλογίες μειώνεται, αλλά αυξάνεται στις δύο υψηλές μοριακές αναλογίες (9:2.0, 9:3.0) (Πίνακας 5, Διάγραμμα 2).

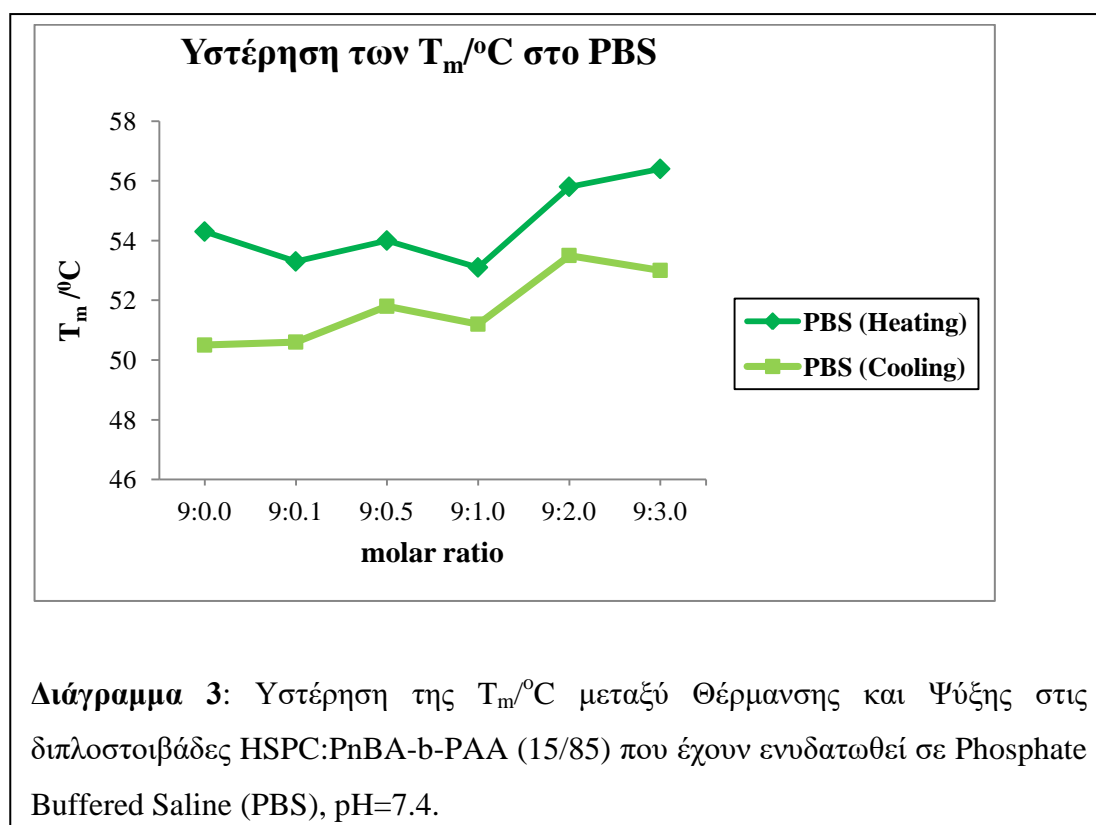


Η μεταβολή στην τιμή της  $T_m$  υποδηλώνει την ενσωμάτωση του πολυμερούς (το ενσωματωμένο πολυμερές μπορεί να χαρακτηριστεί ως πρόσμιξη, με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται το σημείο τήξης  $T_m$  της διπλοστοιβάδας). Το υδρόφοβο τμήμα PnBA του συμπολυμερούς, εισερχόμενο μέσα στη διπλοστοιβάδα, γεμίζει τα κενά μεταξύ των υδρογονανθρακικών αλυσίδων, αλλά όντας σε λιγότερο ποσοστό στη δομή του

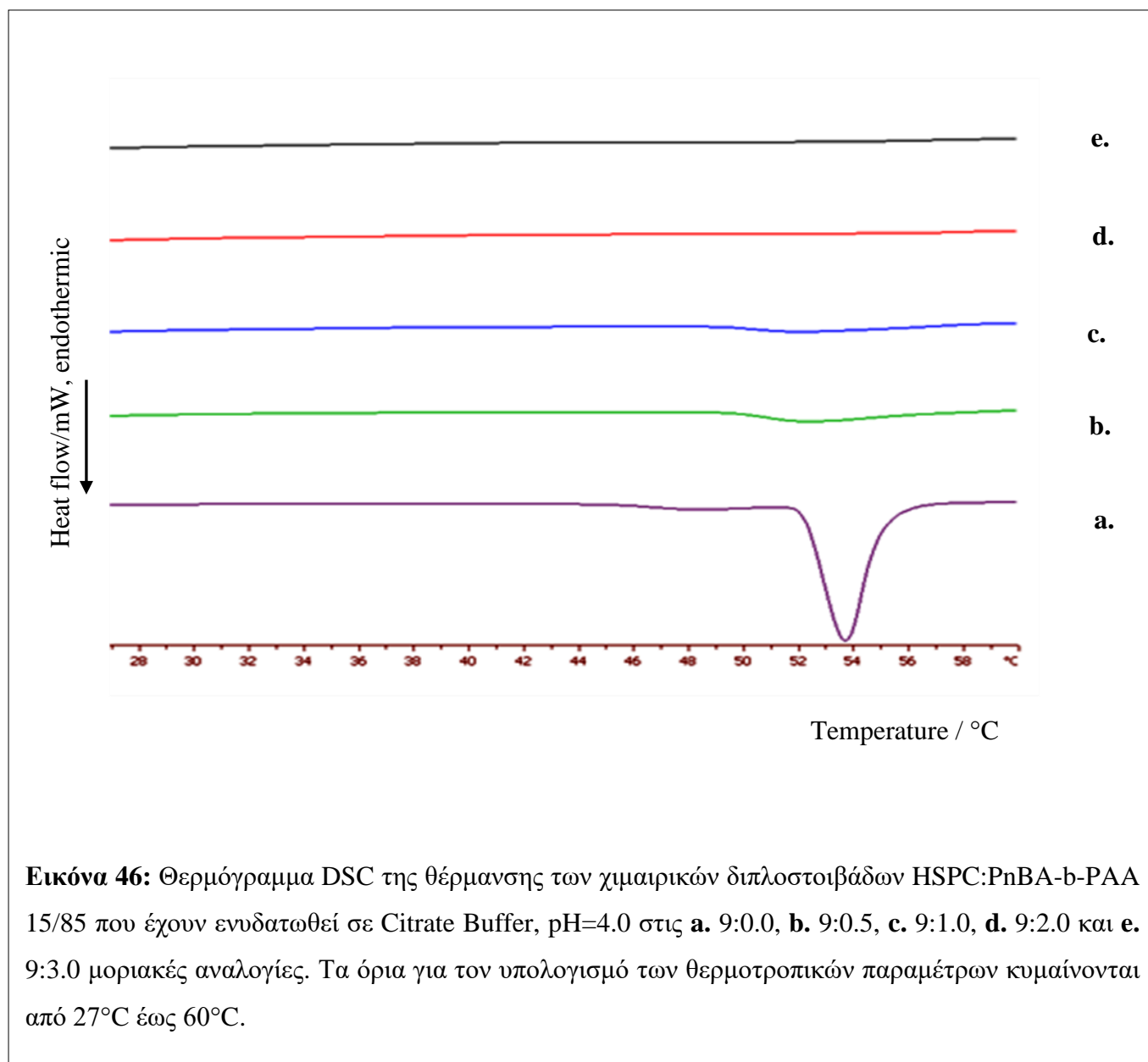


πολυμερούς σε σχέση με το υδρόφιλο PAA (15/85), δεν προκαλεί έντονη μετάπτωση της τιμής της  $T_m$ . Ακόμα, μπορούμε να σημειώσουμε, ότι η μεταβολή της  $T_m$  είναι αντίστροφη από αυτή της  $\Delta H_m$ , όπως ήταν και αναμενόμενο, καθώς η αύξηση της  $T_m$  αποσταθεροποιεί τη μεμβράνη, οπότε μικρότερη ποσότητα ενέργειας ( $\Delta H_m$ ) απαιτείται για να ρευστοποιήσει τη μεμβράνη.

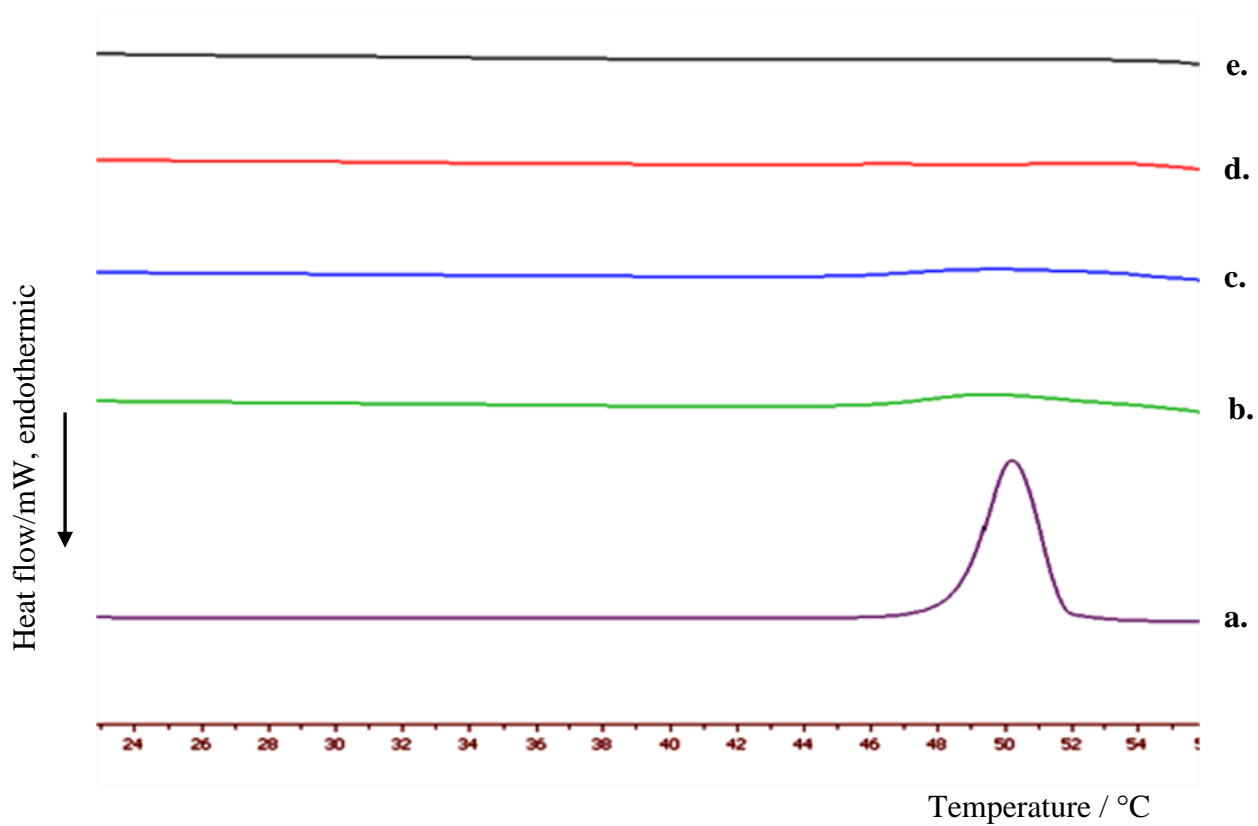
Παρατηρώντας τα θερμογράμματα ψύξης DSC και τις υπολογισμένες παραμέτρους (Εικόνα 45, Πίνακας 5, Διάγραμμα 3), παρατηρούμε μια μικρή υστέρηση των τιμών στις χημεικές διπλοστοιβάδες HSPC:PnBA-b-PAA 15/85 σε όλες τις μοριακές αναλογίες. Λαμβάνοντας υπόψη τον αμφίφιλο χαρακτήρα του συμπολυμερούς κατά συστάδες, η υστέρηση αυτή ίσως υποδηλώνει το σχηματισμό μιας φάσης ενδοεισχώρησης. Η καινούρια αυτή φάση σχηματίζεται στην προσπάθεια του συστήματος, να αντιμετωπίσει την αποσταθεροποίηση του από την εισαγωγή των υδρόφοβων "PnBA nanodomains". Η ενδοεισχώρηση γενικώς δημιουργείται ως μια προσπάθεια της λιπιδικής διπλοστοιβάδας, να ελαχιστοποιήσει την ελεύθερη ενέργεια και να παραμείνει θερμοδυναμικά σταθερή. Οπότε, σε όλες τις μοριακές αναλογίες η ενσωμάτωση του PnBA-b-PAA 15/85, προκάλεσε τη δημιουργία μιας νέας φάσης και ίσως αυτή να αποτελεί μια φάση ενδοεισχώρησης (Demetzos 2008; Pippa et al., 2015).



**3.1.2 Η θερμοτροπική συμπεριφορά των χμαιορικών διπλοστοιβάδων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85) που ενυδατώθηκαν σε Citrate Buffer, pH=4.0**



**Εικόνα 46:** Θερμογράμμο DSC της θέρμανσης των χμαιορικών διπλοστοιβάδων HSPC:PnBA-b-PAA 15/85 που έχουν ενυδατωθεί σε Citrate Buffer, pH=4.0 στις **a.** 9:0.0, **b.** 9:0.5, **c.** 9:1.0, **d.** 9:2.0 και **e.** 9:3.0 μοριακές αναλογίες. Τα όρια για τον υπολογισμό των θερμοτροπικών παραμέτρων κυμαίνονται από 27°C έως 60°C.



**Εικόνα 47:** Θερμόγραμμα DSC της ψύξης των χημικών διπλοστοιβάδων HSPC:PnBA-b-PAA 15/85 που έχουν ενυδατωθεί σε Citrate Buffer, pH=4.0 στις **a.** 9:0.0, **b.** 9:0.5, **c.** 9:1.0, **d.** 9:2.0 και **e.** 9:3.0 μοριακές αναλογίες. Τα όρια για τον υπολογισμό των θερμοτροπικών παραμέτρων κυμαίνονται από 27°C έως 60°C.

Sample	molar ratio	Cycle	T <sub>onset,m</sub> /°C	T <sub>m</sub> /°C	ΔT <sub>1/2,m</sub> /°C	ΔH <sub>m</sub> / J mol <sup>-1</sup>	T <sub>onset,s</sub> /°C	T <sub>s</sub> /°C	ΔT <sub>1/2,s</sub> /°C	ΔH <sub>s</sub> / J mol <sup>-1</sup>
HSPC:PnBA-b-PAA	9:0.0	Heating	52.2	53.8	1.63	49.8	45.7	48.1	2.76	1.6
HSPC:PnBA-b-PAA	9:0.5	Heating	49.6	52.4	4.69	9.8	-	-	-	-
HSPC:PnBA-b-PAA	9:1.0	Heating	49.1	52.3	5.80	7.1	-	-	-	-
HSPC:PnBA-b-PAA	9:2.0	Heating	48.6	56.5	7.86	1.4	-	-	-	-
HSPC:PnBA-b-PAA	9:3.0	Heating	48.6	53.0	5.13	0.9	-	-	-	-
HSPC:PnBA-b-PAA	9:0.0	Cooling	51.7	50.2	1.83	53.0	-	-	-	-
HSPC:PnBA-b-PAA	9:0.5	Cooling	55.6	49.5	5.50	11.2	-	-	-	-
HSPC:PnBA-b-PAA	9:1.0	Cooling	55.1	50.1	6.54	7.7	-	-	-	-
HSPC:PnBA-b-PAA	9:2.0	Cooling	55.6	53.2	4.13	3.1	-	-	-	-
HSPC:PnBA-b-PAA	9:3.0	Cooling	55.6	52.5	5.13	2.0	-	-	-	-

**Πίνακας 6:** Θερμοτροπικοί παράμετροι των χμιαϊρικών διπλοστοιβάδων HSPC:PnBA-b-PAA 15/85 που έχουν ενυδατωθεί σε Citrate Buffer, pH=4.0.

T<sub>onset</sub>: η θερμοκρασία όπου αρχίζει το θερμικό φαινόμενο

T: η θερμοκρασία όπου η θερμοχωρητικότητα (ΔC<sub>p</sub>) υπό συνεχή πίεση είναι μέγιστη

ΔT<sub>1/2</sub>: το εύρος θερμοκρασίας που αντιστοιχεί στο μισό ύψος της καμπύλης μετάβασης

ΔH: η μεταβολή της ενθαλπίας κανονικοποιημένη ανά mol λιποσωματικού συστήματος

m: κύρια μετάβαση

s: δευτερεύουσα μετάβαση

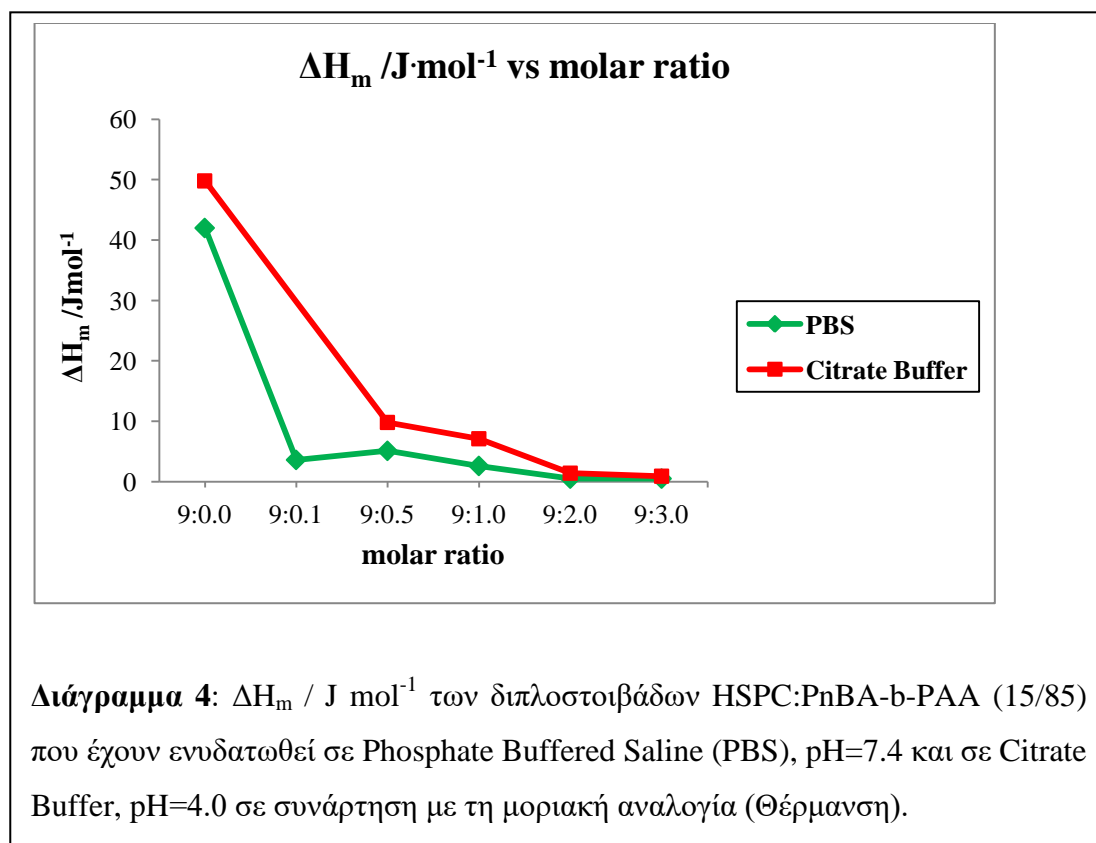
Η διπλοστοιβάδα HSPC παρουσιάζει διαφορετική θερμοτροπική συμπεριφορά στα δύο μέσα διασποράς. Η προμετάπτωση έχει παρόμοιες τιμές, με εξαίρεση το εύρος της καμπύλης της, αφού στο όξινο περιβάλλον η προμετάπτωση διαπλατύνθηκε (Πίνακας 6, Εικόνα 46). Το όξινο pH οδήγησε σε μια πιο οξεία κύρια κορυφή μετάπτωσης (το ΔT<sub>1/2</sub> έχει διπλασιαστεί), ενώ τα υπόλοιπα τρία χαρακτηριστικά δεν έχουν μεταβληθεί ιδιαίτερα. Η οξύτερη κορυφή της απλής HSPC διπλοστοιβάδας που εμφανίζεται στο όξινο περιβάλλον, σε αντίθεση με την αντίστοιχη του ουδέτερου PBS, οφείλεται ίσως στην πρωτονίωση της φωσφορικής ομάδας της φωσφατιδυλογολίνης παρουσία του οξέος. Το γεγονός αυτό επηρεάζει τη συμπεριφορά στη μεσόφαση, σταθεροποιώντας τη μεμβράνη, δημιουργώντας

περισσότερους δεσμούς υδρογόνου και ως αποτέλεσμα μεταβάλλει τις τιμές της  $T_m$  (Koyonova et al., 1998). Το φαινόμενο αυτό θεωρητικά γίνεται εντονότερο σε  $pH < 3$ , ωστόσο ήδη από το  $pH = 4.0$  του ρυθμιστικού διαλύματος των κιτρικών αρχίζει να διαφαίνεται μια μικρή διαφοροποίηση της  $T_m$ . Και στα δύο μέσα διασποράς, μπορούμε να διακρίνουμε από τα θερμογράμματα DSC, ότι κατά τη διαδικασία της ψύξης, οι κορυφές παρουσιάζονται περισσότερο συμμετρικές, καθώς και ότι οι περισσότερες από τις τιμές  $\Delta T_{1/2}$  είναι ελαφρώς χαμηλότερες από τις αντίστοιχες στους κύκλους της θέρμανσης (**Εικόνα 47**, **Πίνακας 6**). Η συμπεριφορά αυτή προφανώς οφείλεται στην υψηλότερη πλευρική κινητικότητα των αλυσίδων, που παρουσιάζουν στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση από ότι στη φάση γέλης (Bonora et al., 2003).

Η ενσωμάτωση του συμπολυμερούς κατά συστάδες PnBA-b-PAA 15/85, προκαλεί και στο όξινο μέσο διασποράς σοβαρές αλλαγές στη θερμοτροπική συμπεριφορά των HSPC λιπιδικών διπλοστοιβάδων. Οι αλλαγές αυτές είναι παρόμοιες και στα δύο μέσα διασποράς. Και στο όξινο και στο ουδέτερο pH η προμετάπτωση εξαφανίζεται. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των συστάδων του PAA και των λιπιδίων HSPC συμβαίνει πάνω στη μεμβρανική επιφάνεια, ενώ η κινητήρια δύναμη της αλληλεπίδρασης αυτής είναι ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου μεταξύ των μη ιονισμένων καρβοξυλομάδων του πολυμερούς και των φωσφορικών ομάδων των πολικών κεφαλών των λιπιδίων (Kenji et al., 1984). Στο γεγονός αυτό οφείλεται η εξαφάνιση της προμετάπτωσης. Εξάλλου, η προμετάπτωση συνδέεται άμεσα με την ελευθερία του μεγάλου άξονα περιστροφής των μορίων φωσφατιδυλοχολίνης, η οποία μειώνεται με το σχηματισμό των δεσμών υδρογόνου (Fujiiwara et al., 1997; Munaviron et al., 2014).

Ανάμεσα στις διαφορετικές μοριακές αναλογίες του μέσου διασποράς των κιτρικών, υπάρχουν μικρές μεταβολές στις τιμές των  $T_{onset,m}$  και  $T_m$ , αλλά δραματική μείωση της  $\Delta H_m$  (**Διάγραμμα 4**). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι, η αλληλεπίδραση του συμπολυμερούς κατά συστάδες με τις διπλοστοιβάδες HSPC επηρεάζει την κινητικότητα των πολικών κεφαλών του λιπιδίου (δραματική μείωση της  $\Delta H_m$ ) πολύ περισσότερο από την κινητικότητα των υδρογονανθρακικών αλυσίδων του (μικρή μεταβολή της  $T_m$ , καθώς και των υπόλοιπων υπολογισμένων θερμοτροπικών παραμέτρων) (Pirpa et al., 2014). Το πολυμερές προσροφάται στη λιπιδική επιφάνεια. Το φαινόμενο αυτό, πιθανόν προάγει την εισχώρηση των  $-C(O)-OH$

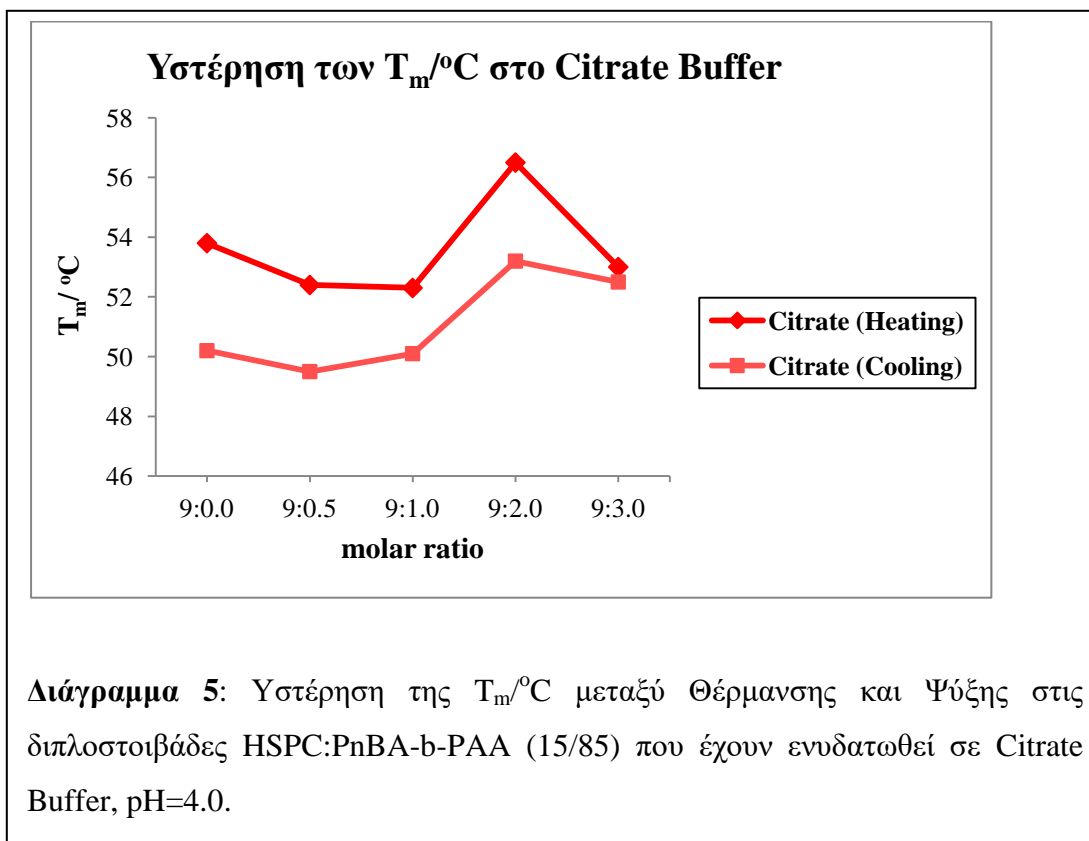
άκρων του PAA μεταξύ της χολίνης και των φωσφορικών τμημάτων των γειτονικών λιπιδικών μορίων, καθώς και την πιο "σφιχτή" οργάνωση των λιπιδικών μορίων που βρίσκονται πιο βαθιά στο σύστημα (C=O, C-O-C-O-C . . .). Όλες αυτές οι μεταβολές σχετίζονται άμεσα με τις αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν μεταξύ πολυμερούς και πολικής περιοχής της λιπιδικής μεμβράνης (Munaviron et al., 2014).



Η τιμή του ΔT<sub>1/2</sub> αυξάνεται, καθώς η ποσότητα του πολυμερούς αυξάνεται στη μοριακή αναλογία (η 9:2.0 παρουσιάζει τη μέγιστη τιμή). Το γεγονός αυτό απεικονίζεται ανάγλυφα στο αντίστοιχο θερμογράμμα DSC (**Εικόνα 46**), όπου η διεύρυνση της κορυφής και η απώλεια της συμμετρίας της είναι εμφανείς και ιδιαίτερα έντονες. Επίσης, στο όξινο pH, η συνεργασιμότητα των λιπιδίων HSPC και του πολυμερούς PnBA-b-PAA 15/85 μειώθηκε σημαντικά με την αύξηση του ποσοστού πολυμερούς στη μοριακή αναλογία. Οι δύο υψηλότερες μοριακές αναλογίες παρουσιάζουν επίσης ιδιότητες ισότροπου υγρού (solution like model), όπως ακριβώς και οι αντίστοιχες μοριακές αναλογίες στο PBS.

Στις καμπύλες ψύξης, καθώς και στα πειραματικά δεδομένα (**Εικόνα 47, Πίνακας 6, Διάγραμμα 5**) μπορούμε πάλι να διακρίνουμε μια μικρή υστέρηση των τιμών των

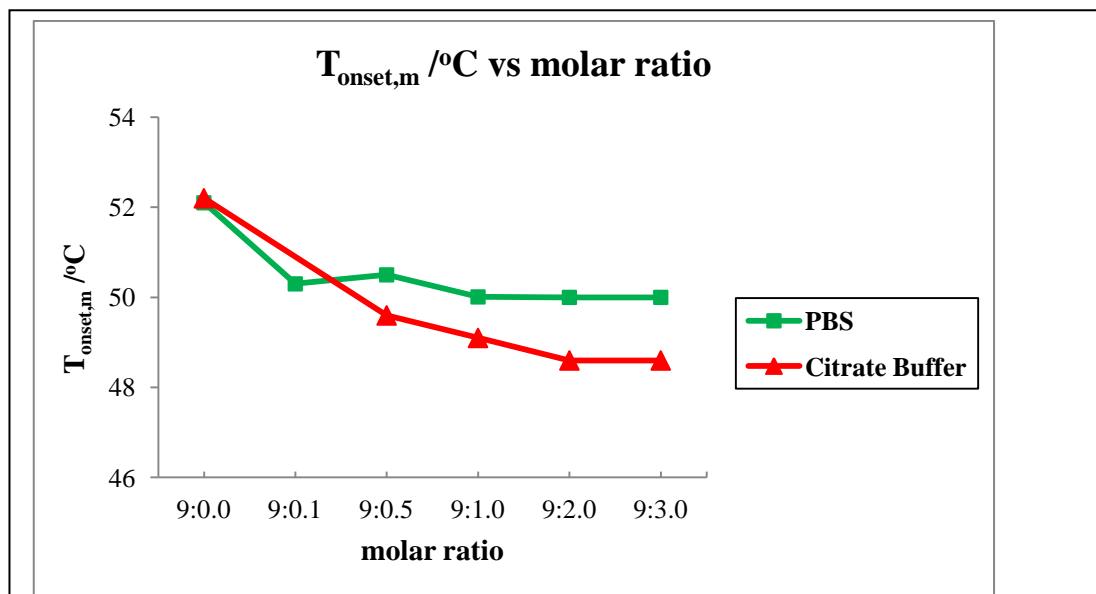
θερμοτροπικών παραμέτρων των διπλοστοιβάδων HSPC: PnBA-b-PAA 15/85 όλων των μοριακών αναλογιών του όξινου pH. Ο αμφίφιλος χαρακτήρας του συμπολυμερούς κατά συστάδες ίσως ευθύνεται πάλι για τη δημιουργία μιας φάσης ενδοεισχώρησης. Οπότε, η ενσωμάτωση του συμπολυμερούς κατά συστάδες επηρεάζει τις μοριακές αναλογίες με περίπου ίδιο τρόπο και στα δύο μέσα.



