



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

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

**«Μελέτες Φυσικοχημικής Σταθερότητας
Λιποσωμακών Συστημάτων: Ο ρόλος της λιπιδικής
σύστασης και συγκέντρωσης στην πρωτεϊνική
σύνδεση»**

Παπαγεωργίου Φωτεινή

Φαρμακοποιός

Αθήνα, 2018

Ευχαριστίες

Η παρούσα ερευνητική διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακευτικής Νανοτεχνολογίας του τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Βιομηχανική Φαρμακευτική».

Θα ήθελα να εκφράσω τις πιο θερμές και ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους με βοήθησαν για την πραγματοποίηση της διπλωματικής εργασίας.

Πρώτα απ' όλους στον επιβλέποντα καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Δεμέτζο, για την ανάθεση του θέματος, την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Τέλος τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την υπέροχη συνεργασία που είχαμε και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησής της.

Στην Μεταδιδακτορική ερευνήτρια του Τμήματος Φαρμακευτικής Τεχνολογίας Αναστασία – Γεωργία Πίππα για την πολύπλευρη και απλόχερη βοήθειά της, καθώς και για την αμέριστη υποστήριξη και τη συμβολή της στην ολοκλήρωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας. Ταυτόχρονα θα ήθελα να την ευχαριστήσω ιδιαίτερα για τις πολύτιμες παρατηρήσεις και υποδείξεις που μου πρόσφερε.

Στον υποψήφιο διδάκτορα Νικόλαο Ναζίρη για την καθημερινή του βοήθεια και υποστήριξη, την ευχάριστη συνεργασία μας, αλλά και για τις εποικοδομητικές συζητήσεις μας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς και τον αδελφό μου για τη στήριξη και τη βοήθεια που μου πρόσφεραν προκειμένου να συνεχίσω τις σπουδές μου και να πραγματοποιήσω τους στόχους μου.

Περιεχόμενα.....	3
Περίληψη.....	6
Abstract.....	7
Συνοτομογραφίες.....	8
Θεωρητικό μέρος.....	9
1. Λιπосώματα.....	9
1.1. Γενικά στοιχεία.....	9
1.2. Φωσφολιπίδια και Χοληστερόλη.....	11
1.3. Κατάταξη λιποσωμάτων.....	13
1.4. Συμβατικά - Ανιονικά λιπосώματα.....	14
1.5. Stealth λιπосώματα.....	15
1.6. Εφαρμογές και Προκλήσεις.....	16
2. Πρωτεΐνες πλάσματος και Οψωνινοποίηση.....	19
2.1. Πλάσμα και Πρωτεΐνες.....	19
2.2. Αλβουμίνη και άλλες πρωτεΐνες πλάσματος.....	20
2.3. Μηχανισμοί άμυνας: Φαγοκυττάρωση και Οψωνινοποίηση.....	23
3. Αλληλεπιδράσεις Λιποσωμάτων – Πρωτεϊνών.....	25
3.1. Ρόλος των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών στην πρωτεϊνική σύνδεση.....	26
3.2. Επιπτώσεις της πρωτεϊνικής προσρόφησης: Εμπόδια και Προοπτικές.....	28
Σκοπός της εργασίας.....	31
Πειραματικό μέρος.....	32
4. Υλικά και Όργανα.....	32
5. Μέθοδοι.....	37
5.1. Μέθοδος παρασκευής λιποσωμάτων.....	37
5.2. Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός λιποσωματικών συστημάτων.....	37
5.3. Δυναμική Σκέδαση Φωτός.....	38
5.4. Στατιστική ανάλυση.....	40

6. Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	41
6.1. Μελέτες σταθερότητας σε υδατικό μέσο.....	41
6.1.1. Μετρήσεις σταθερότητας για τα λιποσώματα που περιείχαν DPPC λιπίδια.....	41
6.1.1.1. Μετρήσεις σταθερότητας για τα DPPC λιποσώματα.....	41
6.1.1.2. Μετρήσεις σταθερότητας για τα DPPC:CH (9:1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα.....	44
6.1.1.3. Μετρήσεις σταθερότητας για τα DPPC:CH:DPPG (9:1:1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα.....	46
6.1.1.4. Μετρήσεις σταθερότητας για τα DPPC:DPPE-PEG (9:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα.....	48
6.1.1.5. Μετρήσεις σταθερότητας για τα DPPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα.....	51
6.1.2. Μετρήσεις σταθερότητας για τα λιποσώματα που περιείχαν HSPC λιπίδια.....	53
6.1.2.1. Μετρήσεις σταθερότητας για τα HSPC λιποσώματα.....	53
6.1.2.2. Μετρήσεις σταθερότητας για τα HSPC:CH (9:1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα.....	55
6.1.2.3. Μετρήσεις σταθερότητας για τα HSPC:CH:DPPG (9:1:1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα.....	57
6.1.2.4. Μετρήσεις σταθερότητας για τα HSPC:DPPE-PEG (9:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα.....	59
6.1.2.5. Μετρήσεις σταθερότητας για τα HSPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα.....	61
6.2. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά λιποσωμάτων σε βιολογικό μέσο.....	63
6.2.1. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των λιποσωμάτων που περιείχαν DPPC λιπίδια.....	63
6.2.2. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των λιποσωμάτων που περιείχαν HSPC λιπίδια.....	67

6.2.3. Σύγκριση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των λιποσωμάτων διαφορετικής λιπιδικής σύστασης και συγκέντρωσης	69
6.3. Fraction of Stealthiness (F_s).....	72
7. Συμπεράσματα.....	76
8. Βιβλιογραφία.....	78

Περίληψη

Κατά την είσοδο τους στην κυκλοφορία του αίματος τα νανοσωματίδια αλληλεπιδρούν και έρχονται σε επαφή με βιομόρια, τα οποία τροποποιούν τις ιδιότητες της επιφάνειας και επηρεάζουν τη βιολογική συμπεριφορά των νανοσωματιδίων. Αντικείμενα της παρούσας μελέτης αποτελούν η αξιολόγηση της φυσικοχημικής και βιολογικής σταθερότητας λιποσωματικών συστημάτων, ο ρόλος της λιπιδικής σύστασης και συγκέντρωσης στην πρωτεϊνική σύνδεση και η επίδραση της πρωτεϊνικής προσρόφησης στις ιδιότητες των νανοσωματιδίων. Για τον σχεδιασμό των λιποσωματικών συστημάτων χρησιμοποιήθηκαν ουδέτερα και ανιονικά λιπίδια και λιπίδια συζευγμένα με πολυαιθυλενογλυκόλη (Poly(Ethylene Glycol)-lipid conjugates). Λιποσώματα διαφορετικής λιπιδικής σύστασης παρασκευάστηκαν σε δύο συγκεντρώσεις με τη μέθοδο ενυδάτωσης λεπτού λιπιδικού υμενίου. Ακολούθησε αραίωση των λιποσωμάτων σε υδατικό και βιολογικό μέσο και έπειτα προσδιορίστηκαν τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά με τη χρήση Δυναμικής και Ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι τα συμβατικά ουδέτερα λιποσωματικά συστήματα δεν ήταν σταθερά στο υδατικό και βιολογικό μέσο, ενώ τα ανιονικά παρουσίασαν καλύτερη σταθερότητα και στα δύο μέσα διασποράς. Επιπλέον, η ενσωμάτωση της χοληστερόλης φάνηκε να προσδίδει φυσική και βιολογική σταθερότητα χάρη στη ρύθμιση της ρευστότητας των λιπιδικών μεμβρανών. Τα λιποσώματα που περιείχαν χοληστερόλη και συζευγμένα λιπίδια με πολυαιθυλενογλυκόλη διατήρησαν το μέγεθος τους παρουσία πρωτεϊνών ορού πλάσματος, λόγω της στερεοχημικής σταθεροποίησης. Στην παρούσα εργασία, προτείνουμε μια νέα παράμετρος, το Fraction of stealthiness (F_s), προκειμένου να διερευνηθεί η έκταση της πρωτεϊνικής σύνδεσης στα λιποσώματα. Η παράμετρος αυτή εξαρτάται από τις μεταβολές στο μέγεθος των λιποσωμάτων μετά την επώαση στον ορό πλάσματος, ενώ τα λιποσώματα παρουσιάζουν ιδιότητες στερεοχημικά σταθεροποιημένων λιποσωμάτων (stealth properties) όταν το F_s πλησιάζει την τιμή 1. Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή θα μπορούσε να συμβάλλει στην κατανόηση των αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών - νανοσωματιδίων και των διεπιφανειακών φαινομένων, τα οποία αποτελούν κλειδί στην ανάπτυξη προηγμένων Νανοσυστημάτων χορήγησης φαρμακομορίων (Advanced drug delivery nanosystems - aDDnSs).

Abstract

When nanoparticles enter into the bloodstream, they interact and come into contact with biomolecules, which modify the surface properties and affect the biological behavior of nanoparticles. The aim of the present study is to evaluate the physicochemical and biological stability of liposomal systems, the role of lipid composition and concentration in protein binding, and the effect of protein absorption on the properties of liposomal nanosystems. Neutral, anionic lipids and Poly(Ethylene Glycol)-Lipid Conjugates (PEG-lipid conjugates) were used for the preparation of liposomal systems. Liposomes of different lipid composition were prepared in two concentrations by lipid - film hydration method. Thereafter, the liposomes were diluted in aqueous and biological media and their physicochemical characteristics were determined using Dynamic and Electrophoretic light scattering. Our results show that the conventional neutral liposome systems were not stable in the aqueous and biological media, whereas the anionic liposomal formulations showed better stability in the two dispersion media. In addition, the incorporation of cholesterol appears to confer physical and biological stability by regulating the lipid membrane fluidity. Liposomes containing cholesterol and PEG-lipid conjugates retained their size in the presence of serum proteins due to steric stabilization. In the present study, we propose a new parameter, Fraction of stealthiness (F_s), to investigate the extent of protein binding in liposomes. This parameter depends on the changes in the size of the liposomes after the incubation in the serum, while the liposomes exhibit stealth properties when the F_s approaches the value 1. In conclusion, this study could help to understand the interfacial phenomena and the interactions of proteins - nanoparticles, which are the keys to the development of Advanced Drug Delivery Nanosystems (aDDnSs).

Συντομογραφίες

DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine	Διπαλμιτοϋλοφωσφατιδυλοχολίνης
HSPC	Hydrogenated soybean phosphatidylcholine	L-α- φωσφατιδυλοχολίνη, υδρογονωμένη σόγια
DPPG	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt)	1,2-διπαλμιτοϋλ-sn-γλυκερο-3-φωσφο-(1-rac-γλυκερόλη) (άλας νατρίου)
CH	Cholesterol	Χοληστερόλη
DPPE-PEG 3000	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-3000] (ammonium salt)	1,2-διπαλμιτοϋλ-sn-γλυκερο-3-φωσφοαιθανολαμίνη-N-[μεθοξυ(πολυαιθυλενογλυκόλη) -3000]
PEG	Polyethylene glycol	Πολυαιθυλενογλυκόλη
aDDnS	Advanced Drug Delivery nanoSystems	Προχωρημένα Νάνο - Συστήματα Μεταφοράς Φαρμακομορίων
RES	Reticuloendothelial System	Δικτυοενδοθηλιακό σύστημα
FBS	Fetal bovine serum	Ορός Πλάσματος Βοοειδούς
D_h	Hydrodynamic diameter	Υδροδυναμική διάμετρος
PD.I.	Polydispersity Index	Δείκτης Πολυδιασποράς
DLS	Dynamic Light Scattering	Δυναμική Σκέδαση Φωτός
ELS	Electrophoretic Light Scattering	Ηλεκτροφορητική Σκέδαση Φωτός
LD	Liquid disordered phase	Υγρή κατάσταση
SO	Solid ordered phase	Κατάσταση πήγματος
T_m	Phase transition temperature	Θερμοκρασία μετάβασης

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Λιποσώματα

1.1. Γενικά στοιχεία

Τις τελευταίες δεκαετίες σημειώνεται μια ραγδαία πρόοδος της Νανοτεχνολογίας, ενός πολυεπιστημονικού κλάδου, ο οποίος προσελκύει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για τη παρασκευή και χρήση νανοσωματιδίων κατάλληλων στη θεραπεία και διάγνωση ασθενειών. Η Νανοτεχνολογία ανοίγει νέους δρόμους στο σχεδιασμό συστημάτων χορήγησης φαρμάκων με βελτιστοποιημένα φυσικοχημικά και βιολογικά χαρακτηριστικά, προσφέροντας την δυνατότητα ελεγχόμενης και παρατεταμένης αποδέσμευσης φαρμακομορίων, στοχευμένης θεραπείας (targeted and controlled drug delivery) και ανάπτυξης πολυλειτουργικών (multifunctional) νανοσυστημάτων για μεταφορά και χορήγηση θεραπευτικών και διαγνωστικών ενώσεων (Allen and Cullis., 2013; Nahar et al., 2006; Vasir et al., 2005; Jain et al., 2002). Ένα σπουδαίο επίτευγμα της Νανοτεχνολογίας θεωρείται ο σχεδιασμός νανο-μεταφορέων λιπιδικής σύστασης και η εφαρμογή αυτών στην θεραπευτική των νόσων (Bargham et al. 1965). Τα λιπιδικά αυτά νανοσυστήματα ονομάστηκαν λιποσώματα και αποτελούν καινοτόμα συστήματα χορήγησης θεραπευτικών προϊόντων, ενώ έχει προταθεί και η χρήση τους στη γονιδιακή θεραπεία (Gabizon et al., 1989; Balazs et al., 2011). Τα λιποσώματα χαρακτηρίζονται ως αυτοοργανούμενα κολλοειδή συστήματα διασποράς, τα οποία σχηματίζονται κυρίως από φωσφολιπίδια, δηλαδή αμφίφιλα μόρια με ένα υδρόφιλο και ένα υδρόφοβο τμήμα. Όταν τα μόρια αυτά βρεθούν σε υδατικό περιβάλλον σε δεδομένη συγκέντρωση δύναται να σχηματίσουν αυθορμήτως ψευδοσφαιρικές κλειστές δομές, ενσωματώνοντας μόρια στον υδατικό πυρήνα τους ή ανάμεσα στη λιπιδική διπλοστοιβάδα, αναλόγως με τις φυσικοχημικές ιδιότητες των ουσιών (Laouini et al., 2012; Bozzuto et al., 2015). Τα λιποσώματα αποτελούν << έξυπνα >> συστήματα χορήγησης φαρμάκων (Smart Drug Delivery Systems - SDDS), τα οποία εκφράζουν την λειτουργικότητα τους (functionality) και δύναται να ανταποκρίνονται σε συγκεκριμένα εσωτερικά ή εξωτερικά ερεθίσματα, προσφέροντας την ικανότητα στόχευσης, αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα και μειώνοντας τις ανεπιθύμητες ενέργειες και την τοξικότητα των φαρμακομορίων (Liu et al., 2016; Sercombe et al., 2015). Ωστόσο, εκτός από Νάνο – Συστήματα Μεταφοράς Φαρμακομορίων, τα λιποσώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως

Μοντέλα Προσομοίωσης Βιομεμβρανών (Bangham et al., 1974). Τα λιποσώματα λόγω της λιπιδικής τους σύστασης και της λιπιδικής διπλοστοιβάδας παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες με τις βιολογικές μεμβράνες, επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διερεύνηση των φαινομένων που εμφανίζονται στις κυτταρικές μεμβράνες, των αλληλεπιδράσεων τους με φάρμακα και με πρωτεΐνες, με στόχο την κατανόηση των μοριακών και ενδοεπιφανειακών φαινομένων (interfacial phenomena) και τον εντοπισμό νέων πιθανών θεραπευτικών στρατηγικών (Colley et al., 1976; Peetla et al., 2009).

Παρά την πρόοδο της λιποσωμιακής τεχνολογίας, η εφαρμογή στην κλινική πράξη είναι σταδιακή και εξακολουθεί να αντιμετωπίζει αρκετές προκλήσεις. Η Νανοτεχνολογία καλείται να ξεπεράσει εμπόδια όπως, η αναγνώριση και η κάθαρση από το Δικτυοενδοθηλιακό σύστημα (Reticuloendothelial System - RES), η οψωνινοποίηση και αποσταθεροποίηση των νανοσυστημάτων (opsonisation and vesicle destabilization), το φαινόμενο της επιταχυνόμενης εκκαθάρισης από το αίμα (Accelerated Blood Clearance Phenomenon - ABS) καθώς και οι αντιδράσεις υπερευαισθησίας (Complement Activation-Related Pseudoallergy - CAPRA) (Semple et al., 1998; Dams et al., 2000; Hua and Wu., 2013; Moghimi and Hunter, 2001). Με την είσοδο τους στην κυκλοφορία, τα λιποσώματα αντιμετωπίζουν διάφορους αμυντικούς μηχανισμούς, με αποτέλεσμα την αναγνώριση και κάθαρση τους μέσω αλληλεπιδράσεων με τα φαγοκύτταρα. Η απομάκρυνση από τα κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος ακολουθεί μετά την οψωνινοποίηση, η οποία αποτελεί την διαδικασία προσρόφησης των πρωτεϊνών πλάσματος (π.χ. λιποπρωτεΐνες, ανοσοσφαιρίνες, φιμπρονεκτίνη) στη φωσφολιπιδική μεμβράνη και τροποποίησης της επιφάνειας του νανοσωματιδίου (Liu et al., 1998; Yan et al., 2005). Μια στρατηγική για την παράταση του χρόνου ζωής των νανοσωματιδίων στην κυκλοφορία συνιστά η στερεοχημική σταθεροποίηση με την ενσωμάτωση πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) στην λιποσωμιακή μεμβράνη, ώστε να αναστέλλονται οι υδροφοβικές και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τις πρωτεΐνες και τα κύτταρα και να αποτρέπεται η φαγοκυττάρωση (Immordino et al. 2006). Προβλήματα παρουσιάζει όμως και η τεχνολογία τροποποιημένων με πολυμερή λιποσωμάτων, καθώς μέσω του φαινομένου <<επιταχυνόμενης εκκαθάρισης από το αίμα>> παράγονται αντισώματα έναντι τους (immune response). Επιπροσθέτως, σύμφωνα με τις τελευταίες κλινικές μελέτες φαίνεται ότι είναι πιθανή η πρόκληση αντιδράσεων υπερευαισθησίας (CAPRA) μετά από χορήγηση λιποσωμιακών συστημάτων (Ishida et al., 2003, 2006b; Ishoda and Kiwada, 2008). Απαιτείται λοιπόν η περαιτέρω μελέτη και

κατανόηση των μηχανισμών των παραπάνω φαινομένων, ώστε να αναπτυχτούν ασφαλή και καινοτόμα συστήματα χορήγησης θεραπευτικών μορίων.

1.2. Φωσφολιπίδια και Χοληστερόλη

Τα βασικά λιπίδια που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των λιποσωμάτων είναι τα φωσφολιπίδια. Το υδρόφοβο μέρος τους αποτελείται από αλυσίδες λιπαρών οξέων κορεσμένων ή ακόρεστων εστεροποιημένων με γλυκερόλη. Παίρνουν κατάλληλο προσανατολισμό όταν βρεθούν σε υδατικό περιβάλλον και σχηματίζουν λιπιδικές διπλοστοιβάδες μέσα από την ανάπτυξη υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και την ελαχιστοποίηση της ελεύθερης ενεργείας του συστήματος. Τα φωσφολιπίδια μπορεί να είναι φυσικά ή συνθετικά, ουδέτερα ή φορτισμένα, ενώ η διαμόρφωση των λιπαρών αλυσίδων (*trans*, *gauche*) καθορίζει τη μετάβαση στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση, τη ρευστότητα της λιπιδικής στοιβάδας και κατ' επέκταση τη λειτουργικότητα των λιποσωμάτων (Li et al., 2015). Αναλυτικότερα, η *trans* διαμόρφωση επιτρέπει στις αλυσίδες να είναι κοντά η μία στην άλλη, ενώ η *gauche* αυξάνει την απόσταση μεταξύ της στρεβλωμένης αλυσίδας και των γειτονικών αλυσίδων. Παράλληλα, η *trans* διαμόρφωση περιορίζει την μετακίνηση των λιπιδίων, μειώνει τη ρευστότητα και τη διαπερατότητα σε μόρια της λιπιδικής στοιβάδας σε αντίθεση με την *gauche* (Metso et al., 2005; Rabinovich et al., 1991). Επιπροσθέτως, ο βαθμός κορεσμού και το μήκος των αλυσίδων των λιπαρών οξέων, καθώς επίσης και το φορτίο των φωσφολιπιδίων επιδρούν στον ρυθμό απομάκρυνσης των λιποσωμάτων και την πρόσληψη τους από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Li et al., 2015). Είναι φανερό ότι το είδος των φωσφολιπιδίων επηρεάζει τις ιδιότητες της μεμβράνης, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων και τελικά την φαρμακοκινητική και βιοδιαθεσιμότητα των φαρμακομορίων.

Μια άλλη κατηγορία λιπιδίων που παρουσιάζει ενδιαφέρον στην ανάπτυξη λιποσωμάτων είναι οι στερόλες. Μεταξύ αυτών η χοληστερόλη, η οποία έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, χάρη στην δομή και τη δράση της, ρυθμίζει τη ρευστότητα των λιπιδικών διπλοστοιβάδων και τη διαπερατότητα σε ιόντα και νερό, ενώ επιδρά στη θερμοκρασία μετάβασης φάσης T_m προάγοντας τη φάση της υγρής κρυσταλλικής κατάστασης (Yeagle et al., 1990). Η χοληστερόλη είναι το κύριο συστατικό των μεμβρανών των ευκαρυωτικών κυττάρων και ένα από τα σημαντικότερα λιπίδια των βιομεμβρανών, αφού επηρεάζει τη συμπεριφορά των φωσφολιπιδίων. Η χοληστερόλη αποτελείται από ένα σύστημα τεσσάρων δακτυλίων που ενώνονται μεταξύ τους, μια 3β-υδροξυλομάδα και μια

υδρογονανθρακική αλυσίδα. Η υδροξυλομάδα προσδίδει αμφίφιλο χαρακτήρα στο μόριο της, η οποία μπορεί να εισχωρεί στην διπλοστοιβάδα παράλληλα στις υδρογονάνθρακες αλυσίδες των φωσφολιπιδίων. Μάλιστα, η υδροφοβική ουρά πραγματοποιεί ταχείες κινήσεις μεταξύ πολλών διαμορφώσεων, σε αντίθεση με τον στεροειδή δακτύλιο που περιορίζεται σε μια διαμόρφωση. Αυτή η κινητικότητα είναι που προκαλεί τις αλλαγές της διαμόρφωσης στην μεμβράνη. Η χοληστερόλη ρυθμίζει τη διαμόρφωση των αλυσίδων των λιπιδίων, με τα φωσφολιπίδια να επιλέγουν trans διαμόρφωση γύρω από την χοληστερόλη για την αποφυγή κόμβων (kinks). Εξαιτίας της μείωσης των gauche διαμορφώσεων μεταβάλλεται η συνοχή και η ρευστότητα των λιπιδικών στοιβάδων. Ειδικότερα, η ενσωμάτωση της χοληστερόλης προάγει τη δημιουργία πιο οργανωμένων διπλοστοιβάδων και την αύξηση της συνοχής των λιπιδίων (ordering and condensing effect), με αποτέλεσμα να προσδίδεται φυσική σταθερότητα στα λιπιδώματα και ταυτόχρονα να μειώνονται οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ φωσφολιπιδίων και πρωτεϊνών (Tierney et al., 2005; Meyer et al., 2009; Hung et al., 2007; McIntosh et al., 1988). Οι κύριοι παράγοντες που καθορίζουν την δράση της στη λιπιδική στοιβάδα είναι: (i) το μήκος των υδρογονανθρακικών αλυσίδων των λιπιδίων (ii) ο βαθμός κορεσμού και (iii) η δομή της κεφαλής. Η επιστημονική κοινότητα διερευνά τον ρόλο και τη δράση της χοληστερόλης στη λιποσωμιακή μεμβράνη, καθώς η ενσωμάτωση της αυξάνει τη σταθερότητα και παρατείνει τον χρόνο κυκλοφορίας των νανοσυστημάτων, ενώ εμποδίζει την ανταλλαγή λιπιδίων με τις λιποπρωτεΐνες και τα ερυθροκύτταρα. Μάλιστα η χρήση της χοληστερόλης αποτελεί μία εναλλακτική τακτική για την τροποποίηση της επιφάνειας των λιποσωμάτων με μόρια πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) (Crook et al., 1998; Birchall et al., 1999; Nchinda et al., 2002; Zhang and Anchordoquy, 2004).

1.3. Κατάταξη Λιποσωμάτων

Οι ιδιότητες του λιποσωμάτων διαφέρουν σημαντικά ανάλογα με τη λιπιδική τους σύνθεση, το επιφανειακό φορτίο, το μέγεθος και τη μέθοδο παρασκευής. Τα λιποσώματα μπορούν να ταξινομηθούν με βάση (i) το μέγεθος και τον αριθμό των λιπιδικών διπλοστοιβάδων, (ii) τη λιπιδική σύσταση και (iii) τη μέθοδο παρασκευής. Στο Πίνακα 1 συνοψίζονται μερικές από τις βασικές κατηγορίες λιποσωματικών συστημάτων. Επομένως, δίνεται η δυνατότητα ανάπτυξης και παρασκευής λιποσωματικών συστημάτων ανάλογα με την επιθυμητή θεραπευτική εφαρμογή, δεδομένου ότι μπορούν να παρασκευαστούν διάφοροι τύποι λιποσωμάτων παρουσιάζοντας διαφορές ως προς τη δομή, τη σύσταση, το μέγεθος, την επικάλυψη της επιφάνειας και συνεπώς ως προς την λειτουργία τους (Akbarzadeh et al., 2013).

Πίνακας 1. Κατάταξη των λιποσωμάτων με βάση το (i) το μέγεθος και τον αριθμό των λιπιδικών διπλοστοιβάδων, (ii) τη λιπιδική σύσταση, (iii) τη μέθοδο παρασκευής.

Μέγεθος και Αριθμός λιπιδικών διπλοστοιβάδων	Λιπιδική σύσταση	Μέθοδος παρασκευής
Γιγάντια Μονοστοιβαδικά Λιποσώματα	Συμβατικά Λιποσώματα	Μέθοδος εξάτμισης ανάστροφης φάσης
Μεγάλα πολυστοιβαδικά λιποσώματα	Λιποσώματα ευαίσθητα στο pH	Εξώθηση διαμέσου φίλτρου
Ολιγοστοιβαδικά λιποσώματα	Κατιονικά Λιποσώματα	Μέθοδος Ψύξης - Θέρμανσης
Μεγάλα μονοστοιβαδικά λιποσώματα	Λιποσώματα μακράς κυκλοφορίας	Αφυδατωμένα – Ενυδατωμένα κυστίδια
Μικρά μονοστοιβαδικά λιποσώματα	Ανοσολιποσώματα	Ενυδάτωση λεπτού υμενίου

Στη συγκεκριμένη μελέτη παρασκευάστηκαν μικρά μονοστοιβαδικά λιποσώματα (Small unilamellar vesicles - SUVs), συμβατικά (ουδέτερα ή αρνητικά φορτισμένα) και στερεοχημικά σταθεροποιημένα (stealth) με τη μέθοδο ενυδάτωσης λεπτού λιπιδικού υμενίου και τη χρήση της μεθόδου υπερήχησης.

➤ Μέθοδος ενυδάτωσης λεπτού λιπιδικού υμενίου - Υπερήχηση

Κατά την παρασκευή λιποσωμάτων, τα λιπίδια αρχικά διαλύονται και αναμιγνύονται σε έναν οργανικό διαλύτη για να εξασφαλιστεί ομοιογενές μίγμα λιπιδίων. Στόχος είναι η πλήρης ανάμιξη των λιπιδίων και η λήψη ενός διαυγούς λιπιδικού διαλύματος. Έπειτα, ο οργανικός διαλύτης απομακρύνεται με εξάτμιση με τη χρήση περιστρεφόμενης συσκευής εξάτμισης υπό κενό ώστε να σχηματιστεί το λεπτό λιπιδικό υμένιο. Ακολουθεί η ενυδάτωση με απλή προσθήκη υδατικού μέσου στη φιάλη με το λιπιδικό υμένιο και ανάδευση εντός υδατόλουτρου. Η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της εξάτμισης του οργανικού διαλύτη και της ενυδάτωσης θα πρέπει να είναι πάνω από τη θερμοκρασία μετάβαση φάσης (transition temperature - T_m) του/των λιπιδίου/ων. Αυτό επιτυγχάνεται εύκολα με τη μεταφορά του λιπιδικού εναιωρήματος σε σφαιρική φιάλη και τοποθέτηση της σε υδατόλουτρο. Ο χρόνος ενυδάτωσης μπορεί να διαφέρει μεταξύ των λιπιδίων αναλόγως το είδος και τη δομή, ωστόσο, συνήθως ο χρόνος ενυδάτωσης είναι μία ώρα με έντονη ανάδευση. Το προϊόν της ενυδάτωσης είναι μεγάλα πολυστοιβαδικά λιποσώματα (Large multilamellar vesicles – MLVs). Ακολουθεί, η μείωση του μεγέθους των MLVs λιποσωμάτων, η οποία συνήθως πραγματοποιείται με υπερήχηση (sonication) και τελικά παράγονται μικρά μονοστοιβαδικά λιποσώματα (Small Unilamellar Vesicles - SUVs). Το μέγεθος και η κατανομή επηρεάζονται από τη σύσταση και τη συγκέντρωση των λιπιδίων, τη θερμοκρασία και τον χρόνο υπερήχησης.

