



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ & ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

**ΗΛΕΚΤΡΟΪΝΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΜΙΚΡΟ-/ΝΑΝΟΪΝΕΣ
ΩΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗΣ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗΣ
ΤΟΥ ΕΧΙΝΟΧΡΩΜΑΤΟΣ Α**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΓΙΑ ΤΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ
ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΜΑΥΡΟΓΙΩΡΓΗΣ

ΑΘΗΝΑ
ΙΟΥΛΙΟΣ 2022

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

Βασίλειος Ρούσσης

Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γεωργία Βαλσαμή

Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Βασίλειος Ρούσσης

Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευσταθία Ιωάννου

Αναπλ. Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε απομόνωση της βιοδραστικής κόκκινης χρωστικής εχινόχρωμα Α από αχινούς του γένους *Diadema* που συλλέχθηκαν από τον κόλπο του Αγίου Γεωργίου στο Καστελλόριζο, σε βάθος 1-5 m, τον Σεπτέμβριο του 2021.

Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν με τη τεχνική της ηλεκτροϊνοποίησης μικρο-/νανοΐνες από υδρόφοβα και υδρόφιλα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή χαμηλού κόστους, στις οποίες ενσωματώθηκε το εχινόχρωμα Α. Τα ηλεκτροϊνοποιημένα ικρίσματα μελετήθηκαν *in vitro* ως προς τον ρυθμό αποδέσμευσης του ενσωματωμένου εχινόχρωματος Α, καθώς και *ex vivo* ως προς τη διαπερατότητα του εχινόχρωματος Α χρησιμοποιώντας μεμβράνες που απομονώθηκαν από έντερο κουνελιών.

Για τον χαρακτηρισμό των μη υφάνσιμων υποστρωμάτων χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM), φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR), θερμοβαρυτική ανάλυση (TGA) και διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC). Το προφίλ αποδέσμευσης του εχινόχρωματος Α από τα ινώδη ικρίσματα μελετήθηκε με την διαδικασία διάλυσης (dissolution) σε υδατικά μέσα που προσομοιώνουν τα γαστρεντερικά υγρά του ανθρώπινου σώματος. Η μελέτη διαπερατότητας των ινών μελετήθηκε με κάθετα στατικά κύτταρα διάχυσης (Franz cells).

Τα διαφορετικά ινώδη σκευάσματα εμφάνισαν κυμαινόμενα ποσοστά αποδέσμευσης του εχινόχρωματος Α και επηρέασαν θετικά την σταθερότητα του στα υπό εξέταση υδατικά διαλύματα. Από τις μελέτες διαπερατότητας διαπιστώθηκε ότι η ενσωμάτωση του εχινόχρωματος Α στα μικρο-/νανοϊνώδη ικρίσματα αυξάνει την διαπερατότητα του από βιολογικές μεμβράνες.

ABSTRACT

In the framework of the present thesis, the bioactive red pigment echinochrome A was isolated from sea urchins of the genus *Diadema*, specimens of which were collected from Ag. Georgios bay in Kastellorizo, at a depth of 1-5 m, in September 2021.

Subsequently, micro-/nanofibrous matrices based on inexpensive biodegradable polymers of hydrophobic and hydrophilic nature were prepared using electrospinning, incorporating echinochrome A. The release rate of echinochrome A from the developed micro-/nanofibrous matrices was evaluated *in vitro*, whereas its permeability was investigated *ex vivo* using the small intestine of young rabbits as a membrane.

The morphological and physicochemical characterization of the electrospun patches was performed using scanning electron microscopy (SEM), FT-IR spectroscopy, thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC). Dissolution assays using gastrointestinal-like fluids were performed to evaluate the release rate of echinochrome A from the electrospun matrices. The permeability assay was performed in vertical Franz type diffusion cells.

The different formulations of the nonwoven fibrous matrices exhibited variable release rates of echinochrome A, positively affecting the stability of the active substance in aqueous media in all cases. In addition, the prepared micro-/nanofibrous scaffolds increased the permeation of echinochrome A across the rabbit intestinal mucosa.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Καθηγητή Βασίλειο Ρούσση και την Αναπλ. Καθηγήτρια Ευσταθία Ιωάννου για την επιλογή και την ανάθεση του θέματος, την υποστήριξη και την καθοδήγησή τους καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και για την ανάγνωση και αξιολόγηση της εργασίας μου, ως μέλη της τριμελούς επιτροπής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την Καθηγήτρια Γεωργία Βαλσαμή για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω ένα σημαντικό μέρος των πειραματικών διαδικασιών στο εργαστήριο της, για την καθοδήγηση της και για την ανάγνωση και αξιολόγηση της διπλωματικής μου εργασίας, ως μέλος της τριμελούς επιτροπής.

Ένα θερμό ευχαριστώ στον μεταδιδακτορικό ερευνητή Δρ. Στέφανο Κικιώνη για την πολύτιμη συμμετοχή του στις πειραματικές διαδικασίες, την βοήθεια, την καθοδήγηση, τις συμβουλές και την υποστήριξη του καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Παρασκευή Παπακυριακοπούλου για την πολύτιμη βοήθεια της, την καθοδήγηση της, όπως επίσης και για την συμμετοχή της στις πειραματικές διαδικασίες.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους του μεταπτυχιακούς φοιτητές, υποψήφιους διδάκτορες και μεταδιδακτορικούς ερευνητές και τεχνικούς του εργαστηρίου μας, τον καθένα και την καθεμία ξεχωριστά, για τη συναδελφικότητά τους, την συνεργασία και την βοήθειά τους καθ' όλη τη διάρκεια που παρέμεινα και εργάστηκα μαζί τους στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για τη κατανόηση και τη στήριξή τους καθ' όλη την διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	i
ABSTRACT.....	iii
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	v
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	vii
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	ix
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
1.1. Θαλάσσια Φαρμακογνωσία.....	1
1.2. Εχινόχρωμα Α.....	3
1.2.1. Εισαγωγικά στοιχεία.....	3
1.2.2. Ιστορική αναδρομή.....	4
1.2.3. Πηγές απομόνωσης του εχινόχρωματος Α.....	5
1.2.4. Ο ρόλος του εχινόχρωματος Α στους αχινούς.....	7
1.2.5. Βιολογικές δράσεις του εχινόχρωματος Α.....	9
1.2.6. Τοξικότητα του εχινόχρωματος Α.....	21
1.2.7. Το φάρμακο Histochrome.....	21
1.2.8. Το διατροφικό συμπλήρωμα Timarin.....	22
1.2.9. Το εχινόχρωμα Α σε άλλες φαρμακοτεχνικές μορφές.....	22
1.3. Μικρο-/νανοΐνες και ηλεκτροϊονοποίηση.....	23
1.3.1. Μικρο-/νανοΐνες.....	23
1.3.2. Εφαρμογές μικρο-/νανοϊνών.....	23
1.3.3. Ηλεκτροϊονοποίηση.....	25
1.3.4. Παράμετροι που επηρεάζουν την ηλεκτροϊονοποίηση.....	28
1.3.5. Παραλλαγές της ηλεκτροϊονοποίησης.....	34
1.4. Διαλυτότητα & διάλυση φαρμακευτικών ουσιών.....	36
1.4.1. Διαλυτότητα.....	36
1.4.2. Διάλυση – Ρυθμός διάλυσης.....	37
1.4.3. Μέθοδοι μελέτης διαδικασίας διάλυσης.....	38
1.5. Πειραματικές μέθοδοι για τη μελέτη της απορρόφησης με <i>ex vivo</i> μοντέλα.....	41
1.6. Σκοπός της μελέτης.....	43
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	45
2.1. Οργανολογία.....	45
2.2. Διαλύτες και χημικά αντιδραστήρια.....	47

2.3. Συλλογή του οργανισμού	47
2.4. Χρωματογραφικός διαχωρισμός και απομόνωση του εχινόχρωματος Α	47
2.5. Παρασκευή των μικρο-/νανοϊνών	52
2.6. Χαρακτηρισμός των μικρο-/νανοϊνών	54
2.7. Προετοιμασία για τις μελέτες διάλυσης και διαπερατότητας	55
2.8. Πειραματική διαδικασία για τη μελέτη διάλυσης.....	58
2.9. Πειραματική διαδικασία για τη μελέτη διαπερατότητας.....	60
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	63
3.1. Απομόνωση και ταυτοποίηση του μεταβολίτη εχινόχρωμα Α.....	63
3.2. Παραγωγή και χαρακτηρισμός ινών	64
3.3. <i>In vitro</i> μελέτη διάλυσης του εχινόχρωματος Α	70
3.4. <i>Ex vivo</i> μελέτη διαπερατότητας του εχινόχρωματος Α	82
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	87
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	89

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

$^1\text{H NMR}$	1D-NMR πείραμα πυρήνων υδρογόνου (πρωτονίου)
$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	διένυδρο κιτρικό νάτριο
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	ένυδρο κιτρικό οξύ
$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	δευτεριωμένη ακετόνη
CH_2Cl_2	διχλωρομεθάνιο
cHex	κυκλοεξάνιο
DSC	διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης
EchA	εχινόχρωμα A
EtOAc	οξικός αιθυλεστέρας
EtOH	αιθανόλη
H_2SO_4	θειικό οξύ
HCl	υδροχλώριο
IR	φασματοσκοπία υπέρυθρης ακτινοβολίας
<i>J</i>	σταθερά σύζευξης (σε Hz) (NMR)
KCl	χλωριούχο κάλιο
KH_2PO_4	δισόξινο φωσφορικό κάλιο
MeOH	μεθανόλη
MgSO_4	θειικό μαγνήσιο
Na_2HPO_4	φωσφορικό δινάτριο
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7-ένυδρο φωσφορικό δινάτριο
NaCl	χλωριούχο νάτριο
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	ένυδρο φωσφορικό νάτριο
NMR	φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance)
PCL	πολυ(ε-καπρολακτόνη)
PEO	πολυ(αιθυλενικό οξείδιο)
PLLA	πολυ(γαλακτικό οξύ)
PVA	πολυ(βινυλική αλκοόλη)
PVP	πολυ(βινυλοπυρρολιδόνη)
ROS	δραστικές μορφές οξυγόνου
SD	τυπική απόκλιση (Standard Deviation)
SEM	ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy)
TGA	θερμοσταθμική ή θερμοβαρυτική ανάλυση
TLC	χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography)
UV-Vis	φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατής ακτινοβολίας
δ	χημική μετατόπιση της απορρόφησης ενός πυρήνα σε σχέση με το τετραμεθυλοσιλάνιο (σε ppm) (NMR)

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

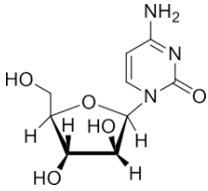
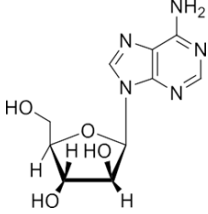
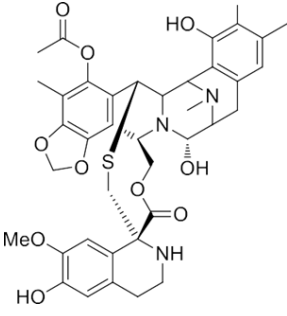
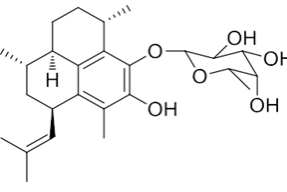
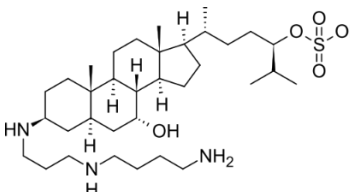
1.1. Θαλάσσια Φαρμακογνωσία

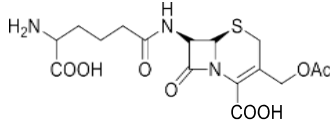
Στο θαλάσσιο περιβάλλον επικρατούν συνθήκες πολύ διαφορετικές από τις αντίστοιχες του χερσαίου περιβάλλοντος, με αποτέλεσμα οι δευτερογενείς μεταβολίτες που απομονώνονται από θαλάσσιους οργανισμούς να έχουν χημικούς σκελετούς και δραστικές ομάδες σπάνιες ή άγνωστες στους χερσαίους οργανισμούς. Καλύπτοντας περισσότερο από το 70% της επιφάνειας της γης, οι ωκεανοί αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο οικοσύστημα με υψηλή βιοποικιλότητα που μεταφράζεται σε υψηλή χημειοποικιλότητα. Παρόλο που τα περισσότερα φάρμακα εξακολουθούν να προέρχονται από χερσαίες πηγές, τα τελευταία χρόνια έχει εντοπιστεί ένας σημαντικός αριθμός φαρμάκων, υποψήφιων φαρμάκων και άλλων μεταβολιτών από θαλάσσιους οργανισμούς (Hu et al., 2011; Kiuru et al., 2014).

Η ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών ουσιών από θαλάσσιους οργανισμούς ξεκίνησε στα τέλη της δεκαετίας του 1950 με την ανακάλυψη των νουκλεοσιδίων σπογγοθυμιδίνη και σπογγουριδίνη που προέρχονται από θαλάσσιο σπόγγο *Cryptotethya crypta* (Bergmann & Feeney, 1951). Ακολούθησε η ανακάλυψη των φαρμακευτικών ουσιών Ara-A (βινταραμπίνη) και Ara-C (κυταραμπίνη) που είναι τα συνθετικά παράγωγα των νουκλεοσιδίων αυτών, και δρουν μπλοκάροντας τη λειτουργία της DNA πολυμεράσης, οι οποίες εμπορικά διατίθενται ως αντικόκ και αντικαρκινικός παράγοντας, αντίστοιχα (Stonik, 2009). Ορόσημο αποτέλεσε το ενδιαφέρον για τις φαρμακευτικές εφαρμογές των κωνοτοξινών, νευροτοξικών πεπτιδίων από γαστερόποδα του γένους *Conus*. Το ζικονοτίδιο, ένα πεπτίδιο 25 αμινοξικών καταλοίπων που απομονώθηκε από το *Conus majus*, συνδέεται επιλεκτικά με N-τύπου κανάλια ασβεστίου, εμποδίζοντας τη νευροδιαβίβαση και προκαλώντας ισχυρή αναλγητική δράση. Το Δεκέμβριο του 2004, η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) ενέκρινε τη χορήγησή του για την αντιμετώπιση σοβαρού χρόνιου πόνου σε ασθενείς με καρκίνο ή AIDS (Jones et al., 2006).

Περισσότερες από 38.000 ενώσεις θαλάσσιας προέλευσης είναι γνωστές και από το 2008 ανακαλύπτονται περισσότερες από 1.000 ενώσεις κάθε χρόνο. Συχνά, τα μόρια αυτά χαρακτηρίζονται από δομική καινοτομία, πολυπλοκότητα και ποικιλομορφία (Hu et al., 2011; Kiuru et al., 2014).

Πίνακας 1. Μεταβολίτες θαλάσσιας προέλευσης που αποτελούν δραστικά συστατικά εμπορικών σκευασμάτων.

Όνομασία	Οργανισμός	Δομή	Δράση
Cytarabine, Ara-C/ Cytosar-U, Depocyt	Σπόγγος <i>Tethya crypta</i>		Αντικαρκινική
Vidarabine, Ara-A/ Vira-A	Σπόγγος <i>Tethya crypta</i>		Αντιϊκή
Ziconotide/ Prialt	Γαστερόποδο <i>Conus magus</i>	H-Cys-Lys-Gly-Lys-Gly-Ala- Lys-CysSer-Arg-Leu-Met- Tyr-Asp-Cys-Cys-ThrGly-Ser- Cys-Arg-Ser-Gly-Lys- Cys-NH ₂	Αναλγητική
Trabectedin (ET-743)/ Yondelis	Ασκίδιο <i>Ecteinascidia turbinata</i>		Αντικαρκινική
Pseudopterosin E/ Resilience	Μαλακό κοράλλι <i>Pseudopteroqorgia elisabethae</i>		Αντιφλεγμονώδης
Σκουαλαμίνη	Ήπαρ του καρχαρία <i>Squalus acanthias</i>		Αντιβιοτική, κατά της εκφύλισης της ωχράς κηλίδας

Όνομασία	Οργανισμός	Δομή	Δράση
Καλιτονίνη σολομού/ miacalcin	Σολομός <i>Oncorhynchus</i> sp.	H-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr- CysVal-Leu-Gly-Lys-Leu- Ser- Gln-GluLeu-His-Lys-Leu-Gln- Thr-Tyr-ProArg- Thr-Asn-Thr- Gly-Ser-Gly-ThrPro-NH ₂	- Κατά της νόσου του Paget των οστών - Κατά της μετεμ- μηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης
Κεφαλοσπορίνη	Θαλάσσιος μύκητας <i>Cephalosporium acremonium</i>		Αντιβιοτική

1.2. Εχινόχρωμα Α

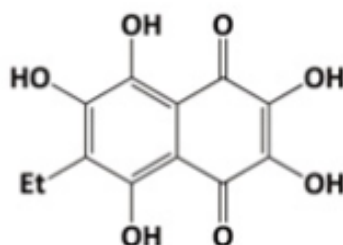
1.2.1. Εισαγωγικά στοιχεία

Οι αχινοί ανήκουν στα ασπόνδυλα ζώα της τάξης Echinoidea και μέχρι στιγμής έχουν βρεθεί περισσότερα από 800 είδη. Οι γονάδες τους με σχήμα ημισελήνου και κίτρινο-πορτοκαλί χρώμα, οι οποίες αντιστοιχούν μόλις στο 10% του συνολικού βάρους των αχινών, αποτελούν το βρώσιμο τμήμα των αχινών και είναι δημοφιλείς προς βρώση λόγω του ιδιαίτερου αρώματος και γεύσης που προσφέρουν. Το κέλυφος και τα αγκάθια των αχινών απορρίπτονται μετά την παραλαβή του βρώσιμου τμήματος ως παραπροϊόντα (Powell et al., 2014; Zhou et al., 2011).

Εκτός από τα καροτενοειδή και τη μελανίνη, που είναι ευρέως διαδεδομένα στο ζωικό βασίλειο, οι αχινοί παράγουν πολυϋδροξυναφθοκινόνες, μία ομάδα χρωστικών ασυνήθιστη στους υπόλοιπους ζωικούς οργανισμούς. Η παρουσία πολυϋδροξυλιωμένων ναφθοκινονών ως χρωστικές ενώσεις στους αχινούς είναι γνωστή και έχει μελετηθεί για χρόνια. Μερικές από αυτές ονομάζονται εχινόχρωμα (echinochromes) και σπινοχρώματα (spinochromes). Οι ναφθοκινόνες αυτές βρίσκονται στο κέλυφος και στα αγκάθια των αχινών και παρουσιάζουν εξαιρετικές αντιμικροβιακές και καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες. Έχει προταθεί η χρήση τους ως αντιοξειδωτικά με παρόμοιο τρόπο με τις πολυφαινολικές ενώσεις από τα φυτά. Έτσι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή αντιοξειδωτικών στα τρόφιμα ώστε να αντικατασταθούν τεχνητά αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται σήμερα στην βιομηχανία τροφίμων (Koltsova et al., 1981; Powell et al., 2014; Zhou et al., 2011).

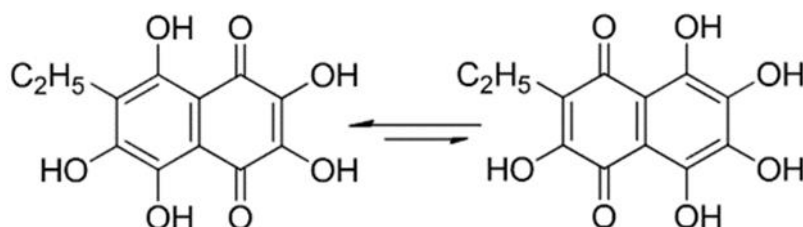
Το εχινόχρωμα Α (6-αιθυλο-2,3,5,7,8-πενταϋδροξυ-1,4-ναφθοκινόνη) ανήκει στη κατηγορία των πολυϋδροξυναφθοκινονών με μοριακό τύπο C₁₂H₁₀O₇ και είναι μία σκούρα

κόκκινη χρωστική ουσία που απομονώνεται κυρίως από το κέλυφος και τα αγκάθια των αχινών. Είναι αδιάλυτη στο νερό και στη καθαρή της μορφή κρυσταλλώνεται ως κόκκινες βελόνες με σημείο τήξης από τους 219 έως 221.5 °C (Artyukov et al., 2020; Millott, 1957; Mohamed, 2021; Park et al., 2021; Yun et al., 2021).



Εικόνα 1. Η χημική δομή του εχινόχρωματος Α.

Υπό διαφορετικές συνθήκες, το εχινόχρωμα Α μπορεί να υπάρχει ως μείγμα τεσσάρων ταυτομερικών μορφών. Ωστόσο, μόνο οι 1,4-ναφθοκινονικές μορφές με αιθύλιο στον δακτύλιο βενζολίου ή αιθύλιο στον κινονικό δακτύλιο είναι ενεργειακά ευνοϊκές (Mishchenko et al., 2020).



Εικόνα 2. Οι ταυτομερικές μορφές του εχινόχρωματος Α (Mishchenko et al., 2020).

1.2.2. Ιστορική αναδρομή

Το 1885 ο McMunn για πρώτη φορά περιέγραψε τη χρωστική που απομονώθηκε από τα κύτταρα στο υγρό της κοιλιομυϊκής κοιλότητας του *Echinus esculentus* και το ονόμασε εχινόχρωμα. Η χρωστική αυτή για πρώτη φορά απομονώθηκε σε κρυσταλλική μορφή το 1912 από τον McClendon από τις ωθήκες του *Arbacia pustulosa* και η δομή του αποδόθηκε το 1940 από τους Kuhn και Wallenfells, οι οποίοι απομόνωσαν το εχινόχρωμα Α μαζί με άλλες δύο παρόμοιες χρωστικές από τις γονάδες του *Paracentiotes lividus*. Η επιβεβαίωση της δομής πραγματοποιήθηκε το 1943 όταν οι Wallenfels και Gauh κατάφεραν να συνθέσουν το εχινόχρωμα Α. Η ανακάλυψη και άλλων ναφθοκινονών προκάλεσε σύγχυση στη σχετική

βιβλιογραφία για δύο λόγους: α) διαφορετικά ονόματα δόθηκαν σε διαφορετικές εποχές για την ίδια χρωστική και β) ήταν συχνό φαινόμενο τότε οι συγγραφείς να μην γνωρίζουν την συνωνυμία που υπάρχει στη συστηματική κατάταξη των αχινών. Έτσι υιοθετήθηκε η διαδικασία προσθήκης κάποιας κατάληξης, όπως για παράδειγμα A, B, C κ.λπ., μετά τους γενικούς όρους «echinochrome» και «spinochrome», σύμφωνα με τη σειρά που απομονώθηκαν για πρώτη φορά οι ουσίες, και όχι με βάση το είδος του αχινού από το οποίο απομονώθηκαν. Για το λόγο αυτό το όνομα της χρωστικής αυτής που βρίσκεται στα ερυθρά σφαιρικά κύτταρα επαναπροσδιορίστηκε από εχινόχρωμα σε εχινόχρωμα A (Goodwin & Srisukh, 1950; Service & Wardlaw, 1984).

Ιστορικά ο όρος «εχινόχρωμα» χρησιμοποιήθηκε για τη χρωστική εχινόχρωμα A, ενώ τα σπινοχρώματα για πρώτη φορά ανακαλύφθηκαν ως άλατα ασβεστίου στα αγκάθια και το κέλυφος των θαλάσσιων αχινών, και έτσι πήραν την ονομασία αυτή. Ωστόσο, το εχινόχρωμα A στην πραγματικότητα είναι μια διαδεδομένη χρωστική που προέρχεται από τα αγκάθια των αχινών και πρακτικά ανήκει στην κατηγορία των σπινοχρωμάτων (Shikov et al., 2018).

1.2.3. Πηγές απομόνωσης του εχινόχρωματος A

Το εχινόχρωμα A έχει απομονωθεί από τα αγκάθια, το κέλυφος, τα αυγά ή το υγρό της κοιλιομυϊκής κοιλότητας των αχινών των ειδών:

- *Psammechinus miliaris* που συλλέχθηκε στην θάλασσα της Σκωτίας (απαντάται συνήθως στο Ηνωμένο Βασίλειο, αλλά και στον Ατλαντικό ωκεανό από την Σκανδιναβία έως το Μαρόκο) (Powell et al., 2014).
- *Anthocidaris crassipina* (Powell et al., 2014).
- *Strongylocentrotus franciscanus* που συλλέχθηκε στην παλιρροιακή ζώνη του Newport της California (Johnson & Chapman, 1970).
- *Strongylocentrotus purpuratus* (Coates et al., 2018).
- *Echinus esculentus* (Coates et al., 2018).
- *Paracentrotus lividus*, το οποίο είναι ένα διαδεδομένο είδος στις ακτές του Ατλαντικού και της Μεσογείου (Coates et al., 2018).
- *Strongylocentrotus intermedius* (Shikov et al., 2017).
- *Scaphechinus mirabilis* (sand dollars) (Mishchenko et al., 2020)
- *Strongylocentrotus nudus* (ο μωβ αχινός είναι ένας από τους πιο δημοφιλείς βρώσιμους αχινούς στην Κίνα και στην Ιαπωνία και υπάρχει σε αφθονία στις ακτές του Νταλιάν) (Zhou et al., 2011).
- *Echinometra mathaei* (απαντάται σε αφθονία στις Ιρανικές ακτές του Περσικού κόλπου) (Soleimani et al., 2021).

- *Arbacia pustulosa* (Goodwin & Srisukh, 1950)
- *Echinarachnius parma* (Mishchenko et al., 2020).
- *Evechinus chloroticus* (ενδημικό στη Νέα Ζηλανδία) (Hou et al., 2020).
- *Diadema setosum*, *Diadema savignyi*, *Stomopneustes variolaris* και *Tripneustes gratilla* (βρίσκονται σε αφθονία στις θάλασσες της επαρχίας Khanh Hoa του Βιετνάμ) (Hieu et al., 2020)
- *Brisaster latifrons*, *Strongylocentrotus droebachiensis*, και *Strongylocentrotus polyacanthus*, που συλλέχθηκαν στις θάλασσες Okhotsk και Bering στο βόρειο Ειρηνικό (Vasileva et al., 2017).
- *Toxopneustes pileolus* (απαντάται στους κοραλλιογενείς υφάλους του Ινδικού Ωκεανού) (Brasseur et al., 2017) .
- *Mesocentrotus nudus* από τη θάλασσα της Ιαπωνίας και τη θάλασσα της Okhotsk (Vasileva et al., 2016).
- *Echinothrix diadema* και *Echinothrix calamaris*, οι οποίοι συλλέχθηκαν στο κόλπο Kaneohe του νησιού Οάχου στη Χαβάη (Moore et al., 1966).
- *Diadema antillarum* (Millott, 1957)
- *Echinocardium cordatum* (Soleimani et al., 2022.)



Εικόνα 3. Το είδος *Strongylocentrotus nudus*.



Εικόνα 4. Το είδος *Paracentrotus lividus*.



Εικόνα 5. Το είδος *Scaphechinus mirabilis*.

1.2.4. Ο ρόλος του εχινόχρωματος A στους αχινούς

Οι χρωστικές ενώσεις κινόνης είναι ιδιαίτερα βιοδραστικές και συχνά εμπλέκονται στη χημική άμυνα των οργανισμών. Μεταξύ αυτών είναι οι πολυϋδροξυαναφθοκινόνες, ενώσεις υπεύθυνες για τον χρωματισμό των αχινών, που έχουν δείξει ένα μεγάλο εύρος βιοχημικών επιδράσεων λόγω των δομών τους στην εξέλιξη και διαβίωση των αχινών. Η αντιοξειδωτική δράση υποδηλώνει τη συμμετοχή τους στην προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία. Εμπλέκονται επίσης στο ανοσοποιητικό σύστημα και κατά τη διάρκεια αναπαραγωγής των αχινών, με την παρουσία τους στο φλοιό των γαμετών και στα έμβρυα, μέσω των αντιβακτηριακών, προφλεγμονώδων και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους, παίζοντας σημαντικό ρόλο στον αμυντικό μηχανισμό και στις διατροφικές τους συνήθειες. Οι πολυϋδροξυαναφθοκινόνες περιέχονται στα ωκύτταρα και στα έμβρυα, κατά προτίμηση όταν η γαστρίδα μετατρέπεται σε πλουτέα (τελευταίο στάδιο της πρώιμης ανάπτυξης του εμβρύου του αχινού). Έτσι εικάζεται ότι οι αχινοί έχουν ανάγκη από αυτές τις ουσίες ήδη από τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης τους και πιθανόν αυτές να συμμετέχουν σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες τους (Brasseur et al., 2017; Brasseur et al., 2018; Koltsova et al., 1981).

Το εχινόχρωμα A εμφανίζεται και συσσωρεύεται κατά την ανάπτυξη των εμβρύων ως αδιάλυτα μετ' ασβεστίου και μαγνησίου άλατα. Μια ιδιαίτερα υψηλή αύξηση στη ποσότητα χρωστικών και κυρίως του εχινόχρωματος εμφανίζεται στους αχινούς στο στάδιο της πλουτέας, όταν οι προνύμφες εισέρχονται στη φάση του ενεργού μεταβολισμού και σχηματίζουν ασβεστοποιημένο σκελετό (Koltsova et al., 1981).

Η ανοσοποιητική άμυνα στους αχινούς βασίζεται στα κύτταρα του υγρού της κοιλιομυϊκής κοιλότητας και στους παρακείμενους ιστούς. Ο πιο εμβληματικός μορφότυπος αυτών των κυττάρων είναι τα κόκκινα σφαιρικά κύτταρα, τα οποία ονομάζονται έτσι λόγω της αφθονίας τους σε κυτταροπλασματικά κυστίδια που περιέχουν το εχινόχρωμα A. Όταν αυτά

τα κύτταρα εντοπίζουν μικρόβια, απελευθερώνουν εχινόχρωμα A για την απομάκρυνση του σιδήρου από το περιβάλλον. Σε παθολογικές καταστάσεις λειτουργούν για την πρόληψη της εξάπλωσης των μικροβίων και εκμεταλλεύονται τις ιδιότητες του εχινόχρωματος A στο να σαρώνει τις νιτρικές και οξειδωτικές ρίζες που παράγονται κατά την λειτουργία του ανοσοποιητικού. Έτσι, οι χηλικές ικανότητες του λειτουργούν ως αντιμικροβιακός παράγοντας και οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες μειώνουν την πιθανότητα εμφάνισης παράπλευρων ζημιών (Coates et al., 2018).

Παρατηρήθηκε ότι στα αγκάθια του είδους *Strongylocentrotus purpuratus* το εχινόχρωμα A κατανέμεται στα σημεία που έχουν υποστεί τραυματισμό κατά την διαδικασία της αναγέννησης τους και μελετήθηκε η σχέση μεταξύ της παραγωγής αυτής της χρωστικής με την ποσότητα φωτός που δέχεται ο οργανισμός. Σε πειράματα που έγιναν σε αχινούς με σπασμένα αγκάθια, όταν εκτέθηκαν σε συνθήκες φωτός τα αναγεννημένα κομμάτια ήταν μωβ χρώματος, ενώ όταν κρατήθηκαν στο σκοτάδι τα αναγεννημένα αγκάθια πήραν χρώμα ανοιχτού πράσινου. Έχει αναφερθεί επίσης ότι το εχινόχρωμα A εμποδίζει την ανάπτυξη κυανοβακτηρίων και αποτρέπει την μόλυνση του αχινού. Βέβαια ένας τέτοιος μηχανισμός προστασίας σε οργανισμούς που ζουν σε συνθήκες χωρίς φως όπου τα κυανοβακτήρια δεν αναπτύσσονται θα ήταν μικρής σημασίας. Για αυτό το λόγο συμπεραίνεται ότι αχινοί που ζουν σε συνθήκες με περισσότερο φως είναι πιο πιθανόν να περιέχουν εχινόχρωμα A (Johnson & Charman, 1970).



Εικόνα 6. Το είδος *Strongylocentrotus purpuratus*, ο μωβ αχινός της Καλιφόρνιας.

Η παραπάνω υπόθεση επιβεβαιώθηκε και από άλλες μελέτες. Για παράδειγμα, το είδος *Scaphechinus mirabilis* που εμφανίζεται σε μικρά βάθη έχει βρεθεί να περιέχει υψηλά ποσοστά εχινόχρωματος A, το είδος *Echinarachnius parma*, το οποίο εν μέρει θάβεται στην

άμμο, εμφανίζει λιγότερη ποσότητα, ενώ το είδος *Scaphechinus griseus* που θάβεται στην άμμο σε βάθος 4-5 cm δεν εμφανίζει καθόλου. Επίσης, η προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία που προσφέρουν οι ναφθοκινόνες μπορεί να εξηγήσει την ανάγκη κάποιων ειδών να καλύπτονται για να προστατευτούν, όπως για παράδειγμα τα είδη *Tripneustes gratilla* και *Tripneustes pileolus* που παρουσιάζουν σχετικά χαμηλή συγκέντρωση των χρωστικών αυτών (Brasseur et al., 2017; Koltsova et al., 1981).

1.2.5. Βιολογικές δράσεις του εχινοχρώματος A

1.2.5.1. Αντιοξειδωτική δράση

Λόγω των όξινων/βασικών ιδιοτήτων τους οι ναφθοκινόνες κατανέμονται και στο υδρόφοβο πυρήνα και στο υδρόφιλο περιβάλλον των μεμβρανών. Έτσι, οι ενώσεις αυτές, στις ανιοντικές και ουδέτερες μορφές τους εμπλέκονται στην απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών εισερχόμενες τόσο σε υδατικό όσο και σε λιπιδικό περιβάλλον (Lebedev et al., 2008).

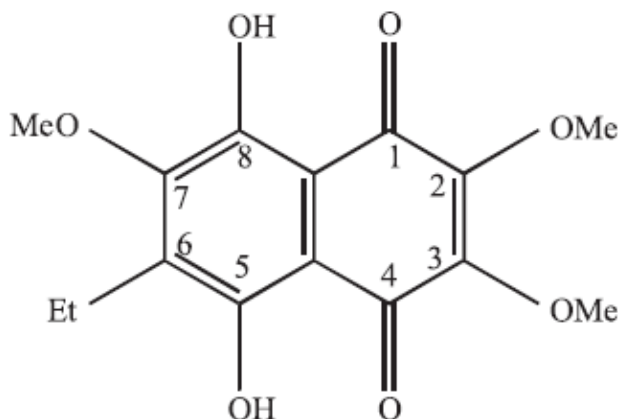
Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του εχινοχρώματος A συνδέονται με την σάρωση των ριζών υπεροξειδίου του υδρογόνου στα λιποσώματα, την σάρωση ριζών ανιόντων υπεροξειδίου και τη δέσμευση ιόντων σιδήρου σε ανενεργά σύμπλοκα στην υδατική φάση (Lebedev et al., 2001).

Λόγω της ομοιότητας που παρουσιάζει η δομή του εχινοχρώματος A με αυτή της βιταμίνη C, αναγνωρίζεται από τις εξωκυτταρικές πρωτεΐνες μεταφοράς της βιταμίνης C στο αίμα και διεισδύει στο κυτταρόπλασμα. Αλληλεπιδρά με το ένζυμο DT-διαφοράση, που εντοπίζεται στην εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης. Η διαδικασία αυτή συνοδεύεται από την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου το οποίο προκαλεί αύξηση των υπεροξεισώματων στα κύτταρα. Τα υπεροξεισώματα περιέχουν ένζυμα αντιοξειδωτικής προστασίας που εμποδίζουν την εμφάνιση οξειδωτικού στρες στα κύτταρα. Αυτή η υπόθεση βασίζεται στα αποτελέσματα προκλινικών δοκιμών του εχινοχρώματος A και της δεκαετούς πρακτικής εφαρμογής του στην ιατρική ως φάρμακο με την ονομασία Histrochrome (El'kin et al., 2011).

Η καρδιοπροστατευτική και αντιφλεγμονώδης δράση του δεν οφείλεται μόνο στις εξαιρετικές αντιοξειδωτικές του ικανότητες, αλλά και στην ικανότητά του να διατηρεί σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις τα μόρια υπεροξειδίου του υδρογόνου στα βιολογικά συστήματα, μόρια που αποτελούν αγγειοφόρους διάφορων μεταβολικών διεργασιών (Poron et al., 2017).

Σε πειράματα που έγιναν με το παράγωγο του εχινοχρώματος A 2,3,7-τριμεθοξυ-εχινόχρωμα δεν παρατηρήθηκε καμία αντιοξειδωτική δράση και η αναποτελεσματικότητα αυτή μπορεί να εξηγηθεί από τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ των υδροξυλίων

στους C-5 και C-8 με τα καρβονύλια C-1 και C-4 με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η μεταφορά υδρογόνου στις ρίζες. Έτσι συμπεραίνεται ότι οι υδροξυ-υποκαταστάτες στους C-2, C-3 και C-7 των ναφθοκινονών παίζουν βασικό ρόλο στη χηλικοποίηση ιόντων σιδήρου και στην σάρωση των ελεύθερων ριζών (Lebedev et al., 2005; Lebedev et al., 2008).



Εικόνα 7. Η χημική δομή του 2,3,7-τριμεθοξυ-εχινοχρώματος.

Χηλικοποίηση ιόντων σιδήρου

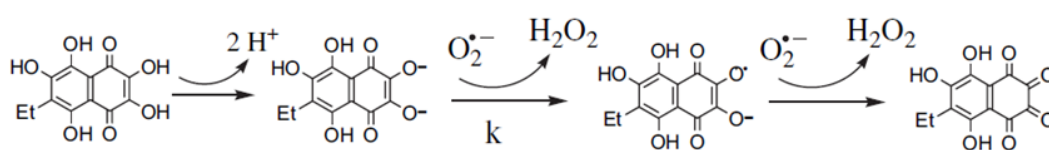
Τα ελεύθερα δισθενή ιόντα σιδήρου (ferrous) είναι ευαίσθητα στο οξυγόνο και δημιουργούν τρισθενή ιόντα σιδήρου (ferric) και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η αντίδραση δισθενών ιόντων σιδήρου με το υπεροξείδιο οδηγεί στη δημιουργία ριζών υδροξυλίου, που αποτελεί το πιο δραστικό και επιζήμιο είδος των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) στα βιολογικά συστήματα. Χηλικοί παράγοντες μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα με τα μεταλλικά ιόντα και έτσι να αναστείλουν την επαγόμενη οξείδωση που προκαλούν. Έτσι, οι ναφθοκινόνες που παρουσιάζουν ιδιότητες ασθενών οξέων και φέρουν υδροξυλομάδες σε ortho θέση, μπορούν στην μορφή δισθενών ιόντων σε ουδέτερο ή αλκαλικό περιβάλλον να σχηματίσουν χηλικές ενώσεις με τα ιόντα σιδήρου (Zhou et al., 2011).