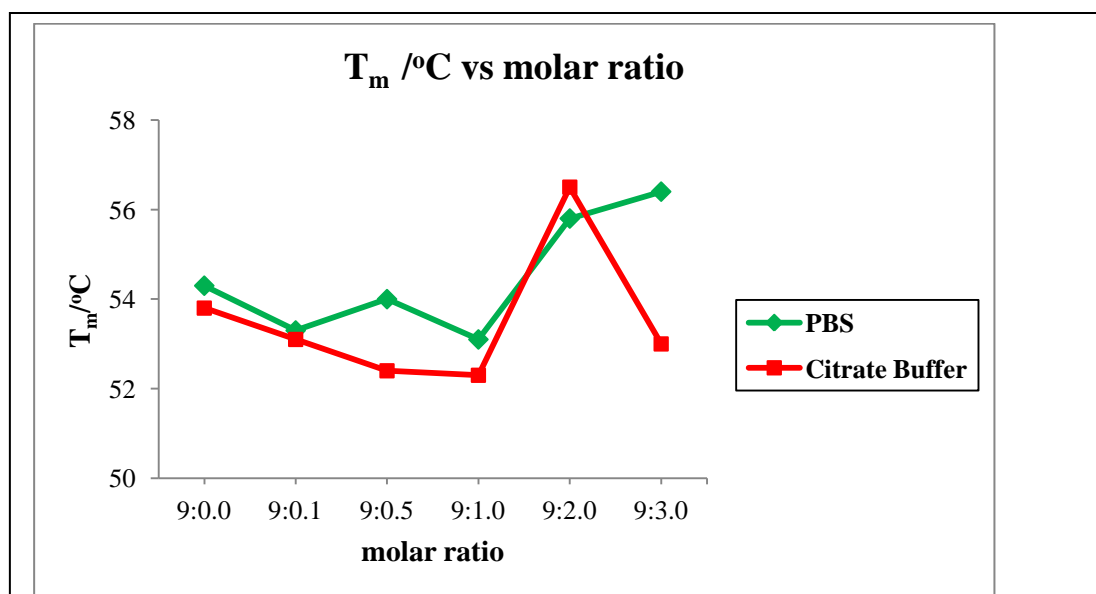
Ας εξηγήσουμε τώρα τις μικρές διαφοροποιήσεις που υπάρχουν στα δύο μέσα διασποράς, εξ αιτίας των δύο διαφορετικών διαμορφώσεων του ίδιου συμπολυμερούς κατά συστάδες, που λαμβάνουν χώρα στα δύο διαφορετικά μέσα (στις δύο διαφορετικές τιμές pH).

Μια μικρή διαφορά μεταξύ των δύο μέσων είναι, ότι στο ρυθμιστικό διάλυμα κιντρικών οι κορυφές (παρόλο που είναι εξίσου διευρυμένες στις μεγάλες μοριακές αναλογίες) είναι περισσότερο οξείες από ότι στο PBS. Γι αυτό το λόγο, στο όξινο περιβάλλον παρουσιάζονται και υψηλότερες τιμές  $\Delta H_m$ . (**Διάγραμμα 4**). Οι τιμές  $T_{\text{onset},m}$  και  $T_m$  είναι χαμηλότερες στο Citrate buffer (με μοναδική εξαίρεση τη μοριακή αναλογία 9:2.0) (**Διαγράμματα 6, 7**). Οπότε, τα φαινόμενα στο όξινο pH λαμβάνουν χώρα σε χαμηλότερες θερμοκρασίες και γι αυτό το λόγο οι

διπλοστοιβάδες χρειάζονται μεγαλύτερα ποσά ενέργειας για να ρευστοποιηθούν (υψηλότερες τιμές  $\Delta H_m$ ).



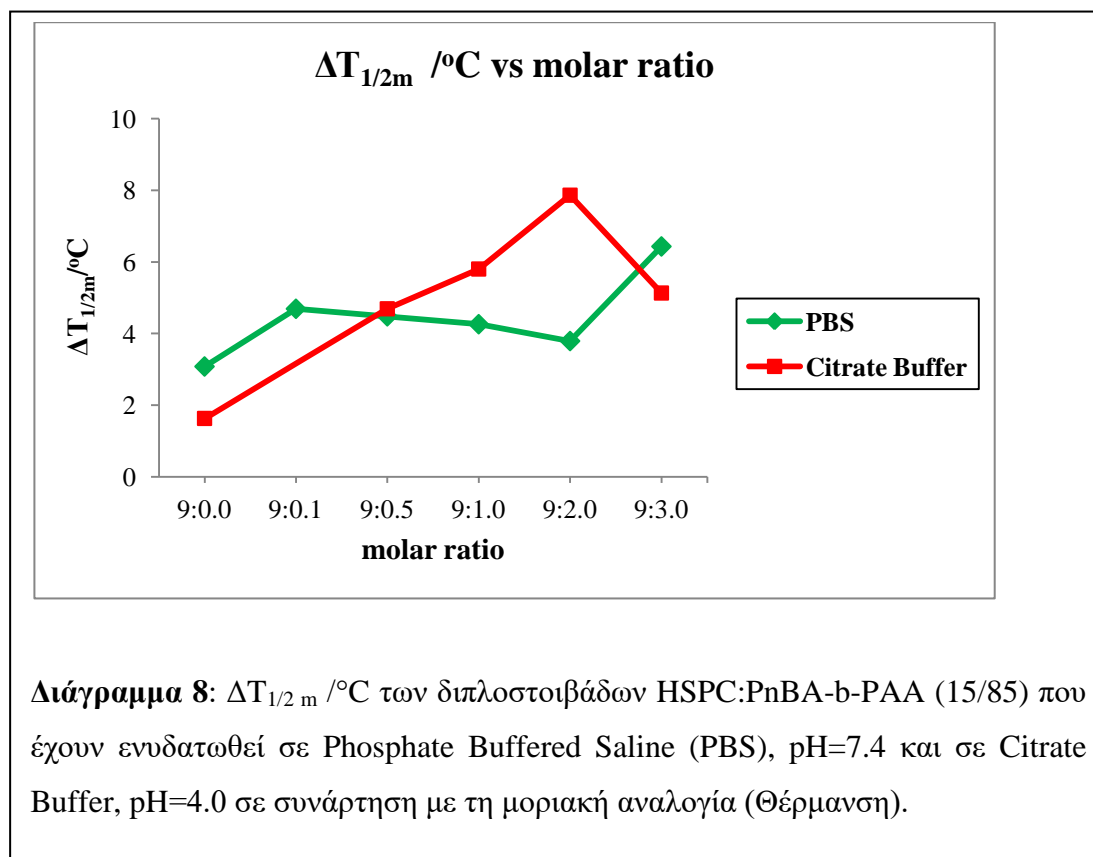
**Διάγραμμα 6:** T<sub>onset,m</sub> /°C των διπλοστοιβάδων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85) που έχουν ενυδατωθεί σε Phosphate Buffered Saline (PBS), pH=7.4 και σε Citrate Buffer, pH=4.0 σε συνάρτηση με τη μοριακή αναλογία (Θέρμανση).



**Διάγραμμα 7:** T<sub>m</sub> /°C των διπλοστοιβάδων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85) που έχουν ενυδατωθεί σε Phosphate Buffered Saline (PBS), pH=7.4 και σε Citrate Buffer, pH=4.0 σε συνάρτηση με τη μοριακή αναλογία (Θέρμανση).



Οι τιμές του  $\Delta T_{1/2}$  είναι κατά πλειοψηφία υψηλότερες στο Citrate Buffer σε σχέση με το PBS (**Διάγραμμα 8**), οπότε η συνεργασιμότητα είναι χαμηλότερη στο όξινο pH. Το φαινόμενο αυτό μελλοντικά θα μπορούσε να αποδειχτεί χρήσιμο: μελλοντικά αντίστοιχα λιποσώματα HSPC: PnBA-b-PAA 15/85 με εγκλωβισμένο φαρμακομόριο, παρουσιάζοντας μικρότερη συνεργασιμότητα σε παθολογικά βιολογικά συστήματα με όξινο pH, θα μπορούσαν να αποδεσμεύσουν στον παθολογικό αυτό ιστό ευκολότερα το περιεχόμενό τους σε σχέση με το υγιές, που παρουσιάζει φυσιολογικά pH = 7.4, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο την στόχευση των φορέων. Η αποδέσμευση από ένα σύστημα, που περιέχει PAA, μπορεί να γίνει από τη δημιουργία πόρων, που προκαλεί στη λιπιδική μεμβράνη. Η μοριακή αναλογία με την υψηλότερη τιμή  $\Delta T_{1/2}$  στο όξινο pH είναι η 9:2.0, έχοντας παράλληλα την υψηλότερη  $T_m$  και μια ιδιαίτερα χαμηλή  $\Delta H_m$  (**Πίνακας 6**).



Στο Citrate Buffer όπου το pH είναι 4.0, η  $-\text{COO}^-$  του τμήματος PAA πρωτονιώνεται προς  $-\text{COOH}$  χάνοντας την εκτεταμένη μορφή της, ενώ η συρρίκνωση της πολυμερικής αλυσίδας θα προκαλέσει τις ενσωματωμένες στη διπλοστοιβάδα υδρόφοβες συστάδες να εξαχθούν από τη διπλοστοιβάδα, αποσταθεροποιώντας έτσι τη μεμβράνη και αυξάνοντας τις τιμές  $\Delta T_{1/2}$ . Μικρή ποσότητα πολυμερούς ίσως να

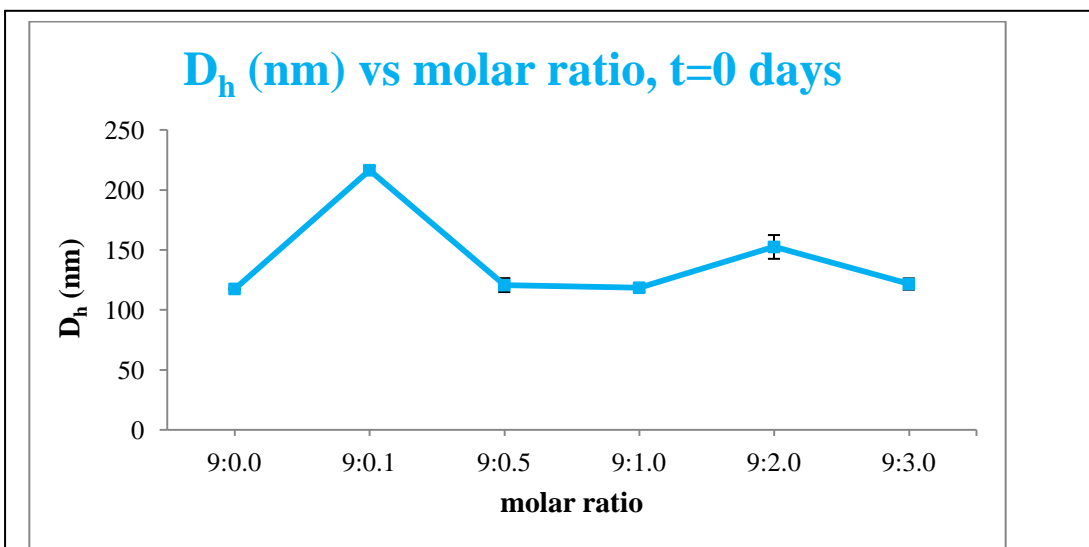
μη μπορεί να δημιουργήσει ικανή δύναμη για να λάβει χώρα το παραπάνω φαινόμενο, οπότε και η ποσότητα του πολυμερούς παίζει εξίσου σημαντικό ρόλο (Wanga et al., 2014). Γι αυτό ακριβώς το λόγο η μοριακή αναλογία 9:2.0 (που αποτελεί μια αναλογία με υψηλό ποσοστό πολυμερούς) αποτελεί την πιο αποσταθεροποιημένη αναλογία στο όξινο περιβάλλον.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η επίδραση του PAA είναι pH-εξαρτώμενη και λαμβάνει χώρα σε όξινο pH. Το PAA δεν αλλάζει τη φυλλοειδή δομή των φωσφατιδυλοχολινών, αλλά η μεμβράνη γίνεται περισσότερο εύθραυστη και διαπερατή. Καθώς οι καρβοξυλικές ομάδες πρωτονιώνονται, το πολυμερές γίνεται περισσότερο υδρόφοβο και η προσρόφηση στην λιπιδική επιφάνεια αυξάνεται. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη πλευρική συμπίεση της διπλοστοιβάδας και εν τέλει διάρρηξη της μεμβράνης (Drummond et al., 2000). Η αποσταθεροποίηση της μεμβράνης οδήγησε στην εμφάνιση ενός ή περισσότερων πλευρικών φάσεων με αυξημένη θερμοκρασία μετάπτωσης από τη φάση γέλης στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση, καθώς και με μειωμένη συνεργασιμότητα. Το ποσοστό των καινούριων αυτών φάσεων αυξάνεται, καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του PAA στο σύστημα (Munaviron et al., 2014; Filipon et al., 2011; Fujiwara et al., 1997), ακριβώς όπως στο σύστημα 9:2.0. Γενικώς, η αλληλεπίδραση PAA-βιομεμβράνης είναι ισχυρά εξαρτώμενη από τη μοριακή μάζα του πολυμερούς, τη συγκέντρωσή του, καθώς και από το pH του περιβάλλοντος (Filipon et al., 2011).

Στις δύο υψηλότερες μοριακές αναλογίες, όπου πιθανόν να επικρατούν και ιδιότητες ισότροπου υγρού (solution like model) και η μεμβράνη έχει ρευστοποιηθεί, οι τιμές της  $\Delta H_m$  είναι παρόμοιες και στα δύο μέσα (**Διάγραμμα 4**). Οπότε, το ενσωματωμένο πολυμερές είναι κυρίως υπεύθυνο για τις διαφορές που παρουσιάζονται στις δύο διαφορετικές τιμές pH, επιβεβαιώνοντας την pH-ευαισθησία των παρασκευασθέντων συστημάτων εξαιτίας του συγκεκριμένου συμπολυμερούς κατά συστάδες.

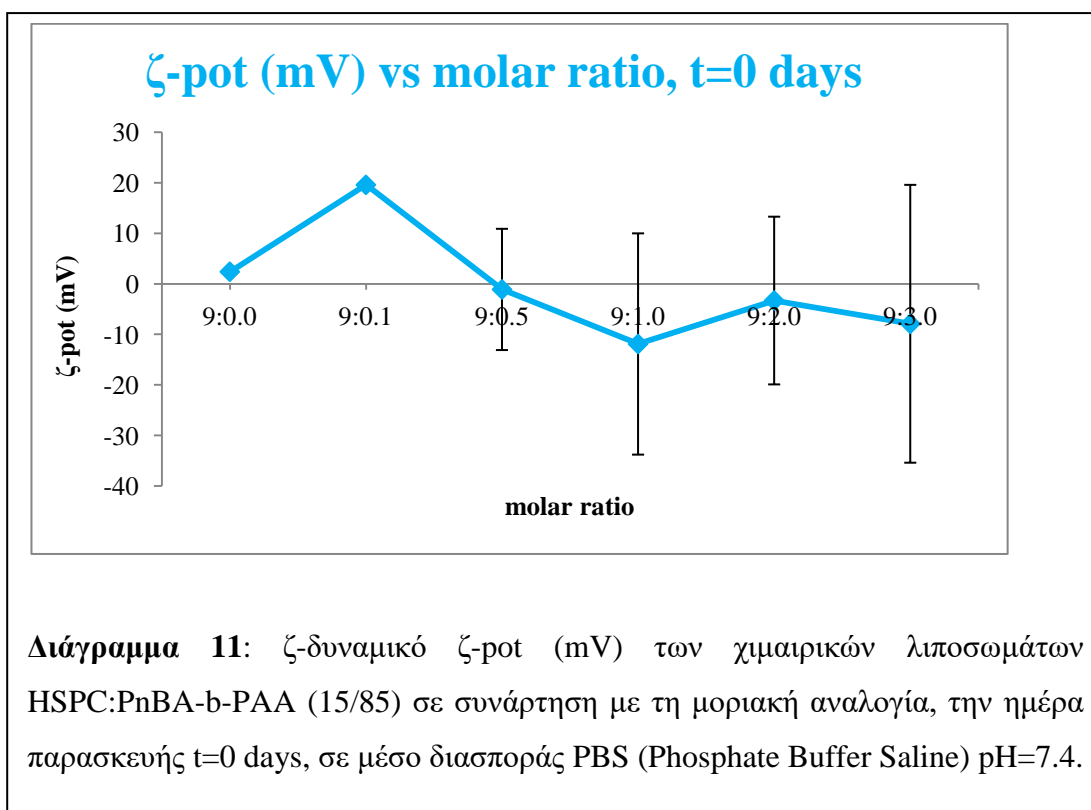
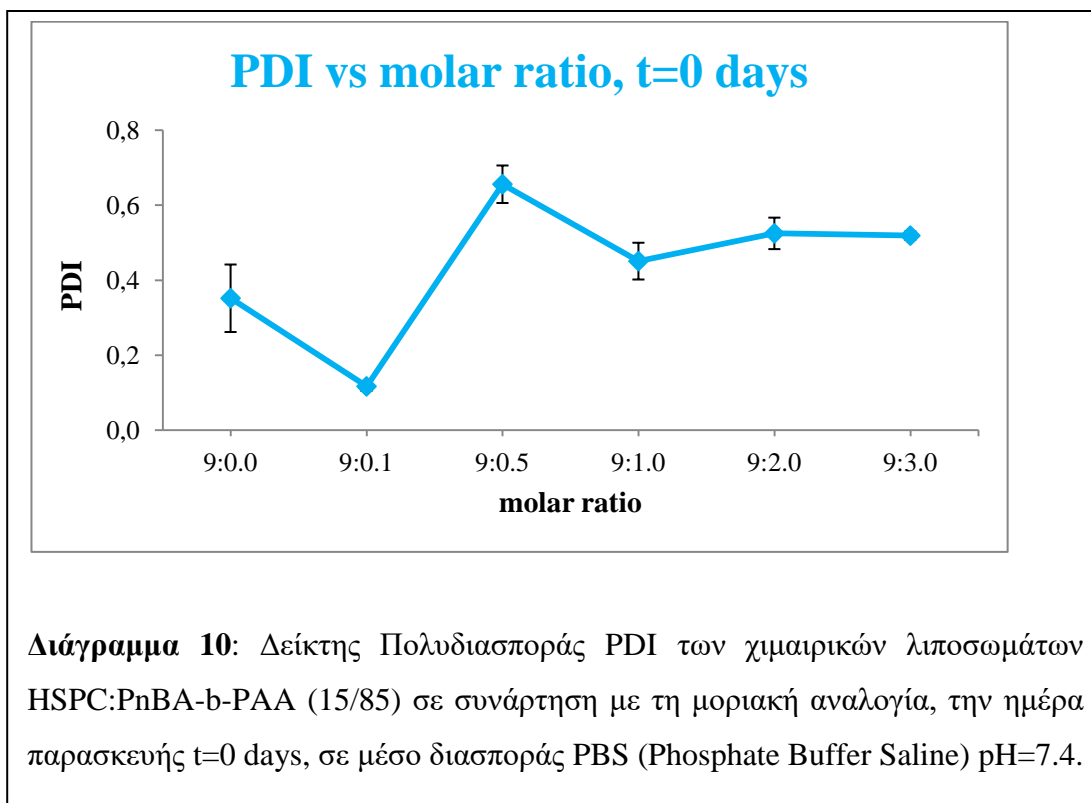
### 3.2 Φυσικοχημικά αποτελέσματα των κενών χημικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85)

#### 3.2.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των κενών χημικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85) την ημέρα παρασκευής t=0 days



**Διάγραμμα 9:** Μέση υδροδυναμική διάμετρος  $D_h$  (nm) των χημικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85) σε συνάρτηση με τη μοριακή αναλογία, την ημέρα παρασκευής t=0 days, σε μέσο διασποράς PBS (Phosphate Buffer Saline) pH=7.4.

Την ημέρα παρασκευής (t=0 days), η  $D_h$  των λιποσωμάτων όλων των μοριακών αναλογιών που περιέχουν το πολυμερές PnBA-b-PAA (15/85), ήταν μεγαλύτερη από τη  $D_h$  των συμβατικών φορέων, που αποτελούνταν αποκλειστικά από το λιπίδιο HSPC (Διάγραμμα 9). Όσο αφορά τη μεταβολή της  $D_h$  ανάμεσα στα χημικά λιποσωματικά συστήματα, καθώς η ποσότητα του πολυμερούς στη μοριακή αναλογία αυξάνεται, η  $D_h$  μειώνεται, με εξαίρεση τη μοριακή αναλογία 9:2.0. Η μοριακή αναλογία 9:1.0 παρουσιάζει τη χαμηλότερη τιμή  $D_h$ , ενώ η 9:0.1 τη μεγαλύτερη τιμή αντίστοιχα. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι, οι τιμές  $D_h$  των 9:0.5, 9:1.0 και 9:3.0 μοριακών αναλογιών είναι παραπλήσιες στη τιμή  $D_h$  των συμβατικών λιποσωμάτων (9:0.0).



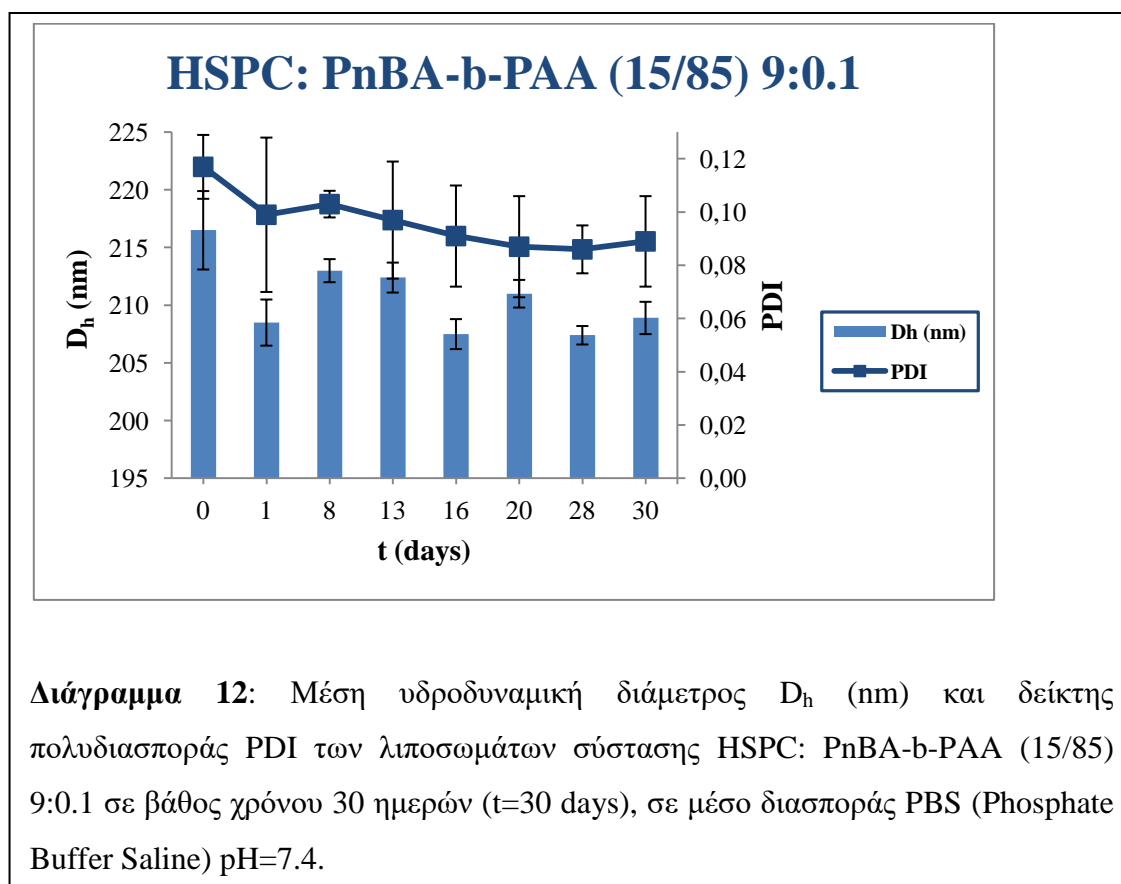
Όσο αφορά τη μεταβολή του PDI, όλες οι χημεικές μοριακές αναλογίες έχουν υψηλότερη τιμή PDI σε σχέση τη συμβατική μοριακή αναλογία (9:0.0). Η μόνη εξαίρεση είναι η 9:0.1, που διαθέτει τη χαμηλότερη τιμή PDI. Καθώς αυξάνεται το συμπολυμερές κατά συστάδες στη μοριακή αναλογία, οι τιμές του PDI παρουσιάζουν μια ανομοιόμορφη μεταβολή (διαδοχικές αυξομειώσεις) (**Διάγραμμα 10**).

Οι τιμές του ζ-δυναμικού παρουσιάζουν επίσης μια ανομοιόμορφη μεταβολή παρουσία αυξανόμενης ποσότητας συμπολυμερούς. Με την ενσωμάτωση του PnBA-b-PAA (15/85) στα λιποσωματικά συστήματα, η τιμή του ζ-δυναμικού από θετική μετατράπηκε σε αρνητική, με εξαίρεση τη μοριακή αναλογία 9:0.1 (**Διάγραμμα 11**). Η 9:0.1 παρουσιάζει επίσης την υψηλότερη απόλυτη τιμή ζ-δυναμικού, ενώ η 9:0.5 τη χαμηλότερη αντίστοιχα. Αφού λοιπόν η 9:0.1 παρουσιάζει την υψηλότερη απόλυτη τιμή ζ-δυναμικού και παράλληλα τη χαμηλότερη τιμή PDI, αποτελεί την πιο σταθερή αναλογία ηλεκτροστατικά και το πιο ομοιογενές σύστημα αντίστοιχα.

Συνοπτικά, η αύξηση του ποσοστού του πολυμερούς στη μοριακή αναλογία του συστήματος προκάλεσε μια απότομη αύξηση της απόλυτης τιμής του ζ-δυναμικού, ακολουθούμενη από μια σταδιακή μείωση. Από φυσικοχημική άποψη, οι απόλυτες τιμές του ζ-δυναμικού πρέπει να κυμαίνονται τουλάχιστον από 40mV έως 60mV, έτσι ώστε η κολλοειδής διασπορά να χαρακτηριστεί σταθερή. Δυστυχώς κανένα από τα παρασκευασθέντα συστήματα δε βρέθηκε να είναι ανάμεσα σε αυτά τα θεωρητικά όρια.

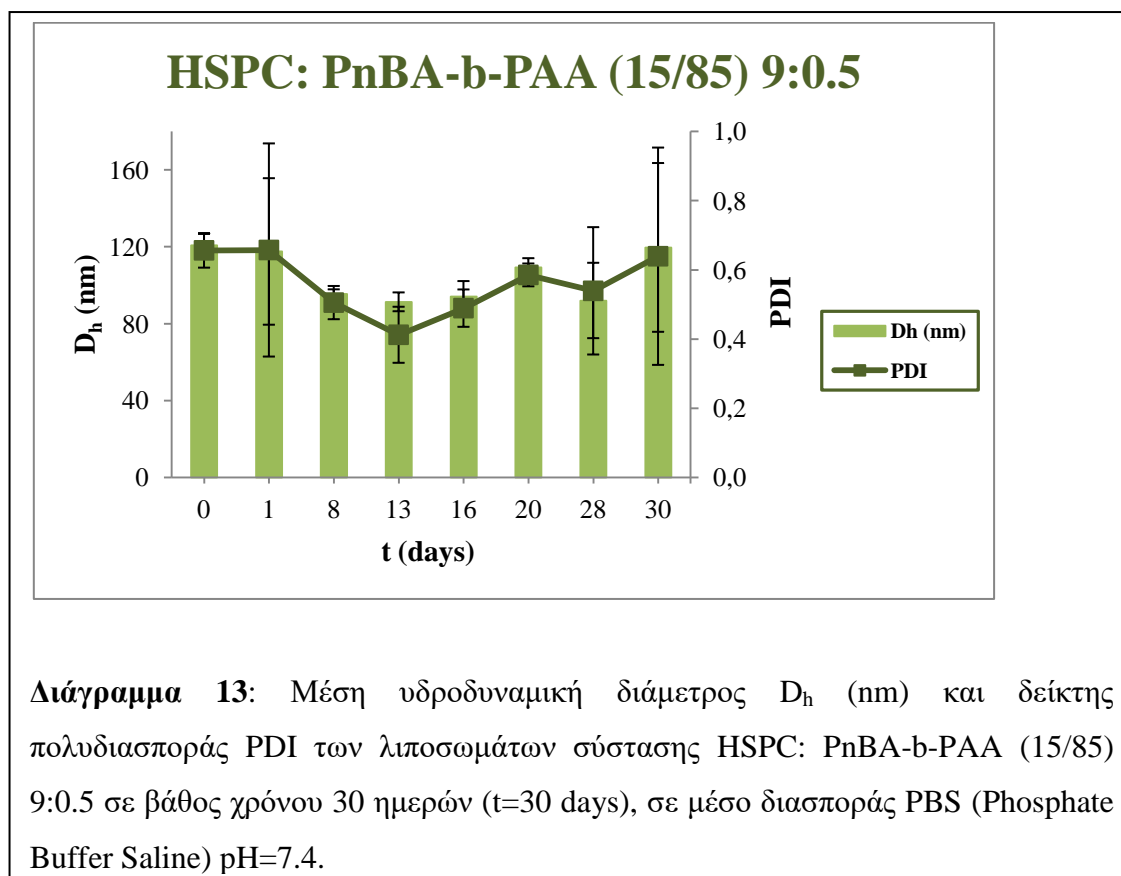
### 3.2.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των κενών γμαιρικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85) σε βάθος χρόνου (μελέτη σταθερότητας των συστημάτων ξεχωριστά)

#### 3.2.2.1 HSPC: PnBA-b-PAA (15/85) 9:0.1



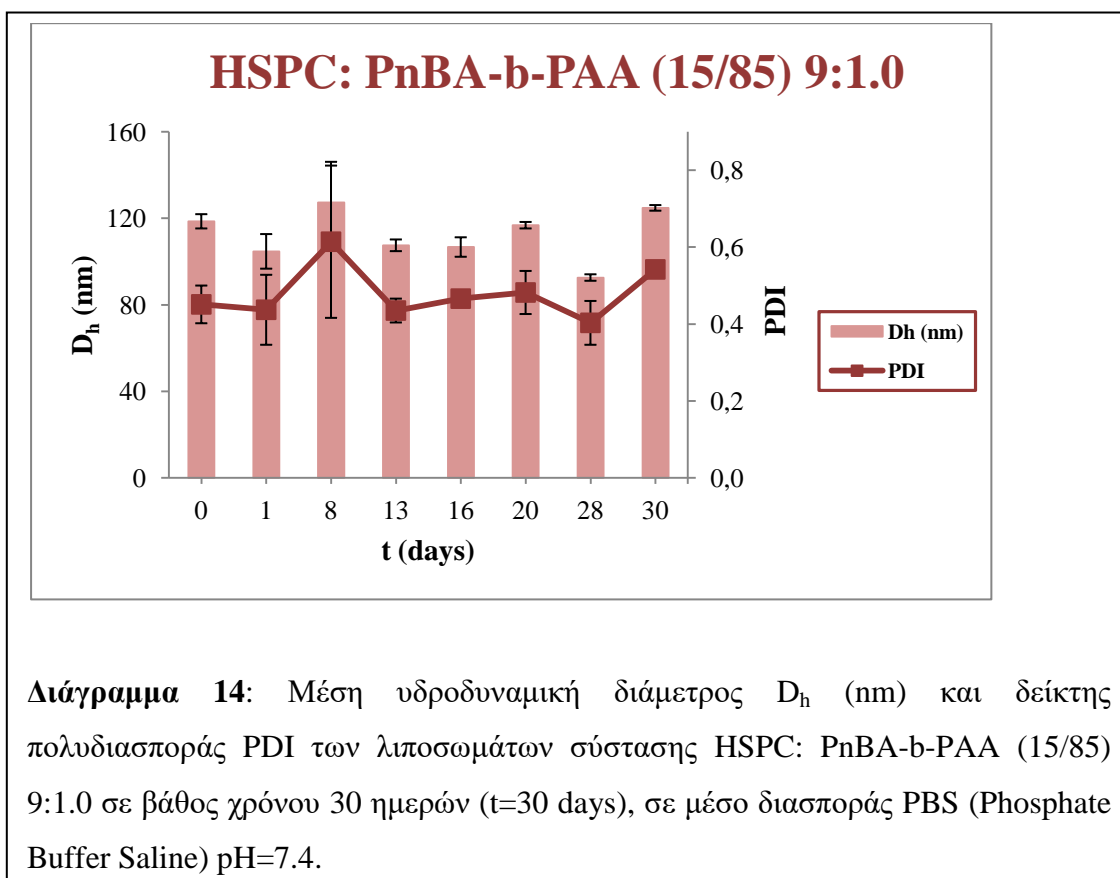
Οι τιμές της  $D_h$  σε βάθος χρόνου 30 ημερών στη μοριακή αναλογία 9:0.1 κυμαίνονται από 207.4 έως 213.0 nm και άρα τα λιποσώματα του συγκεκριμένου συστήματος κατατάσσονται στην κατηγορία των Μεγάλων Μονοστιβαδικών Λιποσωμάτων (Large Unilamellar Vesicles, LUVs, 200-800nm). Η μεταβολή των τιμών της  $D_h$  είναι ανομοιόμορφη (παρουσιάζει διαδοχικές αυξομειώσεις), χωρίς όμως οι μεταβολές αυτές μεταξύ των ημερών μέτρησης να ξεπερνούν τα 10nm, με αποτέλεσμα η  $D_h$  να παραμένει σταθερή στο χρονικό αυτό διάστημα της μελέτης. Ο PDI κυμαίνεται από 0.087 έως 0.117, παρουσιάζει μια σταδιακή μικρή μείωση σε βάθος χρόνου, υποδηλώνοντας πάρα πολύ καλή ομοιογένεια για το σύστημα (**Διάγραμμα 12**).