1.4. Συμβατικά – Ανιονικά Λιποσώματα

Τα συμβατικά λιποσώματα (conventional liposomes - CL) συντίθεται συνήθως από ουδέτερα ή/και φορτισμένα λιπίδια (ανιονικά ή κατιοντικά) και μπορούν να περιέχουν χοληστερόλη. Η χρήση της χοληστερόλης και των φωσφολιπιδίων με κορεσμένες αλκυλικές αλυσίδες, τα οποία έχουν αυξημένη θερμοκρασία μετάβασης T_m , μπορούν να επιμηκύνουν το χρόνο κυκλοφορίας των λιπιδικών φορέων χάρη στη μεταβολή της ρευστότητας της λιπιδικής μεμβράνης (Allen et al., 1989; Webb et al., 1995). Η ρευστότητα, το επιφανειακό φορτίο, η υδροφιλικότητα και τα υπόλοιπα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά καθορίζουν τόσο τη σταθερότητα των νανοσυστημάτων, όσο και το είδος και τον αριθμό των πρωτεϊνών που προσδένονται στη μεμβράνη τους. Η επιλογή και ο καθορισμός των ιδιοτήτων της λιπιδικής μεμβράνης διακατέχουν σημαντικό ρόλο στην μείωση της πρόσληψης από το Σύστημα μονοπύρηνων φαγοκυττάρων (Mononuclear Phagocyte System- MPS) και στον σχεδιασμό λιποσωμάτων μακράς κυκλοφορίας (Semple et al., 1998).

Όσον αφορά τα ανιονικά λιποσώματα, έχει διαπιστωθεί ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπα βιομεμβρανών για τη μελέτη κυτταρικών λειτουργιών και μηχανισμών, ενώ η επιστημονική κοινότητα έχει αρχίσει να επικεντρώνεται στη θεραπευτική χρήση τους ως φορείς χορήγησης πεπτιδίων ή άλλων μορίων (Siddhesh et al., 2004). Τα ανιονικά λιποσώματα, λόγω της αρνητικής φορτισμένης επιφάνειας και των απωστικών δυνάμεων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, φαίνεται να παρουσιάζουν μειωμένη κάθαρση και φαγοκυττάρωση από τα κύτταρα του Δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (Nishikawa et al., 1990, Funato, 1992), αποδεικνύοντας ότι είναι πιο βιοσυμβατά σε σχέση με τα κατιονικά λιποσώματα (Senior, 1987). Επιπλέον, έρευνες δείχνουν ότι τα ανιονικά λιποσώματα έχουν καλύτερη φυσική σταθερότητα και αυξημένη *in vitro* βιολογική σταθερότητα συγκριτικά με τα κατιονικά και ουδέτερα λιποσώματα (Roerdink et al., 1989). Όπως αναφέρθηκε, το είδος των λιπιδίων καθορίζει τις ιδιότητες της μεμβράνης κι έτσι τη λειτουργικότητα των λιποσωμάτων. Τα ανιονικά λιποσώματα μπορούν να περιέχουν διάφορα φωσφολιπίδια, τα οποία διαμορφώνουν τα χαρακτηριστικά των λιπιδικών διπλοστοιβάδων όπως τη πυκνότητα του φορτίου, τη ρευστότητα και την καμπυλότητα του συστήματος. Ωστόσο, στη βιβλιογραφία αναφέρεται επίσης ότι τα ανιονικά λιποσώματα αποσταθεροποιούνται και αποσυντίθενται στην παρουσία ορισμένων λιποπρωτεϊνών, ενώ ακόμη έχει βρεθεί ότι τα ανιονικά παρουσιάζουν μεγαλύτερη κάθαρση από τα ουδέτερα λιποσώματα (Harashima et al., 1998). Καταλήγοντας, η μελέτη της λειτουργίας και του ρόλου των ανιονικών λιπιδίων στη βιολογικές μεμβράνες, την αλληλεπίδραση τους με τις πρωτεΐνες και την χρήση τους ως πιθανούς φορείς χορήγησης μορίων χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

1.5. Stealth Λιποσώματα

Πολλά συμβατικά λιποσώματα είναι εμπορικώς διαθέσιμα είτε βρίσκονται υπό κλινική μελέτη (Fan et al., 2013). Ως εκ τούτου, η χρήση των συμβατικών λιποσωμάτων υπόκειται σε ορισμένους περιορισμούς εξαιτίας της θερμοδυναμικής και κινητικής αστάθειας, της μειωμένης βιοδιαθεσιμότητας και της ταχείας κάθαρσης κατά τη συστηματική χορήγηση. Μία εναλλακτική στρατηγική, προκειμένου να ξεπεραστούν τα προαναφερθέντα προβλήματα και να βελτιωθεί ο χρόνος ζωής στο πλάσμα αποτελούν τα stealth λιποσώματα. Τα << αόρατα >> (stealth) λιποσώματα είναι στερεοχημικά σταθεροποιημένα λιποσώματα μακράς κυκλοφορίας. Χαρακτηρίζονται ως << αόρατα >> (stealth) γιατί εμποδίζουν την πρόσδεση των ειδικών πρωτεϊνών (οψωνίνες) του πλάσματος και την αναγνώριση από τα μακροφάγα του ανοσοποιητικού συστήματος. Με την παρεμπόδιση της φαγοκυττάρωσης, μειώνεται η κάθαρση και αυξάνεται η βιοδιαθεσιμότητα των λιποσωμάτων (Immordino et

al., 2006; Moghimi et al., 2003; Cattel et al., 2004). Ταυτόχρονα, τα stealth λιποσώματα έχουν την δυνατότητα να συγκεντρώνονται σε ιστούς, όπως καρκινικούς ιστούς και κύτταρα, μέσω του φαινομένου ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης (Enhanced permeability and retention effect-EPR). Επομένως, τα λιποσώματα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως νανοφορείς φαρμάκων, π.χ. αντικαρκινικών, για παρατεταμένη αποδέσμευση και παθητική στόχευση (Maeda et al., 2001). Ο κύριος μηχανισμός στερεοχημικής σταθεροποίησης βασίζεται στην ικανότητα ενός υδρόφιλου πολυμερούς να ενσωματώνεται ή να προσροφάται στην επιφάνεια της λιπιδικής διπλοστοιβάδας και μέσω απομάκρυνσης μορίων νερού να παρέχει ενθαλπική σταθερότητα, ενώ ταυτόχρονα καθίσταται δυνατό, μέσω της αύξησης της υδροφιλικότητας, να μειώνονται οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ λιποσωμάτων και πρωτεϊνών. Ένα από τα πολυμερή που χρησιμοποιείται ευρύτατα για την ανάπτυξη μακράς κυκλοφορίας λιποσωμάτων, είναι η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG). Η πολυαιθυλενογλυκόλη είναι βιοσυμβατό μόριο με διαλυτότητα σε οργανικούς και υδατικού φορείς και χωρίς σημαντική τοξικότητα. Η τροποποίηση της επιφάνειας των λιποσωμάτων με πολυαιθυλενογλυκόλη μπορεί να γίνει είτε με φυσική προσρόφηση του πολυμερούς είτε με ενσωμάτωση λιπιδίων συζευγμένων με PEG (PEG-lipid conjugates) κατά τη διάρκεια της λιποσωματικής παρασκευής. Η παρουσία του πολυμερούς αυξάνει το χρόνο ζωής, μειώνει την κάθαρση και τις ανοσολογικές αντιδράσεις και ταυτόχρονα μεταβάλλοντας την φαρμακοκινητική των φαρμακομορίων βελτιώνει το θεραπευτικό τους αποτέλεσμα. Ακόμη, χάρη στην αύξηση της υδροφιλικότητας της επιφάνειας μειώνονται οι αλληλεπιδράσεις με τις οψωνίνες, ενώ μελέτες αποδεικνύουν την αλληλεπίδραση της πολυαιθυλενογλυκόλης με ειδικές πρωτεΐνες, τις δυσόψωνινες (dysopsonins), οι οποίες αναστέλλουν την φαγοκυττάρωση και την αναγνώριση των νανοσωματιδίων από τα φαγοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και παρατείνουν τη δράση τους (Moghimi et al., 1993; Johnstone et al., 2001).. Παρόλα αυτά, νέα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η πολυαιθυλενογλυκόλη δεν αναστέλλει πλήρως την πρόσληψη από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, ενώ υπάρχουν αμφιβολίες για την μη τοξικότητα της (Verhoef et al., 2013; Amoozgar et al., 2012).

1.6. Εφαρμογές και Προκλήσεις

Οι εφαρμογές των λιποσωμάτων συναντώνται σε διάφορους τομείς, όπως στην Ιατρική, Φαρμακολογία και Κοσμητολογία. Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε, η περισσότερη προσοχή έχει επικεντρωθεί στη χρήση τους ως διαγνωστικά μέσα ή νανοφορείς φαρμάκων, καθώς και ως μοντέλα βιομεμβρανών για τη μελέτη κυτταρικών αλληλεπιδράσεων και μοριακών

λειτουργιών. Οι εξελίξεις στη Λιποσωμακή τεχνολογία οδηγούν στη χορήγηση νέων βιοτεχνολογικών προϊόντων, βελτιώνοντας τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα και μειώνοντας την τοξικότητα των φαρμακομορίων (Πίνακας 2). Αδιαμφισβήτητα λοιπόν, τα λιποσώματα κατέχουν μία σημαντική θέση στα νεώτερα συστήματα χορήγησης, βρίσκοντας εφαρμογή σε διάφορα πεδία, όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2. Κύριες εφαρμογές των λιποσωμάτων σε διάφορους επιστημονικούς τομείς.

Εφαρμογές των λιποσωμάτων	Παραδείγματα
Θεραπεία καρκίνου	<ul style="list-style-type: none"> • Φορείς αντικαρκινικών φαρμάκων • Μείωση τοξικότητας • Στοχευμένη θεραπεία
Θεραπεία λοιμώξεων και παρασιτικών ασθενειών	<ul style="list-style-type: none"> • Φορείς αντιμικροβιακών και αντιμυκητιακών φαρμάκων • Μείωση τοξικότητας • Στόχευση μακροφάγων
Διάγνωση Κόσμητολογία	<ul style="list-style-type: none"> • Φορείς ραδιοεπισημασμένων μορίων • Μεταφορά δραστικών ουσιών • Μείωση της διαδερμικής απώλειας ύδατος.
Μοντέλα Προσομοίωσης βιομεμβρανών	<ul style="list-style-type: none"> • Μελέτη κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών

Τα λιποσώματα χάρη στη βιοσυμβατότητα, βιοαποικοδόμηση και τη χαμηλή τοξικότητα χρησιμοποιούνται ευρύτατα ως φορείς βιομορίων και φαρμάκων. Ο αμφίφιλος χαρακτήρας των λιπιδίων καθιστά τα λιποσώματα ικανά να ενσωματώνουν τόσο υδρόφιλα όσο και λιπόφιλα μόρια, ενώ παράλληλα η δυνατότητα τροποποίησης της επιφάνειας συμβάλει στη χρήση τους για παρατεταμένη και ελεγχόμενη χορήγηση. Επιπλέον, με τον εγκλωβισμό (encapsulation) των μορίων περιορίζεται η έκθεση των ιστών σε τοξικές ουσίες και αυξάνεται η σταθερότητα των φαρμακομορίων (Mufamadi et al., 2011; Samad et al., 2007).

Όμως, η λιποσωμακή νανοτεχνολογία αντιμετωπίζει πολλά εμπόδια που αφορούν κυρίως διαδικασίες παραγωγής και σταθερότητας, αλλά και την πρόσληψη των νανοσυστημάτων από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα. Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στις

αλληλεπιδράσεις των λιποσωμάτων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, οι οποίες αποτελούν το πρωταρχικό στάδιο στη διαδικασία της οψωνινοποίησης. Οι πρωτεΐνες του πλάσματος έχουν καθοριστικό ρόλο στην αποδόμηση και κάθαρση των λιποσωμάτων από το ανοσοποιητικό σύστημα μέσω των μηχανισμών της οψωνινοποίησης και αποσταθεροποίησης των λιποσωματικών δομών. Η μελέτη και κατανόηση των προκλήσεων που πρέπει να αντιμετωπιστούν θα επιτρέψει την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών και τη βελτίωση του θεραπευτικού αποτελέσματος.

2. Πρωτεΐνες πλάσματος και Οψωνινοποίηση

2.1. Πλάσμα και Πρωτεΐνες

Το πλάσμα αποτελείται κυρίως από νερό αλλά περιέχει επίσης πρωτεΐνες, σάκχαρα, λίπη και ηλεκτρολύτες. Οι κύριες πρωτεΐνες του πλάσματος είναι η Αλβουμίνη (λευκωματίνη - Albumin), οι ανοσοσφαιρίνες (immunoglobulins) και η φιβρινονεκτίνη (fibrinonectin). Η αλβουμίνη ρυθμίζει την ωσμωτική πίεση του αίματος, οι σφαιρίνες συμμετέχουν στο ανοσοποιητικό σύστημα (ανοσοσφαιρίνες) και λειτουργούν ως μεταφορικές πρωτεΐνες (transport proteins) και η φιβρινονεκτίνη εμπλέκεται στη διαδικασία πήξης. Οι πρωτεΐνες του πλάσματος έχουν διάφορες λειτουργίες και συμμετέχουν σε διαδικασίες όπως, η μεταφορά μορίων και λιπιδίων, η χυμική ανοσία, η ρύθμιση της οξεοβασικής ισορροπίας και η διατήρηση της ωσμωτικής πίεσης.

Πίνακας 3: Κύριες πρωτεΐνες του πλάσματος και οι βασικές λειτουργίες τους.

Πρωτεΐνες πλάσματος	Λειτουργίες - Ρόλος
Αλβουμίνη (Albumin)	Διατήρηση ωσμωτικής πίεσης και μεταφορά μορίων και φαρμάκων
Ανοσοσφαιρίνες (Immunoglobulins-IgG,IgM)	Μηχανισμός άμυνας (χυμική ανοσία)
A2-μακροσφαιρίνη (a2-macroglobulin)	Μεταφορά ορμονών και ενζύμων, αναστολέας πρωτεάσης
Φιβρινονεκτίνη (Fibrinonectin a,b,c,)	Κυτταρική συγκόλληση
Λιποπρωτεΐνες (Lipoproteins-LDL,VLDL,HDLD)	Μεταφορά λιπιδίων
Σύστημα συμπληρώματος (Complement system-C3)	Μηχανισμός άμυνας (φυσική ανοσία)
A1-αντιθρυψίνη (a1-antitrypsin)	Αναστολέας πρωτεάσης
Τρανσφερίνη (Transferrin)	Μεταφορά ιόντων (σιδήρου)

Ορισμένες πρωτεΐνες του πλάσματος γνωστές ως οψωνίνες συμμετέχουν στο φαινόμενο της Οψωνινοποίησης η οποία επάγει τη Φαγοκυττάρωση των μικροοργανισμών και οποιοδήποτε << ξένων >>σωματιδίων. Οι οψωνίνες προσδένονται στην επιφάνεια των σωματιδίων και τροποποιούν τις ιδιότητες τους, με αποτέλεσμα τα οψωνινοποιημένα σωματίδια να

προσδένονται στους υποδοχείς των φαγοκυττάρων και να επέρχεται ο θάνατος τους. Συνεπώς, τα κύτταρα του συστήματος των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων δεν αναγνωρίζουν τα ίδια τα σωματίδια αλλά τις προσδεμένες πρωτεΐνες. Σε αυτή την κατηγορία πρωτεϊνών ανήκουν οι ανοσοσφαιρίνες, β-2 γλυκοπρωτεΐνη, φμπρινονεκτίνη, β-2 μακροσφαιρίνη και οι πρωτεΐνες του Συμπληρώματος. Μάλιστα τα συστατικά του Συμπληρώματος προκαλούν λύση της μεμβράνης των σωματιδίων εκτός από ενίσχυση της φαγοκυττάρωσης. Στον αντίποδα, μια άλλη κατηγορία πρωτεϊνών, οι δυσοψωίνες (dysopsonins), προσδένονται στα σωματίδια και παρατείνουν την παραμονή τους στην κυκλοφορία του αίματος μέσω της αναστολής της φαγοκυττάρωσης. Η αλβουμίνη, οι λιποπρωτεΐνες και η ανοσοσφαιρίνη A (IgA) ανήκουν στην κατηγορία αυτή και η προσρόφηση τους στην επιφάνεια των σωματιδίων μειώνει τη πρόληψη από τα φαγοκύτταρα. Βεβαίως, ακόμα και αυτές οι πρωτεΐνες μετά την πρόσδεση τους στα σωματίδια, μπορούν να μεταβάλουν τα χαρακτηριστικά της μεμβράνης οδηγώντας σε αλλαγές στη συμπεριφορά, τη λειτουργικότητα και τη σταθερότητά τους (Absolom, 1986).

2.2. Αλβουμίνη και άλλες πρωτεΐνες πλάσματος

Η αλβουμίνη ή λευκωματίνη αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη του πλάσματος και ανήκει στα λευκώματα του ορού του αίματος. Ως η πλέον άφθονη πρωτεΐνη στο κυκλοφορικό σύστημα, η αλβουμίνη συνεισφέρει στο 80% της διατήρησης της κολλοειδωσμοτικής πίεσης (colloidal-osmotic pressure - COP) ανάμεσα στο πλάσμα του αίματος των τριχοειδών αρτηριδίων και φλεβιδίων και στο εξωκυττάριο υγρό των ιστών. Λόγω του φορτίου και της υδατοδιαλυτότητας η αλβουμίνη έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της συγκέντρωσης υγρών σε διαφορετικούς ιστούς. Παρά το αρνητικό της φορτίο, μπορεί να δεσμεύει τόσο κατιονικά όσο και ανιονικά μόρια, με αποτέλεσμα να αδρανοποιεί ή να μεταφέρει ένα πλήθος ουσιών, συμπεριλαμβανομένων ιχνοστοιχείων, φαρμάκων, λιπαρών οξέων, ορμονών, μετάλλων και ενζύμων. Έτσι μπορεί να συνδέεται με ουσίες ασταθείς ή αδιάλυτες, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται ενώσεις διαλυτές και να επιτυγχάνεται η μεταφορά τους σε ιστούς. Παράλληλα, διατηρεί και ενισχύει τη φυσική άμυνα του οργανισμού έναντι μικροοργανισμών ή ξένων σωματιδίων. Επιπλέον, παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ιοντικής ισορροπίας. Οι μεταβολές στο επίπεδο της λευκωματίνης του ορού μπορεί να συμβάλουν σε αλλαγές στην οξεοβασική ισορροπία. Η αλβουμίνη συντίθεται στο ήπαρ (Peters and Anfinsen, 1950) και διαθέτει χρόνο ημιζωής 19 ημερών (Waldmann, 1977). Η αλβουμίνη ανθρώπινου ορού (Human Serum Albumin -HSA) είναι μια σφαιρική πρωτεΐνη που αποτελείται από 585 αμινοξέα και αντιπροσωπεύει περίπου το 60% της συνολικής

πρωτεΐνης στον ορό αίματος, ενώ βρίσκεται σε φυσιολογική συγκέντρωση 3-5 g/dL ορού (30 - 50 g/L). Έχει την εξαιρετική ικανότητα να δεσμεύει ένα ευρύ φάσμα ενδογενών και εξωγενών προσδεμάτων, επηρεάζοντας έτσι σε μεγάλο βαθμό την φαρμακοκινητική πολλών φαρμάκων. Η HSA αποτελείται από τρεις ομόλογες περιοχές, η καθεμιά από τις οποίες περιέχει δύο υπομονάδες (IA, IB, IIA, IIB, IIIA και IIIB). Σήμερα, έχει αποδειχτεί ότι υπάρχουν θέσεις δεσμεύσεως υψηλής συγγένειας για μικρές ετεροκυκλικές ή αρωματικές ενώσεις (που εντοπίζονται σε υποτομείς IIA και IIIA), θέσεις δέσμευσης λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας (που βρίσκονται σε υποτομείς IB και IIIB), και δύο θέσεις δέσμευσης μετάλλων, σχηματίζοντας έτσι συνολικά έξι δεσπόζουσες περιοχές σύνδεσης. Κάθε περιοχή έχει κυλινδρική δομή αποτελούμενη από έξι παράλληλες πολυπεπτιδικές αλυσίδες, με την εξωτερική επιφάνεια να είναι κυρίως πολική και εύκαμπτη. Αντίθετα, έχει μια εξαιρετικά οργανωμένη, κυρίως υδρόφοβη εσωτερική δομή, η οποία συνιστά πιθανή θέση δέσμευσης για άλλα υδρόφοβα μόρια (Fasano et al., 2005; Charbonneau et al., 2008, 2009; Wu et al., 2011; Dockal et al., 1999).

Ποσοτικές και ποιοτικές μεταβολές στην αλβουμίνη συμβαίνουν σε διάφορες νόσους και ειδικότερα σε νόσους του ήπατος. Ένας μεγάλος αριθμός παθολογικών καταστάσεων σχετίζονται με αλλαγές στο επίπεδο της λευκωματίνης στον ορό. Επομένως, η αλβουμίνη χρησιμοποιείται ως βιολογικός δείκτης διάφορων νόσων. Παθολογική αύξηση της λευκωματίνης (Υπεραλβουμιναιμία) σπάνια παρατηρείται και έχει μικρή διαγνωστική σημασία και συνήθως οφείλεται σε οξεία αφυδάτωση ή καταπληξία. Αντίθετα, ελάττωση της λευκωματίνης (Υποαλβουμιναιμία) παρατηρείται σε κάθε νόσο του ηπατικού κυττάρου και σχετίζεται με διάφορες νόσους, π.χ. φλεγμονή, νόσος Crohn, νεφρωσικό σύνδρομο, αποφολιδοτική δερματίτιδα. Επιπλέον, μεταβολές και διαφορές στα επίπεδα της αλβουμίνης επηρεάζονται και από παράγοντες όπως η ηλικία, η λήψη φαρμάκων, η διατροφή, η εγκυμοσύνη, ενώ έχουν παρατηρηθεί και γενετικές διαταραχές ή μεταλλάξεις της αλβουμίνης (bisalbuminemia/alloalbuminemia).

Η Αλβουμίνη παίζει καθοριστικό ρόλο στη φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική των λιποσωμακών φαρμάκων, αφού ως η πιο άφθονη πρωτεΐνη του πλάσματος αλληλεπιδρά και προσδέεται, κυρίως μέσω υδροφοβικών δυνάμεων, στα νανοσωματίδια αμέσως μετά τη συστηματική χορήγηση τους. Δεδομένου ότι η αλβουμίνη ανήκει στις δυσωφωσίνες, μπορεί να αναστείλει την πρόσδεση των οψωνινών και να προστατέψει τα λιποσώματα από τη φαγοκυττάρωση. Σύμφωνα όμως με το φαινόμενο << Vroman >> οι πρωτεΐνες με υψηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα δεσμεύουν αρχικά τα λιποσώματα και στη συνέχεια οι πρωτεΐνες

που έχουν μεγαλύτερη συγγένεια για την επιφάνεια των νανοσωματιδίων παίρνουν τη θέση τους (Vroman, 1962; Semple et al., 1998; Aggarwal et al., 2009). Έτσι λοιπόν η αλβουμίνη εκτοπίζεται από άλλες πρωτεΐνες που έχουν μεγαλύτερη συγγένεια για την επιφάνεια των νανοδομών και τελικά επέρχεται αποσταθεροποίηση και φαγοκυττάρωση των φορέων. Βεβαίως, πρέπει να τονιστεί ότι η σύνδεση της αλβουμίνης μπορεί να οδηγήσει σε φαινόμενα συσσωμάτωσης και σε ενίσχυση της φαγοκυττάρωσης, εξαιτίας της τροποποίησης των ιδιοτήτων μεμβράνης, εκθέτοντας υδρόφοβες περιοχές και ενισχύοντας την σύνδεση άλλων πρωτεϊνών.

Ωστόσο, λίγες λεπτομέρειες για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων και αλβουμίνης είναι γνωστές. Η γνώση από τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων με την αλβουμίνη αποτελούν υπόσχεση στην ανάπτυξη πολλών φαρμακευτικών και διαγνωστικών μορίων καθώς και στον σχεδιασμό νέων συστημάτων χορήγησης. Νέες τεχνολογίες έχουν επικεντρωθεί στο σχεδιασμό νανοσυστημάτων επικαλυμμένων με αλβουμίνη (albumin-coated liposomes), τα οποία χαρακτηρίζονται από αυξημένο χρόνο παραμονής στην κυκλοφορία και μειωμένη νεφρική κάθαρση (Mariam et al., 2015; Loureiro et al., 2016). Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει και η επίδραση νόσων, που σχετίζονται με διαταραχές στη σύνθεση ή το μεταβολισμό της αλβουμίνης, στο σχηματισμό της πρωτεϊνικής κορώνας στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων. Σήμερα είναι γνωστό ότι κάθε ασθενής εμφανίζει διαφορές στη πρωτεϊνική σύσταση του πλάσματος, οι οποίες επηρεάζονται από την ετερογένεια και τη σοβαρότητα της ασθένειας καθώς και από περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες. Οι διαφορές αυτές προκαλούν μεταβολές στη σύνθεση της πρωτεϊνικής κορώνας που θα σχηματισθεί τελικά στα νανοσωματίδια και η οποία θα καθορίσει τη βιολογική τους συμπεριφορά. Επομένως, η Φαρμακευτική Νανοτεχνολογία οδεύει προς την ανάπτυξη και το σχεδιασμό νανοσωματιδίων για εξατομικευμένη θεραπεία (Mohammad et al., 2014).

Εκτός από την αλβουμίνη έρευνες επικεντρώνονται στην επίδραση κι άλλων πρωτεϊνών που φαίνεται να παίζουν καθοριστικό ρόλο στην βιοκατανομή των νανοσωματιδίων ενισχύοντας ή αναστέλλοντας την πρόσληψη τους από τα κύτταρα του Δικτυοενδοθηλιακού συστήματος. Οι ανοσοσφαιρίνες (immunoglobulins) μέσω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων προσδένονται στα νανοσωματίδια και ενισχύουν τόσο την αναγνώριση και πρόσληψη από τα μακροφάγα κύτταρα όσο και την ηπατική κάθαρση. Η φιβρινονεκτίνη (fibrinonectin) και η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein) ενισχύουν την μεσολαβούμενη από υποδοχέα ενδοκυττάρωση, αλλά παράλληλα ενεργοποιούν και τα συστατικά του συμπληρώματος.

Γίνεται αντιληπτό ότι ο ρόλος των αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών - νανοσωματιδίων στη Νανοϊατρική αποτελεί έναν αναδύμενο ερευνητικό κλάδο ειδικότερα μετά την ανάπτυξη της ιδέας της πρωτεϊνικής κορώνας.

2.3. Μηχανισμοί άμυνας: Φαγοκυττάρωση και Οψωνινοποίηση

Η πρόσληψη και η απομάκρυνση των σωματιδίων μπορεί να συμβεί με διάφορους μηχανισμούς, όπως με φαγοκυττάρωση (π.χ. μέσω υποδοχέων συμπληρώματος, υποδοχέων Fc), μεσολαβούμενη με κλαθρίνη ή καβεολίνη ενδοκυττάρωση και πινοκυττάρωση. Κάθε μηχανισμός περιλαμβάνει ένα μοναδικό σύνολο υποδοχέων και δρα σε συγκεκριμένους τύπους σωματιδίων (Dobrovolskaia et al., 2007; Blander et al., 2006; Conner et al., 2003; Aderem et al., 1999). Η φαγοκυττάρωση αποτελεί κύριο μηχανισμό της φυσικής ανοσίας και αναφέρεται στη διαδικασία με την οποία ένα σωματίδιο αναγνωρίζεται ως << ξένο >> , προσλαμβάνεται και εγκλωβίζεται εντός του φαγοκυττάρου. Τα μακροφάγα, τα οποία αποτελούν υποκατηγορία των φαγοκυττάρων, ανήκουν στα λευκοκύτταρα και είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση, τον εγκλωβισμό και την φαγοκυττάρωση των σωματιδίων. Επιπλέον, συμμετέχουν και σε ανοσολογικές και φλεγμονώδεις αντιδράσεις (Mosser et al., 2008; Mantovani et al., 2013). Η φαγοκυττάρωση λαμβάνει χώρα σε όλους τους ιστούς που συναντώνται σωματίδια, συμπεριλαμβανομένων του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (RES), ήπατος και σπλήνα. Οι διαφορετικοί φαινότυποι των μακροφάγων που συμμετέχουν και οι αλλαγές στο μικρο-περιβάλλον καθιστούν δύσκολή την πρόβλεψη της βιολογικής συμπεριφοράς των νανοσωματιδίων και της πρόσληψή τους από τα φαγοκύτταρα. Η πρόσληψη από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος μπορεί να γίνει είτε άμεσα είτε μέσω αναγνώρισης ειδικών πρωτεϊνών που συνδέονται στην επιφάνεια των σωματιδίων. Η αναγνώριση μέσω πρωτεϊνικής προσρόφησης συνιστά αρχικό στάδιο για την πρόληψη και φαγοκυττάρωση των σωματιδίων. Οι προσροφημένες πρωτεΐνες σχηματίζουν ένα βιολογικό στρώμα το ονομαζόμενο πρωτεϊνικό << στέμμα >> ή πρωτεϊνική << κορώνα >>. Η σύνθεση και η διαμόρφωση των πρωτεϊνών καθώς και οι αλλαγές που υφίστανται μετά την πρόσδεσή τους στα σωματίδια καθορίζουν την απομάκρυνση από το μονοπυρηνικό φαγοκυτταρικό σύστημα (MPS) και τις ανοσολογικές αντιδράσεις, οι οποίες οδηγούν συχνά και σε παθολογικές καταστάσεις. Η χρονικά εξαρτώμενη διαδικασία της πρωτεϊνικής προσρόφησης, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και η φύση και η διαμόρφωση των πρωτεϊνών επηρεάζουν την κάθαρση και τη συμπεριφορά των νανοσωματιδίων. Οι ιδιότητες της μεμβράνης των σωματιδίων, παραδείγματος χάρη η κυρτότητα, η μορφολογία, η υδροφιλικότητα, η στερική σταθεροποίηση, είναι καθοριστικοί παράγοντες στην οψωνινοποίηση και τις διαμορφωτικές

αλλαγές που υφίστανται οι πρωτεΐνες (Gustafson et al., 2015). Η κατανόηση των βιολογικών φαινομένων και μηχανισμών πρόληψης συμβάλλουν στο σχεδιασμό βιοσυμβατών συστημάτων μεταφοράς και φαρμακομορίων με μηχανισμούς ενεργητικής ή παθητικής στόχευσης.