Σε μορφή ανιόντων, οι ναφθοκινόνες είναι πιθανό να προσφέρουν δύο ηλεκτρόνια στα ιόντα τρισθενούς σιδήρου και να σχηματίζουν ναφθοτετρακετόνη σαν τελικό προϊόν της αντίδρασης. Σε φασματοφωτομετρική μελέτη βρέθηκε ότι το εχινόχρωμα Α σχηματίζει σύμπλοκα με τα ιόντα σιδήρου και η περαιτέρω αύξηση της αναλογίας [Fe]:[EchA] (σε περισσότερο από 2:1) οδηγεί σε καθίζηση των συμπλόκων που σχηματίζονται (Lebedev et al., 2005; Zhou et al., 2011).

Σάρωση ριζών υπεροξειδίου

Η διαλυτότητα του εχινόχρωματος Α στο νερό είναι υψηλότερη από τις αντίστοιχες

των άλλων λιποδιαλυτών αντιοξειδωτικών και το γεγονός αυτό το καθιστά ικανό σαρωτή των υδατοδιαλυτών ανιοντικών ριζών υπεροξειδίου. Η αντιοξειδωτική δράση των πολυϋδροξυναφθοκινονών έναντι του υπεροξειδίου εξετάστηκε στο σύστημα ξανθίνης/οξειδάσης ξανθίνης. Το εχινόχρωμα A και το σπινόχρωμα D εμφάνισαν τις υψηλότερες τιμές. Η αλληλεπίδραση του ανιόντος υπεροξειδίου με το εχινόχρωμα A μπορεί να θεωρηθεί ως αντίδραση δύο σταδίων, με την παραγωγή μιας ναφθομικινόνης ως ενδιάμεσο προϊόν και μιας τετρακετόνης ως κύριο σταθερό προϊόν (Lebedev et al., 2001; Lebedev et al., 2008).



Εικόνα 8. Η αλληλεπίδραση του εχινόχρωματος A με το ανιόν υπεροξειδίου (Lebedev et al., 2008).

Αναστολή της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων

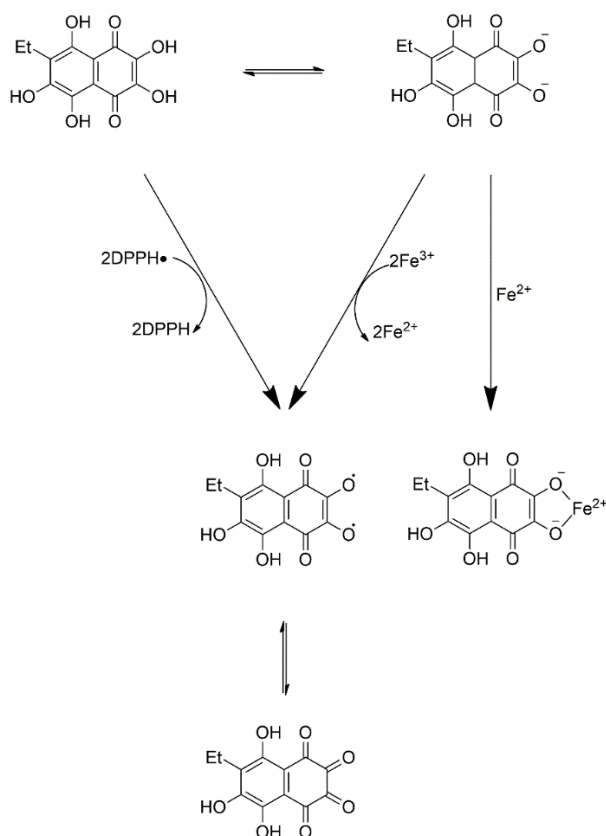
Στα βιολογικά συστήματα, οι ενεργές μορφές οξυγόνου αφαιρούν ένα άτομο υδρογόνου από μία ομάδα μεθυλενίου ενός ακόρεστου λιπαρού οξέος και στη συνέχεια σχηματίζουν ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίου του υδρογόνου. Μόλις σχηματιστούν αυτές οι ελεύθερες ρίζες, θα αποσυντεθούν σε διάφορα δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης, όπως η μαλονοδιαλδεΐδη (MDA) (Zhou et al., 2011).

Το εχινόχρωμα A παρουσίασε παρόμοια αποτελεσματικότητα στη σάρωση ριζών υπεροξειδίου του υδρογόνου με αυτή των πολυφαινολικών ενώσεων, των οποίων η ικανότητα οφείλεται στη μεταφορά ενός ατόμου υδρογόνου στις ρίζες προς το σχηματισμό αλκυλοϋδροϋπεροξειδίου (ROOH). Επέδειξε αντιοξειδωτική δράση και στα δύο μοντέλα λιποσωμικής οξείδωσης και η αποτελεσματικότητά του βρέθηκε παρόμοια με αυτή του βουτυλο-υδροξυτολουολίου (BHT) και της α-τοκοφερόλης και ήταν υψηλότερη όταν η λιποϋπεροξειδωση προκλήθηκε από ελεύθερα ιόντα δισθενούς σιδήρου. Αυτό το γεγονός μπορεί να εξηγηθεί προτείνοντας δύο μηχανισμούς δράσης του εχινόχρωματος A ως αντιοξειδωτικό: 1) σάρωση των ριζών υπεροξειδίου του υδρογόνου των λιπιδίων, όπως το BHT και η α-τοκοφερόλη, 2) δημιουργία χηλικών συμπλόκων Fe^{2+} -EchA, αδρανοποιώντας τον σίδηρο από το να εκκινήσει νέες αλυσίδες ελεύθερων ριζών (Lebedev et al., 2001; Lebedev et al., 2005; Lebedev et al., 2009).

Σάρωση των ριζών 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζυλίου (DPPH)

Στην δοκιμασία με ρίζες DPPH, ένα άτομο υδρογόνου αφαιρείται από την υδροξυλομάδα της ναφθοκινόνης προς τον σχηματισμό μίας πιο σταθερής διαμαγνητικής δομής. Η απώλεια δύο ατόμων υδρογόνου σχηματίζει την ναφθοημικινόνη ως ενδιάμεσο προϊόν και την ναφθοτετρακετόνη ως τελικό προϊόν της αντίδρασης (Zhou et al., 2011).

Σε δοκιμασία με ρίζες DPPH βρέθηκε ότι το εχινόχρωμα A ήταν πολύ δραστικό, και πιο συγκεκριμένα από την στοιχειομετρία της αντίδρασης βρέθηκε ότι αναλογούν 7 μόρια ριζών ανά μόριο εχινόχρωματος A και μόλις 2 ρίζες ανά μόριο α-τοκοφερόλης. Η δράση του εχινόχρωματος A είναι συγκρίσιμη με αυτή που παρουσιάζουν διάφορα φλαβονοειδή, ταννίνες και η κατεχόλη (Lebedev et al., 2005; Lebedev et al., 2008).



Εικόνα 9. Μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης του εχινόχρωματος A (Zhou et al., 2011).

1.2.5.2. Αντιφλεγμονώδης δράση

Η ικανότητα ουσιών να παρεμποδίζουν τη μετουσίωση πρωτεϊνών είναι μια δοκιμασία για την αξιολόγηση της αντιφλεγμονώδους δράσης τους. Παρόμοια με άλλα αντιφλεγμονώδη φάρμακα, όπως το σαλικυλικό οξύ, η φαινυλοβουταζόνη, το φλουφεναμικό οξύ, κ.λπ., οι ναφθοκινόνες παρουσίασαν δοσοεξαρτώμενη δράση στη θερμικά επαγόμενη μετουσίωση πρωτεϊνών. Οι ενώσεις αυτές ίσως αναστέλλουν τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις,

ρυθμίζοντας τις προφλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες (Soleimani et al., 2022).

Η αντιφλεγμονώδης δράση του εχινόχρωματος A έναντι της φλεγμονής του ραγοειδούς χιτώνα σε αρουραίους αποδείχθηκε σε πρόσφατη μελέτη, στην οποία τα επίπεδα της προφλεγμονώδους κυτοκίνης TNF- α μειώθηκαν σημαντικά. Επίσης, σημειώθηκε σημαντική καταστολή του πυρηνικού παράγοντα NF- κ B (ένας βασικός μεσολαβητής των φλεγμονωδών αποκρίσεων), γεγονός που οφείλεται στη σημαντική μείωση των δραστικών μορφών οξυγόνου στον οφθαλμικό ιστό (Kim et al., 2021).

Λόγω των αξιοσημείωτων αντιοξειδωτικών και αντιφλεγμονωδών επιδράσεων, το εχινόχρωμα A θα μπορούσε να ασκήσει ένα ευρύ φάσμα θεραπευτικών επιδράσεων σε παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με τη φλεγμονή.

Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου

Η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου είναι μια ανίατη, χρόνια φλεγμονώδης νόσος του πεπτικού συστήματος. Η νόσος του Crohn και η ελκώδης κολίτιδα είναι οι κύριοι τύποι της νόσου. Ενδοφλέβιες ενέσεις με εχινόχρωμα A απέτρεψαν σημαντικά την απώλεια βάρους και την θνησιμότητα που προκαλεί η κολίτιδα σε ποντίκια. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανασταλτική της δράση στον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων *in vitro*. Έτσι, προτείνεται ότι το εχινόχρωμα A μπορεί να δρα ευεργετικά στην φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, διορθώνοντας την ανισορροπία που προκαλείται στο ανοσοποιητικό σύστημα (Oh et al., 2019).

Θεραπεία του γαστρικού έλκους

Το πεπτικό έλκος επηρεάζει πολλούς ανθρώπους και ορίζεται ως η διαταραχή της βλεννογόνου μεμβράνης του στομάχου και του δωδεκαδάκτυλου. Χορήγηση εχινόχρωματος A σε ποντίκια βρέθηκε να έχει επουλωτική δράση κατά του έλκους στο στομάχι, βελτιώνοντας τον όγκο και την οξύτητα του γαστρικού υγρού και διατηρώντας την μακροσκοπική και μικροσκοπική ακεραιότητα της βλεννογόνου. Επίσης, προκάλεσε μεταβολές στους δείκτες οξειδωτικού στρες και έλκους, όπου βρέθηκε σημαντική μείωση στα επίπεδα μαλονοδιαλδεϋδης (MDA), καθώς και της περιεκτικότητας σε τρανσφεράση της γλουταθειόνης-S- (GST) και καταλάση (CAT), ενώ αντίθετα προκάλεσε σημαντική αύξηση των δραστηριοτήτων της γλουταθειόνης (GSH) και της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD), αλλά και των επιπέδων μονοξειδίου του αζώτου (NO) (Sayed et al., 2018).

Θεραπεία σκληροδερμίας

Η σκληροδερμία είναι μια αυτοάνοση νόσος που προκαλείται από την ανώμαλη

ρύθμιση στη σύνθεση της εξωκυτταρικής μήτρας και ενεργοποιείται από μη ρυθμιζόμενα φλεγμονώδη κύτταρα και κυτοκίνες. Το εχινόχρωμα Α αποδείχθηκε χρήσιμο στην θεραπεία της σκληροδερμίας που προκαλείται από βλεομυκίνη, ασκώντας αντι-ινωτική και αντιφλεγμονώδη δράση. Πιο συγκεκριμένα, ομαλοποίησε το πάχος του δέρματος και κατέστειλε την εναπόθεση του κολλαγόνου *in vivo*. Μείωσε τον αριθμό των ενεργών μυοϊνοβλαστών, καθώς παρατηρήθηκε μείωση των δεικτών α -SMA, βιμεντίνη και το φωσφορυλιωμένο Smad3, και των μακροφάγων κυττάρων (τύπου M1 και M2) στο προσβεβλημένο δέρμα. Επιπλέον, εξασθένησε τα επίπεδα φλεγμονωδών κυτοκινών στον ορό, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α) και η ιντερφερόνη- γ (Park et al., 2021).

Πρόληψη της αθηροσκλήρωσης

Η αθηροσκλήρωση είναι μια φλεγμονώδης νόσος που επηρεάζει τα αρτηριακά αιμοφόρα αγγεία, χαρακτηρίζεται από συσσώρευση λιπιδίων και ινωδών στοιχείων στον ενδοθηλιακό χώρο και αποτελεί την κύρια αιτία εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου και εγκεφαλικού. Διάφορες αιτίες είναι υπεύθυνες στην εμφάνιση αυτής της νόσου, όπως για παράδειγμα η αυτοάνοση απόκριση και η δυσλειτουργία του αντιοξειδωτικού συστήματος.

Σε μελέτη που διεξήχθη από τους Artyukon et al. (2020) βρέθηκαν οι ευεργετικές ιδιότητες του εχινόχρωματος Α σε ασθενείς με καρδιοαγγειακές νόσους, που χορηγήθηκε είτε ενέσιμα το φαρμακευτικό σκεύασμα "HistoChrome" είτε με την μορφή του συμπληρώματος διατροφής "Timarin". Το εχινόχρωμα Α διόρθωσε τις διαταραχές στον μεταβολισμό των λιπιδίων και των υδατανθράκων στους ασθενείς. Αύξησε την ανοσοποιητική λειτουργία και ομαλοποίησε την οξειδωτική φωσφορυλίωση, εξαλείφοντας πολλές αιτίες φλεγμονής, ρυθμίζοντας παράλληλα την έκφραση παραγόντων που επηρεάζουν το ανοσοποιητικό, όπως οι υποδοχείς HLA-DR αντιγόνων (Human Leucocyte antigens-DR isotype, υπεύθυνοι για την διακυτταρική συνεργασία των ανοσοκυττάρων) και ο δείκτης απόπτωσης CD95 + (που υποδηλώνει την ανανέωση των κυττάρων). Με βάση τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες και τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες που παρουσίασε ανεξάρτητα με τον τρόπο χορήγησης του θα μπορούσε να προταθεί για την θεραπεία της αθηροσκλήρωσης (Artyukon et al., 2020).

1.2.5.3. Ρύθμιση του σακχαρώδη διαβήτη

Ο σακχαρώδης διαβήτης θεωρείται μία από τις πιο επικίνδυνες μεταβολικές διαταραχές παγκοσμίως και σχετίζεται με την μείωση της ποιότητας υγείας, προκαλώντας υπεργλυκαιμία, με αποτέλεσμα την αντίσταση στην ινσουλίνη ή στην ανεπάρκεια ινσουλίνης και ταξινομείται σε τύπου-1 (νεανικός ή ινσουλινο-εξαρτώμενος διαβήτης) και

τύπου-2 (μη ινσουλινο-εξαρτώμενο ή διαβήτη των ενηλίκων) σακχαρώδη διαβήτη.

Αρουραίοι στους οποίους χορηγήθηκε εχινόχρωμα Α εμφάνισαν σημαντική βελτίωση στα επίπεδα της αργινάσης, της ινσουλίνης και της δράσης της 6-φωσφορικής αφυδρογονάσης, που υποδηλώνουν την υπογλυκαιμική δράση του εχινόχρωματος Α. Επίσης, το εχινόχρωμα Α εμφάνισε υψηλή δραστηριότητα στην διόρθωση και μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Στην μελέτη των Mohamed et al. (2016) βρέθηκε ότι η θεραπεία με εχινόχρωμα Α προκάλεσε μείωση στη δραστηριότητα των ενζύμων του ορού ALT (alanine aminotransferase), AST (aspartate aminotransferase), ALP (alkaline phosphatase) και GGT (γ-glutamyl transferase) των διαβητικών αρουραίων, ευρήματα που υποδεικνύουν τη διατήρηση της λειτουργίας και της δομής των ηπατικών κυττάρων, τα οποία επιβεβαιώθηκαν και με ιστοπαθολογική εξέταση στο ήπαρ, υποδεικνύοντας ότι το εχινόχρωμα Α βελτιώνει την ανεπιθύμητη ενέργεια της υπεργλυκαιμίας. Παρατηρήθηκε, επίσης, βελτίωση στις τιμές της ολικής χοληστερόλης (TC), των τριγλυκεριδίων (TG) και της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL-C) σε ασθενείς που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη, καθώς επίσης και αυξημένα επίπεδα μονοξειδίου του αζώτου στις ομάδες που έλαβαν εχινόχρωμα Α, κάτι που σχετίζεται με την αύξηση των επιπέδων ινσουλίνης. Πολλές πειραματικές και κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι το οξειδωτικό στρες παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και των δύο τύπων σακχαρώδη διαβήτη. Ωστόσο, σε ομάδες που έλαβαν εχινόχρωμα Α παρατηρήθηκε αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα σε συνδυασμό με χαμηλά ποσοστά υπεροξειδωσης λιπιδίων, λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης του εχινόχρωματος Α (Kim et al., 2021; Mohamed et al., 2016; Poron & Krivosheiko, 2013).

1.2.5.4. Επίδραση στα μιτοχόνδρια

Ενώσεις, όπως το *tert*-βουτυλουδροϋπεροξειδίο (tBHP), νιτροπρουσίδη νατρίου (SNP, φάρμακο κατά της υπέρτασης) και δοξορουβικίνη (DOX, αντικαρκινικό φάρμακο), επάγουν την μιτοχονδριακή δυσλειτουργία με αύξηση των επιπέδων των δραστικών μορφών οξυγόνου και μείωση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η συγχορήγηση εχινόχρωματος Α βρέθηκε ότι προστατεύει τα κύτταρα των μιτοχονδρίων, προλαμβάνοντας την παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου και την πιθανή αποπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Προστάτευσε την ικανότητα παραγωγής ενέργειας, αφού κατάφερε να διατηρήσει το ρυθμό κατανάλωσης οξυγόνου και την ικανότητα σύζευξης (coupling efficiency) των μιτοχονδρίων σε φυσιολογικά επίπεδα, παράγοντες που επηρεάζονται από τη χορήγηση καρδιοτοξικών ενώσεων. Επίσης, οι καρδιοτοξικοί παράγοντες ενεργοποιούν και επάγουν την φωσφορυλίωση πρωτεϊνικών κινάσων που ενεργοποιούνται με μιτογόνο (mitogen-activated protein kinases, MAPKs), τις εξωκυττάρως σηματοδοτούμενες κινάσες 1 και 2 (extracellular

signal-regulated kinases, EKR1/2), τις c-Jun amino-terminal κινάσες 1-3 (JNK1-3), και τη πρωτεϊνική κινάση p38, οι οποίες εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες. Η συγχορήγηση εχινόχρωματος A μείωσε τη δράση αυτή. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι το εχινόχρωμα A έχει θεραπευτικό δυναμικό για την ελαχιστοποίηση των δυσμενών καρδιοτοξικών επιδράσεων, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητας του να αποτρέπει την σηματοδότηση του κυτταρικού θανάτου από τους καρδιοτοξικούς παράγοντες (Jeong et al., 2014).

Επιπλέον, μελετήθηκε το κατά πόσον το εχινόχρωμα A επιδρά στο περιεχόμενο των μιτοχονδρίων και βρέθηκε ότι με χορήγηση του αυξάνεται η μιτοχονδριακή μάζα και το μιτοχονδριακό DNA. Για το λόγο αυτό εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που ρυθμίζουν την μιτοχονδριακή βιογένεση με ποσοτική qRT-PCR. Βρέθηκε ότι διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν τις πρωτεΐνες της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και ενισχύουν την μεταγραφή του μιτοχονδριακού DNA αυξήθηκαν με χορήγηση εχινόχρωματος A με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Ομοίως, ενεργοποιήθηκαν γονίδια παραγόντων που ρυθμίζουν το μιτοχονδριακό DNA. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το εχινόχρωμα A ενισχύει την μεταγραφή του μιτοχονδριακού DNA μέσω της ρύθμισης των μεταγραφικών γονιδίων της μιτοχονδριακής βιογένεσης και δεν λειτουργεί μόνο ως κλασικό αντιοξειδωτικό, αλλά αλλάζει τη βιοχημική διαδικασία των μιτοχονδρίων διεγείροντας τον μεταβολισμό τους (Jeong et al., 2014).

Σε μελέτη που διεξήχθη σε αρουραίους Sprague-Dawley βρέθηκε ότι η ικανότητα άσκησης των αρουραίων της ομάδας αερόβιας άσκησης στην οποία χορηγήθηκε εχινόχρωμα A αυξήθηκε σημαντικά, ακόμη και σε σύγκριση με τους αρουραίους που έκαναν απλά αερόβια άσκηση, γεγονός που καταδεικνύει ότι η χορήγηση εχινόχρωματος A μετά από βραχυπρόθεσμη προπόνηση αντοχής ενισχύει την ικανότητα άσκησης, η οποία συνδέεται με την αύξηση των μιτοχονδρίων στους σκελετικούς μύες (Seo et al., 2015).

1.2.5.5. Αντικαρκινική δράση

Σε ποντίκια που είχε προκληθεί καρκίνωμα ασκίτη Ehrlich, η χορήγηση εχινόχρωματος A βελτίωσε τις εξής παραμέτρους:

- μείωσε τον όγκο,
- διατήρησε την περιεκτικότητα της αιμοσφαιρίνης, των ερυθρών και των λευκών αιμοσφαιρίων που είχαν υποστεί αλλαγές κατά την εξέλιξη του όγκου,
- διατήρησε την λειτουργία του ήπατος και των νεφρών, εμφανίζοντας προστατευτική δράση από βλάβες που μπορούν να δημιουργηθούν από τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων και την αλλαγή στην έκφραση των ηπατικών ενζύμων (AST, ALT και ALP) ή

αύξηση των τιμών της ουρίας και της κρεατινίνης στα νεφρά,

- μείωσε την υπεροξειδωση των λιπιδίων και βελτίωσε την αντιοξειδωτική κατάσταση, καθώς κατά την ανάπτυξη καρκινικού όγκου ή ως παρενέργειες της χημειοθεραπείας, προκαλούνται οξειδωτικές διαταραχές και υπεροξειδωση λιπιδίων σε ζωτικά όργανα όπως στο συκώτι και το νεφρό (Mohamed, 2021).

1.2.5.6. Δράση κατά της ατοπικής δερματίτιδας

Η ατοπική δερματίτιδα είναι μια χρόνια δερματική νόσος στην οποία δημιουργείται δυσλειτουργία στο φραγμό του δέρματος, που οδηγεί σε ξηρότητα, κνησμό και ερυθρηματώδεις βλάβες. Σε έρευνα που διεξήχθη βρέθηκε ότι το εχινόχρωμα Α βελτιώνει την λειτουργία του δερματικού φραγμού και το πάχος της επιδερμίδας. Επίσης, μείωσε την διαδερμική απώλεια νερού και βελτίωσε την ενυδάτωση της κεράτινης στιβάδας. Μείωσε τις φλεγμονές στο δέρμα κατά την διάρκεια της θεραπείας και κατέστειλε την έκφραση των προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως της ιντερφερόνης- γ , ιντερλευκίνης-4 και ιντερλευκίνης-13 (Yun et al., 2021).

1.2.5.7. Προστασία από την φωτογήρανση

Η εξωγενής γήρανση του δέρματος (φωτογήρανση) περιλαμβάνει τις δομικές και λειτουργικές αλλαγές στο δέρμα που μπορούν να προκληθούν από την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία. Η UV-B ακτινοβολία εμποδίζει την ορθή λειτουργία του δερματικού φραγμού, εμφανίζοντας αύξηση στην διαδερμική απώλεια νερού, μείωση στην ενυδάτωση της κεράτινης στιβάδας και τον εκφυλισμό του κολλαγόνου. Το δέρμα που εκτίθεται στην υπεριώδη ακτινοβολία παράγει μεγάλη ποσότητα δραστικών μορφών οξυγόνου με αποτέλεσμα να προκαλείται οξειδωτική βλάβη, η οποία σηματοδοτεί την έκφραση μεταλλοπρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες για την αποικοδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας και την αναδιαμόρφωση του ιστού. Βασιζόμενοι στις αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και στην αποτελεσματική βελτίωση της λειτουργίας των μιτοχονδρίων, το εχινόχρωμα Α θεωρήθηκε πιθανό μόριο για την θεραπεία της φωτογήρανσης. Πράγματι σε άτριχα αρσενικά SKH-1 ποντίκια που υποβλήθηκαν σε έκθεση με υπεριώδη ακτινοβολία UV-B, η θεραπεία με εχινόχρωμα Α μέσω ενδοπεριτοναϊκής ένεσης βρέθηκε ότι μειώνει σημαντικά την διαδερμική απώλεια νερού και τον εκφυλισμό του κολλαγόνου, καθώς και την έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών, της τρυπτάσης και της χυμάσης (Seol et al., 2021).

1.2.5.8. Αναστολή της δράσης της ακετυλοχολινεστεράσης

Η ακετυλοχολινεστεράση είναι μια υδρολάση σερίνης που ανήκει στην οικογένεια ενζύμων καρβοξυλεστεράσης, η οποία υδρολύει την ακετυλοχολίνη σε χολίνη και οξικό οξύ. Οι αναστολείς ακετυλοχολινεστεράσης ή αντι-χολινεστεράσες που χρησιμοποιούνται για την

θεραπεία διάφορων νευρομυϊκών διαταραχών αυξάνουν τόσο τα επίπεδα όσο και τη διάρκεια της δραστηριότητας των νευροδιαβιβαστών της ακτελυχολίνης στη χολινεργική νευρική σύναψη, στα αγγεία και σε άλλους ιστούς. Από έρευνες που έγιναν διαπιστώθηκε ότι το εχινόχρωμα A αναστέλλει μη αναστρέψιμα και μη ανταγωνιστικά την δράση της ακετυλοχολινεστεράσης. Η ανασταλτική δράση κατά της ακετυλοχολινεστεράσης θα μπορούσε να εφαρμοστεί για την θεραπεία ασθενειών που σχετίζονται με τον περιορισμό της ακετυλοχολίνης και κατά συνέπεια την ανάπτυξη ενός νέου φαρμάκου κατά του Alzheimer, μιας νόσου που σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες και την φλεγμονή (Lee et al., 2014).

1.2.5.9. Αντιβακτηριακή δράση

Το εχινόχρωμα A, λόγω των ηλικικών του ιδιοτήτων, δεσμεύει το ελεύθερο σίδηρο από το περιβάλλον, στερώντας έτσι στα μικρόβια ένα βασικό μέταλλο για την ανάπτυξη τους (Coates et al., 2018). Από τους ερευνητές Wardlaw και Unkles, παρατηρήθηκε η αντιβακτηριακή δράση που εμφάνισε το υγρό της κοιλιομυϊκής κοιλότητας του αχινού *Echinus esculentus* τόσο σε gram (+) όσο και σε gram (-) θαλάσσια βακτήρια. Σε πειράματα που έγιναν με διαλύματα εχινόχρωματος A σε θαλασσινό νερό, το εχινόχρωμα A παρουσίασε βακτηριοκτόνο ή βακτηριοστατική δράση σε έξι στελέχη θαλάσσιων gram (+)/gram (-) βακτηρίων, καθώς και σε στελέχη *Pseudomonas* sp. και *Vibrio fischeri* (Service & Wardlaw, 1984).

1.2.5.10. Αντιική δράση

Ο ιός του έρπητα τύπου 1 (HSV-1) είναι ένας από τους πιο κοινούς ιούς που προσβάλλουν τον ανθρώπινο οργανισμό. Σε πειράματα που έγιναν σε Vero-κύτταρα (νεφρικά κύτταρα αφρικανικού πράσινου πιθήκου) βρέθηκε ότι το εχινόχρωμα A και το προϊόν οξείδωσης του αναστέλλουν σημαντικά την σύνδεση του ιού στα κύτταρα στα πρώιμα στάδια, αλλά δεν επεμβαίνουν στα στάδια αντιγραφής του ιού. Σε άλλη έρευνα αποδείχθηκε η άμεση ιοκτόνος δράση του εχινόχρωματος A, αναστέλλοντας την προσκόλληση του ιού στα κύτταρα και σε μικρότερο βαθμό την είσοδο του, καθώς επίσης και η ικανότητα του να μειώνει τα αυξημένα επίπεδα των ROS που προκαλεί ο ιός του έρπητα (Iunikhina et al., 2021; Mishchenko, et al., 2020).

1.2.5.11. Θεραπεία συμπτωμάτων της αλλεργίας τύπου I

Εξετάστηκε η ανασταλτική δράση του εχινόχρωματος A στην αποκοκκίωση που διεγείρεται από αντιγόνα σε κύτταρα βασεόφιλης λευχαιμίας RBL-2H3 σε αρουραίους. Τα αντιγόνα συνδέονται με τον υποδοχέα της ανοσοσφαιρίνης E υψηλής συγγένειας, ο οποίος εκφράζεται στην επιφάνεια των ιστιοκυττάρων και των βασεόφιλων, ενεργοποιεί την ενδοκυτταρική μεταγωγή σήματος, με αποτέλεσμα την αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων

ασβεστίου (Ca^{2+}) και την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου και διάφορων κυτταρικών αποκρίσεων, καταλήγοντας σε αποκοκκίωση, παραγωγή κυτοκίνης και έκκριση λευκοτριενίων, χημικοί μεσολαβητές που προκαλούν άσθμα και φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Το εχινόχρωμα A όχι μόνο κατέστειλε την αποκοκκίωση με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, την αύξηση των επιπέδων ασβεστίου και την παραγωγή ROS, αλλά κατέστειλε και την ενεργοποίηση των Lyn, Syk και PLC γ 1/2 κινασών σε διεγερμένα από αντιγόνο κύτταρα (Itoh et al., 2016).

1.2.5.12. Αντιμετώπιση του συνδρόμου καταιγίδας κυτοκινών

Το σύνδρομο καταιγίδας κυτοκινών έχει λάβει μεγάλη προσοχή το τελευταίο διάστημα λόγω του ότι αποτελεί συχνό φαινόμενο συννοσηρότητας σε ασθενείς που πάσχουν από Covid-19. Αφορά την συστηματική φλεγμονώδη απόκριση που προκαλούν οι κυτοκίνες και οδηγεί σε δυσλειτουργία πολλών οργάνων, σήψη, πυρετό, υπερφερριτιναιμία ή ακόμη και σε θάνατο. Ένα βασικό χαρακτηριστικό του συνδρόμου αυτού είναι το οξειδωτικό στρες που δημιουργείται και η εξάντληση των επιπέδων γλουταθειόνης, διεγείροντας την παραγωγή των προφλεγμονώδων κυτοκινών. Η χορήγηση ενώσεων που μειώνουν τις ενεργές μορφές οξυγόνου βοηθούν αποτελεσματικά στην θεραπεία, κάτι που αποτελεί βασική χαρακτηριστική δράση του εχινόχρωματος A, όπως επίσης και η αύξηση του μεταβολισμού της γλουταθειόνης. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι το εχινόχρωμα A είναι σε θέση να μειώσει την παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτοκινών IL-1 β και IL-6 και την έκκριση TNF- α και να αυξήσει τις αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως την IL-10, διορθώνοντας έτσι την ανοσολογική ανισορροπία που δημιουργείται κατά το σύνδρομο της καταιγίδας κυτοκινών (Rubilar et al., 2021).

1.2.5.13. Αγγολυτική δράση

Η πρωτεΐνη p53 ενεργοποιείται σε διάφορες καταστάσεις στρες, όπως αυτές που προκαλούν βλάβη στο DNA, οι οποίες δημιουργούν οξειδωτικό στρες, οσμωτικό σοκ, κ.α. Η ενεργοποίηση της p53 έχει ως αποτέλεσμα το τερματισμό του κυτταρικού κύκλου και της αντιγραφής του DNA και μπορεί να οδηγήσει μέχρι και στην απόπτωση των κυττάρων. Το χρόνιο στρες αύξησε τα επίπεδα αυτής της πρωτεΐνης στα κύτταρα του μυελού των οστών σε SHK ποντίκια, τα οποία ομαλοποιήθηκαν με χορήγηση εχινόχρωματος A σε δόση 1 mg/kg, αποδεικνύοντας έτσι τις αγγολυτικές του ιδιότητες και την πιθανή δράση του σε γενετικό επίπεδο, αλλοιώνοντας την βιοσύνθεση της πρωτεΐνης p53 που αποτελεί βασικό ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου (Kareva et al., 2014).

1.2.5.14. Ηπατοπροστατευτική δράση

Σοβαρές βακτηριακές λοιμώξεις οδηγούν σε σήψη, η οποία προκαλεί δυσλειτουργίες σε διάφορα ζωτικά όργανα. Κύρια επιπλοκή αποτελεί η ηπατική ανεπάρκεια, όπου κατά την σήψη το ήπαρ είναι υπεύθυνο για την ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης μέσω της κάθαρσης των λοιμώξεων στην κυκλοφορία του αίματος. Ποντίκια στα οποία είχε προκληθεί σήψη εμφάνισαν αυξημένες τιμές σε ένζυμα του ήπατος, ενώ η χορήγηση εχινόχρωματος A στα ποντίκια βελτίωσε την λειτουργία του ήπατος, όπως φάνηκε από τις μειωμένες τιμές των ενζύμων τρανσαμινάση της αλανίνης και γ-γλουταμυλο-τρανσφεράση, καθώς και την αυξημένη περιεκτικότητα σε λευκωματίνη. Επιπλέον, παρουσίασε δράση έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται στο ήπαρ, αυξάνοντας την περιεκτικότητα σε γλουταθειόνη και την δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων και μειώνοντας τη περιεκτικότητα της μαλνοδιαδεΰδης και το σχηματισμό του μονοξειδίου του αζώτου και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Mohamed et al., 2019).

1.2.5.15. Αντιμετώπιση ισχαιμικού ή αιμορραγικού εγκεφαλικού επεισοδίου

Μελέτες έχουν αξιολογήσει την νευροπροστατευτική δράση του εχινόχρωματος A σε ζωικά μοντέλα με ισχαιμικό ή αιμορραγικό εγκεφαλικό επεισόδιο. Η χορήγηση του εμπορικού σκευάσματος HistoChrome ενδοπεριτοναϊκά σε αρουραίους μείωσε αποτελεσματικά το οίδημα που προκαλείται και εξαφανίστηκε σχεδόν τελείως σε επτά ημέρες, ανακουφίζοντας έτσι τα νευρολογικά συμπτώματα που προκάλεσε η αιμορραγία. Η ισχυρή αντιφλεγμονώδης δράση του εχινόχρωματος A βοηθά στην μείωση του οιδήματος και την επακόλουθη εγκεφαλική βλάβη, κάτι που αποδεικνύεται με την ανίχνευση του HistoChrome στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό των αρουραίων. Επιπλέον, αύξησε τη ροή του αίματος στα κατεστραμμένα εγκεφαλικά αγγεία σε αρουραίους με μακροχρόνια εγκεφαλική ισχαιμία, με αποτέλεσμα την βελτίωση της λειτουργίας του εγκεφάλου, δρώντας ως αγγειοδιασταλτικό προς την αύξηση της διαμέτρου της στεφανιαίας αρτηρίας και μειώνοντας τη περιοχή του εγκεφαλικού εμφράγματος (Kim et al., 2021).

Σε μία άλλη έρευνα που διεξήχθη από τους Kim et al. (2019) εξετάστηκε η δράση του εχινόχρωματος A σε εγκεφαλική βλάβη σε μοντέλα MCAo αρουραίων. Βρέθηκε ότι μειώνει το εγκεφαλικό έμφραγμα που δημιουργείται μετά την επαναιμάτωση, και ενισχύει την κινητική ικανότητα των ποντικών με εγκεφαλική ισχαιμία. Επίσης, επηρεάζει την έκφραση μορίων που σχετίζονται με τη κυτταρική επιβίωση στην τραυματισμένη περιοχή των ποντικών, αυξάνοντας τα επίπεδα έκφρασης των Bcl-2, p-ERK/ERK και p-AKT/AKT, BDNF και μειώνοντας τη κασπάση-3 και τον Bax (Kim et al., 2019).

1.2.6. Τοξικότητα του εχινόχρωματος Α

Ο αυτοοξειδωτικός μετασχηματισμός του εχινόχρωματος Α σε πολυσθενή ανιόντα μπορεί να είναι πηγή ελεύθερων ριζών, συμπεριλαμβανομένων των ναφθοημικινονών και των ριζών υπεροξειδίου, υπεύθυνες για την εμφάνιση τοξικότητας και τη πρόκληση μεταλλαξιγένεσης. Ωστόσο από μελέτες τοξικότητας μόνο μία πιθανή ταυτομερική μορφή του εχινόχρωματος (με αιθύλιο στον δακτύλιο βενζολίου) βρέθηκε να συμμετέχει σε διαδικασίες οξείδωσης και συμπεριλαμβάνεται στις ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία τοξικότητας II. Σε μια ολοκληρωμένη μελέτη για τις μεταλλαξιγόνες ιδιότητες του φαρμάκου HistoChrome που πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις απαιτήσεις της Φαρμακολογικής Επιτροπής του Υπουργείου Υγείας της Ρωσίας δεν προκλήθηκε καμία χρωμοσωμική βλάβη στον μυελό των οστών σε κύτταρα ποντικών C57BL/6 σε συγκεντρώσεις 1-10 mg/kg του φαρμάκου, ούτε οδήγησαν σε αυθόρμητη γονιδιακή μετάλλαξη στη μύγα του γένους *Drosophila* ή σε βακτήρια του είδους *Salmonella typhimurium* (Lebedev et al., 2001; Mishchenko et al., 2020).

1.2.7. Το φάρμακο HistoChrome

Το HistoChrome είναι το φαρμακευτικό σκεύασμα που περιέχει ως δραστική ουσία το μετά νατρίου άλας του εχινόχρωματος Α που αναπτύχθηκε στο G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry στο Βλαδιβοστόκ της Ρωσίας. Το HistoChrome συστήνεται για την αντιμετώπιση οφθαλμικών, καρδιαγγειακών, φλεγμονωδών και μεταβολικών ασθενειών (Kareva et al., 2014; Kim et al., 2021).

Θεραπεία οφθαλμικών νοσημάτων

Πολλές παθήσεις των οφθαλμών συμβαίνουν λόγω της αύξησης των ελεύθερων ριζών και της εμφάνισης προϊόντων από την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Το εχινόχρωμα Α έχει αποδειχθεί ότι επιλύει την τραυματική αιμοφθαλμία στα κουνέλια και δρα ως ισχυρό αντιοξειδωτικό. Το HistoChrome χρησιμοποιείται για την θεραπεία παθήσεων του οφθαλμού, με τη χορήγηση του να γίνεται ως ενέσιμο ή ως οφθαλμικές σταγόνες. Η θεραπεία διευκολύνει την αντιμετώπιση της αιμορραγίας, αυξάνει την οπτική οξύτητα, προστατεύει τον αμφιβληστροειδή, βελτιώνει τον τροπισμό των ιστών, μειώνει τα οιδήματα που δημιουργούνται και αυξάνει τον ρυθμό επιθηλιοποίησης. Για αυτούς τους λόγους θεωρείται ικανό φάρμακο για την θεραπεία ασθενειών που προκαλούνται από μεταβολικές διαταραχές στον αμφιβληστροειδή και στον ραγοειδή χιτώνα, χωρίς να εκδηλώνει παρενέργειες κατά την χορήγηση του (Kim et al., 2021).