### 3.2.2.2 HSPC: PnBA-b-PAA (15/85) 9:0.5



Οι τιμές της  $D_h$  σε βάθος χρόνου 30 ημερών στη μοριακή αναλογία 9:0.5 κυμαίνονται από 91.3 έως 120.8 nm και άρα τα λιποσώματα του συγκεκριμένου συστήματος κατατάσσονται στην κατηγορία των Μικρών Μονοστιβαδικών Λιποσωμάτων (Small Unilamellar Vesicles, SUVs, 20-100nm). Η μεταβολή των τιμών της  $D_h$  είναι ανομοιόμορφη (παρουσιάζει διαδοχικές αυξομειώσεις), με μικρές διαφορές από ημέρα σε ημέρα, με αποτέλεσμα η  $D_h$  να παραμένει σταθερή στο χρονικό αυτό διάστημα της μελέτης. Ο PDI κυμαίνεται από 0.412 έως 0.657, παρουσιάζει μια σταδιακή μικρή μείωση και μετά αύξηση σε βάθος χρόνου, υποδηλώνοντας μέτρια ομοιογένεια για το σύστημα (Διάγραμμα 13).

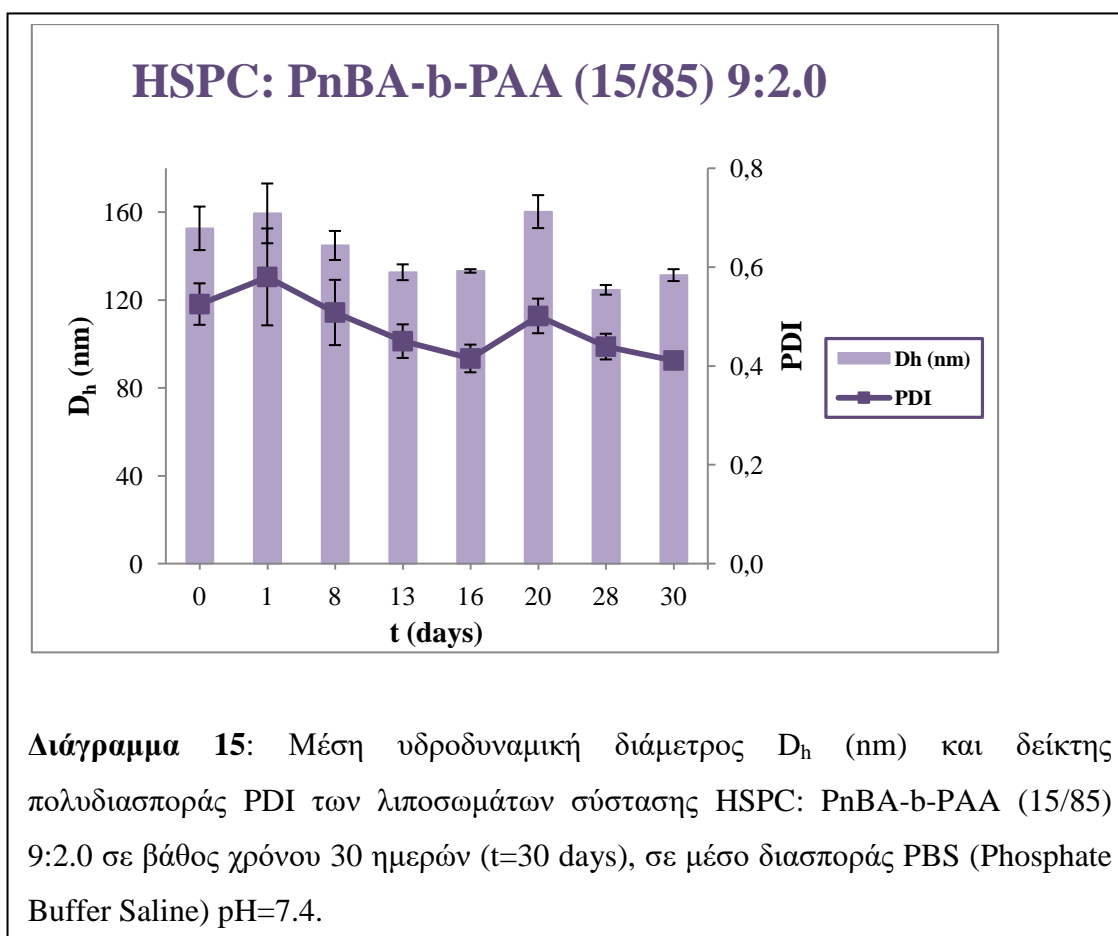
### 3.2.2.3 HSPC: PnBA-b-PAA (15/85) 9:1.0



Οι τιμές της  $D_h$  σε βάθος χρόνου 30 ημερών στη μοριακή αναλογία 9:1.0 κυμαίνονται από 92.6 έως 127.3 nm και άρα τα λιποσώματα του συγκεκριμένου συστήματος κατατάσσονται στην κατηγορία των Μικρών Μονοστιβαδικών Λιποσωμάτων (Small Unilamellar Vesicles, SUVs, 20-100nm). Η μεταβολή των τιμών της  $D_h$  είναι ανομοιόμορφη (παρουσιάζει διαδοχικές αυξομειώσεις), με μικρές διαφορές από ημέρα σε ημέρα μέτρησης, που δεν ξεπερνούν τα 30nm, με αποτέλεσμα η  $D_h$  να παραμένει σταθερή στο χρονικό αυτό διάστημα της μελέτης. Ο PDI κυμαίνεται από 0.403 έως 0.542 (με εξαίρεση την  $t=8$  days που φθάνει στα 0.614, αλλά την επόμενη ημέρα μέτρησης επανέρχεται), μένοντας σταθερός σε βάθος χρόνου, υποδηλώνοντας ικανοποιητική ομοιογένεια για το σύστημα στο χρονικό αυτό διάστημα (**Διάγραμμα 14**).

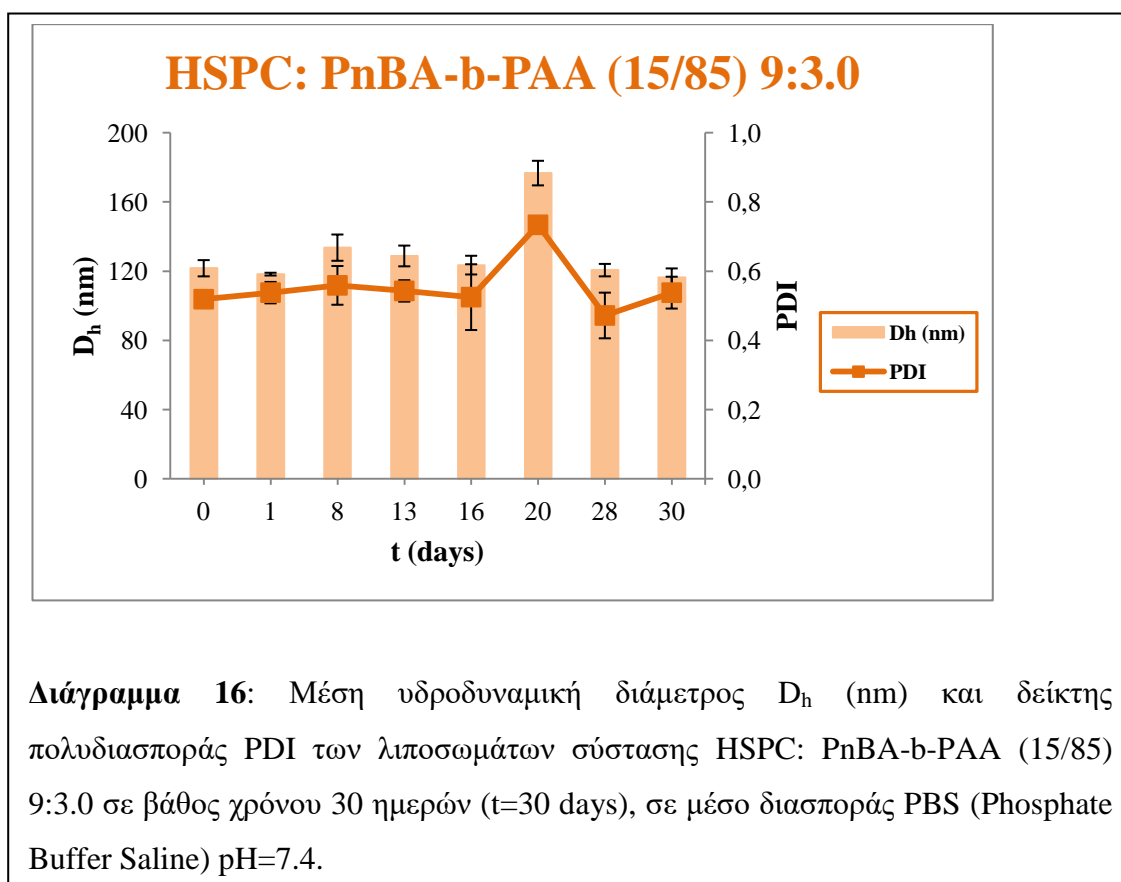


### 3.2.2.4 HSPC: PnBA-b-PAA (15/85) 9:2.0



Οι τιμές της  $D_h$  σε βάθος χρόνου 30 ημερών στη μοριακή αναλογία 9:2.0 κυμαίνονται από 124.6 έως 160.2 nm. Η τιμή της  $D_h$  μειώνεται σταδιακά έως την ημέρα  $t=20$  days, όπου παρουσιάζεται μια μικρή αύξηση, η οποία ισοσκελίζεται στην ημέρα  $t=28$  days με την τιμή της  $D_h$  να επιστρέφει στα 124.6 nm. Με εξαίρεση τη μεταβολή αυτή, οι υπόλοιπες μεταβολές δεν ξεπερνούν τα 10 nm μεταξύ των διαστημάτων μέτρησης. Ως αποτέλεσμα, η  $D_h$  να παραμένει σταθερή στο χρονικό αυτό διάστημα της μελέτης. Ο PDI κυμαίνεται από 0.411 έως 0.580, παρουσιάζοντας σταθερή πτωτική τάση σε βάθος χρόνου, υποδηλώνοντας ικανοποιητική ομοιογένεια για το σύστημα για το χρονικό αυτό διάστημα (Διάγραμμα 15).

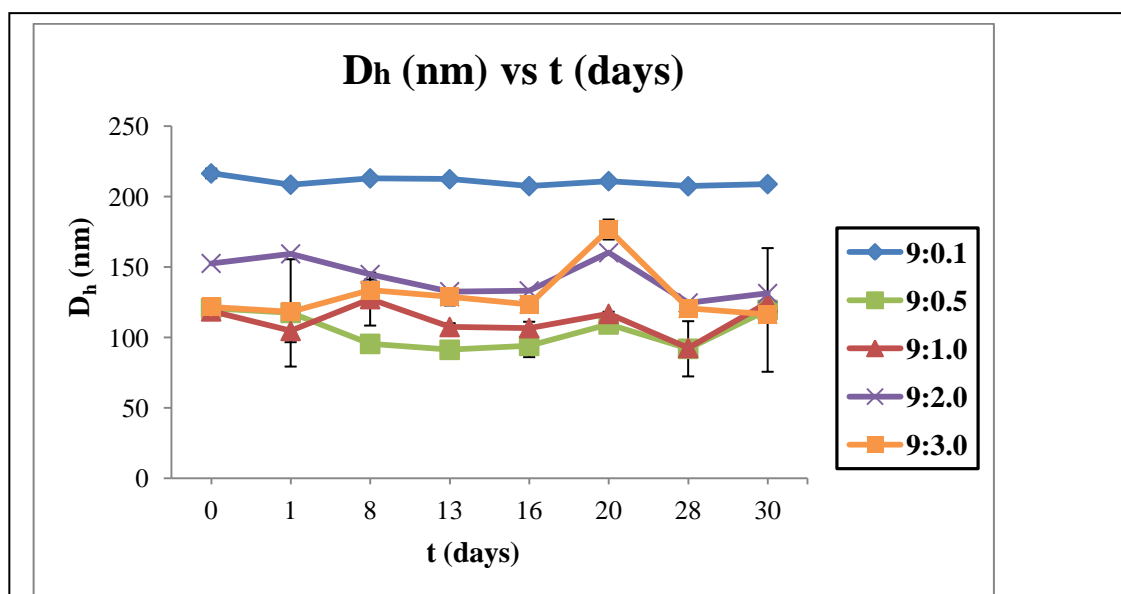
### 3.2.2.5 HSPC: PnBA-b-PAA (15/85) 9:3.0



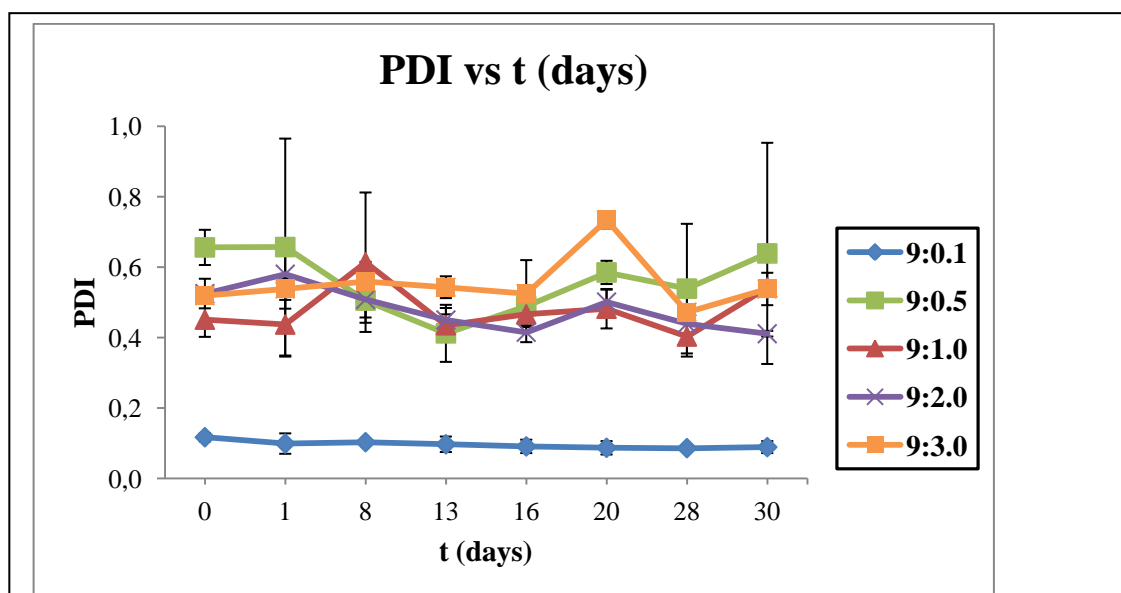
Οι τιμές της  $D_h$  σε βάθος χρόνου 30 ημερών στη μοριακή αναλογία 9:3.0 κυμαίνονται από 116.4 έως 176.7 nm. Η τιμή της  $D_h$  μένει σταθερή σε βάθος χρόνου (121.7 -116.4 nm), παρουσιάζοντας μικρές αυξομειώσεις της τάξης των 5-10 nm. Εξαίρεση αποτελεί η ημέρα  $t=20$  days, όπου παρουσιάζεται μια απότομη αύξηση στα 176.7 nm, η οποία έχει επανέλθει μέχρι την επόμενη ημέρα μέτρησης ( $t=28$  days). Ο PDI κυμαίνεται από 0.472 έως 0.559 (με εξαίρεση μια απότομη αύξηση στα 0.734 nm την ημέρα  $t=20$  days, η οποία επίσης επανέρχεται), παρουσιάζοντας αυξημένη σταθερότητα σε βάθος χρόνου, υποδηλώνοντας ικανοποιητική ομοιογένεια για το σύστημα για το χρονικό αυτό διάστημα (**Διάγραμμα 16**).

### 3.2.3 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των κενών χημικών λιποσωμάτων

#### HSPC:PnBA-b-PAA (15/85) σε βάθος χρόνου (συγκριτική μελέτη σταθερότητας)



**Διάγραμμα 17:** Μέση υδροδυναμική διάμετρος  $D_h$  (nm) όλων των μοριακών αναλογιών των λιποσωμάτων σύστασης HSPC: PnBA-b-PAA (15/85) σε βάθος χρόνου 30 ημερών ( $t=30$  days), σε μέσο διασποράς PBS (Phosphate Buffer Saline)  $pH=7.4$ .



**Διάγραμμα 18:** Δείκτης πολυδιασποράς PDI όλων των μοριακών αναλογιών των λιποσωμάτων σύστασης HSPC: PnBA-b-PAA (15/85) σε βάθος χρόνου 30 ημερών ( $t=30$  days), σε μέσο διασποράς PBS (Phosphate Buffer Saline)  $pH=7.4$ .

Μελετώντας λοιπόν την σταθερότητα των συστημάτων σε βάθος χρόνου 30 ημερών, τα χημικώς λιποσωμιακά συστήματα HSPC:PnBA-b-PAA (15/85) βρέθηκαν να διατηρούν τα αρχικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους (μέγεθος και κατανομή μεγέθους) τουλάχιστον στο χρονικό αυτό διάστημα που μελετήθηκαν (**Διαγράμματα 17, 18**). Ως προς τη  $D_h$ , σε όλες τις μοριακές αναλογίες παρατηρήθηκαν μικρές μεταβολές (αυξομειώσεις) κατά τη διάρκεια των ημερών της μελέτης, ωστόσο η διαφορά μεταξύ μέγιστης και ελάχιστης τιμής δεν ξεπέρασε σε καμιά αναλογία τα 30 nm, με εξαίρεση μια μέτρηση στην 9:3.0 μοριακή αναλογία (η διαφορά έφτασε τα 50nm, αλλά επανήλθε μέχρι το πέρας των 30 ημερών). Η 9:0.1 μοριακή αναλογία παρουσιάζει τις υψηλότερες τιμές  $D_h$ , ενώ η 9:0.5 τις χαμηλότερες αντίστοιχα. Εκτός από την 9:0.1, οι υπόλοιπες μοριακές αναλογίες παρουσιάζουν παραπλήσιες τιμές (91.3 nm-176.7nm). Οπότε, το μέγεθος όλων των μοριακών αναλογιών παρέμεινε σταθερό κατά τη διάρκεια της μελέτης σταθερότητας (**Διάγραμμα 17**).

Όσο αφορά το PDI, παρατηρούμε παρόμοιες μεταβολές. Σε όλες τις μοριακές αναλογίες, παρουσιάζονται μικρές αυξομειώσεις σε βάθος χρόνου, αλλά η διαφορά μεταξύ μέγιστης και ελάχιστης τιμής δεν ξεπέρασε σε καμιά αναλογία τα 0.2. Ως αποτέλεσμα, ο PDI όλων των συστημάτων παρέμεινε σταθερός κατά τη διάρκεια της μελέτης σταθερότητας. Εκτός από την 9:0.1, οι υπόλοιπες μοριακές αναλογίες παρουσιάζουν παραπλήσιες τιμές (0.412-0.734). Η 9:0.1 παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς είναι η πιο σταθερή σε βάθος χρόνου (υπάρχει μια σταδιακή μείωση των τιμών της, ενώ η μέγιστη διαφορά μεταξύ των τιμών της φτάνει μόνο στα 0.031).

Επιπροσθέτως, η 9:0.1 παρουσιάζει τις χαμηλότερες τιμές PDI (<0.117), οπότε μπορεί να χαρακτηριστεί το πιο ομοιογενές και πιο σταθερό σύστημα, παρουσιάζοντας όμως τις υψηλότερες τιμές  $D_h$  σε σύγκριση με τις υπόλοιπες αναλογίες (**Διάγραμμα 18**). Η παρουσία υψηλής ποσότητας πολυμερούς στο σύστημα, κυρίως στις αναλογίες 9:2.0 και 9:3.0, όπως φαίνεται στα **Διαγράμματα 17, 18**, διατηρεί τα συστήματα σταθερά, αρκετά ομοιογενή, με αρκετά ικανοποιητικό μέγεθος. Από την άλλη πλευρά, ενδιάμεσα ποσοστά πολυμερούς, όπως στις 9:0.5 και 9:1.0 αναλογίες μας παρέχουν πολύ σταθερά, αρκετά ομοιογενή συστήματα, που παρουσιάζουν επίσης τις χαμηλότερες τιμές  $D_h$ , σε βάθος χρόνου 30 ημερών.

### **3.2.4 Η φυσικοχημική συμπεριφορά των κενών χιμαιρικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85)**

Όπως περιγράψαμε παραπάνω, τα συστήματα HSPC:PnBA-b-PAA παραμένουν φυσικοχημικά σταθερά σε βάθος χρόνου. Η μέση υδροδυναμική διάμετρος και ο δείκτης πολυδιασποράς δεν παρουσίασαν σημαντική διαφορά σε βάθος χρόνου 30 ημερών.

Η θεωρία DLVO είναι αυτή που περιγράφει την σταθερότητα των κολλοειδών συστημάτων και αναπτύχθηκε το 1940 από τους Derjaguin, Landau, Verway, Overbeek, από τα αρχικά των οποίων πήρε και το όνομά της. Ορίζεται λοιπόν, ότι η σταθερότητα ενός κολλοειδούς συστήματος καθορίζεται από το άθροισμα των ελκτικών (van der Waals) και απωστικών (ηλεκτροστατικών) δυνάμεων που αναπτύσσονται μεταξύ δύο σωματιδίων, όταν αυτά πλησιάζουν. Εκτός από την κλασσική θεωρία DLVO, λαμβάνοντας υπόψη την επέκτασή της, όταν τα κολλοειδή σωματίδια έχουν μία επιφάνεια με ορισμένους βαθμούς υδροφοβικότητας, υπάρχει και η ενέργεια ενυδάτωσης  $E_{hyd}$ , η οποία είναι γενικά απωθητική.  $E = E_{elec} + E_{vW} + E_{hyd}$ . Η συγχώνευση των λιποσωμάτων σε μεγαλύτερα σωματίδια είναι αποτέλεσμα της κυριαρχίας των ελκτικών van der Waals αλληλεπιδράσεων έναντι των απωστικών δυνάμεων ενυδάτωσης. Οι ισχυρές ελκτικές δυνάμεις van der Waals ανταγωνίζονται τις απωστικές δυνάμεις ενυδάτωσης, οι οποίες αναπτύσσονται σε αποστάσεις μικρότερες των 3nm μεταξύ των παρακείμενων διπλοστοιβάδων και τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις λόγω ύπαρξης φορτίου. Για να είναι ένα κολλοειδές σύστημα σταθερό, πρέπει να υπερσχύουν οι απωστικές δυνάμεις (ηλεκτροστατικές και δυνάμεις ενυδάτωσης). Κατά την παρασκευή των λιποσωμάτων τους προσφέρθηκε ενέργεια (μέσω της υπερήχησης με αισθητήρα). Όλες οι διαφορετικές μοριακές αναλογίες είχαν λάβει αρχικά την ίδια ενέργεια, την οποία κάθε αναλογία, ανάλογα με την ποσότητα συμπολυμερούς που είχε, αποθήκευσε και διαχειρίστηκε διαφορετικά, με αποτέλεσμα τη διαφορά στην σταθερότητα, που έδειξαν τελικά οι διάφορες μοριακές αναλογίες μεταξύ τους. Ακολούθως, θα περιγράψουμε πως τα συστατικά των λιποσωμάτων που παρασκευάσαμε και η ποσότητα των συστατικών αυτών, συνεισφέρουν στην ηλεκτροστατική (από τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις) και στερεοχημική (από τις δυνάμεις ενυδάτωσης) άπωση και άρα στην σταθερότητα του συστήματος.

(\*) Πρέπει να σημειώσουμε ότι εννοώντας «σταθερά» εννοούμε ότι είναι κινητικά σταθερά, δηλαδή ότι δε συσσωματώνονται και διατηρούν σταθερές τις τιμές των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους (φαρμακευτική σταθερότητα). Θερμοδυναμικώς είναι ασταθή, διότι θερμοδυναμικώς σταθερά θα ήταν αν μηδένιζαν την ελεύθερη ενέργεια  $W$ , μέσω αύξησης του μεγέθους και άρα μείωσης της συνολικής επιφάνειας, δηλαδή μέσω συσσωμάτωσης, κάτι που δε μας συμφέρει διότι θα είχαμε κατάρρευση του συστήματος.

#### ➤ Το Φωσφολιπίδιο HSPC

Το φωσφολιπίδιο HSPC που χρησιμοποιήθηκε, είναι zwitter-ιοντικό, καθώς αποτελείται από μια φωσφορική ομάδα με αρνητικό φορτίο(-1) και μια ομάδα τεταρτοταγούς αμμωνίου με θετικό φορτίο(+1), με αποτέλεσμα να μη διαθέτει καθαρό φορτίο. Όταν λοιπόν βρίσκεται διεσπαρμένο στο ύδωρ, οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις παύουν να ασκούνται, οι ελκτικές δυνάμεις van der Waals κυριαρχούν με αποτέλεσμα τη συσσωμάτωση των λιποσωμάτων και τη θερμοδυναμική κατάρρευση του συστήματος γενικότερα. Απωστικές δυνάμεις ενυδάτωσης θεωρείται ότι προκύπτουν από τη σύνδεση μορίων ύδατος σε υδρόφιλες επιφάνειες, όπως είναι οι πολικές ομάδες των φωσφολιπιδίων, κατά την ενυδάτωση της διπλοστοιβάδας, αλλά εύκολα υπερνικούνται από τις ελκτικές. Άρα, το HSPC από μόνο του δε συνεισφέρει σημαντικά στην σταθερότητα των λιποσωμάτων και το πρόβλημα αυτό έρχεται να διορθώσει το συμπολυμερές κατά συστάδες (block copolymer) PnBA-b-PAA.

#### ➤ Το υδρόφιλο τμήμα PAA του συμπολυμερούς κατά συστάδες PnBA-b-PAA

Το υδρόφιλο pH-αποκρινόμενο τμήμα PAA, που βρίσκεται στη λιποσωματική επιφάνεια εκτείνεται προς το υδατικό περιβάλλον, ενώ το υδρόφοβο τμήμα PnBA εισέρχεται μέσα στη λιποσωματική διπλοστοιβάδα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το PAA είναι ένας ασθενής ηλεκτρολύτης (με  $pK_a \approx 4.2$ ), που παρουσιάζει μια υδρόφιλη και pH-αποκρινόμενη συμπεριφορά. Οι κολλοειδείς διασπορές του πειράματος μας παρασκευάστηκαν με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος PBS (Phosphate Buffered Saline) ως μέσο διασποράς, το οποίο διαθέτει pH =7.4. Οπότε, στο σχεδόν ουδέτερο pH, όπου έλαβαν μέρος και οι μετρήσεις, η συστάδα PAA ήταν μερικώς ιονισμένη (ύπαρξη  $COO^-$ ) και η αλυσίδα του είχε εκτεταμένη διαμόρφωση. Επομένως, το PAA μπορεί να αναπτύσσει στο ουδέτερο pH και ηλεκτροστατικές και

στερεοχημικές αποθητικές δυνάμεις, οι οποίες σύμφωνα με την DLVO θεωρία, συνεισφέρουν στην σταθερότητα των συστημάτων.

Ηλεκτροστατικές αποθήσεις: Το αρνητικό φορτίο της καρβοξυλομάδας ( $\text{COO}^-$ ), που φέρει η συστάδα PAA στο ουδέτερο pH του PBS, προκαλεί άπωση μεταξύ των λιποσωμάτων, αποτρέποντας τη σύντηξη και άρα την αποσταθεροποίησή τους. Η αύξηση της απόλυτης τιμής του ζ- δυναμικού με την ενσωμάτωση του συμπολυμερούς κατά συστάδες σε σχέση με τους συμβατικούς φορείς, υποδηλώνει ενίσχυση της σταθερότητας μέσω ηλεκτροστατικών απώσεων μεταξύ των λιποσωμάτων, καθώς το ζ- δυναμικό αποτελεί αξιόπιστο οδηγό ως προς το μέγεθος των απωστικών δυνάμεων μεταξύ των λιποσωμάτων.

Αποθητικές δυνάμεις ενυδάτωσης: το τμήμα του PAA στο συμπολυμερές είναι υδρόφιλο σε ουδέτερο και βασικό pH και στρέφεται προς το εξωτερικό υδατικό περιβάλλον του λιποσώματος, με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται αποθητικές αλληλεπιδράσεις ενυδάτωσης. Αντίθετα στο όξινο pH, όπου το PAA γίνεται υδρόφοβο, οι αλληλεπιδράσεις ενυδάτωσης θα δράσουν ελκτικά, εξαιτίας της ανακατάταξης του ύδατος στη μεμβρανική επιφάνεια του λιποσώματος και σε συνδυασμό με τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις van der Waals λόγω του υδρόφοβου πλέον πολυμερούς, τα λιποσώματα θα έλκονται και θα συσσωματώνονται.

Αποθητικές στερικές αλληλεπιδράσεις/ Εντροπικό φαινόμενο: Σε  $\text{pH}=7.4$  οι αλυσίδες του PAA έχουν υδρόφιλες ιδιότητες, προσελκύουν πολλά μόρια νερού, με αποτέλεσμα να αποκτούν υψηλό βαθμό ενυδάτωσης και άρα εκτεταμένη, τρισδιάστατη μορφή, που καλύπτει τη λιπιδική επιφάνεια του λιποσώματος, παρεμποδίζοντας την έλξη και άρα τη συσσωμάτωση των λιποσωμάτων (Wanga et al., 2014; Drummond et al.; 2000; Liu et al., 2014). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές ή εντροπικό φαινόμενο ουσιαστικά προκαλούν απώλεια της ελευθερίας της κίνησης των αλυσίδων. Η μείωση της διαμορφωτικής αυτής ελευθερίας οδηγεί σε αρνητική μεταβολή της εντροπίας ( $-\Delta S$ ). Κάθε αλυσίδα χάνει τη διαμορφωτική της ελευθερία και η συμβολή στην ελεύθερη ενέργεια αυξάνεται, οδηγώντας σε άπωση. Ο υψηλός βαθμός ενυδάτωσης αποκτιέται λόγω δημιουργίας δεσμών υδρογόνου του PAA με το νερό.