3. Αλληλεπιδράσεις Λιποσωμάτων – Πρωτεϊνών

Μετά τη συστηματική χορήγηση, τα λιποσώματα εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και εκτίθενται σε υψηλά επίπεδα πρωτεϊνών, οι οποίες αλληλεπιδρούν με την επιφάνεια των λιποσωμάτων και προσδένονται σε αυτά σχηματίζοντας μια πρωτεϊνική << κορώνα >>. Όπως φαίνεται σε αρκετές μελέτες, η προσρόφηση πρωτεϊνών μπορεί να προκαλέσει γρήγορη αποικοδόμηση των νανοσωματιδίων από το σύστημα μακροφάγων-φαγοκυττάρων, αλλαγές στη κατανομή και την αποτελεσματικότητα τους, καθώς και να παρουσιαστούν ανεπιθύμητες ενέργειες όπως ανοσολογικές αντιδράσεις και θρόμβωση (Aggarwal et al., 2009). Ο Dawson ήταν ο πρώτος που έθεσε την ιδέα της πρωτεϊνικής κορώνας, η οποία προκαλεί αλλαγές στα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων και καθορίζει τη βιολογική <<μοίρα>> τους. Έτσι σήμερα ο φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των σωματιδίων πριν και μετά την έκθεση τους σε βιολογικό μέσο αποτελεί υποχρεωτικό στάδιο σε ένα πειραματικό σχέδιο που περιλαμβάνει τη χρήση των νανοσωματιδίων.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η πρωτεϊνή κορώνα υποδιαιρείται σε δύο στρώματα, την << σκλήρη >> (hard) και τη << μαλακή >> (soft) κορώνα (Rahman et al., 2013, Lee et al. 2015). Η << σκλήρη >> κορώνα αποτελεί το πρώτο στρώμα πρωτεϊνών και συνδέεται ισχυρά και άμεσα με τα νανοσωματίδια. Αντίθετα, η << μαλακή >> κορώνα αποτελεί το δεύτερο στρώμα, συνδέεται έμμεσα με τα νανοσωματίδια, ενώ παρατηρείται μία συνεχής ανταλλαγή πρωτεϊνών. Ο σχηματισμός πρωτεϊνών corona είναι ένα δυναμικό φαινόμενο. Σύμφωνα με το κινητικό μοντέλο που ονομάζεται << το φαινόμενο Vroman >> υπάρχει μια ανταγωνιστική προσρόφηση πρωτεϊνών στα νανοσωματίδια. Οι προσροφημένες πρωτεΐνες αντικαθίστανται από πρωτεΐνες μεγαλύτερης συγγένειας. Σύμφωνα με το φαινόμενο αυτό παρατηρείται μία ποιοτική αλλαγή και όχι ποσοτική. Ωστόσο, έρευνες δείχνουν ότι το φαινόμενο Vroman δεν ισχύει πάντα και παρατηρούνται και ποιοτικές αλλαγές. Οι βασικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σχηματισμό της πρωτεϊνικής κορώνας, ανάμεσα τους η αλβουμίνη, η φμπρινονεκτίνη και οι απολιποπρωτεΐνες, συμμετέχουν και στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος και την αναγνώριση παθογόνων.

Επιπλέον, υπάρχουν αρκετές δυνάμεις υπεύθυνες για τη δέσμευση πρωτεϊνών, όπως αλληλεπιδράσεις van der Waals, δεσμοί υδρογόνου, ηλεκτροστατικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Όπως φαίνεται σε αρκετές μελέτες, υπάρχουν πολλοί τύποι αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-λιπιδίων, οι οποίοι μπορεί να περιλαμβάνουν προσρόφηση ή

διείσδυση της λιπιδικής διπλοστοιβάδας, που προκαλείται κυρίως από υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (Parahadjopoulos et al., 1975)

Τέλος, απο θερμοδυναμικής πλευράς η πρωτεϊνική κορώνα παίζει βασικό ρόλο στην κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και λιποσωμάτων. Η προσρόφηση πρωτεϊνών στην επιφάνεια του λιποσώματος προσδιορίζεται από την αύξηση της εντροπίας, με αποτέλεσμα τη μείωση της ελεύθερης ενέργειας Gibbs (Caracciolo, 2015). Αυτή η αύξηση της εντροπίας εξηγείται από την απελευθέρωση των δεσμευμένων μορίων νερού από την λιποσωματική επιφάνεια.

Συμπεραίνοντας, η μελέτη και κατανόηση των αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν στην διεπιφάνεια μεταξύ νανοσωματιδίων και βιολογικών μορίων συνιστούν αναγκαία κριτήρια στη πρόβλεψη της βιολογικής συμπεριφοράς των νανοσυστημάτων.

3.1. Ρόλος των φυσικοχημικών ιδιοτήτων στη πρωτεϊνική σύνδεση

Γνωρίζουμε ότι η σύνθεση της πρωτεϊνικής κορώνας επηρεάζεται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων, τον τύπο και τη συγκέντρωση του πλάσματος / ορού και άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως τη θερμοκρασία και τον χρόνο επώασης (Mahmoudi et al., 2013; Pozzi et al., 2015; Semple et al., 1996). Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων επηρεάζουν το είδος και την έκταση της πρωτεϊνικής σύνδεσης, και τελικά καθορίζουν την κατανομή, τη βιοδιαθεσιμότητα και την τοξικότητα των νανοσωματιδίων (Duan et al., 2013). Ο προσδιορισμός του ρόλου κάθε φυσικοχημικής παραμέτρου είναι απαραίτητος για το σχεδιασμό νανο-μεταφορέων μακράς κυκλοφορίας με μειωμένη τοξικότητα και ικανότητα στόχευσης.

Το μέγεθος των νανοσωματιδίων επηρεάζει το χρόνο ζωής, την κατανομή τους στους ιστούς και την κυτταρική πρόσληψη (Duan et al., 2013; Juliano et al., 1975). Το μέγεθος των λιποσωμάτων έχει σημαντική επίδραση επίσης στην προσρόφηση των πρωτεϊνών του πλάσματος και επηρεάζει τη δομή και τη σύνθεση της πρωτεϊνικής κορώνας. Το μέγεθος καθορίζει την κυρτότητα της επιφάνειας των νανοσωματιδίων, τα διεπιφανειακά φαινόμενα καθώς και την έκταση της πρωτεϊνικής σύνδεσης. Έχει αναφερθεί ότι περισσότερες πρωτεΐνες προσροφώνται σε μεγάλα νανοσωματίδια, σε σύγκριση με τα μικρά νανοσωματίδια (Wolfram et al., 2014a; Aggarwal et al., 2009). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η μείωση του μεγέθους οδηγεί στο σχηματισμό επιφανειών μεγαλύτερης κυρτότητας με αποτέλεσμα να μειώνονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και μεμβρανών. Αντίθετα,

λιπίδια με μακριές υδρογονανθρακικές αλυσίδες προάγουν το σχηματισμό ελαττωμένης κυρτότητας και αυξημένων σε μέγεθος στοιβάδων. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες που προσροφώνται σε μικρά νανοσωματίδια έχουν την τάση να υποβάλλονται σε λιγότερες διαμορφωτικές αλλαγές και να σχηματίζουν μικρότερου πάχους πρωτεϊνική κορώνα. Επομένως ακόμα και μικρές διαφορές, π.χ. της τάξεως 10 nm, στο μέγεθος και την κυρτότητα της επιφάνειας νανοσωματιδίων μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετικού βαθμού πρωτεϊνική σύνδεση και διαφορετική σύσταση πρωτεϊνών στην επιφάνεια (Gao et al., 2014). Είναι προφανές ότι οι συνθήκες και η μέθοδος παρασκευής καθώς και το είδος των λιπιδίων πρέπει να επιλέγονται ορθά εφόσον καθορίζουν τη διάταξη και το μέγεθος των σχηματιζόμενων νανοδομών και συνεπώς το πως αλληλεπιδρούν με τα βιολογικά μόρια.

Μια άλλη παράμετρος που επηρεάζει τη σύνθεση της πρωτεϊνικής κορώνας είναι το επιφανειακό φορτίο. Έχει παρατηρηθεί ότι η πρωτεϊνική σύνδεση και η κάθαρση των λιποσωμάτων αυξάνεται με την αύξηση του επιφανειακού φορτίου και της πυκνότητας τους φορτίου (Rahman et al. 2013, Aggarwal et al., 2009). Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι τα κατιοντικά λιποσώματα παρουσιάζουν εκτεταμένη πρωτεΐνη προσρόφηση *in vitro* και αυξημένη κάθαρση *in vivo*. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι οι περισσότερες πρωτεΐνες είναι αρνητικά φορτισμένες σε φυσιολογικό pH και έτσι τα κατιοντικά λιποσώματα αλληλεπιδρούν έντονα με τις πρωτεΐνες μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Επιπλέον, τα κατιοντικά λιποσώματα αλληλεπιδρούν έντονα με τις πρωτεΐνες του συμπληρώματος και προσδέονται με πρωτεΐνες που έχουν ισοηλεκτρικό σημείο $pI < 5.5$, π.χ. αλβουμίνη. Τελικά, τα οψωνινοποιημένα κατιοντικά λιποσώματα απομακρύνονται γρηγορότερα από τον οργανισμό, προκαλούν διαμορφωτικές αλλαγές στις πρωτεΐνες και κατ' επέκταση τοξικότητα *in vivo*. Αντίθετα, τα ανιονικά λιποσώματα εμφανίζουν βιολογική σταθερότητα σε *in vitro* πειράματα. Τα ανιονικά λιποσώματα αλληλεπιδρούν κυρίως με πρωτεΐνες με $p.I. > 5.5$ και η πρωτεϊνική σύνδεση δεν καθορίζεται από την πυκνότητα του φορτίου αλλά από την αλκυλική αλυσίδα και τη υδρόφιλη κεφαλή των λιπιδίων. Σήμερα, αρκετά πειράματα και κλινικές μελέτες επικεντρώνεται στη χρήση των ανιονικών λιπιδίων στη μεταφορά φαρμακομορίων και βιομορίων. Από την άλλη πλευρά, τα ουδέτερα λιποσώματα επιδεικνύουν καλύτερη βιολογική σταθερότητα σε σχέση με τα φορτισμένα και βρίσκουν ευρεία εφαρμογή (Gao et al., 2014; Semple et al., 1998).

Η υδροφιλικότητα και η υδροφοβικότητα επηρεάζουν το τύπο των πρωτεϊνών που προσδέονται στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων. Η πρωτεϊνική σύνδεση ενισχύεται με την αύξηση της υδροφοβικότητας και συνεπώς τα λιποσώματα τα οποία περιέχουν λιπίδια με

υδρόφοβες μακρίες αλκυλικές αλυσίδες απομακρύνονται ταχέως. Οι υδρόφοβες επιφάνειες αλληλεπιδρούν ισχυρά με την αλβουμίνη και τις ανοσοσφαιρίνες και μέσω της οψωνινοποίησης αποσταθεροποιούνται και φαγοκυτταρώνονται. Ένας κοινός τρόπος για την πρόληψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης είναι η επικάλυψη της επιφάνειας των νανοσωματιδίων με υδρόφιλα μόρια, π.χ. πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), τα οποία αυξάνουν την υδροφιλικότητα της μεμβράνης καθιστώντας τα λιποσώματα «αόρατα» στα μακροφάγα (Okhil et al., 2013).

Ένας τρόπος μείωσης της κάθαρσης είναι η ενσωμάτωση της χοληστερόλης στη λιποσωματική διπλοστοιβάδα (Salmaso et al., 2013). Η χοληστερόλη μειώνει την αλληλεπίδραση της επιφάνειας των νανοσωματιδίων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος ρυθμίζοντας τη συνοχή και τη ρευστότητα της λιποσωματικής μεμβράνης (Yeagle, 1985).

Επιπλέον, τα λιποσώματα ανήκουν στους υγρούς λυοτροπικούς κρυστάλλους, μεταβάλλοντας λοιπόν τη λιπιδική συγκέντρωση αλλάζουν μεσοφάσεις, δομές, λειτουργικότητα και ιδιότητες μεμβράνης. Επομένως, ο λυοτροπισμός επηρεάζει της φυσική και βιολογική σταθερότητα και τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνων - λιποσωμάτων. Έχει αναφερθεί ότι η υψηλότερη λιπιδική συγκέντρωση σχετίζεται με μεγαλύτερο χρόνο κυκλοφορίας στον οργανισμό και με αυξημένη φυσική σταθερότητα σε βάθος χρόνου (Semple et al., 1998). Θεωρείται ότι η αύξηση της δόσης επάγει τον κορεσμό του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος και των πρωτεϊνών που προσδέονται, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η κάθαρση των νανοσωματιδίων.

3.2. Επιπτώσεις πρωτεϊνικής σύνδεσης: Εμπόδια και Προοπτικές

Η πρωτεϊνική σύνδεση επιφέρει αλλαγές τόσο στα ίδια τα νανοσωματίδια όσο και στις προσροφημένες πρωτεΐνες. Οι διαμορφωτικές αλλαγές στις πρωτεΐνες μπορεί να είναι αναστρέψιμες ή μη, ενώ ο βαθμός και η έκταση των αλλαγών καθορίζουν τη σταθερότητα τους (Lundqvist et al., 2004; Karlsson et al., 2000). Πρωτεΐνες, όπως η αλβουμίνη, υφίστανται μεταβολές στη δευτεροταγή και τεταρτοταγή δομή τους, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η λειτουργικότητα τους, να δημιουργούν συσσωματώματα (Zhu et al., 2012; Kendall et al., 2011) και να προκαλούν καταρράκτες πολύπλοκων ανοσολογικών αντιδράσεων, οι οποίοι οδηγούν σε αποσταθεροποίηση και σε παθολογικές καταστάσεις (Shang et al., 2007). Οι αλλαγές στη διαμόρφωση των πρωτεϊνών εξαρτώνται από τα χαρακτηριστικά της μεμβράνης των λιπιδικών νανοσωματιδίων και ειδικότερα από το μέγεθος και την κυρτότητα της επιφάνειας. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η αύξηση του

μεγέθους και η μείωση της κυρτότητας οδηγεί σε εκτεταμένη πρωτεϊνική σύνδεση και επιφέρει περισσότερες διαμορφωτικές αλλαγές (Lundqvist et al., 2004, 2017; Karlsson et al., 2000; Walkey et al., 2012).

Μετά την προσρόφηση πρωτεϊνών στην λιποσωματική επιφάνεια, οι φυσικοχημικές ιδιότητες των λιποσωμάτων μεταβάλλονται σε μεγάλο βαθμό. Συγκεκριμένα η μορφολογία, το μέγεθος και το φορτίο επηρεάζονται σημαντικά εξαιτίας της πρόσδεσης των πρωτεϊνών. Γενικά, τα νανοσωματίδια συνήθως γίνονται μεγαλύτερα σε μέγεθος λόγω του πάχους της πρωτεϊνικής κορώνας (soft and hard corona) (Monopoli et al., 2001; Tenzer et al., 2013; Goy-Lopez et al., 2012). Εντούτοις, μπορεί να παρατηρηθεί μείωση μεγέθους για ορισμένα νανοσωματίδια επειδή η οσμωτική πίεση που δημιουργείται από τις πρωτεΐνες που είναι αδιαπέραστες στην λιποσωματική μεμβράνη, προκαλούν την απομάκρυνση του νερού από τον λιποσωματικό πυρήνα (Sabin et al., 2006; Hupfeld et al., 2010; Pencer et al., 2001). Μπορούν επίσης να εμφανισθούν μεταβολές στο επιφανειακό φορτίο. Μείωση του ζ δυναμικού παρατηρείται λόγω της προσρόφησης πρωτεϊνών πλάσματος, οι οποίες συνήθως είναι αρνητικά φορτισμένες και συνεπώς η επιφάνεια των νανοσωματιδίων γίνεται πιο ανιονική (Capriotti et al., 2012; Tenzer et al., 2013).

Οι μεταβολές στις ιδιότητες των νανοσωματιδίων και τη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών μπορούν να ενισχύσουν την κυτταρική πρόσληψη (Maiorano et al., 2010; Lesniak et al., 2012; Sim et al., 2011), να επιφέρουν αυξημένη τοξικότητα και μεταβολές στην κατανομή και την απελευθέρωση των φαρμακομορίων (Chiti et al., 2006; Deng et al., 2011; Benzhadí et al., 2014; Dobrovolskaia et al., 2009). Οι διαμορφωτικές αλλαγές των ενδογενών και μεμβρανικών πρωτεϊνών οδηγούν σε λανθασμένη αναδίπλωση (protein misfolding) προκαλώντας νόσους και ταυτόχρονα εκθέτουν επίτοπους που μπορούν να ενισχύσουν το φαινόμενο της φαγοκυττάρωσης και να επάγουν μονοπάτια φλεγμονής και ανοσολογικών αντιδράσεων (Saptarshi et al., 2013; Nel et al., 2009; Vauthier et al., 2011; Moghimi et al., 2013). Η πρόσδεση των οψωνινών, ειδικότερα των ανοσοσφαιρινών και του συμπληρώματος, έχει ως συνέπεια την αύξηση της κυτταρικής πρόσληψης μέσω των υποδοχέων των μακροφάγων, τον εγκλωβισμό των σωματιδίων και τη μείωση ή αύξηση της απελευθέρωσης των φαρμακομορίων εξαιτίας της αποσταθεροποίησης ή των οσμωτικών δυνάμεων (Dutta et al., 2006; Paula et al., 2013). Τέλος, ο σχηματισμός της πρωτεϊνικής κορώνας επηρεάζει την ικανότητα στόχευσης και τη λειτουργικότητα των νανοφορέων, αναστέλλοντας τις αλληλεπιδράσεις τους με συγκεκριμένους υποδοχείς και κύτταρα στόχους.

Ωστόσο, η πρωτεϊνική κορώνα έχει βρεθεί ότι παρέχει πολλά πλεονεκτήματα εκτός από τις αρνητικές επιπτώσεις τις στα βιολογικά συστήματα. Παράλληλα, νέες μελέτες σχετικά με την κυτταροτοξικότητα και τον ρόλο της πρωτεϊνικής προσρόφησης δείχνουν τα υποσχόμενα οφέλη της στο σχεδιασμό καινοτόμων συστημάτων χορήγησης φαρμάκων με ικανότητα στόχευσης σε καρκινικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, η πρωτεϊνική σύνδεση μπορεί να επιφέρει μείωση της κυτταροτοξικότητας και να αυξήσει την ασφάλεια των θετικά φορτισμένων νανοσωματιδίων, ενώ η πρόσδεση συγκεκριμένων πρωτεϊνών, οι οποίες λειτουργούν ως προσδέτες σε υποδοχείς κυττάρων στόχων (π.χ. καρκινικών), ενισχύουν την στοχευμένη δράση των φαρμάκων (Yin et al., 2015; Wells et al. 2012; Dominguez et al., 2013; Ge et al., 2011; Zanganeh et al., 2016). Η επιστημονική κοινότητα επανεξετάζει τα δεδομένα, χαρακτηριστικά και αποτελέσματα των αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-νανοσωματιδίων, ανοίγοντας δρόμους σε καινούργιες στρατηγικές με σκοπό την επίτευξη εξατομικευμένης θεραπείας (Corbo et al., 2017).

Σκοπός της εργασίας

Μόλις τα νανοσωματίδια εισέλθουν στη συστηματική κυκλοφορία αναγνωρίζονται και απομακρύνονται από τους αμυντικούς μηχανισμούς, όπως την οψωνινοποίηση (opsonisation), το μονοπύρηνο φαγοκυτταρικό σύστημα (MPS) και την ανοσογονικότητα (immunogenicity). Ειδικές πρωτεΐνες του πλάσματος τροποποιούν τις ιδιότητες της επιφάνειας των νανοσωματιδίων και ενισχύουν τη κάθαρση από τα κύτταρα του Δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (reticuloendothelial system - RES). Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και οι ιδιότητες της μεμβράνης των νανο-μεταφορέων διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική των φαρμακομορίων. Επομένως, είναι σημαντικό να κατανοήσουμε τις αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν μεταξύ των νανοσωματιδίων και των πρωτεϊνών προκειμένου να προβλεφθεί η βιολογική τους συμπεριφορά. Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο:

- τη μελέτη της φυσικής και βιολογικής σταθερότητας λιποσωμιακών συστημάτων διαφορετικής λιπιδικής σύστασης και συγκέντρωσης
- τη διερεύνηση του ρόλου των φυσικοχημικών ιδιοτήτων (μέγεθος, φορτίο, υδροφιλικότητα, ρευστότητα, λιπιδική σύσταση, συγκέντρωση) στη σταθερότητα και την αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες πλάσματος
- την ανίχνευση των μεταβολών των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών εξαιτίας της πρωτεϊνικής σύνδεσης

Η παρασκευή των λιποσωμιακών συστημάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μεθόδου ενυδάτωσης λεπτού λιπιδικού υμενίου, ενώ για τον φυσικοχημικό χαρακτηρισμό σε δυο διαφορετικά μέσα διασποράς χρησιμοποιήθηκε Δυναμική και Ηλεκτροφορητική Σκέδαση Φωτός.

Πειραματικό μέρος

4. Υλικά και Όργανα

➤ Υλικά

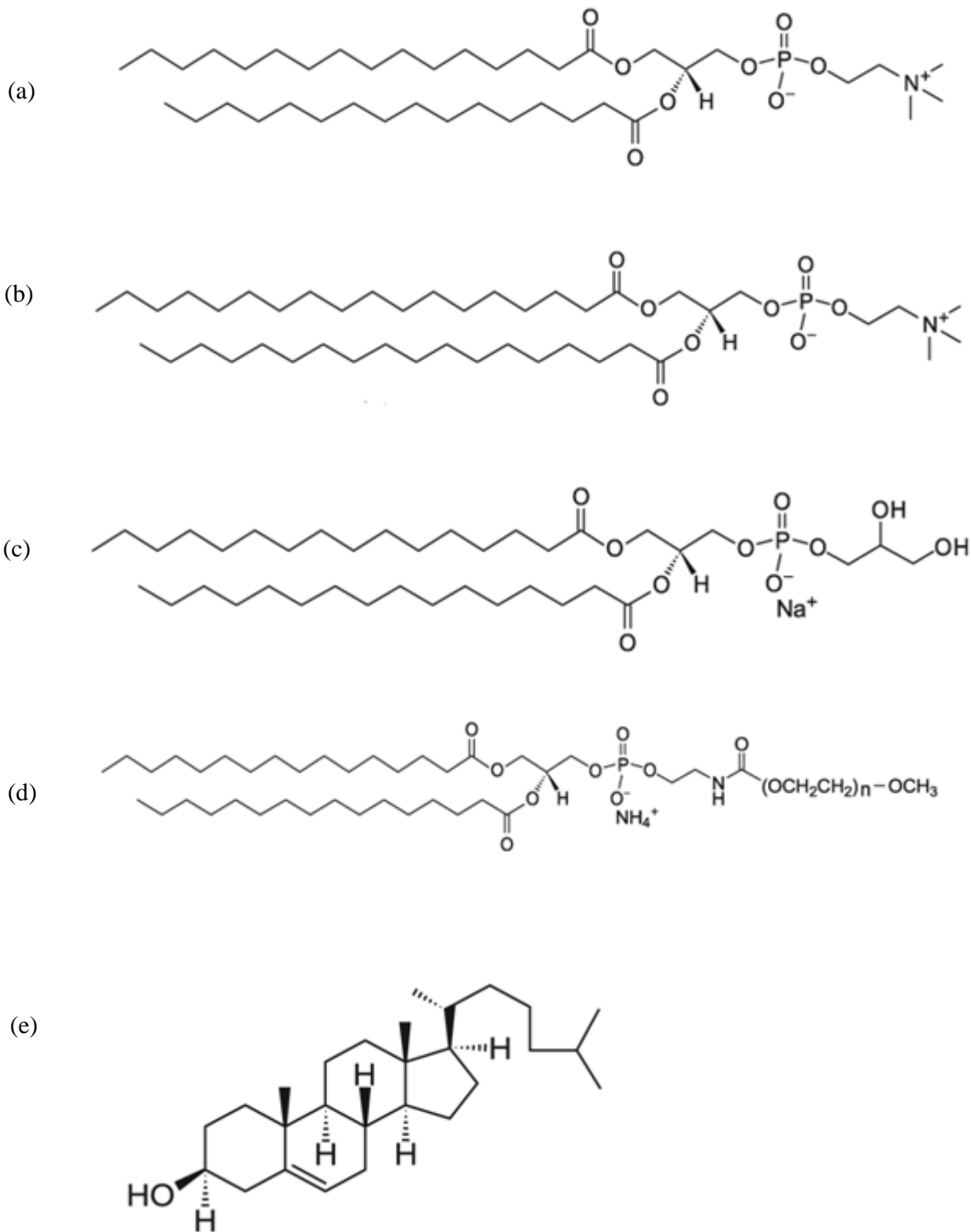
- 1,2-διπαλμιτοϋλ-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (DPPC) (Avanti Polar Lipids Inc., Albaster, AL, USA)
- L-α- φωσφατιδυλοχολίνη, υδρογονωμένη σόγια (HSPC), (Avanti Polar Lipids Inc., Albaster, AL, USA)
- 1,2-διπαλμιτοϋλ-sn-γλυκερο-3-φωσφο-(1-*rac*-γλυκερόλη) (άλας νατρίου) (DPPG), (Avanti Polar Lipids Inc., Albaster, AL, USA)
- 1,2-διπαλμιτοϋλ-sn-γλυκερο-3-φωσφοαιθανολαμίνη-N-[μεθοξυ(πολυαιθυλενογλυκόλη) -3000] (DPPE-PEG 3000) (Avanti Polar Lipids Inc., Albaster, AL, USA)
- Χοληστερόλη (Cholesterol - CH). (Avanti Polar Lipids Inc., Albaster, AL, USA)
- Χλωροφόρμιο (CHCl₃) (Sigma–Aldrich Chemical Co.)
- H₂O HPLC-καθαρότητας
- Fetal Bovine Serum (FBS)

➤ Όργανα

- Ζυγός (College B154, Mettler-Toledo, Switzerland)
- Περιστρεφόμενη Συσκευή Εξατμίσεως Υπό Κενό (Rotavapor R-114, Buchi, Switzerland)
- Συσκευή Υπερηχησεως με Αισθητήρα (Probe Sonicator) (UP 200S, dr. Hielsher GmbH, Berlin, Germany)
- Φασματοφωτόμετρο Συσχετίσεως Φωτονίων (PCS) (Zetasizer 3000 HAS, Malvern UK)

Η ενυδάτωση λεπτού λιπιδικού υμενίου ήταν η μέθοδος παρασκευής των λιποσωμάτων. Το Χλωροφόρμιο χρησιμοποιήθηκε ως οργανικός διαλύτης χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Η ενυδάτωση των λιποσωμάτων και οι μελέτες σταθερότητας σε υδατικό μέσο πραγματοποιήθηκαν με νερό καθαρότητας HPLC, ενώ για τις μελέτες σε βιολογικό μέσο τα λιποσωμάτα αραιώθηκαν σε ορό πλάσματος βοοειδούς (Fetal Bovine Serum-FBS). Όλα τα

υλικά και αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Στην Εικόνα 1 και στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται οι χημικές δομές και ιδιότητες των λιπιδίων, αντίστοιχα.



Εικόνα 1: Χημικές δομές των λιπιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη: (a)DPPC, (b)HSPC,(c)DPPG, (d) DPPE-PEG 3000, (e) Cholesterol

Πίνακας 4: Ιδιότητες των λιπιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Lipids	Chemical name (source)	MW	Acyl chains, (number of C: unsaturated bonds)	Phase transition temperature, T_m, °C	Physical phase at 37°C
DPPC	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (Avanti Polar Lipids)	734.039	PC (16:0/16:0)	41°C	SO
HSPC	Hydrogenated soybean phosphatidylcholine (Avanti Polar Lipids)	783.774	88,6 % 18:0 11,4 % 16:0	52.5°C	SO
DPPG	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt) (Avanti Polar Lipids)	744.952	PG (16:0/16:0)	41°C	SO
DPPE-PEG 3000	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-3000] (ammonium salt) (Avanti Polar Lipids)	3718.547	16:0	-	LD
cholesterol	(Avanti Polar Lipids)	386.654	-	-	SO

Η εξάτμιση του οργανικού διαλύτη και η ενυδάτωση λεπτού λιπιδικού υμενίου πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση περιστρεφόμενης συσκευής εξάτμισης υπό κενό (Rotavapor R-114, Buchi, Switzerland) (Εικόνα 2). Για την μείωση του μεγέθους και την παρασκευή μικρών μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων χρησιμοποιήθηκε η συσκευή υπερηχησεως με αισθητήρα (UP 200S, dr. Hiesher GmbH, Berlin, Germany). Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των λιποσωματικών συστημάτων προσδιορίστηκαν με τη χρήση οργάνου φασματοσκοπίας συσχέτισης φωτονίων (Zetasizer 3000 HAS, MalvernUK).



Εικόνα 2: Περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπο κενό (Rotavapor R-114, Buchi, Switzerland)

Όργανο Φασματοσκοπίας συσχέτισης φωτονίων

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 συσχέτισμού 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 σκεδαζομένου από τα σωματίδια φωτός να σχηματίζει ένα μοντέλο κινούμενου στίγματος. Αυτή η κινητικότητα ανιχνεύεται ως αλλαγή της εντάσεως 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 διακυμάνσεως του σκεδαζομένου φωτός είναι πιο βραδύς. Η φασματοσκοπία συσχέτισμού 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 εντάσεως του σκεδαζομένου 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 ως 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 επιφανείας καλύψεως του σωματιδίου που δημιουργείται μεταξύ του φορτίου του σωματιδίου και του μέσου, και όχι το φορτίο επιφανείας του σωματιδίου.