Θεραπεία ισχαιμικής καρδιοπάθειας

Το HistoChrome χορηγείται για την θεραπεία της στεφανιαίας νόσου και για τον περιορισμό της ζώνης νέκρωσης που προκαλεί το έμφραγμα. Σε διάφορες κλινικές μελέτες αποδείχθηκαν τα ευεργετικά αποτελέσματα του HistoChrome σε ασθενείς με ισχαιμικές παθήσεις. Πιο συγκεκριμένα η χορήγηση του μείωσε το οξειδωτικό στρες στην καρδιά και τα αιμοφόρα αγγεία, την υπεροξείδωση των λιπιδίων και την συσσώρευση των αιμοπεταλίων στο αίμα σε ασθενείς με ασταθή στηθάγχη ή σε περιπτώσεις σοβαρής καρδιακής ανεπάρκειας, όπου τα επίπεδα υπεροξείδωσης των λιπιδίων ήταν υψηλά. Κατέστειλε το έμφραγμα του μυοκαρδίου, ρύθμισε τα επίπεδα της κρεατινοφωσφοκινάσης, η οποία απελευθερώνεται στο αίμα σε ασθενείς που υποφέρουν από ισχαιμική καρδιοπάθεια, μείωσε την περιοχή εμφράγματος του μυοκαρδίου και ενίσχυσε την μυοκαρδική συσταλτικότητα (Kim et al., 2015; Kim et al., 2021).

1.2.8. Το διατροφικό συμπλήρωμα Timarin

Το Timarin είναι ένα διατροφικό συμπλήρωμα που αποτελείται από αλκοολικό εκχύλισμα αχινών και περιέχει φυσικά αντιοξειδωτικά (εχινόχρωμα Α, ασκορβικό οξύ), μέταλλα και οργανικές ουσίες και έχει κατοχυρωθεί με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας στη Ρωσία. Σε κλινική μελέτη που έγινε σε ανθρώπους διαπιστώθηκε ότι η χορήγηση Timarin από το στόμα ρυθμίζει αποτελεσματικά διάφορα συστήματα του σώματος και ενισχύει την λειτουργία τους, επηρεάζει τα επίπεδα των λιπιδίων στο αίμα, μειώνοντας το κίνδυνο εμφάνισης αθηροσκλήρωσης και παρουσιάζει ανοσοδιεγερτικές ιδιότητες, αυξάνοντας τον πληθυσμό των λεμφοκυττάρων και την έκφραση δεικτών που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα, όπως ο υποδοχέας IL-2 και το αντιγόνο HLA-DR (Artyukov et al., 2013).

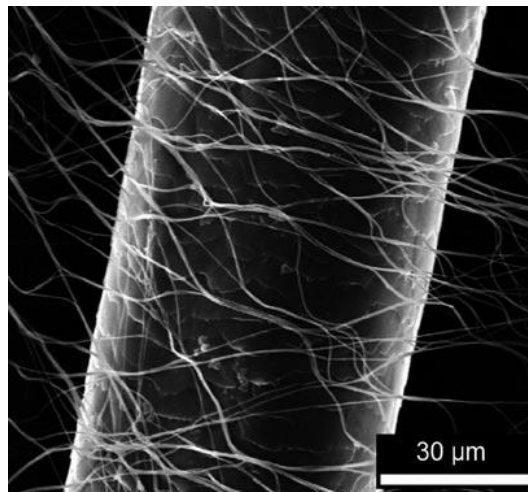
1.2.9. Το εχινόχρωμα Α σε άλλες φαρμακοτεχνικές μορφές

Το εχινόχρωμα Α ιοντίζεται εύκολα υπό φυσιολογικές συνθήκες και υφίσταται εύκολα οξείδωση λόγω της έκθεσης του στο οξυγόνο, επομένως η προστασία των υδροξυλομάδων αποτελεί στόχο για την ανάπτυξη νέων φαρμακοτεχνικών μορφών. Επίσης, για την ανάπτυξη νέων φαρμακοτεχνικών μορφών του εχινόχρωματος Α θα πρέπει να ληφθούν υπόψη διάφορες παράμετροι με σκοπό την αύξηση της διαλυτότητας του στο νερό και τη δυνατότητα στοχευμένης ή/και ελεγχόμενης αποδέσμευσης του διατηρώντας ή ενισχύοντας τις φαρμακολογικές του ιδιότητες (Kim et al., 2021; Yermak et al., 2017). Σε αυτή τη κατεύθυνση μέχρι στιγμής έχει δοκιμαστεί η ενσωμάτωση του εχινόχρωματος Α σε γέλη καραγενάνης, σε σφαιρίδια γέλης καραγενάνης αλλά και σε λιποσώματα με βάση τη καραγενάνη (Yermak et al., 2017, Yermak et al., 2018, Yermak et al., 2021).

1.3. Μικρο-/νανοΐνες και ηλεκτροϊνοποίηση

1.3.1. Μικρο-/νανοΐνες

Οι μονοδιάστατες νανοδομές έχουν αποτελέσει θέμα συστηματικής έρευνας λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων τους και των ενδιαφερουσών εφαρμογών τους σε πολλούς τομείς. Νανοΐνες χαρακτηρίζονται οι ίνες με διάμετρο μικρότερη ή ίση των 1.000 nm. Όταν οι διαμέτροι των πολυμερικών ινών μειώνονται από μm σε nm εμφανίζουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, όπως μεγάλη σχέση επιφάνειας προς όγκο λόγω της μικρής διαμέτρου, ευελιξία στην επιφάνεια, ανώτερες μηχανικές ιδιότητες και εξαιρετικά πορώδη δομή. Υπάρχουν αρκετοί μέθοδοι για την παραγωγή μικρο-/νανοϊνών, όπως ο διαχωρισμός φάσης, η αυτοδιάταξη, η ηλεκτροϊνοποίηση κ.λπ. Οι ηλεκτροϊνοποιημένες ίνες είναι πολύ πιο λεπτές από τις ανθρώπινες τρίχες (Fang et al., 2008; Greiner & Wendorff, 2007; Huang et al., 2003; Li & Xia 2004; Tanioka et al., 2016).



Εικόνα 10. Εικόνα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) ανθρώπινης τρίχας που περιβάλλεται από ηλεκτροϊνοποιημένες ίνες πολυ(βινυλικής αλκοόλης) (PVA) (Greiner & Wendorff, 2007).

1.3.2. Εφαρμογές μικρο-/νανοϊνών

Οι νανοΐνες μπορούν να παραχθούν από ένα ευρύ φάσμα πολυμερών και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών (Fang et al., 2008):

- Ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμάκων
- Επούλωση πληγών
- Μηχανική των ιστών
- Παραγωγή ενέργειας
- Αισθητήρες

- Φίλτρα
- Προστατευτικά ενδύματα
- Κατάλυση

Ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμάκων

Η ελεγχόμενη αποδέσμευση είναι μια αποτελεσματική διαδικασία χορήγησης φαρμάκων κατά την θεραπεία. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να εξισορροπηθεί η κινητική της χορήγησης, να ελαχιστοποιηθεί η τοξικότητα και οι παρενέργειες του φαρμάκου. Η δραστική ουσία ενσωματώνεται σε ένα φορέα αρχικά και απελευθερώνεται με προβλέψιμο τρόπο όταν χορηγείται ενέσιμα ή με άλλη μέθοδο (Fang et al., 2008).

Τα κύρια πλεονεκτήματα της διαδικασίας ηλεκτροϊονοποίησης έναντι των παραδοσιακών τεχνικών για την ενσωμάτωση ουσιών είναι η απουσία θερμικής επεξεργασίας και η μεγάλη αναλογία επιφάνειας προς όγκο, κάτι που είναι σημαντικό για την επίτευξη της ενσωμάτωσης βιοδραστικών υλικών σε μεγάλα ποσοστά. Η μεγάλη ειδική επιφάνεια και η σύντομη δίοδος διάχυσης προσδίδουν στα συστήματα των νανοϊνών υψηλούς ρυθμούς αποδέσμευσης. Σε γενικές γραμμές, όσο μικρότερες οι διαστάσεις του φαρμάκου και του υλικού επικάλυψης που απαιτείται για την ενσωμάτωση του φαρμάκου, τόσο καλύτερα το φάρμακο μπορεί να απορροφηθεί από τον άνθρωπο. Οι πολυμερικές νανοΐνες ως φορείς φαρμάκων βασίζονται στην αρχή ότι ο ρυθμός διάλυσης των σωματιδίων του φαρμάκου αυξάνεται με την αύξηση του εμβαδού επιφάνειας του φαρμάκου και του αντίστοιχου φορέα. Εκτός από την μεταφορά φαρμάκων η ηλεκτροϊονοποίηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μεταφορά άλλων παραγόντων, όπως ιοί, μικρόβια, κύτταρα, πεπτίδια, νουκλεϊκά οξέα κ.λπ. Ένας άλλος τρόπος για την ανάπτυξη πολυμερικών νανοϊνών για την ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμάκων εκτός της απλής ηλεκτροϊονοποίησης, είναι η χρήση της ομοαξονικής ηλεκτροϊονοποίησης, όπου στο πυρήνα ακινητοποιείται το φάρμακο και το κέλυφος ελέγχει την διάχυση του από τις ίνες (Fang et al., 2008; Greiner & Wendorff, 2007; Huang et al., 2003; Zhong et al., 2022).

Τα συστήματα νανοϊνών θα πρέπει να είναι σε θέση να προστατεύουν την ένωση από την αποσύνθεση και να επιτρέπουν την ελεγχόμενη αποδέσμευση της, σε μια επιθυμητή χρονική στιγμή με σταθερό ρυθμό, καθώς επίσης θα πρέπει να διαπερνούν ορισμένες μεμβράνες, πχ. του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Garg & Bowlin, 2010; Greiner & Wendorff, 2007).

Γενικά το προφίλ απελευθέρωσης εξαρτάται από το πόσο καλά διασπείρεται το φάρμακο στη μήτρα του πολυμερούς. Συνήθως τα φάρμακα διαλύονται ή διασπείρονται στο διάλυμα του πολυμερούς πριν από την ηλεκτροϊονοποίηση. Υπάρχει πάντα η πιθανότητα το

φάρμακο να βρεθεί στην επιφάνεια των ινών και όχι εγκλωβισμένο στο εσωτερικό τους, με αποτέλεσμα την άμεση αποδέσμευση του φαρμάκου. Ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο πολυμερές, η απελευθέρωση της φαρμακευτικής δόσης μπορεί να σχεδιαστεί ως ταχεία, άμεση, καθυστερημένη ή τροποποιημένη διάλυση. Συνήθως χρησιμοποιούνται βιοδιασπώμενα υδρόφοβα (πχ. PCL, PLLA) ή υδρόφιλα (πχ. PVA, PEO) πολυμερή. Ακόμη, η αποδέσμευση μπορεί να ελεγχθεί με ακρίβεια διαμορφώνοντας την μορφολογία, το πορώδες και τη σύνθεση των ινών. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την αποδέσμευση του φαρμάκου είναι η υδροφιλία και η υδροφοβικότητα του φαρμάκου, αλλά και του πολυμερούς, η αλληλεπίδραση τους με το φάρμακο, η συγκέντρωση του φαρμάκου στις ίνες, η διαλυτότητα του φαρμάκου και τα έκδοχα που μπορεί να χρησιμοποιηθούν. Γενικά, με τη χρήση υδατοδιαλυτών πολυμερών, μη διαλυτά φάρμακα αποδεσμεύονται λόγω της άμεσης διαλυτοποίησης των ινών (Agarwal et al., 2008; Bhardwaj & Kundu, 2010; Fang et al., 2008).

1.3.3. Ηλεκτροϊνοποίηση

Η ηλεκτροϊνοποίηση, ή αλλιώς ηλεκτροστατική ινοποίηση, είναι μια εξαιρετικά ευέλικτη μέθοδος για την επεξεργασία διαλυμάτων ή τηγμάτων, κυρίως πολυμερών, και τη μετατροπή τους σε συνεχείς ίνες με διάμετρο που κυμαίνονται από λίγα μm έως λίγα nm. Μπορεί να εφαρμοστεί σε συνθετικά και φυσικά πολυμερή, σε μείγματα πολυμερών και σε πολυμερή που φέρουν δραστικές ουσίες, χρωμοφόρα, νανοσωματίδια, καθώς και μέταλλα ή κεραμικά στοιχεία. Παρόλο που φαίνεται μια απλή μέθοδος, αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία που εξαρτάται από μια πληθώρα παραμέτρων. Δίνει την δυνατότητα πρόσβασης σε εντελώς νέα υλικά και προς το παρόν αποτελεί τη μόνη τεχνική που επιτρέπει την κατασκευή συνεχών ινών με διάμετρο έως και λίγα nm που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμη και σε βιομηχανική κλίμακα (Greiner & Wendorff, 2007).

1.3.3.1. Η ιστορία της ηλεκτροϊνοποίησης

Η ηλεκτροϊνοποίηση έχει τις βάσεις της σε πρώιμες μελέτες, όπου ήδη το 1745 ο Bose περιέγραψε τα αερολύματα που δημιουργούνται από την εφαρμογή υψηλού ηλεκτρικού δυναμικού σε σταγόνες υγρού. Το 1882 ο Lord Rayleigh υπολόγισε το φορτίο που χρειάζεται για να υπερβεί την επιφανειακή τάση μιας σταγόνας. Οι πρώτες διατάξεις ψεκασμού υγρών μέσω της εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου κατοχυρώθηκαν με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας από τους Cooley και Morton το 1902 και 1903. Αργότερα, το 1929 ο Hagiwaba και η ομάδα του κατάφεραν να περιγράψουν την κατασκευή τεχνητού μεταξιού με τη χρήση ηλεκτρικού πεδίου. Όμως η πατέντα, στην οποία περιγράφεται για πρώτη φορά η ηλεκτροϊνοποίηση των πολυμερών, εμφανίστηκε για πρώτη φορά το 1934 από τον Anton Formhals. Στη δεκαετία του 1970, ο Simm και η ομάδα του κατοχύρωσαν για πρώτη φορά την παραγωγή ινών με

διάμετρο μικρότερη από 1 mm. Παρά τις πρώιμες ανακαλύψεις, η διαδικασία αυτή άργησε να χρησιμοποιηθεί εμπορικά. Για πρώτη φορά ίνες με την μέθοδο ηλεκτροϊνοποίησης πρωτοεμφανίστηκαν στο εμπόριο στις εφαρμογές φίλτρων. Τη δεκαετία του 1990 η ηλεκτροϊνοποίηση κέρδισε την προσοχή των ερευνητών επειδή αποτελεί συνδυασμό βασικής και εφαρμοσμένης έρευνας από διάφορες επιστήμες και μηχανικούς κλάδους (Greiner & Wendorff, 2007).

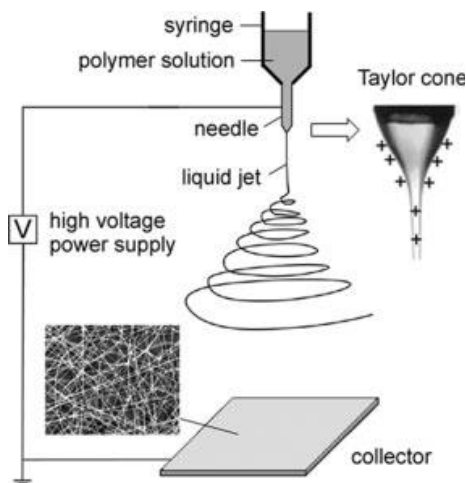
1.3.3.2. Διάταξη ηλεκτροϊνοποίησης

Μία τυπική διάταξη ηλεκτροϊνοποίησης περιλαμβάνει: α) μία γεννήτρια παροχής υψηλής τάσης, β) μία αντλία σύριγγας και γ) έναν γειωμένο μεταλλικό συλλέκτη. Η αντλία επιτρέπει την έγχυση του διαλύματος με σταθερό και ελεγχόμενο ρυθμό. Συνήθως χρησιμοποιείται γεννήτρια παροχής συνεχούς ρεύματος (DC), ωστόσο μπορεί να χρησιμοποιηθεί και εναλλασσόμενου ρεύματος (AC). Ο συλλέκτης μπορεί να έχει οποιοδήποτε σχήμα ανάλογα με τις ανάγκες, όπως επίπεδη πλάκα ή περιστρεφόμενος κύλινδρος (Li & Xia, 2004).

1.3.3.3. Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος ηλεκτροϊνοποίησης αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία. Σε μια τυπική πειραματική διάταξη, ένα διάλυμα πολυμερούς ή τήγμα ωθείται με την βοήθεια αντλίας μέσω ενός λεπτού ακροφυσίου (με εσωτερική διάμετρο της τάξης των 100 μm). Ακολουθεί η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου στο άκρο του ακροφυσίου, που λειτουργεί σαν ηλεκτρόδιο και περιέχει το διάλυμα πολυμερούς το οποίο συγκρατείται από την επιφανειακή τάση. Με την εφαρμογή υψηλής τάσης (συνήθως της τάξεως 1 με 30 kV), η σταγόνα του διαλύματος στο ακροφύσιο ηλεκτρίζεται και τα επαγόμενα φορτία κατανέμονται ομοιόμορφα στην επιφάνεια της. Η σταγόνα υφίσταται δύο είδη ηλεκτροστατικών δυνάμεων, την ηλεκτροστατική άπωση μεταξύ των επιφανειακών φορτίων και τις δυνάμεις Coulomb που ασκούνται από το εξωτερικό πεδίο με αποτέλεσμα την εμφάνιση μίας δύναμης ακριβώς αντίθετης από την επιφανειακή τάση. Έτσι όσο η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου αυξάνεται, η σταγόνα στην άκρη του ακροφυσίου με ημισφαιρικό σχήμα, επιμηκύνεται και σχηματίζει ένα κωνικό σχήμα γνωστό ως κώνος του Taylor με γωνία γύρω στις 30° και κατεύθυνση προς το αντίθετο ηλεκτρόδιο. Όταν η ισχύς του ηλεκτρικού πεδίου ξεπεράσει μια κρίσιμη τιμή, οι απωθητικές ηλεκτροστατικές δυνάμεις υπερνικούν την επιφανειακή τάση, με αποτέλεσμα την εκτόξευση ενός φορτισμένου πίδακα από την άκρη του κώνου. Ο πίδακας αυτός υφίσταται μια διαδικασία αστάθειας και επιμήκυνσης που του επιτρέπει να γίνει πολύ λεπτός και μακρύς, με τη διάμετρό του να μπορεί να φτάσει από εκατοντάδες μm έως και δεκάδες nm. Κατά την διαδικασία αυτή ο διαλύτης εξατμίζεται (ή το τήγμα στερεοποιείται), αφήνοντας πίσω

φορτισμένες πολυμερικές ίνες. Οι ίνες αυτές με διαμέτρους που κυμαίνονται από μm έως nm προσκρούουν με υψηλές ταχύτητες ($> 40 \text{ m/sec}$) πάνω στο αντίθετο ηλεκτρόδιο-συλλέκτη (Greiner & Wendorff, 2007; Huang et al., 2003; Li & Xia, 2004).



Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση της ηλεκτροϊνοποίησης, όπου φαίνεται η απεικόνιση του κώνου του Taylor και μία εικόνα SEM νανοϊνών από πολυβινυλο-πυρρολιδόνη (PVP) (Li & Xia, 2004).

1.3.3.4. Οι αστάθειες του πίδακα

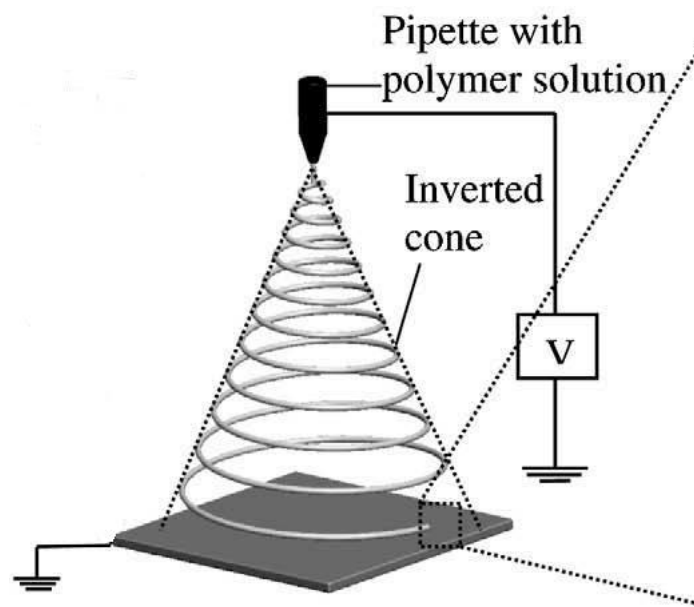
Κατά την διαδικασία της ηλεκτροϊνοποίησης, ο πίδακας που δημιουργείται υφίσταται μείωση στη διάμετρο με ταυτόχρονη αύξηση του μήκους του πριν προσκρούσει στο συλλέκτη. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να εξηγηθεί από τις φυσικές αστάθειες που συμβαίνουν στο πίδακα κατά τη διάρκεια της ηλεκτροϊνοποίησης. Οι αστάθειες αυτές επηρεάζουν το μέγεθος και τη γεωμετρία των ινών.

Η πρώτη αστάθεια είναι γνωστή ως αστάθεια του Rayleigh και είναι συμμετρική ως προς τον άξονα του πίδακα. Εμφανίζεται όταν η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου είναι χαμηλή ή όταν το ιξώδες του διαλύματος δεν είναι ικανοποιητικό. Όταν το ιξώδες του πολυμερικού διαλύματος είναι χαμηλό, ο πίδακας διασπάται και οδηγεί στη δημιουργία χαντρών (beads) στη μορφολογία των ινών. Αυτό αποδίδεται στην μικρή εμπλοκή (entanglement) των πολυμερικών αλυσίδων, καθώς και στην ανεπαρκή αντίσταση στο ηλεκτροστατικό πεδίο. Η αστάθεια του Rayleigh καταστέλλεται σε υψηλά ηλεκτρικά πεδία ή όταν χρησιμοποιείται υψηλότερης συγκέντρωσης διάλυμα.

Οι άλλες δύο αστάθειες είναι η αστάθεια κάμψης (bending instability) (αξονοσυμμετρική) και η αστάθεια χτυπήματος (whipping instability) (μη αξονοσυμμετρική), οι οποίες προκύπτουν λόγω της απώθησης που δημιουργείται μεταξύ των ομώνυμων φορτίων που υπάρχουν σε περίσσεια στο πίδακα και συμβάλουν στη μείωση της διαμέτρου

και στη επιμήκυνση του.

Σε υψηλές ηλεκτρικές δυνάμεις κυριαρχούν οι αστάθειες κάμψης και χτυπήματος, με αποτέλεσμα ο πίδακας να κινείται σε σχήμα αναστραμμένου κώνου και έτσι παράγονται καμπυλωτά ή κυματοειδή μοτίβα στο πίδακα. Σε υψηλότερα ηλεκτρικά πεδία και όταν υπάρχει επαρκής πυκνότητα φορτίου στον πίδακα, οι αξονοσυμμετρικές αστάθειες καταστέλλονται και ενισχύεται η μη αξονοσυμμετρική αστάθεια. Η αστάθεια χτυπήματος παράγει μια δύναμη κάμψης επί του πίδακα με αποτέλεσμα την επιμήκυνση του σε μεγάλο βαθμό. Κατά την διάρκεια όλων αυτών των διεργασιών, ο διαλύτης εξατμίζεται και τελικά εξαιρετικά λεπτές ίνες εναποτίθενται στον αγωγίμο συλλέκτη (Baji et al., 2010).



Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση της διαδρομής του πίδακα σε αναστραμμένο κώνο προτού συλλεχθεί σε ίνες στο συλλέκτη (Baji et al., 2010).

1.3.4. Παράμετροι που επηρεάζουν την ηλεκτροϊνοποίηση

Η διαδικασία ηλεκτροϊνοποίησης διέπεται από πολλές παραμέτρους που σχετίζονται με τις ιδιότητες του διαλύματος, τις παραμέτρους διεργασίας, και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι παράμετροι του διαλύματος περιλαμβάνουν το ιξώδες, την αγωγιμότητα, την επιφανειακή τάση, αλλά και το μοριακό βάρος του πολυμερούς που θα χρησιμοποιηθεί. Στις παραμέτρους διεργασίας ανήκουν η εφαρμοζόμενη τάση του ηλεκτρικού πεδίου, η ταχύτητα ροής του διαλύματος, η απόσταση του συλλέκτη από το ακροφύσιο και το είδος του συλλέκτη. Σημαντικό ρόλο παίζουν επίσης η θερμοκρασία και η υγρασία του περιβάλλοντος. Κάθε μία από αυτές τις παραμέτρους επηρεάζει την μορφολογία των ινών και με κατάλληλο χειρισμό δίνεται η δυνατότητα να παραχθούν νανοϊνες επιθυμητής μορφολογίας και

διαμέτρου (Bhardwaj & Kundu, 2010).

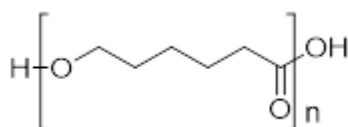
1.3.4.1. Ιδιότητες διαλύματος

- Πολυμερή

Στην επιλογή ενός συστήματος για ηλεκτροϊνοποίηση, το είδος του πολυμερούς που θα χρησιμοποιηθεί επιλέγεται βάση των απαιτούμενων ιδιοτήτων που θέλουμε να έχουν οι παραγόμενες ίνες και τις συνθήκες ηλεκτροϊνοποίησης που προσφέρει (Greiner & Wendorff, 2007). Υπάρχει ένα ευρύ φάσμα πολυμερών που χρησιμοποιούνται στην ηλεκτροϊνοποίηση και στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί νανοϊνες από διάφορα συνθετικά πολυμερή, φυσικά πολυμερή ή μείγματα και των δύο, συμπεριλαμβανομένων πολυσακχαριτών, πρωτεϊνών, ακόμη και νουκλειϊκών οξέων (Bhardwaj & Kundu, 2010).

Πολυ(ε-καπρολακτόνη) (PCL)

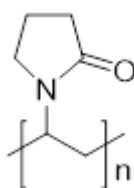
Η πολύ(ε-καπρολακτόνη) είναι ένα συνθετικό, ημι-κρυσταλλικό πολυμερές, το οποίο διαλύεται σε οργανικούς διαλύτες. Βιοαποικοδομείται μέσω υδρόλυσης στο ανθρώπινο σώμα και έχει ελάχιστη ή καθόλου τοξικότητα. Αποικοδομείται με αργό ρυθμό και γι' αυτό χρησιμοποιείται σε πολλές βιοϊατρικές εφαρμογές, κυρίως για μεταφορά φαρμάκων και σε μακροχρόνια εμφυτεύματα (Nair & Laurencin, 2007).



Εικόνα 13. Η χημική δομή της πολύ(ε-καπρολακτόνης).

Πολυ(βινυλοπυρρολιδόνη) (PVP)

Η πολυ(βινυλοπυρρολιδόνη) είναι ένα υδρόφιλο συνθετικό πολυμερές με πολύ καλή διαλυτότητα στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες. Έχει πολύ χαμηλή τοξικότητα και καλή βιοσυμβατότητα και γι' αυτό χρησιμοποιείται ευρέως σε καλλυντικά και στην παραγωγή νανοϊνών (Gökmeşe et al., 2013).



Εικόνα 14. Η χημική δομή της πολυ(βινυλοπυρρολιδόνης).

- **Ιξώδες**

Το ιξώδες του διαλύματος παίζει σημαντικό ρόλο στο μέγεθος και την μορφολογία των ινών. Έχει παρατηρηθεί ότι διαλύματα με χαμηλό ιξώδες δεν παράγουν συνεχόμενες ίνες, ενώ υπάρχει δυσκολία στην εκτόξευση του πίδακα για διαλύματα με πολύ υψηλό ιξώδες. Για κάθε υλικό απαιτείται διαφορετικό ιξώδες προκειμένου να ηλεκτροϊνοποιηθεί, που κυμαίνεται από 1 έως 215 poise. Διαλύματα με υψηλό ιξώδες εμφανίζουν συνήθως μεγαλύτερο χρόνο χαλάρωσης τάσης, κάτι που αποτρέπει το σπάσιμο του πίδακα κατά την ηλεκτροϊνοποίηση. Αύξηση του ιξώδους του διαλύματος ή της συγκέντρωσης του έχει ως αποτέλεσμα να σχηματίζονται μεγαλύτερες και πιο ομοιόμορφες ίνες. Το ιξώδες ενός διαλύματος παίζει καθοριστικό ρόλο στον προσδιορισμό του εύρους των συγκεντρώσεων από τις οποίες μπορούν να ληφθούν συνεχείς ίνες. Για διαλύματα χαμηλού ιξώδους, η επιφανειακή τάση είναι ο κυρίαρχος παράγοντας και σχηματίζονται χάντρες ή ίνες με χάντρες, ενώ πάνω από μία κρίσιμη συγκέντρωση λαμβάνονται συνεχείς ίνες και η μορφολογία επηρεάζεται μόνο από την συγκέντρωση του διαλύματος (Bhardwaj & Kundu, 2010).

- **Συγκέντρωση διαλύματος**

Η συγκέντρωση του πολυμερούς καθορίζει την ικανότητα ινοποίησης του διαλύματος, καθώς και το ιξώδες και την επιφανειακή του τάση, δύο παράμετροι πολύ σημαντικές στην διαδικασία της ηλεκτροϊνοποίησης. Εάν το διάλυμα είναι πολύ αραιό, τότε οι ίνες διασπώνται σε σταγονίδια πριν φτάσουν στο συλλέκτη λόγω των επιπτώσεων της υψηλής επιφανειακής τάσης. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορεί να ληφθεί μείγμα πολυμερικών χαντρών και ινών, ενώ με την αύξηση της συγκέντρωσης το σχήμα των πολυμερικών χαντρών αλλάζει από σφαιρικό σε ατρακτοειδές μέχρι που τελικά σχηματίζονται ομοιόμορφες ίνες με αυξημένη διάμετρο. Ωστόσο, εάν το διάλυμα είναι πολύ συμπυκνωμένο, δεν μπορούν να σχηματιστούν ίνες λόγω του υψηλού ιξώδους που καθιστά δύσκολο τον έλεγχο της ροής του διαλύματος στη βελόνα. Έτσι υπάρχει ένα βέλτιστο εύρος συγκεντρώσεων όπου μπορούν να παραχθούν ίνες, όταν οι άλλες παράμετροι διατηρούνται σταθερές. Γενικότερα ισχύει ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του διαλύματος αυξάνεται η διάμετρος των παραγόμενων ινών (Bhardwaj & Kundu, 2010; Sill et al., 2008).

- **Μοριακό βάρος**

Το μοριακό βάρος του πολυμερούς έχει σημαντική επίδραση στις ρεολογικές και ηλεκτρικές ιδιότητες, όπως το ιξώδες, η επιφανειακή τάση, η αγωγιμότητα και η διηλεκτρική σταθερά. Επηρεάζει την μορφολογία των ινών και γενικότερα στην ηλεκτροϊνοποίηση χρησιμοποιούνται διαλύματα πολυμερών με υψηλό μοριακό βάρος καθώς παρέχουν το

επιθυμητό ιξώδες για την παραγωγή ινών. Διαλύματα με χαμηλό μοριακό βάρος τείνουν να σχηματίσουν χάντρες αντί για ίνες, ενώ με υψηλό μοριακό βάρος δίνουν ίνες με μεγαλύτερη διάμετρο. Το μοριακό βάρος ενός πολυμερούς καθορίζει τον αριθμό των μπλεγμένων (entangled) πολυμερικών αλυσίδων στο διάλυμα, άρα και το ιξώδες του. Οι μπλεγμένες αλυσίδες είναι πολύ σημαντικές για την ηλεκτροϊνοποίηση. Ως εκ τούτου, ακόμη και όταν η συγκέντρωση πολυμερούς είναι χαμηλή, το υψηλό μοριακό βάρος μπορεί να διατηρήσει τον επαρκή αριθμό των μπλεγμένων αλυσίδων, εξασφαλίζοντας έτσι το απαραίτητο ιξώδες του διαλύματος για την παραγωγή ομοιόμορφου πίδακα και περιορίζοντας την επιφανειακή τάση, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην δημιουργία χαντρών. Το υψηλό μοριακό βάρος δεν είναι πάντα απαραίτητο για την ηλεκτροϊνοποίηση, εφόσον επαρκείς διαμοριακές αλληλεπιδράσεις παρέχουν τις κατάλληλες διασυνδέσεις (Bhardwaj & Kundu, 2010).

- **Επιφανειακή τάση**

Η επιφανειακή τάση εξαρτάται κυρίως από το διαλύτη που χρησιμοποιείται και παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της ηλεκτροϊνοποίησης. Γενικά η υψηλή επιφανειακή τάση εμποδίζει την διαδικασία της ηλεκτροϊνοποίησης λόγω αστάθειας του πίδακα και δημιουργίας ψεκαζόμενων σταγονιδίων. Ο σχηματισμός σταγονιδίων, χαντρών και ινών εξαρτάται από την επιφανειακή τάση του διαλύματος και περαιτέρω μείωση της επιφανειακής τάσης ενός διαλύματος επιτρέπει την ηλεκτροϊνοποίηση σε χαμηλότερο ηλεκτρικό πεδίο. Ωστόσο, δεν είναι απαραίτητο πάντα ότι η χαμηλή επιφανειακή τάση είναι κατάλληλη για την ηλεκτροϊνοποίηση (Bhardwaj & Kundu, 2010).

- **Αγωγιμότητα**

Τα πολυμερή είναι ως επί το πλείστον αγωγίμα, με λίγες εξαιρέσεις όπως τα διηλεκτρικά υλικά. Τα φορτισμένα ιόντα στο διάλυμα των πολυμερών επηρεάζουν σημαντικά τον σχηματισμό του πίδακα. Η αγωγιμότητα του διαλύματος προσδιορίζεται κυρίως από τον τύπο του πολυμερούς, τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη και τη χρήση ιοντικών αλάτων. Έχει βρεθεί ότι με αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας του διαλύματος υπάρχει σημαντική μείωση στη διάμετρο των νανοϊνών, ενώ σε χαμηλής αγωγιμότητας διαλύματα παρατηρείται ανεπαρκής επιμήκυνση του πίδακα για την παραγωγή ομοιόμορφων ινών και μπορεί να σχηματισθούν χάντρες. Τα ιόντα αυξάνουν την ικανότητα του πίδακα να μεταφέρει φορτίο, υποβάλλοντάς τον έτσι σε μεγαλύτερη τάση με το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Τα υψηλής αγωγιμότητας διαλύματα είναι εξαιρετικά ασταθή παρουσία ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου, το οποίο οδηγεί σε αστάθεια κάμψης και σε ευρεία κατανομή διαμέτρων. Η ακτίνα του πίδακα μεταβάλλεται αντιστρόφως ανάλογα της κυβικής ρίζας της ηλεκτρικής αγωγιμότητας του

διαλύματος. Με την προσθήκη ιοντικών αλάτων (πχ. KH_2PO_4 , NaCl) αυξάνεται η αγωγιμότητα του διαλύματος και μπορεί να ληφθούν ίνες μικρότερης διαμέτρου, ενώ αυξάνεται η ομοιομορφία τους και μειώνεται η δημιουργία χαντρών (Bhardwaj & Kundu, 2010).

- **Διαλύτης**

Ο διαλύτης παίζει σημαντικό ρόλο στην ηλεκτροϊνοποίηση, καθώς αφενός διαλύει τα μόρια του πολυμερούς για τα σχηματισμό του πίδακα και αφετέρου μεταφέρει τα μόρια του πολυμερούς προς το συλλέκτη. Έτσι για επιτυχή ηλεκτροϊνοποίηση, η επιλογή ενός κατάλληλου συστήματος διαλυτών είναι απαραίτητη. Κατά την ηλεκτροϊνοποίηση λαμβάνει χώρα ταχεία εξάτμιση του διαλύτη και διαχωρισμός φάσης λόγω της στένωσης του πίδακα. Η τάση ατμών του διαλύτη καθορίζει τον ρυθμό εξάτμισης του, ενώ η πητικότητα του την διαδικασία διαχωρισμού φάσεων. Η επιφανειακή τάση επηρεάζεται τόσο από την συγκέντρωση του πολυμερούς όσο και από το διαλύτη και ως γνωστόν παίζει καθοριστικό ρόλο στην μορφολογία και το μέγεθος των ινών (Bhardwaj & Kundu, 2010).

1.3.4.2. Παράμετροι διεργασίας

- **Τάση του ηλεκτρικού πεδίου**

Στη διαδικασία ηλεκτροϊνοποίησης ένα κρίσιμο στοιχείο είναι η εφαρμοζόμενη τάση στο διάλυμα. Μόνο μετά την επίτευξη τάσης υψηλότερης από μία κρίσιμη τιμή, παράγονται ίνες και πιο συγκεκριμένα δημιουργείται ικανοποιητικό ηλεκτρικό φορτίο στο διάλυμα από το ηλεκτρικό πεδίο για να ξεκινήσει η διαδικασία της ηλεκτροϊνοποίησης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, αύξηση της τάσης οδηγεί σε αύξηση των δυνάμεων Coulomb που ασκούνται στο πίδακα, με αποτέλεσμα τη μείωση της διαμέτρου των παραγόμενων ινών και τη ταχεία εξάτμιση του διαλύτη. Σε ακόμη υψηλότερες τάσεις υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να σχηματιστούν χάντρες. Έτσι η εφαρμοζόμενη τάση επηρεάζει την διάμετρο των ινών και αυτό ποικίλει ανάλογα με τη συγκέντρωση του πολυμερούς και την απόσταση του συλλέκτη (Bhardwaj & Kundu, 2010).