Ωσμωτικό φαινόμενο: οι εκτεταμένες υδρόφιλες αλυσίδες PAA μεταξύ των γειτονικών σωματιδίων στο διάστημα μεταξύ των δύο αυξάνουν τη συγκέντρωση των αλυσίδων στην περιοχή αλληλοεπικάλυψης. Η άπωση που προκύπτει, οφείλεται στην ωσμωτική πίεση του διαλύτη και στην προσπάθειά του να αραιώσει τη

συμπυκνωμένη περιφέρεια. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μόνο όταν τα λιποσώματα απομακρύνονται.

Ενθαλπική σταθεροποίηση: κατά την προσέγγιση των λιποσωμάτων, τα ενυδατωμένα μόρια ύδατος που βρίσκονται πάνω στις υδρόφιλες αλυσίδες PAA, αποδεσμεύονται, γεγονός που είναι η αιτία της αύξησης της ενθαλπίας, οδηγώντας σε άπωση (Pirra et al., 2014).

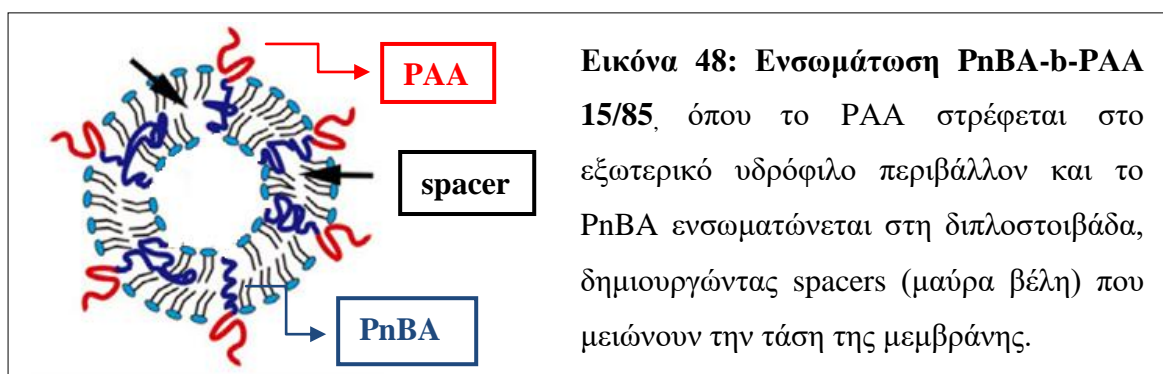
Πρέπει να σημειώσουμε, ότι το εντροπικό και το ενθαλπικό φαινόμενο λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα, με το εντροπικό να υπερτερεί του ενθαλπικού, διατηρώντας δηλαδή μια ισορροπία μεταξύ τους (balance) (Δεμέτζος 2014).

#### ➤ Το υδρόφοβο τμήμα PnBA- του συμπολυμερούς κατά συστάδες PnBA-PAA

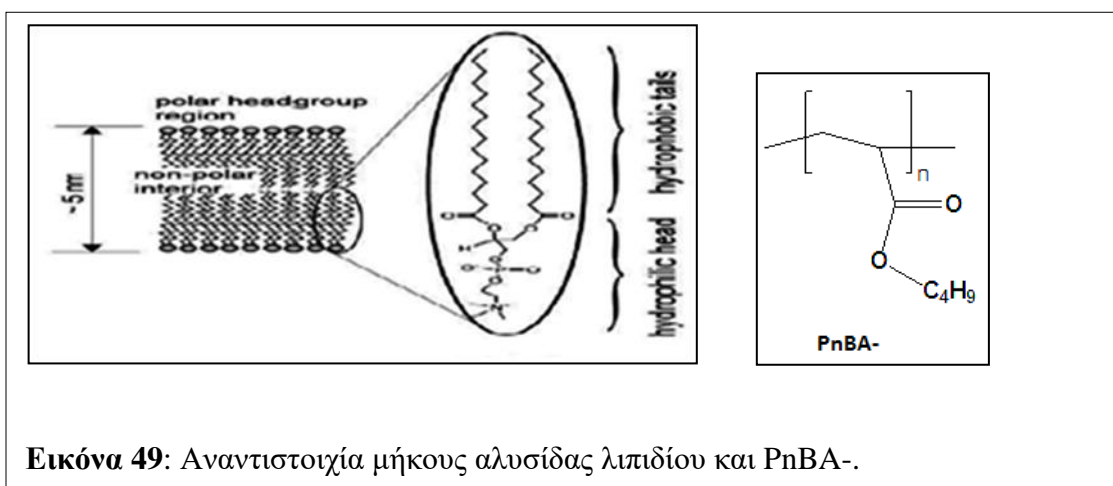
Το υδρόφοβο PnBA- του συμπολυμερούς κατά συστάδες (block copolymer) PnBA-b-PAA ενσωματώνεται στη διπλοστοιβάδα των λιποσωμάτων. Γενικά, η αυτό-συναρμολόγηση των αμφίφιλων συμπολυμερών, όπως του PnBA-b-PAA 15/85, εντός των λιποσωμάτων αναμένεται να βοηθήσει να διατηρηθεί η σφαιρική διπλοστοιβαδική δομή του λιποσώματος, καθώς και να ενισχύσει τη φυσική τους σταθερότητα. Η επιφανειακή τάση ή «τάση» της μεμβράνης των λιποσωμάτων είναι ένας από τους κύριους παράγοντες, που συμβάλλουν στη σύντηξη των κυστιδίων σε μεγαλύτερα. Η ενσωμάτωση του συμπολυμερούς κατά συστάδες PnBA-b-PAA 15/85 και πιο συγκεκριμένα του υδρόφοβου PnBA- διαταράσσει τη δομή της διπλοστοιβάδας και μειώνει την τάση της μεμβράνης των κυστιδίων (λειτουργώντας ουσιαστικά σαν επιφανειοδραστικό, καθυστερεί την τάση του συστήματος να μειώνει τη συνολική επιφάνεια μέσω της σύντηξης, ώστε να μηδενίσει την ελεύθερη ενέργεια  $W$ ). Αναλυτικά, το εισερχόμενο υδρόφοβο τμήμα PnBA- κατανέμεται ομοιογενώς στη διπλοστοιβάδα του λιπιδίου HSPC, καλύπτει τα κενά της διπλοστοιβάδας, αυξάνοντας ίσως έτσι την πυκνότητα του πακεταρίσματος της μεμβράνης. Ωστόσο, σημαντικό ρόλο ίσως παίζει η αναντιστοιχία μήκους μεταξύ του PnBA- του συμπολυμερούς (7C+1O) και της υδρογονανθρακικής αλυσίδας του λιπιδίου (16C+1O η κάθε ουρά). Η αναντιστοιχία αυτή προκαλεί τη δημιουργία νέων κενών χώρων στη διπλοστοιβάδα. Δηλαδή, το PnBA δρα ως διάκενο (spacer) μεταξύ των λιπιδικών ουρών), εξασθενεί τις ελκτικές δυνάμεις van der Waals μεταξύ των υδρόφοβων αλυσίδων αλκυλίου του HSPC και μειώνει τελικά την πυκνότητα του πακεταρίσματος (Εικόνα 48). Η χαμηλή πυκνότητα του πακεταρίσματος μειώνει εν



τέλει την τάση μεμβράνης, που όπως είπαμε είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες σύντηξης των λιποσωμάτων (Shen et al 2014).



Επίσης, η αναντιστοιχία μήκους των αλυσίδων των δύο υλικών (**Εικόνα 49**) οδηγεί συνήθως σε εμπλοκή της πολυμερικής αλυσίδας στη διπλοστοιβάδα (η συστάδα PnBA λαμβάνει ίσως και διαμόρφωση χτένας – hairpin), γεγονός που κάνει τη μεμβράνη να λάβει πιο ευνοϊκές δομές για το σύστημα, δηλαδή να μειώσει περαιτέρω την τάση της μεμβράνης και την πυκνότητα του πακεταρίσματος και να προλάβει τη σύντηξη του κυστιδίου, διατηρώντας σταθερό το σύστημα σε βάθος χρόνου (Amado et al 2009).



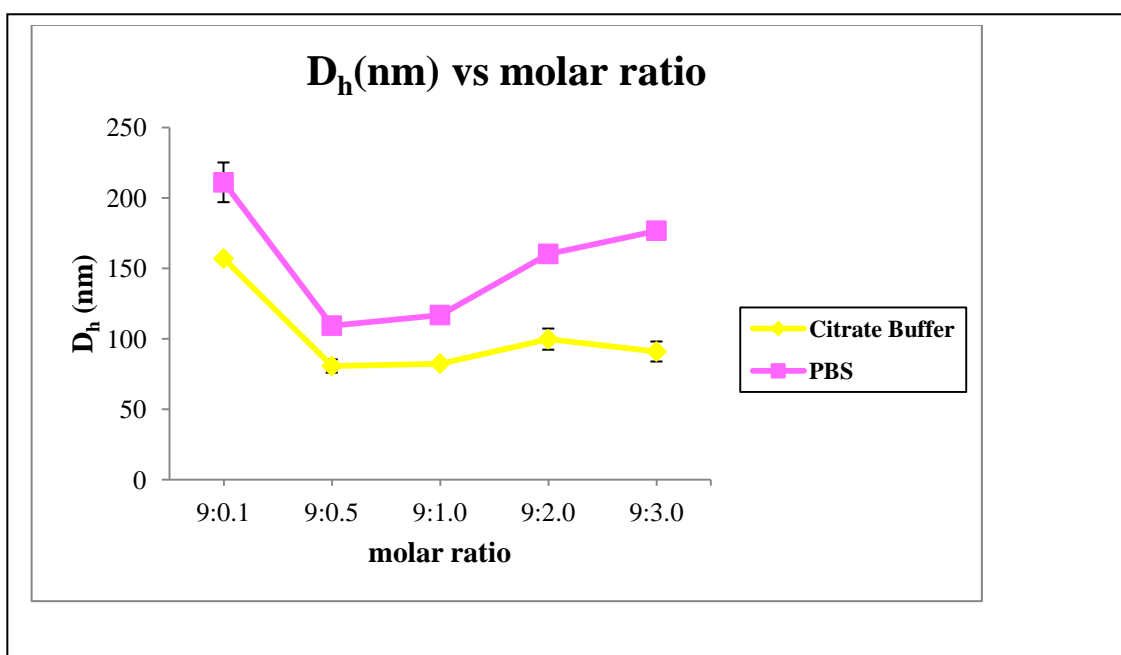
Καταλήγοντας, αν συνδυάσουμε τα αποτελέσματα του DSC για τη θερμοτροπική συμπεριφορά των συστημάτων, η ενσωμάτωση του τμήματος (block) PnBA- στη διπλοστοιβάδα προσδίδει στη μεμβράνη ιδιότητες ισότροπου υγρού (solution like model), διότι η απομάκρυνση των ουρών του φωσφολιπιδίου που προκαλεί, αλλάζει την ισχύ των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ουρών και του PnBA, με αποτέλεσμα να

εξασθενούν οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, και να αλλάζει την κρυσταλλική κατάστασή του φωσφολιπιδίου.

➤ **Η ποσότητα του συμπολυμερούς κατά συστάδες (block copolymer) PnBA-b-PAA**

Πρέπει να σημειωθεί ότι, όχι μόνο η παρουσία αλλά και η ποσότητα του συμπολυμερούς κατά συστάδες (block copolymer) PnBA-b-PAA παίζει εξίσου σημαντικό ρόλο στη φυσικοχημική σταθερότητα των συστημάτων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που περιγράψαμε προηγουμένως, οι μοριακές αναλογίες HSPC:PnBA-b-PAA 15/85, που περιείχαν μεσαίες έως και υψηλές ποσότητες πολυμερούς χαρακτηρίστηκαν πολύ σταθερές, τουλάχιστον για το χρονικό διάστημα της μελέτης. Καθώς το ποσοστό του πολυμερούς αυξάνεται στην αναλογία, τόσο περισσότερες μονάδες PAA προσροφώνται στην επιφάνεια των λιποσωμάτων (μεγαλύτερος αριθμός υδρόφιλων αλυσίδων ανά μονάδα επιφάνειας του λιποσώματος), τόσο πιο έντονα είναι τα φαινόμενα που περιγράψαμε πριν. Παράλληλα, αυξάνονται και οι μονάδες του block PnBA- που ενσωματώνονται στη διπλοστοιβάδα του κάθε λιποσώματος και συνεισφέρουν στην σταθερότητα. Οι μοριακές αναλογίες 9:0.5 και 9:1.0 είχαν την καλύτερη φυσικοχημική συμπεριφορά σε σχέση με τις άλλες, ενώ οι 9:2.0 και 9:3.0 βρέθηκαν αρκετά σταθερές. Αν συνδυάσουμε τα αποτελέσματα του DSC, υψηλό ποσοστό πολυμερούς προκάλεσε έντονη αποσταθεροποίηση (οι 9:2.0 και 9:3.0 παρουσίασαν ιδιότητες ισότροπου υγρού/ solution like model). Ίσως, σε εξαιρετικά υψηλά ποσοστά πολυμερούς, το PnBA δρώντας ως spacer, προκάλεσε υπερβολικά πολλά κενά, προκαλώντας εν τέλει υδροφοβικά ελαττώματα στη μεμβράνη και κατάρρευση αυτής, αντικατοπτρίζοντας τα αποτελέσματα DSC των 9:2.0 και 9:3.0 μοριακών αναλογιών (Fujiwara et al.; 1997; Bonora et al., 2003; Matsingou et al., 2007; Pippa et al., 2016).

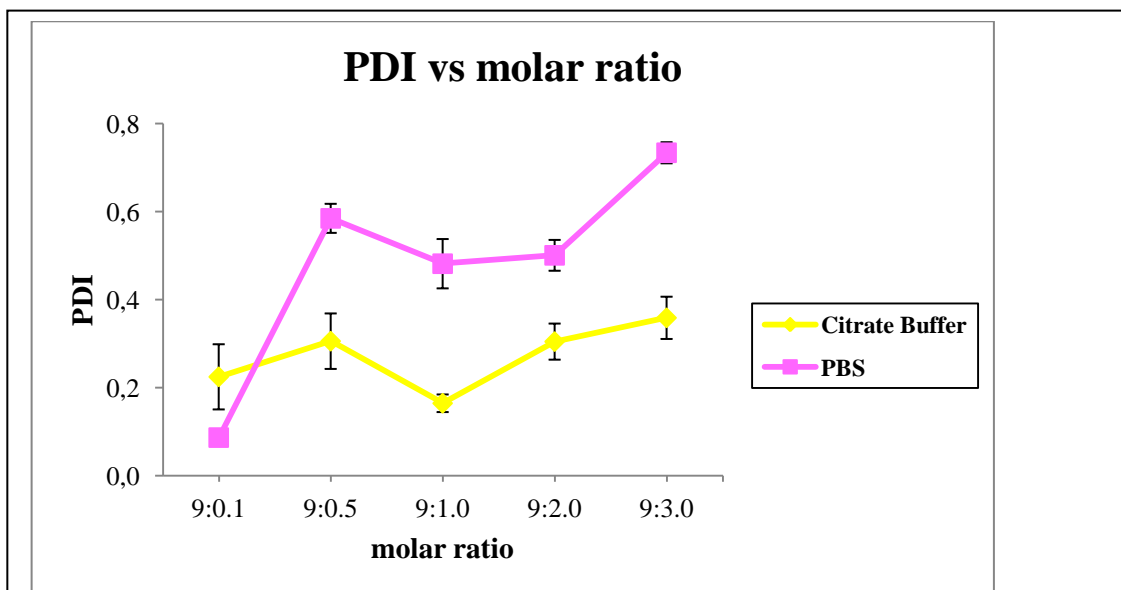
### 3.3 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των κενών γιμειρικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85) σε Citrate Buffer (pH=4.0) (όξινο πρωτόκολλο)



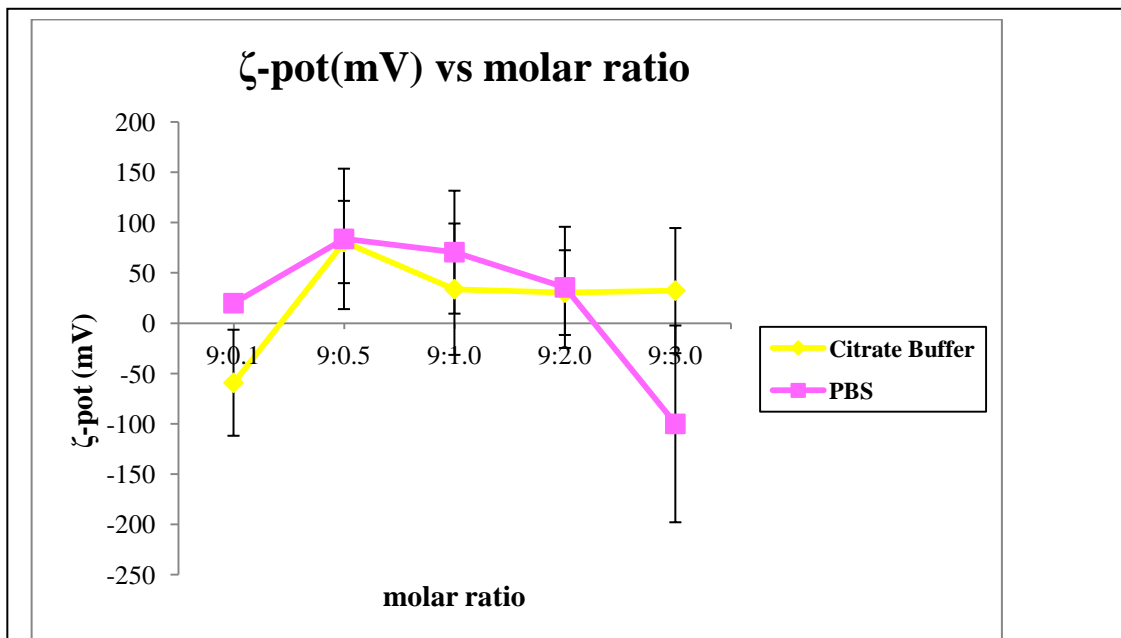
**Διάγραμμα 19:** Μέση υδροδυναμική διάμετρος  $D_h$  (nm) όλων των μοριακών αναλογιών των λιποσωμάτων σύστασης HSPC: PnBA-b-PAA (15/85), σε δύο διαφορετικά μέσα διασποράς, PBS (Phosphate Buffer Saline) με pH=7.4 και Citrate Buffer με pH=4.0 αντίστοιχα.

Όλες οι μοριακές αναλογίες παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές  $D_h$  στο όξινο περιβάλλον σε σύγκριση με το PBS (**Διάγραμμα 19**). Αυτό είναι αναμενόμενο από τη βιβλιογραφία, καθώς η υδρόφιλη συστάδα PAA, που προσροφάται στη λιποσωματική επιφάνεια και εκτείνεται προς το υδατικό περιβάλλον, είναι ένας ασθενής πολυηλεκτρολύτης, που περιέχει την ομάδα του  $-COOH$  (με  $pK_a \approx 4.2$ ). Σε υψηλές τιμές pH, δεν υπάρχει ισχυρή σύνδεση μεταξύ PAA και λιποσωματικής επιφάνειας (μόνο η υδρόφοβη συστάδα PnBA εισχωρεί μέσα στη μεμβράνη), ενώ καθώς το pH μειώνεται, η σύνδεση PAA- λιποσωμάτων αυξάνεται. Όταν το PAA βρίσκεται σε ένα διάλυμα υφίσταται μια coil-to-globule μετάβαση σε  $pH < 6.2$ , που περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω. Η μεταβολή αυτή μπορεί να αποδοθεί στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ του PAA και της λιποσωματικής επιφάνειας (Drummond et al., 2000). Οπότε στο ουδέτερο pH (PBS), η συστάδα του PAA είναι μερικώς ιονισμένη (σύμφωνα με τη βιβλιογραφία σε pH 7.4, σχεδόν το 45% των καρβοξυλομάδων του PAA είναι ιονισμένες) και η αλυσίδα του διαθέτει εκτεταμένη διαμόρφωση.

Αντίθετα, στο Citrate Buffer όπου το pH είναι 4.0, οι ιονισμένες καρβοξυλομάδες ( $-\text{COO}^-$ ) του PAA πρωτονιώνονται σε  $-\text{COOH}$ , χάνοντας έτσι το PAA την εκτεταμένη μορφή και την τρισδιάστατη διαμόρφωσή του, με αποτέλεσμα η πολυμερική αλυσίδα να συρρικνώνεται. Με την πρωτονίωση των ομάδων, το πολυμερές γίνεται επίσης πιο υδρόφοβο και η επιφανειακή προσρόφησή του αυξάνεται. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε πλευρική συμπίεση της διπλοστοιβάδας και διατάραξη της μεμβράνης. Σε αυτό το pH, η εισαγωγή υδρόφοβων τμημάτων του PAA στις μεμβράνες των γειτονικών λιποσωμάτων μπορεί να οδηγήσει σε στενή επαφή των κυστιδίων μεταξύ τους, να προκληθεί τοπική αφυδάτωση στο σημείο επαφής και ελαττώματα στο πακετάρισμα των λιπιδίων μέσα στη μεμβράνη και τελικώς σύντηξη των λιποσωμάτων. Επίσης, η εισχώρηση του υδρόφοβου πρωτονιωμένου πολυμερούς προκαλεί τη δημιουργία πόρων στη διπλοστοιβάδα (Fujiwara et al. 1997; Drummond et al., 2000; Felber et al., 2012; Peasron et al.; 2013; Munaviron et al., 2014; Naziris et al., 2017). Επιπροσθέτως, το αρνητικό φορτίο, που φέρει η καρβοξυλομάδα ( $-\text{COO}^-$ ) στο ουδέτερο pH, αναγκάζει τα λιποσώματα να απωθούν το ένα το άλλο, προλαμβάνοντας τη σύντηξη μεταξύ τους, διατηρώντας με αυτό το τρόπο το μέγεθός τους σε χαμηλές τιμές. Εξάλλου, η μέση υδροδυναμική διάμετρος περιλαμβάνει τα φορτία που είναι προσροφημένα στην επιφάνεια του σωματιδίου, οπότε η παρουσία περισσότερων φορτίων λόγω ιονισμένου PAA στο PBS, οδηγεί αυτόματα και σε υψηλότερες τιμές  $D_h$ . Αυτό επιβεβαιώνεται και στο **Διάγραμμα 19**.



**Διάγραμμα 20:** Δείκτης πολυδιασποράς PDI όλων των μοριακών αναλογιών των λιποσωμάτων σύστασης HSPC: PnBA-b-PAA (15/85), σε δύο διαφορετικά μέσα διασποράς, PBS (Phosphate Buffer Saline) με pH=7.4 και Citrate Buffer με pH=4.0 αντίστοιχα.

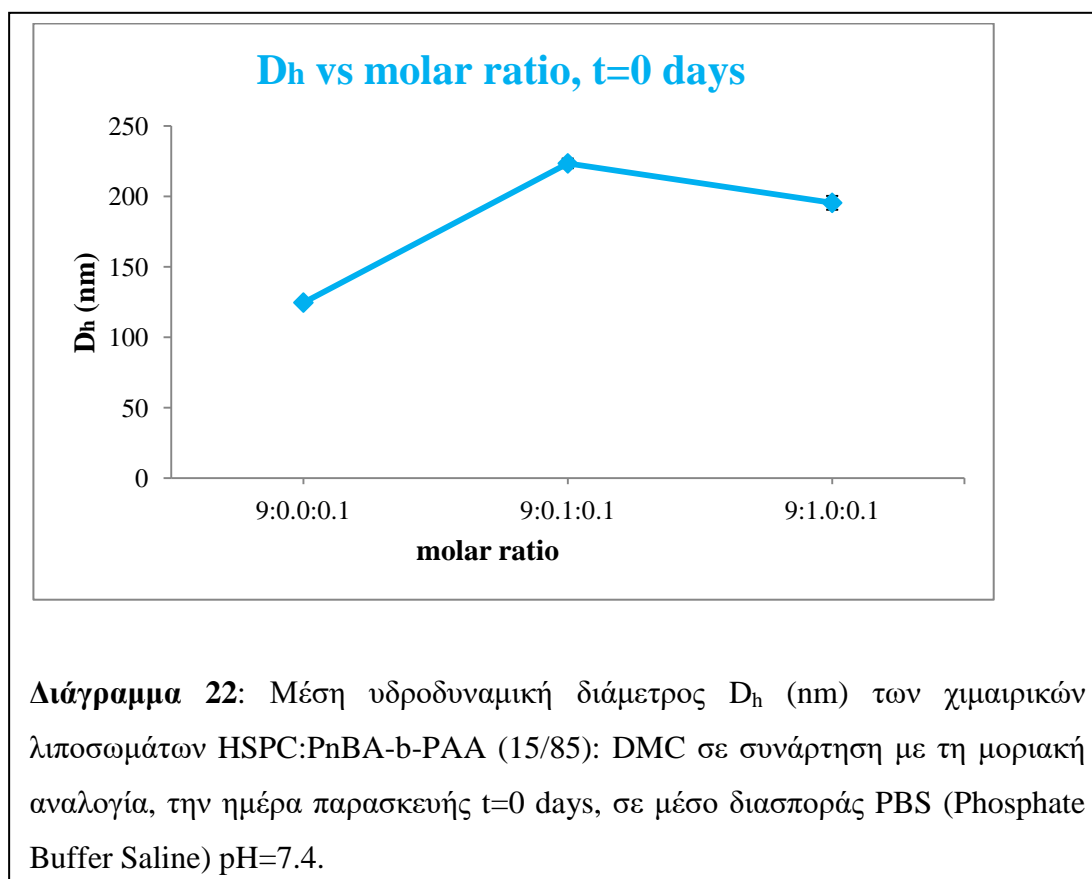


**Διάγραμμα 21:** ζ-δυναμικό ζ-pot (mV) όλων των μοριακών αναλογιών των λιποσωμάτων σύστασης HSPC: PnBA-b-PAA (15/85), σε δύο διαφορετικά μέσα διασποράς, PBS (Phosphate Buffer Saline) με pH=7.4 και Citrate Buffer με pH=4.0 αντίστοιχα.

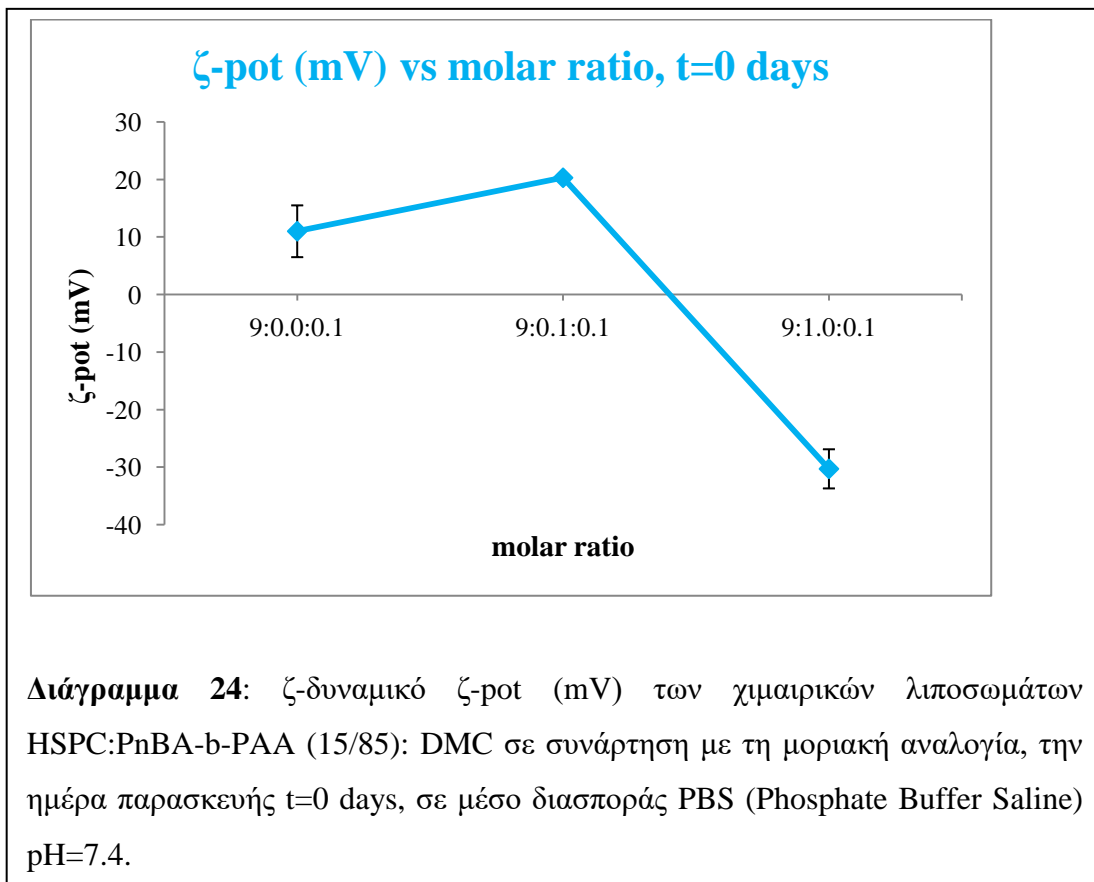
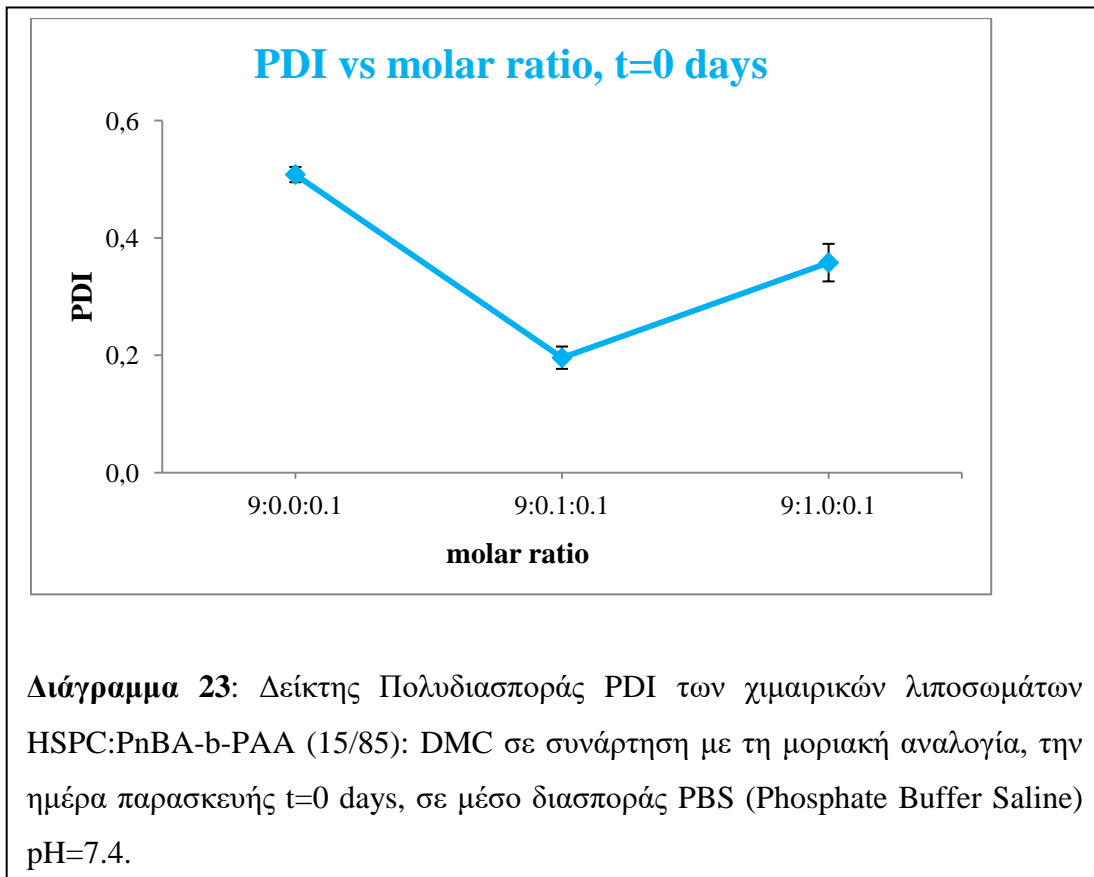
Όλες οι μοριακές αναλογίες παρουσιάζουν χαμηλότερες τιμές PDI στο όξινο pH σε σχέση με το PBS (**Διάγραμμα 20**). Όσο αφορά το ζ-δυναμικό, στο όξινο pH εμφανίζονται κυρίως χαμηλότερες απόλυτες τιμές με εξαίρεση την αναλογία 9:0.1 (**Διάγραμμα 21**). Οι μεταβολές των  $D_h$  και PDI σε συνάρτηση με τη μοριακή αναλογία είναι παρόμοιες και στα δύο pH. Η  $D_h$  παρουσιάζει μια αρχική μείωση (μέχρι το σύστημα 9:0.5, που εμφανίζεται και η χαμηλότερη τιμή της) και μετά μια σταδιακή αύξηση. Ο PDI παρουσιάζει μια αρχική αύξηση, που ακολουθείται από μια μικρή μείωση και ύστερα από μια σταδιακή αύξηση. Τα παραπάνω αποτελέσματα (η διαφοροποίηση των μεγεθών στα δύο διαφορετικά μέσα) επιβεβαιώνουν ότι το ενσωματωμένο συμπολυμερές κατά συστάδες είναι pH-αποκρινόμενο, ενώ το εύρος pH που ενεργοποιείται η απόκρισή του είναι περίπου 4.0-7.4 (Hao et al., 2015).