Εφαρμογή του δείγματος

Το δείγμα αραιώνεται με H₂O HPLC-καθαρότητας, διηθημένο (από φίλτρο Millipore με διάμετρο πόρων 200nm) και:

1. Μεταφέρεται σε κυψελίδα μίας χρήσεως 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.
2. Ενίεται με σταθερό ρυθμό στην ειδική υποδοχή του οργάνου, προς αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων που θα εμπόδιζαν τη σωστή μέτρηση του ζδυναμικού, που οδηγεί το λιποσωματικό εναιώρημα στην εσωτερική κυψελίδα του οργάνου και μετράται τα ζ-δυναμικό

5. Μέθοδοι

5.1. Μέθοδος Παρασκευής λιποσωμάτων

Η μέθοδος παρασκευής λιποσωμάτων που ακολουθήθηκε ήταν η ενυδάτωση λεπτού λιπιδικού υμενίου. Τα λιποσωματικά συστήματα λιπιδικής σύστασης : (i) DPPC, (ii) HSPC, (iii) DPPC:CH (9:1 μοριακή αναλογία), (iv) HSPC:CH (9:1 μοριακή αναλογία), (v) DPPC:DPPG:CH (9:1:1 μοριακή αναλογία), (vi) HSPC:DPPG:CH (9:1:1 μοριακή αναλογία), (vii) DPPC:DPPE-PEG (9:0.1 μοριακή αναλογία), (viii) HSPC:DPPE-PEG (9:0.1 μοριακή αναλογία), (ix) DPPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 μοριακή αναλογία) and (x) HSPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 μοριακή αναλογία) παρασκευάστηκαν σε δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις, 10 mg/ml και 30 mg/ml. Εν συντομία, κατάλληλες ποσότητες κάθε λιπιδίου διαλύθηκαν σε χλωροφόρμιο και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε σφαιρική φιάλη συνδεδεμένη σε περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης (Rotavapor R-114, Buchi, Switzerland). Εφαρμόστηκε κενό και σχηματίστηκε ένα στρώμα λεπτού λιπιδικού υμενίου (film) στο τοίχωμα της φιάλης με εξάτμιση του οργανικού διαλύτη στους 40 ° C για 30 λεπτά. Η λιπιδική μεμβράνη ενυδατώθηκε με νερό HPLC καθαρότητας με αργή περιστροφή της στο υδατόλουτρο για 1 ώρα διατηρούμενο σε θερμοκρασία πάνω από τη θερμοκρασία μετάβασης φάσης των λιπιδίων T_m (41 ° C για DPPC, 55 ° C για HSPC και 41 ° C για DPPG). Πραγματοποιήθηκε ανάδευση με τη χρήση vortex προκειμένου να αποκολληθεί το φιλμ από τα τοιχώματα της φιάλης. Τα προκύπτοντα πολυστοιβαδικά λιποσώματα (MLVs) υποβλήθηκαν σε δύο κύκλους υπερήχησης των 5 λεπτών με διακοπή 5 λεπτών στο ενδιάμεσο χρησιμοποιώντας έναν αισθητήρα υπερηχησεως (Probe Sonicator) (πλάτος ταλαντώσεως 70%, διάρκεια παλμού 0.5 sec). Τα μικρά μονοστοιβαδικά λιποσώματα (SUVs), τα οποία παρήχθησαν, αφέθηκαν σε ηρεμία (annealing) για 30 λεπτά.

5.2. Φυσικοχημικό Χαρακτηρισμός λιποσωματικών συστημάτων

Το μέγεθος (υδροδυναμική διάμετρος D_h), η πολυδιασπορά (δείκτης πολυδιασποράς P.DI.) και το ζ-δυναμικό (z-pot) των λιποσωμάτων μετρώνται άμεσα μετά την παρασκευή των λιποσωμάτων ως ακολούθως :

- Τα λιποσώματα, αμέσως μετά την παρασκευή τους ($t = 0$ days) αραιώνονται σε H₂O-HPLC καθαρότητας. Για τις μελέτες σταθερότητας, 100μl από το λιποσωματικό εναιώρημα αραιώνεται με 2900μl H₂O HPLC-καθαρότητας σε κυψελίδα όγκου 3ml και η υδροδυναμική διάμετρος (D_h), ο δείκτης πολυδιασποράς (P.DI.) και το ζ-

δυναμικό (z-pot) των λιποσωμάτων μετρώνται με φασματοσκοπία συσχέτισεως φωτονίων (PCS). Τα δείγματα σκεδάζονται (633nm) υπό γωνία 90° και οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία 25°C. Τα αποτελέσματα αναλύονται με τη μέθοδο CONTIN του πακέτου λογισμικού MALVERN.

- Τα λιποσώματα, αμέσως μετά την παρασκευή τους (t = 0 days) επωάζονται σε ορό πλάσματος βοοειδούς (Fetal bovine serum – FBS). Συγκεκριμένα, 100 μl από το λιποσωματικό εναιώρημα αραιώνονται με 2900 μl FBS σε κυψελίδα όγκου 3ml και η υδροδυναμική διάμετρος (D_h), ο δείκτης πολυδιασποράς (P.DI.) και το ζ-δυναμικό (z-pot) των λιποσωμάτων μετρώνται με φασματοσκοπία συσχέτισεως φωτονίων (PCS). Τα δείγματα σκεδάζονται (633nm) υπό γωνία 90° και οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία 25°C. Τα αποτελέσματα αναλύονται με τη μέθοδο CONTIN του πακέτου λογισμικού MALVERN

5.3. Δυναμική και Ηλεκτροφορητική Σκέδαση φωτός

Η Δυναμική σκέδαση φωτός ή μέθοδος συσχέτισης φωτονίων αποτελεί μέθοδο επιλογής για το προσδιορισμό των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών, όπως τη μέτρηση της υδροδυναμικής διαμέτρου (D_h), του μοριακού βάρους (MW), της γεωμετρικής ακτίνας (R_g – radius of gyration) των σωματιδίων, καθώς και για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-νανοσωματιδίων. Στο όργανο φασματοσκοπίας συσχέτισης φωτονίων, όταν η μονοχρωματική ακτίνα συναντά τα σωματίδια, το προσπίπτον φως σκεδάζεται προς όλες τις κατευθύνσεις και η ένταση του καταγράφεται από έναν ανιχνευτή. Το μονοχρωματικό προσπίπτον φως θα υποβληθεί σε ένα φαινόμενο που ονομάζεται Doppler καθώς τα σωματίδια βρίσκονται σε συνεχή κίνηση. Με τη δυναμική σκέδαση φωτός μετράμε τη συνάρτηση συσχέτισης G2 (τ) (ή τη συνάρτηση συσχέτισης δεύτερης τάξης) που περιγράφει την κίνηση των μορίων που βρίσκονται υπό μελέτη και εκφράζεται συναρτήσεως των εντάσεων στους χρόνους t και (t + τ). Η συνάρτηση αυτή μετά από κανονικοποίηση παίρνει τη μορφή:

$$g_2(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(\tau) \rangle^2} \quad (1)$$

Σε ένα πείραμα που αναλύεται με σκέδαση φωτός δεν είναι δυνατόν να γνωρίζουμε με ακρίβεια πώς κάθε σωματίδιο κινείται στο διάλυμα. Ωστόσο, η κίνηση του ενός σωματιδίου με του αλλού, συσχετίζεται με τη βοήθεια μιας συνάρτησης συσχέτισης ηλεκτρικού πεδίου

$G_1(\tau)$, γνωστής επίσης και ως συνάρτηση συσχέτισης πρώτης τάξης, η οποία μετά απο κανονικοποίηση ορίζεται απο την εξίσωση (2):

$$g_1(\tau) = \frac{\langle E(t)E(t+\tau) \rangle}{\langle E(t) \rangle^2} \quad (2)$$

Οι δύο συναρτήσεις σχετίζονται μεταξύ τους σύμφωνα με τη σχέση (3) του Siegert:

$$g_2(\tau) = 1 + |g_1(\tau)|^2 \quad (3)$$

Για διαλύματα μονοδιάσπαρτων σωματιδίων, ο συντελεστής συσχέτισης $g_1(\tau)$ εξαρτάται από την σταθερά Γ , για μόρια που υφίστανται κίνηση Brownian και δίνεται από τη σχέση (4):

$$g_1(\tau) = e^{-\Gamma\tau} \quad (4)$$

Επομένως η εξίσωση (3) μπορεί να γραφτεί σύμφωνα με την παρακάτω σχέση (5) :

$$g_2(\tau) = 1 + e^{-2\Gamma\tau} \quad (5)$$

Η παράμετρος Γ σχετίζεται άμεσα με το συντελεστή διάχυσης (D), όπως εκφράζεται στην ακόλουθη εξίσωση (6):

$$\Gamma = -Dq^2 \quad (6)$$

Όπου q είναι το διάνυσμα σκέδασης και ορίζεται απο τη σχέση (7):

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin(\theta/2) \quad (7)$$

όπου λ είναι το μήκος κύματος του φωτός και θ η γωνία σκέδασης.

Ο συντελεστής διάχυσης D χρησιμοποιείται στον υπολογισμό της υδροδυναμικής ακτίνας (R_h), η οποία μπορεί να οριστεί ως η ακτίνα μιας υποθετικής σφαίρας που διαχέεται με τον ίδιο ρυθμό όπως το σωματίδιο υπό έρευνα, μπορεί να ληφθεί χρησιμοποιώντας την εξίσωση (8) Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h} \quad (8)$$

Όπου το k είναι η σταθερά Boltzmann ($1.380 \cdot 10^{-23} \text{ kg.m}^2.\text{s}^{-2}.\text{K}^{-1}$), το T είναι απόλυτη θερμοκρασία και η είναι το ιξώδες του μέσου.

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 επιφανείας του σωματιδίου.

Το ζ-δυναμικό υπολογίζεται από την ηλεκτροφορητική κινητικότητα, μ_E , χρησιμοποιώντας τη διόρθωση του Henry στην εξίσωση (9) Smoluchowski:

$$\zeta = \frac{3\mu_E \eta}{2\varepsilon_0 \varepsilon_r} \frac{1}{f(ka)} \quad (9)$$

Όπου ε_0 η διαπερατότητα του κενού, ε_r η σχετική διαπερατότητα, a η ακτίνα του σωματιδίου, κ το μήκος Debye, και η το ιξώδες του ύδατος. Η συνάρτηση $f(ka)$ εξαρτάται από το σχήμα των σωματιδίων.

5.4. Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις με Δυναμική (DLS) και Ηλεκτροφορητική (ELS) Σκέδαση Φωτός παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση (S.D.) τριών ανεξάρτητων μετρήσεων. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη χρησιμοποιώντας t-test κατά Student και πολλαπλές συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση μονόδρομης ανάλυση διασποράς ANOVA (one-way ANOVA). Οι τιμές $P < 0,05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το "EXCELL". Η γραμμική συσχέτιση διερευνήθηκε με τη βοήθεια διαγράμματος διασποράς (scatter analysis), χρησιμοποιώντας το "EXCELL" και η γραμμική εξίσωση υπολογίστηκε για κάθε σύστημα χωριστά.

6. Αποτελέσματα και Συζήτηση

6.1. Μελέτες Σταθερότητας σε υδατικό μέσο

Η φυσικοχημική σταθερότητα όλων των λιποσωμακίων συστημάτων εκτιμήθηκε με μέτρηση της υδροδυναμικής διαμέτρου (D_h) και του δείκτη πολυδιασποράς (PD.I.) σε βάθος χρόνου έπειτα από αραιώση σε νερό βαθμού HPLC καθαρότητας. Οι μετρήσεις των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών πραγματοποιήθηκαν με Δυναμική Σκέδαση Φωτός.

Επιπλέον, μετρήθηκε και το ζ-δυναμικό την πρώτη μέρα της παρασκευής των λιποσωμακίων εναιωρημάτων μετά από αραιώση σε υδατικό μέσο. Οι μετρήσεις του ζ-δυναμικού πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της Ηλεκτροφορητικής Σκέδασης φωτός. Το ζ-δυναμικό αποτελεί ένδειξη του επιφανειακού φορτίου των λιποσωμάτων και διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο στη σταθερότητα ενός κolloειδούς συστήματος διασποράς. Η φυσικοχημική σταθερότητα εκφράζει τη θερμοδυναμική σταθερότητα ενός συστήματος και καθορίζει εάν είναι κατάλληλο για χρήση, ενώ αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την χρήση των λιποσωμάτων ως συστήματα χορήγησης φαρμακομορίων.

6.1.1. Μετρήσεις Σταθερότητας για τα λιποσώματα που περιείχαν DPPC λιπίδια

6.1.1.1. Μετρήσεις Σταθερότητας για τα DPPC λιποσώματα

Στους Πίνακες 5 και 6, παρουσιάζονται τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των λιποσωμάτων σύστασης DPPC, διαφορετικών συγκεντρώσεων σε υδατικό μέσο σε βάθος χρόνου 29 ημερών.

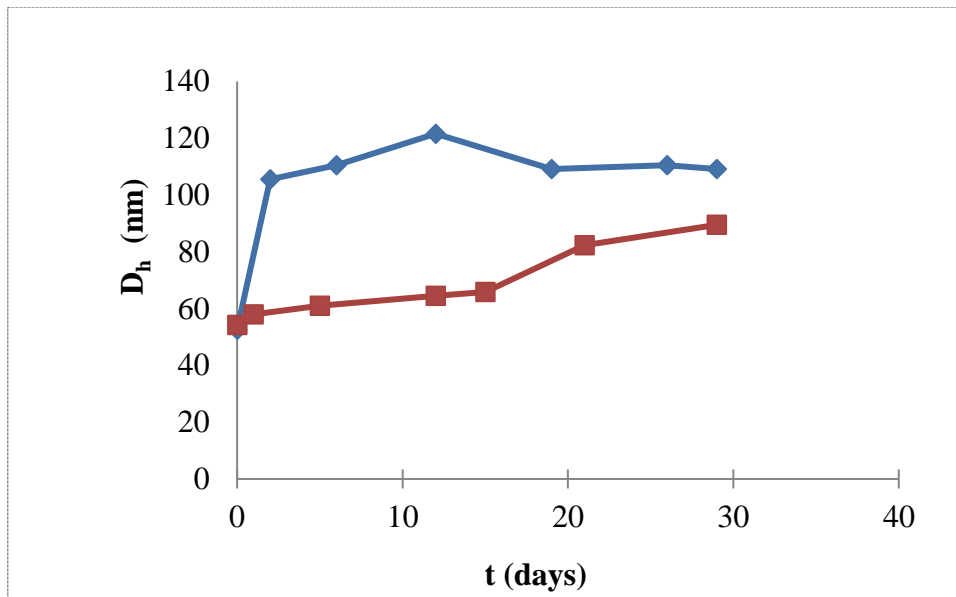
Πίνακας 5: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των DPPC λιποσωμάτων συγκέντρωσης 10 mg/ml σε υδατικό μέσο σε βάθος χρόνου 29 ημερών.

T (days)	D_h (nm)	PD.I.
0	52.6 ± 0.9	0.246 ± 0.008
2	105.5 ± 1.1	0.448 ± 0.005
6	110.5 ± 1.3	0.418 ± 0.013
12	121.6 ± 0.6	0.402 ± 0.016
19	109.1 ± 0.4	0.411 ± 0.008
26	110.5 ± 1.9	0.409 ± 0.007
29	109.1 ± 1.1	0.399 ± 0.009

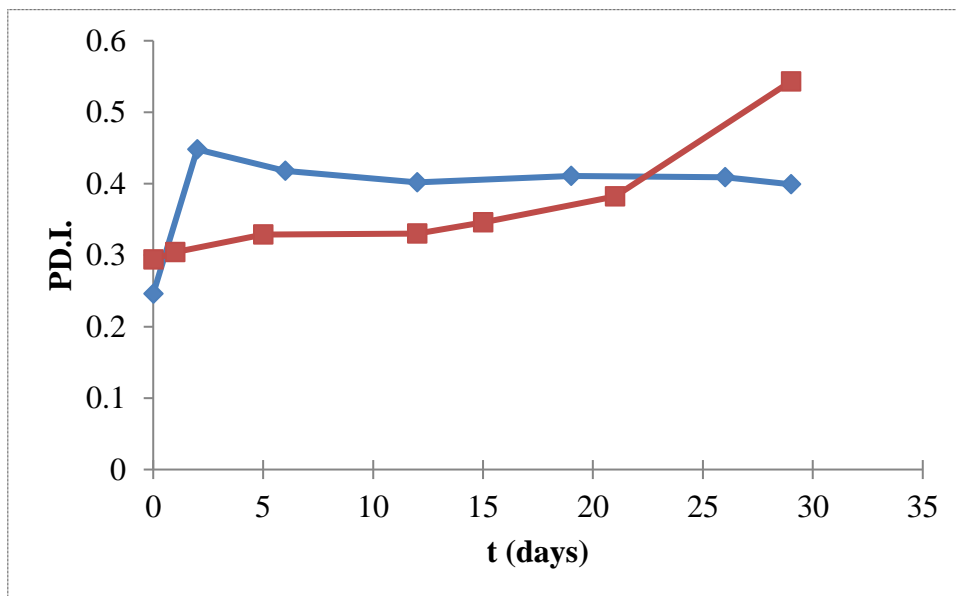
Πίνακας 6: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των DPPC λιποσωμάτων συγκέντρωσης 30 mg/ml σε υδατικό μέσο σε βάθος χρόνου 29 ημερών.

T (days)	D _h (nm)	PD.I.
0	54.2 ± 0.1	0.294 ± 0.006
1	58.0 ± 0.6	0.304 ± 0.002
5	61.0 ± 0.2	0.329 ± 0.009
12	64.5 ± 1.4	0.330 ± 0.004
15	65.9 ± 0.2	0.346 ± 0.009
21	82.3 ± 1.4	0.382 ± 0.011
29	89.5 ± 0.7	0.543 ± 0.013

Η υδροδυναμική διάμετρος (D_h) των DPPC λιποσωμάτων συγκέντρωσης 10 mg/ml αυξήθηκε από τα 52.6 nm την ημέρα της αραίωσης του στα 109.1 nm, ενώ η D_h των DPPC λιποσωμάτων συγκέντρωσης 30mg/ml αυξήθηκε από τα 54.2 nm στα 89.5 nm. Τα αποτελέσματα φανερώνουν ότι οι διασπορές των λιποσωμάτων δεν είναι θερμοδυναμικά σταθερές καθώς το μέγεθος των λιποσωμάτων αυξάνεται με το χρόνο (Διάγραμμα 1). Συνεπώς, παρατηρήθηκε συσσωμάτωση (aggregation) και στις δύο συγκεντρώσεις, καθώς η αύξηση τόσο του μεγέθους όσο και του δείκτη πολυδιασποράς είναι αποτέλεσμα της «γήρανσης» (ageing) του συστήματος. Το ζ-δυναμικό για τα DPPC λιποσώματα 10 mg/ml βρέθηκε 33.2 ± 1.5 mV και για τα DPPC λιποσώματα 30 mg/ml 17.1 ± 2.4 mV. Γενικά, τα κολλοειδή συστήματα με υψηλές απόλυτες τιμές, συγκεκριμένα με τιμές μικρότερες από -35 mV ή μεγαλύτερες από 35mV, τείνουν να είναι σταθερά (Legrand et al., 1999), εξαιτίας της αποτροπής της συσσωμάτωσης και της σύντηξης των μεμβρανών (Heurtault et al., 2003). Ως εκ τούτου, σύμφωνα με την κλασική θεωρία των Derjaguin, Landau, Vervey, and Overbeek (DLVO), οι τιμές του ζ-δυναμικού των DPPC λιποσωμάτων δεν επαρκούν για την αποτροπή της συσσωμάτωσης εξαιτίας των van der Waals αλληλεπιδράσεων (Derjaguin et al., 1941; Verwey et al., 1948). Στα παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται οι μεταβολές των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών σε συνάρτηση με το χρόνο για τα λιποσωματικά συστήματα στις δυο συγκεντρώσεις. Παρατηρούμε ότι τόσο η υδροδυναμική διάμετρος, όσο και ο δείκτης πολυδιασποράς μεταβάλλονται διαφορετικά για τα συστήματα διαφορετικής λιπιδικής συγκέντρωσης. Επομένως, η μεταβολή της συγκέντρωσης επηρεάζει τον λυοτροπισμό και τη δομή των λιποσωμακών εναιωρημάτων και άρα τις αλληλεπιδράσεις (δυνάμεις ενυδάτωσης, van der Waals ελκτικές δυνάμεις) και τη σταθερότητα τους.



Διάγραμμα 1: Μεταβολή της υδροδυναμικής διαμέτρου (D_h) σε συνάρτηση με τον χρόνο για τα DPPC λιποσώματα συγκέντρωσης 10 mg/ml (- μπλέ γραμμή) και 30 mg/ml (- κόκκινη γραμμή) σε υδατικό μέσο.



Διάγραμμα 2: Μεταβολή του δείκτη πολυδιασποράς (PD.I.) σε συνάρτηση με τον χρόνο για τα DPPC λιποσώματα συγκέντρωσης 10 mg/ml (- μπλέ γραμμή) και 30 mg/ml (- κόκκινη γραμμή) σε υδατικό μέσο.

6.1.1.2. Μετρήσεις Σταθερότητας για τα DPPC:CH (9:1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα

Από την άλλη πλευρά, τα λιποσώματα DPPC:CH (9: 1 μοριακή αναλογία) βρέθηκε ότι διατηρούν τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά και στις δύο συγκεντρώσεις, όπως φαίνεται στους Πίνακες 7 και 8. Το μέγεθος και οι τιμές PD.I. παρέμειναν σχεδόν σταθερά σε βάθος χρόνου.

Πίνακας 7 : Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των DPPC:CH (9: 1 μοριακή αναλογία) λιποσωμάτων συγκέντρωσης 10 mg/ml σε υδατικό μέσο σε βάθος χρόνου 27 ημερών.

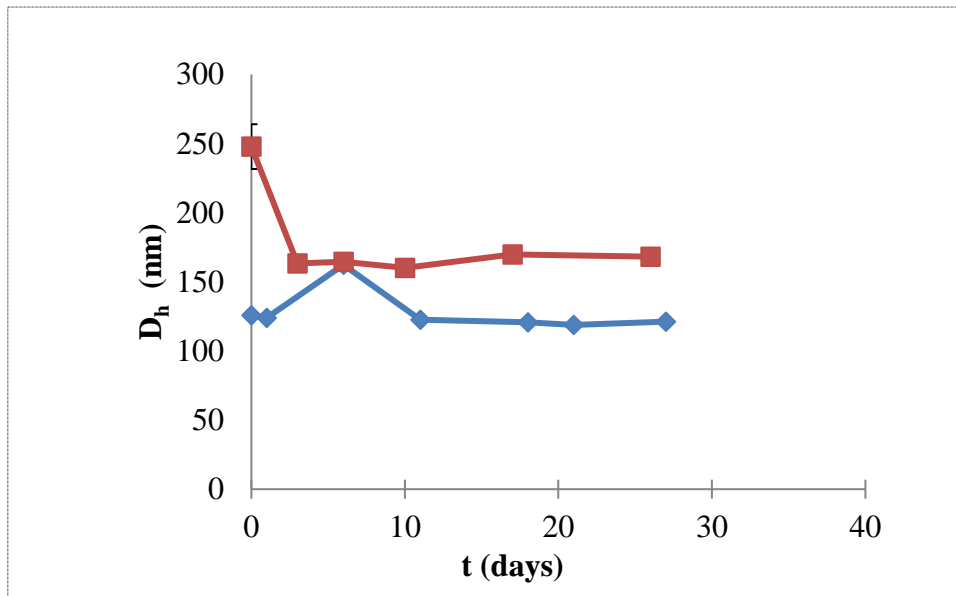
T (days)	D _h (nm)	PD.I.
0	125.7 ± 0.8	0.408 ± 0.004
1	124.0 ± 1.2	0.396 ± 0.012
6	162.3 ± 0.7	0.831 ± 0.046
11	122.5 ± 0.4	0.380 ± 0.002
18	120.8 ± 2.1	0.355 ± 0.011
21	118.8 ± 0.5	0.349 ± 0.006
27	121.1 ± 0.5	0.370 ± 0.017

Πίνακας 8 : Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των DPPC:CH (9: 1 molar ratio) λιποσωμάτων συγκέντρωσης 10 mg/ml σε υδατικό μέσο σε βάθος χρόνου 26 ημερών.

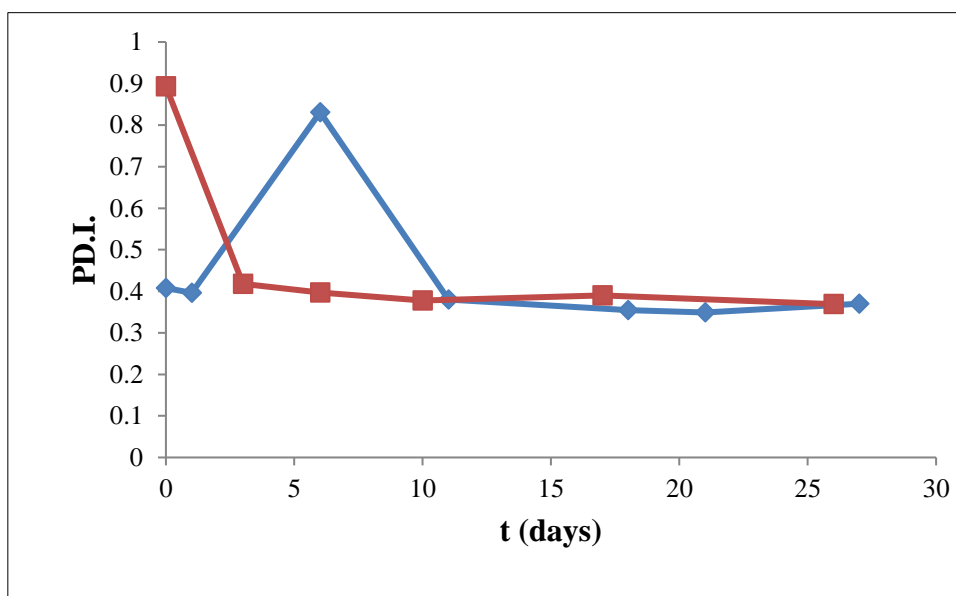
T (days)	D _h (nm)	PD.I.
0	247.8 ± 16.2	0.893 ± 0.095
3	163.4 ± 1.1	0.418 ± 0.010
6	164.4 ± 1.7	0.397 ± 0.015
10	160.1 ± 0.9	0.378 ± 0.034
17	169.7 ± 1.8	0.390 ± 0.020
26	168.3 ± 1.2	0.369 ± 0.027

Αυτά τα αποτελέσματα επαληθεύουν ότι η χοληστερόλη αυξάνει τη σταθερότητα των λιποσωμάτων. Σε σύγκριση με τα λιποσώματα DPPC, διαπιστώσαμε ότι η παρουσία χοληστερόλης προκαλεί σταθεροποίηση των λιπιδικών διπλοστοιβάδων, αυξάνοντας την συνοχή των λιπιδίων και προάγοντας τη φάση υγρής διευθέτησης (liquid-ordered phase). Η χοληστερόλη ως << βοηθητικό >> λιπίδιο ρυθμίζει την ρευστότητα της λιπιδικής μεμβράνης και τροποποιεί τις δυνάμεις ενυδάτωσης και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των λιποσωμάτων, παρέχοντας σταθεροποίηση (Yeagle, 1985; Tierney et al., 2005; Róg et al., 2009). Επιπλέον,

εξαιτίας της δομής και του αμφίφιλου χαρακτήρα της χοληστερόλης, ευνοείται η ενσωμάτωσή της στις DPPC διπλοστιβάδες. Οι τιμές των ζ-δυναμικών ήταν 28.8 ± 0.9 mV και 19.3 ± 1.0 mV για τα DPPC: CH (9:1 μοριακή αναλογία) λιπосώματα 10 mg/ml και 30 mg/ml, αντίστοιχα. Η παρουσία της χοληστερόλης δεν επηρέασε σημαντικά το φορτίο των λιπосωμάτων. Τέλος, στο διάγραμμα παρατηρούμε ότι οι μεταβολές της D_h είναι ανεξάρτητες από την συγκέντρωση παρά την ενσωμάτωση της χοληστερόλης.



Διάγραμμα 3: Μεταβολή της υδροδυναμικής διαμέτρου (D_h) σε συνάρτηση με τον χρόνο για τα DPPC: CH (μοριακή αναλογία) λιπосώματα συγκέντρωσης 10 mg/ml (- μπλέ γραμμή) και 30 mg/ml (- κόκκινη γραμμή) σε υδατικό μέσο.



Διάγραμμα 4: Μεταβολή του δείκτη πολυδιασποράς (PD.I.) σε συνάρτηση με τον χρόνο για τα DPPC:CH (9:1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα συγκέντρωσης 10 mg/ml (- μπλέ γραμμή) και 30 mg/ml (- κόκκινη γραμμή) σε υδατικό μέσο.

6.1.1.3. Μετρήσεις Σταθερότητας για τα DPPC:CH:DPPG (9:1:1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα

Τα αποτελέσματα των φυσικοχημικών μετρήσεων των DPPC:CH:DPPG (9: 1: 1 μοριακή αναλογία) λιποσωμάτων παρουσιάζονται στους Πίνακες 9 και 10. Τα λιποσώματα ήταν μικρού μεγέθους μονοστοιβαδικά και οι τιμές PD.I. αποδεικνύουν μονοδιάσπαρτα λιποσωματικά συστήματα.

Πίνακας 9: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των DPPC:CH:DPPG (9:1:1 μοριακή αναλογία) λιποσωμάτων συγκέντρωσης 10 mg/ml σε υδατικό μέσο σε βάθος χρόνου 28 ημερών.

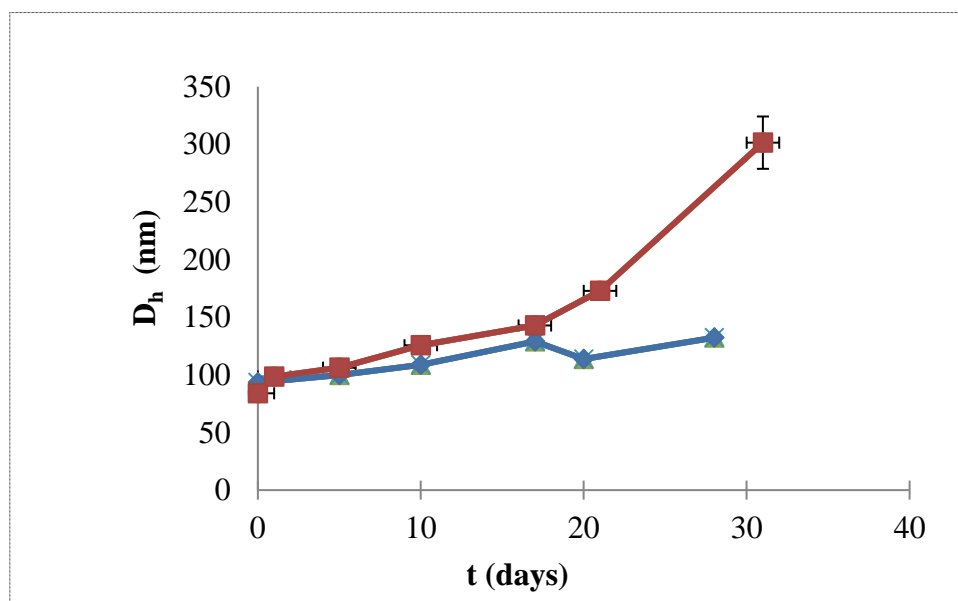
T (days)	D _h (nm)	PD.I.
0	93.3 ± 0.5	0.224 ± 0.010
5	99.9 ± 0.2	0.235 ± 0.017
10	108.6 ± 1.5	0.321 ± 0.008
17	128.9 ± 2.6	0.474 ± 0.008
20	113.6 ± 0.8	0.323 ± 0.004
28	132.2 ± 0.4	0.458 ± 0.004

Πίνακας 10: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των DPPC:CH:DPPG (9:1:1 μοριακή αναλογία) λιποσωμάτων συγκέντρωσης 30 mg/ml σε υδατικό μέσο σε βάθος χρόνου 31 ημερών.