- **Ταχύτητα ροής**

Η ταχύτητα ροής αποτελεί σημαντική παράμετρο της ηλεκτροϊνοποίησης, καθώς επηρεάζει την ταχύτητα του πίδακα και το ρυθμό μεταφοράς του υλικού που θα υποστεί ηλεκτροϊνοποίηση από τη σύριγγα. Συνήθως, προτιμάται χαμηλή ταχύτητα ροής, ώστε ο διαλύτης να έχει τον απαραίτητο χρόνο να εξατμιστεί. Όταν η ταχύτητα ροής είναι πολύ υψηλή, σχηματίζονται ίνες με χάντρες επειδή δεν προλαβαίνουν να στεγνώσουν πριν

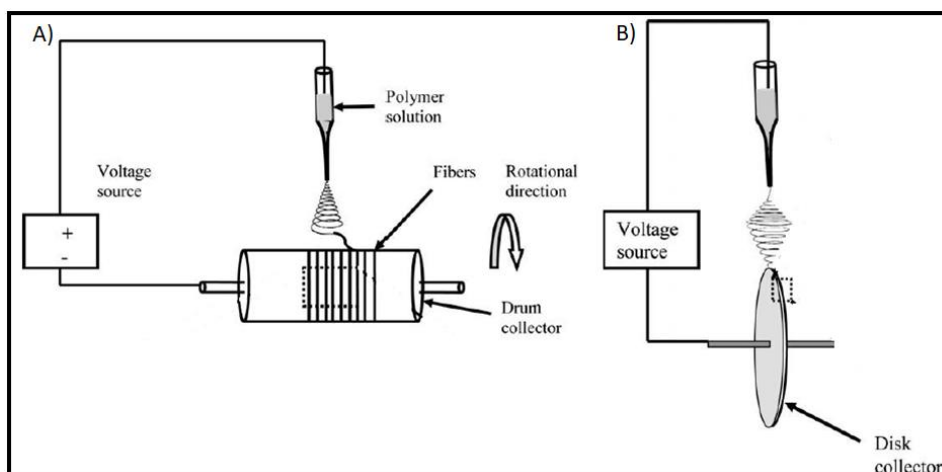
φτάσουν στον συλλέκτη ή σχηματίζονται πεπλατυσμένες ίνες (σαν κορδέλες). Σε χαμηλές ταχύτητες ροής, το σχήμα κώνου στην άκρη του ακροφυσίου δεν μπορεί να διατηρηθεί, όταν η ροή του διαλύματος δεν επαρκεί για να αντικαταστήσει το διάλυμα που έχει ηλεκτροϊνοποιηθεί (Bhardwaj & Kundu, 2010; Sill et al., 2008).

- **Απόσταση του συλλέκτη**

Η απόσταση μεταξύ του άκρου της βελόνας και του συλλέκτη αποτελεί μία παράμετρο που επηρεάζει την μορφολογία και την διάμετρο των ινών. Έχει παρατηρηθεί ότι απαιτείται συγκεκριμένη απόσταση για να παραχθούν ίνες, διαφορετικά σε αποστάσεις είτε πολύ μικρότερες είτε πολύ μεγαλύτερες, παράγονται χάντρες. Έχει αναφερθεί ότι πιο επίπεδες ίνες παράγονται σε πιο κοντινές αποστάσεις, ενώ με την αύξηση της απόστασης δημιουργούνται κυλινδρικές ίνες. Κατά την διαδικασία της ηλεκτροϊνοποίησης είναι πολύ σημαντικό οι ίνες να έχουν τον απαραίτητο χρόνο να στεγνώσουν από το διαλύτη πριν φτάσουν στο συλλέκτη. Έτσι η επιλογή της βέλτιστης απόστασης ευνοεί την εξάτμιση του διαλύτη (Bhardwaj & Kundu, 2010).

- **Είδη συλλεκτών**

Πολύ σημαντικό παράγοντα στην διαδικασία της ηλεκτροϊνοποίησης αποτελεί ο τύπος συλλέκτη που θα χρησιμοποιηθεί. Κατά την διαδικασία αυτή, ένας συλλέκτης χρησιμεύει ως αγώγιμο υπόστρωμα όπου συλλέγονται οι νανοΐνες. Γενικά χρησιμοποιείται φύλλο αλουμινίου, αλλά λόγω της δυσκολίας μεταφοράς των ινών ή της ανάγκης πιο ευθυγραμμισμένων ινών για διάφορες εφαρμογές χρησιμοποιούνται και άλλοι συλλέκτες, όπως αγώγιμο χαρτί, αγώγιμο ύφασμα, συρματοπλεγμα, καρφίτσα, παράλληλη ράβδος, περιστρεφόμενη ράβδος, περιστρεφόμενος τροχός και υγρό λουτρό με διαλύτη που δεν διαλυτοποιεί τις ίνες. Οι παραγόμενες νανοΐνες εναποτίθενται στον συλλέκτη σαν τυχαία μάζα λόγω της αστάθειας κάμψης του πολύ φορτισμένου πίδακα. Η χρήση μεταλλικού και αγώγιμου συλλέκτη συμβάλλει στην διασπορά των φορτίων με αποτέλεσμα την αποφόρτιση των ινών και την μείωση της μεταξύ τους άπωσης. Αυτό συνεπάγεται ίνες λείες και πυκνά πακεταρισμένες. Σε μη αγώγιμους συλλέκτες οι ίνες δεν διασπείρουν τα φορτία, τα οποία απωθούνται μεταξύ τους. Για τον λόγο αυτό, δημιουργούνται χαλαρά πλέγματα. Σε επιφάνειες με μικρότερη αγωγιμότητα ευνοείται η παραγωγή χαντρών. Η λήψη ευθυγραμμισμένων ινών καθορίζεται από το είδος του συλλέκτη και την ταχύτητα περιστροφής του. Οι συνηθέστεροι συλλέκτες είναι ο περιστρεφόμενος κύλινδρος, ο περιστρεφόμενος δίσκος, το μεταλλικό πλαίσιο και τα στατικά παράλληλα ηλεκτρόδια (Baji et al., 2010; Bhardwaj & Kundu, 2010).



Εικόνα 15. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ηλεκτροϊνοποίησης με Α) περιστρεφόμενο κύλινδρο Β) περιστρεφόμενο τροχό (Baji et al., 2010).

1.3.4.3. Συνθήκες περιβάλλοντος

Εκτός από τις παραμέτρους του διαλύματος και της επεξεργασίας, υπάρχουν και οι περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η υγρασία και η θερμοκρασία, που επηρεάζουν την διαδικασία της ινοποίησης. Σε μελέτες που έγιναν βρέθηκε ότι αύξηση της θερμοκρασίας επάγει την μείωση της διαμέτρου των παραγόμενων ινών, πιθανόν λόγω της μείωσης του ιξώδους του διαλύματος, δηλαδή υπάρχει μια αντίστροφη σχέση μεταξύ ιξώδους και θερμοκρασίας. Σε αντίστοιχες μελέτες που έγιναν για την υγρασία παρατηρήθηκε ότι με αύξηση της εμφανίζονται κυκλικοί πόροι στην επιφάνεια των ινών, ενώ με περαιτέρω αύξηση της οι πόροι κλείνουν. Επίσης, σε πολύ χαμηλά επίπεδα υγρασίας ένας πτητικός διαλύτης εξατμίζεται πιο γρήγορα. Μερικές φορές όταν ο ρυθμός εξάτμισης του διαλύτη είναι πολύ γρήγορος συγκριτικά με την απομάκρυνση του διαλύτη από την άκρη της βελόνας, η ηλεκτροϊνοποίηση μπορεί να διεξαχθεί για λίγα λεπτά πριν βουλώσει το άκρο της βελόνας (Bhardwaj & Kundu, 2010).

1.3.5. Παραλλαγές της ηλεκτροϊνοποίησης

Σε πολλές περιπτώσεις, η λειτουργικότητα των νανοϊνών μέσω ενσωμάτωσης λειτουργικών μορίων (σε πεδία όπως η τεχνολογία βιοαισθητήρων, η μηχανική ιστών, τα συστήματα χορήγησης φαρμάκων και η νανοηλεκτρονική) οδηγεί σε εμπόδια στη συμβατική ηλεκτροϊνοποίηση. Σε αυτές τις περιπτώσεις μπορεί να εφαρμοστούν τροποποιημένες μορφές της ηλεκτροϊνοποίησης (Greiner & Wendorff, 2007).

Ηλεκτροϊνοποίηση τήγματος (melt electrospinning)

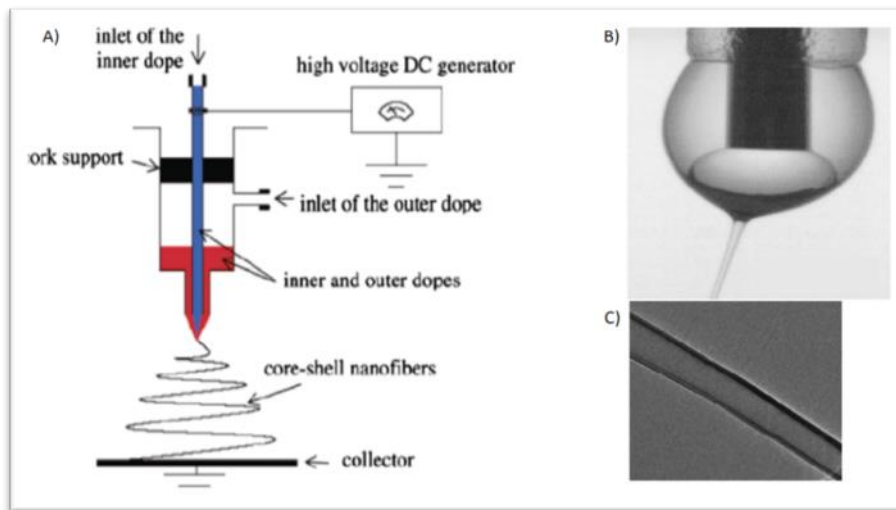
Το πιο αξιοσημείωτο πλεονέκτημα της ηλεκτροϊνοποίησης είναι ότι μπορεί να γίνεται με διάφορα πολυμερή σε διαλύματα αλλά και σε τήγματα. Η ηλεκτροϊνοποίηση τήγματος επιτρέπει νέες προσεγγίσεις για διάφορες εφαρμογές, ξεπερνώντας τεχνικούς περιορισμούς που διέπονται από την τοξικότητα του διαλύτη. Είναι ιδιαίτερα οικολογική και οικονομική μέθοδος λόγω της αποφυγής χρήσης οργανικών διαλυτών. Στην ηλεκτροϊνοποίηση τήγματος, αντί για διάλυμα, εισάγεται τήγμα πολυμερούς και η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε συνθήκες κενού. Λόγω της μεγάλης αύξησης του ιξώδους που θα μπορούσε να είναι πολλές τάξεις μεγέθους μεγαλύτερο από αυτό ενός διαλύματος πολυμερούς, αυτή η τεχνική δεν μπορεί να αποδώσει ίνες στη νανοκλίμακα. Επί του παρόντος, παρά το γεγονός ότι προσφέρει διάφορα πλεονεκτήματα, δεν εφαρμόζεται τόσο συχνά, λόγω του υψηλού ιξώδους του τήγματος και της πολύ υψηλής θερμοκρασίας επεξεργασίας που απαιτείται (Bhardwaj & Kundu, 2010).

Ομοαξονική ηλεκτροϊνοποίηση (coaxial electrospinning)

Τροποποιώντας το σχέδιο του κλωστήρα (συσκευή που χρησιμοποιείται για την εξώθηση ενός πολυμερικού διαλύματος ή τήγματος πολυμερούς για να σχηματιστούν ίνες, spinneret), διαφορετικές ιδιότητες μπορούν να αποδοθούν στις νανοϊνες. Στη διαδικασία της ομοαξονικής ηλεκτροϊνοποίησης, δύο διαλύματα πολυμερών μπορούν να ηλεκτροϊνοποιηθούν χωρίς απευθείας ανάμειξη, χρησιμοποιώντας δύο ομόκεντρα ευθυγραμμισμένα ακροφύσια. Η ίδια τάση εφαρμόζεται και στα δύο ακροφύσια και παραμορφώνονται τα σταγονίδια, από όπου παράγεται ο πίδακας και ιδανικά παράγονται νανοϊνες πυρήνα-κελύφους (core-shell). Αυτή η τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή διαφορετικών τύπων διπλής σύνθεσης νανοϊνών, επιφανειακά τροποποιημένων ινών, λειτουργικά διαβαθμισμένων νανοςύνθετων και κοίλων ινών. Έτσι δίνεται η δυνατότητα της χρήσης αυτής της τεχνικής σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, όπου η δραστική ουσία μπορεί να εισαχθεί στον πυρήνα των νανοϊνών, αλλά και σε ικρίωματα προσομοίωσης βιολογικών ιστών και στη παραγωγή εξαιρετικά ευαίσθητων βιοχημικών αισθητήρων (Garg & Bowlin, 2010; Teo & Ramakrishna, 2006).

Άλλες παραλλαγές ηλεκτροϊνοποίησης

Εκτός από τις παραλλαγές ηλεκτροϊνοποίησης που αναφέρθηκαν παραπάνω, έχουν αναπτυχθεί και άλλες καινοτομίες για την παρασκευή ινών με διαφορετικές ιδιότητες, όπως πολυστρωματική και μικτή ηλεκτροϊνοποίηση (multilayer and mixed electrospinning), ηλεκτροϊνοποίηση υποβοηθούμενη με αέρα (forced air-assisted electrospinning), ηλεκτροϊνοποίηση με διάκενο αέρα (air-gap electrospinning) (Garg & Bowlin, 2010).



Εικόνα 16. Α) Πειραματική διάταξη για την παραγωγή νανοϊνών core-shell (Garg & Bowlin, 2010) Β) Οπτική εικόνα των σταγόνων στο ακροφύσιο κατά την ομοαξονική ηλεκτροϊνιοποίηση C) TEM απεικόνιση ινών core-shell από πολυ(βινυλιδενοφθορίδιο) (PVDF, core) και πολυανθρακικό (PC, shell) (Greiner & Wendorff, 2007).

1.4. Διαλυτότητα & διάλυση φαρμακευτικών ουσιών

1.4.1. Διαλυτότητα

Ένα διάλυμα, το οποίο αποτελείται από ορισμένη ποσότητα διαλύτη, ανάλογα με την ποσότητα της διαλυμένης ουσίας σε αυτό, υπό σταθερές συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας μπορεί να χαρακτηριστεί ως:

- Ακόρεστο, όταν μπορεί να διαλυθεί σε αυτό επιπλέον ποσότητα της ουσίας
- Κορεσμένο, όταν ο διαλύτης περιέχει τη μέγιστη δυνατή ποσότητα διαλυμένης ουσίας
- Υπέρκορο, όταν περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα ουσίας από εκείνη που χρειάζεται για να γίνει το διάλυμα κορεσμένο. Σε αυτή την περίπτωση, συνήθως, η διαλυμένη ουσία παρουσιάζει διάφορες κρυσταλλικές δομές.

Η ενδογενής διαλυτότητα κορεσμού είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου σε κορεσμένο υδατικό διάλυμα, στο οποίο το φάρμακο δεν ιονίζεται και δεν αλληλεπιδρά με οποιοδήποτε τρόπο με τα συστατικά του διαλύματος. Όταν οι προϋποθέσεις αυτές δεν ισχύουν, περίπτωση η οποία συναντάται συχνά στις φαρμακευτικές ουσίες, τότε ορίζεται η συνολική διαλυτότητα κορεσμού (C_{ST}). Η τελευταία ισούται με την ενδογενή διαλυτότητα, αυξημένη κατά τη συγκέντρωση του φαρμάκου, το οποίο έχει ιονιστεί ή/και αντιδράσει με τα συστατικά του διαλύματος. Η συνολική διαλυτότητα κορεσμού μιας ουσίας, ή απλά

διαλυτότητα, είναι μια σταθερή θερμοδυναμική παράμετρος (Lipinski, 2000; Loftsson, 2010).

1.4.2. Διάλυση – Ρυθμός διάλυσης

Διάλυση είναι η διαδικασία μεταφοράς μάζας της προς διάλυση ουσίας στο κυρίως διάλυμα προς σχηματισμό ομοιογενούς μείγματος. Η μεταφορά αυτή θεωρείται ότι πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο λαμβάνει χώρα στη διεπιφάνεια στερεού – υγρού και έχει σαν αποτέλεσμα μόρια της προς διάλυση ουσίας να αποσπώνται από την επιφάνεια του στερεού και να σχηματίζουν ενυδατωμένα μόρια στην διεπιφάνεια στερεού–υγρού. Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει τη μεταφορά των διαλυμένων αυτών μορίων από τη διεπιφάνεια στον κύριο όγκο του μέσου διάλυσης. Αυτό συμβαίνει συνήθως με τη διαδικασία διάχυσης και μεταφοράς. Ένα από τα δύο στάδια αποτελεί το περιοριστικό βήμα για τη διάλυση της ουσίας και είναι αυτό που απαιτεί περισσότερο χρόνο για να πραγματοποιηθεί. Στις περισσότερες περιπτώσεις το στάδιο που ελέγχει τη διαδικασία είναι το δεύτερο, δηλαδή η διάχυση και μεταφορά του μορίου στον κύριο όγκο του διαλύματος.

Η κινητική της διάλυσης έχει απασχολήσει πολλούς επιστήμονες και έχουν γίνει πολλές μελέτες μέχρι σήμερα για τον καθορισμό της, καθώς πολλές φορές επηρεάζει τη βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου. Μέχρι σήμερα έχουν προταθεί πολλά μοντέλα, ενώ η πρώτη ποσοτική έκφραση για τη διαδικασία της διάλυσης δόθηκε το 1897 από τους Noyes & Whitney, οι οποίοι ξεκίνησαν από τη θεώρηση ότι η διαδικασία της διάλυσης ελέγχεται από το φαινόμενο της διάχυσης (Grijseels et al., 1981). Σύμφωνα με το μοντέλο των Noyes & Whitney ο ρυθμός διάλυσης ενός μη ιονισμένου μορίου είναι ανάλογος της διαφοράς ανάμεσα στη διαλυτότητα κορεσμού της ουσίας και της συγκέντρωσής της στο διάλυμα και δίνεται από την εξίσωση:

$$\frac{dc}{dt} = k_d(C_s - C_t)$$

όπου dc/dt είναι ο ρυθμός διάλυσης εκφρασμένος ως μεταβολή της συγκέντρωσης του διαλυμένου φαρμάκου (C) στη μονάδα του χρόνου (t), C_s και C_t είναι η διαλυτότητα κορεσμού του μη ιονισμένου μορίου και η συγκέντρωση του διαλυμένου φαρμάκου σε χρόνο t, αντίστοιχα, και k_d η γενικευμένη πρωτοταξική σταθερά του ρυθμού διάλυσης.

Στην περίπτωση που το μόριο ιονίζεται, όπως συμβαίνει στα περισσότερα φαρμακευτικά μόρια, η διαλυτότητα κορεσμού C_s , αντικαθίσταται στην εξίσωση με την ολική διαλυτότητα, C_{ST} , η οποία ισούται με το άθροισμα της διαλυτότητας κορεσμού και της συγκέντρωσης του ιονισμένου μορίου στο διάλυμα. Έτσι, η μεταβολή του pH του μέσου διάλυσης θα επηρεάζει τη συνολική διαλυτότητα (C_{ST}) των φαρμάκων καθώς θα ιονίζονται ανάλογα με το pH του υγρού στο οποίο είναι διαλυμένα.

Το μοντέλο των Noyes & Whitney ισχύει με τις προϋποθέσεις ότι το υπό διάλυση στερεό δεν αποσαθρώνεται και η διάλυση εξελίσσεται σε συνθήκες μέτριας ή έντονης ανάδευσης χωρίς να συνοδεύεται από χημική αντίδραση της διαλυμένης ουσίας με τα συστατικά του μέσου διάλυσης. Καθώς οι προϋποθέσεις αυτές είναι δύσκολο να ισχύουν *in vivo*, έχουν προταθεί και άλλα μοντέλα, τα οποία είναι κυρίως τροποποιήσεις του βασικού μοντέλου των Noyes & Whitney. Τέτοια μοντέλα είναι το μοντέλο της οριακής στιβάδας διάχυσης, το μοντέλο διεπιφανειακού φράγματος και το μοντέλο του Danckewerts (Higuchi, 1967; Μαχαίρας και Ρέππας, 1997).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό διάλυσης είναι:

1. Όγκος του υγρού μέσου διάλυσης: Όσο αυξάνεται ο όγκος του υγρού μέσου συνήθως τόσο μειώνεται ο ρυθμός αύξησης της συγκέντρωσης στο κυρίως διάλυμα. Βέβαια, ο όγκος των υγρών του γαστρεντερικού σωλήνα είτε παρουσία είτε απουσία τροφής βρίσκεται σε σχετικά στενά πλαίσια με αποτέλεσμα να μην μπορεί να επηρεαστεί σημαντικά ο *in vivo* ρυθμός διάλυσης μιας ουσίας με έλεγχο του όγκου του υγρού διάλυσης.

2. Ενδογενής σταθερά του ρυθμού διάλυσης: Ρυθμίζεται με διαφορετικό τρόπο για κάθε μοντέλο διάλυσης.

3. Έκταση επιφάνειας του στερεού: Η αύξηση της έκτασης επιφάνειας των σωματιδίων του φαρμάκου είναι ίσως ο πιο κοινός τρόπος αύξησης του ρυθμού διάλυσης. Καθώς μειώνεται το μέγεθός τους, αυξάνεται η διαθέσιμη προς διάλυση επιφάνεια με αποτέλεσμα να αυξάνεται και ο ρυθμός διάλυσής τους.

4. Η διαφορά ($C_s - C$): Η διαφορά αυτή μπορεί να ελεγχθεί είτε τροποποιώντας τη διαλυτότητα κορεσμού C_s είτε διατηρώντας πολύ χαμηλή τη συγκέντρωση C του φαρμάκου στο υγρό μέσο.

1.4.3. Μέθοδοι μελέτης διαδικασίας διάλυσης

Κατά καιρούς έχουν προταθεί πολλές διατάξεις για τη μελέτη και τον προσδιορισμό του ρυθμού διάλυσης των φαρμακευτικών ουσιών, αλλά σήμερα χρησιμοποιούνται σχεδόν αποκλειστικά μόνο δύο διατάξεις, οι οποίες περιλαμβάνονται και στις Φαρμακοποιίες των περισσότερων χωρών (US Pharmacopeia NF <711> Dissolution General Chapter, European Pharmacopeia 8.0 Chapter 2.9.3, 5.17). Αυτές είναι η διάταξη του περιστρεφόμενου καλαθίσκου και η διάταξη του περιστρεφόμενου πτερυγίου και προτιμώνται καθώς εμφανίζουν τα παρακάτω πλεονεκτήματα:

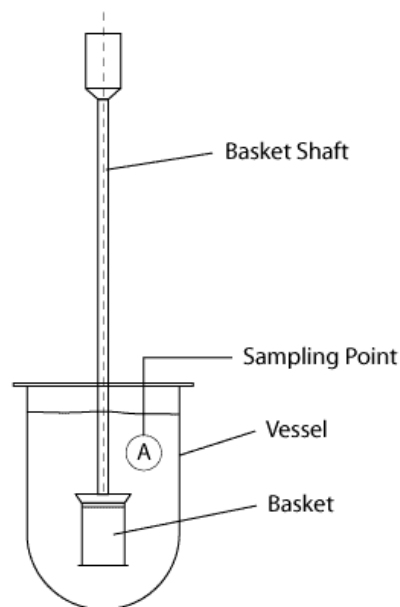
- Ακριβείς συνθήκες ανάδευσης
- Εύκολη δειγματοληψία
- Δυνατότητα αυτοματισμού

- Διατήρηση συνθηκών δεξαμενής κατά τη διάρκεια του πειράματος
- Χαμηλό κόστος λειτουργίας

Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να δίνουν επαναλήψιμα αποτελέσματα, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε *in vitro* – *in vivo* συσχετίσεις.

Διάταξη του περιστρεφόμενου καλαθίσκου (Rotating Basket, Apparatus I)

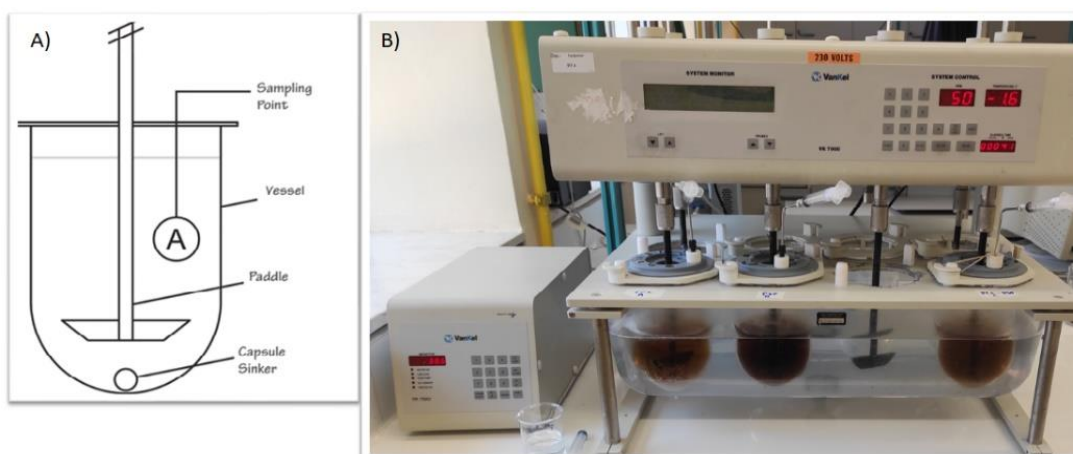
Η συσκευή αυτή αποτελείται συνήθως από επτά σκεπασμένα ποτήρια, τα οποία είναι κατασκευασμένα από γυαλί ή άλλο αδρανές διαφανές υλικό, και από άξονες σε καθένα από τους οποίους τοποθετείται μεταλλική ράβδος, της οποίας το άνω άκρο είναι προσαρμοσμένο σε ένα κινητήρα και το κάτω είναι τοποθετημένο σε ένα κυλινδρικό καλαθίσκο. Τα ποτήρια είναι κυλινδρικά με σφαιρική βάση και χωρητικότητα 1000 mL. Βυθίζονται σε υδατόλουτρο του οποίου η θερμοκρασία ρυθμίζεται στους 37 ± 0.5 °C. Οι ράβδοι και οι καλαθίσκοι είναι από ανοξείδωτο ασάλι και περιστρέφονται με την βοήθεια του κινητήρα με συγκεκριμένο αριθμό στροφών ανά λεπτό, συνήθως 100 rpm ή σύμφωνα με την αντίστοιχη μονογραφία της Φαρμακοποιίας. Η φαρμακοτεχνική μορφή τοποθετείται στον καλαθίσκο, ο οποίος περιστρέφεται στο κέντρο του ποτηριού. Η δειγματοληψία γίνεται από συγκεκριμένο σημείο που ορίζεται ως η μέση απόσταση από την επιφάνεια του μέσου διάλυσης και το άνω άκρο του καλαθίσκου.



Εικόνα 17. Διάταξη του περιστρεφόμενου καλαθίσκου (<https://www.labhut.com/education-centre/about-dissolution-testing/apparatus-1-rotating-basket.html>).

Διάταξη του περιστρεφόμενου πτερυγίου (Rotating Paddle, Apparatus II)

Η συσκευή αυτή διαφέρει από την προηγούμενη μόνο στη χρήση πτερυγίου αντί του καλαθίσκου και στην τοποθέτηση της φαρμακοτεχνικής μορφής στον πυθμένα του ποτηριού. Εάν το σκεύασμα επιπλέει, τότε τοποθετείται εντός ενός χαλαρού μεταλλικού πλέγματος, το οποίο το παρασύρει στον πάτο του ποτηριού (US Pharmacopeial Convention, 2011, European Pharmacopeia 8.0, Μαχαίρας και Ρέππας, 1997). Επιπλέον, ο συνήθης ρυθμός ανάδευσης είναι 50 rpm, ή όπως ορίζεται από την αντίστοιχη για το φαρμακευτικό προϊόν μονογραφία της Φαρμακοποιίας. Η δειγματοληψία γίνεται και πάλι από συγκεκριμένο σημείο που ορίζεται ως η μέση απόσταση από την επιφάνεια του μέσου διάλυσης και το άνω άκρο του πτερυγίου. Τόσο το πτερύγιο όσο και ο καλαθίσκος θα πρέπει να βρίσκονται σε απόσταση 2.5 cm από τον πυθμένα του ποτηριού.



Εικόνα 18. Α) Διάταξη του περιστρεφόμενου πτερυγίου (<https://www.labhut.com/education-centre/about-dissolution-testing/apparatus-2-paddle-test.html>). Β) Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο.

Συνθήκες διαδικασίας διάλυσης

Οι όγκοι που χρησιμοποιούνται πιο συχνά στις διατάξεις περιστρεφόμενου πτερυγίου και καλαθίσκου κυμαίνονται από 500 μέχρι 1.000 mL. Τέτοιοι όγκοι μπορούν να δημιουργήσουν συνθήκες δεξαμενής για τη μελέτη του ρυθμού διάλυσης του φαρμάκου και μπορούν να οδηγήσουν σε συμπεράσματα που αφορούν την αποδέσμευση του φαρμάκου από την δοσολογική μορφή. Ωστόσο, οι όγκοι που χρησιμοποιούνται μπορεί να μην σχετίζονται με τους αντίστοιχους όγκους *in vivo*. Αυτό εξαρτάται κάθε φορά από την ύπαρξη ή μη τροφής κατά τη λήψη του φαρμάκου. Κατά τη διάρκεια της πέψης στο στομάχι μπορούν να επιτευχθούν όγκοι οι οποίοι πλησιάζουν το 1 L ή ακόμα και μεγαλύτεροι. Παρόλα αυτά, αν το σκεύασμα χορηγείται σε περίοδο νηστείας με ένα ποτήρι νερό, τότε ο όγκος των γαστρικών

υγρών δεν αναμένεται να ξεπεράσει τα 250 mL. Έτσι, οι όγκοι που χρησιμοποιούνται στον έλεγχο του ρυθμού διάλυσης *in vitro* μπορεί να είναι υπερβολικά υψηλοί. Για φάρμακα υψηλής διαλυτότητας, που ανήκουν στην κλάση I και III του συστήματος βιοφαρμακευτικής ταξινόμησης (Biopharmaceutical Classification System, BCS), για τα οποία επιτυγχάνονται συνθήκες δεξαμενής σε μικρούς όγκους μέσου διάλυσης, αυτή η αναντιστοιχία των όγκων δεν προκαλεί προβλήματα. Ωστόσο, για τα δυσδιάλυτα φάρμακα (κλάση II και IV του BCS) οι μεγάλοι όγκοι που χρησιμοποιούνται *in vitro* μπορεί να οδηγήσουν σε υπερεκτίμηση της διάλυσης στο στομάχι ή το λεπτό έντερο *in vivo*.

Οι υδροδυναμικές συνθήκες στη διάταξη του περιστρεφόμενου πτερυγίου έχουν μελετηθεί εκτενώς και έχουν προταθεί πολλά μοντέλα που τις περιγράφουν (Bai et al., 2007). Οι συνθήκες που ορίζονται από την Αμερικάνικη Φαρμακοποιία μπορεί να παρουσιάσουν προβλήματα όχι μόνο επειδή δεν έχουν λάβει υπόψη τους τις *in vivo* συνθήκες κατά το σχεδιασμό των μεθόδων, αλλά και επειδή οι υδροδυναμικές συνθήκες διαφέρουν μέσα στο ίδιο το ποτήρι της διάταξης. Έτσι, ανάλογα με το σχήμα, το μέγεθος και την πυκνότητα της ουσίας που διαλύεται, καθώς και του τρόπου τοποθέτησης της στο δοχείο, μπορούν να ληφθούν πολύ διαφορετικά αποτελέσματα διάλυσης (Kostewicz et al., 2014).

1.5. Πειραματικές μέθοδοι για τη μελέτη της απορρόφησης με *ex vivo* μοντέλα

Η διαβλεννογονική μεταφορά των φαρμάκων συνήθως μελετάται με *ex vivo* μοντέλα στα οποία χρησιμοποιείται βλεννογόνο ζώων. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα *ex vivo* μοντέλα ζωικού ιστού λαμβάνονται από αρουραίους, κουνέλια, σκύλους, πρόβατα, πιθήκους, αλλά και από ανθρώπους. Από τις μελέτες αυτές προκύπτουν πληροφορίες σχετικά με τη διαπερατότητα, το μεταβολισμό, την αποτελεσματικότητα και την τοξικότητα των φαρμάκων. Τα μοντέλα αυτά παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα, όμως έχουν και ορισμένους περιορισμούς. Ο σημαντικότερος παράγοντας περιορισμού είναι το πάχος των επιθηλιακών ιστών και η έλλειψη διάμεσου ρυθμού ροής κάτω από τον βλεννογόνο. Για τη χορήγηση φαρμάκου είναι απαραίτητο να διερευνηθούν ορισμένοι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την έκταση και το ρυθμό της απορρόφησης του. Αυτοί οι παράγοντες είναι η μεταβολική σταθερότητα, οι μηχανισμοί διαπερατότητας και η φαρμακοτεχνική του μορφή. Τα πιο γνωστά μοντέλα για τη μελέτη διαπερατότητας του φαρμάκου είναι αυτό της ρινικής διάχυσης με τη χρήση θαλάμου Ussing και τα κάθετα στατικά κύτταρα διάχυσης, τα οποία είναι γνωστά και ως κύτταρα Franz (Cho et al., 2010).

Κύτταρα διάχυσης (Diffusion Cells)

Κατά την πρώιμη φάση ανάπτυξης φαρμάκων, τα *ex vivo* πειράματα διαπερατότητας πραγματοποιούνται συνήθως χρησιμοποιώντας κύτταρα διάχυσης, τα οποία είναι γνωστά και ως κύτταρα Franz. Ανάλογα με την κατασκευή τους, τα κύτταρα διάχυσης χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τα στατικά κύτταρα κάθετου ή οριζόντιου σχεδιασμού και τα flow through κύτταρα διάχυσης (Fabrizio et al., 2009).

Τα κύτταρα Franz είναι κατασκευασμένα από γυαλί και αποτελούνται από δύο διαμερίσματα, του δότη (donor chamber) και του δέκτη (receptor chamber), τα οποία συνιστούν δυο ανεξάρτητα μέρη του κυττάρου και συγκρατούνται μεταξύ τους με τη βοήθεια μεταλλικού σφιγκτήρα. Μεταξύ των δυο διαμερισμάτων τοποθετείται η μεμβράνη έτσι ώστε το διαμέρισμα του δότη να βρίσκεται στην πλευρά της μεμβράνης που εφαρμόζεται το υπό μελέτη προϊόν, ενώ το διαμέρισμα του δέκτη να βρίσκεται στην άλλη πλευρά της μεμβράνης. Το διαμέρισμα του δέκτη γεμίζεται με διάλυμα το οποίο πρέπει να έχει χαρακτηριστικά τέτοια που να μην επηρεάζει την ακεραιότητα της μεμβράνης και ταυτόχρονα να προσομοιάζει τις φυσιολογικές συνθήκες (πχ. pH αίματος). Το κάτω μέρος του κυττάρου τοποθετείται σε υδατόλουτρο με σταθερή θερμοκρασία στους 37 °C, ώστε να προσομοιάζει τη θερμοκρασία του σώματος και να αποφεύγονται διακυμάνσεις που μπορεί να επηρεάσουν τη διαπερατότητα των σκευασμάτων. Στο διαμέρισμα του δότη τοποθετείται το φαρμακευτικό προϊόν προσομοιάζοντας την πραγματική διαδικασία χορήγησης, ενώ στο διαμέρισμα του δέκτη τοποθετείται μαγνήτης ανάδευσης (Levintova et al., 2011). Η διαδικασία δειγματοληψίας από το διαμέρισμα δέκτη διαφοροποιείται ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος. Συνήθως λαμβάνεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα μικρός όγκος (500 μL) που αντικαθίσταται αμέσως με καθαρό διάλυμα. Το διάλυμα του διαμερίσματος δέκτη αναδεύεται συνεχώς με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα.

Τα κύτταρα Franz έχουν γίνει αρκετά δημοφιλή λόγω του χαμηλού κόστους και του ότι πρόκειται για μια μέθοδο που χαρακτηρίζεται από ταχύτητα και επαναληψιμότητα. Παρουσιάζουν όμως κάποιους περιορισμούς, με τον πιο σημαντικό να αφορά στην ευαισθησία τους στη διατάραξη των συνθηκών δεξαμενής και στη σχετικά κακή ανάμειξη του διαλύματος στο διαμέρισμα δέκτη, λόγω του σχήματος του κυττάρου. Γι' αυτό και υπάρχει η πιθανότητα σχηματισμού ενός κορεσμένου στρώματος κάτω από την επιφάνεια της μεμβράνης που χωρίζει τα δυο διαμερίσματα (Moss, 2015).

1.6. Σκοπός της μελέτης

Με βάση την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας είναι εμφανές ότι το εχινόχρωμα Α έχει, μεταξύ άλλων, πολύ σημαντική αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και καρδιοπροστατευτική δράση. Ωστόσο, το εχινόχρωμα Α είναι πρακτικά αδιάλυτο στο νερό, ενώ παράλληλα είναι ασταθές καθώς ιοντίζεται εύκολα υπό φυσιολογικές συνθήκες και υφίσταται οξείδωση λόγω της έκθεσης του στο οξυγόνο. Μέχρι στιγμής το εχινόχρωμα Α έχει αποτελέσει τη βάση για την ανάπτυξη του εμπορικά διαθέσιμου φαρμάκου HistoChrome που κυκλοφορεί στην Ρωσία. Το HistoChrome έχει ως δραστική ουσία το μετά νατρίου άλας του εχινόχρωματος Α και για τον λόγο αυτό χορηγείται μόνο είτε ως ενέσιμο στη καρδιολογία είτε ως οφθαλμικές σταγόνες στην οφθαλμολογία. Παρόλα αυτά η χρήση του εχινόχρωματος Α παραμένει μέχρι στιγμής περιορισμένη αφού δεν μπορεί να βρει εφαρμογή σε περιπτώσεις που απαιτείται εναλλακτικός τρόπος χορήγησης (από του στόματος, διαδερμική, παρειακή, ρινική, κλπ).