### 3.4 Φυσικοχημικά αποτελέσματα των χιμαιρικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85):DMC

#### 3.4.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των χιμαιρικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85):DMC την ημέρα παρασκευής t=0 days



Οι χιμαιρικές αναλογίες, που περιέχουν και συμπολυμερές κατά συστάδες εκτός από το βιοδραστικό μόριο, παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές  $D_h$  από τη συμβατική αναλογία 9:0.0:0.1. Μεταξύ των χιμαιρικών αναλογιών, η 9:0.1:0.1 παρουσιάζει την υψηλότερη τιμή  $D_h$  (Διάγραμμα 22).



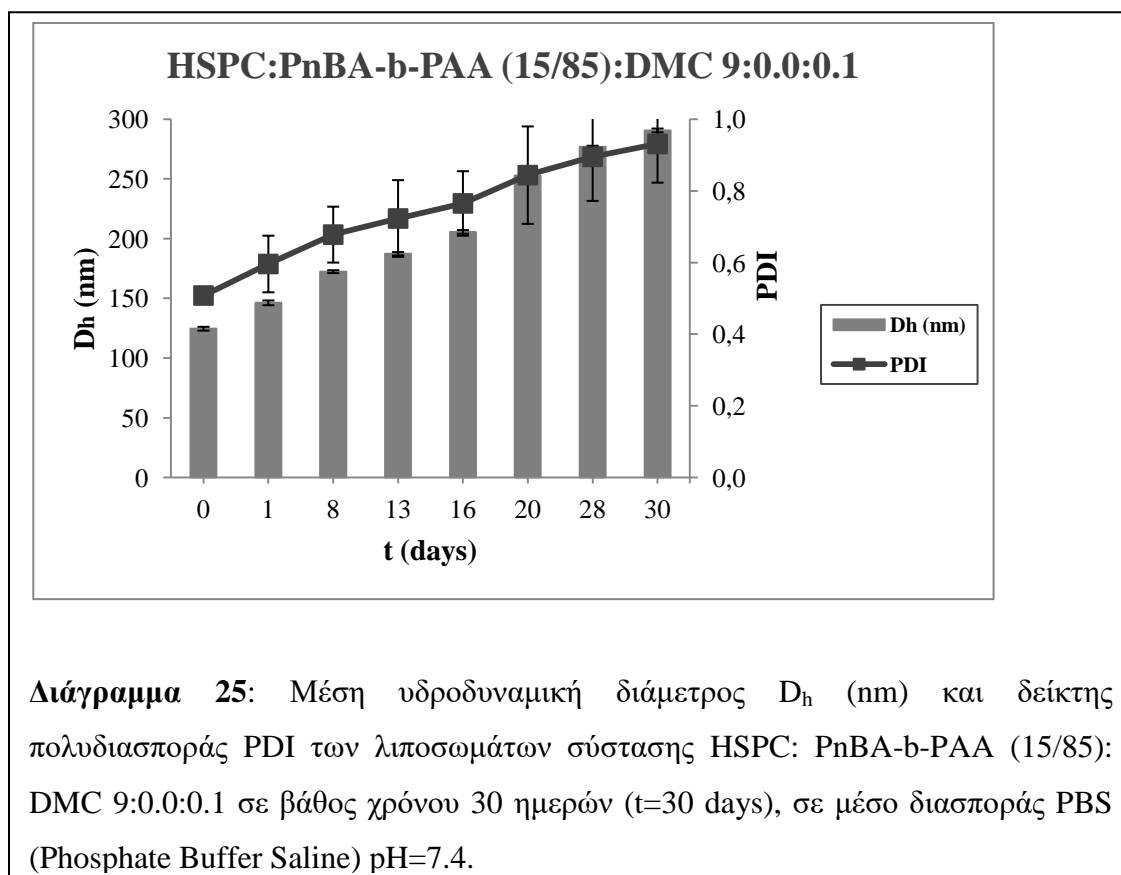


Ως προς το PDI, η ενσωμάτωση του πολυμερούς στις χημεικές αναλογίες προκάλεσε βελτίωση των τιμών του (μείωση του PDI). Η μοριακή αναλογία 9:0.1:0.1 παρουσιάζει το χαμηλότερο PDI (**Διάγραμμα 23**).

Όσο αφορά το ζ-δυναμικό, παρουσιάζεται επίσης βελτίωση λόγω παρουσίας του πολυμερούς, καθώς οι χημεικές αναλογίες παρουσιάζουν υψηλότερες απόλυτες τιμές από την αντίστοιχη συμβατική 9:0.0:0.1. Η 9:1.0:0.1 παρουσιάζει την υψηλότερη τιμή (-30.3mV) (**Διάγραμμα 24**). Το αρνητικό φορτίο πιθανόν να οφείλεται στην παρουσία της ιονισμένης  $-\text{COO}^-$ , που περιέχεται στο πολυμερές, όταν αυτό βρίσκεται στο ουδέτερο pH=7.4 του PBS. Επιπλέον, η απόλυτη τιμή 30 mV αποτελεί θεωρητικά την κατώτερη τιμή ζ-δυναμικού για την επίτευξη σταθερής κolloειδούς διασποράς. Άρα, η ενσωμάτωση του πολυμερούς συντέλεσε σημαντικά στην ηλεκτροστατική σταθεροποίηση της αναλογίας αυτής.

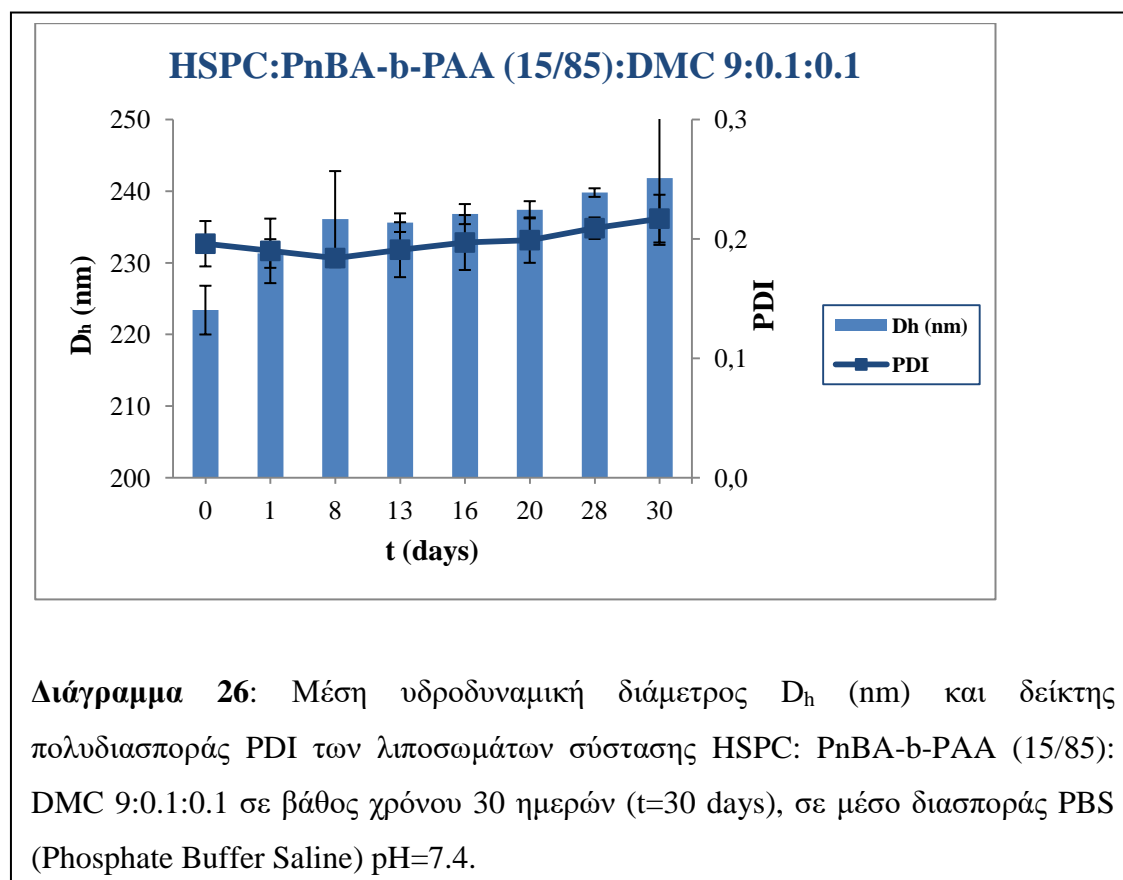
### 3.4.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των γιαιρικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85):DMC σε βάθος χρόνου (μελέτη σταθερότητας των συστημάτων ξεχωριστά)

#### 3.4.2.1 HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC 9:0.0:0.1



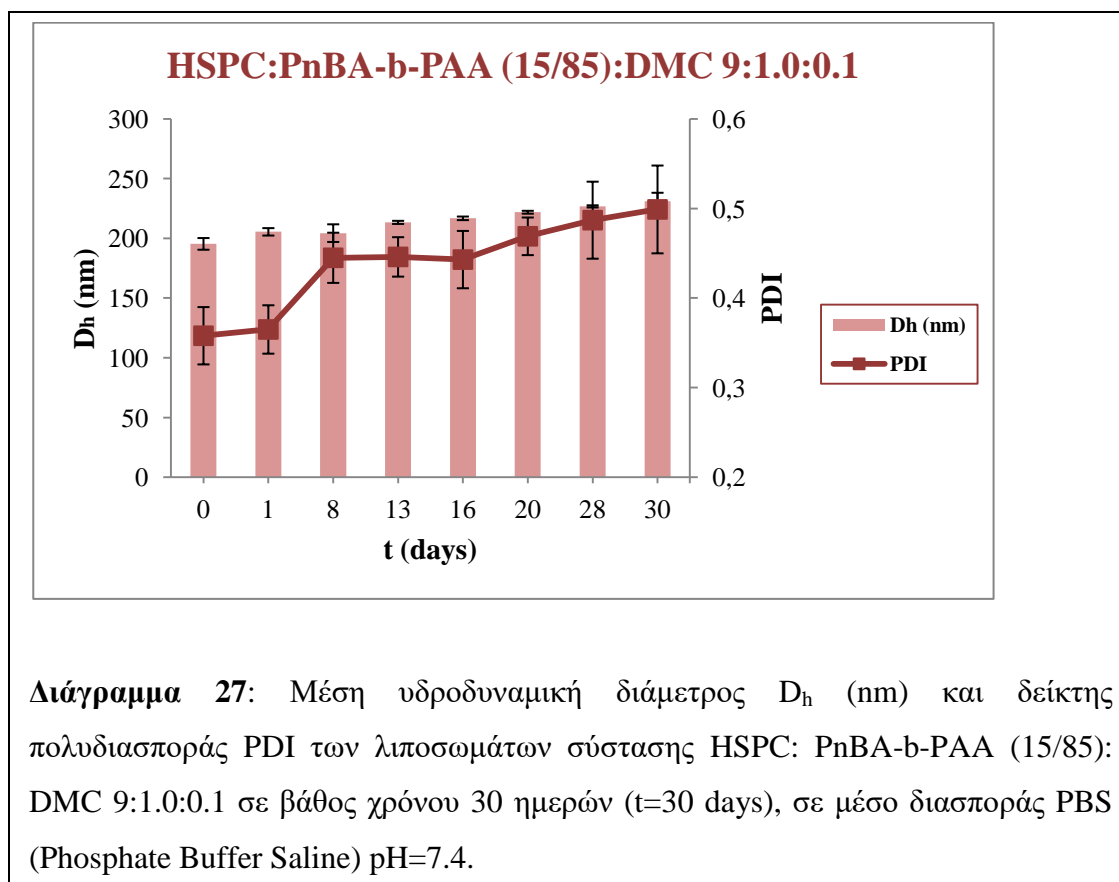
Οι τιμές της  $D_h$  σε βάθος χρόνου 30 ημερών στη μοριακή αναλογία 9:0.0:0.1 κυμαίνονται από 124.6 έως 290.6 nm. Η τιμή της  $D_h$  δεν παραμένει σταθερή σε βάθος χρόνου, παρουσιάζοντας σταδιακή αύξηση, η οποία φθάνει συνολικά τα 166 nm. Ο PDI κυμαίνεται από 0.508 έως 0.931, εμφανίζοντας επίσης σταδιακή αύξηση στο χρονικό διάστημα των 30 ημερών της μελέτης, υποδηλώνοντας ελάχιστη έως και καθόλου ομοιογένεια στο σύστημα με το πέρασμα των ημερών. Επομένως, το σύστημα θεωρείται ασταθές σε βάθος χρόνου (Διάγραμμα 25).

### 3.4.2.2 HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC 9:0.1:0.1



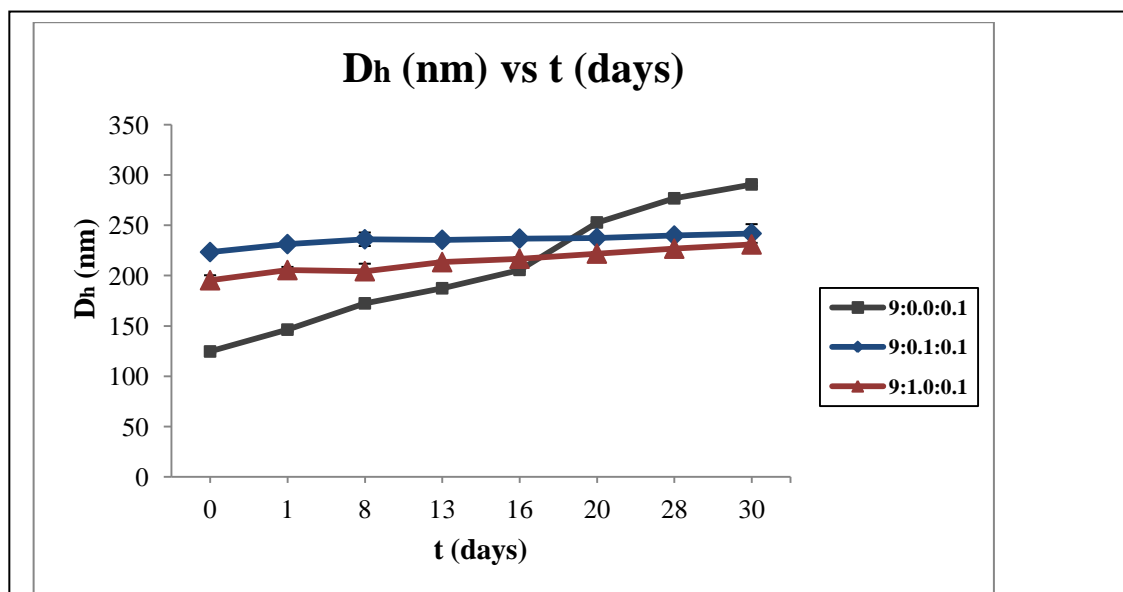
Οι τιμές της  $D_h$  σε βάθος χρόνου 30 ημερών στη μοριακή αναλογία 9:0.1:0.1 κυμαίνονται από 223.4 έως 241.8 nm. Η τιμή της  $D_h$  μένει σταθερή σε βάθος χρόνου (τουλάχιστον για το διάστημα της μελέτης αυτής), με τη συνολική διαφορά να φτάνει στα 18.4nm. Άρα, τα λιποσώματα του συγκεκριμένου συστήματος κατατάσσονται στην κατηγορία των Μεγάλων Μονοστιβαδικών Λιποσωμάτων (Large Unilamellar Vesicles, LUVs, 200-800nm). Ο PDI κυμαίνεται από 0.196 έως 0.217, με ενδιάμεσες διαδοχικές αυξομειώσεις, παρουσιάζοντας αυξημένη σταθερότητα σε βάθος χρόνου, υποδηλώνοντας πολύ καλή ομοιογένεια για το σύστημα στο χρονικό αυτό διάστημα (Διάγραμμα 26).

### 3.4.2.3 HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC 9:1.0:0.1

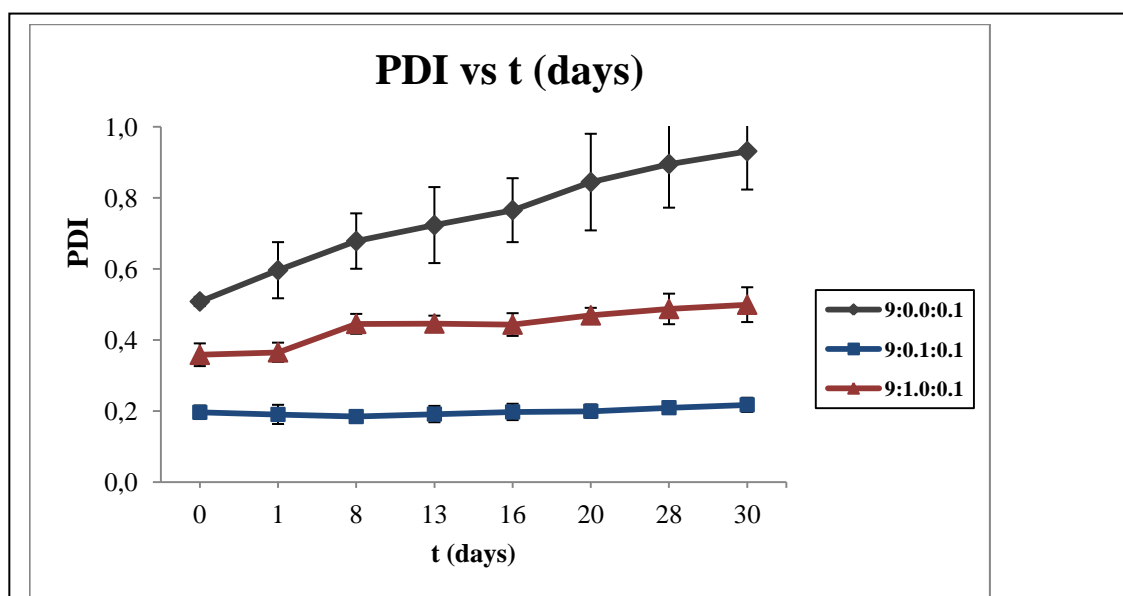


Οι τιμές της  $D_h$  σε βάθος χρόνου 30 ημερών στη μοριακή αναλογία 9:1.0:0.1 κυμαίνονται από 195.4 έως 231.0 nm. Η τιμή της  $D_h$  μένει σταθερή σε βάθος χρόνου (τουλάχιστον για το διάστημα της μελέτης αυτής), με τη συνολική διαφορά να φτάνει στα 35.6 nm. Άρα, τα λιποσώματα του συγκεκριμένου συστήματος κατατάσσονται στην κατηγορία των Μεγάλων Μονοστιβαδικών Λιποσωμάτων (Large Unilamellar Vesicles, LUVs, 200-800nm). Ο PDI κυμαίνεται από 0.358 έως 0.499, με ενδιάμεσες διαδοχικές αυξομειώσεις, παρουσιάζοντας μέτρια σταθερότητα σε βάθος χρόνου, υποδηλώνοντας πολύ καλή ομοιογένεια για το σύστημα στο χρονικό αυτό διάστημα (Διάγραμμα 27).

**3.4.3 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των γιαιρικών λιποσωμάτων HSPC:PnBA-b-PAA (15/85):DMC σε βάθος χρόνου (συγκριτική μελέτη σταθερότητας)**



**Διάγραμμα 28:** Μέση υδροδυναμική διάμετρος  $D_h$  (nm) όλων των μοριακών αναλογιών των λιποσωμάτων σύστασης HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC σε βάθος χρόνου 30 ημερών ( $t=30$  days), σε μέσο διασποράς PBS (Phosphate Buffer Saline) pH=7.4.

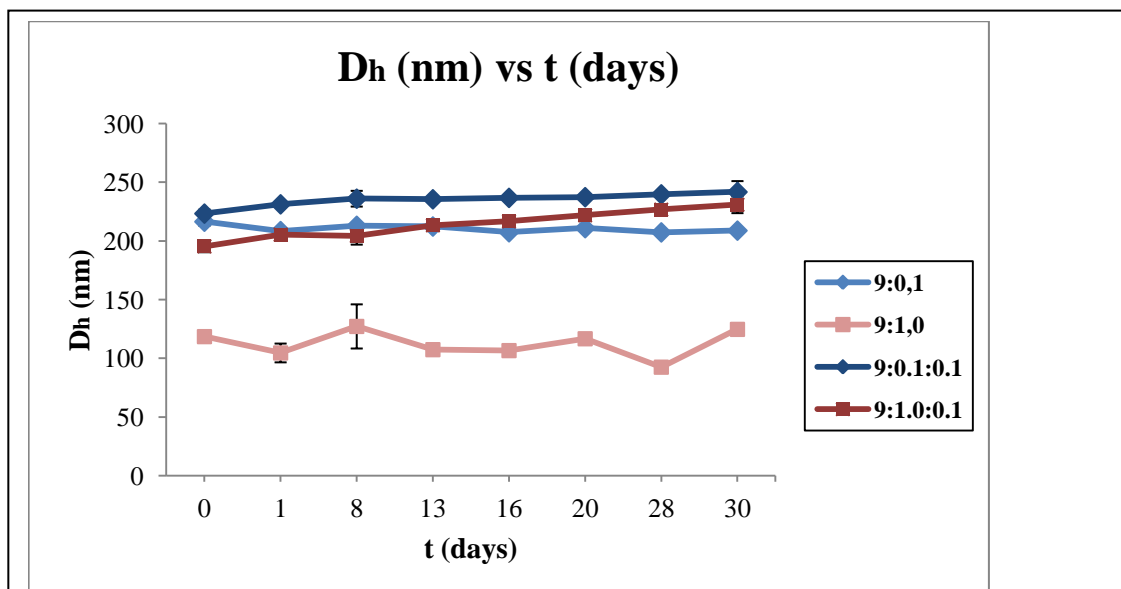


**Διάγραμμα 29:** Δείκτης πολυδιασποράς PDI όλων των μοριακών αναλογιών των λιποσωμάτων σύστασης HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC σε βάθος χρόνου 30 ημερών ( $t=30$  days), σε μέσο διασποράς PBS (Phosphate Buffer Saline) pH=7.4.

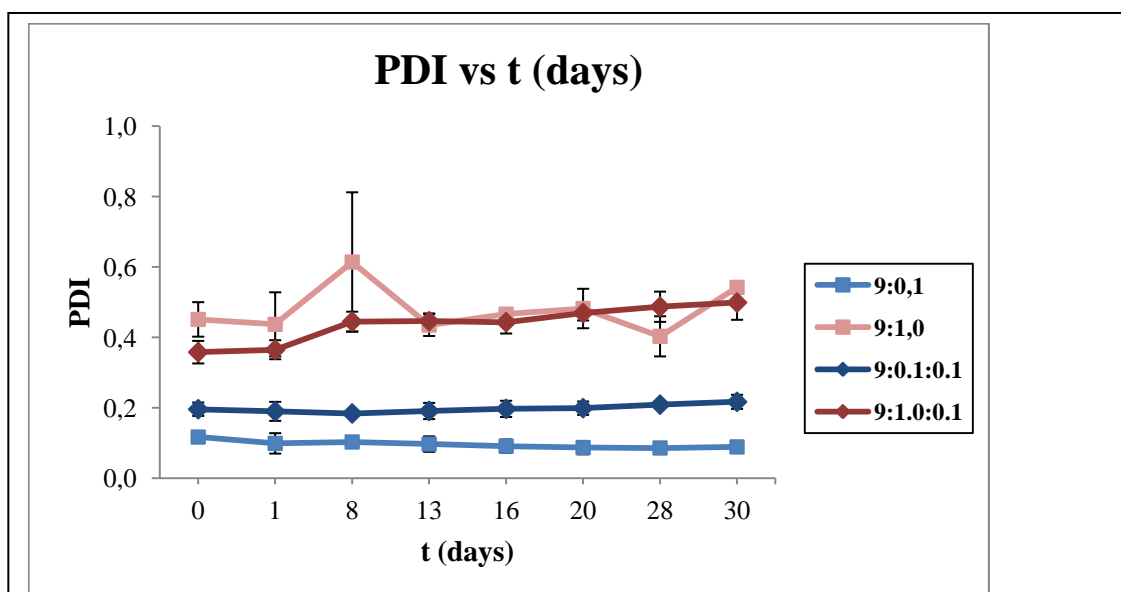
Μελετώντας λοιπόν την σταθερότητα των συστημάτων σε βάθος χρόνου 30 ημερών, τα χιμαιρικά λιποσωμακά συστήματα HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC βρέθηκαν να διατηρούν τα αρχικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους (μέγεθος και κατανομή μεγέθους) τουλάχιστον στο χρονικό αυτό διάστημα που μελετήθηκαν, σε αντίθεση με τη συμβατική μοριακή αναλογία 9:0.0:0.1 (**Διαγράμματα 28, 29**). Ως προς τη  $D_h$ , σε όλες τις χιμαιρικές μοριακές αναλογίες παρατηρήθηκαν μικρές μεταβολές (αυξομειώσεις) κατά τη διάρκεια των ημερών της μελέτης, ωστόσο η διαφορά μεταξύ μέγιστης και ελάχιστης τιμής δεν ξεπέρασε σε καμιά αναλογία τα 35 nm. Η 9:1.0:0.1 μοριακή αναλογία παρουσιάζει χαμηλότερες τιμές  $D_h$  από την 9:0.1:0.1. Συνολικά, το μέγεθος και των δύο χιμαιρικών μοριακών αναλογιών παρέμεινε σταθερό κατά τη διάρκεια της μελέτης σταθερότητας (**Διάγραμμα 28**).

Ως προς το PDI, παρατηρούμε παρόμοιες μεταβολές (**Διάγραμμα 29**). Σε όλες τις μοριακές αναλογίες, παρουσιάζονται μικρές αυξομειώσεις σε βάθος χρόνου, με αποτέλεσμα ο PDI των χιμαιρικών συστημάτων να παραμείνει σταθερός κατά τη διάρκεια της μελέτης σταθερότητας. Η μοριακή αναλογία 9:0.1:0.1 παρουσιάζει μικρότερες τιμές PDI από την 9:1.0:0.1 και συνεπώς ήταν πιο ομοιογενές σύστημα.

Συγκριτικά με τη συμβατική αναλογία 9:0.0:0.1, οι χιμαιρικές αναλογίες παρουσίασαν μικρότερες και σταθερότερες τιμές  $D_h$  σε βάθος χρόνου 30 ημερών (**Διάγραμμα 28**), όπως επίσης και PDI (**Διάγραμμα 29**).



**Διάγραμμα 30:** Μέση υδροδυναμική διάμετρος  $D_h$  (nm) όλων των μοριακών αναλογιών των χμιαϊρικών λιποσωμάτων σύστασης HSPC: PnBA-b-PAA (15/85) και HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC σε βάθος χρόνου 30 ημερών ( $t=30$  days), σε μέσο διασποράς PBS (Phosphate Buffer Saline)  $pH=7.4$ .



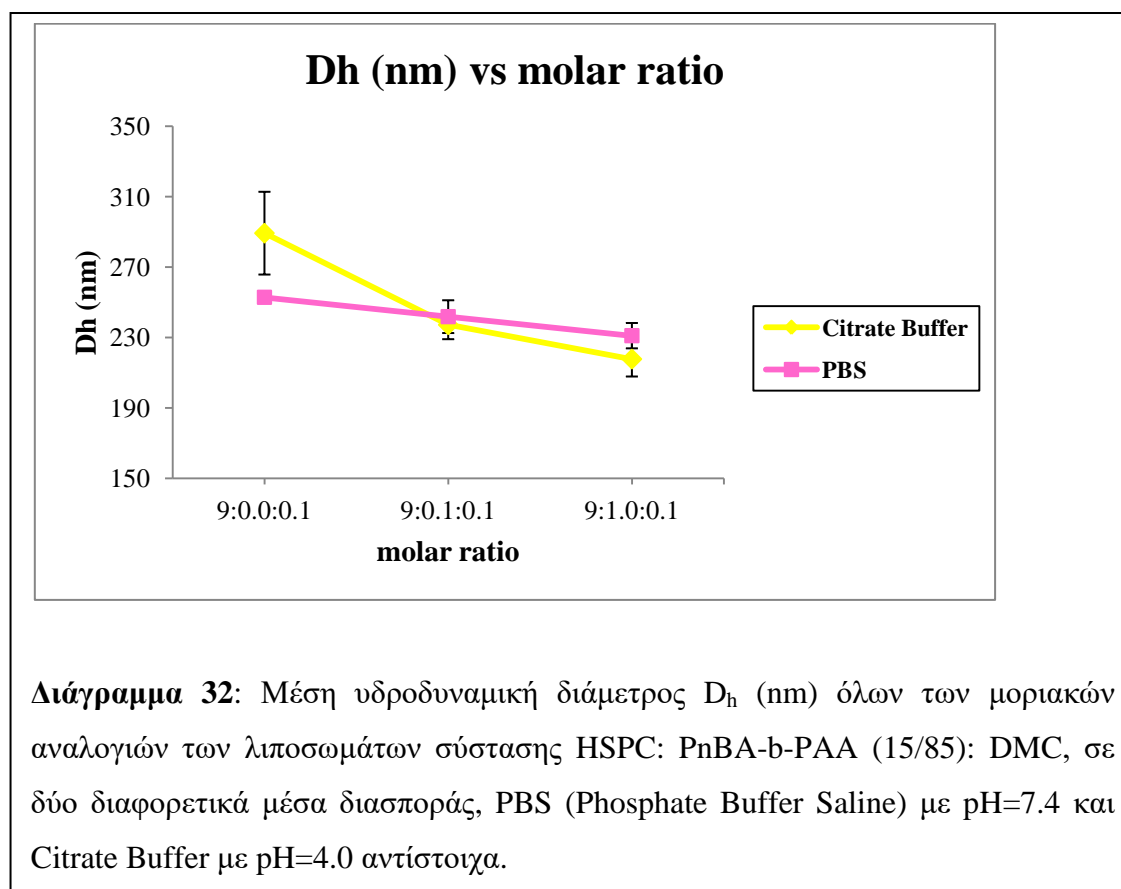
**Διάγραμμα 31:** Δείκτης πολυδιασποράς PDI όλων των μοριακών αναλογιών των χμιαϊρικών λιποσωμάτων σύστασης HSPC: PnBA-b-PAA (15/85) και HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC σε βάθος χρόνου 30 ημερών ( $t=30$  days), σε μέσο διασποράς PBS (Phosphate Buffer Saline)  $pH=7.4$ .