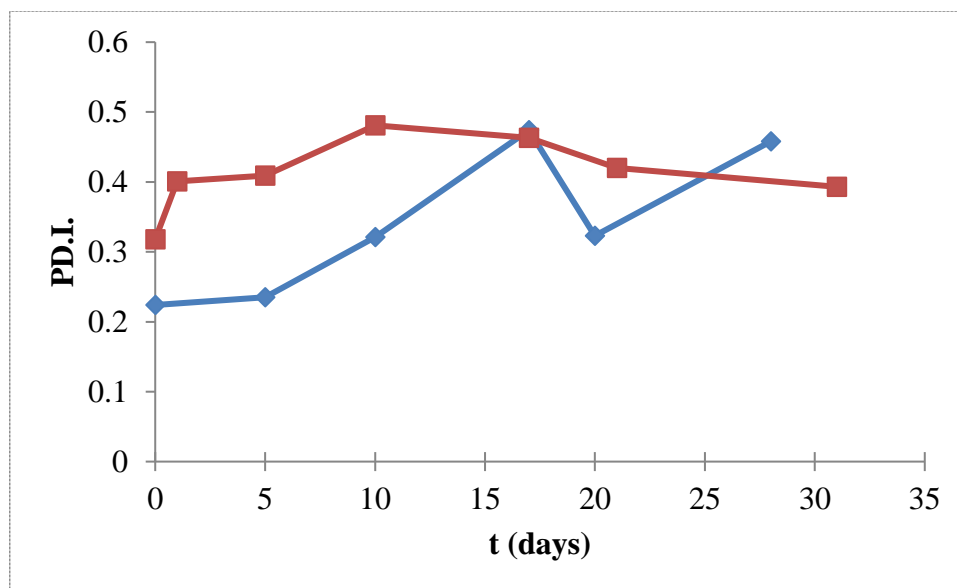
T (days)	D _h (nm)	PD.I.
0	84.0 ± 0.6	0.318 ± 0.007
1	98.5 ± 0.8	0.401 ± 0.003
5	106.2 ± 1.2	0.409 ± 0.005
10	125.7 ± 1.4	0.481 ± 0.004
17	142.8 ± 2.5	0.463 ± 0.010
21	172.8 ± 1.5	0.420 ± 0.003
31	301.4 ± 22.7	0.393 ± 0.085

Γενικά, τα αρνητικά φορτισμένα λιποσώματα τείνουν να έχουν μεγάλη φυσική σταθερότητα, επειδή οι δυνάμεις ηλεκτροστατικής άπωσης υπερβαίνουν των Van der waals δυνάμεων (Mahmoud M. et al., 2011). Σε σύγκριση με τα DPPC:CH (9:1 μοριακή αναλογία)

λιποσώματα, η ενσωμάτωση των DPPG λιπιδίων είχε ως αποτέλεσμα την ελάττωση του ζ-δυναμικού, με τιμές $0,3 \pm 1.2\text{mV}$ και $-8.1 \pm 0.6 \text{ mV}$ για τα DPPC:CH:DPPG (9: 1: 1 μοριακή αναλογία) 10 mg/ml και 30mg/ml, αντίστοιχα. Ο συνδυασμός χοληστερόλης και ανιονικών λιπιδίων φαίνεται να αποτελεί κλειδί στη σταθερότητα των συγκεκριμένων λιποσωμάτων. Στη παρούσα μελέτη, τα DPPC: DPPG: CH (9: 1: 1) λιποσώματα συγκέντρωσης 10 mg/ml επέδειξαν φυσική σταθερότητα στη χρονική περίοδο την οποία μελετήθηκαν. Αντίθετα, παρατηρήθηκε συσσωμάτωση στην υψηλότερη συγκέντρωση, δεδομένου ότι η D_h αυξήθηκε κατά 217.4 nm (Διάγραμμα 3). Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η συγκέντρωση και ο λυοτροπισμός επιδρά στην οργάνωση των DPPC: DPPG: CH (9: 1: 1) λιποσωμάτων και κατ' επέκταση στην σταθεροποίηση και τις ιδιότητες της λιπιδικής διπλοστοιβάδας. Πιθανόν, με την αύξηση της λιπιδικής συγκέντρωσης, η λιπιδική μεμβράνη παρουσιάζει υδροφοβική συμπεριφορά, ενισχύοντας έτσι τις ελκτικές δυνάμεις και τους μηχανισμούς συσσωμάτωσης (Yokouchi et al., 2001).



Διάγραμμα 5: Μεταβολή της υδροδυναμικής διαμέτρου (D_h) σε συνάρτηση με τον χρόνο των DPPC:CH:DPPG (9:1:1 μοριακή αναλογία) λιποσωμάτων συγκέντρωσης 10 mg/ml (- μπλέ γραμμή) και 30 mg/ml (- κόκκινη γραμμή) σε υδατικό μέσο.



Διάγραμμα 6: Μεταβολή του δείκτη πολυδιασποράς (PD.I.) σε συνάρτηση με τον χρόνο για τα DPPC:CH:DPPG (9:1:1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα συγκέντρωσης 10 mg/ml (- μπλέ γραμμή) και 30 mg/ml (- κόκκινη γραμμή) σε υδατικό μέσο.

6.1.1.4. Μετρήσεις Σταθερότητας για τα DPPC:DPPE-PEG (9:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα

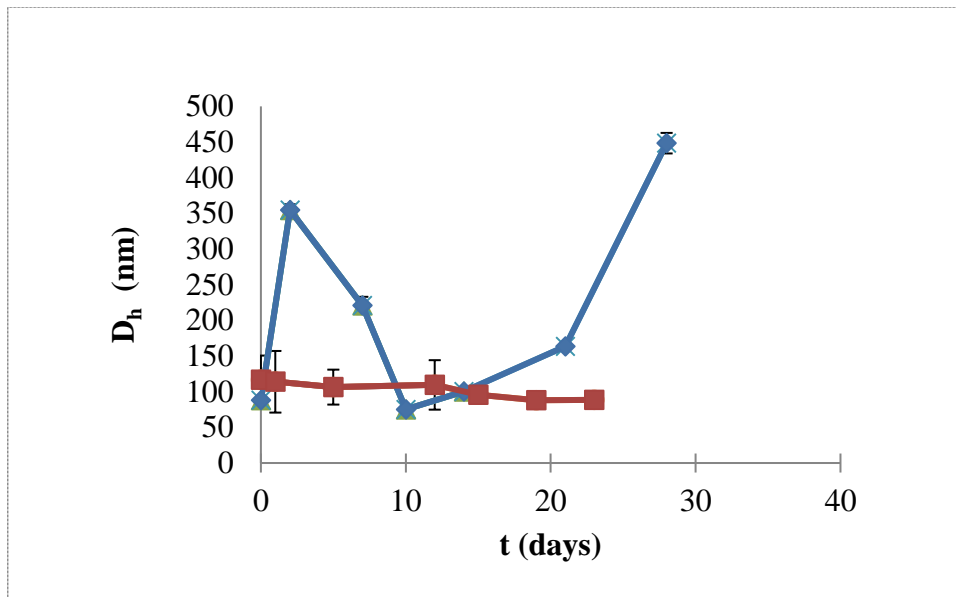
Τα DPPC: DPPE-PEG (9: 0.1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα βρέθηκαν να διατηρούν τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά στην υψηλότερη συγκέντρωση σε βάθος χρόνου, σε αντίθεση με τα λιποσωμιακά συστήματα χαμηλότερης συγκέντρωσης τα οποία δεν ήταν θερμοδυναμικά σταθερά. Οι αλυσίδες της πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) αυξάνουν την υδροφιλικότητα της επιφάνειας των διπλοστοιβάδων και προσφέρουν ενθαλπική σταθερότητα. Κατά την στενή προσέγγιση των αλυσίδων της PEG, τα ενυδατωμένα μόρια του ύδατος στα προσροφημένα μόρια αποδεσμεύονται, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ενθαλπία οδηγώντας σε άπωση. Στη βιβλιογραφία, αναφέρεται ότι η σταθερότητα των νανοσυστημάτων αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης και του μήκους της αλυσίδας της PEG (Santos et al., 2007; Semple et al., 1998). Συνεπώς, η αύξηση της συγκέντρωσης για τα λιποσώματα DPPC:DPPE-PEG (9:0.1 μοριακή αναλογία) βελτιώνει το λυοτροπισμό και τη σταθερότητα του συστήματος, αποτρέποντας την εντροπική αποσταθεροποίηση, η οποία οδηγεί στην κατάρρευση του συστήματος.

Πίνακας 11 : Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά για τα DPPC:DPPE-PEG (9:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα συγκέντρωσης 10 mg/ml σε υδατικό μέσο σε βάθος χρόνου 28 ημερών.

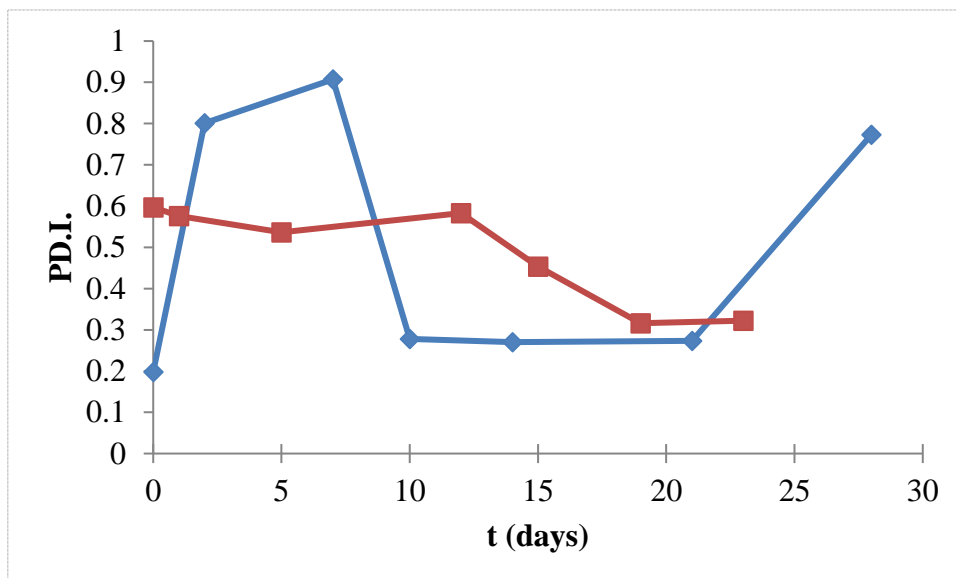
T (days)	D _h (nm)	PD.I.
0	88.3 ± 0.2	0.198 ± 0.009
2	354.6 ± 8.1	0.801 ± 0.016
7	220.9 ± 12.1	0.907 ± 0.160
10	75.2 ± 0.4	0.278 ± 0.017
14	100.0 ± 1.0	0.270 ± 0.005
21	163.3 ± 3.8	0,273 ± 0,003
28	448.4 ± 14.4	0.773 ± 0.214

Πίνακας 12 : Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά για τα DPPC:DPPE-PEG (9:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα συγκέντρωσης 30 mg/ml σε υδατικό μέσο σε βάθος χρόνου 23 ημερών.

T (days)	D _h (nm)	PD.I.
0	116.6 ± 3.4	0.597 ± 0.257
1	113.9 ± 43.2	0.576 ± 0.368
5	106.4 ± 24.5	0.536 ± 0.238
12	109.5 ± 34.7	0,583 ± 0,362
15	95.9 ± 10.9	0.453 ± 0.159
19	88.0 ± 3.0	0.316 ± 0.003
23	88.7 ± 2.0	0.322 ± 0.002



Διάγραμμα 7: Μεταβολή της υδροδυναμικής διαμέτρου (D_h) σε συνάρτηση με τον χρόνο των DPPC: DPPE-PEG (9:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσωμάτων συγκέντρωσης 10 mg/ml (- μπλέ γραμμή) και 30 mg/ml (- κόκκινη γραμμή) σε υδατικό μέσο.



Διάγραμμα 8: Μεταβολή του δείκτη πολυδιασποράς (PDI) σε συνάρτηση με τον χρόνο των DPPC: DPPE-PEG (9:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσωμάτων συγκέντρωσης 10 mg/ml (- μπλέ γραμμή) και 30 mg/ml (- κόκκινη γραμμή) σε υδατικό μέσο.

6.1.1.5. Μετρήσεις Σταθερότητας για τα DPPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα

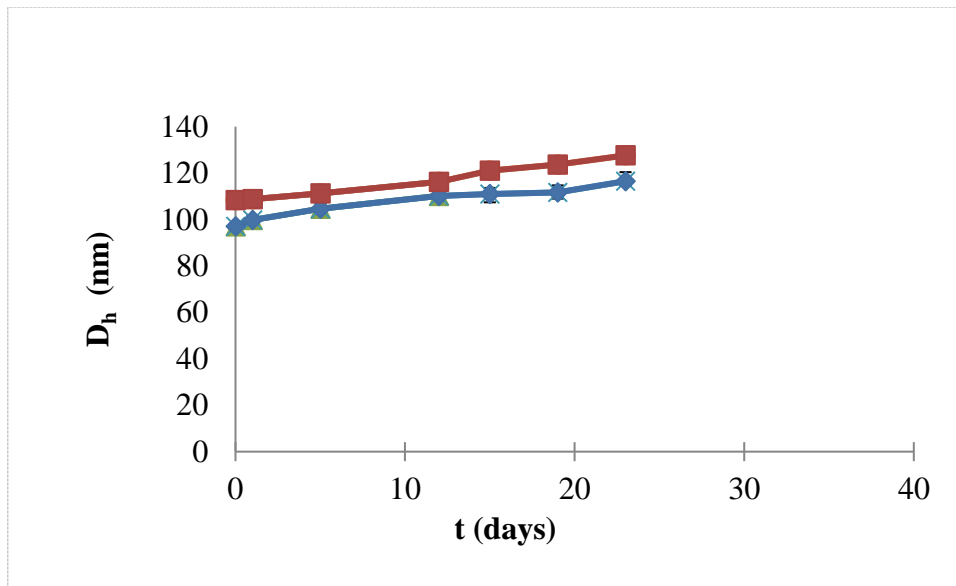
Τέλος, παρατηρήθηκε φυσικοχημική σταθερότητα για τα DPPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα και στις δύο συγκεντρώσεις. Η παρουσία των αλυσίδων της πολυαιθυλενόγλυκολης και η ενσωμάτωση της χοληστερόλης δρούν συνεργιστικά, με επακόλουθο την ενίσχυση της σταθερότητας των μεμβρανών (Frank K. et al 1995). Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των DPPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσωμάτων είναι ιδανικά και θα μπορούσαν να μελετηθούν περισσότερο ως ενδεχόμενα συστήματα χορήγησης μακρά κυκλοφορίας.

Πίνακας 13 : Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των DPPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσωμάτων συγκέντρωσης 10 mg/ml σε υδατικό μέσο σε βάθος χρόνου 23 ημερών.

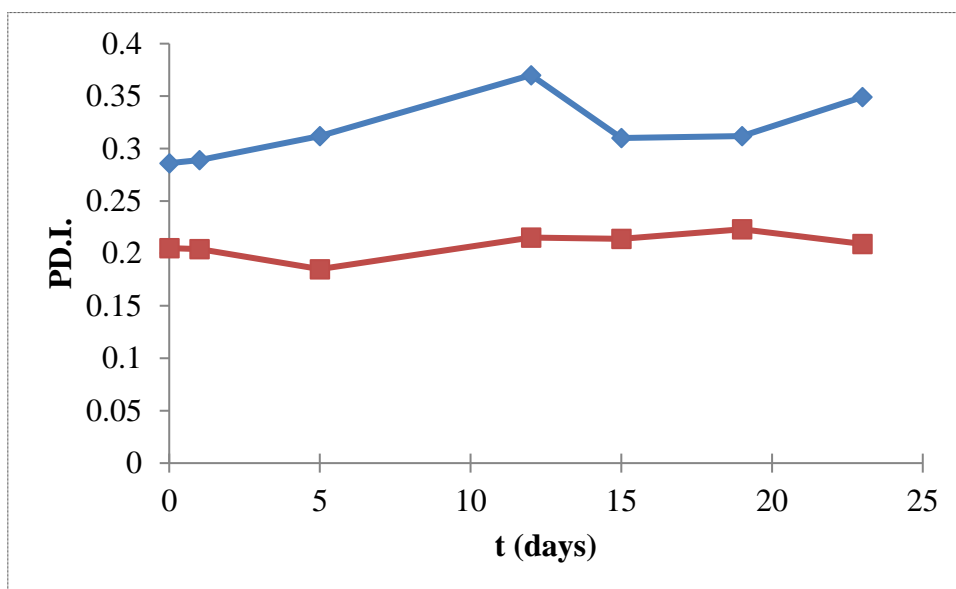
T (days)	D _h (nm)	PD.I.
0	97.0 ± 0.8	0.286 ± 0.010
1	99.8 ± 1.6	0.289 ± 0.020
5	104.6 ± 1.0	0.312 ± 0.012
12	110.2 ± 1.3	0.370 ± 0.029
15	111.0 ± 2.6	0.310 ± 0.010
19	111.6 ± 3.1	0.312 ± 0.006
23	116.5 ± 3.9	0.349 ± 0.069

Πίνακας 14 : Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των DPPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσωμάτων συγκέντρωσης 30 mg/ml σε υδατικό μέσο σε βάθος χρόνου 23 ημερών.

T (days)	D _h (nm)	PD.I.
0	108.4 ± 1.3	0.205 ± 0.008
1	108.7 ± 0.9	0.204 ± 0.006
5	111.3 ± 1.2	0.185 ± 0.018
12	116.2 ± 1.4	0.215 ± 0.009
15	121.1 ± 3.6	0.214 ± 0.004
19	123.7 ± 2.6	0.223 ± 0.004
23	127.6 ± 1.9	0.209 ± 0.005



Διάγραμμα 9: Μεταβολή της υδροδυναμικής διαμέτρου (D_h) σε συνάρτηση με τον χρόνο των DPPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσωμάτων συγκέντρωσης 10 mg/ml (- μπλέ γραμμή) και 30 mg/ml (- κόκκινη γραμμή) σε υδατικό μέσο.



Διάγραμμα 10: Μεταβολή του δείκτη πολυδιασποράς (PD.I.) σε συνάρτηση με τον χρόνο των DPPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσωμάτων συγκέντρωσης 10 mg/ml (- μπλέ γραμμή) και 30 mg/ml (- κόκκινη γραμμή) σε υδατικό μέσο.

6.1.2. Μετρήσεις Σταθερότητας για τα λιποσώματα που περιείχαν HSPC λιπίδια

6.1.2.1. Μετρήσεις Σταθερότητας για τα HSPC λιποσώματα

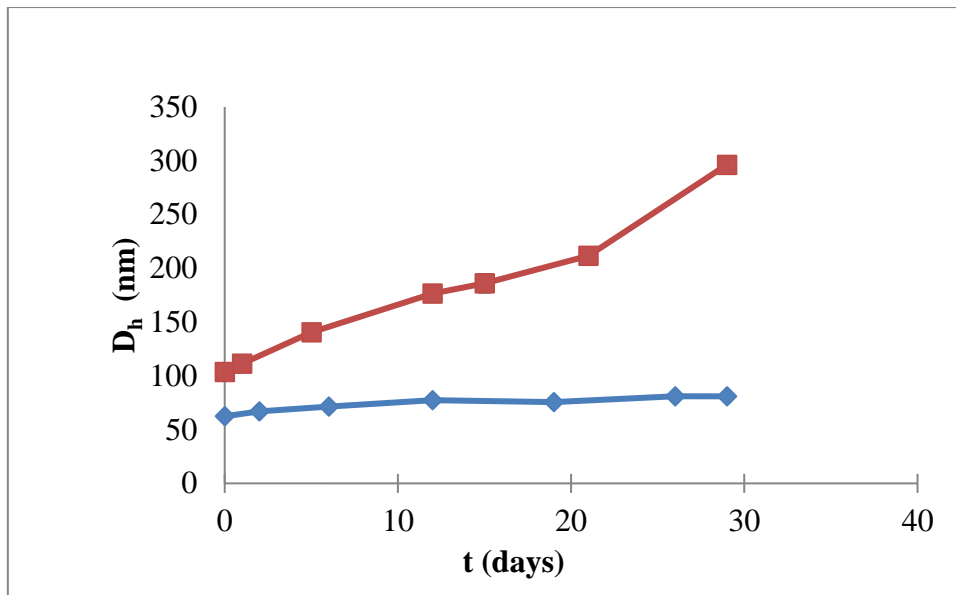
Η φυσικοχημική σταθερότητα των λιποσωμάτων HSPC διαφορετικών συγκεντρώσεων μελετήθηκε και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους Πίνακες 15 και 16. Το μέγεθος των HSPC συστημάτων στη χαμηλή συγκέντρωση αυξήθηκε κατά 18.4 nm, ενώ παρατηρήθηκε συσσωμάτωση των HSPC λιποσωμάτων στην υψηλότερη συγκέντρωση, καθώς η D_h αυξήθηκε κατά 192.7 nm μετά από 28 ημέρες. Συνεπώς, τα λιποσώματα HSPC συγκέντρωσης 30mg/ml δεν είναι θερμοδυναμικά σταθερά. Είναι εμφανές λοιπόν ότι η συγκέντρωση επηρεάζει τον προσανατολισμό και την οργάνωση των λιπιδικών στιβάδων, γεγονός που δείχνει ότι ο λυοτροπισμός διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στη σταθερότητα των HSPC λιπιδίων.

Πίνακας 15 : Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των HSPC λιποσωμάτων συγκέντρωσης 10 mg/ml σε υδατικό μέσο σε βάθος χρόνου 29 ημερών.

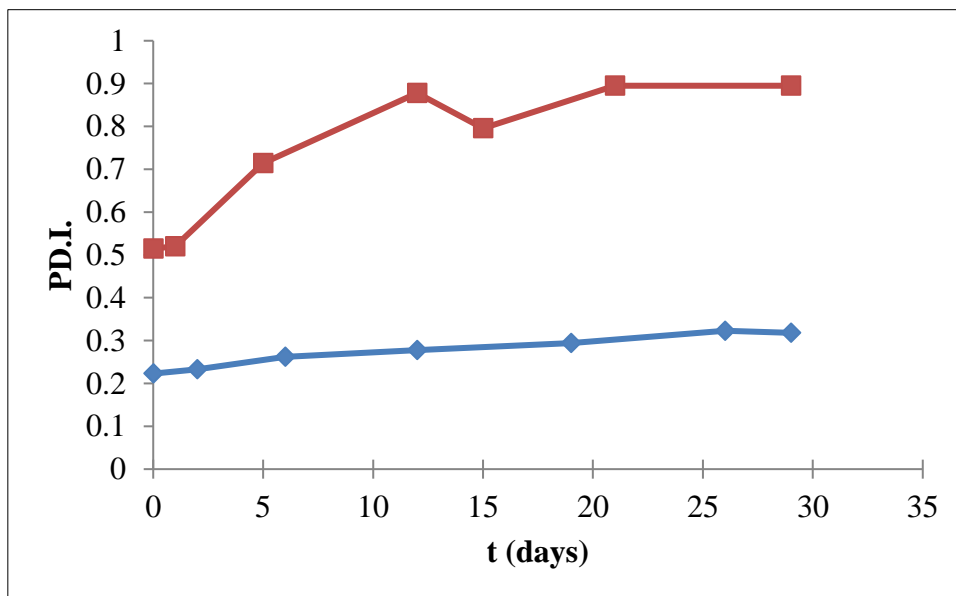
T (days)	D_h (nm)	PD.I.
0	62.4 ± 1.0	0.223 ± 0.020
2	66.9 ± 1.3	0.233 ± 0.022
6	71.4 ± 1.4	0.262 ± 0.013
12	77.5 ± 0.4	0.278 ± 0.012
19	75.7 ± 0.3	0.294 ± 0.012
26	81.0 ± 1.6	0.323 ± 0.007
29	80.8 ± 0.6	0.318 ± 0.014

Πίνακας 16 : Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των HSPC λιποσωμάτων συγκέντρωσης 30 mg/ml σε υδατικό μέσο σε βάθος χρόνου 29 ημερών.

T (days)	D_h (nm)	PD.I.
0	103.6 ± 0.4	0.515 ± 0.005
1	111.2 ± 0.3	0.520 ± 0.011
5	140.5 ± 0.8	0.714 ± 0.010
12	176.5 ± 3.2	0.878 ± 0.010
15	186.0 ± 8.4	0.796 ± 0.119
21	211.7 ± 5.9	0.895 ± 0.171
29	296.3 ± 4.1	0.895 ± 0.017



Διάγραμμα 11: Μεταβολή της υδροδυναμικής διαμέτρου (D_h) σε συνάρτηση με τον χρόνο για τα HSPC λιποσώματα συγκέντρωσης 10 mg/ml (- μπλέ γραμμή) και 30 mg/ml (- κόκκινη γραμμή) σε υδατικό μέσο.



Διάγραμμα 12: Μεταβολή του δείκτη πολυδιασποράς (PD.I.) σε συνάρτηση με τον χρόνο για τα HSPC λιποσώματα συγκέντρωσης 10 mg/ml (- μπλέ γραμμή) και 30 mg/ml (- κόκκινη γραμμή) σε υδατικό μέσο.

6.1.2.2. Μετρήσεις Σταθερότητας για τα HSPC:CH (9:1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα

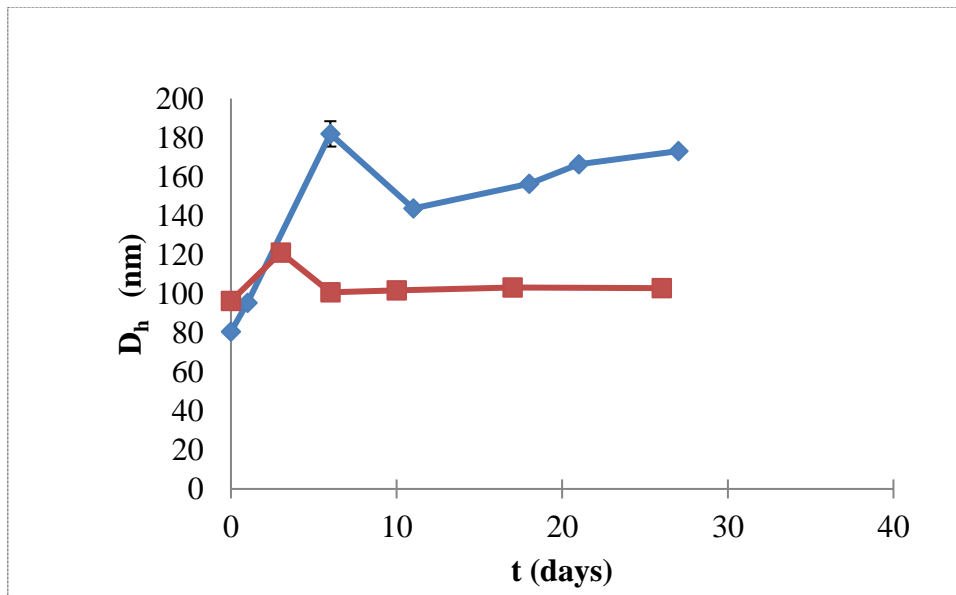
Απο την άλλη πλευρά, τα λιποσώματα HSPC:CH παρουσίασαν μεγαλύτερη σταθερότητα στην υψηλότερη συγκέντρωση σε σχέση με τα λιποσωματικά εναιωρήματα της χαμηλότερης συγκέντρωσης. Οι τιμές του ζ-δυναμικού μετά την ενσωμάτωση της χοληστερόλης παρέμειναν θετικές, 22.9 ± 3.6 mV και 10.0 ± 2.6 mV για τα HSPC:CH (9:1 molar ratio) 10 mg/ml και 30 mg/ml, αντιστοίχως. Συγκρίνοντας τα HSPC και τα HSPC:CH λιποσώματα, θα πρέπει να επισημανθεί ότι η χοληστερόλη αποτελεί ρυθμιστής του λυοτροπισμού των HSPC λιπιδίων και θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στο σχεδιασμό των λιποσωματικών μορφών.