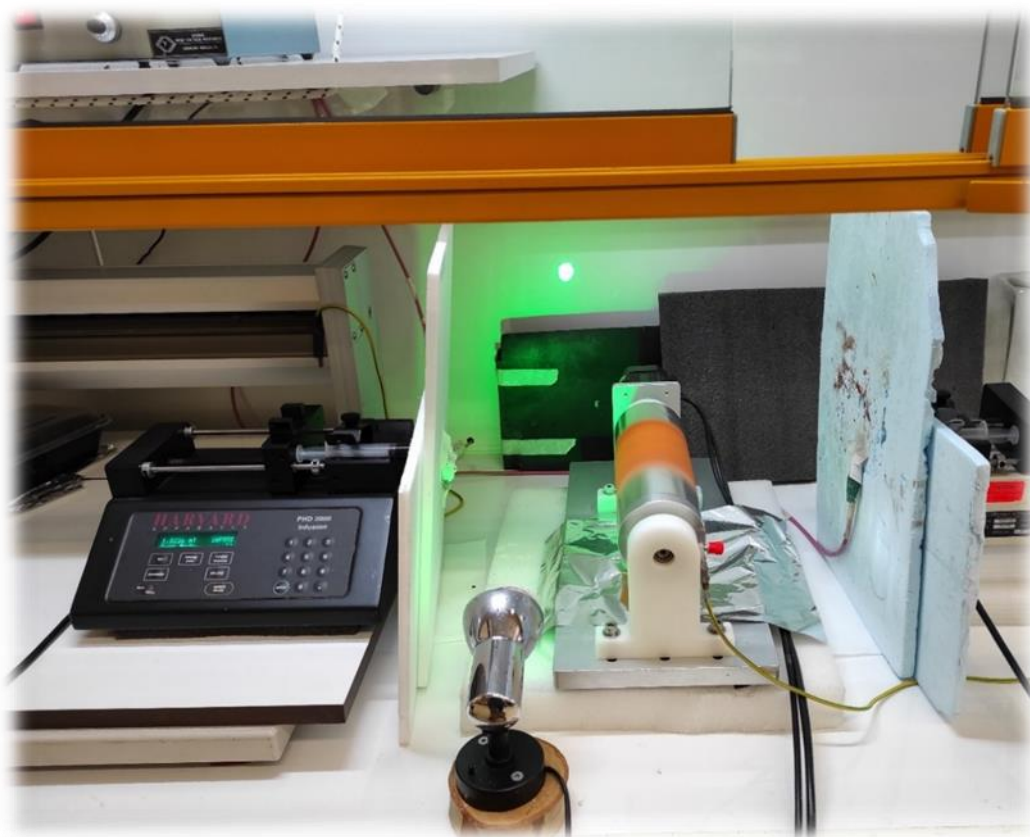
Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας σκοπός ήταν η ανάπτυξη μίας νέας φαρμακοτεχνικής μορφής που να βελτιώνει τα χαρακτηριστικά διάλυσης του εχινόχρωματος Α, καθώς και τη σταθερότητα του σε υδατικά μέσα που προσομοιώνουν τα γαστρεντερικά υγρά του ανθρώπινου σώματος με απώτερο στόχο να καταστεί δυνατή η από του στόματος ή διαδερμική χορήγηση του εχινόχρωματος Α.

Για τον λόγο αυτό επιλέχθηκε προς μελέτη η ανάπτυξη μικρο-/νανοϊνωδών ικρνωμάτων μέσω της τεχνικής της ηλεκτροϊνοποίησης, χρησιμοποιώντας βιοσυμβατά υδρόφοβα και υδρόφιλα πολυμερή και ενσωματώνοντας το εχινόχρωμα Α.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Οργανολογία

Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροϊονοποίηση αποτελείται από τρία βασικά μέρη: μία γεννήτρια παροχής υψηλής τάσης (Gamma High Voltage Research, Ormond Beach, FL, USA) η οποία παρέχει τάση έως 50 kV, μία προγραμματιζόμενη αντλία (Harvard PHD 2000, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) και έναν περιστρεφόμενο συλλέκτη (NaBond Technologies, Hong Kong). Η διάταξη βρίσκεται σε έναν ηλεκτρικά μονωμένο θάλαμο τοποθετημένη σε οριζόντια θέση. Στη περίπτωση της αντιπαράλληλης ηλεκτροϊονοποίησης, χρησιμοποιήθηκαν δύο προγραμματιζόμενες αντλίες (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) τοποθετημένες σε αντιπαράλληλη διάταξη.



Εικόνα 19. Η εργαστηριακή διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για την αντιπαράλληλη ηλεκτροϊονοποίηση.

Για την ηλεκτροϊονοποίηση των πολυμερικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε σύριγγα μιας χρήσεως των 10 mL, στην άκρη της οποίας βρισκόταν τοποθετημένη μεταλλική βελόνα διαμέτρου 23 gauge (0.60 mm) που συνδέθηκε στον θετικό πόλο της γεννήτριας τάσης. Η ροή

του διαλύματος ρυθμίστηκε από την αντλία. Οι παραγόμενες νανοϊνες συλλέχθηκαν σε φύλλο αλουμινίου, το οποίο ήταν τοποθετημένο στον γειωμένο συλλέκτη. Η σχετική υγρασία και η θερμοκρασία ήταν $60 \pm 5\%$ και $21 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$, αντίστοιχα.

Ο χαρακτηρισμός και η παρατήρηση των παραγόμενων ινών έγινε με την χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (PhenomWorld, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) με νήμα βολφραμίου (10 kV). Χρησιμοποιήθηκε δειγματολήπτης μείωσης φορτίου (charge reduction sample holder, PhenomWorld) ώστε να μην απαιτείται προεπεξεργασία για την απεικόνιση των μη αγώγιμων υλικών. Η διάμετρος των ινών υπολογίστηκε με το ενσωματωμένο λογισμικό ανάλυσης εικόνας Phenom Pro Suite/ FiberMetric.

Τα φάσματα NMR ελήφθησαν σε φασματογράφο Bruker DRX 400. Για τη λήψη των φασμάτων NMR χρησιμοποιήθηκε $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$. Οι ^1H NMR χημικές μετατοπίσεις δίνονται στη κλίμακα δ (ppm) λαμβάνοντας ως αναφορά την κορυφή του $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ στα 2.05 ppm, ενώ οι σταθερές σύζευξης J (Hz) δίνονται σε παρενθέσεις.

Τα φάσματα FT-IR καταγράφηκαν σε φασματογράφο Bruker Alpha II (Billerica, MA, USA) με τη τεχνική της εξασθενημένης (αποσβένουσας) ολικής ανάκλασης (ATR).

Τα φάσματα UV-Vis καταγράφηκαν σε φασματοφωτόμετρο πολλαπλών θέσεων (microplate reader) TECAN Infinite M200 Pro (Männedorf, Zürich, Switzerland).

Η θερμοσταθμική ή θερμοβαρυτική ανάλυση (Thermogravimetric Analysis, TGA) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός TA Thermogravimetric Analyzer (TGA 55, TA Instruments, New Castle, DE, USA), σε εύρος θερμοκρασιών από 40 έως 600 $^\circ\text{C}$, με ρυθμό θέρμανσης 10 $^\circ\text{C}$ /min, υπό συνεχή ροή αζώτου 25 mL/min, με συνεχή καταγραφή του βάρους δείγματος, της θερμοκρασίας δείγματος, και της ροής θερμότητας.

Η ανάλυση διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry, DSC) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός TA Thermal Analyzer (Discovery DSC 25, TA instruments, New Castle, DE, USA). Δείγματα των 6-7 mg σφραγισμένα σε καψάκιο αλουμινίου θερμάνθηκαν από τους 40 έως τους 370 $^\circ\text{C}$, με ρυθμό θέρμανσης 10 $^\circ\text{C}$ /min, υπό συνεχή ροή αζώτου 50 mL/min.

Η συμπύκνωση των εκχυλισμάτων και των κλασμάτων υπό κενό έγινε σε συσκευή ταχείας εξάτμισης διαλύτη με μηχανικά περιστρεφόμενη φιάλη απόσταξης και εφαρμογή ελαττωμένης πίεσης τύπου BÜCHI Rotavapor R-200 σε θερμοκρασία έως 38 $^\circ\text{C}$.

Η διάλυση αξιολογήθηκε *in vitro* σε συσκευή διάλυσης (dissolution) περιστρεφόμενου περυγίου, USP Apparatus II, Vankel 750D.

Η διαπερατότητα αξιολογήθηκε *ex vivo* χρησιμοποιώντας κύτταρα Franz (Crown Glass, Somerville, U.S.A.) με εμβαδό ανοίγματος 0.636 cm², όγκο διαμερίσματος δέκτη 6.275 mL και θερμοστατούμενο υδατόλουτρο Edmund Bühler D-7400 (Tübingen, Germany).

2.2. Διαλύτες και χημικά αντιδραστήρια

Για την παραγωγή των ηλεκτροϊονοποιημένων ινών χρησιμοποιήθηκαν πολυ(βινυλοπυρρολιδόνη) (PVP) (average Mw 1.300.000) και πολυ(ε-καπρολακτόνη) (PCL) (average Mn 80.000) από την εταιρεία Sigma-Aldrich.

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί υγρής χρωματογραφίας με υποβοήθηση κενού πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ως υλικό πλήρωσης της στήλης γέλη πυριτίου κανονικής φάσης Kieselgel 60H ή αντίστροφης φάσης Kieselgel C₁₈ της εταιρείας Merck.

Οι χρωματογραφικοί προσδιορισμοί TLC πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας πλάκες αλουμινίου με επίστρωση Kieselgel 60 G/UV₂₅₄ (20 x 20 cm, πάχους 0.2 mm) της εταιρείας Macherey-Nagel. Μετά την ανάπτυξη τους σε κατάλληλο σύστημα διαλυτών, οι πλάκες ελέγχονταν σε λάμπα υπεριώδους φωτός (UV) στα 254 nm και 365 nm και οι κηλίδες ανιχνεύονταν ύστερα από ψεκασμό με διάλυμα 15% H₂SO₄ σε MeOH και θέρμανση της πλάκας στους 100°C για περίπου 2 min.

Οι διαλύτες cHex, EtOAc, CH₂Cl₂ και MeOH ήταν καθαρότητας A.R. της εταιρείας LAB-SCAN Analytical Sciences, οι οποίοι πριν από τη χρήση τους αποστάχθηκαν. Οι διαλύτες EtOH και DMF ήταν καθαρότητας A.R. της εταιρείας LAB-SCAN Analytical Sciences.

Για την λήψη των φασμάτων NMR χρησιμοποιήθηκε (CD₃)₂CO χωρίς εσωτερικό πρότυπο της εταιρείας Deutero GmbH.

Το H₂O που χρησιμοποιήθηκε ήταν απεσταγμένο που στη συνέχεια διηθήθηκε μέσω συστήματος ρητινών.

2.3. Συλλογή του οργανισμού

Αχινοί του γένους *Diadema* συλλέχθηκαν από τον κόλπο του Αγίου Γεωργίου στο Καστελλόριζο, σε βάθος 1-5 m, τον Σεπτέμβριο του 2021. Οι αχινοί μεταφέρθηκαν υπό ψύξη στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστημίου Αθηνών, όπου και διατηρήθηκαν στους -20°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους.

2.4. Χρωματογραφικός διαχωρισμός και απομόνωση του εχινοχρώματος A

Αρχικά οι αχινοί καθαρίστηκαν από τα εντόσθια και το υγρό τους. Ποσότητα αγκαθιών και κελύφη αχινών (~350 g) τοποθετήθηκαν σε πλαστικό δοχείο, όπου πολτοποιήθηκαν με τη χρήση πλαστικής ράβδου και στη συνέχεια εκχυλίστηκαν εξαντλητικά με μείγμα EtOH (70%)-H₂SO₄ (8-10%) τρεις φορές. Μετά την συμπύκνωση των τριών εκχυλισμάτων υπό κενό προέκυψαν εκχυλίσματα καφέ-κόκκινου χρώματος.

Η συνολική πορεία απομόνωσης του εχινόχρωματος Α από τα αρχικά εκχυλίσματα παρουσιάζεται διαγραμματικά στο ακόλουθο σχήμα (Εικ. 20), ενώ στη συνέχεια περιγράφονται λεπτομερώς όλα τα στάδια της.

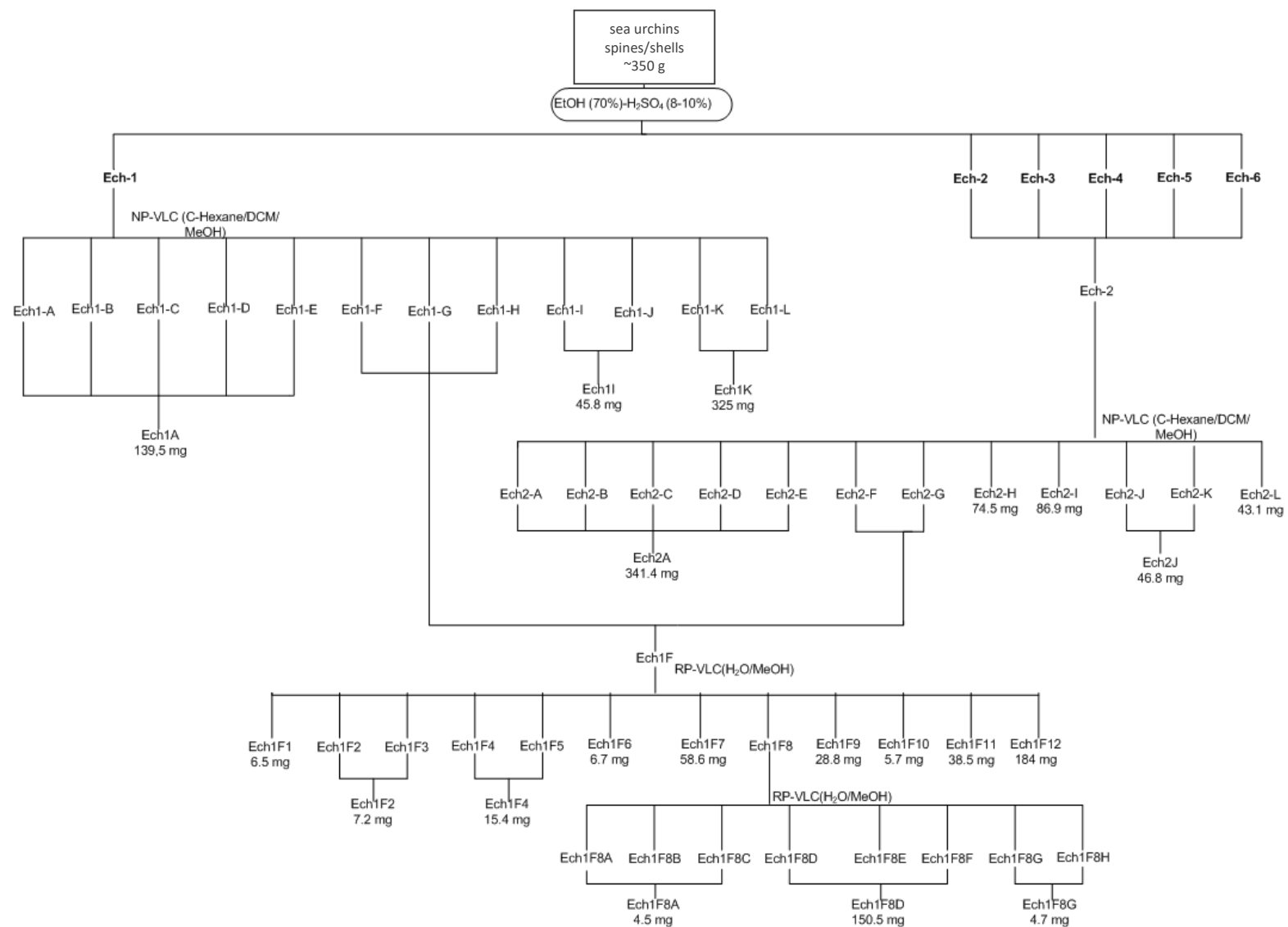
Το πρώτο εκχύλισμα συμπυκνώθηκε υπό κενό προς απομάκρυνση της EtOH. Αραιώθηκε με 200 mL H₂O και στη συνέχεια ακολούθησε υγρή-υγρή εκχύλιση με 200 mL CH₂Cl₂ σε διαχωριστική χοάνη. Συλλέχθηκε η οργανική φάση, η οποία αφυδατώθηκε με προσθήκη MgSO₄ και διηθήθηκε προς απομάκρυνση των στερεών υπολειμμάτων. Στη συνέχεια η οργανική φάση εξατμίστηκε μέχρι ξηρού και παραλήφθηκε το κλάσμα Ech-1. Στην υδατική φάση πραγματοποιήθηκε ακόμη μία εκχύλιση με EtOAc με τον ίδιο τρόπο για την παραλαβή του κλάσματος Ech-2. Με την ίδια διαδικασία έγινε η επεξεργασία των υπόλοιπων δύο εκχυλισμάτων από όπου παραλήφθηκαν τα κλάσματα Ech-3 έως Ech-6.

Το υπόλειμμα Ech-1 (0.98 g) υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία με υποβοήθηση κενού, χρησιμοποιώντας ως στατική φάση γέλη πυριτίου κανονικής φάσης οξιμισμένη με οξαλικό οξύ/EtOH και ως κινητή φάση συστήματα διαλυτών c-Hex/CH₂Cl₂ και CH₂Cl₂/MeOH βαθμιαία αυξανόμενης πολικότητας. Συνολικά παρελήφθησαν 12 κλάσματα (Πίν. 2), τα οποία αρχικά ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC.

Πίνακας 2. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

Κλάσμα	Σύστημα διαλυτών	Κωδικός κλάσματος
1	cHex (100 %)	Ech1-A
2	cHex/CH ₂ Cl ₂ (50:50)	Ech1-B
3	cHex/CH ₂ Cl ₂ (20:80)	Ech1-C
4	CH ₂ Cl ₂ (100 %)	Ech1-D
5	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (95:5)	Ech1-E
6	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (95:5)	Ech1-F
7	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (95:5)	Ech1-G
8	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (90:10)	Ech1-H
9	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (80:20)	Ech1-I
10	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (80:20)	Ech1-J
11	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (50:50)	Ech1-K
12	MeOH (100 %)	Ech1-L

Τα υπολείμματα Ech-2, Ech-3, Ech-4, Ech-5 και Ech-6 συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε υγρή χρωματογραφία με υποβοήθηση κενού όπως περιγράφηκε ανωτέρω. Συνολικά παρελήφθησαν 12 κλάσματα (Πίν. 3), τα οποία αρχικά ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC.



Εικόνα 20. Πορεία χρωματογραφικών διαχωρισμών για την απομόνωση του εχινοχρώματος Α.

Πίνακας 3. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

Κλάσμα	Σύστημα διαλυτών	Κωδικός κλάσματος
1	cHex (100 %)	Ech2-A
2	cHex/CH ₂ Cl ₂ (50:50)	Ech2-B
3	cHex/CH ₂ Cl ₂ (20:80)	Ech2-C
4	CH ₂ Cl ₂ (100 %)	Ech2-D
5	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (95:5)	Ech2-E
6	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (95:5)	Ech2-F
7	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (95:5)	Ech2-G
8	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (90:10)	Ech2-H
9	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (80:20)	Ech2-I
10	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (80:20)	Ech2-J
11	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (50:50)	Ech2-K
12	MeOH (100 %)	Ech2-L

Τα κλάσματα Ech1-F, Ech1-G, Ech1-H, Ech2-F και Ech2-G, τα οποία εμφάνισαν παρόμοια χρωματογραφικά χαρακτηριστικά, συνενώθηκαν στο υπόλειμμα Ech1F (~600 mg) και υποβλήθηκαν σε υγρή χρωματογραφία με υποβοήθηση κενού, χρησιμοποιώντας ως στατική φάση γέλη πυριτίου αντίστροφης φάσης και ως κινητή φάση συστήματα διαλυτών H₂O/MeOH και EtOAc. Συνολικά παρελήφθησαν 12 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 10 υπολείμματα (Πίν. 4).

Πίνακας 4. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

Κλάσμα	Σύστημα διαλυτών	Κωδικός υπολείμματος	Μάζα (mg)
1	H ₂ O (100%)	Ech1F1	6.5
2	H ₂ O/MeOH (80:20)	Ech1F2	7.2
3	H ₂ O/MeOH (80:20)		
4	H ₂ O/MeOH (60:40)	Ech1F4	15.4
5	H ₂ O/MeOH (40:60)		
6	H ₂ O/MeOH (40:60)	Ech1F6	6.7
7	H ₂ O/MeOH (20:80)	Ech1F7	58.6
8	H ₂ O/MeOH(20:80)	Ech1F8	201.6
9	H ₂ O/MeOH(20:80)	Ech1F9	28.8
10	MeOH (100%)	Ech1F10	5.7
11	MeOH (100%)	Ech1F11	30.5
12	EtOAc (100%)	Ech1F12	184.0

Το υπόλειμμα Ech1F8 (201.6 mg) υποβλήθηκε εκ νέου σε υγρή χρωματογραφία με υποβοήθηση κενού με τις ίδιες συνθήκες που περιγράφηκαν ανωτέρω. Συνολικά παρελήφθησαν 8 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 3 υπολείμματα (Πίν. 5), τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα Ech1F8D (150.5 mg) ήταν το εχινόχρωμα A σε καθαρή μορφή.

Πίνακας 5. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

Κλάσμα	Σύστημα διαλυτών	Κωδικός κλάσματος
1	H ₂ O/MeOH (40:60)	Ech1F8A
2	H ₂ O/MeOH (40:60)	
3	H ₂ O/MeOH (40:60)	
4	H ₂ O/MeOH (20:80)	Ech1F8D
5	H ₂ O/MeOH (20:80)	
6	H ₂ O/MeOH (20:80)	
7	H ₂ O/MeOH (20:80)	Ech1F8G
8	MeOH (100%)	



Εικόνα 21. Τα κλάσματα που παραλήφθηκαν κατά το τελευταίο στάδιο χρωματογραφικού διαχωρισμού.



Εικόνα 22. Το κλάσμα Ech1F8D κατά την διαδικασία εξάτμισης του διαλύτη.

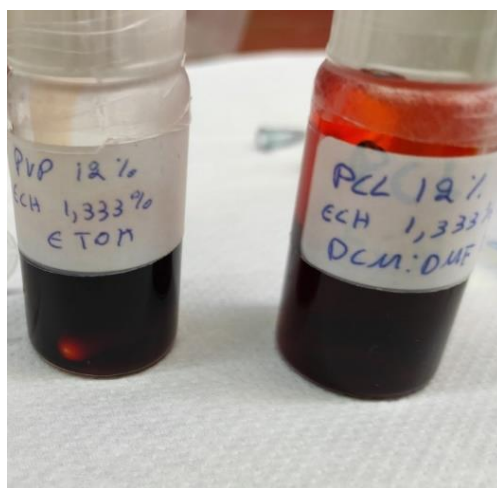
2.5. Παρασκευή των μικρο-/νανοϊνών

Για τη παραγωγή ηλεκτροϊνοποιημένων μικρο-/νανοϊνών ινών με ενσωμάτωση του εχινοχρώματος A χρησιμοποιήθηκαν τα πολυμερή PVP και PCL σε διάφορες αναλογίες.

2.5.1. Προετοιμασία διαλυμάτων ηλεκτροϊνοποίησης

Για την παρασκευή των διαλυμάτων ηλεκτροϊνοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν στη παραγωγή των απλών και των μικτών πολυμερικών συστημάτων μικρο-/νανοϊνών, αρχικά προστέθηκαν τα πολυμερή σε συγκέντρωση 12% w/v σε κατάλληλο σύστημα διαλυτών. Συγκεκριμένα, η PVP διαλύθηκε σε EtOH, ενώ η PCL σε CH₂Cl₂/DMF (8:2 v/v). Ακολούθησε προσθήκη του εχινοχρώματος A σε συγκέντρωση 10% w/w ως προς το βάρος του πολυμερούς και ύστερα από ανάδευση για 24 h σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι πλήρους διαλυτοποίησης, προέκυψαν τα αντίστοιχα διαλύματα κόκκινου χρώματος.

Για την παρασκευή των μικτών μικρο-/νανοϊνών [PCL-PVP(1:3)]-EchA, το διάλυμα ηλεκτροϊνοποίησης παρασκευάστηκε έπειτα από προσθήκη 9% w/v PVP και 3% w/v PCL σε σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂/EtOH (7:3 v/v) με σκοπό την παρασκευή ινών με αναλογία υποστρώματος PVP-PCL(3:1). Ακολούθησε η προσθήκη του εχινοχρώματος A σε συγκέντρωση 10% w/w ως προς το βάρος του πολυμερούς και το διάλυμα αφέθηκε προς ανάδευση για 24 h.



Εικόνα 23. Τα διαλύματα ηλεκτροϊνοποίησης PCL-EchA και PVP-EchA.

2.5.2. Συνθήκες ηλεκτροϊνοποίησης

Για την παραγωγή των πολυμερικών ινών PCL-EchA, PVP-EchA και [PCL-PVP(1:3)]-EchA, σε σύριγγα μιας χρήσεως με βελόνα 23 G μεταφέρθηκαν 9 mL διαλύματος και στη συνέχεια η σύριγγα τοποθετήθηκε στην προγραμματιζόμενη αντλία της πειραματικής

διάταξης. Οι συνθήκες ηλεκτροϊνοποίησης για τις ίνες PCL-EchA, PVP-EchA και [PCL-PVP(1:3)]-EchA παρουσιάζονται στους Πίν. 6, 7 και 8, αντίστοιχα. Οι ίνες συλλέχθηκαν σε φύλλο αλουμινίου το οποίο ήταν τοποθετημένο στον περιστρεφόμενο συλλέκτη, υποβλήθηκαν σε ξήρανση υπό κενό (προς απομάκρυνση υπολειμμάτων διαλυτών) και αποθηκεύτηκαν σε κλειστά δοχεία σε θερμοκρασία δωματίου (25 ± 2 °C).

Πίνακας 6. Συνθήκες ηλεκτροϊνοποίησης των ινών PCL-EchA.

PCL	
Εφαρμοζόμενη τάση	25 kV
Ταχύτητα ροής	3 mL/h
Απόσταση από τον συλλέκτη	15 cm
Ταχύτητα περιστροφής	400 rpm

Πίνακας 7. Συνθήκες ηλεκτροϊνοποίησης των ινών PVP-EchA.

PVP	
Εφαρμοζόμενη τάση	25 kV
Ταχύτητα ροής	3 mL/h
Απόσταση από τον συλλέκτη	15 cm
Ταχύτητα περιστροφής	400 rpm

Πίνακας 8. Συνθήκες ηλεκτροϊνοποίησης των ινών [PCL-PVP(1:3)]-EchA.

PCL-PVP	
Εφαρμοζόμενη τάση	25 kV
Ταχύτητα ροής	3 mL/h
Απόσταση από τον συλλέκτη	15 cm
Ταχύτητα περιστροφής	400 rpm

Για την παραγωγή των μικτών πολυμερικών συστημάτων μικρο-/νανοϊνών με διαφορετικές αναλογίες των πολυμερών PCL και PVP στη σύστασή τους, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αντυπαράλληλης ηλεκτροϊνοποίησης με μεταφορά σε σύριγγες μιας χρήσεως με βελόνα 23 G του κατάλληλου κατά περίπτωση όγκου διαλύματος (4.5, 2.25 ή 6.75 mL) και στη συνέχεια οι σύριγγες τοποθετήθηκαν στις προγραμματιζόμενες αντλίες της πειραματικής διάταξης. Οι συνθήκες ηλεκτροϊνοποίησης αναφέρονται στους Πίν. 9, 10 και 11.

Πίνακας 9. Συνθήκες ηλεκτροϊνοποίησης των ινών PCL-EchA/PVP-EchA (1:1).

PCL	
Εφαρμοζόμενη τάση	25 kV
Ταχύτητα ροής	3 mL/h
Απόσταση από τον συλλέκτη	15 cm
Ταχύτητα περιστροφής	400 rpm
PVP	
Εφαρμοζόμενη τάση	25 kV
Ταχύτητα ροής	3 mL/h
Απόσταση από τον συλλέκτη	15 cm
Ταχύτητα περιστροφής	400 rpm

Πίνακας 10. Συνθήκες ηλεκτροϊνοποίησης των ινών PCL-EchA/PVP-EchA (1:3).

PCL	
Εφαρμοζόμενη τάση	25 kV
Ταχύτητα ροής	1.5 mL/h
Απόσταση από τον συλλέκτη	15 cm
Ταχύτητα περιστροφής	400 rpm
PVP	
Εφαρμοζόμενη τάση	25 kV
Ταχύτητα ροής	4.5 mL/h
Απόσταση από τον συλλέκτη	15 cm
Ταχύτητα περιστροφής	400 rpm

Πίνακας 11. Συνθήκες ηλεκτροϊνοποίησης των ινών PCL-EchA/PVP-EchA (3:1).

PCL	
Εφαρμοζόμενη τάση	25 kV
Ταχύτητα ροής	4.5 mL/h
Απόσταση από τον συλλέκτη	15 cm
Ταχύτητα περιστροφής	400 rpm
PVP	
Εφαρμοζόμενη τάση	25 kV
Ταχύτητα ροής	1.5 mL/h
Απόσταση από τον συλλέκτη	15 cm
Ταχύτητα περιστροφής	400 rpm

2.6. Χαρακτηρισμός των μικρο-/νανοϊνών

Ο χαρακτηρισμός των ηλεκτροϊνοποιημένων ινών έγινε με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM), φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR), θερμοβαρυτική ανάλυση (TGA) και διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC).

2.7. Προετοιμασία για τις μελέτες διάλυσης και διαπερατότητας

2.7.1. Παρασκευή διαλυμάτων

Για την παρασκευή 1 L διαλύματος HCl (pH 1.2), προστέθηκαν 60 mL διαλύματος HCl 1 M σε ογκομετρική φιάλη του 1 L με νερό και στη συνέχεια αραιώθηκαν μέχρι χαραγής με νερό.

Για την παρασκευή 1 L ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών 0.1 M (pH 4.5), σε ποτήρι ζέσεως των 1000 mL διαλύθηκαν 13.514 g $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ και 10.383 g $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ σε περίπου 800 mL νερό με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Το pH ρυθμίστηκε στο 4.5 με στάγδην προσθήκη HCl ή NaOH υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση. Στη συνέχεια το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL και αραιώθηκε μέχρι χαραγής με νερό.

Για την παρασκευή 1 L ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 0.1 M (pH 6.8), σε ποτήρι ζέσεως των 1000 mL διαλύθηκαν 13.124 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ και 7.043 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ σε περίπου 800 mL νερό με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Το pH ρυθμίστηκε στο 6.8 με στάγδην προσθήκη HCl ή NaOH υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση. Στη συνέχεια το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL και αραιώθηκε μέχρι χαραγής με νερό.

Για την παρασκευή 1 L ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 0.1 M (pH 7.4), σε ποτήρι ζέσεως των 1000 mL διαλύθηκαν 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na_2HPO_4 και 0.245 g KH_2PO_4 σε περίπου 800 mL νερό. Το pH ρυθμίστηκε στο 7.4 με στάγδην προσθήκη HCl ή NaOH υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση. Στη συνέχεια το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL και αραιώθηκε μέχρι χαραγής με νερό.

Για την παρασκευή του μητρικού διαλύματος του εχينوχρώματος A (stock solution) συγκέντρωσης 1 mg/mL ζυγίστηκαν 10 mg καθαρής ουσίας, τα οποία μεταφέρθηκαν σε φιαλίδιο και διαλύθηκαν σε 10 mL EtOH.

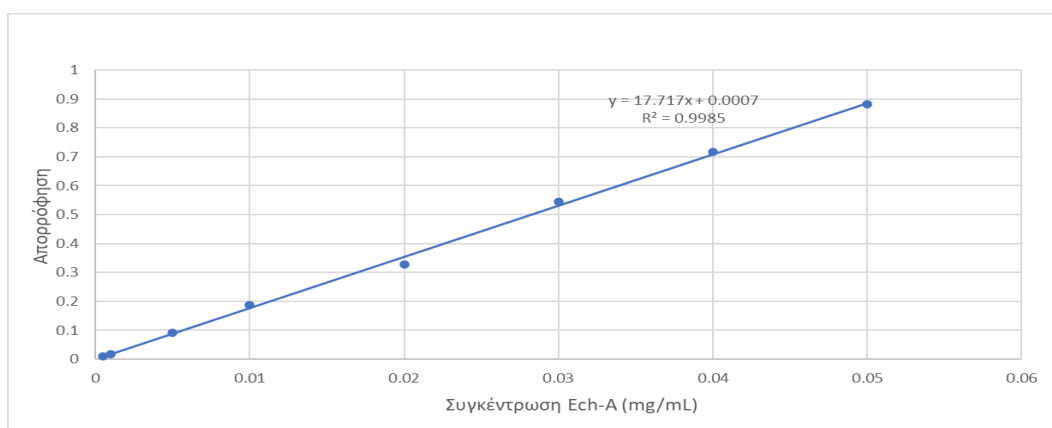
2.7.2. Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων εχينوχρώματος A για τη κατασκευή καμπύλων αναφοράς

Για την κατασκευή των καμπύλων αναφοράς, αρχικά παρασκευάστηκε διάλυμα του εχينوχρώματος A συγκέντρωσης 0.1 mg/mL. Για το διάλυμα αυτό, σε ένα φιαλίδιο μεταφέρθηκαν 500 μ L από το μητρικό διάλυμα και 0.45 mL του ρυθμιστικού διαλύματος (pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8 και pH 7.4). Στη συνέχεια για την παρασκευή των διαλυμάτων με εύρος συγκεντρώσεων από 0.05 έως 0.01 mg/mL που χρησιμοποιήθηκαν για την καμπύλη αναφοράς, σε φιαλίδια προστέθηκε συγκεκριμένος όγκος από το διάλυμα συγκέντρωσης 0.1 mg/mL με την βοήθεια αυτόματης πιπέτας και συμπληρώθηκε με αντίστοιχο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος, για να επιτευχθούν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις. Για τα υπόλοιπα

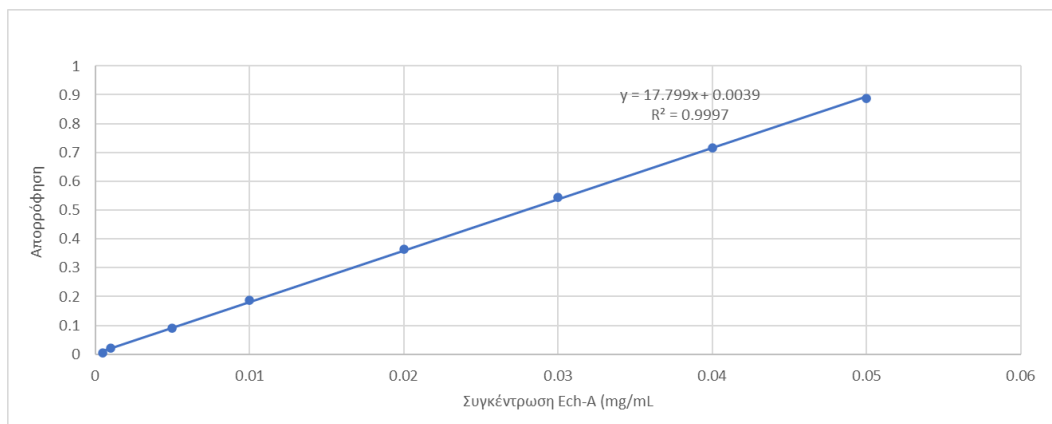
διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, σε φιαλίδια με χρήση αυτόματης πιπέτας προστέθηκε συγκεκριμένος όγκος από τα διαλύματα που παρασκευάστηκαν αρχικά (με συγκεντρώσεις 0.05, 0.01, 0.005 και 0.001 mg/mL) και συμπληρώθηκε με τον κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος, ώστε να παρασκευαστούν τα διαλύματα με εύρος συγκεντρώσεων από 0.005 έως 0.0005 mg/mL.

2.7.3. Χαρακτηριστικά των καμπυλών αναφοράς που κατασκευάστηκαν

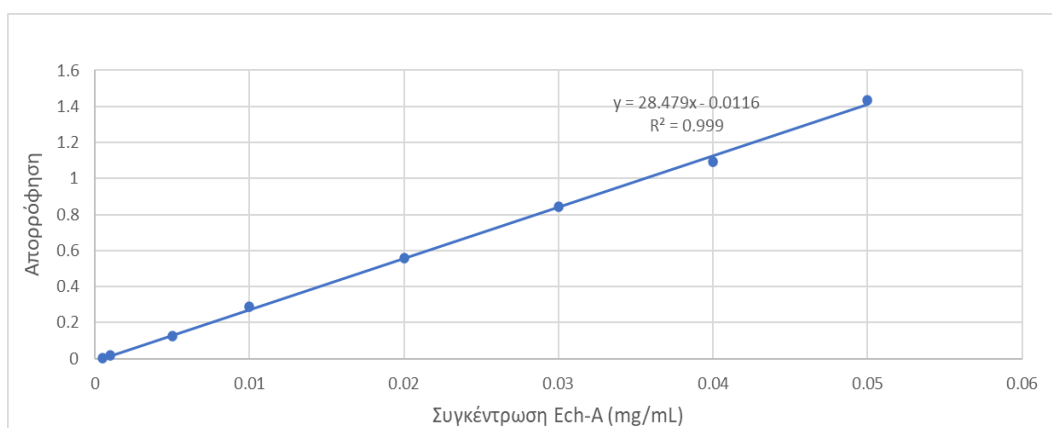
Για τα πειράματα της διάλυσης και της διαπερατότητας κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς 8 σημείων για τα τέσσερα διαφορετικά pH (1.2, 4.5, 6.8 και 7.4), μετρώντας την απορρόφηση των πρότυπων δειγμάτων στα 470 nm που απορροφά το εχινόχρωμα A (ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα) (Εικ. 24-27). Το εύρος των συγκεντρώσεων του εχινόχρωματος A ήταν 0.05-0.0005 mg/mL. Στον Πίν. 12 συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά των ευθειών παλινδρόμησης που προέκυψαν, όπου η ο αριθμός των σημείων στις καμπύλες αναφοράς. Σε όλες τις τιμές pH που μελετήθηκαν παρατηρήθηκε καλή γραμμικότητα ($R^2 \geq 0.99$).



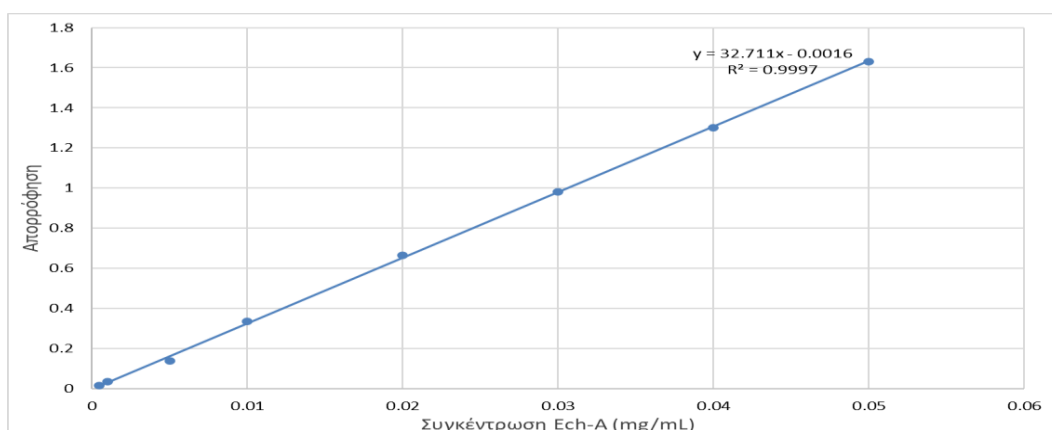
Εικόνα 24. Καμπύλη αναφοράς εχινόχρωματος A σε pH 1.2 και σε μήκος κύματος 470 nm.