Όσο αφορά τα χμαιορικά συστήματα με εγκλωβισμένο βιοδραστικό μόριο από τα αντίστοιχα κενά συστήματα (**Διαγράμματα 30, 31**), η ενσωμάτωση της DMC δεν έφερε μεγάλες αλλαγές στη φυσικοχημική σταθερότητα, με εξαίρεση την αναλογία 9:1.0:0.1 που παρουσίασε υψηλότερες τιμές  $D_h$  από την αντίστοιχη κενή. Η 9:0.1:0.1 παρουσίασε αυξημένες, αλλά παραπλήσιες, τιμές  $D_h$  με την 9:0.1. Η αύξηση του μεγέθους σε σχέση με τα αντίστοιχα κενά συστήματα αποδίδεται στην ενσωμάτωση του μορίου (Peng et al., 2017). Ο PDI παρουσίασε παρόμοιες μεταβολές και παραπλήσιες τιμές και στις δύο αναλογίες, που φέρουν βιοδραστικό μόριο, με τις αντίστοιχες κενές τους.

Η φυσικοχημική συμπεριφορά των χμαιορικών λιποσωμάτων HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC ερμηνεύεται επίσης από τη θεωρία DLVO, οφείλεται στην παρουσία της υδρόφιλης συστάδας PAA και της υδρόφοβης PnBA του συμπολυμερούς κατά συστάδες PnBA-b-PAA (15/85), ενώ διαφοροποιείται από το εκάστοτε ποσοστό του πολυμερούς στη μοριακή αναλογία, όπως έχει αναλυθεί στην παράγραφο 3.2.4 για τα αντίστοιχα κενά συστήματα.

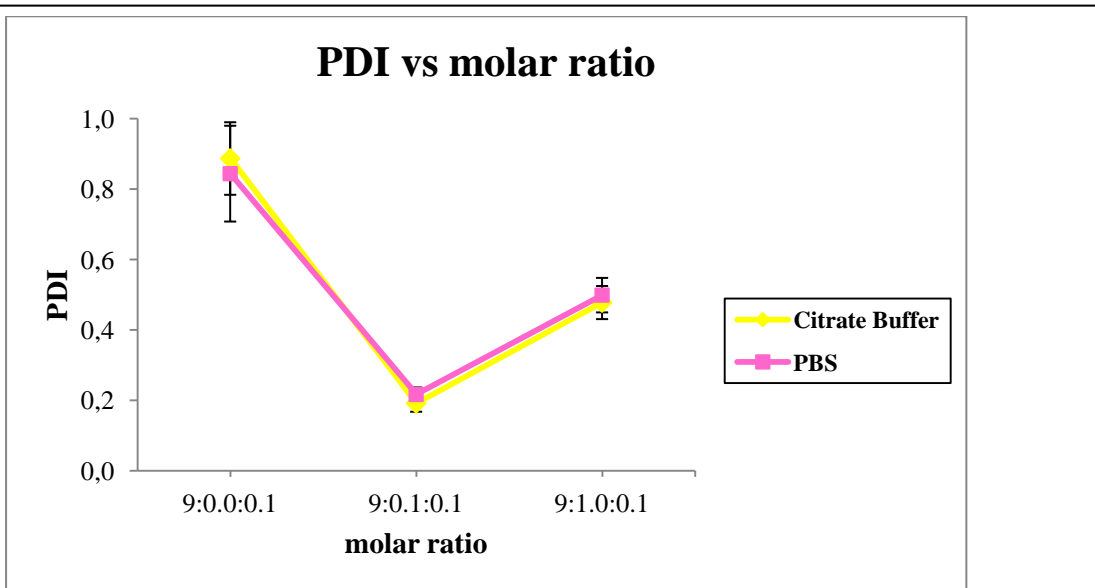


### **3.5 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των χημικών λιποσωμάτων HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC σε Citrate Buffer (pH=4.0) (όξινο πρωτόκολλο)**

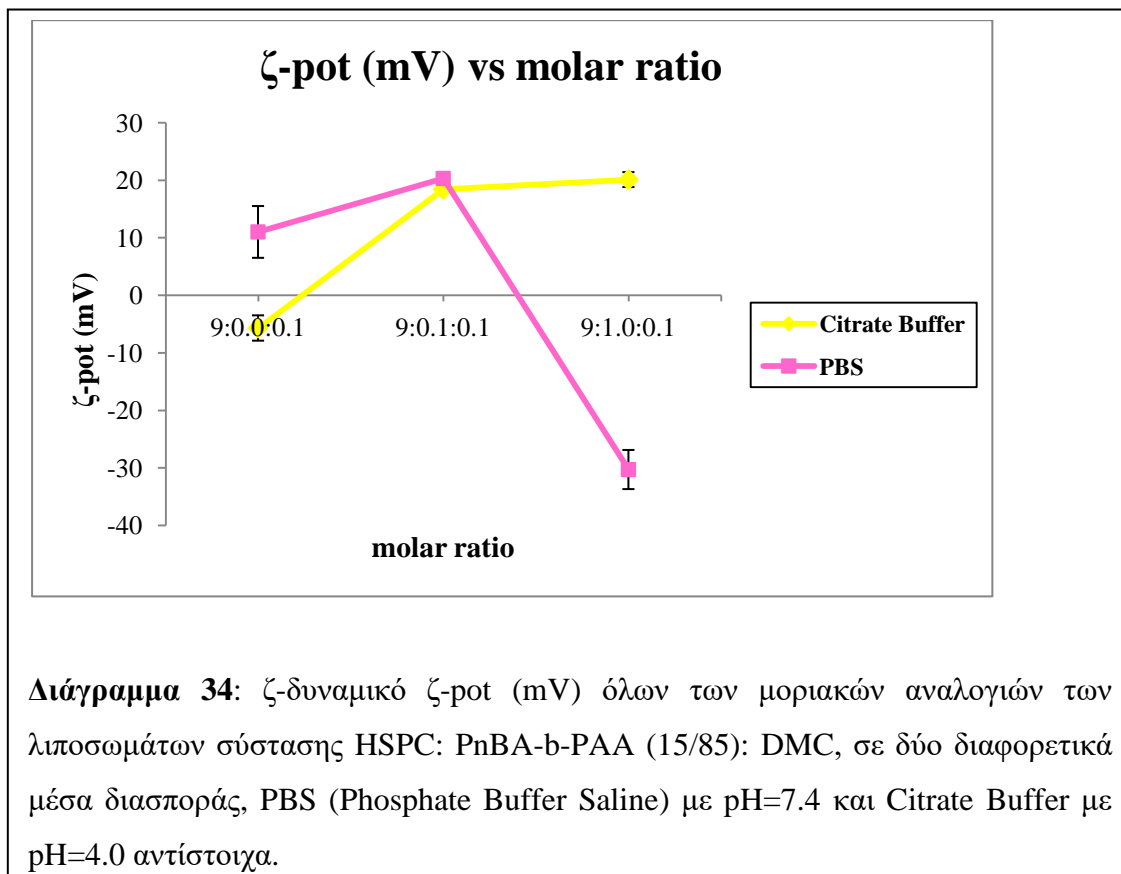


Όπως και στα αντίστοιχα κενά συστήματα, προσθέσαμε συγκεκριμένη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών [Citrate Buffer (pH=4.0)] στις παρασκευασθείσες κολλοειδείς διασπορές και μετά μετρήσαμε τη μέση υδροδυναμική διάμετρο  $D_h$  (nm), το δείκτη πολυδιασποράς PDI και το ζ-δυναμικό ζ-pot (mV). Ακολούθως συγκρίναμε τις μετρήσεις αυτές με τις αντίστοιχες τιμές που παρουσίασαν τα λιποσώματα σε PBS (pH=7.4) (οι μετρήσεις αυτές και των δύο μέσων έλαβαν μέρος την ίδια μέρα από την ημέρα παρασκευής).

Οι χημικές αναλογίες 9:0.1:0.1 και 9:1.0:0.1 παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές  $D_h$  στο όξινο pH του Citrate Buffer σε σχέση με το ουδέτερο του PBS. Αντίθετα, η συμβατική αναλογία 9:0.0:0.1 είχε υψηλότερη τιμή  $D_h$  στο όξινο περιβάλλον (Διάγραμμα 32).



**Διάγραμμα 33:** Δείκτης πολυδιασποράς PDI όλων των μοριακών αναλογιών των λιποσωμάτων σύστασης HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC, σε δύο διαφορετικά μέσα διασποράς, PBS (Phosphate Buffer Saline) με pH=7.4 και Citrate Buffer με pH=4.0 αντίστοιχα.



**Διάγραμμα 34:** ζ-δυναμικό ζ-pot (mV) όλων των μοριακών αναλογιών των λιποσωμάτων σύστασης HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC, σε δύο διαφορετικά μέσα διασποράς, PBS (Phosphate Buffer Saline) με pH=7.4 και Citrate Buffer με pH=4.0 αντίστοιχα.

Ο PDI είχε σχεδόν ίδια συμπεριφορά και στα δύο μέσα, σε όλες τις αναλογίες (Διάγραμμα 33). Το ζ-δυναμικό έχει διαφορετική συμπεριφορά μεταξύ των αναλογιών. Στην αναλογία 9:0.1:0.1, η τιμή δε διαφοροποιείται από μέσο σε μέσο, ενώ στην 9:1.0:0.1, το όξινο pH έχει μικρότερη απόλυτη τιμή και παράλληλα παρατηρούμε μια μετατροπή του αρνητικού φορτίου σε θετικό, που ίσως οφείλεται στην πρωτονίωση που υφίσταται η καρβοξυλομάδα του πολυμερούς στο όξινο pH (Διάγραμμα 34). Η συμβατική αναλογία 9:0.0:0.1 αντίθετα παρουσιάζει αντίστροφη μεταβολή των τιμών ζ-δυναμικού.

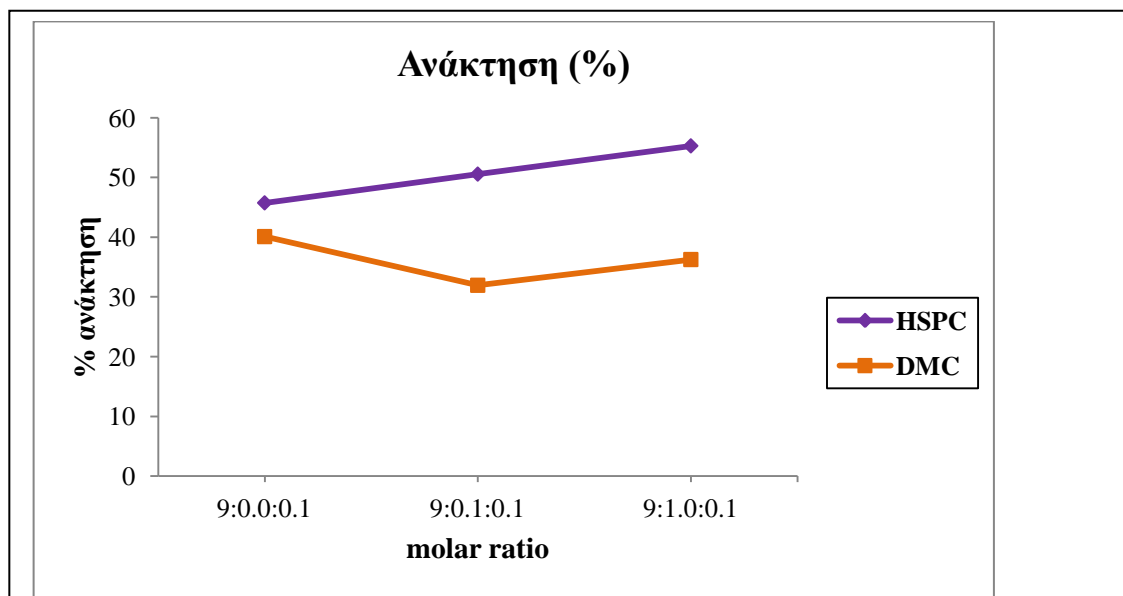
Η φυσικοχημική συμπεριφορά των χημικών αναλογιών 9:0.1:0.1 και 9:1.0:0.1 στο όξινο περιβάλλον είναι σύμφωνη με τη βιβλιογραφία που αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.3 για τα αντίστοιχα κενά συστήματα. Συνοπτικά, η καρβοξυλομάδα του PAA του πολυμερούς είναι σε ιονισμένη ( $-\text{COO}^-$ ) και εκτεταμένη διαμόρφωση στο ουδέτερο pH του PBS (εξ ου και τα μεγαλύτερα μεγέθη), ενώ στο όξινο pH πρωτονιώνεται σε  $-\text{COOH}$ , χάνοντας την τρισδιάστατη διαμόρφωσή του και μειώνοντας έτσι το μέγεθος των σωματιδίων.

### **3.6 Ποσοτικοποίηση της ενσωματωμένης DMC και του λιπιδίου HSPC στα χημικά συστήματα HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC**

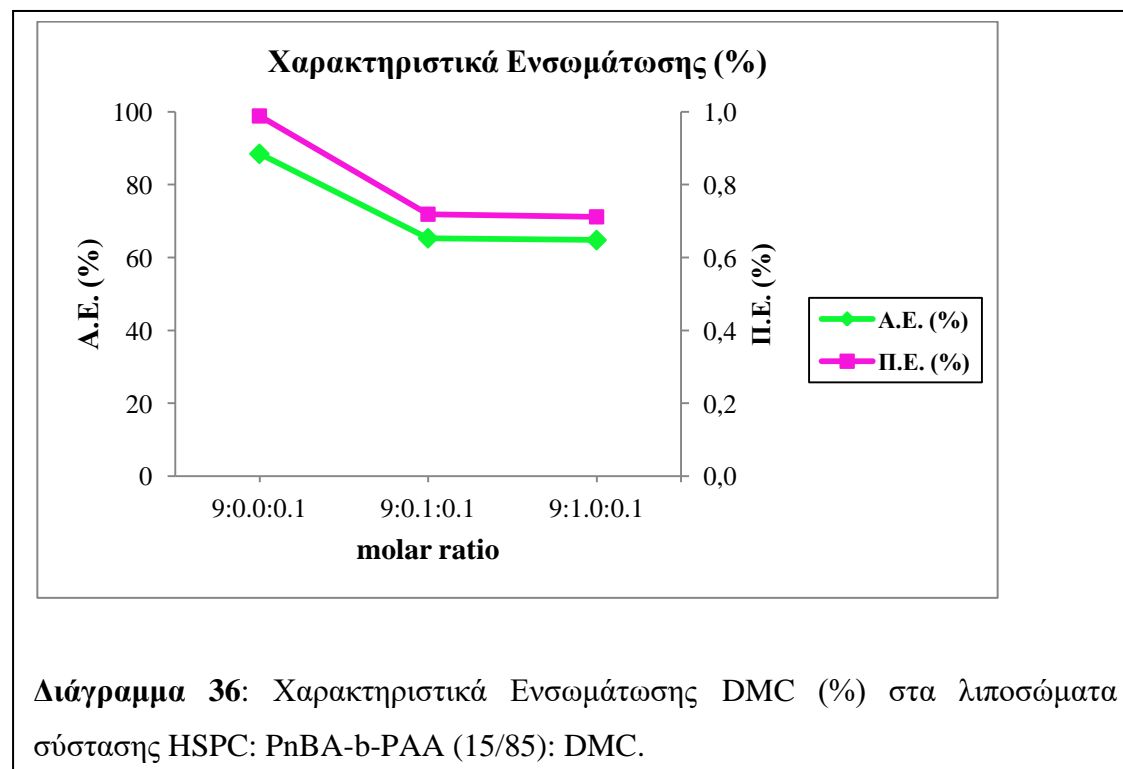
	<b>DMC (mg)</b>	<b>SD<sub>(DMC)</sub></b>	<b>HSPC (mg)</b>	<b>SD<sub>(HSPC)</sub></b>
<b>9:0.0:0.1</b>	0,021	0,001	4,2	0,01
<b>9:0.1:0.1</b>	0,016	0,004	4,4	0,30
<b>9:1.0:0.1</b>	0,018	0,002	5,0	0,12

**Πίνακας 7:** Οι μάζες (mg) της ενσωματωμένης DMC και του λιπιδίου HSPC, που ποσοτικοποιήθηκαν στα χημικά συστήματα HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC.

**3.7 Χαρακτηριστικά ενσωμάτωσης DMC στα χημικά λιποσώματα HSPC:  
PnBA-b-PAA (15/85): DMC**



**Διάγραμμα 35:** Ανάκτηση (%) του λιπιδίου HSPC και του βιοδραστικού μορίου DMC όλων των μοριακών αναλογιών των λιποσωμάτων σύστασης HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC.



**Διάγραμμα 36:** Χαρακτηριστικά Ενσωμάτωσης DMC (%) στα λιποσώματα σύστασης HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC.

Η ενσωμάτωση του βιοδραστικού μορίου στα λιποσώματα (χρησιμοποιούμε τον όρο «ενσωμάτωση» και όχι «εγκλωβισμός», διότι το βιοδραστικό μόριο στην προκειμένη περίπτωση, η DMC, είναι λιπόφιλο μόριο, οπότε υποθέτουμε ότι ενσωματώνεται στη λιπόφιλη διπλοστοιβάδα των λιποσωμάτων) αποτελεί μια ιδιαίτερα σημαντική παράμετρο στη σχεδίαση των λιποσωματικών συστημάτων. Τόσο η μελέτη της ενσωμάτωσης, όσο και της αποδέσμευσης του βιοδραστικού μορίου που περιγράφεται στην επόμενη παράγραφο, παρέχουν σημαντικές πληροφορίες, που σχετίζονται με τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του συστήματος και αφορούν:

- Στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τόσο του εξωτερικού, όσο και του εσωτερικού τμήματος του συστήματος, αλλά και των διεπιφανειακών φαινομένων, τα οποία εξελίσσονται τόσο κατά τη διάρκεια της ενσωμάτωσης, όσο και της αποδέσμευσης του βιοδραστικού μορίου.
- Στη συνεργασιμότητα (cooperativity), τόσο μεταξύ των βιοϋλικών του λιποσωματικού συστήματος [εδώ το φωσφολιπίδιο HSPC και το πολυμερές PnBA-b-PAA (15/85)], όσο και μεταξύ των βιοϋλικών και του βιοδραστικού μορίου (DMC). Γενικά, οι αλληλεπιδράσεις και οι δεσμοί που δημιουργούνται, συνεισφέρουν στις τελικές ιδιότητες του συστήματος, στη φαρμακοκινητική και στη βιοδιαθεσιμότητα του βιοδραστικού μορίου και τέλος στη θεραπευτική αποτελεσματικότητα κάθε πιθανού προϊόντος φαρμακευτικής νανοτεχνολογίας και γι' αυτό τα χαρακτηριστικά αυτά πρέπει να μελετώνται ήδη από τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης του προϊόντος (Δεμέτζος 2014).

Τα χαρακτηριστικά ενσωμάτωσης που υπολογίστηκαν από τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας ήταν τα εξής:

- ✓ Η **Ανάκτηση (%) του λιπιδίου HSPC** [Πειραματική μάζα λιπιδίου / Θεωρητική μάζα λιπιδίου (%)] μας δείχνει το ποσοστό του λιπιδίου, που βρέθηκε να έχουμε στα συστήματα στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας (παρασκευή και διαπέραση από στήλη), ως προς την αρχική μάζα λιπιδίου που είχαμε ζυγίσει πριν την παρασκευή.
- ✓ Η **Ανάκτηση (%) του βιοδραστικού μορίου DMC** [Πειραματική μάζα βιοδραστικού μορίου / Θεωρητική μάζα βιοδραστικού μορίου (%)] μας δείχνει το ποσοστό του βιοδραστικού μορίου, που βρέθηκε να έχουμε στα συστήματα στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας (παρασκευή και διαπέραση από στήλη), ως

προς την αρχική μάζα βιοδραστικού μορίου που είχαμε ζυγίσει πριν την παρασκευή.

- ✓ Το **Ονομαστικό Ποσοστό Ενσωμάτωσης Ο.Π.Ε. (%)** ή Μοριακός Λόγος ή Drug Loading ή Drug Content % (θεωρητικά moles βιοδραστικού μορίου / θεωρητικά moles λιπιδίου %) είναι κοινό και για τα τρία συστήματα (1.11), διότι η θεωρητική μοριακή αναλογία HSPC: DMC ήταν 9:0.1 και για τα τρία συστήματα.
- ✓ Το **Ποσοστό Ενσωμάτωσης Π.Ε. (%)** ή Μοριακός Λόγος ή Drug Loading ή Drug Content % (πειραματικά moles βιοδραστικού μορίου / πειραματικά moles λιπιδίου %) διαφοροποιείται μεταξύ των συστημάτων, διότι πειραματικά είχαμε διαφορετικά ποσοστά ανάκτησης, τόσο λιπιδίου όσο και βιοδραστικού μορίου στα τρία συστήματα.
- ✓ Το **Ποσοστό Αποτελεσματικής Ενσωμάτωσης Α.Ε. (%)** ή Entrapment Efficiency % [Π.Ε / Ο.Π.Ε (%)].

Το Ποσοστό Αποτελεσματικής Ενσωμάτωσης Α.Ε. (%) του βιοδραστικού μορίου περιγράφει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου που χρησιμοποιείται για την ενσωμάτωση (ή τον εγκλωβισμό, αν πρόκειται για υδρόφιλο μόριο) του βιοδραστικού μορίου στα λιποσώματα και γενικότερα στα νανοσυστήματα μεταφοράς. Ιδανική μέθοδος θεωρείται αυτή, που επιτυγχάνει μεγάλο Ποσοστό Ενσωμάτωσης Π.Ε. (%) (ή εγκλωβισμό αντίστοιχα) του βιοδραστικού μορίου και ελαχιστοποιεί την ονομαστική ενσωμάτωση (ή εγκλωβισμό αντίστοιχα), εξασφαλίζοντας έτσι μεγάλο Ποσοστό Αποτελεσματικής Ενσωμάτωσης Α.Ε. (%). Στη περίπτωση που το σύστημά μας είναι ανομοιογενές ως προς τη σύστασή του, π.χ. λιπίδια και πολυμερή για την παρασκευή σύνθετων νανοσυστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων (χημικών νανοσυστημάτων) χρησιμοποιούμε το λόγο της μάζας του βιοδραστικού μορίου ως προς τη μάζα των συστατικών του νανοσυστήματος για τον προσδιορισμό του Ποσοστού Ενσωμάτωσης Π.Ε. (%) (ή εγκλωβισμό αντίστοιχα) του βιοδραστικού μορίου στο νανόσυστημα (Δεμέτζος 2014).

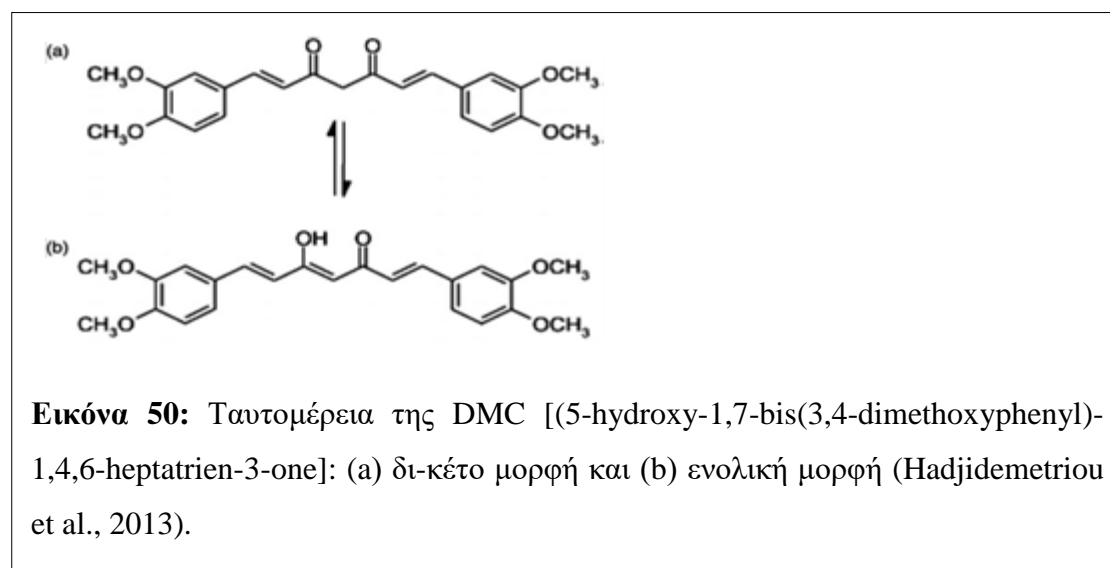
Εδώ πρέπει να σημειωθεί, ότι εμείς χρησιμοποιήσαμε για αυτό το σκοπό μοριακούς λόγους βιοδραστικού μορίου/λιπιδίου. Αυτό έγινε για δούμε, πως η αύξηση του ποσοστού του πολυμερούς PnBA-b-PAA (15/85) στη μοριακή αναλογία, επηρέασε το Ποσοστό Ενσωμάτωσης Π.Ε. (%) της DMC στα χημικά λιποσώματα HSPC: PnBA-b-PAA (15/5): DMC. Ο ονομαστικός μοριακός λόγος βιοδραστικού

μορίου/λιπιδίου [Όνομαστικό Ποσοστό Ενσωμάτωσης Ο.Π.Ε. (%)] διατηρήθηκε σταθερός (0.1/9 ή 1.11) και στα τρία παρασκευασθέντα συστήματα (η μοριακή αναλογία HSPC:DMC ήταν παντού 9:0.1).

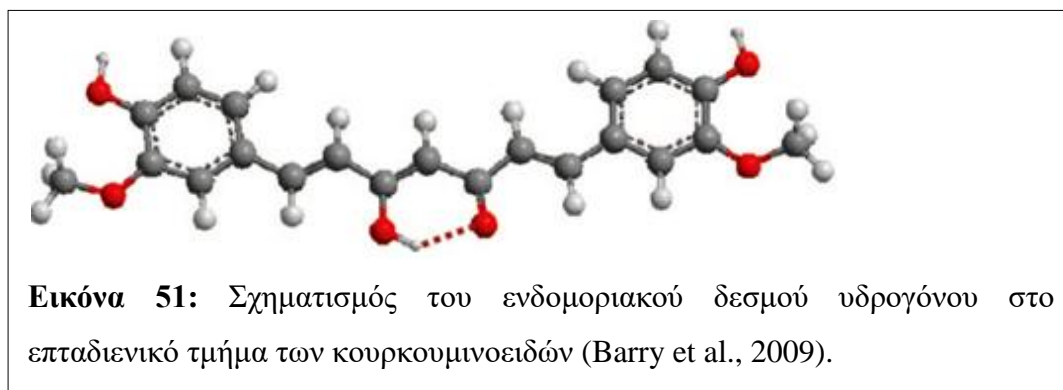
Ως προς τα ποσοστά ανάκτησης (%) του λιπιδίου, παρατηρούμε ότι τα χμιαρικά συστήματα παρουσιάζουν μικρότερες απώλειες λιπιδίου, ενώ η ανάκτηση του λιπιδίου αυξάνεται, αυξανομένης της ποσότητας του πολυμερούς στη μοριακή αναλογία. Αντίθετα, το ποσοστό ανάκτησης του βιοδραστικού μορίου είναι μικρότερο στα χμιαρικά συστήματα, ενώ κανένα σύστημα χμιαρικό ή μη, δεν ξεπερνά το 40% (**Διάγραμμα 35**). Τα Ποσοστά Ενσωμάτωσης (%) του βιοδραστικού μορίου στα χμιαρικά συστήματα διαφοροποιούνται από το συμβατικό σύστημα 9:0.0:0.1. Παρατηρούμε ότι η προσθήκη του πολυμερούς μειώνει το Ποσοστό Ενσωμάτωσης Π.Ε. (%) της DMC, με αποτέλεσμα να μειώνεται και το Ποσοστό Αποτελεσματικής Ενσωμάτωσης Α.Ε. (%). Η μείωση των ποσοστών είναι περίπου ίση και στις δύο χμιαρικές αναλογίες 9:0.1:0.1 και 9:1.0:0.1 (**Διάγραμμα 36**). Άρα, η παρουσία του πολυμερούς μειώνει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου ως προς την ενσωμάτωση του βιοδραστικού μορίου.

Τα μέτρια ποσοστά ανάκτησης της DMC (31-40%), τόσο στη συμβατική αναλογία, όσο και στα χμιαρικά συστήματα οφείλονται στη δομή του μορίου και την αλληλεπίδρασή του με το pH.

- ✓ Η DMC παρουσιάζει το φαινόμενο της κέτο-ένολο ταυτομέρειας, όπως ακριβώς και η κουρκουμίνη. Έτσι λοιπόν, η δομή της DMC υφίσταται δομικές διαφοροποιήσεις ανάλογα το pH (**Εικόνα 50**).



- ✓ Σε όξινο έως και βασικό pH (3-7), το μόριο της DMC δρα ως δότης ατόμων H και υπερिσχύει η δι-κέτο μορφή. Αναλυτικότερα, στη δι-κέτο μορφή της DMC, η επταδιενική σύνδεση μεταξύ των δύο διμεθόξυ-φαινολικών δακτυλίων περιέχει ένα ιδιαίτερα δραστικό άτομο άνθρακα, ενώ ο δεσμός C-H πάνω στον άνθρακα είναι πολύ ασθενής, αφού το ηλεκτρονιακό νέφος έχει μετατοπιστεί στα ασύζευκτα ζεύγη ηλεκτρονίων των δύο οξυγόνων της δικετόνης.
- ✓ Αντιθέτως, σε βασικό pH υπερिσχύει η ενολική δομή στην επταδιενική σύνδεση και η DMC δρα ως δότης ηλεκτρονίων (Sharma et al., 2005; Jovanovic et al., 1999).
- ✓ Η ενολική μορφή μάλιστα θεωρείται πιο σταθερή από τη δι-κέτο, λόγω της ύπαρξης του διπόλου, που οδηγεί στο σχηματισμό ενός ισχυρού ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου (Jain et al., 2017) (**Εικόνα 51**).



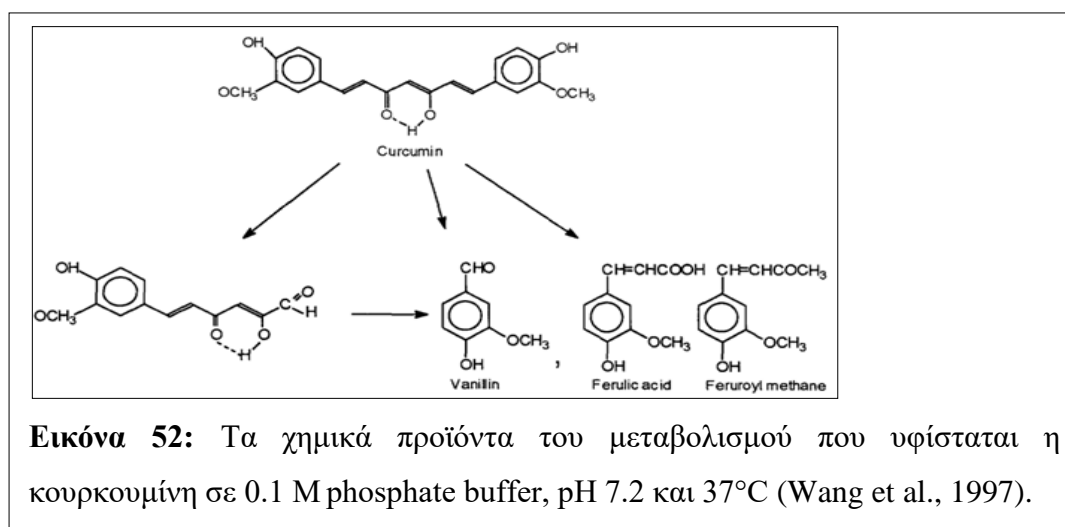
- ✓ Στο βασικό pH=7.4 του PBS συνυπάρχουν και οι δύο μορφές (δι-κέτο και ενολική) (Hadjidemetriou et al., 2013).
- ✓ Η αλληλεπίδραση των λειτουργικής ομάδας του ενολικού -OH της DMC με τις πολικές κεφαλές του φωσφολιπιδίου παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της οργάνωσης της διπλοστοιβάδας. Μάλιστα, η αλληλεπίδραση αυτή, μεταξύ ενολικού -OH και πολικής κεφαλής, προκαλεί αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης σε DMC και ειδικά σε pH>8.0 (Pourreza et al., 2015; Varshney et al., 2017).