Πίνακας 17 : Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των HSPC:CH (9:1 μοριακή αναλογία) λιποσωμάτων συγκέντρωσης 10 mg/ml σε υδατικό μέσο σε βάθος χρόνου 27 ημερών

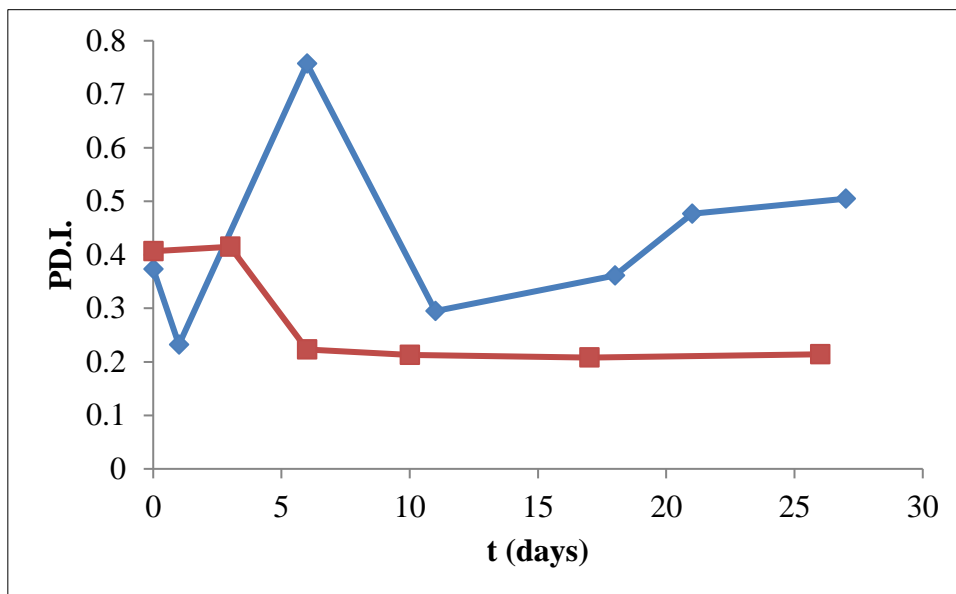
T (days)	D _h (nm)	PD.I.
0	80.6 ± 0.9	0.373 ± 0.005
1	95.3 ± 0.3	0.232 ± 0.007
6	181.9 ± 6.5	0.757 ± 0.128
11	143.7 ± 0.3	0.295 ± 0.020
18	156.4 ± 1.8	0.361 ± 0.020
21	166.3 ± 1.4	0.477 ± 0.023
27	173.0 ± 0.5	0.505 ± 0.006

Πίνακας 18 : Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των HSPC:CH (9:1 μοριακή αναλογία) λιποσωμάτων συγκέντρωσης 30 mg/ml σε υδατικό μέσο σε βάθος χρόνου 26 ημερών.

T (days)	D _h (nm)	PD.I.
0	96.3 ± 0.4	0.407 ± 0.002
3	121.1 ± 0.9	0.415 ± 0.047
6	100.8 ± 1.2	0.223 ± 0.007
10	101.8 ± 0.8	0.213 ± 0.008
17	103.2 ± 1.7	0.208 ± 0.012
26	102.9 ± 0.5	0.214 ± 0.002



Διάγραμμα 13: Μεταβολή της υδροδυναμικής διαμέτρου (D_h) σε συνάρτηση με τον χρόνο για τα HSPC:CH (9:1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα συγκέντρωσης 10 mg/ml (- μπλέ γραμμή) και 30 mg/ml (- κόκκινη γραμμή) σε αδατικό μέσο.



Διάγραμμα 14: Μεταβολή του δείκτη πολυδιασποράς (PD.I.) σε συνάρτηση με τον χρόνο για τα HSPC:CH (9:1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα συγκέντρωσης 10 mg/ml (- μπλέ γραμμή) και 30 mg/ml (- κόκκινη γραμμή) σε αδατικό μέσο.

6.1.2.3. Μετρήσεις Σταθερότητας για τα HSPC:CH:DPPG (9:1:1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα

Στους παρακάτω Πίνακες 19 και 20 παρουσιάζονται τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των HSPC:CH:DPPG (9:1:1 μοριακή αναλογία) συστημάτων.

Πίνακας 19 : Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των HSPC:CH:DPPG (9:1:1 μοριακή αναλογία) λιποσωμάτων συγκέντρωσης 10 mg/ml σε υδατικό μέσο σε βάθος χρόνου 28 ημερών.

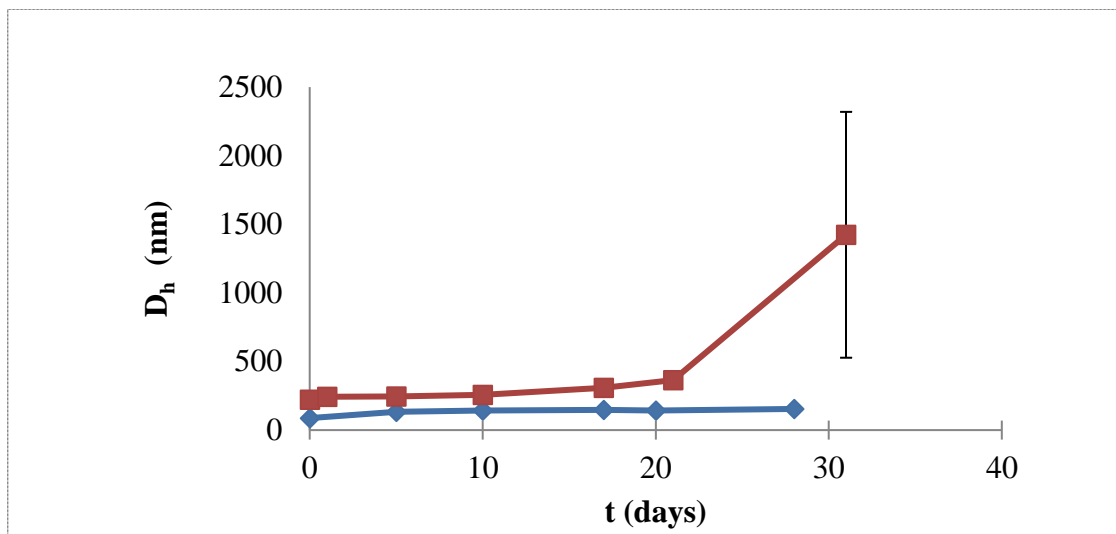
T (days)	D _h (nm)	PD.I.
0	87.5 ± 0,3	0.321 ± 0.007
5	133.9 ± 0.5	0.367 ± 0.006
10	142.5 ± 1.7	0.388 ± 0.007
17	147.8 ± 4.2	0.360 ± 0.020
20	142 ± 1.1	0.359 ± 0.016
28	154.2 ± 1.2	0.369 ± 0.004

Πίνακας 20 : Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των HSPC:CH:DPPG (9:1:1 μοριακή αναλογία) λιποσωμάτων συγκέντρωσης 30 mg/ml σε υδατικό μέσο σε βάθος χρόνου 31 ημερών.

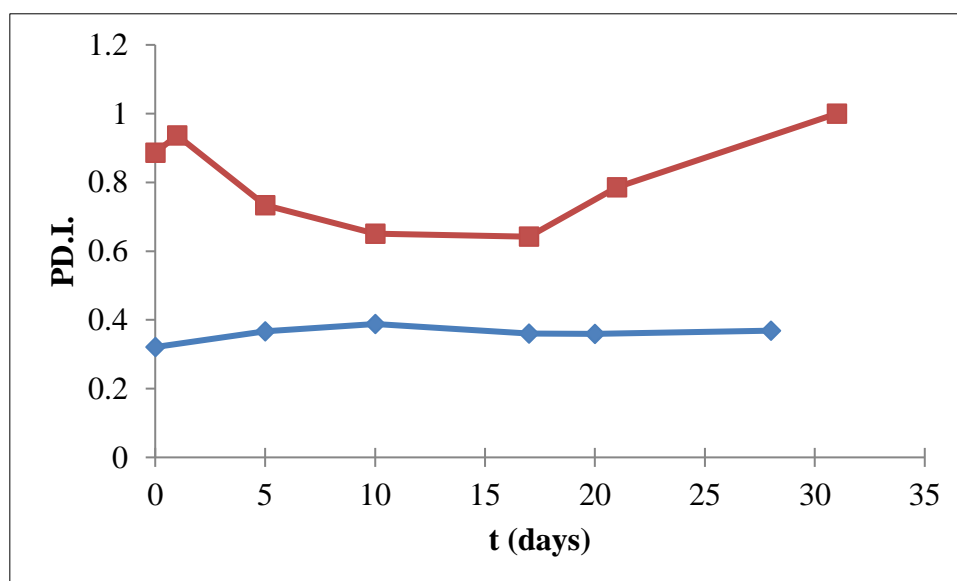
T (days)	D _h (nm)	PD.I.
0	222.9 ± 20.3	0.886 ± 0.099
1	243.0 ± 17.8	0.937 ± 0.109
5	246.0 ± 8.6	0.734 ± 0.136
10	257.8 ± 7.2	0.651 ± 0.015
17	308.3 ± 3.3	0.642 ± 0.034
21	365.4 ± 7.0	0.786 ± 0.032
31	1423.4 ± 895.9	1.000

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα HSPC: DPPG: CH (9:1:1 μοριακή αναλογία) λιποσωματικά συγκέντρωσης 10 mg/ml συστήματα εμφάνισαν φυσική σταθερότητα σε βάθος χρόνου. Αντίθετα, για τα λιποσωματικά συστήματα συγκέντρωσης 30 mg/ml παρατηρήθηκε συσσωμάτωση (aggregation) καθώς η D_h αυξήθηκε από τα 222.9 nm στα 1423.4 nm (Διάγραμμα 8). Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η μεταβολή της συγκέντρωσης επηρεάζει την οργάνωση και το λυοτροπισμό των λιπιδικών στοιβάδων, ενώ η αυξημένη συγκέντρωση των

DPPG λιπιδίων είναι πιθανόν να συμβάλλει στη δημιουργία πιο υδρόφοβων λιπιδικών μεμβρανών και τελικά να οδηγεί σε συσσωμάτωση.



Διάγραμμα 15: Μεταβολή της υδροδυναμικής διαμέτρου (D_h) σε συνάρτηση με τον χρόνο των HSPC:CH:DPPG (9:1:1 μοριακή αναλογία) λιποσωμάτων συγκέντρωσης 10 mg/ml (- μπλέ γραμμή) και 30 mg/ml (- κόκκινη γραμμή) σε υδατικό μέσο.



Διάγραμμα 16: Μεταβολή του δείκτη πολυδιασποράς (PDI) σε συνάρτηση με τον χρόνο των HSPC:CH:DPPG (9:1:1 μοριακή αναλογία) λιποσωμάτων συγκέντρωσης 10 mg/ml (- μπλέ γραμμή) και 30 mg/ml (- κόκκινη γραμμή) σε υδατικό μέσο.

3.1.2.4. Μετρήσεις Σταθερότητας για τα HSPC:DPPE-PEG (9:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα

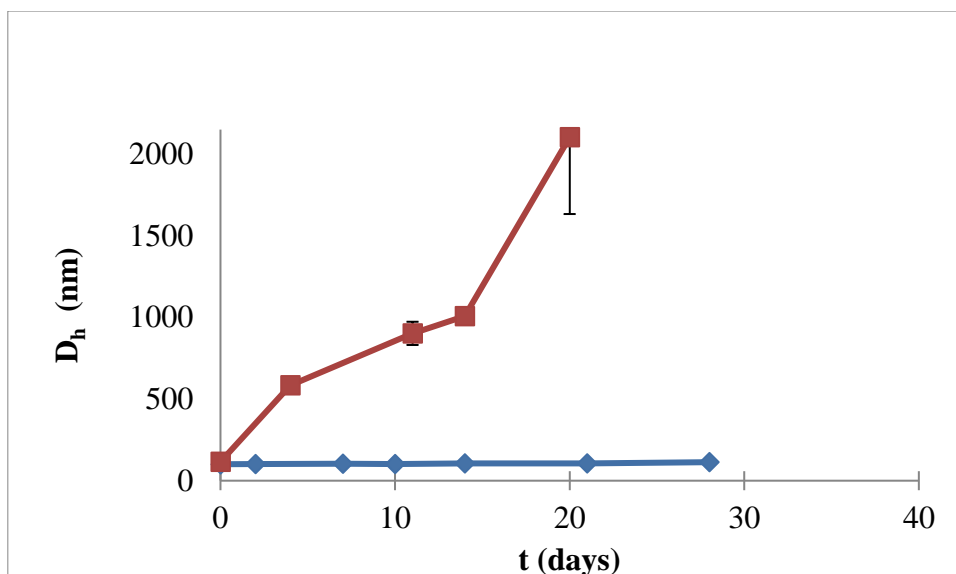
Η υδροδυναμική διάμετρος D_h και ο δείκτης πολυδιασποράς αυξήθηκαν δραματικά στην υψηλότερη συγκέντρωση με την πάροδο του χρόνου για τα λιποσώματα HSPC:DPPE-PEG (9:0.1 μοριακή αναλογία). Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν ότι τα λιποσώματα συγκέντρωση 30 mg/ml δεν ήταν θερμοδυναμικά σταθερά, εφόσον επήλθε συσσωμάτωση εξαιτίας της γήρανσης του συστήματος. Από την άλλη μεριά, τα συστήματα σύστασης HSPC:DPPE-PEG (9:0.1 μοριακή αναλογία) χαμηλότερης συγκέντρωσης διατήρησαν τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά, όπως φαίνεται και στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 21 : Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των HSPC:DPPE-PEG (9:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσωμάτων συγκέντρωσης 10 mg/ml σε υδατικό σε βάθος χρόνου 28 ημερών.

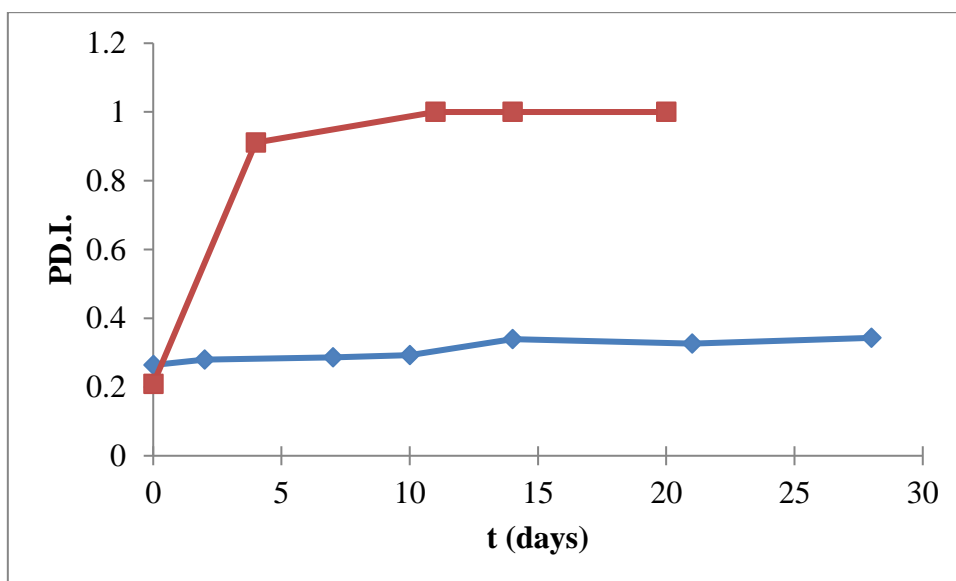
T (days)	D_h (nm)	PD.I.
0	100.8 ± 1.2	0.264 ± 0.015
2	101.4 ± 0.9	0.280 ± 0.008
7	103.0 ± 1.8	0.286 ± 0.006
10	102.5 ± 0.7	0.293 ± 0.015
14	106.1 ± 2.0	0.339 ± 0.015
21	106.5 ± 0.3	0.326 ± 0.009
28	113.5 ± 2.8	0.343 ± 0.013

Πίνακας 22 : Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των HSPC:DPPE-PEG (9:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσωμάτων συγκέντρωσης 30 mg/ml σε υδατικό μέσο σε βάθος χρόνου 20 ημερών.

T (days)	D_h (nm)	PD.I.
0	115.7 ± 0.4	0.209 ± 0.015
4	584.4 ± 32.2	0.911 ± 0.080
11	902.2 ± 71.1	1.000
14	1008.6 ± 36.6	1.000
20	2103 ± 470	1.000



Διάγραμμα 17: Μεταβολή της υδροδυναμικής διαμέτρου (D_h) σε συνάρτηση με τον χρόνο των HSPC:DPPE-PEG (9:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσωμάτων συγκέντρωσης 10 mg/ml (- μπλέ γραμμή) και 30 mg/ml (- κόκκινη γραμμή) σε υδατικό μέσο.



Διάγραμμα 18: Μεταβολή του δείκτη πολυδιασποράς (PD.I.) σε συνάρτηση με τον χρόνο των HSPC:DPPE-PEG (9:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσωμάτων συγκέντρωσης 10 mg/ml (- μπλέ γραμμή) και 30 mg/ml (- κόκκινη γραμμή) σε υδατικό μέσο.

Πρέπει να σημειωθεί ότι τα λιποσώματα DPPC:DPPE-PEG (9:1 μοριακή αναλογία) και HSPC:DPPE-PEG (9:1 μοριακή αναλογία) παρουσιάζουν διαφορετική συμπεριφορά παρά την ίδια περιεκτικότητα σε PEGylated λιπίδια. Τα DPPC:DPPE-PEG (9:1) είναι πιο σταθερά

σε υψηλότερη συγκέντρωση, ενώ τα HSPC:DPPE-PEG εμφανίζουν φυσική σταθερότητα στη χαμηλότερη συγκέντρωση. Η λιπιδική σύσταση επηρεάζει το λυοτροπισμό και το μέγεθος και τη μορφολογία, όπως τη κυρτότητα, των λιπιδικών διπλοστοιβάδων με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η σταθερότητα. Το μικρό μέγεθος και η αυξημένη κυρτότητα των λιποσωμάτων αποτελούν θεμελιώδη στοιχεία για τη φυσική σταθερότητα (Satzler et al., 2015)

6.1.2.5. Μετρήσεις Σταθερότητας για τα HSPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα

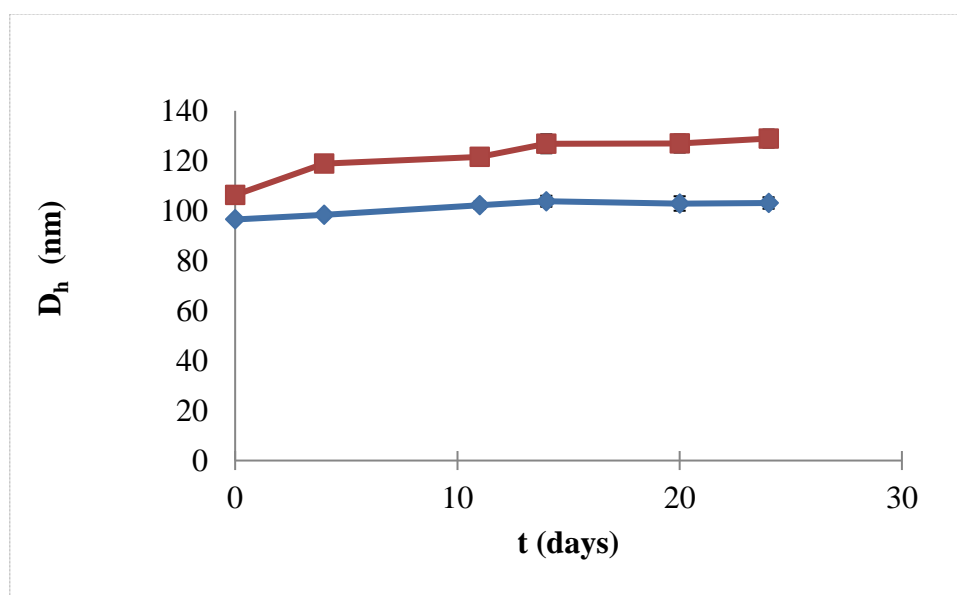
Τα HSPC:CH:DPPE-PEG (9: 1: 0.1 μοριακή αναλογία) λιποσωμιακά εναιωρήματα διατήρησαν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους για το χρονικό διάστημα που πραγματοποιήθηκαν οι μελέτες. Τα συστήματα, ανεξάρτητα από τη μεταβολή τη συγκέντρωσης, είναι θερμοδυναμικά σταθερά, εξαιτίας της τροποποίησης της επιφάνειας και της οργάνωσης των λιπιδικών στιβάδων. Οι αλυσίδες PEG παρέχουν κολλοειδή σταθερότητα μέσω στερικών δυνάμεων που εμποδίζουν τα φαινόμενα συσσωμάτωσης και η χοληστερόλη μεταβάλλει τα διεπιφανειακά φαινόμενα παρέχοντας σταθεροποίηση.

Πίνακας 23 : Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των HSPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσωμάτων συγκέντρωσης 10 mg/ml σε υδατικό μέσο σε βάθος χρόνου 24 ημερών.

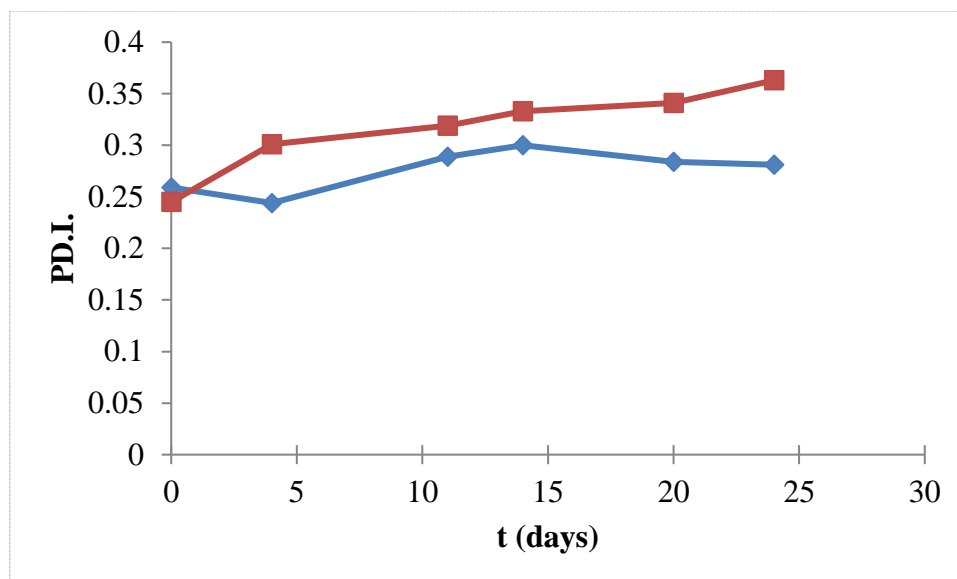
T (days)	D _h (nm)	PD.I.
0	96.5 ± 0.9	0.259 ± 0.012
4	98.3 ± 1.2	0.244 ± 0.013
11	102.2 ± 1.5	0.289 ± 0.010
14	103.8 ± 2.2	0.300 ± 0.008
20	102.9 ± 2.9	0.284 ± 0.006
24	103.1 ± 2.3	0.281 ± 0.008

Πίνακας 24 : Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των HSPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσωμάτων συγκέντρωσης 30 mg/ml σε υδατικό μέσο σε βάθος χρόνου 24 ημερών.

T (days)	D _h (nm)	PD.I.
0	106.3 ± 0.6	0.245 ± 0.011
4	118.9 ± 1.3	0.301 ± 0.006
11	121.6 ± 0.9	0.319 ± 0.002
14	126.8 ± 3.8	0.333 ± 0.015
20	126.9 ± 3.6	0.341 ± 0.008
24	128.9 ± 3.6	0.363 ± 0.014



Διάγραμμα 19: Μεταβολή της υδροδυναμικής διαμέτρου (D_h) σε συνάρτηση με τον χρόνο των HSPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσωμάτων συγκέντρωσης 10 mg/ml (- μπλέ γραμμή) και 30 mg/ml (- κόκκινη γραμμή) σε υδατικό μέσο.



Διάγραμμα 20: Μεταβολή του δείκτη πολυδιασποράς (PD.I.) σε συνάρτηση με τον χρόνο των HSPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσωμάτων συγκέντρωσης 10 mg/ml (- μπλέ γραμμή) και 30 mg/ml (- κόκκινη γραμμή) σε υδατικό μέσο

6.2. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά λιποσωμάτων σε βιολογικό μέσο

6.2.1. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των λιποσωμάτων που περιείχαν DPPC λιπίδια

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των DPPC, DPPC:CH (9:1 μοριακή αναλογία), DPPC:DPPG:CH (9:1:1 μοριακή αναλογία), DPPC:DPPE-PEG (9:0.1 μοριακή αναλογία) και DPPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσωμάτων διερευνήθηκαν μετρώντας την υδροδυναμική διάμετρο (D_h), τον δείκτη πολυδιασποράς (PD.I.) και το ζ-δυναμικό μετά την διασπορά τους σε δύο διαφορετικά μέσα, σε ένα υδατικό και ένα βιολογικό (Ορός πλάσματος βοοειδούς - FBS).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, που παρουσιάζονται στον Πίνακα 25, τα DPPC και DPPC:CH (9:1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα εμφάνισαν αυξημένη υδροδυναμική διάμετρο μετά την επώαση τους στον ορό πλάσματος βοοειδούς (FBS) και στις δύο συγκεντρώσεις, ενώ ο δείκτης πολυδιασποράς αυξήθηκε δραματικά παίρνοντας τιμές κοντά στο 1, γεγονός που αποδεικνύει ότι ο πληθυσμός των λιποσωμάτων έγινε ετερογενείς και τα συστήματα δεν παρουσίασαν βιολογική σταθερότητα. Αντίθετα, μετά την αραίωση τους σε νερό HPLC-βαθμού καθαρότητας τα λιποσώματα είχαν μικρό μέγεθος και εμφάνισαν φυσική σταθερότητα. Η μεταβολή του μεγέθους και η δημιουργία συσσωματωμάτων (aggregations) οφείλονται στην προσρόφιση των πρωτεϊνών του πλάσματος, και ειδικότερα στην σύνδεση

της αλβουμίνης βοοειδούς η οποία μεταβάλλει τις φυσικοχημικές ιδιότητες της λιπιδικής διπλοστοιβάδας. Συμπερασματικά, όπως έχει προταθεί και από άλλες μελέτες, η πρωτεϊνική σύνδεση επιφέρει αλλαγές στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των λιποσωμάτων και στη βιολογική τους συμπεριφορά (Dimitrova et al., 2000; Semple et al., 1998; Bonté, 1986; Pippa et al., 2012a). Παράλληλα η ενσωμάτωση της χοληστερόλης στα DPPC λιποσώματα να μην προσέδωσε φυσική σταθερότητα, όπως φαίνεται στα διαγράμματα μελέτης σταθερότητας, αλλά δεν φαίνεται ξεκάθαρα αν ελαττώνει τις αλληλεπιδράσεις με τις πρωτεΐνες.

Στη συνέχεια, προσδιορίστηκαν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των DPPC:DPPG:CH (9:1:1 μοριακή αναλογία) λιποσωματικών συστημάτων. Σύμφωνα με τον Πίνακα 25, η υδροδυναμική διάμετρος των λιποσωματικών εναιωρημάτων δεν μεταβλήθηκε σημαντικά μετά την επώαση στο FBS. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα DPPG λιπίδια και η χοληστερόλη προσδίδουν στα λιποσώματα << stealth >> ιδιότητες, δηλαδή εμποδίζουν την προσρόφηση των πρωτεϊνών κάνοντας τα << αόρατα >> (Gabizon et al., 1991; Marzban et al., 2015; Semple et al., 1998). Η μείωση των αλληλεπιδράσεων με τις πρωτεΐνες οφείλεται στα αρνητικά φορτισμένα DPPG λιπίδια, τα οποία δημιουργούν απωστικές δυνάμεις με τις πρωτεΐνες, οι οποίες είναι και αυτές αρνητικά φορτισμένες στον ορό πλάσματος. Επομένως, οι απωστικές ηλεκτροστατικές δυνάμεις υπερτερούν των ελκτικών Van der Waals δυνάμεων, και τελικά επέρχεται φυσική και βιολογική σταθερότητα. Σημαντικό ρόλο παίζει και η χοληστερόλη, η οποία μέσω της οργάνωσης και της αύξησης της ρευστότητας των λιπιδικών δομών, μειώνει τον αριθμό των φωσφολιπιδίων που αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες.

Πίνακας 25: Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των λιποσωμάτων σύστασης DPPC, DPPC:CH (9:1 μοριακή αναλογία), DPPC:CH:DPPG (9:1:1 μοριακή αναλογία) δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων σε υδατικό και βιολογικό μέσο.

Λιπιδική σύσταση λιποσωματικών συστημάτων	Συγκέντρωση (mg/ml)	Μέσο διασποράς	Υδροδυναμική διάμετρος (nm)	Δείκτης πολυδιασποράς	ζ-δυναμικό (mV)
DPPC	10mg/ml	HPLC-grade water	52.6 ± 0.9	0.246 ± 0.008	33.2 ± 1.5
		FBS	220.2 ± 54.9	0.989 ± 0.019	4.7 ± 11.2
DPPC	30mg/ml	HPLC-grade water	54.2 ± 0.1	0.294 ± 0.006	17.1 ± 2.4
		FBS	136.0 ± 80	0.659 ± 0.008	-5.8 ± 15.8
DPPC : CH (9:1)	10mg/ml	HPLC-grade water	125.7 ± 0.8	0.408 ± 0.004	28.8 ± 0.9
		FBS	418.2 ± 134.9	1.000	7.4 ± 11.2
DPPC : CH (9:1)	30mg/ml	HPLC-grade water	247.8 ± 16.2	0.893 ± 0.095	19.3 ± 1.0
		FBS	1150.0 ± 244.5	1.000	22.0 ± 1.4
DPPC:DPPG:CH (9:1:1)	10mg/ml	HPLC-grade water	93.3 ± 0.5	0,224 ± 0.010	0,3 ± 1.2
		FBS	140.6 ± 3.7	0.880 ± 0.014	-4,6 ± 0.9
DPPC:DPPG:CH (9:1:1)	30mg/ml	HPLC-grade water	84 ± 0.6	0.318 ± 0.007	-8.1 ± 0.6
		FBS	141.9 ± 1.1	0.671 ± 0.015	-14.9 ± 18.6

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασαν τα λιποσώματα που περιείχαν τα DPPE-PEG λιπίδια, τα οποία ανήκουν στη κατηγορία των PEG-lipid conjugates και χρησιμοποιούνται για την στερεοχημική σταθεροποίηση λιποσωμάτων μακράς κυκλοφορίας. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας έδειξαν ότι το μέγεθος των DPPC:DPPE-PEG (9:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσωμάτων δεν αυξήθηκε δραματικά μετά την αραίωση στον ορό πλάσματος FBS. Κατά συνέπεια, τα συστήματα μπορούν να χαρακτηριστούν ως βιολογικά σταθερά. Οι αλυσίδες της πολυαιθυλενογλυκόλης εξαιτίας της αύξησης της υδροφιλικότητας, είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση της φυσικής και βιολογικής σταθερότητας των λιποσωμάτων, εμποδίζοντας την πρωτεϊνική προσρόφηση και την μεταβολή των χαρακτηριστικών και ιδιοτήτων των συστημάτων. Παρόμοια αποτελέσματα, παρατηρήθηκαν και για τα DPPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα. Ειδικότερα, το μέγεθος των λιποσωμάτων αυτών μειώθηκε μετά την έκθεση στο όρο πλάσματος βοοειδούς. Όπως αναφέρεται σε άλλες

μελέτες και σύμφωνα με την επέκταση της DLVO θεωρίας, αυτή η μείωση στο μέγεθος των PEGylated λιποσωμάτων μπορεί να οφείλεται στις δυνάμεις ενυδάτωσης, οι οποίες ασκούν ωσμωτική πίεση και οδηγούν στην εκκένωση του νερού από τον υδατικό πυρήνα των λιποσωμάτων (Wolfram et al., 2014b; Sabin et al., 2006).