Εικόνα 25. Καμπύλη αναφοράς εχινόχρωματος A σε pH 4.5 και σε μήκος κύματος 470 nm.



Εικόνα 26. Καμπύλη αναφοράς εχινόχρωματος Α σε pH 6.8 και σε μήκος κύματος 470 nm.



Εικόνα 27. Καμπύλη αναφοράς εχινόχρωματος Α σε pH 7.4 και σε μήκος κύματος 470 nm.

Πίνακας 12. Χαρακτηριστικά των ευθειών παλινδρόμησης του εχινόχρωματος Α σε pH 1.2, 4.5, 6.8 και 7.4.

pH	Τεταγμένη±SD	Κλίση±SD	R ²	n
1.2	0.0007±0.0074	17.717±0.28	0.998	8
4.5	0.0039±0.0032	17.799±0.12	0.999	8
6.8	- 0.0116±0.0098	28.479±0.37	0.999	8
7.4	- 0.0016±0.0063	32.711±0.24	0.999	8

2.7.4. Προετοιμασία δειγμάτων των μικρο-/νανοϊνών

Για την μελέτη της διάλυσης, τα ηλεκτροποιημένα ινώδη ικρίσματα κόπηκαν εγκάρσια σε τεμάχια (200 mg) ώστε να αντιστοιχούν σε δόση 20 mg του εχινόχρωματος Α και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε sinkers, ώστε να αποφευχθεί η επίπλευση του δείγματος στην επιφάνεια του μέσου διάλυσης. Τα sinkers εμβαπτίστηκαν στο μέσο διάλυσης για να ξεκινήσει η διαδικασία της δειγματοληψίας.



Εικόνα 28. Τεμάχια ηλεκτροϊνοποιημένων ιών των 200 mg.



Εικόνα 29. Τεμάχια των ηλεκτροϊνοποιημένων ιών τοποθετημένα σε sinkers για τη μελέτη διάλυσης.

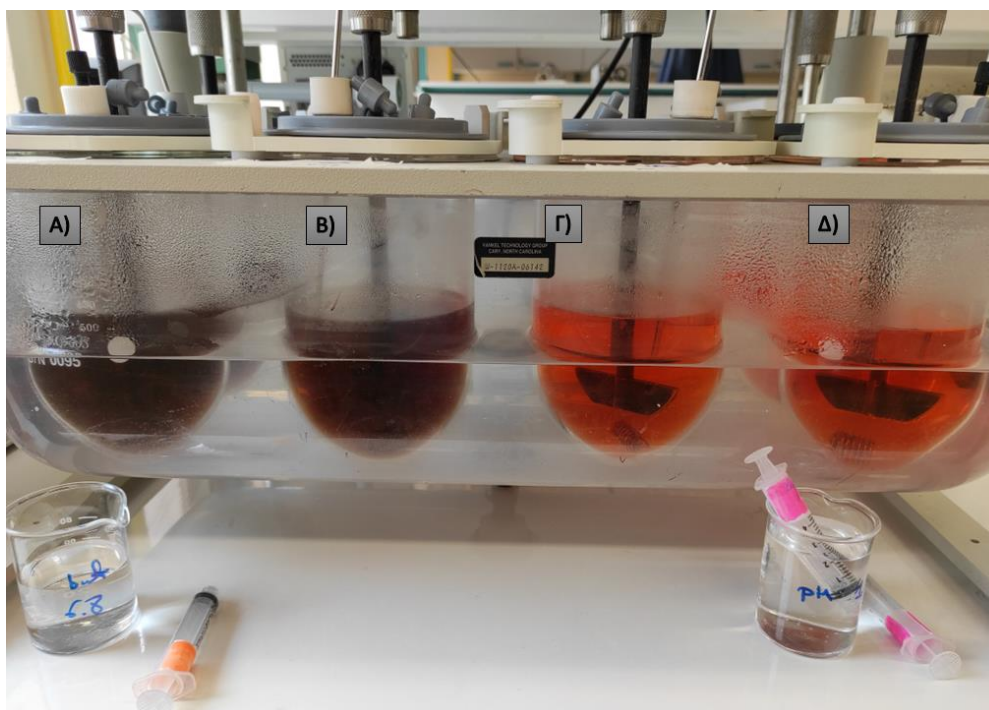
Για τη μελέτη του εχινόχρωματος A σε στερεά μορφή, ζυγίστηκαν 20 mg της ουσίας και τοποθετήθηκαν σε κάψουλες κυτταρίνης. Στη συνέχεια, οι κάψουλες τοποθετήθηκαν σε sinkers και εμβαπτίστηκαν στο μέσο διάλυσης για να ξεκινήσει η μελέτη της διάλυσης.

Για τη μελέτη της διαπερατότητας, τα ηλεκτροϊνοποιημένα ινώδη ικρίσματα κόπηκαν σε στρογγυλά τεμάχια των 2 mg ώστε να αντιστοιχούν σε δόση 0.2 mg του εχινόχρωματος A, ενώ για τη μελέτη του εχινόχρωματος A σε στερεά μορφή, ζυγίστηκαν 0.2 mg στερεής κόνεος.

2.8. Πειραματική διαδικασία για τη μελέτη διάλυσης

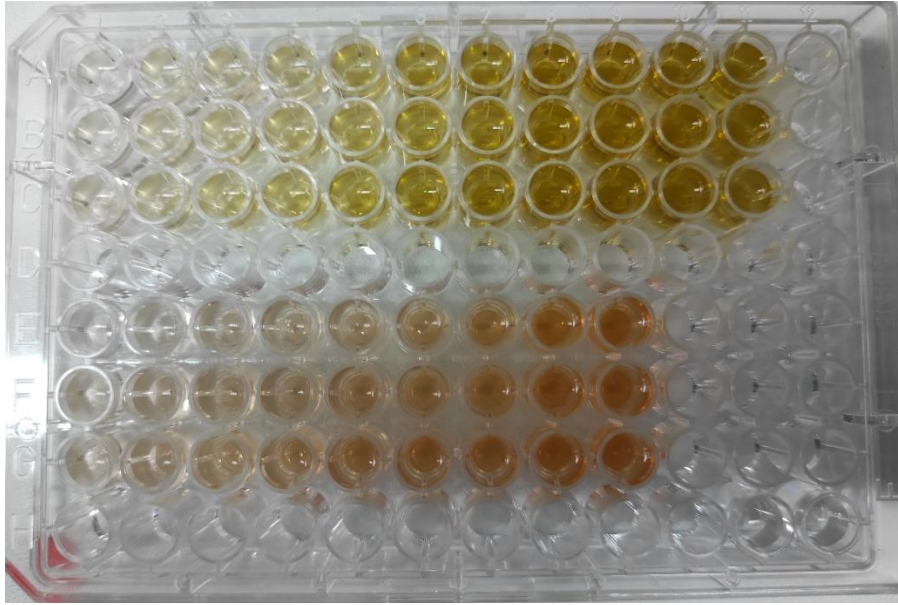
Η συσκευή διάλυσης ρυθμίστηκε στα 50 rpm και η θερμοκρασία του υδατόλουτρου παρέμεινε σταθερή σε όλη τη διάρκεια του πειράματος στους 37.0 ± 0.1 °C. Στα έξι κοίλα δοχεία της συσκευής, προστέθηκαν 500 mL ρυθμιστικού διαλύματος και τα πτερύγια τέθηκαν σε περιστροφή. Τα δείγματα εμβαπτίστηκαν, ενώ τα πτερύγια περιστρέφονταν. Οι χρόνοι

δειγματοληψίας ήταν 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 120 και 180 min από την εμβάπτιση των sinkers, για το μέσο διάλυσης με pH 1.2, ενώ στα υπόλοιπα μέσα διάλυσης (pH 4.5 και 6.8) ληφθήκαν επιπλέον δείγματα στα 240, 300 και 360 min. Σε κάθε δειγματοληψία απομακρύνονταν 3 mL διαλύματος από κάθε δοχείο με τη βοήθεια σύριγγας, προσαρμοσμένης στον δειγματολήπτη, και τα δείγματα συλλέγονταν το καθένα ξεχωριστά σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Κάθε φορά, πριν την συλλογή στον δοκιμαστικό σωλήνα το δείγμα διηθούν μέσω φίλτρου αναγεννημένης κυτταρίνης προκειμένου να απομακρυνθεί το ίζημα αδιάλυτης ουσίας που μπορεί να περιείχε. Μετά την εκάστοτε απομάκρυνση δείγματος γινόταν αναπλήρωση του όγκου που είχε απομακρυνθεί με προσθήκη 3 mL ρυθμιστικού διαλύματος. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν για κάθε δείγμα σε κάθε pH.



Εικόνα 30. Πειραματική πορεία διάλυσης των μικτών ινών PCL-EchA/PVP-EchA (1:3) σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 6.8 (A και B) και pH 1.2 (Γ και Δ).

Όγκος 300 μ L από κάθε δείγμα μεταφέρθηκε με την βοήθεια αυτόματης πιπέτας σε 96-τρυπη πλάκα και μετρήθηκε η απορρόφηση σε μήκος κύματος 470 nm.



Εικόνα 31. Δείγματα από τη διάλυση των μικτών ινών PCL-EchA/PVP-EchA (1:3) που έχουν τοποθετηθεί σε 96-τρυπη πλάκα προς φασματοφωτομέτρηση. Οι σειρές A-C περιέχουν δείγματα σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 6.8, ενώ οι σειρές E-G περιέχουν δείγματα σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 1.2.

2.9. Πειραματική διαδικασία για τη μελέτη διαπερατότητας

Για τη μελέτη διαπερατότητας χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες που απομονώθηκαν από έντερο (τμήμα δωδεκαδακτύλου) κουνελιών, οι οποίες τοποθετήθηκαν μεταξύ των διαμερισμάτων του δότη και του δέκτη. Πριν την τοποθέτηση της μεμβράνης, στο διαμέρισμα του δέκτη προστέθηκαν 5 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 7.4 και μαγνήτης ανάδευσης. Τα δύο μέρη των κυττάρων Franz διατηρήθηκαν ενωμένα με τη βοήθεια μεταλλικού σφιγκτήρα. Στη συνέχεια το σύστημα αφέθηκε στη συσκευή των κυττάρων Franz, για να ισορροπήσει στους 37 °C για 15 min. Στο διαμέρισμα του δότη τοποθετήθηκαν τα δείγματα μαζί με 1 mL του αντίστοιχου μέσου διάλυσης (pH 1.2 ή pH 6.8). Τα διαμερίσματα του δότη και του δέκτη καλύφθηκαν με parafilm προς αποφυγήν της εξάτμισης των διαλυμάτων. Οι δειγματοληψίες έγιναν στις 1, 2, 3, 4 και 24 h. Σε κάθε δειγματοληψία απομακρύνθηκε 300 μL δείγματος με τη βοήθεια σύριγγας Hamilton, ο όγκος αυτός αναπληρώθηκε με ίσο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 7.4 στο διαμέρισμα του δέκτη. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε 96-τρυπη πλάκα προς φασματοφωτομέτρηση. Μετά την ολοκλήρωση της δειγματοληψίας, η ποσότητα που είχε παραμείνει στο διαμέρισμα του δότη ανακτήθηκε με κατάλληλο όγκο MeOH/H₂O (50:50) και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στις 3.000 rpm στους 4 °C. Το υπερκείμενο που προέκυψε αραιώθηκε με κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος pH 7.4 (σε αναλογία 1:9) και αναλύθηκε. Η

μεμβράνη θρυμματίστηκε και ομογενοποιήθηκε με χειρουργική λεπίδα, αφού πρώτα είχαν προηγηθεί εκπλύσεις με 300 μL H_2O τρεις φορές, για 30 sec κάθε φορά και μια φορά με 300 μL MeCN. Στη συνέχεια αραιώθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.4 σε ογκομετρική φιάλη των 5 mL, φυγοκεντρήθηκε για 10 min στις 10.000 rpm στους 4 °C και το υπερκείμενο που προέκυψε αναλύθηκε με φασματοφωτομέτρηση UV-Vis. Οι ποσότητες του εχινόχρωματος A στα διαμερίσματα του δότη και του δέκτη, καθώς και αυτές που ανακτήθηκαν από τις μεμβράνες χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του ισοζυγίου μάζας.



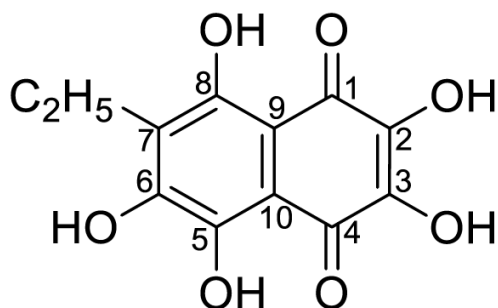
Εικόνα 32. Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη διαπερατότητας.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Απομόνωση και ταυτοποίηση του μεταβολίτη εχινόχρωμα Α

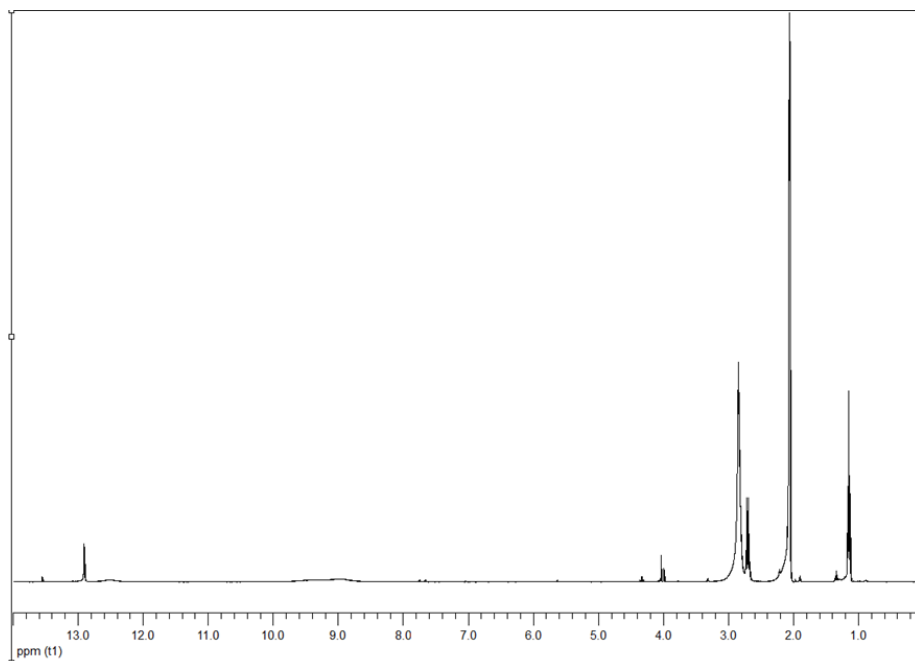
Αχινοί του γένους *Diadema* συλλέχθηκαν από τον κόλπο του Αγίου Γεωργίου στο Καστελλόριζο, σε βάθος 1-5 m, τον Σεπτέμβριο του 2021. Ο οργανισμός εκχυλίστηκε εξαντλητικά με μείγμα EtOH (70%)-H₂SO₄(8-10%) και το οργανικό εκχύλισμα που προέκυψε υποβλήθηκε σε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς με αποτέλεσμα την απομόνωση του εχινόχρωματος Α σε επαρκείς ποσότητες.

Το εχινόχρωμα Α με μοριακό τύπο C₁₂H₁₀O₇ απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως σκούρο κόκκινο στερεό υπόλειμμα και η ταυτοποίηση του βασίστηκε στην ανάλυση των φασματοσκοπικών του δεδομένων NMR και στη σύγκριση τους με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας.



Στο φάσμα ¹H NMR του απομονωμένου μεταβολίτη (Εικ. 33) και της πρότυπης ουσίας παρατηρήθηκαν:

- Μία τριπλή κορυφή σε δ 1.13 (*J* = 7.5 Hz), η οποία ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί σε πρωτόνια αλειφατικού μεθυλίου σε δευτεροταγές άτομο άνθρακα.
- Μία τετραπλή κορυφή σε δ 2.69 (*J* = 7.5 Hz), η οποία ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί σε πρωτόνια μεθυλενίου.



Εικόνα 33. Φάσμα ^1H NMR του εχινόχρωματος Α που απομονώθηκε σε $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

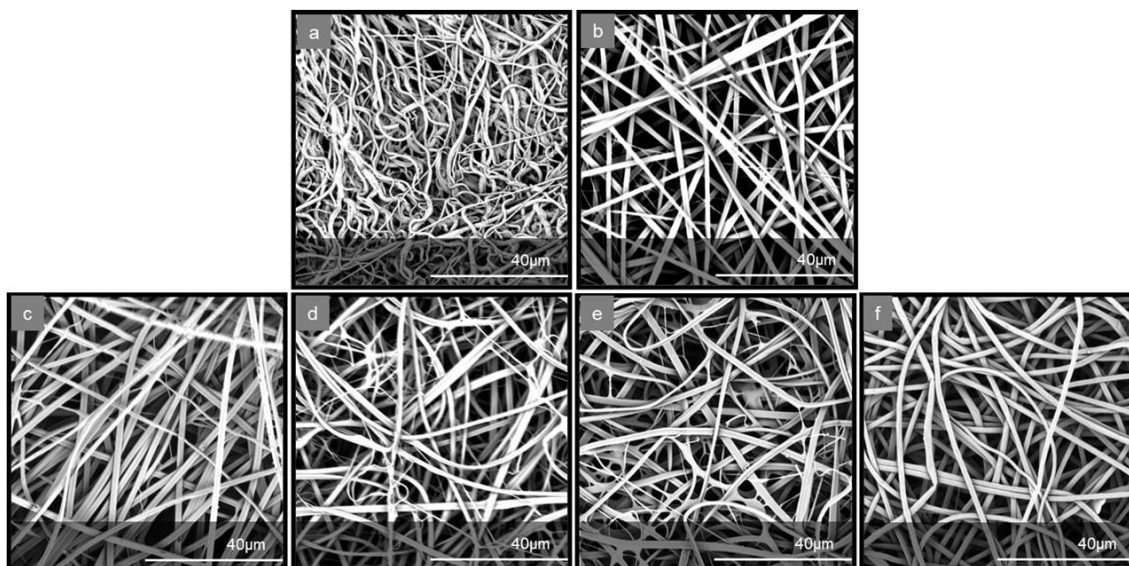
3.2. Παραγωγή και χαρακτηρισμός ινών

Για την παρασκευή των συστημάτων ελεγχόμενης αποδέσμευσης χρησιμοποιήθηκαν πολυμερή υδρόφοβου και υδρόφιλου χαρακτήρα. Επιλέχθηκαν η υδρόφοβης φύσης PCL και η υδρόφιλης φύσης PVP ως χαμηλού κόστους βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή με σκοπό την παραγωγή συστημάτων αποδέσμευσης με διαφορετικούς ρυθμούς αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας.

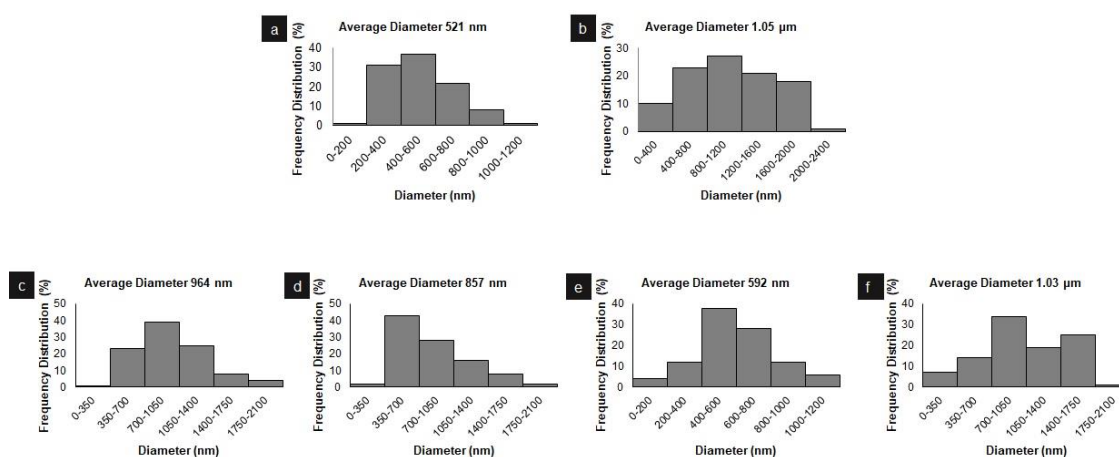
Ο αρχικός σχεδιασμός περιλάμβανε την παρασκευή ικριωμάτων μικρο-/νανοϊνών με εχινόχρωμα Α από 100% PCL και 100% PVP. Στα πειράματα αποδέσμευσης παρατηρήθηκε ότι οι ίνες PCL απελευθέρωναν με αργό ρυθμό την δραστική εχινόχρωμα Α λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα της PCL, ενώ οι ίνες από PVP παρουσίασαν άμεση αποδέσμευση της δραστικής λόγω του υδρόφιλου χαρακτήρα και της ταχείας διάλυσης της PVP. Για το λόγο αυτό στη συνέχεια παρασκευάστηκαν μικτά ικρίωματα μικρο-/νανοϊνών αποτελούμενα από PCL-PVP (1:3), PCL-PVP (1:1) και PCL-PVP (3:1).

Λόγω του γεγονότος ότι κατά τη μελέτη διάλυσης των μικτών συστημάτων PCL-PVP παρατηρήθηκε μεγάλη διασπορά των τιμών απελευθέρωσης του εχινόχρωματος Α, πραγματοποιήθηκε και η παρασκευή των σύνθετων ικριωμάτων μικρο-/νανοϊνών με [PCL-PVP(1:3)], ινών που προήλθαν από την ηλεκτροϊνοποίηση των πολυμερικών υλικών από το ίδιο διάλυμα και όχι από την αντιπαράλληλη ηλεκτροϊνοποίηση δύο διαφορετικών πολυμερικών διαλυμάτων όπως έγινε κατά την παραγωγή των μικτών συστημάτων.

Η αρχιτεκτονική των παρασκευασθέντων μικρο-/νανοϊνωδών ικρωμάτων εξετάστηκε μέσω των εικόνων ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) (Εικ. 34). Η ανάλυση των εικόνων έδειξε την επιτυχή παραγωγή ομοιόμορφων ινών χωρίς την δημιουργία χαντρών (beads). Η κατανομή των διαμέτρων και η μέση διάμετρος των ινών για κάθε σύστημα φαίνονται στην Εικ. 35.



Εικόνα 34. Εικόνες SEM των ινών a) PCL-EchA, b) PVP-EchA, c) PCL-EchA/PVP-EchA (1:3), d) PCL-EchA/PVP-EchA (1:1), e) PCL-EchA/PVP-EchA (3:1) και f) [PCL-PVP(1:3)]-EchA.



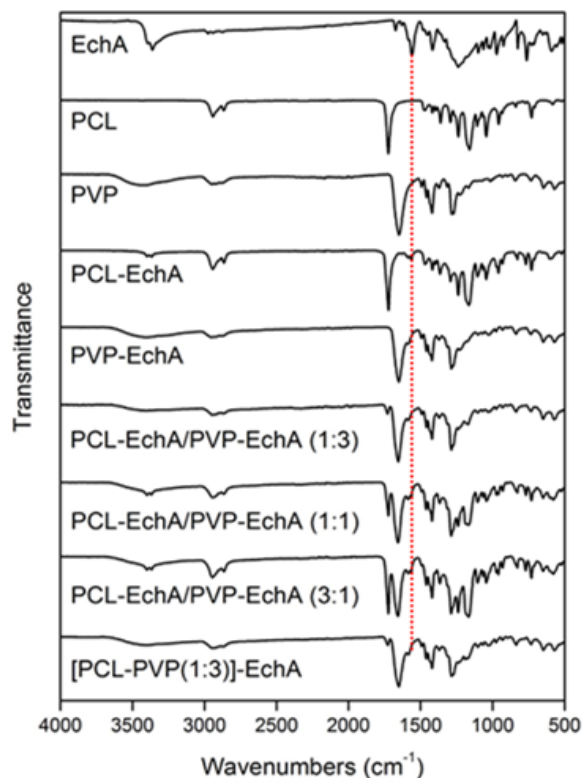
Εικόνα 35. Διαγράμματα της διαμέτρου των ινών a) PCL-EchA, b) PVP-EchA, c) PCL-EchA/PVP-EchA (1:3), d) PCL-EchA/PVP-EchA (1:1), e) PCL-EchA/PVP-EchA (3:1) και f) [PCL-PVP(1:3)]-EchA.

Πιο συγκεκριμένα οι ίνες του ικρωμάτος PCL-EchA ήταν κυλινδρικού σχήματος με διαμέτρους που κυμαίνονταν από 185 nm έως 1.15 μm με μέση διάμετρο 521 ± 96 nm. Οι ίνες

του PVP-EchA ικριώματος ήταν κυλινδρικού σχήματος και μεγαλύτερου μεγέθους σε σχέση με τις ίνες PCL-EchA, με διαμέτρους που κυμαίνονταν από 24 nm έως 2.28 μm με μέση διάμετρο 1.05 ± 0.16 μm. Τα ινώδη ικριώματα PCL-EchA/PVP-EchA (1:3), PCL-EchA/PVP-EchA (1:1) και PCL-EchA/PVP-EchA (3:1) που παρασκευάστηκαν με την τεχνική της αντιπαράλληλης ηλεκτροϊνοποίησης επέδειξαν ένα παρόμοιο ομοιογενές ινώδες δίκτυο με διαφορά στο μέγεθος των ινών που αποδίδεται στη διαφορετική ταχύτητα ροής που χρησιμοποιήθηκε για τα διαλύματα ηλεκτροϊνοποίησης PCL-EchA και PVP-EchA κατά την παραγωγή των συστημάτων αυτών και στην διαφορετική αναλογία των αντίστοιχων μικρο-/νανοϊνών. Οι ίνες του ικριώματος PCL-EchA/PVP-EchA (1:3) κυμαίνονταν από 77 nm έως 1.92 μm με μέση διάμετρο 964 ± 183 nm, οι ίνες του ικριώματος PCL-EchA/PVP-EchA (1:1) κυμαίνονταν από 105 nm έως 1.92 μm με μέση διάμετρο 857 ± 150 nm, ενώ στην περίπτωση του συστήματος PCL-EchA/PVP-EchA (3:1) το μέγεθος των ινών μετρήθηκε από 34 nm έως 1.16 μm με μέση διάμετρο 592 ± 115 nm. Ομοιόμορφο ινώδες πλέγμα παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των ινών του ικριώματος [PCL-PVP(1:3)]-EchA, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ηλεκτροϊνοποίηση των πολυμερικών υλικών από το ίδιο διάλυμα δεν επηρέασε την ηλεκτροϊνοποιητική ικανότητα. Το μέγεθος των ινών κυμαινόταν από 78 nm έως 1.87 μm με μέση διάμετρο 1.03 ± 0.16 μm.

Η χημική ακεραιότητα του εχινόχρωματος Α μετά την ηλεκτροϊνοποίηση υπό τις εφαρμοζόμενες συνθήκες επαληθεύτηκε μέσω φασματοσκοπικής ανάλυσης $^1\text{H NMR}$ και UV-Vis της ανακτηθείσας ένωσης μετά από εκχύλιση των ινωδών ικριωμάτων.

Ανάλυση των παραγόμενων ινών με φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR και σύγκριση των φασμάτων τους με τα φάσματα των πρότυπων υλικών που χρησιμοποιήθηκαν κατέδειξε τις χαρακτηριστικές απορροφήσεις που οφείλονταν στα πολυμερικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και την επιτυχή ενσωμάτωση του εχινόχρωματος Α (Εικ. 36). Στο φάσμα IR του εχινόχρωματος Α παρατηρήθηκε μια ευρεία ταινία απορρόφησης στα 3363 cm^{-1} που αποδίδεται σε δονήσεις τάσης του -OH, απορρόφηση στα 1675 cm^{-1} που οφείλεται σε δονήσεις τάσης δεσμών -C=C , μία χαρακτηριστική απορρόφηση καρβονυλομάδας στα 1560 cm^{-1} , και δονήσεις κάμψης των δεσμών -OH στα 1420 cm^{-1} . Στο φάσμα της PCL παρατηρήθηκαν απορροφήσεις στα 2944 cm^{-1} και 2867 cm^{-1} που αποδίδονται σε δονήσεις τάσης -CH_2 , ενώ οι δονήσεις τάσης του καρβονυλίου -C=O καταγράφηκαν στα 1725 cm^{-1} . Το φάσμα της PVP παρουσίασε μια ευρεία χαρακτηριστική απορρόφηση στα 3434 cm^{-1} που οφείλεται στις δονήσεις τάσης του -OH, καθώς και απορροφήσεις στα 2948 cm^{-1} και 1651 cm^{-1} που οφείλονται σε δονήσεις τάσης των -CH_2 και -C=O , αντίστοιχα, ενώ οι δονήσεις κάμψης του N-C=O καταγράφηκαν στα 570 cm^{-1} .

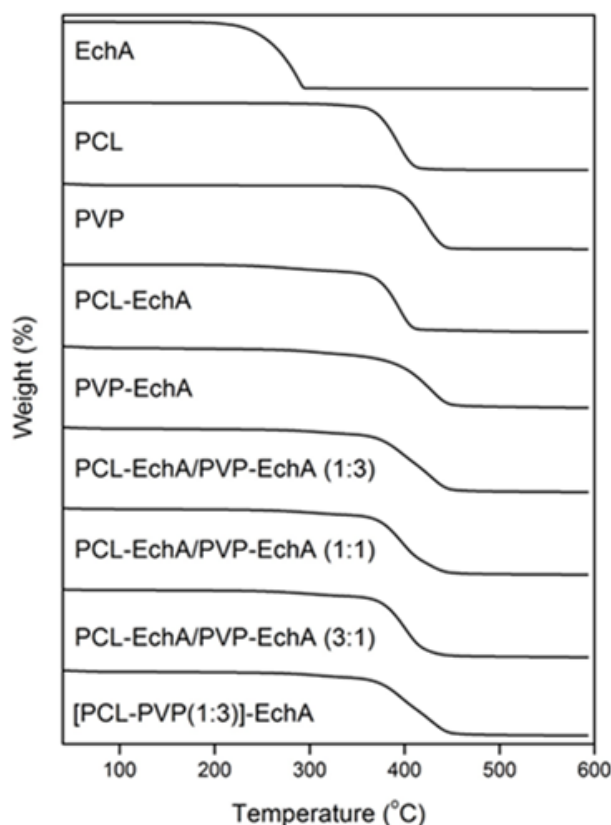


Εικόνα 36. Φάσματα FT-IR των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν και των ινών που παρασκευάστηκαν.

Τα φάσματα FT-IR των μικρο-/νανοϊνών που παρασκευάστηκαν εμφάνισαν τα χαρακτηριστικά σήματα των συστατικών τους. Κυρίως εμφάνισαν τις χαρακτηριστικές απορροφήσεις των πολυμερικών συστατικών τους, καθώς η ποσότητα PCL και PVP που χρησιμοποιήθηκαν κυριαρχεί στις παραγόμενες ίνες. Η ενσωμάτωση του εχινοχρώματος A στις πολυμερικές ίνες όλων των παρασκευασθέντων ικρωμάτων επιβεβαιώνεται από την απορρόφηση στα 1560 cm^{-1} που οφείλεται σε δονήσεις τάσης του -C=O , καθώς οι υπόλοιπες απορροφήσεις του εχινοχρώματος A επικαλύπτονται από τις απορροφήσεις των πολυμερών PCL και PVP. Οι ίνες PCL-EchA/PVP-EchA (1:3), PCL-EchA/PVP-EchA (1:1), PCL-EchA/PVP-EchA (3:1), καθώς και οι ίνες [PCL-PVP(1:3)]-EchA παρουσίασαν παρόμοιες απορροφήσεις στα φάσματα FT-IR, με τη διαφορά στην ένταση της απορρόφησης του -C=O (1725 cm^{-1}) της PCL, να αποδίδεται στη διαφορετική αναλογία των πολυμερών συστατικών στα ινώδη υποστρώματα.

Οι παρασκευασθείσες μικρο-/νανοϊνες, καθώς και οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιήθηκαν, χαρακτηρίστηκαν επιπλέον με αναλύσεις TGA και DSC. Όπως φαίνεται από τα θερμοβαρυτικά διαγράμματα (Εικ. 37), το εχινόχρωμα A ξεκινά να αποσυντίθεται στους $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ και η ολική του αποσύνθεση ολοκληρώνεται περίπου στους $294\text{ }^{\circ}\text{C}$. Η αποσύνθεση της PCL παρατηρήθηκε μεταξύ $355\text{ }^{\circ}\text{C}$ και $411\text{ }^{\circ}\text{C}$, ενώ της PVP μεταξύ $373\text{ }^{\circ}\text{C}$ και $445\text{ }^{\circ}\text{C}$. Τα θερμοβαρυτικά διαγράμματα των παραγόμενων ικρωμάτων εμφάνισαν

συνεργιστικά φαινόμενα αποδόμησης των συνδυασμένων συστατικών.

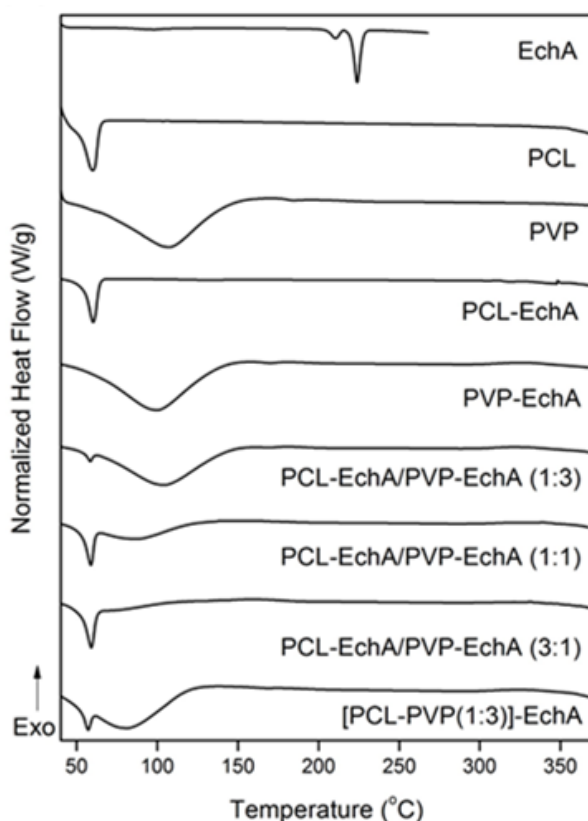


Εικόνα 37. Θερμοβαρυτικά διαγράμματα των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν και των ινών που παρασκευάστηκαν.

Πιο συγκεκριμένα, οι ίνες PCL-EchA επέδειξαν ένα αρχικό στάδιο αποσύνθεσης στους 248 °C λόγω της αποικοδόμησης που υφίσταται το εχινόχρωμα A, με την κύρια απώλεια μάζας να συμβαίνει από τους 357 °C μέχρι την πλήρη αποικοδόμηση τους στους 411 °C. Στις ίνες PVP-EchA η αποσύνθεση του εχινόχρωματος A καταγράφηκε στους 282 °C και η κύρια αποικοδόμηση των ινών καταγράφηκε από τους 371 °C έως 449 °C. Οι διαφορετικές αναλογίες των πολυμερών PCL και PVP που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία των ινών οδήγησαν στην εμφάνιση διαφορετικών διαγραμμάτων αποσύνθεσης. Στην περίπτωση των μικτών ινών PCL-EchA/PVP-EchA (1:3) παρατηρήθηκε μια αρχική απώλεια μάζας στους 289 °C λόγω της παρουσίας εχινόχρωματος A και η κύρια απώλεια μάζας καταγράφηκε μεταξύ των 359 °C and 448 °C. Οι ίνες PCL-EchA/PVP-EchA (1:1) εμφάνισαν μια αρχική απώλεια μάζας στους 275 °C που οφείλεται στο εχινόχρωμα A, ενώ η κύρια απώλεια μάζας των ινών σημειώθηκε μεταξύ των 360 °C και 444 °C. Στις ίνες PCL-EchA/PVP-EchA (3:1) η αρχική απώλεια μάζας λόγω του εχινόχρωματος A παρατηρήθηκε στους 261 °C και η κύρια αποσύνθεση των ινών καταγράφηκε από τους 360 °C έως τους 441 °C. Η αποσύνθεση των

ινών [PCL-PVP(1:3)]-EchA ξεκίνησε στους 285 °C λόγω του εχινόχρωματος A, ενώ η κύρια αποικοδόμηση των ινών σημειώθηκε από τους 361 °C έως τους 448 °C.

Στα θερμογραφήματα DSC (Εικ. 38) το εχινόχρωμα A παρουσίασε μια ασθενή ενδόθερμη κορυφή στους 97.6 °C, μία ενδόθερμη κορυφή στους 210.5 °C λόγω της τήξης της δραστικής ουσίας και μία οξεία ενδόθερμη κορυφή στους 223.9 °C που συνδέεται με την αποικοδόμηση της. Η PCL εμφάνισε μία οξεία ενδόθερμη κορυφή στους 59.9 °C, η οποία οφείλεται στη τήξη του πολυμερούς, ενώ η PVP εμφάνισε μια ευρεία ενδόθερμη κορυφή στους 105.9 °C, λόγω της αφυδάτωσης που υφίσταται. Στα θερμογραφήματα των παραγόμενων ινών ήταν εμφανείς μόνο η οξεία κορυφή τήξης της PCL και η ευρεία κορυφή αφυδάτωσης της PVP, οι οποίες παρατηρήθηκαν σε ελαφρώς μετατοπισμένες θερμοκρασίες και διαφορετικά μοτίβα, λόγω συνεργιστικών θερμικών φαινομένων, σχετικών με τη διαφορετική σύσταση, τη μέθοδο παρασκευής και τα δομικά χαρακτηριστικά των ινών. Τα χαρακτηριστικά θερμικά φαινόμενα του εχινόχρωματος A δεν ήταν εμφανή στα θερμογραφήματα των ινωδών κριωμάτων, γεγονός που υποδηλώνει την απουσία κρυσταλλικής μορφής του εχινόχρωματος A στα συστήματα μικρο-/νανοϊνών, πιθανότατα λόγω της μετατροπής της στην άμορφη μορφή.