Άρα, το χαμηλό ποσοστό ενολικών -OH οδηγεί σε χαμηλότερο ποσοστό αλληλεπίδρασης με τις πολικές κεφαλές και άρα χαμηλότερη διαπέραση, απ' ότι θα είχαμε σε ένα πιο βασικό pH>8.0. Το, έστω και μέτριο, ποσοστό μορίου που παρατηρούμε (31-40%), οφείλεται και στις δύο μορφές ταυτομέρειας. Η παρουσία της δι-κέτο μορφής προσδίδει αυξημένη λιποφιλία στο μόριο, συντελώντας στις



υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις van der Waals των αρωματικών δακτυλίων του μορίου με τις υδρογονανθρακικές αλυσίδες του λιπιδίου. Τα ενολικά –OH, που υπάρχουν στο pH=7.4 του PBS, ασκούν υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις με τις πολικές κεφαλές. Οι υδρόφιλες αυτές αλληλεπιδράσεις συνίσταται σε δεσμούς υδρογόνου μεταξύ του υδροξυλίου της DMC και της λιπιδικής πολικής κεφαλής. Ο συνδυασμός των υδρόφοβων και υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων συντελεί στην ενσωμάτωση του μορίου εντός της λιπιδικής διπλοστοιβάδας (Barry et al., 2008; Niu et al., 2012). Η ενσωμάτωση του μορίου της DMC τροποποιεί τη διπλοστοιβάδα, οδηγώντας σε μείωση του πάχους και της ελαστικότητάς της (Hung et al., 2008), με αποτέλεσμα τα ποσοστά αυτά να είναι χαμηλά (Liu et al., 2015).

Η DMC, παρουσιάζοντας την ίδια κέτο-ένολο ομάδα με την κουρκουμίνη υφίσταται έντονο μεταβολισμό σε βανιλίνη, φερουλικό οξύ και φερουλόυλμεθάνιο σε αλκαλικό περιβάλλον με pH>7.2 (Tonnesen & Karlsen, 1985; Wang et al., 1997). Το γεγονός αυτό ίσως συντελεί στα χαμηλά ποσοστά του βιοδραστικού μορίου, που βρέθηκαν στα συστήματα (Niu et al., 2012) (**Εικόνα 52**).



Εκτός όμως από το μόριο της DMC, και η παρουσία του συμπολυμερούς κατά συστάδες παίζει σημαντικό ρόλο στα χαρακτηριστικά ενσωμάτωσης, καθώς τα χημικά συστήματα παρουσιάζουν χαμηλότερη ανάκτηση βιοδραστικού μορίου, καθώς και χαμηλότερα Π.Ε και Α.Π.Ε (%) από τη συμβατική αναλογία 9:0.0:0.1. Η ενσωμάτωση του πολυμερούς προκαλεί μείωση της διαθέσιμης για την DMC επιφάνειας στο λιπόσωμα (έχουμε ουσιαστικά μείωση της carrying capacity). Προφανώς η διείδυση της υδρόφοβης συστάδας PnBA του πολυμερούς στη

διπλοστοιβάδα μειώνει τις διαθέσιμες θέσεις σύνδεσης του βιοδραστικού μορίου, δημιουργώντας η ίδια υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις van der Waals.

Το μήκος της αλυσίδας του λιπιδίου HSPC επιδρά αρνητικά στο ποσοστό ενσωμάτωσης του μορίου. Μεγάλες υδρογονανθρακικές αλυσίδες προκαλούν αύξηση των ελκτικών δυνάμεων van der Waals, με αποτέλεσμα να μειώνεται ο διαθέσιμος χώρος μεταξύ των αλυσίδων (Bhardwaj et al., 2010).

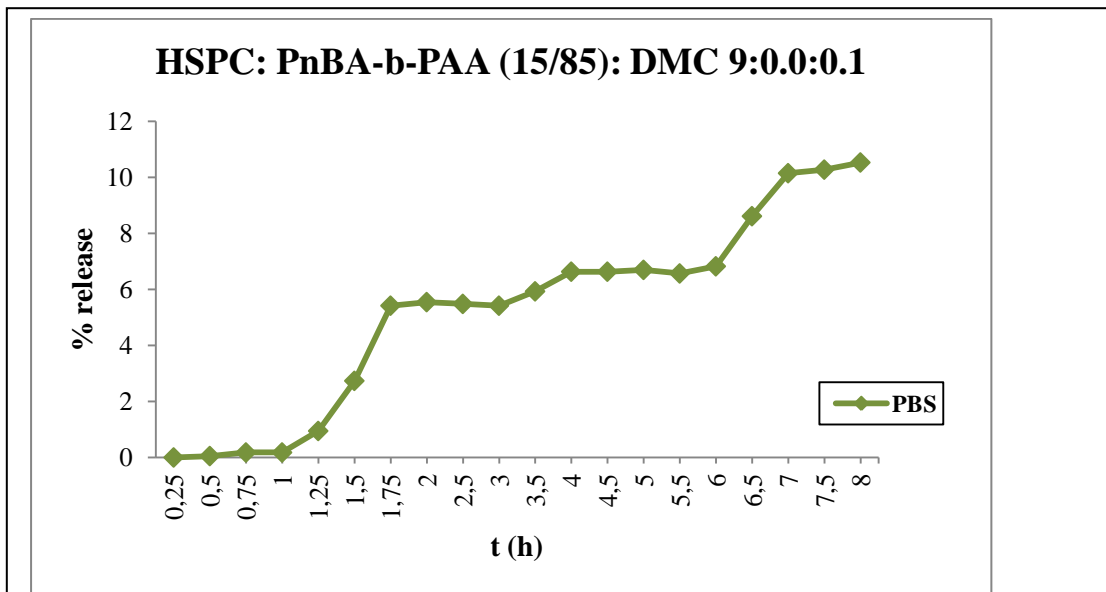
Επίσης, η μέθοδος παρασκευής συντέλεσε αρνητικά στα μέτρια ποσοστά μορίου που πήραμε. Η ανάγκη μείωσης του μεγέθους των αρχικών λιποσωμάτων μας οδήγησε στη χρήση αισθητήρα υπερήχων (probe sonication). Με την υπερήχηση, η διπλοστοιβάδα αναδιαμορφώνεται δομικά και τα λιποσώματα σπάνε και ξανακλείνουν σε μικρότερα και μονοστοιβαδικά. Κατά τη διαδικασία αυτή, ένα ποσοστό μορίου που είχε ενσωματωθεί χάνεται (και ιδιαίτερα εκείνο των εσωτερικών στοιβάδων) και δεν μπορεί να ξανά-ενσωματωθεί στην ενυδατωμένη πλέον διασπορά (Bhardwaj et al., 2010).

Ο λιποσωμιακός φορέας αυτός καθ' εαυτός, πρέπει να θεωρείται έκδοχο και μάλιστα καινοτόμο έκδοχο (innovative excipient), καθώς δεν αποτελεί την τελική μορφή του σκευάσματος, αλλά παρασκευάζεται κατά τη διαδικασία της προ-μορφοποίησης (pre-formulation) και μαζί με τα υπόλοιπα έκδοχα που προστίθενται μετά, συνθέτουν την τελική μορφή του λιποσωμιακού σκευάσματος (π.χ. ενέσιμο διάλυμα).

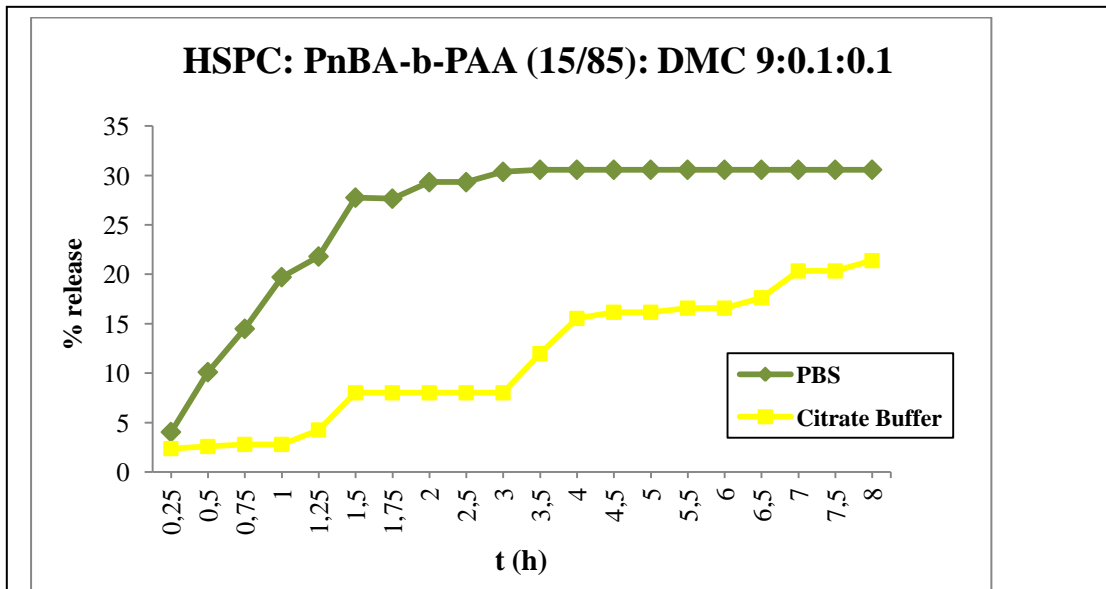
Άρα τα χαρακτηριστικά ενσωμάτωσης είναι ένας δείκτης της συνεργασιμότητας των εκδόχων μεταξύ τους (π.χ. λιπίδιο-πολυμερές προς το σχηματισμό φορέα) αλλά και μεταξύ εκδόχου και δραστικής (λιπίδιο-πολυμερές-φορέας-δραστική ουσία). Δείχνουν επίσης, πως τα έκδοχα επηρεάζουν τη φυσικοχημική συμπεριφορά και σταθερότητα σε βάθος χρόνου, καθώς και τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα του συνολικού συστήματος (π.χ. οι τρεις αναλογίες HSPC: PnBA-b-PAA (15/85):DMC παρουσίασαν διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και αποδέσμευση, όπως παρουσιάζεται αργότερα). Παρατηρείται ακόμα διαφοροποίηση στην ποσότητα του βιοδραστικού μορίου που ενσωματώνεται, εάν μεταβάλλουμε τις ποσότητες των συστατικών του φορέα.

Επομένως τα χαρακτηριστικά ενσωμάτωσης (η σχέση φαρμάκου-λιπιδίου) παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στον ορθολογικό σχεδιασμό των λιποσωμιακών φορέων, διότι με τη βελτιστοποίηση αυτών των χαρακτηριστικών, ουσιαστικά βελτιστοποιούμε τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του συστήματος.

**3.8 Αποτελέσματα της μελέτης αποδέσμευσης του βιοδραστικού μορίου DMC από τα χημειρικά συστήματα HSPC:PnBA-b-PAA (15/85): DMC**



**Διάγραμμα 37:** Ποσοστό αποδέσμευσης (%) του ενσωματωμένου βιοδραστικού μορίου DMC από τα χημειρικά λιποσώματα HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC 9:0.0:0.1 σε βάθος χρόνου 8h, την ημέρα παρασκευής t=0 days, σε μέσο PBS (Phosphate Buffer Saline) με pH=7.4.

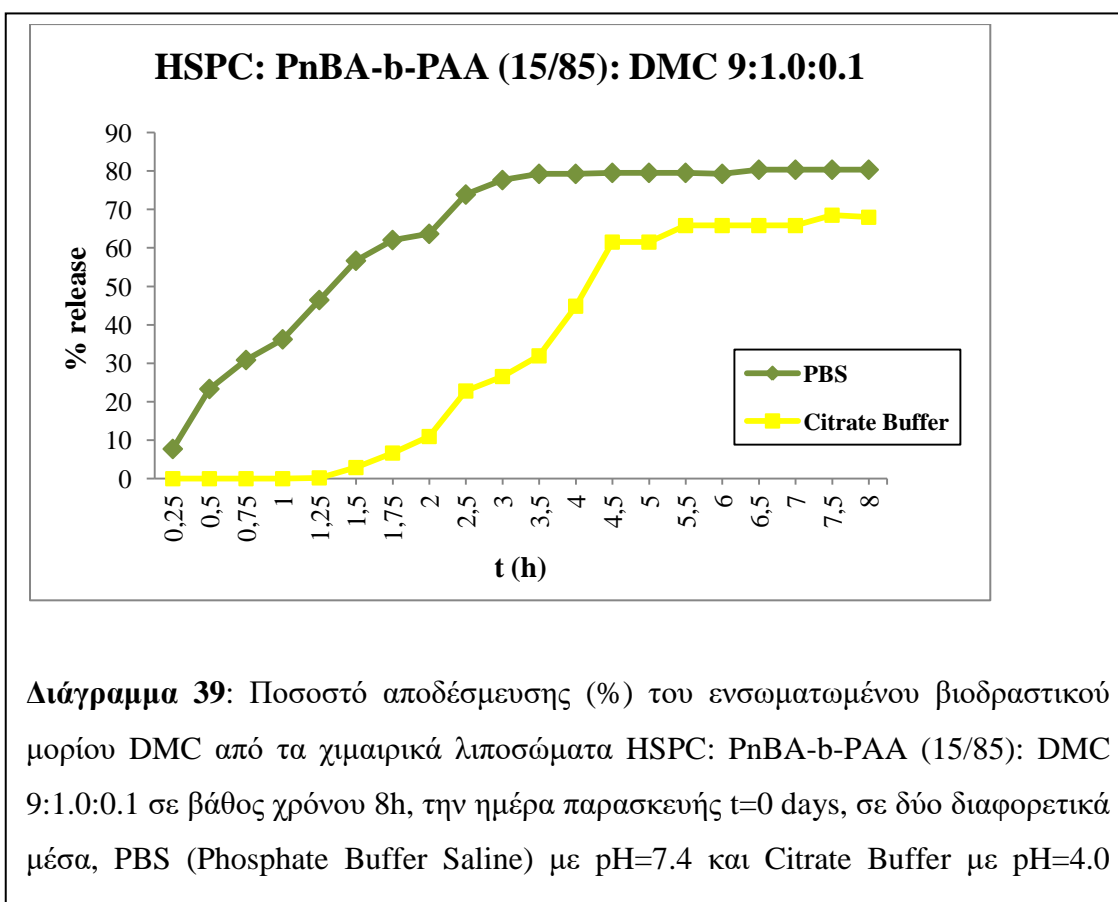


**Διάγραμμα 38:** Ποσοστό αποδέσμευσης (%) του ενσωματωμένου βιοδραστικού μορίου DMC από τα χημειρικά λιποσώματα HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC 9:0.1:0.1 σε βάθος χρόνου 8h, την ημέρα παρασκευής t=0 days, σε δύο διαφορετικά μέσα, PBS (Phosphate Buffer Saline) με pH=7.4 και Citrate Buffer με pH=4.0 αντίστοιχα.

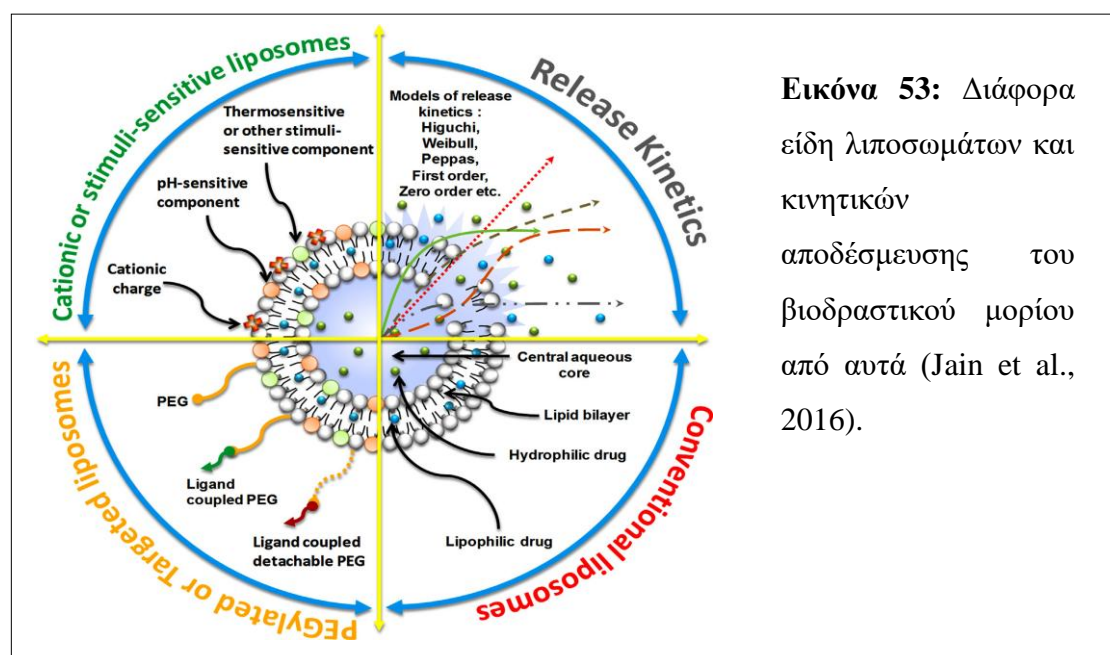
Η μοριακή αναλογία 9:0.0:0.1 αποδέσμευσε περίπου το 10% του περιεχομένου σε βάθος χρόνου 8 ωρών στο ουδέτερο pH=7.4 του PBS, ενώ μόνο το 4% τις πρώτες 6 ώρες στο όξινο pH=4.0 του Citrate Buffer (επειδή το ποσοστό είναι πολύ χαμηλό δεν συμπεριλήφθηκε στο **Διάγραμμα 37**).

Η μοριακή αναλογία 9:0.1:0.1 στο ουδέτερο pH=7.4 του PBS αποδέσμευσε με σταθερό ρυθμό περίπου το 30% του περιεχομένου τις πρώτες 3 ώρες και μετά έφτασε πλατώ, μη αποδεσμεύοντας περαιτέρω ποσότητα. Στο όξινο pH=4.0 του Citrate Buffer, αποδέσμευσε το 10% του περιεχομένου τις πρώτες 3-4 ώρες και μέχρι το πέρας των 8 ωρών είχε αποδεσμεύσει το 20% του περιεχομένου (**Διάγραμμα 38**).

Η μοριακή αναλογία 9:1.0:0.1 στο ουδέτερο pH=7.4 του PBS αποδέσμευσε με σταθερό ρυθμό περίπου το 80% του περιεχομένου τις πρώτες 3-4 ώρες και μετά έφτασε πλατώ, μη αποδεσμεύοντας περαιτέρω ποσότητα. Στο όξινο pH=4.0 του Citrate Buffer, παρουσίασε καθυστερούμενη αποδέσμευση (delayed release), μη αποδεσμεύοντας σχεδόν καθόλου περιεχόμενο τις πρώτες δύο ώρες. Μεταξύ 2 και 5.5 ωρών, αποδέσμευσε με σταθερό ρυθμό το 65% του περιεχομένου, ενώ μετά έφτασε πλατώ, μη αποδεσμεύοντας περαιτέρω ποσότητα (**Διάγραμμα 39**).

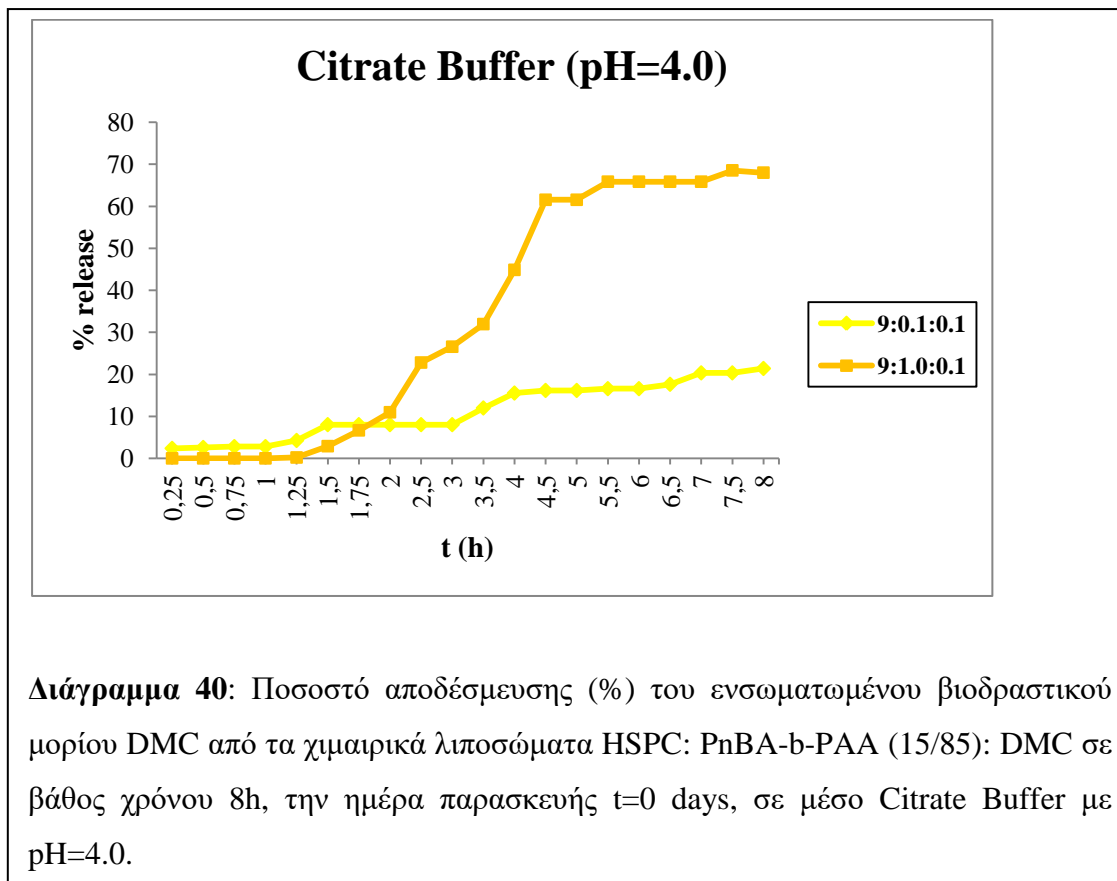


Η αποδέσμευση αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό φαινόμενο, εξαρτώμενο τόσο από τη δομή του λιπιδώματος, όσο από τη δομή του βιοδραστικού μορίου και των υπόλοιπων λειτουργικών υλικών (π.χ. αποκρινόμενα σε ερεθίσματα πολυμερή κτλ.), αλλά και τις συνθήκες και το περιβάλλον στο οποίο γίνεται η αποδέσμευση (Jain et al., 2016) (Εικόνα 53).



**Εικόνα 53:** Διάφορα είδη λιπιδωμάτων και κινητικών αποδέσμευσης του βιοδραστικού μορίου από αυτά (Jain et al., 2016).

Από τη βιβλιογραφία περιμένουμε να έχουμε υψηλότερη και γρηγορότερη αποδέσμευση του βιοδραστικού μορίου στο όξινο pH, λόγω της παρουσίας του pH-ευαίσθητου πολυμερούς PnBA-b-PAA (15/85) (Drummond et al., 2000; Fujiwara et al. 1997; Munaviron et al.; 2014, Pe arson et al., 2013; Felber et al., 2012). Ωστόσο παρατηρούμε το αντίθετο αποτέλεσμα, με το όξινο περιβάλλον του Citrate Buffer να δίνει χαμηλότερα ποσοστά αποδέσμευσης σε όλες τις μοριακές αναλογίες σε σχέση με το ουδέτερο pH. Στο όξινο pH (Διάγραμμα 40), μεταξύ των χημικών αναλογιών, η 9:1.0:0.1 παρουσιάζει υψηλότερο ποσοστό αποδέσμευσης σε σχέση με τις άλλες δύο αναλογίες. Άρα, η αύξηση του ποσοστού του πολυμερούς διευκολύνει την αποδέσμευση και επομένως δεν παίζει ρόλο μόνο η παρουσία, αλλά και η ποσότητα του πολυμερούς στη μοριακή αναλογία (Liang et al., 2015; Jelezova et al., 2015). Χαμηλά ποσοστά πολυμερούς δεν είναι ίσως ικανά να προσδώσουν στο σύστημα την ιδιότητα της pH-ευαισθησίας.



Εκτός όμως από το πολυμερές και η δομή του βιοδραστικού μορίου DMC επηρεάζεται ιδιαίτερα από το pH του περιβάλλοντος, γεγονός στο οποίο αποδίδεται η διαφοροποίηση, που παρατηρούμε, στα δύο μέσα.

Όπως περιγράψαμε και παραπάνω, η DMC παρουσιάζει το φαινόμενο της κέτο-ενολο ταυτομέρειας. Σε όξινο έως και βασικό pH (3-7), το μόριο της DMC δρα ως δότης ατόμων H και υπερισχύει η δι-κέτο μορφή. Αντιθέτως, σε βασικό pH υπερισχύει η ενολική δομή στην επταδιενική σύνδεση και η DMC δρα ως δότης ηλεκτρονίων (Sharma et al., 2005; Jovanovic et al., 1999). Στο βασικό pH=7.4 του PBS συνυπάρχουν και οι δύο μορφές (δι-κέτο και ενολική) (Hadjidemetriou et al., 2013).

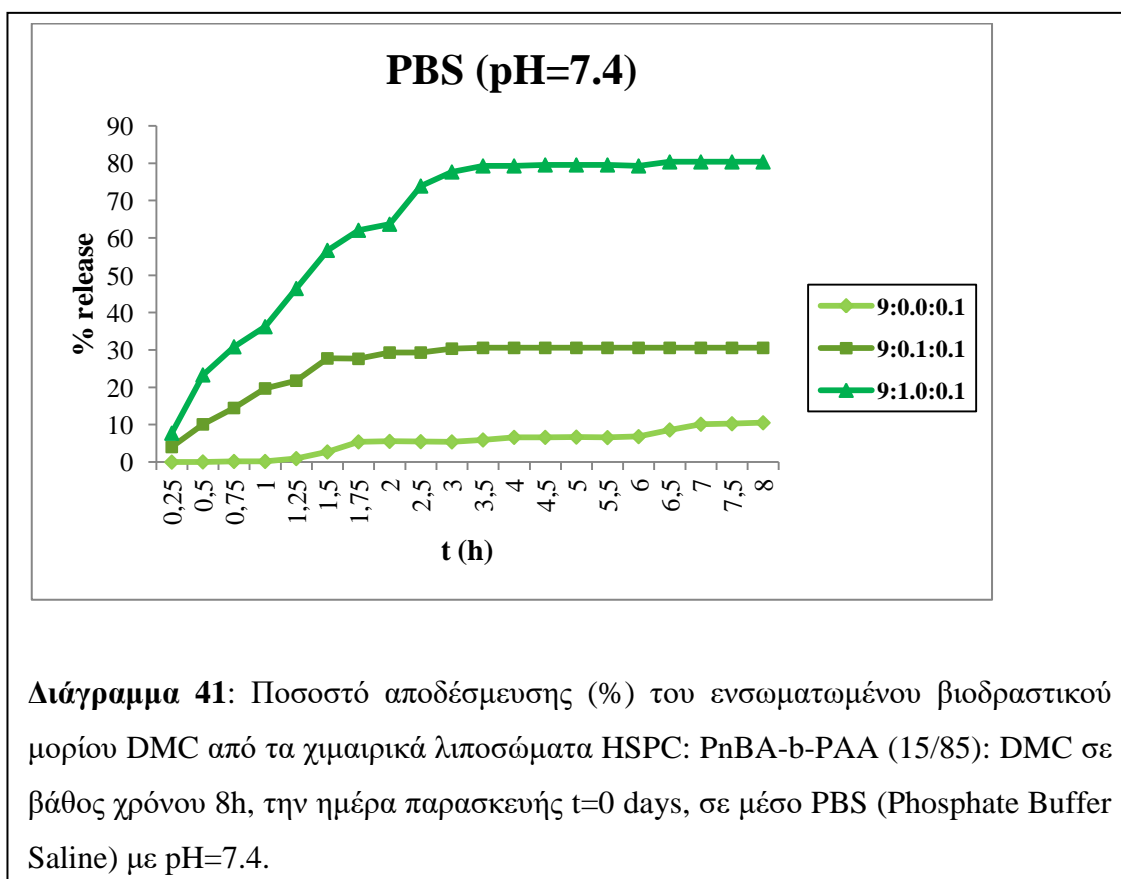
Σε βασικές τιμές pH, όπως στο PBS, η αλληλεπίδραση ενολικού OH<sup>-</sup> και πολικής κεφαλής προκαλεί αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης, με αποτέλεσμα αυξημένη αποδέσμευση του περιεχομένου (Varshney et al., 2017). Γι αυτό και σε όξινες τιμές pH, η δι-κέτο μορφή, μη μπορώντας να αλληλεπιδράσει, μειώνει τη διαπερατότητα και άρα την αποδέσμευση. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αποδέσμευση εξαρτάται ιδιαίτερα από τη ρευστότητα της μεμβράνης και από την αλληλεπίδρασή της με το βιοδραστικό μόριο. Όσο αυξάνεται η αλληλεπίδραση

μορίου- διπλοστοιβάδας, παρατηρείται μείωση του ρυθμού και του ποσοστού της αποδέσμευσης, ενώ αντίθετα, με την αύξηση της ρευστότητας της μεμβράνης έχουμε αυξημένη και γρήγορη διαρροή περιεχομένου (Grazia et al., 2007; Liu et al., 2015; Peng et al., 2017), φαινόμενα που επιβεβαιώνονται από τα αποτελέσματα της αποδέσμευσης στο όξινο και το βασικό περιβάλλον αντίστοιχα.

Ακόμα, στο Citrate Buffer το λιπόσωμα, έχοντας χάσει την προστατευτική τρισδιάστατη διαμόρφωση του PAA λόγω πρωτονίωσης του τελευταίου, έρχεται σε επαφή με το όξινο περιβάλλον. Στο μικροπεριβάλλον του λιποσώματος, μόνο οι ομάδες που μπορούν να ιονισθούν έρχονται σε επαφή με τη διεπιφάνεια νερού-διπλοστοιβάδας (Varshney et al., 2017). Μάλιστα, αποτελέσματα από τη χρήση φασματοσκοπίας Raman έχουν δείξει ότι η DMC βρίσκεται προς την εξωτερική "πλευρά" της λιπιδικής διπλοστοιβάδας (Gardikis et al., 2006). Καθώς η μεμβράνη διαταράσσεται στο pH=4.0 του Citrate Buffer, λόγω πρωτονίωσης του πολυμερούς, η DMC, ερχόμενη σε επαφή με το Citrate Buffer, μεταβαίνει στη δι-κέτο μορφή, με αποτέλεσμα να χάνει τη μοναδική της ιονίσιμη ομάδα του ενολικού OH-, να γίνεται ακόμα πιο λιπόφιλη και άρα να προτιμά το υδρόφοβο περιβάλλον της διπλοστοιβάδας. Επομένως, η αύξηση της λιποφιλίας του βιοδραστικού μορίου μπορεί να επιβραδύνει την αποδέσμευση του σε όξινο περιβάλλον. Στο γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται η εικόνα που πήραμε στο **Διάγραμμα 39**, στη μοριακή αναλογία 9:1.0:0.1, όπου τα συνολικά ποσοστά αποδέσμευσης είναι παραπλήσια, αλλά στο όξινο περιβάλλον το ποσοστό αυτό αποδίδεται σε μεγαλύτερο χρόνο (καθυστερούμενη αποδέσμευση- delayed release). Παρομοίως, στη μοριακή αναλογία 9:0.1:0.1 έχουμε επίσης παραπλήσια τελικά ποσοστά αποδέσμευσης, με το όξινο περιβάλλον να αποδίδει το βιοδραστικό μόριο με πιο σταθερό και αργό ρυθμό από ότι στο PBS (**Διάγραμμα 38**).