Πίνακας 26: Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των λιποσωμάτων σύστασης DPPC:DPPE-PEG (9:0.1 μοριακή αναλογία) και DPPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 μοριακή αναλογία) δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων σε υδατικό και βιολογικό μέσο.

Λιπιδική σύσταση λιποσωματικών συστημάτων	Συγκέντρωση (mg/ml)	Μέσο διασποράς	Υδροδυναμική διάμετρος (nm)	Δείκτης πολυδιασποράς	ζ-δυναμικό (mV)
DPPC:DPPE-PEG (9:0.1)	10mg/ml	HPLC-grade water	88.3 ± 0.2	0.198 ± 0.009	3.2
		FBS	89.8 ± 1.4	0.792 ± 0.004	-2.4 ± 1.5
DPPC:DPPE-PEG (9:0.1)	30mg/ml	HPLC-grade water	116.6 ± 34	0.597 ± 0.257	3.5
		FBS	241.4 ± 194	0.977 ± 0.040	-18.4 ± 15.8
DPPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1)	10mg/ml	HPLC-grade water	97 ± 0.8	0.286 ± 0.010	3.7 ± 0.3
		FBS	72 ± 0.8	0.730 ± 0.006	1.9 ± 3.5
DPPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1)	30mg/ml	HPLC-grade water	108.4 ± 1.3	0.205 ± 0.008	6 ± 0.4
		FBS	100.2 ± 1	0.670 ± 0.007	-9.9 ± 4.9

Έπειτα, τα DPPC:CH (9:1 μοριακή αναλογία) και DPPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα είχαν μεγαλύτερη υδροδυναμική διάμετρο από τα DPPC και DPPC:DPPE-PEG (9:0.1 μοριακή αναλογία) αντίστοιχα (Πίνακας 25 και 26) και εμφάνισαν σημαντική φυσική σταθερότητα στο υδατικό μέσο. Η αύξηση του μεγέθους προκύπτει από την ενσωμάτωση της χοληστερόλης, η οποία προκαλεί αλλαγές στο πάχος της λιπιδικής διπλοστοιβάδας, ενώ ταυτόχρονα ρυθμίζει την καμπυλότητα και τη ρευστότητα του συστήματος και προάγει τη σταθερότητα των λιπιδικών μεμβρανών σχηματίζοντας οργανωμένες δομές (Hunget et al., 2007, Meyera et al., 2009). Επιπροσθέτως, βλέπουμε ότι η υδροδυναμική διάμετρος των λιποσωμάτων που αποτελούνται από λιπίδια DPPC, λόγω του << πακεταρίσματος >> των λιπιδίων και του προσανατολισμού τους, ήταν ανεξάρτητη από μεταβολές συγκεντρώσεων στο υδατικό μέσο. Ωστόσο, μεγαλύτερη αύξηση της υδροδυναμικής διαμέτρου παρατηρήθηκε στην υψηλότερη συγκέντρωση λιπιδίων

(30mg/ml). Ως εκ τούτου, η μεταβολή της συγκέντρωσης των λιπιδίων επηρεάζει τον λυοτροπισμό τους και τελικά τις μεσοφάσεις και τη δομή της λιπιδικής διπλοστοιβάδας, συμβάλλοντας στην αναστολή ή προαγωγή της πρωτεϊνικής προσρόφησης. Τέλος, διακρίνουμε μια μεταβολή του ζ-δυναμικού προς αρνητικότερες τιμές, λόγω της πρωτεϊνικής σύνδεσης, η οποία μπορεί να μεταβάλλει το φορτίο της επιφανείας τους (Arnida et al., 2011).

6.2.2. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των λιποσωμάτων που περιείχαν HSPC λιπίδια

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των HSPC, HSPC:CH (9:1 μοριακή αναλογία), HSPC:DPPG:CH (9:1:1 μοριακή αναλογία), HSPC:DPPE-PEG (9:0.1 μοριακή αναλογία) και HSPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 μοριακή αναλογία) εξετάστηκαν και παρουσιάζονται στην Πίνακα 27. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, οι τιμές PD.I. των λιποσωμάτων σε νερό HPLC βαθμού καθαρότητας δείχνουν ότι όλα τα δείγματα είναι μονοδιάσπαρτα σε μέγεθος, ενώ οι τιμές PD.I. μετά την επώαση σε FBS εμφανίζουν μια αύξηση, με αποτέλεσμα ο πληθυσμός των λιποσωμάτων να γίνεται πιο ετερογενής λόγω της πρωτεϊνικής σύνδεσης. Συγκεκριμένα, τα HSPC και HSPC:CH (9:1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα είχαν μικρή υδροδυναμική διάμετρο < 100 nm στο υδατικό μέσο, όμως μετά την αραίωση στο FBS το μέγεθος τους αυξήθηκε και στις δύο συγκεντρώσεις. Τα λιποσωματικά συστήματα δεν είναι σταθερά, λόγω της πρωτεϊνικής σύνδεσης η οποία μεταβάλλει τις ιδιότητες των λιπιδικών μεμβρανών και τελικά επέρχεται συσσωμάτωση (aggregation) (Dimitrova et al., 2000, Semple et al., 1998; Bonté, 1986; Pippa et al., 2012a). Εξίσου σημαντικό να αναφερθεί είναι ότι η ενσωμάτωση της χοληστερόλης στα HSPC λιποσώματα δεν οδηγεί σε αύξηση του μεγέθους τους. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να οφείλεται στο είδος των φωσφολιπιδίων, όπως στο διαφορετικό μήκος της αλυσίδας των HSPC λιπιδίων, που επηρεάζει τη δράση της χοληστερόλης στη ρευστότητα και το πάχος της λιπιδικής διπλοστοιβάδας. Επιπλέον, τα λιποσωματικά συστήματα παρουσίασαν ελάττωση του ζ-δυναμικού μετά την προσρόφηση των πρωτεϊνών στο βιολογικό μέσο.

Συνεχίζοντας, για τα HSPC:DPPG:CH (9:1:1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα δεν σημειώθηκε εκτεταμένη πρωτεϊνική σύνδεση, εξαιτίας των αρνητικά φορτισμένων DPPG λιπιδίων, τα οποία δημιουργούν ένα ηλεκτροστατικό φραγμό (electrostatic barrier) που εμποδίζει τις αλληλεπιδράσεις με τις πρωτεΐνες. Εντούτοις, πρέπει να σημειωθεί ότι η προσρόφηση της Αλβουμίνης πλάσματος βοοειδούς (Bovine Serum Albumin), της κυριότερης πρωτεΐνης του FBS, προκάλεσε αλλαγές στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των λιποσωμάτων, όπως μείωση του ζ-δυναμικού και μικρή αύξηση του μεγέθους, μολονότι τα

λιποσώματα ήταν αρνητικά φορτισμένα,. Έτσι λοιπόν, η πρωτεϊνική σύνδεση είναι πιθανότερο να σχετίζεται με υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της αλβουμίνης και των λιποσωμάτων (Yokouchi et al., 2001).

Πίνακας 27: Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των λιποσωμάτων σύστασης HSPC,HSPC:CH (9:1 μοριακή αναλογία), HSPC:CH:DPPG (9:1:1 μοριακή αναλογία) δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων σε υδατικό και βιολογικό μέσο.

Λιπιδική σύσταση λιποσωματικών συστημάτων	Συγκέντρωση (mg/ml)	Μέσο διασποράς	Υδροδυναμική ή διάμετρος (nm)	Δείκτης πολυδιασποράς	ζ-δυναμικό (mV)
HSPC	10mg/ml	HPLC-grade water	62.4 ± 1.0	0.223 ± 0.020	22.2 ± 7.6
		FBS	201.8 ± 2.2	0.912 ± 0.098	5.3 ± 3.0
HSPC	30 mg/ml	HPLC-grade water	103.6 ± 0.4	0.515 ± 0.005	34.0 ± 4.5
		FBS	274.3 ± 21.3	1.000	6.1 ± 4.4
HSPC : CH	10mg/ml	HPLC-grade water	80.6 ± 0.9	0.373 ± 0.005	22.9 ± 3.6
		FBS	272.4 ± 41.9	0.959 ± 0.072	14.8 ± 14.8
HSPC : CH	30mg/ml	HPLC-grade water	96.3 ± 0.4	0.407 ± 0.002	10.0 ± 2.6
		FBS	253.7 ± 13.0	0.830 ± 0.195	9.8 ± 7.3
HSPC:DPPG:CH (9:1:1 molar ratio)	10mg/ml	HPLC-grade water	87.5 ± 0,3	0.321 ± 0.007	-5.6 ± 0.1
		FBS	169 ± 4	1.000 ± 0.000	-16.9 ± 1.5
HSPC:DPPG:CH (9:1:1 molar ratio)	30mg/ml	HPLC-grade water	222.9 ± 20.3	0.886 ± 0.099	-25.4 ± 1.6
		FBS	506.3 ± 103.9	1.000 ± 0.000	-18.6 ± 43.7

Τα HSPC:DPPE-PEG (9:0.1 μοριακή αναλογία) και HSPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα, εξαιτίας των αλυσίδων της πολυαιθυλενογλυκόλης, διατήρησαν τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες μετά την επώαση με FBS. Η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) σχηματίζει ένα στρώμα στην επιφάνεια των λιποσωμάτων και αποτρέπει την προσρόφιση των οφωνινών και την πρόσληψη από τα φαγοκυτταρικά κύτταρα μέσω στερεοχημική παρεμπόδιση. Η αύξηση της υδροφιλικότητας, οι απωστικές δυνάμεις που κυριαρχούν έναντι των ελκτικών και η μείωση του ρυθμού της πρωτεϊνικής σύνδεσης καθιστούν τα PEG-

λιποσώματα ιδανικά συστήματα χορήγησης φαρμάκων. Τέλος, μείωση του μεγέθους παρατηρήθηκε και για τα λιποσώματα HSPC:DPPE-PEG (9:0.1 μοριακή αναλογία) και HSPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 μοριακή αναλογία) στα 30 mg/ml και 10 mg/ml, αντίστοιχα. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της αλβουμίνης με τα PEG-λιποσώματα, δημιουργούν ωσμωτικές δυνάμεις που οδηγούν το νερό από το εσωτερικό των λιποσωμάτων στο εξωτερικό, με αποτέλεσμα την συμπίεση και την μείωση του μεγέθους τους.

Πίνακας 28 : Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των λιποσωμάτων σύστασης HSPC:DPPE-PEG (9:0.1 μοριακή αναλογία), HSPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 μοριακή αναλογία) δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων σε υδατικό και βιολογικό μέσο.

Λιπιδική σύσταση λιποσωματικών συστημάτων	Συγκέντρωση (mg/ml)	Μέσο διασποράς	Υδροδυναμική διάμετρος (nm)	Δείκτης πολυδιασποράς	ζ-δυναμικό (mV)
HSPC:DPPE-PEG (9:0.1 molar ratio)	10mg/ml	HPLC-grade water	100.8 ± 1.2	0.264 ± 0.015	2.6 ± 0.5
		FBS	105.7 ± 0.7	0.897 ± 0.008	-4.8 ± 3.1
HSPC:DPPE-PEG (9:0.1 molar ratio)	30mg/ml	HPLC-grade water	115.7 ± 0.4	0.209 ± 0.015	3.6 ± 0.1
		FBS	91.1 ± 1.6	0.747 ± 0.002	32.6 ± 74.8
HSPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 molar ratio)	10mg/ml	HPLC-grade water	96.5 ± 0.9	0.259 ± 0.012	3.4 ± 0.2
		FBS	76.1 ± 0.7	0.744 ± 0.003	-28.2 ± 5.8
HSPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 molar ratio)	30mg/ml	HPLC-grade water	106.3 ± 0.6	0.245 ± 0.011	18 ± 1.2
		FBS	130.4 ± 1.8	0.755 ± 0.013	-6 ± 1.7

6.2.3. Σύγκριση των λιποσωματικών συστημάτων με διαφορετική λιπιδική σύνθεση.

Όπως φαίνεται στους Πίνακες 25 και 27, τα λιποσώματα DPPC και HSCP δεν εμφάνισαν την ίδια υδροδυναμική διάμετρο, επαληθεύοντας ότι η λιπιδική σύνθεση παίζει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση των ιδιοτήτων της μεμβράνης, όπως στο μέγεθος, στο φορτίο, στη ρευστότητα της διπλοστοιβάδας και συνεπώς στην προσρόφηση των πρωτεϊνών (Capriotti et

al., 2012; Soema et al., 2015). Τα λιπίδια DPPC σχημάτισαν μικρότερα σε μέγεθος λιποσώματα από τα λιπίδια HSPC. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα λιπίδια HSPC έχουν μεγαλύτερο μήκος αλυσίδας [88,6% PC (18: 0/18: 0) και 11,4% PC (16: 0/16: 0) 16: 0/16: 0)] και επομένως προσανατολίζονται διαφορετικά σχηματίζοντας διαφορετικού μεγέθους λιποσώματα. Είναι προφανές ότι το μήκος της αλυσίδας καθορίζει το πακετάρισμα των λιπιδίων και το μέγεθος των λιποσωμικών μεμβρανών (Morrow et al., 1992), ενώ επηρεάζει και το βαθμό και ρυθμό της πρωτεϊνικής σύνδεσης.

Ωστόσο, όταν η χοληστερόλη ενσωματώθηκε στα λιπίδια DPPC και HSPC, τα λιποσώματα HSPC: CH (9:1 μοριακή αναλογία) ήταν μικρότερα από τα DPPC: CH (9: 1 μοριακή αναλογία). Η χοληστερόλη μπορεί να ρυθμίσει το πάχος της διπλοστοιβάδας αυξάνοντάς το σε φωσφολιπίδια που περιέχουν 12-16 άνθρακες ανά αλυσίδα, όπως το DPPC ή μειώνοντας το σε φωσφολιπίδια που περιέχουν 18 ή περισσότερους άνθρακες ανά αλυσίδα (McIntosh, 1992). Επιπλέον, τόσο τα λιποσώματα DPPC: DPPG: CH (9: 1: 1 μοριακή αναλογία) όσο και τα HSPC: DPPG: CH (9: 1: 1 μοριακή αναλογία) δεν εμφάνισαν σημαντική μεταβολή στο μέγεθος μετά από την επώαση στο FBS. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν την επίδραση των αρνητικά φορτισμένων DPPG λιπιδίων και της χοληστερόλης στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και λιποσωμάτων. Τα μακράς αλυσίδας φωσφολιπίδια εκθέτουν υδρόφοβες περιοχές στην επιφάνεια της λιπιδικής διπλοστοιβάδας των λιποσωμάτων, ενισχύοντας έτσι την επαφή μεταξύ πρωτεϊνών και υδρογονανθρακικών αλυσίδων. Αντίθετα, τα λιποσωματικά συστήματα με χοληστερόλη δεν εμφανίζουν τόσα δομικά ελαττώματα (Briuglia et al., 2015; Rog et al., 2009; Yeagle, 1985), ενώ χάρη στην οργάνωση και της ρευστότητας τους παρεμποδίζεται η προσρόφηση των πρωτεϊνών. Με τη σειρά της, η ενσωμάτωση των DPPG λιπιδίων δημιουργεί απωθητικές δυνάμεις έναντι των πρωτεϊνών του πλάσματος. Από την άλλη πλευρά, η μικρή αύξηση της DPPC: DPPG: CH (9: 1: 1 μοριακή αναλογία) και HSPC: DPPG: CH (9: 1: 1 μοριακή αναλογία) καταδεικνύει ότι η αρνητικά φορτισμένη αλβουμίνη (BSA) αλληλεπιδρά με τα αρνητικά φορτισμένα λιποσώματα μέσω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων. Όπως φαίνεται σε προηγούμενες μελέτες, οι κύριες αλληλεπιδράσεις μεταξύ λιποσωμάτων και αλβουμίνης είναι πιθανώς υδροφοβικές. Το μοντέλο των τριών τομέων της αλβουμίνης (three-domain model), η υδροφοβική «οπή» (hydrophobic hole) σε κάθε τομέα και η διαμορφωτική προσαρμοστικότητα (configurational adaptability) της αλβουμίνης είναι τα βασικά χαρακτηριστικά που μπορούν να εξηγήσουν τις αλληλεπιδράσεις με τα λιποσώματα παρά την παρουσία αρνητικού φορτίου στην επιφάνεια (Yokouchi et al., 2001). Πρέπει να

σημειωθεί ότι τα DPPC: DPPG: CH (9:1:1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα εμφάνισαν ελαττωμένη πρωτεϊνική προσρόφηση σε σχέση με τα HSPC: DPPG: CH (9: 1: 1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα. Η διαφορετική έκταση της πρωτεϊνικής σύνδεσης οφείλεται πιθανόν όχι μόνο στις διαφορές στο φορτίο και τη ρευστότητα των λιπιδικών μεμβρανών, αλλά και στην υδροφοβικότητα, η οποία καθορίζεται κυρίως από το μήκος των αλυσίδων των φωσφολιπιδίων. Δεδομένου λοιπόν ότι τα HSPC λιπίδια είναι πιο υδρόφοβα από τα DPPC λιπίδια, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υδροφοβικών οπών της BSA και HSPC: DPPG: CH (9: 1: 1) λιποσωμάτων είναι πιο ισχυρές.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε μεταβολή του ζ δυναμικού για όλα τα λιποσώματα που αραιώθηκαν σε FBS λόγω πρόσδεσης της αλβουμίνης στην επιφάνεια των λιποσωμάτων (Arnidaet al., 2011). Η επιφάνεια των λιποσωμάτων μετά την πρωτεϊνική σύνδεση μπορεί να παρουσιάσει τοπικά θετικό ή αρνητικό φορτίο, το οποίο εξαρτάται από τον προσανατολισμό των προσροφημένων πρωτεϊνικών μορίων.

Τέλος, τα PEG-λιποσώματα παρουσίασαν μείωση στο μέγεθος όταν εκτέθηκαν σε FBS. Αυτή η μείωση της υδροδυναμικής διαμέτρου εξηγείται με βάση την χαμηλή διαπερατότητα της μεμβράνης σε πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται οσμωτικές δυνάμεις, οι οποίες προκαλούν εκκένωση του ύδατος από τον πυρήνα των λιποσωμάτων (Wolfram et al., 2014b). Σε σύγκριση με τα αποτελέσματά μας σε υδατικά μέσα, παρατηρήσαμε ότι η μεταβολή του μεγέθους σωματιδίων των λιποσωμικών διασπορών σε FBS συσχετίστηκε με τη μεταβολή της συγκέντρωσης λιπιδίων για όλα τα λιποσώματα. Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί ότι τόσο τα DPPC όσο και τα HSPC λιποσώματα που περιέχουν PEG-lipid conjugates παρεμποδίζουν την προσρόφηση πρωτεϊνών λόγω της στερεοχημικής σταθεροποίησης, όπως φαίνεται και στις *in vivo* μελέτες (Santos κ.ά., 2007, Semple κ.ά., 1998). Εντούτοις, δεν ήταν θερμοδυναμικά σταθερά σε βάθος χρόνου στο υδατικό μέσο, σε αντίθεση με τα λιποσώματα που περιείχαν PEG-lipid conjugates και χοληστερόλη. Είναι σαφές ότι η χοληστερόλη συμβάλλει στο σχηματισμό σταθερών και ομοιογενών λιπιδικών δομών αυξάνοντας τη συνοχή των λιπιδίων (Frank K. et al 1995). Κατά συνέπεια, οι αλυσίδες της πολυαιθυλενογλυκόλης και η χοληστερόλη είναι κρίσιμοι παράγοντες στο σχεδιασμό λιποσωμικών συστημάτων με βελτιωμένη σταθερότητα και παρατεταμένο χρόνο κυκλοφορίας.

Συνοψίζοντας, καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα (i) το ζ-δυναμικό μεταβάλλεται μετά από την επώαση με FBS παίρνοντας πιο αρνητικές τιμές, (ii) ο δείκτης πολυδιασποράς

αυξάνεται (iii) παρατηρείται αύξηση ή μείωση του μεγέθους των λιποσωμάτων εξαιτίας της πρωτεϊνικής σύνδεσης ή οσμωτικών δυνάμεων, αντίστοιχα. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι αλλαγές στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά *in vitro* συμφωνούν με τα αποτελέσματα *in vivo* άλλων μελετών (Hadjidemetriou et al., 2015).

6.3. Fraction of stealthiness (F_s)

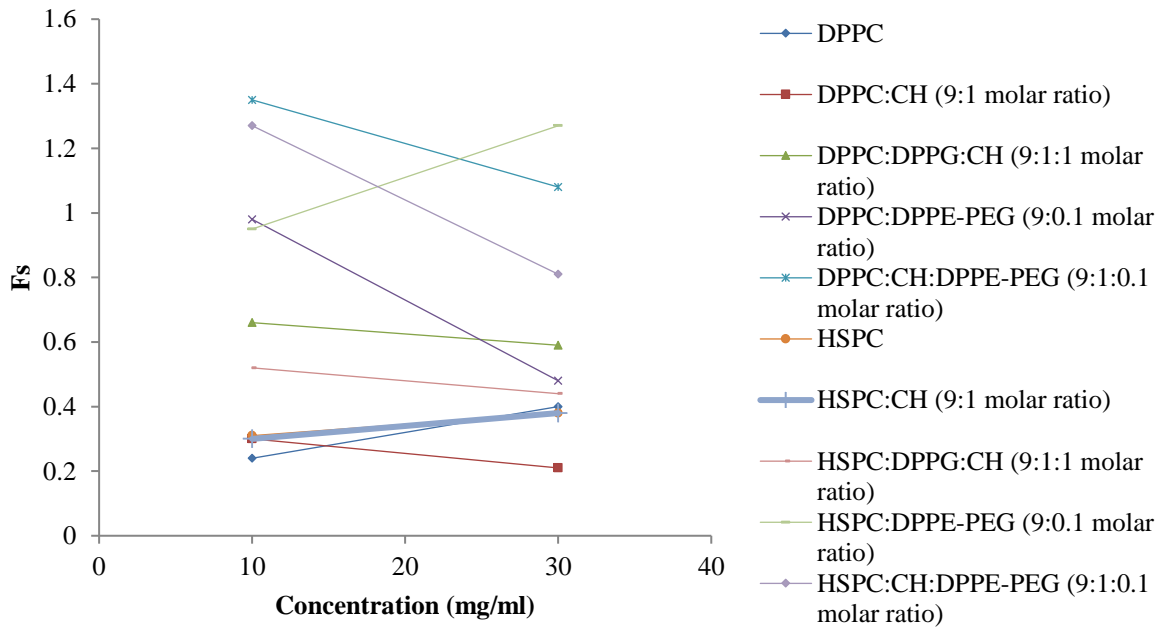
Στη μελέτη μας διερευνώνται ο σχηματισμός του πρωτεϊνικού << στέμματος >> (protein corona) και η μεταβολή των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών, όπως το μέγεθος και το επιφανειακό φορτίο, εξαιτίας της πρωτεϊνικής προσροφησης. Το μέγεθος (υδροδυναμική διάμετρος) των λιποσωμάτων εξετάστηκε πριν και μετά την αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες του FBS. Εισάγουμε μια νέα παράμετρο, the fraction of stealthiness (F_s), η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της έκτασης της πρωτεϊνικής σύνδεσης. Η εξίσωση του F_s παρουσιάζεται παρακάτω:

$$F_s = \frac{D_{h(H_2O)}}{D_{h(FBS)}} \quad (10)$$

όπου $D_{h(H_2O)}$ είναι η υδροδυναμική διάμετρος στο νερό βαθμού HPLC καθαρότητας, δηλαδή πριν από την επώαση και η $D_{h(FBS)}$ είναι η υδροδυναμική διάμετρος μετά την επώαση σε FBS. Αυτή η νέα παράμετρος βασίζεται στην ιδέα ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών ορού και λιποσωμάτων μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα δύο επιδράσεις, την αύξηση του μεγέθους λόγω της πρωτεϊνικής σύνδεσης επί της επιφάνειας ή την μείωση του μεγέθους λόγω μιας οσμωτικά οδηγούμενης εκκένωσης νερού από το εσωτερικό πυρήνα του λιποσώματος. Αυτό το κλάσμα είναι ευαίσθητο στις μεταβολές του μεγέθους των λιποσωμάτων παρουσία πρωτεϊνών πλάσματος και οι τιμές εκφράζονται ως ο λόγος της αρχικής τιμής της υδροδυναμικής διαμέτρου σε υδατικό μέσο προς τη τιμή της υδροδυναμικής διαμέτρου μετά την επώαση σε βιολογικό μέσο. Όταν η τιμή F_s ισούται με 1, τότε τα λιποσώματα έχουν ιδιότητες << stealth >> και είναι σταθερό στην παρουσία πρωτεϊνών που διατηρούν τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά. Αντίθετα, όταν η τιμή F_s είναι κοντά στο 0, τα λιποσωματικά συστήματα είναι ασταθή και παρατηρούνται φαινόμενα συσσώματωσης (aggregation) και προσρόφησης πρωτεΐνης (protein adsorption). Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 27, τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι τα λιποσώματα DPPC, HSPC, DPPC: CH (9: 1:1 μοριακή αναλογία) και HSPC: CH (9: 1 μοριακή αναλογία) παρουσιάζουν εκτεταμένη πρωτεϊνική σύνδεση, δεδομένου ότι οι τιμές F_s ήταν μεταξύ 0.5-0. Από την άλλη πλευρά, οι τιμές F_s για DPPC: DPPG: CH (9:1:1 μοριακή αναλογία) και

HSPC: DPPG: CH (9:1:1 μοριακή αναλογία) λιποσώματα ήταν μεταξύ 0.5-0.7. Συνεπώς, δεν υπήρχε εκτεταμένη προσρόφηση πρωτεϊνών, λόγω των αρνητικά φορτισμένων λιπιδίων DPPG και πιθανώς εξαιτίας της επίδρασης της χοληστερόλης. Η χοληστερόλη έχει δείξει ότι μειώνει τη διαπερατότητα των μεμβρανών στις πρωτεΐνες, εμποδίζει τις αλληλεπιδράσεις λιπιδίων-πρωτεϊνών και παρέχει μεγάλη σταθερότητα *in vitro* και *in vivo*. Έχει αναφερθεί ότι τα λιποσώματα που περιέχουν χοληστερόλη επιδεικνύουν χαμηλό ρυθμό κάθαρσης και παρατεταμένο χρόνο κυκλοφορίας σε σύγκριση με τα λιποσώματα χωρίς χοληστερόλη (Semple et al., 1995; Patel et al., 1983; Kirby et al., 1979; Roerdink et al., 1989). Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν ότι πράγματι η χοληστερόλη έχει μεγάλη επίδραση στην σταθερότητα των λιποσωμάτων και ίσως εμποδίζει την απορρόφηση πρωτεϊνών στην επιφάνεια των λιποσωμάτων. Επιπροσθέτως, η παρούσα μελέτη καταδεικνύει ότι οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-λιπιδίων παρεμποδίστηκαν από την παρουσία ανιονικών λιπιδίων DPPG. Τα ανιονικά λιποσώματα έχουν αποδειχθεί σταθερά σε βιολογικά μέσα υπό *in vitro* συνθήκες (Mahmoud M. et al., 2011), ενώ η *in vivo* σταθερότητα αμφισβητείται και παραμένει υπό μελέτη. Τα αρνητικά φορτισμένα λιποσώματα ανάλογα με την αλκυλική αλυσίδα και την ομάδα κεφαλής φωσφολιπιδίου μπορούν να αποτρέψουν ή να ενισχύσουν τη πρόσληψη λιποσωμάτων (Juliano et al., 1975; Yukihiro et al. 1995). Ωστόσο, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η ενσωμάτωση ανιονικών λιπιδίων, όπως λιπίδια φωσφατιδυλογλυκερόλης, με αρνητικές και υδρόφιλες ιδιότητες μπορεί να οδηγήσει σε βιολογικά σταθερότητα (Gabizon et al., 1991; Marzban et al., 2015; Semple et al., 1998). Επιπλέον, τα DPPC: DPPE-PEG (9: 0.1 μοριακή αναλογία), HSPC: DPPE-PEG (9: 0.1 μοριακή αναλογία), DPPC: CH: DPPE-PEG (9:1:0.1 μοριακή αναλογία) και HSPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 μοριακή αναλογία) συστήματα πήραν τιμές Fs κοντά στο 1, αποδεικνύοντας ότι τα stealth λιποσώματα μπορούν να αποτρέψουν την πρόσδεση πρωτεϊνών και να αντισταθούν στη φαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα. Επιπλέον, όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 11, εξετάζουμε τη σχέση μεταξύ Fs και λιπιδικής συγκέντρωσης. Όπως δείχνεται στον Πίνακα 27, οι τιμές της κλίσης της ευθείας για τα DPPC: CH (9: 1 μοριακή αναλογία), DPPC: DPPG: CH (9:1:1 μοριακή αναλογία), DPPC: DPPE-PEG (9:0.1 μοριακή αναλογία) DPPC: CH: DPPE-PEG (9: 1: 0.1 μοριακή αναλογία) είναι αρνητικές ($\alpha < 0$). Οι παρατηρήσεις αυτές καταδεικνύουν ότι η δέσμευση της πρωτεΐνης ενισχύεται με την αύξηση της συγκέντρωσης. Το αντίθετο φαινόμενο παρατηρήθηκε για τα λιποσώματα σύστασης DPPC. Επιπλέον, περισσότερες πρωτεΐνες προσδέθηκαν στα συστήματα HSPC και HSPC: CH (9:1 μοριακή αναλογία) χαμηλότερης συγκέντρωσης ($\alpha > 0$) μετά από επώαση με FBS, ενώ τα HSPC: DPPC: CH (μοριακός λόγος 9: 1), HSPC: DPPE-PEG (μοριακός λόγος 9: 0,1) και HSPC: CH: DPPE-

PEG (μοριακός λόγος 9: 1: 0.1) παρουσιάζουν μεγαλύτερη απορρόφηση πρωτεΐνης στην υψηλότερη συγκέντρωση ($\alpha < 0$). Συμπερασματικά, όλα τα λιποσώματα αφενός παρουσιάζουν διαφορετική έκταση πρωτεϊνικής σύνδεσης αναλόγως τις μεταβολές της συγκέντρωσης, αφετέρου η αύξηση ή η μείωση της προσρόφησης πρωτεΐνης εξαρτάται από τη λιπιδική σύνθεση.