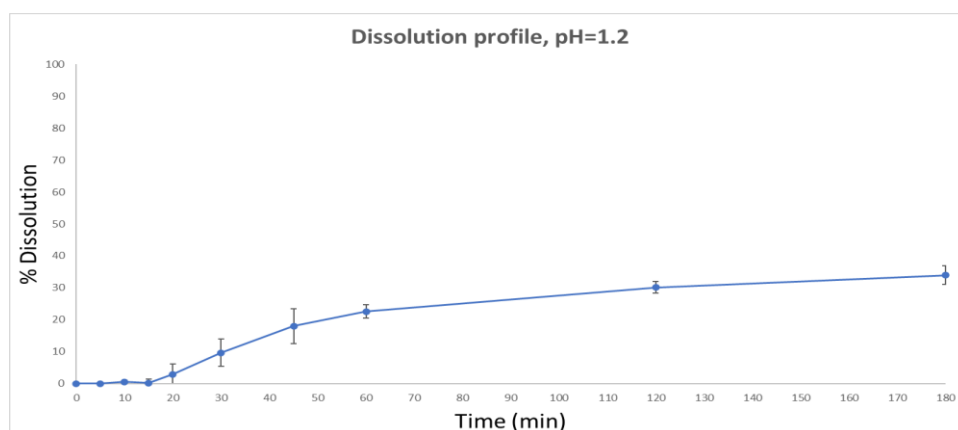
Εικόνα 38. Θερμογραφήματα DSC των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν και των ινών που παρασκευάστηκαν.

3.3. *In vitro* μελέτη διάλυσης του εχινόχρωματος Α

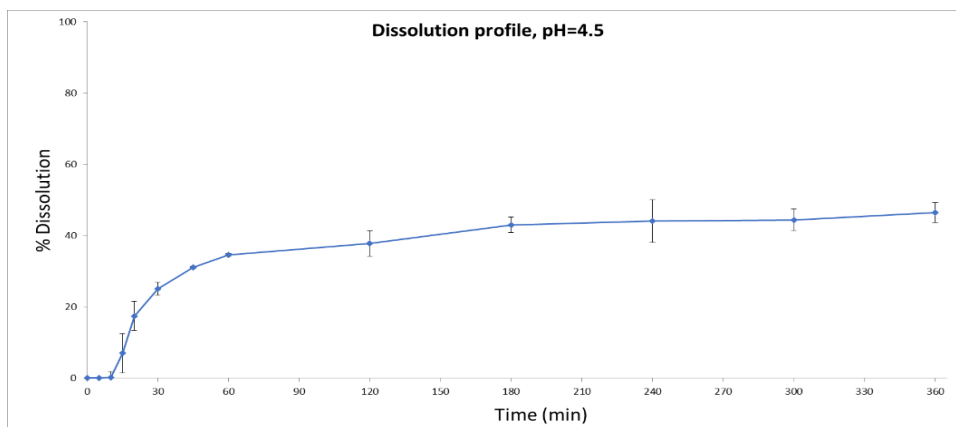
Για τη μελέτη της διάλυσης, η δόση εχινόχρωματος Α που μελετήθηκε ήταν 20 mg και σε κάθε περίπτωση τα ινώδη κριώματα κόπηκαν και ζυγίστηκαν (200 mg) ώστε να αντιστοιχούν στη συγκεκριμένη δόση. Οι δοκιμασίες διάλυσης κάθε δείγματος έγιναν σε pH 1.2, 4.5 και 6.8, σε τρεις επαναλήψεις για το κάθε υλικό. Τα αποτελέσματα αναφέρονται στη μέση τιμή±SD του ποσοστού εχινόχρωματος Α που διαλύεται σε σχέση με την αρχική δόση που χρησιμοποιήθηκε και παρουσιάζονται ακολούθως.

Διάλυση του εχινόχρωματος Α σε στερεά μορφή

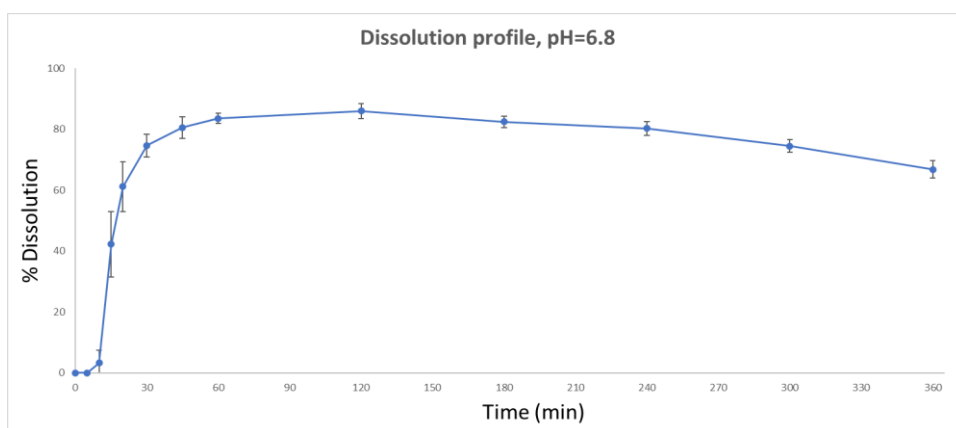
Το ποσοστό διάλυσης του εχινόχρωματος σε στερεά μορφή (σκόνη) φτάνει το 33.9±2.8% σε pH 1.2 στις τρεις ώρες, το 46.7±2.7% σε pH 4.5 στις έξι ώρες και το 85.9±2.4% σε pH 6.8 στις δύο ώρες. Σε pH 6.8 παρατηρείται μείωση στο ποσοστό διαλυμένης ουσίας μετά τις τρεις ώρες. Η μείωση αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι σε πιο αλκαλικό pH το εχινόχρωμα Α υφίσταται οξείδωση.



Εικόνα 39. Διάγραμμα συσχέτισης του χρόνου με το ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης της πρότυπης ουσίας σε pH 1.2.



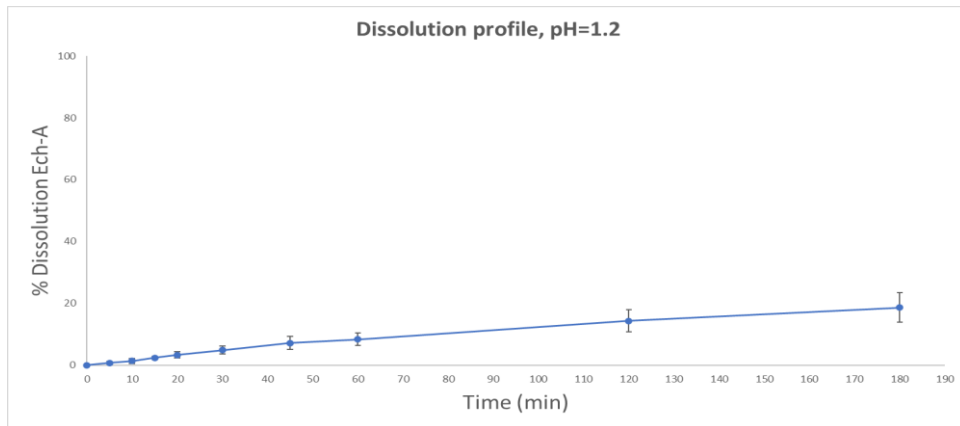
Εικόνα 40. Διάγραμμα συσχέτισης του χρόνου με το ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης της πρότυπης ουσίας σε pH 4.5.



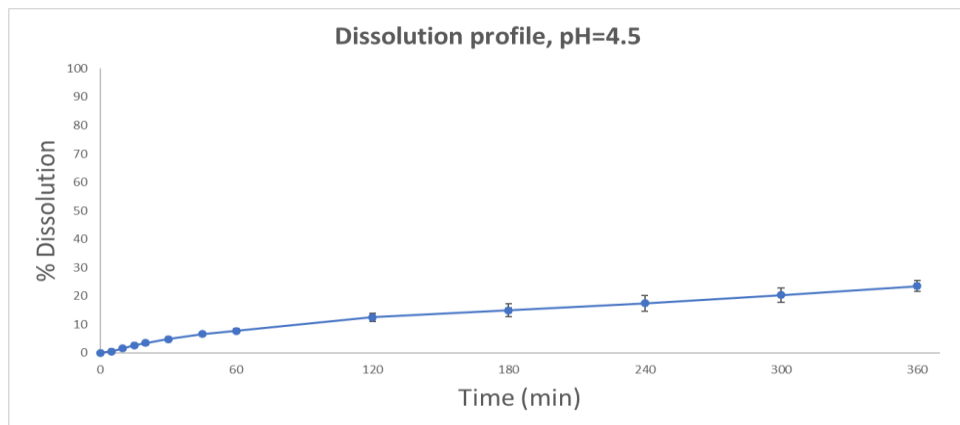
Εικόνα 41. Διάγραμμα συσχέτισης του χρόνου με το ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης της πρότυπης ουσίας σε pH 6.8.

Διάλυση των ινών PCL-EchA

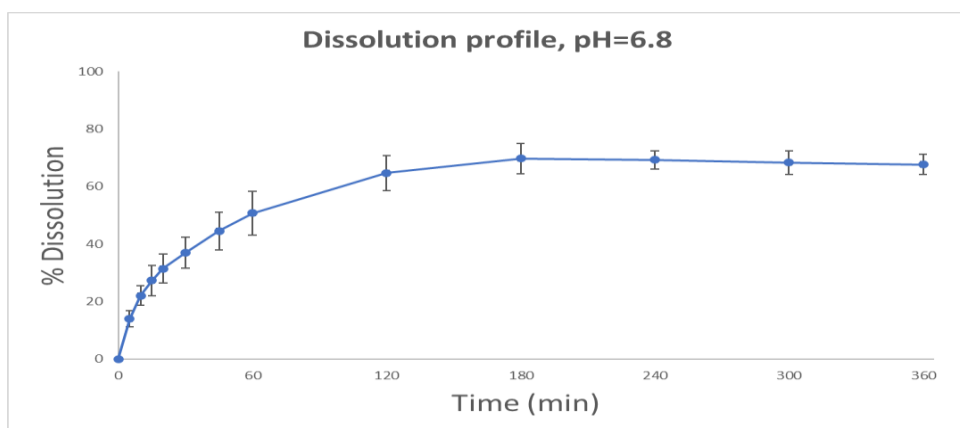
Όπως φαίνεται στα ακόλουθα διαγράμματα, το ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης του εχινόχρωματος A από τις ίνες PCL-EchA είναι περιορισμένο και ίσο με μόλις $18.6 \pm 4.7\%$ σε pH 1.2 και $23.4 \pm 1.9\%$ σε pH 4.5 στις τρεις και τέσσερις ώρες, αντίστοιχα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η PCL είναι ένα υδρόφοβο πολυμερές που δεν διαλύεται στα συγκεκριμένα ρυθμιστικά διαλύματα με αποτέλεσμα να δυσκολεύει την αποδέσμευση του εχινόχρωματος A. Αντίθετα, σε pH 6.8 παρουσιάζεται καλύτερο προφίλ αποδέσμευσης του εχινόχρωματος A με $69.7 \pm 5.2\%$, στις τέσσερις ώρες του πειράματος. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το εχινόχρωμα A είναι περισσότερο διαλυτό σε πιο αλκαλικά pH.



Εικόνα 42. Διάγραμμα συσχέτισης του χρόνου με το ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης του εχινόχρωματος A από τις ίνες PCL-EchA σε pH 1.2.



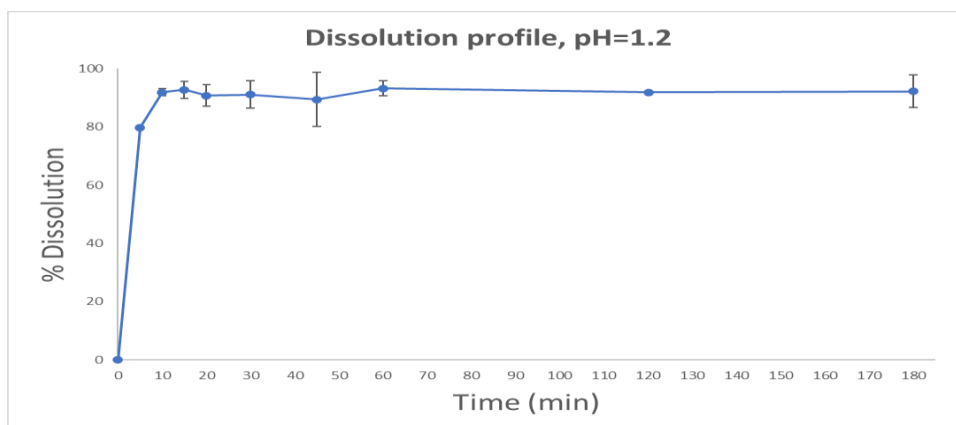
Εικόνα 43. Διάγραμμα συσχέτισης του χρόνου με το ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης του εχινόχρωματος A από τις ίνες PCL-EchA σε pH 4.5.



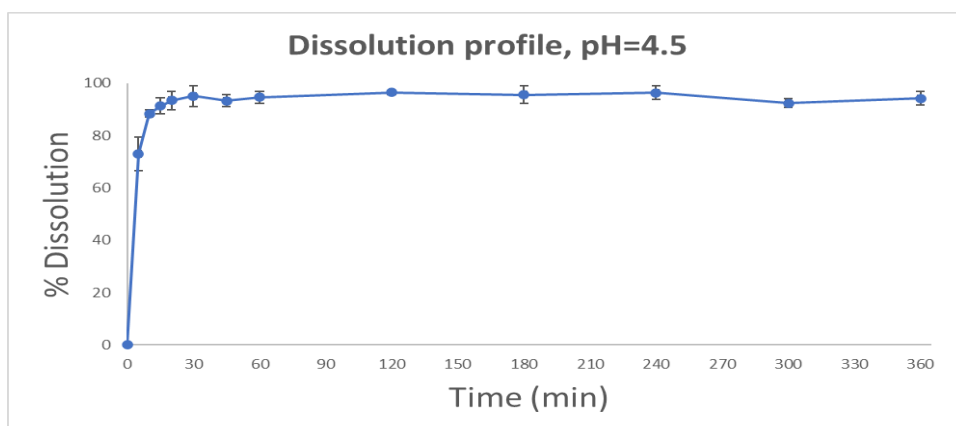
Εικόνα 44. Διάγραμμα συσχέτισης του χρόνου με το ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης του εχινόχρωματος A από τις ίνες PCL-EchA σε pH 6.8.

Διάλυση των ινών PVP-EchA

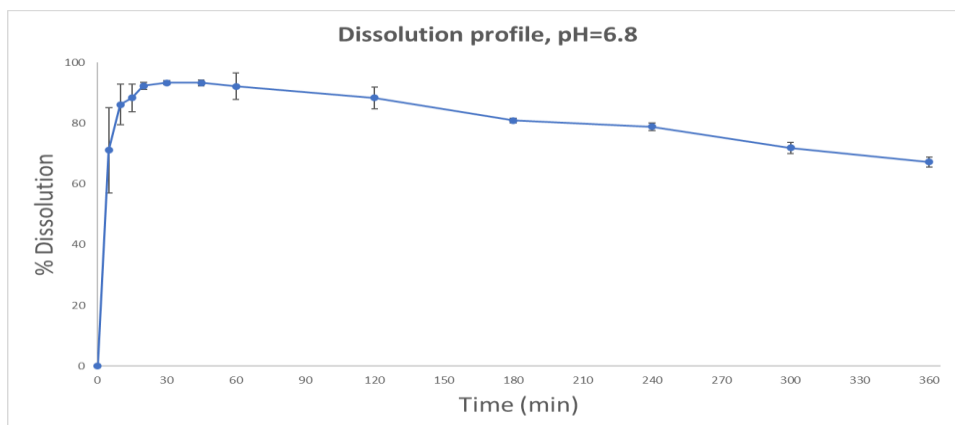
Σε αντίθεση με τις ίνες PCL-EchA, οι ίνες PVP-EchA λόγω της υψηλής υδροφιλικότητας του πολυμερούς διαλύθηκαν και στα τρία pH, με αποτέλεσμα την άμεση αποδέσμευση του εχινόχρωματος Α στο μέσο διάλυσης, με ποσοστό $93.1 \pm 2.5\%$ σε pH 1.2 σε μία ώρα, $96.5 \pm 0.7\%$ σε pH 4.5 στις δύο ώρες και $93.3 \pm 0.7\%$ σε pH 6.8 στα 30 min.



Εικόνα 45. Διάγραμμα συσχέτισης του χρόνου με το ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης του εχινόχρωματος Α από τις ίνες PVP-EchA σε pH 1.2.



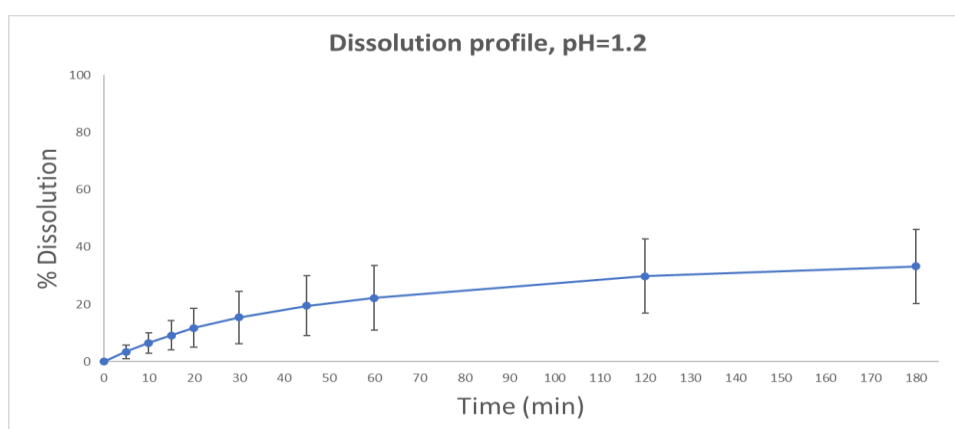
Εικόνα 46. Διάγραμμα συσχέτισης του χρόνου με το ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης του εχινόχρωματος Α από τις ίνες PVP-EchA σε pH 4.5.



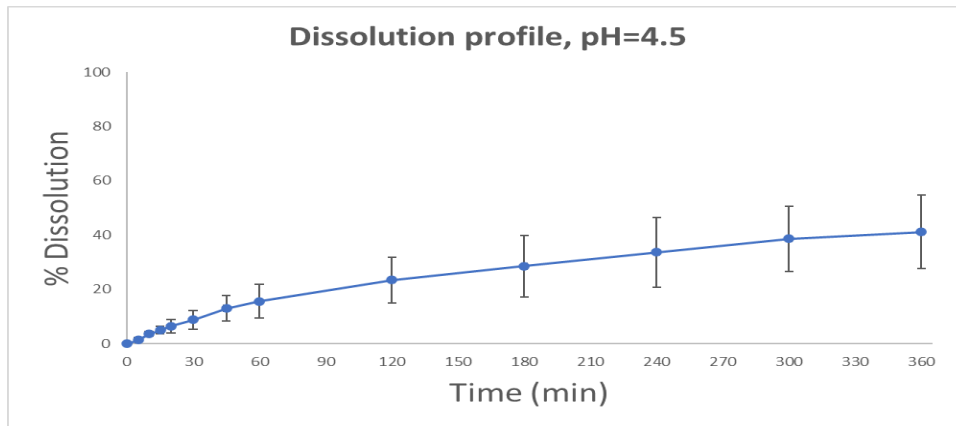
Εικόνα 47. Διάγραμμα συσχέτισης του χρόνου με το ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης του εχινόχρωματος Α από τις ίνες PVP-EchA σε pH 6.8.

Διάλυση των μικτών ινών PCL-EchA/PVP-EchA (1:1)

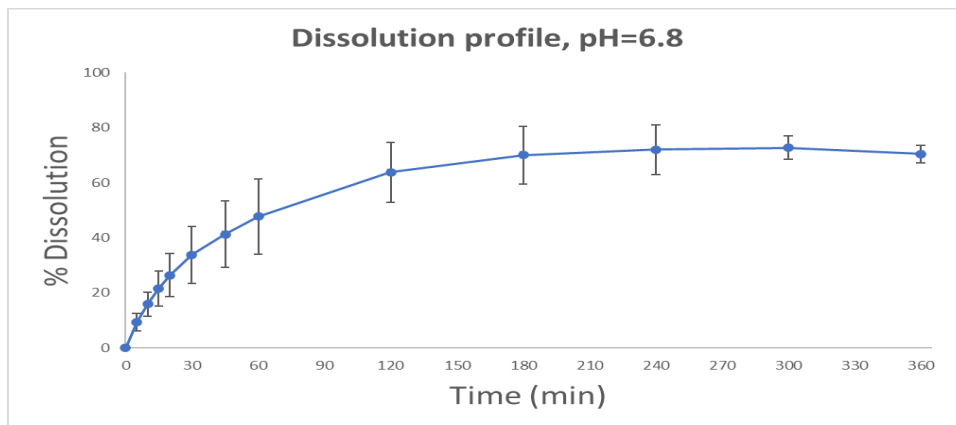
Στο σύστημα ναοϊνών PCL-EchA/PVP-EchA (1:1) παρατηρείται διάλυση του εχινόχρωματος Α ίση με $33.2 \pm 12.9\%$ στις τρεις ώρες σε pH 1.2 και $41.1 \pm 13.5\%$ στις έξι ώρες σε pH 4.5. Σε pH 6.8 σημειώνεται αποδέσμευση του εχινόχρωματος Α ίση με $72.6 \pm 4.2\%$, η οποία είναι παρόμοια με αυτή που παρατηρείται για τις ίνες PCL-EchA.



Εικόνα 48. Διάγραμμα συσχέτισης του χρόνου με το ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης του εχινόχρωματος Α από τις ίνες PCL-EchA/PVP-EchA (1:1) σε pH 1.2.



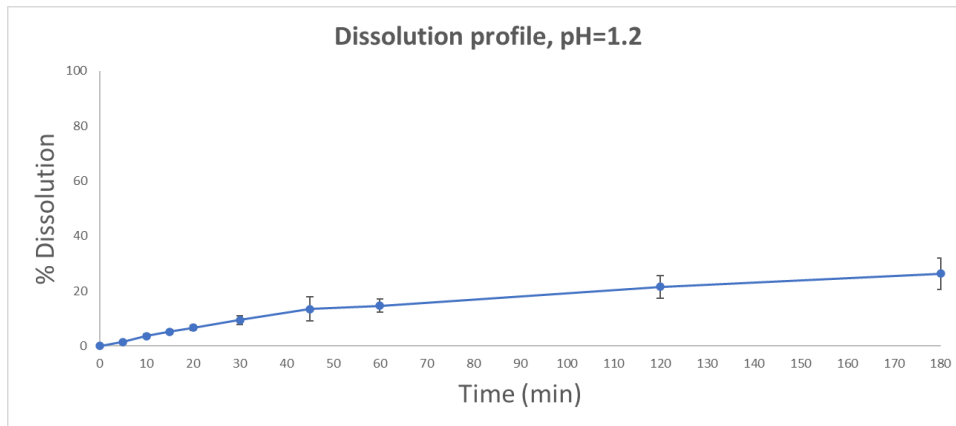
Εικόνα 49. Διάγραμμα συσχέτισης του χρόνου με το ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης του εχνοχρώματος Α από τις ίνες PCL-EchA/PVP-EchA (1:1) σε pH 4.5.



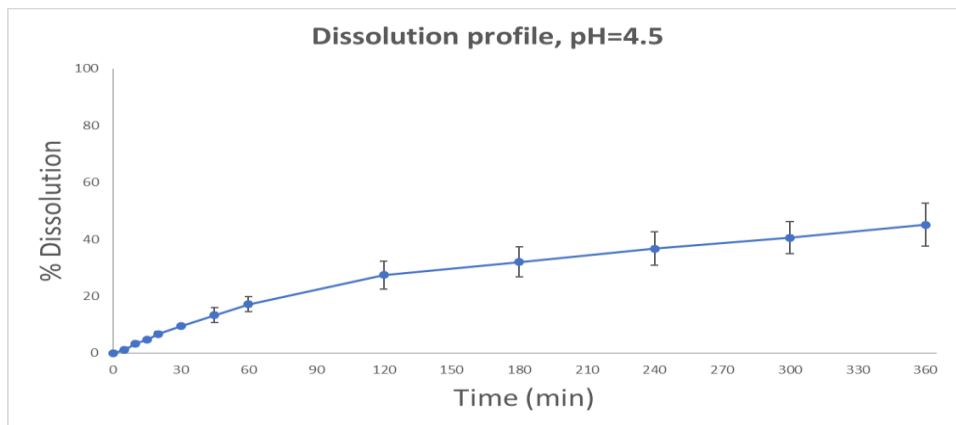
Εικόνα 50. Διάγραμμα συσχέτισης του χρόνου με το ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης του εχνοχρώματος Α από τις ίνες PCL-EchA/PVP-EchA (1:1) σε pH 6.8.

Διάλυση των μικτών ινών PCL-EchA/PVP-EchA (3:1)

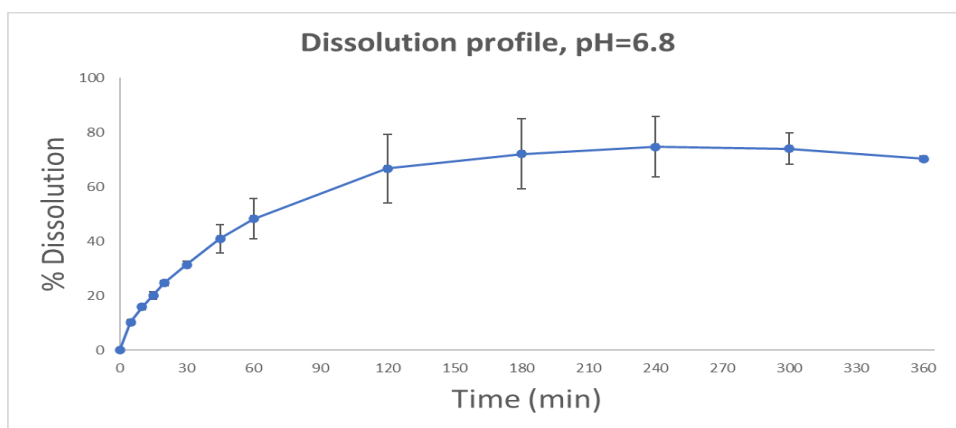
Στο ναοϊνώδες κριώμα PCL-EchA/PVP-EchA (3:1) το ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης του εχνοχρώματος Α βρέθηκε ίσο με $26.3 \pm 5.6\%$ σε pH 1.2 στις τρεις ώρες, με $45.1 \pm 7.4\%$ στις έξι ώρες σε pH 4.5 και με $74.0 \pm 5.7\%$ σε pH 6.8 στις πέντε ώρες.



Εικόνα 51. Διάγραμμα συσχέτισης του χρόνου με το ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης του εχινόχρωματος Α από τις ίνες PCL-EchA/PVP-EchA (3:1) σε pH 1.2.



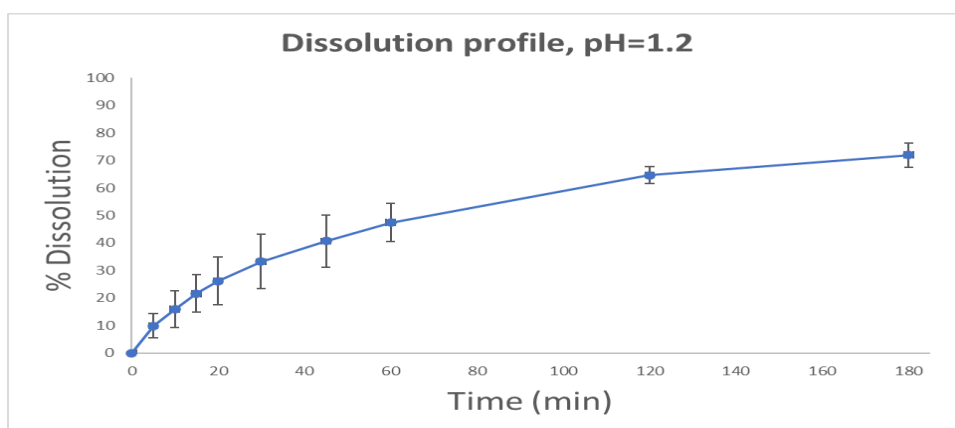
Εικόνα 52. Διάγραμμα συσχέτισης του χρόνου με το ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης του εχινόχρωματος Α από τις ίνες PCL-EchA/PVP-EchA (3:1) σε pH 4.5.



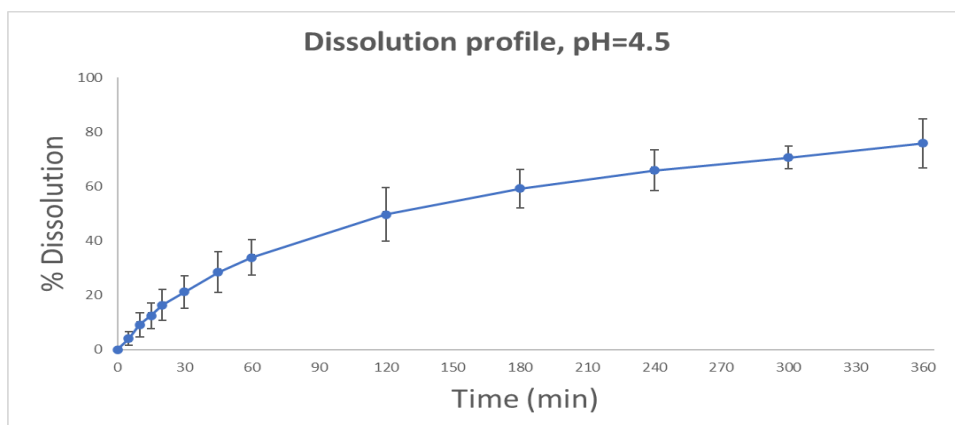
Εικόνα 53. Διάγραμμα συσχέτισης του χρόνου με το ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης του εχινόχρωματος Α από τις ίνες PCL-EchA/PVP-EchA (3:1) σε pH 6.8.

Διάλυση των μικτών ινών PCL-EchA/PVP-EchA (1:3)

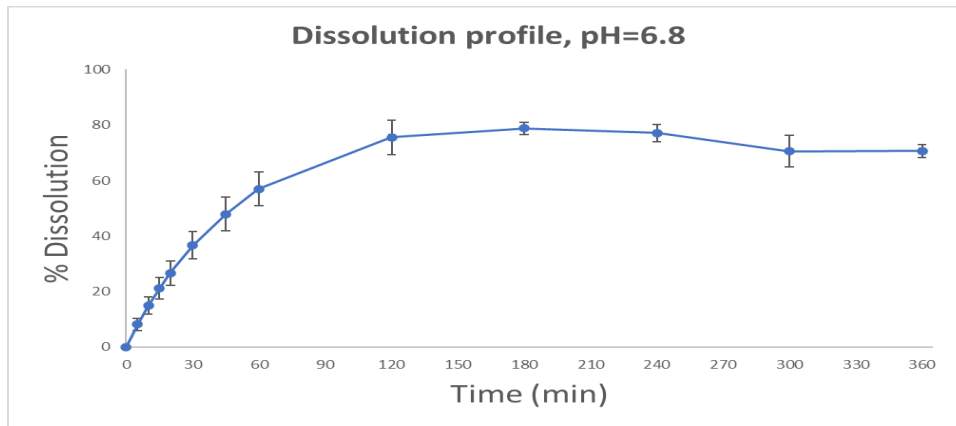
Στις ίνες PCL-EchA/PVP-EchA (1:3) το μέγιστο ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης του εχινοχρώματος Α παρατηρήθηκε στις τρεις ώρες σε pH 1.2 με τιμή ίση με $71.9 \pm 4.4\%$, στις έξι ώρες σε pH 4.5 με τιμή ίση με $75.7 \pm 8.9\%$ και σε pH 6.8 στις τρεις ώρες με τιμή ίση με $78.7 \pm 2.2\%$. Είναι εμφανές ότι οι ίνες PCL-EchA/PVP-EchA (1:3) παρουσίασαν μεγαλύτερο ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης του εχινοχρώματος Α από ότι τα συστήματα PCL-EchA/PVP-EchA (3:1) και PCL-EchA/PVP-EchA (1:1) σε pH 1.2 και 4.5.



Εικόνα 54. Διάγραμμα συσχέτισης του χρόνου με το ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης του εχινοχρώματος Α από τις ίνες PCL-EchA/PVP-EchA (1:3) σε pH 1.2.



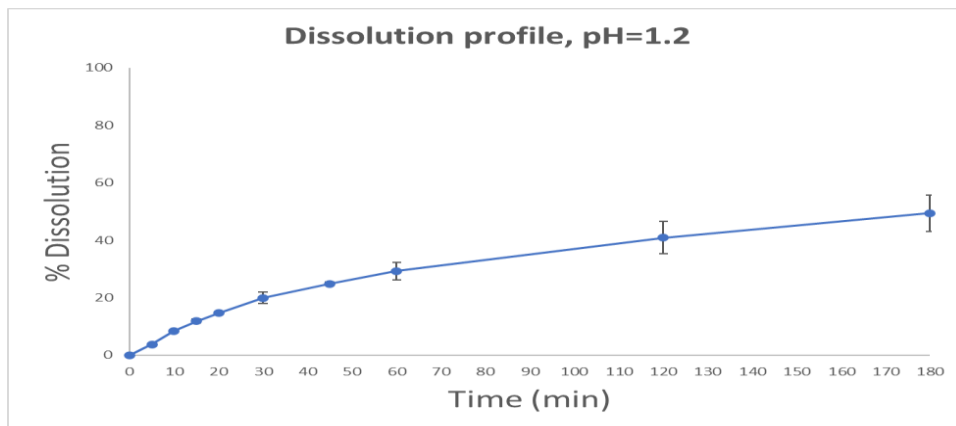
Εικόνα 55. Διάγραμμα συσχέτισης του χρόνου με το ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης του εχινοχρώματος Α από τις ίνες PCL-EchA/PVP-EchA (1:3) σε pH 4.5.



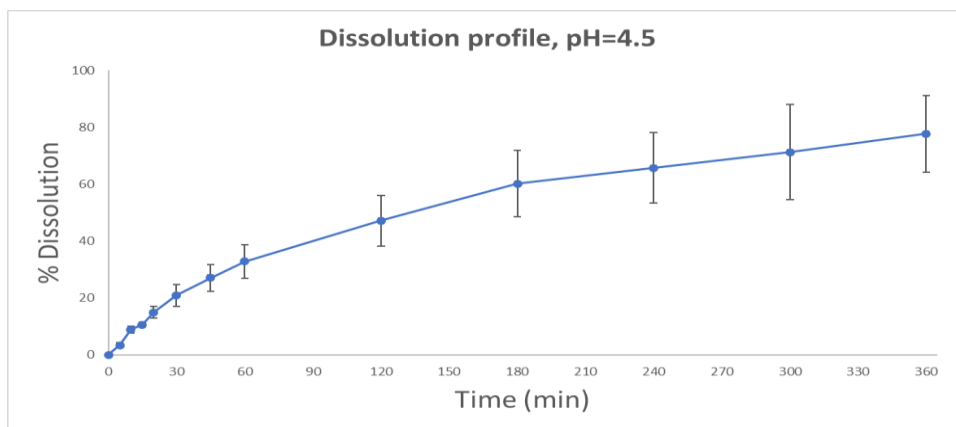
Εικόνα 56. Διάγραμμα συσχέτισης του χρόνου με το ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης του εχινόχρωματος Α από τις ίνες PCL-EchA/PVP-EchA (1:3) σε pH 6.8.

Διάλυση των σύνθετων ινών [PCL-PVP(1:3)]-EchA

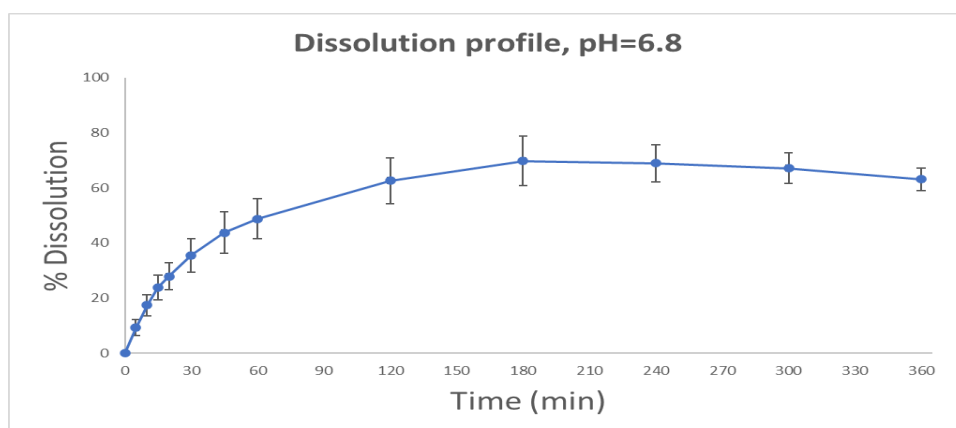
Στο σύστημα των ινών [PCL-PVP(1:3)]-EchA παρατηρείται διάλυση/αποδέσμευση του εχινόχρωματος Α σε ποσοστό $49.4 \pm 6.3\%$ σε pH 1.2 στις τρεις ώρες, $77.7 \pm 13.5\%$ στις έξι ώρες σε pH 4.5 και $69.7 \pm 8.9\%$ σε pH 6.8 στις τρεις ώρες.



Εικόνα 57. Διάγραμμα συσχέτισης του χρόνου με το ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης του εχινόχρωματος Α από τις ίνες [PCL-PVP(1:3)]-EchA σε pH 1.2.