Το φωσφολιπίδιο HSPC παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην αποδέσμευση. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, στη θερμοκρασία μετάβασης φάσης  $T_m$  οι λιπιδικές μεμβράνες εμφανίζουν δομικά ελαττώματα, επειδή η φάση πηκτής (gel phase) και η υγρή κρυσταλλική κατάσταση (liquid crystal) συνυπάρχουν, με αποτέλεσμα την αποδέσμευση του περιεχομένου. Το HSPC παρουσιάζει  $T_m$  στους 54.3 °C, που σημαίνει ότι στους 37 °C που έγινε η δοκιμασία της αποδέσμευσης, το λιπίδιο βρισκόταν σε φάση πηκτής, ελαχιστοποιώντας την αποδέσμευση του περιεχομένου και ιδιαίτερα στη συμβατική μοριακή αναλογία 9:0.0:0.1 και στα δύο μέσα.

Αν παρατηρήσουμε κάθε μέσο ξεχωριστά, μεταξύ των μοριακών αναλογιών, η ενσωμάτωση του πολυμερούς στα χημειρικά λιποσωμιακά συστήματα προκαλεί αύξηση του ρυθμού και του ποσοστού αποδέσμευσης σε σχέση με τη συμβατική αναλογία και στα δύο μέσα. Το φαινόμενο, πιθανόν, οφείλεται στην παρουσία της υδρόφοβης συστάδας PnBA- εντός της λιπιδικής διπλοστοιβάδας, η οποία αποτελεί ένα είδος πρόσμιξης, που μειώνει τη συνεργασιμότητα των υλικών του συστήματος και διαταράσσει τη δομή της διπλοστοιβάδας, όπως περιγράφηκε και από τα αποτελέσματα της Θερμικής Ανάλυσης (παράγραφος 3.1) (Matsingou et al., 2007; Fujiwara et al., 1997). Η «πρόσμιξη» του πολυμερούς επιπλέον, προκαλεί ταπείνωση του σημείου τήξης, με αποτέλεσμα η μετάβαση στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση, όπου έχουμε αυξημένη αποδέσμευση, να γίνεται σε θερμοκρασίες πιο κοντινές σε αυτή της δοκιμασίας αποδέσμευσης (37 °C). Έτσι διευκολύνεται και η έξοδος του βιοδραστικού μορίου από τη διπλοστοιβάδα. Παρατηρείται μάλιστα, ότι η αύξηση του πολυμερούς στη μοριακή αναλογία (και άρα το ποσοστό του PnBA- στη διπλοστοιβάδα) προκαλεί και αύξηση του ρυθμού και του ποσοστού της αποδέσμευσης [η μοριακή αναλογία 9:1.0:0.1 παρουσιάζει το υψηλότερο ποσοστό (Διαγράμματα 40, 41)].



**Διάγραμμα 41:** Ποσοστό αποδέσμευσης (%) του ενσωματωμένου βιοδραστικού μορίου DMC από τα χημειρικά λιποσώματα HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC σε βάθος χρόνου 8h, την ημέρα παρασκευής t=0 days, σε μέσο PBS (Phosphate Buffer Saline) με pH=7.4.



Εξάλλου και στα αποτελέσματα της θερμικής ανάλυσης, η θερμοτροπική συμπεριφορά είχε άμεση εξάρτηση από τη μοριακή αναλογία. Η μείωση της συνεργασιμότητας ήταν εντονότερη στις μεγάλες μοριακές αναλογίες (> 9:1.0) (Εικόνες 44, 46). Επειδή το PnBA- δε διαφοροποιείται από το pH, αυξανόμενου του ποσοστού PnBA-, έχουμε ανάλογη συμπεριφορά των μοριακών αναλογιών και στα δύο μέσα. Η συμβατική μοριακή αναλογία 9:0.0:0.1, που δεν περιέχει καθόλου PnBA-, εμφανίζει ελάχιστα ποσοστά αποδέσμευσης και στα δύο μέσα (Διάγραμμα 37). Τα ποσοστά αυτά (π.χ. 4% στο όξινο περιβάλλον) μπορεί να οφείλονται και σε ένα ποσοστό ελεύθερου βιοδραστικού μορίου, που μπορεί να μη διαχωρίστηκε στη στήλη. Το γεγονός ότι το φωσφολιπίδιο δεν μπορεί, όπως περιγράψαμε παραπάνω, να αποδεσμεύσει το περιεχόμενο του λιποσώματος σε θερμοκρασία 37 °C, σε συνδυασμό με την απουσία του πολυμερούς οδηγούν στην ελάχιστη έως και μηδενική αποδέσμευση που παρουσιάζει η συμβατική αναλογία 9:0.0:0.1.

Και στις δύο χημεικές μοριακές αναλογίες (Διαγράμματα 38, 39), οι καμπύλες αποδέσμευσης που πήραμε και στα δύο μέσα, δείχνουν αργή και παρατεταμένη αποδέσμευση (sustained release) της DMC από τα συστήματα τόσο σε όξινο (Citrate Buffer), όσο και στο φυσιολογικό (για τον οργανισμό) pH (PBS). Αυτή η συμπεριφορά θα μπορούσε να είναι χρήσιμη για την καλύτερη θεραπευτική αποτελεσματικότητα των συστημάτων σε μορφές καρκίνου, σε σύγκριση με τα ήδη υπάρχοντα συστήματα, που αποδεσμεύουν ταχέως (burst release) το βιοδραστικό μόριο. Ειδικά, η συμπεριφορά που έδειξαν τα συστήματα στο pH=7.4 του PBS θα ήταν χρήσιμη σε επικουρικές θεραπείες χορήγησης φαρμάκου για να καταστείλουν την αναπαραγωγή των όγκων μέσω τοπικής εμφύτευσης λόγω της πολύ αργής αποδέσμευσης του περιεχομένου (Bollu et al., 2016).

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της DSC, στις χημεικές λιπιδικές διπλοστοιβάδες, υπό την παρουσία PnBA-b-PAA 15/85 και στα pH, η κορυφή της προμετάπτωσης του HSPC εξαφανίστηκε. Σε όλες τις μοριακές αναλογίες των διπλοστοιβάδων HSPC:PnBA-b-PAA 15/85 παρουσιάζεται μείωση της συνεργασιμότητας μεταξύ HSPC και πολυμερούς, ειδικά στο όξινο pH, καθώς αυξάνεται το ποσοστό του συμπολυμερούς. Σε όξινο pH, τα καρβοξύλια του PAA πρωτονιώνονται, προκαλώντας συρρίκνωση του πολυμερικών αλυσίδων και αποσταθεροποίηση της μεμβράνης. Καταλήξαμε επίσης, στην παρουσία πλούσιων και φτωχών περιοχών σε πολυμερές (nanoclusters). Οι καμπύλες ψύξης του DSC έδειξαν μικρή υστέρηση σε όλες τις μοριακές αναλογίες και στα δύο pH, με την πιθανή δημιουργία φάσης ενδοεισχώρησης.

Προχωρώντας με την παρασκευή λιποσωμάτων, η ενσωμάτωση του pH-αποκρινόμενου συμπολυμερούς κατά συστάδες PnBA-b-PAA 15/85 στα λιποσώματα HSPC προσδίδει στα χημεικά πλέον λιποσώματα φυσικοχημική σταθερότητα σε βάθος χρόνου. Η σταθερότητα αυτή οφείλεται στη δημιουργία άπωσης μεταξύ των λιποσωμάτων, με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η σύντηξή τους. Η άπωση αποτελείται από πολλές συνιστώσες, όπως ηλεκτροστατικές δυνάμεις, δυνάμεις ενυδάτωσης, στερικές παρεμποδίσεις, ωσμωτικές δυνάμεις και ενθαλπική σταθεροποίηση, που προέρχονται από το υδρόφιλο τμήμα PAA αφ' ενός, αλλά και από τη μείωση της επιφανειακής τάσης της λιποσωματικής μεμβράνης, που προέρχεται από το υδρόφοβο τμήμα PnBA αφ' ετέρου.

Παρατηρώντας το κάθε σύστημα ξεχωριστά, οι διάφορες μοριακές αναλογίες HSPC:PnBA-b-PAA 15/85, που παρασκευάστηκαν, παρουσίασαν διαφορετική φυσικοχημική συμπεριφορά σε βάθος χρόνου. Οπότε και το ποσοστό του πολυμερούς στη μοριακή αναλογία παίζει σημαντικό ρόλο στον ορθολογικό σχεδιασμό χημεικών λιποσωματικών φορέων.

Τα χημεικά αυτά λιποσώματα είναι pH-ευαίσθητα, λόγω του pH-αποκρινόμενου τμήματος PAA του συμπολυμερούς κατά συστάδες PnBA-b-PAA 15/85, και γι αυτό μεταβάλλουν τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά με τη μεταβολή του pH του περιβάλλοντος, όπως αποδείχτηκε στο pH-responsiveness test. Το φαινόμενο, που παρατηρήσαμε, έρχεται σε συμφωνία με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, όπου συγκεκριμένα αναφέρεται, ότι το PAA σε όξινο pH χάνει το φορτίο του και την

τριδιάστατη διαμόρφωσή του, μεταβάλλοντας τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του λιποσώματος.

Κατά την προσπάθεια ενσωμάτωσης της DMC στα χμιαρικά λιποσώματα HSPC: PnBA-b-PAA (15/85): DMC, η φυσικοχημική σταθερότητα των λιποσωμάτων με ενσωματωμένη DMC ήταν αντίστοιχη με αυτή των κενών φορέων σε βάθος χρόνου. Ωστόσο, παρατηρήθηκε διαφοροποίηση των χαρακτηριστικών ενσωμάτωσης συναρτήσει του ποσοστού του πολυμερούς. Η διαφορετική χημική συμπεριφορά του μορίου της DMC ανάλογα το περιβάλλον επηρεάζει την ενσωμάτωσή της. Τα χαρακτηριστικά αυτά και η σχέση φαρμάκου-λιπιδίου, παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στον ορθολογικό σχεδιασμό χμιαρικών λιποσωματικών φορέων, διότι με τη βελτιστοποίηση αυτών των χαρακτηριστικών, ουσιαστικά βελτιστοποιούμε τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του συστήματος.

Η παρουσία του pH-αποκρινόμενου συμπολυμερούς κατά συστάδες και η διαφορετική χημική συμπεριφορά του μορίου της DMC ανάλογα το pH διαφοροποίησε την αποδέσμευση του βιοδραστικού μορίου, τόσο μεταξύ των μοριακών αναλογιών (αύξηση του ποσοστού αποδέσμευσης με την αύξηση του ποσοστού πολυμερούς), όσο και ανάμεσα στα δύο διαφορετικά pH. Επιπρόσθετα, οι καμπύλες αποδέσμευσης που πήραμε και στα δύο μέσα (όξινο και φυσιολογικό), στις χμιαρικές μοριακές αναλογίες, δείχνουν αργή και παρατεταμένη αποδέσμευση (sustained release).

Καταλήγοντας, η ενσωμάτωση του pH-αποκρινόμενου συμπολυμερούς κατά συστάδες PnBA-b-PAA 15/85 επιδρά έντονα στη θερμοτροπική και φυσικοχημική συμπεριφορά των HSPC λιπιδικών διπλοστοιβάδων και λιποσωμάτων αντίστοιχα. Η ενσωμάτωση και αποδέσμευση του βιοδραστικού μορίου της DMC από τα αντίστοιχα λιποσώματα επηρεάζεται έντονα από την παρουσία του πολυμερούς. Μελλοντικά δε, θα μπορούσε να διερευνηθεί η θεραπευτική χρήση των παραπάνω φορέων, ώστε να εξακριβωθεί, εάν τα συγκεκριμένα pH-ευαίσθητα συστήματα βελτιώνουν τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα του μορίου της DMC σε παθολογικές καταστάσεις, όπου η βιβλιογραφία μας υποδεικνύει τη χρήση της.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akita H., Kogure K., Moriguchi R. Nanoparticles for ex vivo siRNA delivery to dendritic cells for cancer vaccines: programmed endosomal escape and dissociation. *Journal of Controlled Release*, 2010; 143: 311–317.
- Allen T.M., Cullis P.R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013; 65: 36–48.
- Amado E., Kressler J. Interactions of amphiphilic block copolymers with lipid model membranes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2011; 16: 491–498.
- Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 1965; 13: 238–252.
- Barry J., Fritz M., Brender J.R., Smith P.E.S., Lee D-K. and Ramamoorthy A. Determining the Effects of Lipophilic Drugs on Membrane Structure by Solid-State NMR Spectroscopy: The Case of the Antioxidant Curcumin. *Journal of American Chemical Society*, 2009; 131: 4490–4498.
- Benesch M.G.K., McElhaney R.N. A comparative differential scanning calorimetry study of the effects of cholesterol and various oxysterols on the thermotropic phase behavior of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2016; 195: 21–33.
- Berényi S., Mihály J., Kristyán S., Naszályi N.L., Telegdi J., Bóta A. Thermotropic and structural effects of poly(malic acid) on fully hydrated multilamellar DPPC-water systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013; 1828(2): 661–669.
- Bhardwaj U., Burgess D.J. Physicochemical properties of extruded and non-extruded liposomes containing the hydrophobic drug dexamethasone. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010; 388: 181–189.
- Bollu V.S., Barui A.K., Mondal S.K., Prashar S., Fajardo M., Briones D., Rodríguez-Diéguez A., Patra C.R., Gómez-Ruiz S. Curcumin-loaded silica-based mesoporous materials: Synthesis, characterization and cytotoxic properties against cancer cells. *Materials Science and Engineering*, 2016; 63: 393–410.

- Bonora S., Torreggiani A., Finia G. DSC and Raman study on the interaction between polychlorinated biphenyls (PCB) and phospholipid liposomes. *Thermochimica Acta*, 2003; 408(1–2): 55–65.
- Carvalho Junior A.D., Vieira F.P., Melo V.J. Preparation and cytotoxicity of cisplatin-containing liposomes. *Braz J Med Biol Res*, 2007; 40: 1149–1157.
- Ceckler T.L., Cunningham B.E. Transition state thermodynamics of lipid bilayers characterized by differential scanning calorimetry. *Chem Educ.*, 1997; Vol.2. No.6.
- Chen J., Cheng D., Li J., Wang Y., Guo J., Chen Z., Cai B., Yang T. Influence of lipid composition on the phase transition temperature of liposomes composed of both DPPC and HSPC. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2013; 39(2): 197–204.
- Chen J., He C., Lin A., Xu F., Wang F., Zhao B., Liu X., Chen Z., Cai B.C. Brucine-loaded liposomes composed of HSPC and DPPC at different ratios: in vitro and in vivo evaluation. *Drug Dev Ind Pharm*, 2014; 40(2): 244–251.
- Δεμέτζος Ν. Κωνσταντίνος. Φαρμακευτική Νανοτεχνολογία Βασικές Αρχές και Πρακτικές Εφαρμογές. *Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιανού Α.Ε.*, Copyright 2014.
- Demetzos C. Differential Scanning Calorimetry (DSC): a tool to study the thermal behavior of lipid bilayers and liposomal stability. *Journal of Liposome Research*, 2008; 18(3): 159–73.
- Demetzos C. and Pippa N. Advanced drug delivery nanosystems (aDDnSs): a mini-review. *Drug Delivery*, 2014; 21(4): 250–257.
- Di Foggia M., Bonora S., Tinti A., Tugnoli V. DSC and Raman study of DMPC liposomes in presence of Ibuprofen at different pH. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2017; 127(2): 1407–1417.
- Drummond D.C., Zignani M., Leroux J. Current status of pH-sensitive liposomes in drug delivery. *Progress in Lipid Research*, 2000; 39: 409–460.
- Elizondo E., Cabrera E.M.I., Cordoba A., Sala S., Veciana J. and Ventosa N. Liposomes and Other Vesicular Systems: Structural Characteristics, Methods of Preparation, and Use in Nanomedicine. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 2011; 104: 1–52.
- Eloy J.O., Souza M., Petrilli R., Barcellos J.P.A., Lee R.J., Marchetti J.M. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance

encapsulation and delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014; 123: 345–363.

- Felber A.E., Dufresne M-H., Leroux J-C. pH-sensitive vesicles, polymeric micelles and nanospheres prepared with polycarboxylates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2014; 64: 979–992.
- Filippov A., Munavirov B., Sparrman T., Ishmuhametova V., Rudakova M., Shriram P., Tavelin S. Interaction of a Poly(acrylic acid) Oligomer with Dimyristoylphosphatidylcholine Bilayers. *Langmuir*, 2011; 27: 3754–3761.
- Florence A., Attwood D. Physical Pharmacy. London: *Pharmaceutical Press*, Copyright 2008.
- Fujiwara M., Baldeschwieler J.D., Grups R.H. Receptor-mediated endocytosis of poly(acrylic acid)-conjugated liposomes by macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996; 1278: 59–67.
- Fujiwara M., Grups R.H., Baldeschwieler J.D. Characterization of pH-Dependent Poly(acrylic Acid) Complexation with Phospholipid Vesicles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1997; 185: 210–216.
- Ganta S., Devalapally H., Shahiwala A., Amiji M. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 2008; 126: 187–204.
- Gardikis K., Hatziantoniou S., Viras K., Demetzos C. Effect of a bioactive curcumin derivative on DPPC membrane: A DSC and Raman spectroscopy study. *Thermochimica Acta*, 2006; 447: 1–4.
- Grazia C.M., Celia C., Paolino D., Cosco D., Iannone M., Castelli F. Effects of lipid composition and preparation conditions on physical-chemical properties, technological parameters and in vitro biological activity of gemcitabine-loaded liposomes. *Current Drug Delivery*, 2007; 4: 89–101.
- Hadjidemetriou M., Pippa N., Pispas S., Demetzos C. Incorporation of dimethoxycurcumin into charged liposomes and the formation kinetics of fractal aggregates of uncharged vectors. *Journal of Liposome Research*, 2013; 23(2): 94–100.
- Hao W., Han X., Shang Y., Xu S., Liu H. Insertion of pH-sensitive bola-type copolymer into liposome as a “stability anchor” for control of drug release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015; 136: 809–816.

- Hassan H.E., Carlson S., Abdallah I., Buttolph T., Glass K.C., Fandy T.E. Curcumin and dimethoxycurcumin induced epigenetic changes in leukemia cells. *Pharm Res*, 2015; 32(3): 863–875.
- Honey P.J., Rijo J., Anju A., Anoop K.R. Smart polymers for the controlled delivery of drugs – a concise overview. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2014; 4(2): 120–127.
- Huang C., Li S., Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999; 1422: 273–307.
- Hung W., Chen F., Lee C., Sun Y., Lee M., Huang H.W. Membrane-Thinning Effect of Curcumin. *Biophysical Journal*, 2008; 94: 4331–4338.
- Jain A., Jain S.K. In vitro release kinetics model fitting of liposomes: An insight. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2016; 201: 28–40.
- Jain B. A spectroscopic study on stability of curcumin as a function of pH in silica nanoformulations, liposome and serum protein. *Journal of Molecular Structure*, 2017; 1130: 194–198.
- Jelezova I., Drakalska E., Momekova D., Shalimova N., Momekov G., Konstantinov S., Rangelov S., Pispas S. Curcumin loaded pH-sensitive hybrid lipid/block copolymer nanosized drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015; 78: 67–78.
- Jovanovic S.V., Steenken S., Boone C.W., Simic M.G. H-Atom Transfer Is A Preferred Antioxidant Mechanism of Curcumin. *Journal of American Chemistry Society*, 1999; 121(41): 9677–9681.
- Kanamala M., Wilson W.R., Yang M., Palmer B.D., Wu Z. Mechanisms and biomaterials in pH-responsive tumour targeted drug delivery: A review. *Biomaterials*, 2016; 85: 152–167.
- Kenji S., Tirrell D.A. pH-Dependent complexation of poly(acrylic acid) derivatives with phospholipid vesicle membranes. *Macromolecules*, 1984; 17(9): 1692–1698.
- Kim I.Y., Kang Y.S., Lee D.S. Antitumor activity of EGFR targeted pH-sensitive immunoliposomes encapsulating gemcitabine in A549 xenograft nude mice. *Journal of Controlled Release*, 2009; 140: 55–60.

- Kim K., Chen W.C.W., Heod Y., Wang Y. Polycations and their biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 2016; 60: 18–50.
- Kitayama H., Takechi Y., Tamai N., Matsuki H., Yomoto C., Saito H. Thermotropic Phase Behavior of Hydrogenated Soybean Phosphatidylcholine–Cholesterol Binary Liposome Membrane. *Chem. Pharm. Bull.*, 2014; 62(1): 58–63.
- Kneidl B., Peller M., Winter G., Lindner H.L., Hossann M. Thermosensitive liposomal drug delivery systems: state of the art review. *International Journal of Nanomedicine*, 2014; 9: 4387–4398.
- Koyonova R., Caffrey M. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998; 1376: 91–145.
- Kunwar A., Barik A., Sandur S.K., Indira P.K. Differential antioxidant/pro-oxidant activity of dimethoxycurcumin, a synthetic analogue of curcumin. *Free Radic Res*, 2011a; 45(8): 959–965.
- Li J., Wang X., Zhang T., Wang C., Huang Z., Luo X., Deng Y. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015; 10: 81–98.
- Liang J., Fang C., Wu W., Yu P., Gao J., Li J. Preparation and properties evaluation of a novel pH-sensitive liposomes based on imidazole-modified cholesterol derivatives. *International Journal of Pharmaceutics*, 2017; 518(1–2): 213–219.
- Lin P., Lin S., Wang C.P., Sridhar R. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology Advances*, 2014; 32: 711–726.
- Lin Y.L., Jiang G., Birrell L.K., El-Sayed M.E. Degradable, pH-sensitive, membrane-destabilizing, comb-like polymers for intracellular delivery of nucleic acids. *Biomaterials*, 2010; 31(27): 7150–7166.
- Liu H., Xu H., Jiang Y., Hao S., Gong F., Mu H., Liu K. Preparation, characterization, in vivo pharmacokinetics, and biodistribution of polymeric micellar dimethoxycurcumin for tumor targeting. *International Journal of Nanomedicine*, 2015; 10: 6395–6410.
- Liu M., Du H., Zhang W., Zhai G. Internal stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery: Design strategies and applications. *Materials Science and Engineering*, 2017; 71: 1267–1280.



- Liu J., Huang Y., Kumar A., Tan A., Jin S., Mozhi A., Liang X-J. pH-Sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy. *Biotechnology Advances*, 2014; 32: 693–710.
- Liu X., Huang G. Formation strategies, mechanism of intracellular delivery and potential clinical applications of pH-sensitive liposomes. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013; 8: 319–328.
- Liu Y., Liu D., Zhu L., Gan Q., Le X. Temperature-dependent structure stability and in vitro release of chitosan-coated curcumin liposome. *Food Research International*, 2015; 74: 97–105.
- Lokling K.E., Fossheim S.L., Klaveness J. Biodistribution of pH-responsive liposomes for MRI and a novel approach to improve the pH-responsiveness. *Journal of Controlled Release*, 2004; 98: 87–95.
- Markatou E., Gionis V., Chryssikos G.D., Hatziantoniou S., Georgopoulos A., Demetzos C. Molecular interactions between dimethoxycurcumin and Pamam dendrimer carriers. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007; 339(1–2): 231–236.
- Matsingou C., Demetzos C. Calorimetric study on the induction of interdigitated phase in hydrated DPPC bilayers by bioactive labdanes and correlation to their liposome stability. The role of chemical structure. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2007; 145: 45–62.
- Mehanny M., Hathout R.M., Geneidi A.S., Mansour S. Exploring the use of nanocarrier systems to deliver the magical molecule; Curcumin and its derivatives. *Journal of Controlled Release*, 2016; 225: 1–30.
- Munavirov B.V., Filippov A.V., Rudakova M.A. & Antzutkin O.N. Polyacrylic Acid Modifies Local and Lateral Mobilities in Lipid Membranes. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 2014; 35(6): 848–858.
- Naksuriya O., Okonogi S., Schiffelers R.M., Hennink W.E. Curcumin nanoformulations: A review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. *Biomaterials*, 2014; 35: 3365–3383.
- Naziris N., Pippa N., Meristoudi A., Pispas S. & Demetzos C. Design and development of pH-responsive HSPC:C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>-PAA chimeric liposomes. *Journal of Liposome Research*, 2017; 27(2): 108–117.

- Nehoff H., Parayath N. N., Domanovitch L., Taurin S., Greish K., Nanomedicine for drug targeting: strategies beyond the enhanced permeability and retention effect. *International Journal of Nanomedicine*, 2014; 9: 2539–2555.
- Nicolosi D., Scalia M., Nicolosi V.M. Encapsulation in fusogenic liposomes broadens the spectrum of action of vancomycin against Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents*, 2010; 35: 553–558.
- Niu Y., Ke D., Yang Q., Wang X., Chen Z., An X., Shen W. Temperature-dependent stability and DPPH scavenging activity of liposomal curcumin at pH 7.0. *Food Chemistry*, 2012; 135: 1377–1382.
- Nogueira E., Gomes A.C., Preto A., Cavaco-Paulo A. Design of liposomal formulations for cell targeting. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015; 136: 514–526.
- Ohtake S., Schebor C., Palecek S.P., de Pablo J.J. Phase behavior of freeze-dried phospholipid-cholesterol mixtures stabilized with trehalose. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015; 1713: 57–64.
- Pang X., Jiang Y., Xiao Q., Leung A.W., Hua H., Xu C. pH-responsive polymer–drug conjugates: Design and progress. *Journal of Controlled Release*, 2016; 222: 116–129.
- Patil Y.P., Jadhav S. Novel methods for liposome preparation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2014; 177: 8–18.
- Patwardhan R.S., Checker R., Sharma D., Kohli V., Priyadarsini K., Sandur S.K. Dimethoxycurcumin, a metabolically stable analogue of curcumin, exhibits anti-inflammatory activities in murine and human lymphocytes. *Biochemical Pharmacology*, 2011a; 82(6): 642–657.
- Pearson R.T., Warren N.J., Lewis A.L., Armes S.P., Battaglia G. Effect of pH and Temperature on PMPC–PDPA Copolymer Self-Assembly. *Macromolecules*, 2013; 46: 1400–1407.
- Peng S., Zou L., Liu W., Li Z., Liu W., Hu X., Chen X., Liu C. Hybrid liposomes composed of amphiphilic chitosan and phospholipid: Preparation, stability and bioavailability as a carrier for curcumin. *Carbohydrate Polymers*, 2017; 156: 322–332.

- Perrie Y., Crofts F., Devitt A., Griffiths H.R., Kastner E., Nadella V. Designing liposomal adjuvants for the next generation of vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016; 99: 85–96.
- Pippa N., Chountoulesi M., Kyrili A., Meristoudi A., Pispas S., Demetzos C. Calorimetric study of pH-responsive block copolymer grafted lipid bilayers: rational design and development of liposomes. *Journal of Liposome Research*, 2016; 26(3): 211–220.
- Pippa N., Gardikis K., Pispas S., Demetzos C. The physicochemical/thermodynamic balance of advanced drug liposomal delivery systems. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2014; 116: 99–105.
- Pippa N., Pispas S., Demetzos C. The metastable phases as modulators of biophysical behavior of liposomal membranes. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2015; 120(1): 937–945.
- Pourreza N., Golmohammadi H. Application of curcumin nanoparticles in a lab-on-paper device as a simple and green pH probe. *Talanta*, 2015; 131: 136–141.
- Pradhan P., Giri J., Rieken F., Koch C., Mykhaylyk O., Döblinger M., Banerjee R., Bahadur D., Plank C. Targeted temperature sensitive magnetic liposomes for thermo-chemotherapy. *Journal of Controlled Release*, 2010; 142: 108–121.
- Rosa M., Penacho N., Simoes S. DNA pre-condensation with an amino acid-based cationic amphiphile. A viable approach for liposome-based gene delivery. *Molecular Membrane Biology*, 2008; 25: 23–34.
- Simard P., Leroux J.C. pH-sensitive immunoliposomes specific to the CD33 cell surface antigen of leukemic cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009; 381: 86–96.
- Simões S., Moreira J.N., Fonseca C., Düzgüneş N., de Lima M.C. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004; 56: 947–965.
- Sharma R.A., Gescher A.J., Steward W.P. Curcumin: The story so far. *European Journal of Cancer*, 2005; 41: 1955–1968.
- Shen W., Hu J., Hu X. Impact of amphiphilic triblock copolymers on stability and permeability of phospholipid/polymer hybrid vesicles. *Chemical Physics Letters*, 2014; 600: 56–61.

- Sriram V., Rhodes C.T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutics Acta Helvetiae*, 1995; 70: 95–111.
- Stewart J.C.M. Colorimetric Determination of Phospholipids with Ammonium Ferrothiocyanate. *Analytical Biochemistry*, 1980; 104: 10–14.
- Tamvakopoulos C., Dimas K., Sofianos Z.D., Hatziantoniou S., Han Z., Liu Z-L., Wyche J.H., Pantazis P. Metabolism and anticancer activity of the curcumin analogue, dimethoxycurcumin. *Clinical Cancer Research*, 2007; 13(4): 1269–1277.
- Teymouri M., Barati N., Pirro M., Sahebkar A. Biological and pharmacological evaluation of dimethoxycurcumin: a metabolically stable curcumin analogue with a promising therapeutic potential. *Journal of Cellular Biology*, 2016; In Press.
- Tonnesen H.H. and Karlsen J. Studies on Curcumin and Curcuminoids V. Alkaline Degradation of Curcumin. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1985; 180: 132–134.
- Varshney G.K., Kintali S.R., Gupta P.K., Das K. A comparative study on the effect of Curcumin and Chlorin-p6 on the transport of the LDS cation across a negatively charged POPG bilayer: Effect of pH. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2017; 173: 132–138.
- Vasir K., Jaspreet K., Reddy K. M., Labhasetwar D.V. Nanosystems in Drug Targeting: Opportunities and Challenges. *Current Nanoscience*, 2005; 47: 47–64.
- Wang Y-J., Pan M-H., Cheng A-L., Lin I., Ho Y-S., Hsieh C-Y., Liang J-K. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1997; 15: 1867–1876.
- Wanga L., Geng D., Su H. Safe and efficient pH sensitive tumor targeting modified liposomes with minimal cytotoxicity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014; 12: 395–402.
- Yallapu M.M., Jaggi M., Chauhan S.C. Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. *Drug Discovery Today*, 2012; 17(1–2): 71–80.
- Yoon M.J., Kang Y.J., Lee J.A., Kim I.Y., Kim M.A., Lee Y.S., Park J.H., Lee B.Y., Kim I.A., Kim H.S., Kim S.A., Yoon A.R., Yun C.O., Kim E.Y., Lee K., Choi K.S. Stronger proteasomal inhibition and higher CHOP induction are

responsible for more effective induction of paraptosis by dimethoxycurcumin than curcumin. *Cell Death & Disease*, 2014; 5(3): e1112.

- Yuba E., Harada A., Sakanishi Y., Watarai S., Kono K. A liposomal-based antigen delivery system using pH-sensitive fusogenic polymers for cancer immunotherapy. *Biomaterials*, 2013; 34: 3042–3052.
- Zhao C., Nie S., Tang M., Sun S. Polymeric pH-sensitive membranes- A review. *Progress in Polymer Science*, 2011; 36: 1499–1520.
- Zhu Y., Yang B., Chen S., Du J. Polymer vesicles: Mechanism, preparation, application, and responsive behavior. *Progress in Polymer Science*, 2017; 64: 1–22.