Διάγραμμα 11 : : Η μεταβολή του παράγοντα αορατότητας (Fraction of stealthiness - F_s) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση μετά από επώαση σε βιολογικό μέσο για όλα τα λιποσώματα.

Πίνακας 27: Οι τιμές του Fraction of stealthiness (F_s) και οι εξισώσεις των ευθειών των λιποσωμάτων διαφορετικής συγκέντρωσης και σύστασης.

Λιποσωματικά συστήματα σύστασης	Λιπιδική συγκέντρωση (mg/ml)	Fraction of stealthiness (F_s)	Εξίσωση ευθείας ($y=ax + \beta$)
DPPC	10	0.24	$y = 0.016x + 0.79$
	30	0.40	
DPPC:CH (9:1 μοριακή αναλογία)	10	0.30	$y = -0.004x + 0.345$
	30	0.21	
DPPC:CH:DPPG (9:1:1 μοριακή αναλογία)	10	0.66	$y = -0.003x + 0.695$
	30	0.59	
DPPC:DPPE-PEG (9:0.1 μοριακή αναλογία)	10	0.98	$y = -0.025x + 1.23$
	30	0.48	
DPPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 μοριακή αναλογία)	10	1.35	$y = -0.013x + 1.485$
	30	1.08	
HSPC	10	0.31	$y = 0.003x + 0.275$
	30	0.38	
HSPC:CH (9:1 μοριακή αναλογία)	10	0.30	$y = 0.004x + 0.26$
	30	0.38	
HSPC:CH:DPPG (9:1:1 μοριακή αναλογία)	10	0.52	$y = -0.004x + 0.56$
	30	0.44	
HSPC:DPPE-PEG (9:0.1 μοριακή αναλογία)	10	0.95	$y = 0.016x + 0.79$
	30	1.27	
HSPC:CH:DPPE-PEG (9:1:0.1 μοριακή αναλογία)	10	1.27	$y = -0.023x + 1.5$
	30	0.81	

7. Συμπεράσματα

Παρουσία βιολογικού μέσου, τα λιποσώματα DPPC, HSPC, DPPC: CH (9: 1 μοριακή αναλογία) και HSPC: CH (9: 1 μοριακή αναλογία) παρουσιάζουν τροποποιημένες φυσικοχημικές ιδιότητες. Ωστόσο, τα PEGυλιωμένα λιποσώματα διατηρούν τόσο τα χαρακτηριστικά τους μετά την έκθεση τους σε FBS όσο και τη σταθερότητά τους σε υδατικό μέσο χάρη των στερικών δυνάμεων έναντι των πρωτεϊνών, αποτρέποντας την πρωτεϊνική σύνδεση και τη δημιουργία συσσωματωμάτων. Επιπλέον, τα ανιονικά λιποσώματα που ενσωματώνουν χοληστερόλη επιδεικνύουν μεγάλη σταθερότητα εξαιτίας του επιφανειακού φορτίου και της χοληστερόλης, η οποία προσδίδει λιποσωματική σταθεροποίηση και συμβάλλει στην πρόληψη της οψωνινοποίησης. Παράλληλα, υποδείξαμε μια νέα παράμετρο, το παράγοντα Fraction of stealthiness (F_s), η οποία δείχνει ότι τα λιποσώματα με PEG-lipid conjugates, καθώς και τα λιποσώματα με λιπίδια DPPG και χοληστερόλη έχουν stealth ιδιότητες που μειώνουν τη δέσμευση των πρωτεϊνών ($F_s = 1$). Τα λιπίδια DPPG οδηγούν σε αρνητικά φορτισμένα λιποσώματα (repulsive barrier) και αναστέλλοντας έτσι την πρωτεϊνική σύνδεση. Επιπροσθέτως, οι κλίσεις από τις γραφικές παραστάσεις της παραμέτρου F_s έναντι της συγκέντρωσης υποδεικνύουν ότι η πρωτεϊνική σύνδεση εξαρτάται από τις μεταβολές της συγκέντρωσης και το φαινόμενο του λυοτροπισμού, το οποίο θεωρείται ως κυρίαρχο στην περίπτωση των λιποσωματικών συστημάτων. Αυτό το αποτέλεσμα στη μελέτη μας υποστηρίζεται από το γεγονός ότι ο παράγοντας F_s μεταβλήθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (δηλ. 30 mg / ml) αντίθετα προς αυτό σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (δηλ. 10 mg / ml) στις οποίες παραμένει ανεπηρέαστος [π.χ. DPPC : CH (9:1) και HSPC : CH (9:1)]. Αυτό το φαινόμενο οφείλεται στη λυοτροπική επίδραση της χοληστερόλης στις λιπιδικές διπλοστοιβάδες των λιποσωμάτων. Αυτή η επίδραση θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την ανάπτυξη και την αξιολόγηση των λιποσωμάτων καθώς φαίνεται να επηρεάζει τη βιολογική τους σταθερότητα και κατά συνέπεια την αποτελεσματικότητά τους ως νανοσυστήματα χορήγησης φαρμάκων. Ωστόσο, πρέπει να θεωρήσουμε ως βασικό ερώτημα την ισορροπία μεταξύ του λυοτροπισμού, που είναι ένα ποιοτικό βιοφυσικό φαινόμενο, και φυσικοχημικών μετρήσεων των λιποσωματικών συστημάτων, προκειμένου να εξάγουμε συμπεράσματα που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως χάρτης στη διαδικασία ανάπτυξης των λιποσωματικών φορέων φαρμάκων. Συμπερασματικά, αυτή η μελέτη στοχεύει στη μελέτη των παραγόντων που παίζουν καθοριστικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών και της λιποσωματικής επιφάνειας, καθώς και της επίδρασης της δέσμευσης των πρωτεϊνών στα

φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των λιποσωμάτων και επομένως, στη βιολογική τους συμπεριφορά.

Βιβλιογραφία

Absolom DR. Opsonins and dysopsonins: An overview. *Methods Enzymol.* 1986;132:281-318.

Aderem, A. Underhill, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 593–623 (1999).

Aggarwal,P., Hall,J.B., McLeland, C.B., Dobrovolskaia, M.A., McNeil S.E.,2009. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv Drug Deliv Rev.* 61(6):428-37.

Akbarzadeh A, Rogaie Rezaei-Sadabady , Soodabeh Davaran, Sang Woo Joo, Nosratollah Zarghami, Younes Hanifehpour,Mohammad Samiei,Mohammad Kouhi,Kazem Nejati-Koshki. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett.* 2013 Feb 22;8(1):102.

Allen T.M., Cullis P.R. (2013). Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 65:36-4.

Allen TM, Hansen C, Rutledge J.Liposomes with prolonged circulation times: factors affecting uptake by reticuloendothelial and other tissues. *Biochim Biophys Acta.* 1989 May 19;981(1):27-35.

ArnidaJanát-Amsbury, M.M., Ray, A., Peterson, C.M., Chandehari, H., 2011. Geometry and surface characteristics of gold nanoparticles influence their distribution and uptake by macrophages. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 77, 417–423.

Amoozgar Z, Yeo Y. Recent advances in stealth coating of nanoparticle drug delivery systems. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2012 Mar-Apr;4(2):219-33.

Balazs DA, WT. Godbey· Liposomes for Use in Gene Delivery. *J Drug Deliv.* 2011;2011:326497.

Bangham AD, Hill MW, Miller NG. Preparation and use of liposomes as models of biological membranes. In: Korn ED, editor. *Methods in Membrane Biology.* Vol. 1. New York: Plenum; 1974. pp. 1–68.

Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C. (1965). Diffusion of Univalent Ions across the Lamellae of Swollen Phospholipids. *J Mol Biol*, 13:238-252.

Barenholz Y. 2007. Liposome technology. In: Gregoriadis G, editor. Vol. II. 3rd ed., New York: Informa. p 1–25.

Behzadi S, Serpooshan V, Sakhtianchi R, Müller B, Landfester K, Crespy D, Mahmoudi M. Protein corona change the drug release profile of nanocarriers: the "overlooked" factor at the nanobio interface. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014 Nov 1;123:143-9.

Blander, J. M. & Medzhitov, R. On regulation of phagosome maturation and antigen presentation. *Nat. Immunol.* 7, 1029–1035 (2006).

Bonté, F., Juliano, R.L., 1986. Interactions of liposomes with serum proteins. *Chem.Phys. Lipids* 40, 359–372.

Bozzuto G, Agnese Molinari. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine*. 2015 Feb 2;10:975-99.

Briuglia ML, Rotella C, McFarlane A, LamprouDA., 2015. Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release, *Drug DelivTransl Res*. 5(3):231-42.

Casals E, Pfaller T, Duschl A, Oostingh GJ, Puentes V. Time evolution of the nanoparticle protein corona. *ACS Nano* 4(7), 3623–3632 (2010).

Cattel L, Ceruti M, Dosio F. From conventional to stealth liposomes: a new Frontier in cancer chemotherapy. *J Chemother*. 2004;16(4):94–7.

Capriotti, A.L., Garacciolo, G., Gavalieri, C., Foglia, P., Pozzi, D., Samperi, R., Laganá, A., 2012. Do plasma proteins distinguish between liposomes of varying charge density? *J. Proteomics* 75, 1924–1932.

Caracciolo G., 2015. Liposome-protein corona in a physiological environment: challenges and opportunities for targeted delivery of nanomedicines. *Nanomedicine*. 11(3):543-57.

Cedervall T, Lynch I, Lindman S et al. Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104(7), 2050–2055 (2007).

Charbonneau DM, Tajmir-Riahi HA. Study on the interaction of cationic lipids with bovine serum albumin. *J. Phys. Chem. B*, 2010, 114 (2), pp 1148–1155.

Charbonneau D, Beauregard M, Tajmir-Riahi HA. Structural analysis of human serum albumin complexes with cationic lipids. *J Phys Chem B*. 2009 Feb 12;113(6):1777-84.

Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:333-66.

Colley CM, Brenda E. Ryman. The liposome: From membrane model to therapeutic agent. *Trends in Biochemical Sciences* Volume 1, Issue 9, September 1976, Pages 203-205

Conner, S. D. & Schmid, S. L. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37–44 (2003).

Corbo C, Molinaro R, Tabatabaei M, Farokhzad OC, Mahmoudi M. Personalized protein corona on nanoparticles and its clinical implications. *Biomater Sci*. 2017 Feb 28;5(3):378-387.

Dams, E. T., Laverman, P., Oyen, W. J., Storm, G., Scherphof, G. L., van Der Meer, J. W., et al. (2000). Accelerated blood clearance and altered biodistribution of repeated injections of sterically stabilized liposomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292, 1071–1079.

Deng Z, Mingtao Liang, Michael Monteiro, Istvan Toth, Rodney F. Minchin. Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation. *Nature Nanotechnology* volume6, pages39–44 (2011)

Derjaguin BV, Landau LD. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of adhesion of strongly charged particles in solution of electrolytes. *Acta Physicochim URSS*. 1941;14:633–62. 17.

Dimitrova, M.N., Tsekov, R., Matsumura, H., Fussawa, K., 2000. Size dependence of protein-induced flocculation of phosphatidylcholine liposomes. *J. Colloid Interface Sci.* 226, 44–50.

Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature Nanotechnology* volume2, pages469–478 (2007).

Dobrovolskaia MA, Germolec DR, Weaver JL. Evaluation of nanoparticle immunotoxicity. *Nat. Nanotechnol.* 4(7), 411–414 (2009).

Dockal M, Carter DC, Rüker F. The three recombinant domains of human serum albumin. Structural characterization and ligand binding properties. *J Biol Chem.* 1999 Oct 8;274(41):29303-10.

Dominguez-Medina S, Jan Blankenburg, Jana Olson, Christy F. Landes, Stephan Link. Adsorption of a Protein Monolayer via Hydrophobic Interactions Prevents Nanoparticle Aggregation under Harsh Environmental Conditions. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 2013, 1 (7), pp 833–842.

Duan X, Li Y. Physicochemical characteristics of nanoparticles affect circulation, biodistribution, cellular internalization, and trafficking. *Small.* 2013 May 27;9(9-10):1521-32.

Fan Y., Zhang Q. Development of liposomal formulations: From concept to clinical investigations. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* Volume 8, Issue 2, April 2013, Pages 81-87.

Fasano M, Curry S, Terreno E, Galliano M, Fanali G, Narciso P, Notari S, Ascenzi P. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life.* 2005 Dec;57(12):787-96.

Funato K. Contribution of complement system on destabilization of liposomes composed of hydrogenated egg phosphatidylcholine in rat fresh plasma. *Biochim Biophys Acta.* 1992.

Gabizon A. In: *Drug Carrier Systems.* Roerdink FHD, Kron AM, editor. Chichester: Wiley; 1989. Liposomes as a drug delivery system in cancer therapy; pp. 185–211.

Gao H, He Q. The interaction of nanoparticles with plasma proteins and the consequent influence on nanoparticles behavior. *Expert Opin Drug Deliv.* 2014 Mar;11(3):409-20.

Ge C, Jiangfeng Du, Lina Zhao, Liming Wang, Ying Liu, Denghua Li, Yanlian Yang, Ruhong Zhou, Yuliang Zhao, Zhifang Chai, Chunying Chen. Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. *PNAS* October 11, 2011. 108 (41) 16968-16973.

Gregoriadis, G., 1999. Long Circulating Liposomes: Evolution of the Concept. *Targeting of Drugs* 6, 1998.

Gustafson HH, Dolly Holt-Casper, David W. Grainger, Hamidreza Ghandehari. Nanoparticle Uptake: The Phagocyte Problem. *Nano Today*. 2015 Aug;10(4):487-510.

Harashima H, Matsuo H, Kiwada H. Identification of proteins mediating clearance of liposomes using a liver perfusion system. *Adv Drug Delivery Rev*. 1998;32:61–79

Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials* Volume 24, Issue 23, October 2003, Pages 4283-4300.

Hua, S., and Wu, S. Y. (2013). The use of lipid-based nanocarriers for targeted pain therapies. *Front. Pharmacol*. 4:143.

Hung, W., Lee, M., Chen, F., and Huang, H., 2007. The Condensing Effect of Cholesterol in Lipid Bilayers, *Biophys J*. 92(11): 3960–3967.

Hupfeld S., H.H. Moen, D. Ausbacher, H. Haas, M. Brandl, Liposome fractionation and size analysis by asymmetrical flow field-flow fractionation/multi-angle light scattering: influence of ionic strength and osmotic pressure of the carrier liquid, *Chem. Phys. Lipids*. 163 (2010) 141–147.

Ishida T., Masuda K., Ichikawa T., Ichihara M., Irimura K., Kiwada H. (2003). Accelerated clearance of a injection of PEGylated liposomes in mice. *Int. J. Pharm*. 255, 167–174.

Ishida T., Ichihara M., Wang X., Yamamoto K., Kimura J., Majima E., et al. . (2006). Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes. *J. Control. Release* 112, 15–25.

Immordino M.L., Dosio F., Cattel L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomedicine*. 2006;1(3):297-315.

Jain S., Jain N.K. Liposomes as drug carrier. *Controlled and novel drug delivery*. 2nd ed. CBS publisher, New Delhi, 2002. p.304-52

Johnstone SA, Masin D, Mayer L, et al. Surface associated serum proteins inhibit the uptake of phosphatidylserine and poly(ethylene glycol) liposomes by mouse macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1513:25–37

Karlsson M, Lars-Göran Mårtensson, Bengt-Harald Jonsson, Uno Carlsson. Adsorption of Human Carbonic Anhydrase II Variants to Silica Nanoparticles Occur Stepwise: Binding Is Followed by Successive Conformational Changes to a Molten-Globule-like State. *Langmuir*, 2000, 16 (22), pp 8470–8479

Laouini A, C. Jaafar-Maalej, I. Limayem-Blouza, S. Sfar, C. Charcosset, H. Fessi. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, Volume 1, Number 2, December 2012, pp. 147-168(22).

Law, S.L., Lo, W.Y., Pai, S.H., The, G.W., Kou, F.Y., 1986. The adsorption of bovine serum albumin by liposomes. *Int. J. Pharm.* 32, 237–241.

Lee, YK., Choi, E., Webster, T.J., Kim, S., Khang, D., 2015. Effect of the protein corona on nanoparticles for modulating cytotoxicity and immunotoxicity, *Int J Nanomedicine*. 10: 97–113.

Lesniak, A. et al. Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells. *ACS Nano* 6, 5845–5857 (2012)

Li J, Xuling Wang, Ting Zhang, Chunling Wang, Zhenjun Huang, Xiang Luo, Yihui Deng. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* Volume 10, Issue 2, April 2015, Pages 81-98.

Lis, L.J., Kauffman, J.W., Shriver, D.F., 1976. Raman spectroscopic detection and examination of the interaction of amino acids, polypeptides and proteins with the phosphatidylcholine lamellar structure, *Biochim. Biophys. Acta* 436, 513–522.

Liu D, Liu F, Song YK. Recognition and clearance of liposomes containing phosphatidylserine are mediated by serum opsonin. *Biochim Biophys Acta*. 1995 Apr 12;1235(1):140-6

Liu D, Fang Yang, Fei Xiong, Ning Gu. The Smart Drug Delivery System and Its Clinical Potential. *Theranostics*. 2016; 6(9): 1306–1323.

Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105(38), 14265–14270 (2008).

Maeda H, Sawa T, Konno T. Mechanism of tumor targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS. *J Control Release*. 2001;74:47–61

Mahmoudi M, Abdelmonem AM, Behzadi S et al. Temperature: the “ignored” factor at the nanobio interface. *ACS Nano* 7(8), 6555–6562 (2013)

Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*. 2013; 229:176–185

Maiorano G, Sabella S, Sorce B et al. Effects of cell culture media on the dynamic formation of protein- nanoparticle complexes and influence on the cellular response. *ACS Nano* 4(12), 7481–7491 (2010)

McIntosh, T.J., 1978. The effect of cholesterol on the structure of phosphatidylcholine bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 513, 43–58

McIntosh TJ, Alan D. Magid, Sidney A. Simon. Cholesterol modifies the short-range repulsive interactions between phosphatidylcholine membranes. *Biochemistry*, 1989, 28 (1), pp 17–25.

Metso AJ, Zhao H, Tuunainen I, Kinnunen PK. Observation of the main phase transition of dinervonoylphosphocholine giant liposomes by fluorescence microscopy. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Jul 30;1713(2):83-91.

Meyer F, Berend Smit. Effect of cholesterol on the structure of a phospholipid bilayer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 10; 106(10): 3654–3658.

Mohammad J. Hajipour, Sophie Laurent, Afsaneh Aghaie, Farhad Rezaee, Morteza Mahmoudi. Personalized protein coronas: a “key” factor at the nanobiointerface. *Biomaterials Science* Issue 9, 2014.

Moghimi SM, Muir IS, Illum L, et al. Coating particles with a block copolymer (Poloxamine 908) suppresses opsonization but permits the activity of dysopsonins in the serum. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1179:157–65

Moghimi, S. M., and Hunter, A. C. (2001). Capture of stealth nanoparticles by the body's defences. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst*. 18, 527–550.

Moghimi SM, Szebeni J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog Lipid Res.* 2003;42(6):463–78.

Moghimi SM, Farhangrazi ZS. Nanomedicine and the complement paradigm. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2013 9 (4), 458-460

Morrow, M.R, Whitehead, J.P, D. Lu, 1992. Chain-length dependence of lipid bilayer properties near the liquid crystal to gel phase transition, *Biophys. J.*, 63, pp. 18–27

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8:958–969.

Mufamadi MS, Pillay V, Choonara YE, Du Toit LC, GirishModi G, Naidoo D, et al. A review on composite liposomal technologies for specialized drug delivery. *J Drug Delivery.* 2011;2011:939851–70.

Nahar M, Dutta T, Murugesan S, Asthana A, Mishra D, Rajkumar V, Tare M, Saraf S, Jain NK. Functional polymeric nanoparticles: an efficient and promising tool for active delivery of bioactives. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* (2006) 23(4), 259-318.

Nishikawa K. Scavenger receptor-mediated uptake and metabolism of lipid vesicles containing acidic phospholipids by mouse peritoneal macrophages. *J Biol Chem.* 1990;265:5226–31.

Nel AE, Mädler L, Velegol D et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nat. Mater.* 8(7), 543–557 (2009).

Okhil K.N., Awasthi, V., 2013. Surface Engineering of Liposomes for Stealth Behavior. *Pharmaceutics.* 5(4): 542–569.

Papahadjopoulos, D. et al., Effects of proteins on thermotropic phase transitions of phospholipid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, 401, 317, 1975.

Papahadjopoulos D, Allen T, Gabizon A, Mayhew E, MatthyayK,Huang K, Lee SK, Woodle MC, Lasic DD, RedemannC,Martin FJ. 1991. Sterically stabilized liposomes: Improvements in pharmacokinetics, tissue disposition and anti-tumour therapeutic efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:11460–11464.

Patil SD, Rhodes DG, Burgess DJ..Anionic liposomal delivery system for DNA transfection. AAPS J. 2004 Oct 15;6(4):29

Paula AJ, Araujo Júnior RT, Martinez DS, Paredes-Gamero EJ, Nader HB, Durán N, Justo GZ, Alves OL.Influence of protein corona on the transport of molecules into cells by mesoporous silica nanoparticles. ACS Appl. Mater. Interfaces, 2013, 5 (17), pp 8387–8393

Pencer J., G.F. White, F.R. Hallett, Osmotically induced shape changes of large unilamellar vesicles measured by dynamic light scattering, Biophys. J. 81 (2001) 2716–2728

Peetla C, Andrew Stine,Vinod Labhassetwar: Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery. Mol Pharm. 2009 Sep-Oct;6(5):1264-76.

Pippa, N., Pispas, S., Demetzos, C., 2012a. The fractal hologram and elucidation of the structure of liposomal carriers in aqueous and biological media, Int J Pharm 430(1-2):65-73.

Pippa, N., Pispas, S., Demetzos, C., 2012b. The delineation of the morphology of charged liposomal vectors via a fractal analysis in aqueous and biological media:Physicochemical and self-assembly studies, Int J Pharm. 437(1-2):264-74

Pozzi D, Caracciolo G, Capriotti AL, Cavaliere C, La Barbera G, Anchordoquy TJ, Laganà A.Surface chemistry and serum type both determine the nanoparticle–protein corona. J. Proteomics 119, 209–217 (2015).

Pozzi D, Colapicchioni VG et al. Effect of polyethyleneglycol (PEG) chain length on the bio–nano-interactions between PEGylated lipid nanoparticles and biological fluids: from nanostructure to uptake in cancer cells. Nanoscale 6(5), 2782–2792 (2014).

Rabinovich AL, Ripatti PO. On the conformational, physical properties and functions of polyunsaturated acyl chains. Biochim.Biophys Acta. 1991;1085:53–62.

Rahman, M., Laurent, S., Tawil, N., Yahia, L., Mahmoudi, M., 2013. Protein-Nanoparticle Interactions. The Bio-Nano Interface.pp. 21–44

Roerdink F, Nabila M. Wassef, Earl C. Richardson, Carl R. Alving. 1983. Effects of negatively charged lipids on phagocytosis of liposomes opsonized by complement. Biochim Biophys Acta. 1983 Sep 21;734(1):33-9.

Róg T, Pasenkiewicz-Gierula M, Vattulainen I, Karttunen M., 2009. Ordering effects of cholesterol and its analogues, *BiochimBiophys Acta*.1788(1):97-121.

Sabín, J., Prieto, G., Ruso, J.M., Hidalgo-Álvarez, R., Sarmiento, F., 2006. Size and stability of liposomes: a possible role of hydration and osmotic forces. *Eur. Phys. J. E* 20, 401–408.

Sabín J, Prieto G, Ruso JM, Messina PV, Salgado FJ, Nogueira M, Costas M, Sarmiento F., 2009. Interactions between DMPC liposomes and the serum blood proteins HSA and IgG, *J Phys Chem B*. 113(6):1655-61.

Samad A, Sultana Y, Aqil M. Liposomal drug delivery systems: an update review. *Curr Drug Deliv*. 2007;4(4):297–305.

Salmaso, S., Caliceti, P., 2013. Stealth Properties to Improve Therapeutic Efficacy of Drug Nanocarriers. *Journal of Drug Delivery*, Volume 2013.

Saptarshi SR, Duschl A, Lopata AL. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J. Nanobiotechnol*. 11(1), 26 (2013).

Satzer P, Frantisek Svec, Gerhard Sekot, Alois Jungbaue. Protein adsorption onto nanoparticles induces conformational changes: Particle size dependency, kinetics, and mechanisms. *Engineering in Life Sciences* Volume16, Issue3 April 2016 Pages 238-246.

Senior JH. Fate and behavior of liposomes in vivo: a review of controlling factors. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 1987;3:123–93.

Semple, S.C., Chonn, A., Cullis, P.R., 1998. Interactions of liposomes and lipid-based carrier systems with blood proteins: relation to clearance behavior in vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 32, 3–17.

Sercombe L, Tejaswi Veerati, Fatemeh Moheimani, Sherry Y. Wu, Anil K. Sood, Susan Hua. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Front Pharmacol*. 2015 Dec 1;6:286.

Sim, R. B. & Wallis, R. Surface properties: immune attack on nanoparticles. *Nature Nanotech*. 6, 80–81 (2011).

Soema PC, Willems GJ, Jiskoot W, Amorij JP, Kersten GF, 2015. Predicting the influence of liposomal lipid composition on liposome size, zeta potential and liposome-induced dendritic cell maturation using a design of experiments approach, *Eur J Pharm Biopharm.*94:427-35.

Tenzer S, Docter D, Rosfa S et al. Nanoparticle size is a critical physicochemical determinant of the human blood plasma corona: a comprehensive quantitative proteomic analysis. *ACS Nano* 5(9), 7155–7167 (2011).

Tierney, K.J., Block, D.E., Longo, M.L., 2005. Elasticity and phase behavior of DPPC membrane modulated by cholesterol, ergosterol and ethanol. *Biophys. J.* 89,2481–2493.

Torchilin V.P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov*, 4:145-160.

Tsunoda, T., Imura, T., Kadota, M., Yamazaki, T., Yamauchi, H., Kwon, K.O., Yokoyama, S., Sakai, H., Abe, M., 2001. Effects of lysozyme and bovine serum albumin on membrane characteristics of dipalmitoylphosphatidylglycerol liposomes. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 20, 155–163.

Vasir, J. K. Reddy M.K. and Labhasetwar V. D. Nanosystems in Drug Targeting: Opportunities and Challenges. *Current Nanoscience.* (2005), 1, 47-64.

Vauthier C, Persson B, Lindner P, Cabane B. Protein adsorption and complement activation for di-block copolymer nanoparticles. *Biomaterials*, Volume 32, Issue 6, February 2011, Pages 1646-1656

Verhoef JJ, Thomas J. Anchoroquy. Questioning the Use of PEGylation for Drug Delivery. *Drug Deliv Transl Res.* 2013 Dec;3(6):499-503.

Verwey EJB, Overbeek JTHG. Theory of the stability of lyophobic colloids. Amsterdam: Elsevier; 1948. p. 108.

Vroman, L., 1962. Effect of Adsorbed Proteins on the Wettability of Hydrophilic and Hydrophobic Solids. *Nature* 196, 476 – 477.

Vorobyov I, Toby W. Allen. On the role of anionic lipids in charged protein interactions with membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* Volume 1808, Issue 6, June 2011, Pages 1673-1683.

Walkey CD, Chan WC. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem. Soc. Rev.* 41(7), 2780–2799 (2012).

Webb MS, Harasym TO, Masin D, Bally MB, Mayer LD. Sphingomyelin-cholesterol liposomes significantly enhance the pharmacokinetic and therapeutic properties of vincristine in murine and human tumour models. *Br J Cancer.* 1995 Oct;72(4):896-904.

Wells MA, Abid A, Kennedy IM, Barakat AI. Serum proteins prevent aggregation of Fe₂O₃ and ZnO nanoparticles. *Nanotoxicology.* 2012 Dec;6:837-46.

Wolfram, J., Yong Yang, Shen, J., Moten, A., Chen, C., Shen, H., Ferrari, M. and Zhao, Y., 2014a. The nano-plasma interface: implications of the protein corona. *Colloids Surf B Biointerfaces* 17–24.

Wolfram, J., Suri, K., Yong Yang, Shen, J., Christian, C., Fresta, M., Zhao, Y., Shen, H., Ferrari, M., 2014b. Shrinkage of pegylated and non-pegylated liposomes in serum. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Volume 114.

Wu H, Wang P, Hu X, Dai Z, Zou X. Site-selective probe for investigating the asynchronous unfolding of domains in bovine serum albumin. *Talanta.* 2011 May 15;84(3):881-6.

Yan X, Scherphof GL, Kamps JA. Liposome opsonization. *J Liposome Res.* 2005;15(1-2):109-39.

Yeagle PL., 1985. Cholesterol and the cell membrane., *Biochim Biophys Acta.* 822(3-4):267-87.

Yeagle PL, A D Albert, K Boesze-Battaglia, J Young, and J Frye. Cholesterol dynamics in membranes. *Biophys J.* 1990 Mar; 57(3): 413–424.

Yin H, Chen R, Casey PS, Ke PC, Davis TP, Chen C. Reducing the cytotoxicity of ZnO nanoparticles by a pre-formed protein corona in a supplemented cell culture medium. *RSC Adv.* 5(90), 73963–73973 (2015).

Yokouchi, Y., Tsunoda, T., Imura, T., Yamauchi, H., Yokoyama, S., Sakai, H., Abe, M., 2001. Effect of adsorption of bovine serum albumin on liposomal membrane characteristics. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 20, 95–103.

Zanganeh S, Ryan Spitler, Mohsen Erfanzadeh,Alaaldin M. Alkilany, Morteza Mahmoudi.
Protein corona: Opportunities and challenges. The International Journal of Biochemistry &
Cell Biology, Volume 75, June 2016, Pages 143-147.