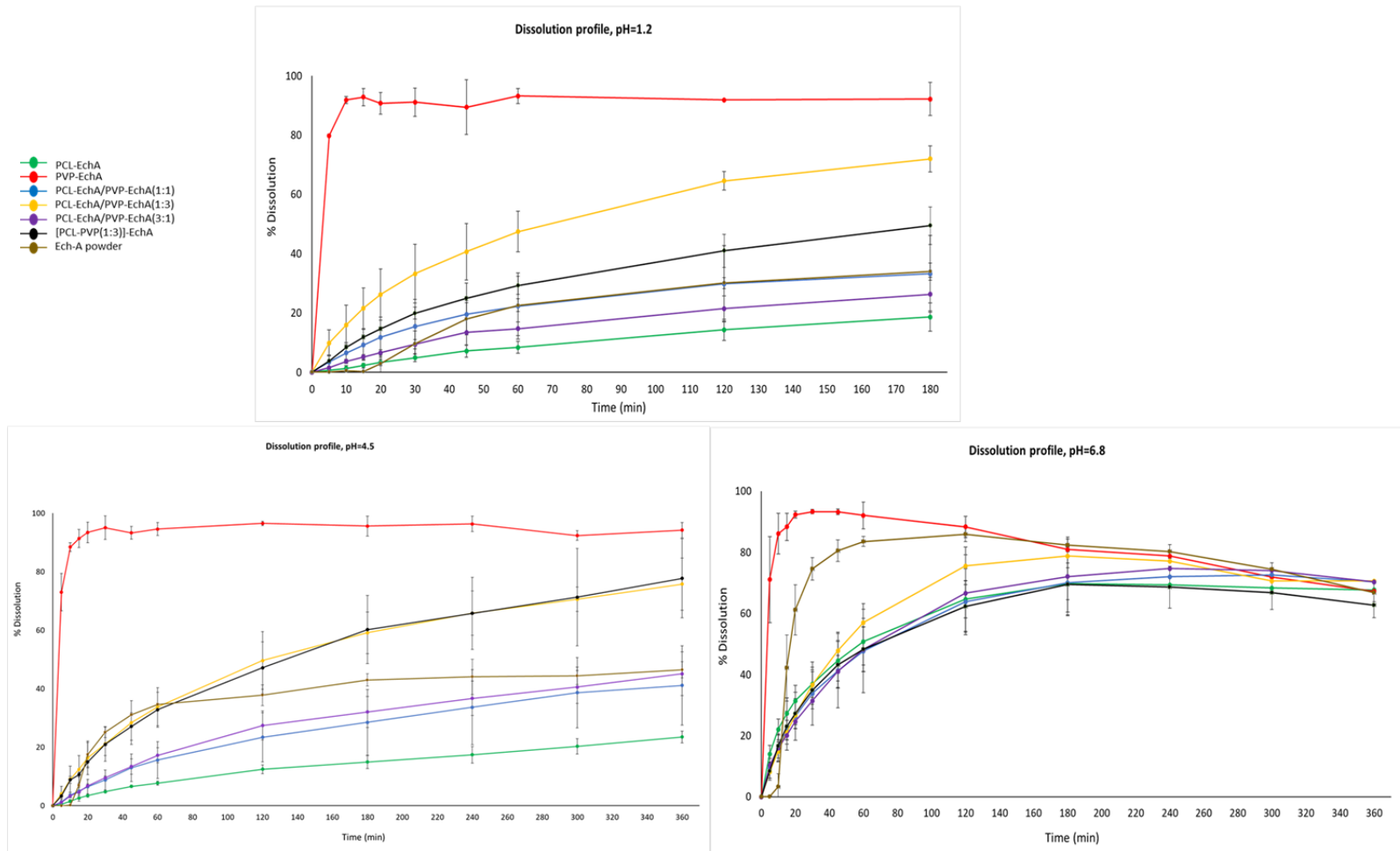
Εικόνα 58. Διάγραμμα συσχέτισης του χρόνου με το ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης του εχινόχρωματος Α από τις ίνες [PCL-PVP(1:3)]-EchA σε pH 4.5.



Εικόνα 59. Διάγραμμα συσχέτισης του χρόνου με το ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης του εχινόχρωματος Α από τις ίνες [PCL-PVP(1:3)]-EchA σε pH 6.8.

Σύγκριση των διαφορετικών προφίλ διάλυσης/αποδέσμευσης

Όπως φαίνεται και από τα αντίστοιχα διαγράμματα (Εικ. 60), οι ίνες PVP-EchA παρουσίασαν άμεση διάλυση/αποδέσμευση της δραστικής ουσίας με ποσοστά $91.1 \pm 4.7\%$, $95.0 \pm 4.0\%$ και $93.3 \pm 0.7\%$ σε pH 1.2, 4.5 και 6.8, αντίστοιχα. Ο υδρόφιλος χαρακτήρας της PVP επιτρέπει την αποτελεσματική διαβροχή των ινών, με αποτέλεσμα τα μόρια νερού να απελευθερώνουν την δραστική ουσία που είχε εγκλωβιστεί στις ίνες. Αντίθετα, ο λιπόφιλος χαρακτήρας της PCL που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή των ινών PCL-EchA εμποδίζει την ενυδάτωση των ινών και κατά συνέπεια την απελευθέρωση του εχινόχρωματος Α. Η PCL δρα ως υδρόφοβος φραγμός, με αποτέλεσμα στην περίπτωση των ινών PCL-EchA να παρατηρείται περίπου το μισό ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης σε σχέση με αυτό που καταγράφηκε κατά τη μελέτη διάλυσης της πρότυπης ουσίας, από τα 30 min του πειράματος και μετά.



Εικόνα 60. Διάγραμμα συσχέτισης του χρόνου με το ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης του εχινοχρώματος Α από τα διαφορετικά ικρίσματα σε pH 1.2, 4.5 και 6.8.

Γενικά, το ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης του εχινόχρωματος Α σε pH 1.2 και pH 4.5 παρουσίασε σταδιακή αύξηση, εξαρτώμενη από το ποσοστό της PVP που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των ινών. Η χρήση της PCL στα παρασκευασθέντα ικρίσματα οδήγησε σε προφίλ παρατεταμένης αποδέσμευσης του εχινόχρωματος Α και στα τρία pH, με διαφορετικό ποσοστό διάλυσης/απελευθέρωσης εξαρτώμενο από το ποσοστό του πολυμερούς στην σύνθεση τους και τη μέθοδο παρασκευής τους.

Σε pH 1.2 δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο προφίλ διάλυσης/αποδέσμευσης που παρουσίασαν οι ίνες PCL-EchA, PCL-EchA/PVP-EchA (3:1) και PCL-EchA/PVP-EchA (1:1) σε όλες τις χρονικές στιγμές δειγματοληψίας. Επίσης παρατηρήθηκε ότι από τις 2 ώρες του πειράματος και μετά οι ίνες PCL-EchA/PVP-EchA (1:3) παρουσίασαν 1.2 φορές υψηλότερα ποσοστά διάλυσης/αποδέσμευσης από τις ίνες [PCL-PVP(1:3)]-EchA.

Σε pH 4.5 παρατηρήθηκε παρόμοιο προφίλ αποδέσμευσης για τις ίνες PCL-EchA/PVP-EchA (3:1) και PCL-EchA/PVP-EchA (1:1), με σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά διάλυσης/αποδέσμευσης από τις ίνες PCL-EchA. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε pH 4.5 το ποσοστό αποδέσμευσης του εχινόχρωματος Α δεν επηρεάστηκε από την μέθοδο παρασκευής των ινών, καθώς τόσο οι ίνες PCL-EchA/PVP-EchA (1:3), όσο και οι ίνες [PCL-PVP(1:3)]-EchA εμφάνισαν παρόμοια προφίλ διάλυσης/αποδέσμευσης.

Το εχινόχρωμα Α εμφανίζει καλύτερη διαλυτότητα σε πιο αλκαλικά pH. Σε pH 6.8 τα ποσοστά διάλυσης της πρότυπης ουσίας που καταγράφηκαν προσεγγίζουν το προφίλ της άμεσης αποδέσμευσης που εμφάνισαν οι ίνες PVP-EchA, ενώ οι ίνες που περιέχουν PCL εμφάνισαν προφίλ παρατεταμένης αποδέσμευσης, όπως παρατηρήθηκε και σε pH 1.2 και 4.5. Επιπροσθέτως, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα ποσοστά διάλυσης/απελευθέρωσης του εχινόχρωματος Α σε pH 6.8 για τα ικρίσματα που περιέχουν PCL στη σύνθεση τους. Το εχινόχρωμα Α είναι λιγότερο σταθερό σε πιο αλκαλικά pH λόγω της οξείδωσης που υφίσταται, με αποτέλεσμα σε pH 6.8 να εμφανίζεται σταδιακή αποικοδόμηση της ουσίας από τα 60 min του πειράματος και μετά. Το φαινόμενο αυτό εμφανίστηκε και στη περίπτωση των ινών PVP-EchA, καθώς και στις ίνες PCL-PVP όσο αυξάνονταν το ποσοστό της PVP σε σχέση με αυτό της PCL στη σύνθεση των ινών. Ο υδρόφοβος χαρακτήρας της PCL πιθανόν προστατεύει το εχινόχρωμα Α, καθυστερώντας την διαδικασία αποικοδόμησής του στις ίνες PCL-EchA, PCL-EchA/PVP-EchA (3:1) και PCL-EchA/PVP-EchA (1:1), καθώς παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό διάλυσης/αποδέσμευσης του εχινόχρωματος Α παρέμεινε σταθερό από την 3^η ώρα του πειράματος και μετά.

Η άμεση απελευθέρωση του εχινόχρωματος Α κατά την είσοδο της φαρμακοτεχνικής μορφής στο στομάχι δεν θεωρείται επιθυμητή, καθώς παρουσιάζει μεγαλύτερη απορρόφηση στο έντερο (Mishchenko et al., 2003). Συνεπώς, η ελεγχόμενη αποδέσμευση του θεωρείται

απαραίτητη για την επίτευξη του μέγιστου ποσοστού διαλυμένης/αποδεσμευμένης ουσίας και κατ' επέκταση την επίτευξη της μέγιστης δυνατής εντερικής απορρόφησης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τους δυο αυτούς στόχους φαίνεται να εξυπηρετούν οι ίνες PCL-EchA/PVP-EchA (1:3) και [PCL-PVP(1:3)]-EchA, οι οποίες επιλέχθηκαν για την διεξαγωγή των *ex vivo* πειραμάτων διαπερατότητας.

3.4. *Ex vivo* μελέτη διαπερατότητας του εχινόχρωματος A

Για τη μελέτη της διαπερατότητας η δόση εχινόχρωματος A ήταν 0.2 mg και σε κάθε περίπτωση τα ινώδη ικρίσματα κόπηκαν και ζυγίστηκαν (~2 mg) ώστε να αντιστοιχούν στη συγκεκριμένη δόση εχινόχρωματος A. Τα πειράματα διαπερατότητας πραγματοποιήθηκαν σε 7 επαναλήψεις για το κάθε υλικό και τα αποτελέσματα αναφέρονται στη μέση τιμή του ποσοστού εχινόχρωματος A που διέρχεται από το φραγμό σε σχέση με την αρχική δόση, σε κάθε χρονική στιγμή.

Σε κάθε κύτταρο υπολογίστηκε α) η ποσότητα που διέρχεται από τον φραγμό της εντερικής μεμβράνης και εντοπίζεται στο διαμέρισμα του δέκτη, β) η ποσότητα που παραμένει στο διαμέρισμα του δότη και γ) η ποσότητα που εγκλωβίζεται στο φραγμό. Τα δεδομένα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του ισοζυγίου μάζας.

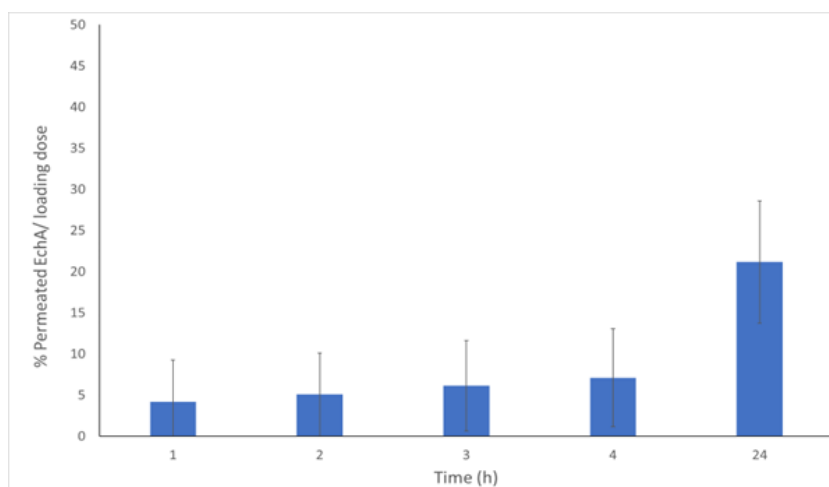
Διαπερατότητα του εχινόχρωματος A σε στερεά μορφή

Πίνακας 13. Αποτελέσματα της μελέτης διαπερατότητας για το εχινόχρωμα A σε στερεά μορφή από μεμβράνη εντέρου.

Χρόνος δειγματοληψίας (h)	%EchA που διαπέρασε το φραγμό	SD
1	4.17	5.083
2	5.04	5.032
3	6.12	5.500
4	7.07	5.942
24	21.14	7.410

Πίνακας 14. Ισοζύγιο μάζας του πειράματος διαπερατότητας για το εχινόχρωμα Α σε στερεά μορφή από μεμβράνη εντέρου.

%EchA που διαπέρασε το φραγμό σε 24h	21.14±7.41
%EchA που ανακτήθηκε από το διαμέρισμα του δότη	17.78±6.35
%EchA που ανακτήθηκε από τη μεμβράνη	3.64±1.05
%EchA συνολική μάζα που ανακτήθηκε	42.57±8.44



Εικόνα 61. Διαγραμματική απεικόνιση της μελέτης διαπερατότητας για το εχινόχρωμα Α σε στερεά μορφή από μεμβράνη εντέρου.

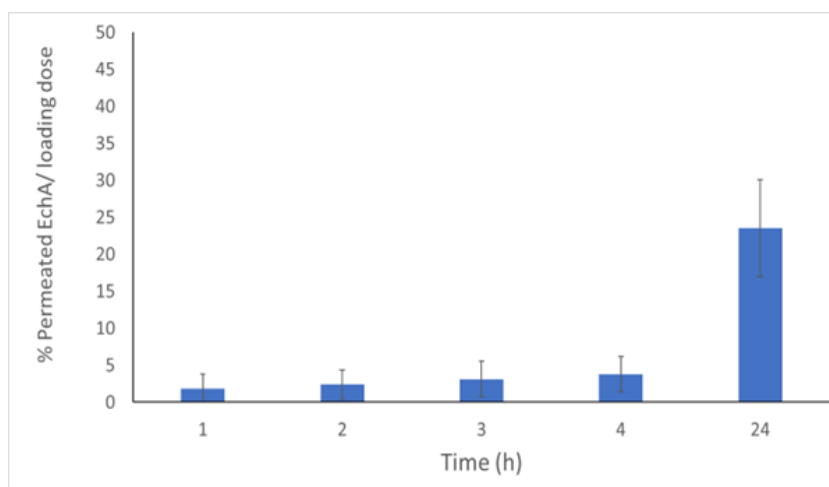
Διαπερατότητα του εχινόχρωματος Α από τις ίνες PCL-EchA/PVP-EchA (1:3)

Πίνακας 15. Αποτελέσματα της μελέτης διαπερατότητας για το εχινόχρωμα Α από τις ίνες PCL-EchA/PVP-EchA (1:3) από μεμβράνη εντέρου.

Χρόνος δειγματοληψίας (h)	%EchA που διαπέρασε το φραγμό	SD
1	1.79	1.947
2	2.39	2.008
3	3.12	2.398
4	3.79	2.366
24	23.52	6.579

Πίνακας 16. Ισοζύγιο μάζας του πειράματος διαπερατότητας για το εχινόχρωμα Α από τις ίνες PCL-EchA/PVP-EchA (1:3) από μεμβράνη εντέρου.

%EchA που διαπέρασε το φραγμό σε 24h	23.52±6.579
%EchA που ανακτήθηκε από το διαμέρισμα του δότη	27.46±6.621
%EchA που ανακτήθηκε από τη μεμβράνη	11.56±7.027
%EchA συνολική μάζα που ανακτήθηκε	62.54±9.43



Εικόνα 62. Διαγραμματική απεικόνιση της μελέτης διαπερατότητας για το εχινόχρωμα Α από τις ίνες PCL-EchA/PVP-EchA (1:3) από μεμβράνη εντέρου.

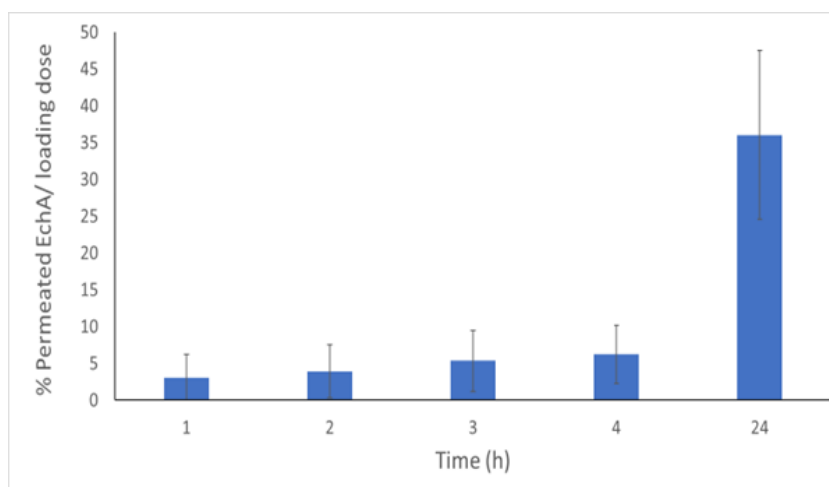
Διαπερατότητα του εχινόχρωματος Α από τις ίνες [PCL-PVP(1:3)]-EchA

Πίνακας 17. Αποτελέσματα της μελέτης διαπερατότητας για το εχινόχρωμα Α από τις ίνες [PCL-PVP(1:3)]-EchA από μεμβράνη εντέρου.

Χρόνος δειγματοληψίας (h)	%EchA που διαπέρασε το φραγμό	SD
1	3.02	3.222
2	3.91	3.574
3	5.32	4.187
4	6.21	3.965
24	36.03	11.482

Πίνακας 18. Ισοζύγιο μάζας του πειράματος διαπερατότητας για το εχινόχρωμα Α από τις ίνες [PCL-PVP(1:3)]-EchA από μεμβράνη εντέρου.

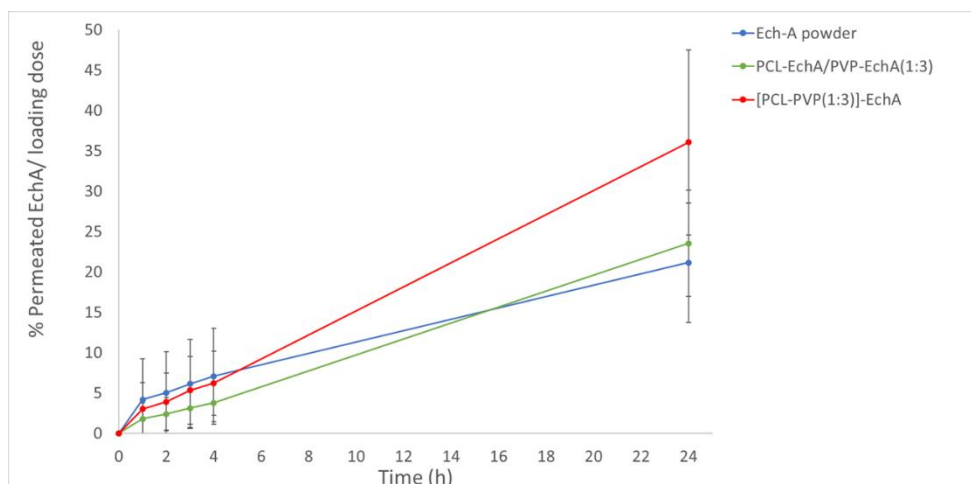
%EchA που διαπέρασε το φραγμό σε 24h	36.03±11.482
%EchA που ανακτήθηκε από το διαμέρισμα του δότη	30.34±14.352
%EchA που ανακτήθηκε από τη μεμβράνη	3.74±1.15
%EchA συνολική μάζα που ανακτήθηκε	70.11±17.58



Εικόνα 63. Διαγραμματική απεικόνιση της μελέτης διαπερατότητας για το εχινόχρωμα Α από τις ίνες [PCL-PVP(1:3)]-EchA από μεμβράνη εντέρου.

Σύγκριση των διαφορετικών προφίλ διαπερατότητας

Στα πειράματα διαπερατότητας δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο ποσοστό του εχινόχρωματος Α που διαπέρασε τον βιολογικό φραγμό του εντέρου στις πρώτες ώρες της διαδικασίας μεταξύ των ινών που εξετάστηκαν και της πρότυπης ουσίας. Ωστόσο, στις 24 ώρες η ποσότητα του εχινόχρωματος Α που διαπέρασε το φραγμό βρέθηκε υψηλότερη στην περίπτωση των ινών [PCL-PVP(1:3)]-EchA. Πιο συγκεκριμένα, το ποσοστό της ποσότητας εχινόχρωματος Α που διαπέρασε το φραγμό βρέθηκε να είναι 1.5 φορές υψηλότερο στις σύνθετες ίνες [PCL-PVP(1:3)]-EchA σε σχέση με τις μικτές ίνες PCL-EchA/PVP-EchA (1:3) και την πρότυπη ουσία σε στερεά μορφή. Το γεγονός αυτό οφείλεται στη διττή φύση των ικρωμάτων, που αποτελούνται τόσο από λιπόφιλα όσο και από υδρόφιλα μέρη, επιτρέποντας έτσι την πιο αποτελεσματική αλληλεπίδραση τους με τα αμφίφιλα μέρη του εντερικού φραγμού. Η αλληλεπίδραση αυτή ευνοεί τη διαπέραση του φραγμού από το εχινόχρωμα Α, όπως προκύπτει από την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων του διαμερίσματος δέκτη κατά τη χρονική στιγμή των 24 ωρών.

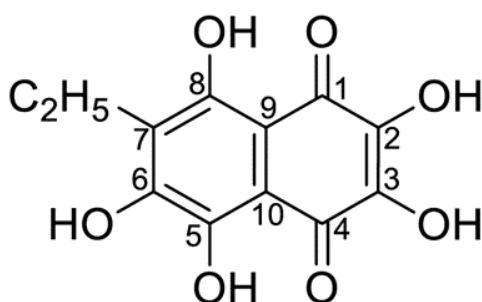


Εικόνα 64. Διαγραμματική απεικόνιση της μελέτης διαπερατότητας των υπό εξέταση υλικών από μεμβράνη εντέρου.

Το ισοζύγιο μάζας που υπολογίστηκε κατά την πειραματική διαδικασία βρέθηκε ίσο με $42.57 \pm 8.44\%$ για την πρότυπη ουσία εχινόχρωμα Α, $62.54 \pm 9.43\%$ και $70.11 \pm 17.58\%$ για τα ικρίωματα PCL-EchA/PVP-EchA (1:3) και [PCL-PVP(1:3)]-EchA, αντίστοιχα. Το ισοζύγιο μάζας των ινωδών ικριωμάτων είναι μεγαλύτερο από αυτό που υπολογίστηκε για την πρότυπη ουσία, κάτι που υποδηλώνει τη προστατευτική δράση της PCL έναντι της αποικοδόμησης που προκαλείται από το pH σε όλα τα μέρη της διάταξης των κυττάρων Franz.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας απομονώθηκε ο δευτερογενής μεταβολίτης εχινόχρωμα Α, το μετά νατρίου άλας του οποίου αποτελεί δραστική ουσία του φαρμάκου Histrochrome που κυκλοφορεί στην αγορά της Ρωσίας. Ποσότητα αχινών του γένους *Diadema* συλλέχθηκε από τον κόλπο του Αγίου Γεωργίου στο Καστελλόριζο, σε βάθος 1-5m, τον Σεπτέμβριο του 2021. Από το οργανικό του εκχύλισμα απομονώθηκε με χρωματογραφικούς διαχωρισμούς το εχινόχρωμα Α.



Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η ενσωμάτωση του εχινόχρωματος Α σε μικρο-/νανοΐνες, οι οποίες αξιολογήθηκαν για την αποτελεσματικότητά τους ως συστήματα αποδέσμευσης του, ενισχύοντας τη σταθερότητα του και τη διάλυση του σε υγρά που προσομοιάζουν τα γαστρεντερικά υγρά του ανθρώπου, καθώς και τη διαπερατότητα του από τον εντερικό φραγμό.

Για το λόγο αυτό παρασκευάστηκαν ηλεκτροϊνοποιημένες μικρο-/νανοΐνες από βιοπολυμερή υδρόφοβης και υδρόφιλης φύσης, όπως η πολυ(ε-καπρολακτόνη) (PCL) και η πολυ(βινυλοπυρρολιδόνη) (PVP), με ενσωματωμένο το εχινόχρωμα Α. Η επιλογή των πολυμερών για την παραγωγή αυτών των μη υφάνσιμων μικρο-/νανοϊνωδών υποστρωμάτων έγινε με κριτήριο το χαμηλό κόστος, την βιοαποικοδομησιμότητά τους και την ασφάλεια τόσο για τον χρήστη όσο και για το περιβάλλον.

Η βελτιστοποίηση των παραμέτρων ηλεκτροϊνοποίησης οδήγησε στον σχηματισμό ομοιόμορφων ινών χωρίς χάντρες, ενώ η ενσωμάτωση του εχινόχρωματος Α δεν εμφάνισε κάποιου είδους επίδραση στη μορφολογία των ινών.

Παρασκευάστηκαν με επιτυχία ίνες με διαφορετικές αναλογίες των πολυμερών PCL και PVP, οι οποίες παρουσίασαν διαφορετικά *in vitro* προφίλ διάλυσης/αποδέσμευσης του εχινόχρωματος Α, εξαρτώμενα από την αναλογία των πολυμερών και τον τρόπο παραγωγής των ικρωμάτων. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι τα ποσοστά διάλυσης/αποδέσμευσης

είναι υψηλότερα στις περιπτώσεις που επικρατεί το πολυμερές PVP.

- Στις ίνες από 100% PVP παρατηρήθηκε άμεση αποδέσμευση του εχινόχρωματος A με βελτιωμένα χαρακτηριστικά διάλυσης, με ποσοστό πάνω από 90% της δόσης που χρησιμοποιήθηκε και στα τρία υδατικά μέσα που εξετάστηκαν.
- Στις ίνες που χρησιμοποιήθηκε PCL παρατηρήθηκε βελτίωση στην σταθερότητα του εχινόχρωματος A, το οποίο υφίσταται οξείδωση σε υδατικά διαλύματα με pH 6.8.
- Στις ίνες PCL-EchA/PVP-EchA (1:3) και [PCL-PVP(1:3)]EchA παρατηρήθηκε ελεγχόμενη αποδέσμευση και βελτιωμένα χαρακτηριστικά διάλυσης του εχινόχρωματος A.

Από την *ex vivo* μελέτη διαπερατότητας των συστημάτων PCL-EchA/PVP-EchA(1:3) και [PCL-PVP(1:3)]-EchA, συμπεραίνεται ότι το εχινόχρωμα A στην άμορφη κατάσταση που βρίσκεται μετά την διαδικασία της ηλεκτροϊονοποίησης είναι ικανό να διαπερνά τη μεμβράνη εντέρου, με το μεγαλύτερο ποσοστό να παρατηρείται στην περίπτωση των σύνθετων ινών [PCL-PVP(1:3)]-EchA .

Η παρούσα μελέτη υποδεικνύει ότι οι μικρο-/νανοϊνώδεις δομές αποτελούν ένα υποσχόμενο σύστημα αποδέσμευσης του εχινόχρωματος A που βελτιώνει τα χαρακτηριστικά διάλυσης και σταθερότητας του. Η κατάλληλη επιλογή του πολυμερούς σε συνδυασμό με τη δόση εχινόχρωματος A που θα ενσωματωθεί στις ίνες μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικά ποσοστά αποδέσμευσης και να επηρεάσει την σταθερότητα του.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Agarwal S., Wendorff J.H., Greiner A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer* **2008**, 49, 5603-5621.

Artyukov A.A., Popov A.M., Tsybulsky A.V., Krivoschapko O.N., Polyakova N.V. Pharmacological activity of echinochrome a alone and in the biologically active additive Timarin. *Biochem Moscow Suppl Ser B* **2013**, 7, 237-242.

Artyukov A.A., Zelepuga E.A., Bogdanovich L.N., Natalia M. Lupach., Novikov V. L., Rutckova T.A., Kozlovskaya E. P. Marine polyhydroxynaphthoquinone, Echinochrome A: Prevention of atherosclerotic inflammation and probable molecular targets. *JCM* **2020**, 9, 1494.

Bai G., Armenante .PM., Plank R.V., Gentzler M., Ford K., Harmon P. Hydrodynamic Investigation of USP Dissolution Test Apparatus II. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2007**, 96, 2327-2349.

Baji A., Mai Y.W., Wong S.C., Abtahi M., Chen P. Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties. *Composites Science and Technology* **2010**, 70, 703-718.

Bergmann W., Feeney R.J. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. I. *J Org Chem.* **1951**, 16, 981-987.

Bhardwaj N., Kundu S.C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* **2010**, 28, 325-347.

Brasseur L., Caulier G., Flammang P., Gerbaux P., Eeckhaut I. Mapping of spinochromes in the body of three tropical shallow water sea urchins. *Natural Product Communications* **2018**, 13, 1934578X1801301.

Brasseur L., Hennebert E., Fievez L. Caulier G., Bureau F., Tafforeau L., Flammang P., Gerbaux P., Eeckhaut I. The roles of spinochromes in four shallow water tropical sea urchins and their potential as bioactive pharmacological agents. *Marine Drugs* **2017**, 15, 179.

Cho H., Termsarab U., Kim S. J., Kim D. In vitro nasal cell culture systems for drug transport studies. *Journal of Pharmaceutical Investigation* **2010**, 40, 321-332.

Coates C.J., McCulloch C., Betts J., Whalley T. Echinochrome A release by red spherule cells is an iron-withholding strategy of sea urchin innate immunity. *J. Innate Immun.* **2018**, 10, 119-130.

El'kin Y., Cherednichenko A.I., Kol'tsova E.A., Artyukov A.A. Electron capture mass spectrometry of echinochrome A. *J. Anal. Chem.* **2011**, 66, 1477-1479.

Fabrizio B., Giulia B.A., Fabio S., Paola R., Gaia C. In vitro permeation of desmopressin across rabbit nasal mucosa from liquid nasal sprays: The enhancing effect of potassium sorbate. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2009**, 37, 36-42.

Fang J, Niu H, Lin T, Wang X. Applications of electrospun nanofibers. *Sci Bull.* **2008**, 53, 2265-2286.

Fedoreyev S., Krylova N., Mishchenko P.N., Vasileva E. A., Pislyagin E. A., Lunikhina O. V., Lavrov V. F, Svitich O. A., Ebralidze L. K., Leonova G. N. Antiviral and antioxidant properties of echinochrome A. *Marine Drugs* **2018**,16, 509.

Garg K., Bowlin G.L. Electrospinning jets and nanofibrous structures. *Biomicrofluidics* **2011**, 5, 013403.

Goodwin T.W., Srisukh S. A study of the pigments of the sea-urchins, *Echinus esculentus* L. and *Paracentrotus lividus* Lamarck. *Biochemical Journal* **1950**, 47, 69-76.

Greiner A., Wendorff J.H. Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 5670-5703.

Grijseels H., Crommelin D.J.A., De Blaey C.J. Hydrodynamic approach to dissolution rate. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition* **1981**, 3, 1005-1020.

Higuchi W.I. Diffusional models useful in biopharmaceutics. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1967**, 56, 315-324.

Hou Y., Carne A., McConnell M., Mros S., Vasileva E. A , Mishchenko N. P., Burrow K. , Wang K., Bekhit A.A., Bekhit A.E.A. PHNQ from *Evechinus chloroticus* sea urchin supplemented with calcium promotes mineralization in Saos-2 human bone cell line. *Marine Drugs* **2020**, 18, 373.

Hu G.P., Yuan J., Sun L., She Z.G., Wu J.H., Lan X.J., Zhu X., Lin Y.C., Chen S.P. Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. *Marine Drugs* **2011**, 9, 514-525.

Huang Z., Zhang Y.Z., Kotaki M, Ramakrishna S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology* **2003**, 63, 2223-2253.

Itoh T., Fujiwara A., Ninomiya M., Maeda T., Ando M., Tsukamasa Y., Koketsu M. Inhibitory effects of Echinochrome A, isolated from shell of the sea urchin *Anthocidaris crassispina* on antigen-stimulated degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells through suppression of lyn activation. *Natural Product Communications* **2016**, 11, 1934578X1601100.

Lunikhina O.V., Krylova N.V., Mishchenko N.P., Vasileva E.A., Fedoreyev S.A., Shchelkanov M.Yu. Comparative in vitro study of antiherpetic activity of Echinochrome A and product of its oxidation dehydroechinochrome. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2021**, 171, 464-467.

Jeong S., Kim H.K., Song I., Lee S. J., Ko K. S., Rhee B. D., Kim N., Mishchenko N. P., Fedoryev S. A., Stonik V. A., Han J. Echinochrome A protects mitochondrial function in cardiomyocytes against cardiotoxic drugs. *Marine Drugs* **2014**, 12, 2922-2936.

Jeong S.H., Kim H.K., Song I., Noh S. J., Marquez J., Ko K. S., Rhee B. D., Kim N., Mishchenko N. P., Fedoreyev S. A., Stonik V.A., Han J. Echinochrome A increases mitochondrial mass and function by modulating mitochondrial biogenesis regulatory genes. *Marine Drugs* **2014**, 12, 4602-4615.

Jian F., Haitao N., Tong L., XunGai W. Applications of electrospun nanofibers. *Materials Science* **2008**, 53, 22.

Jones W.P., Chin Y.W., Kinghorn A.D. The role of pharmacognosy in modern medicine and pharmacy. *CDT*. **2006**, 7, 247-264.

Kareva E.N., Tikhonov D.A., Mishchenko N.P., Fedoreev S.A., Shimanovskii N.L. Effects of Histochrome on P53 expression in mouse red bone marrow cells in a model of chronic stress. *Pharm. Chem. J.* **2014**, 48, 149-152.

Kim H.K., Vasileva E.A., Mishchenko N.P., Fedoreyev S.A., Han J. Multifaceted clinical effects of Echinochrome. *Marine Drugs* **2021**, 19, 412.

Kim H.K., Youm J.B., Jeong S.H., Lee S. R., Song I.S., Ko T. H., Pronto J. R., Ko K.S., Rhee B. D., Kim N., Nilius B., Mischchenko N. P., Fedoreyev S. A., Stonik V. A., Han J. Echinochrome A regulates phosphorylation of phospholamban Ser16 and Thr17 suppressing cardiac SERCA2A Ca²⁺ reuptake. *Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol.* **2015**, 467, 2151-2163.

Kim R., Hur D., Kim H.K., Han J., Mishchenko N.P., Fedoreyev S. A, Stonik V. A., Chang W. Echinochrome A attenuates cerebral ischemic injury through regulation of cell survival after middle cerebral artery occlusion in rat. *Marine Drugs* **2019**, 17, 501.

Kiuru P., D'Auria M., Muller C.D., Tammela P., Vuorela H., Yli-Kauhaluoma J. Exploring marine resources for bioactive compounds. *Planta Med.* **2014**, 80, 1234-1246.

Koltsova E.A., Boguslavskaya L.V., Maximov O.B. On the functions of quinoid pigments in sea urchin embryos. *International Journal of Invertebrate Reproduction* **1981**, 4, 17-23.

Kostewicz E.S., Abrahamsson B., Brewster M., Brouwers J., Butler J., Carlert S., A. Dickinson P., Dressman J., Holm R., Klein S., Mann J., McAllister M., Minekus M., Muenster U., Müllertz A., Verwei M., Vertzoni M., Weitschies W., Augustijns P. In vitro models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2014**, 57, 342-366.

Lebedev A. V., Ivanova M. V., Levitsky D. O. Iron chelators and free radical scavengers in naturally occurring polyhydroxylated 1,4-naphthoquinones. *Hemoglobin* **2008**, 32, 165-179

Lebedev A.V., Ivanova M.V., Levitsky D.O. Echinochrome, a naturally occurring iron chelator and free radical scavenger in artificial and natural membrane systems. *Life Sciences* **2005**, 76, 863-875.

Lebedev A.V., Levitskaya E.L., Tikhonova E.V., Ivanova M.V. Antioxidant properties, autooxidation, and mutagenic activity of Echinochrome A compared with its etherified derivative. *Biochemistry* **2001**, 66, 885-893.

Lee S., Pronto J., Sarankhuu B.E., Ko K. S., Rhee B. D., Kim N., Mishchenko N.P., Fedoreyev S.A., Stonik V. A., Han J. Acetylcholinesterase inhibitory activity of pigment Echinochrome A from sea urchin *Scaphechinus mirabilis*. *Marine Drugs* **2014**, 12, 3560-3573.

Levintova Y., Plakogiannis M. F., Bellantone A. R. An improved in vitro method for measuring skin permeability that controls excess hydration of skin using modified Franz diffusion cells. *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, 419, 96-106.

- Li D., Xia Y. Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel? *Adv. Mater.* **2004**, 16, 1151-1170.
- Lipinski C.A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.* **2000**, 44, 235-249.
- Loftsson T. Aqueous solubility and true solutions. *Pharmazie.* **2010**, 6,404-407.
- Millott N. Naphthaquinone pigment in the tropical sea urchin *Diadema antillarum* Philippi. *Proceedings of the Zoological Society of London* **1957**, 129, 263-272.
- Mishchenko N.P., Krylova N.V., Lunikhina O.V., Vasileva E. A., Likhatskaya G. N., Pisyagin E. A., Tarbeeva D. V., Dmitrenok P. S., Fedoreyev S. A. Antiviral potential of sea urchin aminated spinochromes against Herpes simplex virus type 1. *Marine Drugs* **2020**, 18, 550.
- Mishchenko N. P., Fedoreev S. A., Bagirova V. L. Histochrome: A new original domestic drug. *Pharmaceutical Chemistry Journal* **2002**, 37, 49-53.
- Mishchenko N.P., Vasileva E.A., Gerasimenko A.V., Grigorchuk V.P., Dmitrenok P.S., Fedoreyev S.A. Isolation and structure determination of Echinochrome A oxidative degradation products. *Molecules* **2020**, 25, 4778.
- Mohamed A.S. Echinochrome exhibits antitumor activity against Ehrlich ascites carcinoma in swiss albino mice. *Nutrition and Cancer* **2021**, 73, 124-132.
- Mohamed A.S., Sadek S.A., Hassanein S.S., Soliman A.M. Hepatoprotective effect of echinochrome pigment in septic rats. *Journal of Surgical Research* **2019**, 234, 317-324.
- Mohamed A.S., Soliman A.M., Marie M.A.S. Mechanisms of echinochrome potency in modulating diabetic complications in liver. *Life Sciences* **2016**, 151, 41-49.
- Moore R.E., Singh H., Scheuer P.J. Isolation of eleven new spinochromes from echinoids of the genus *Echinothrix*. *J. Org. Chem.* **1966**, 31, 3645-3650.
- Moss G.P., Gullick D.R., Wilkinson S.C. Predictive methods in percutaneous absorption. **2015**. Springer, Berlin, chapt. 2
- Nhu Hieu V.M., Thanh Van T.T., Hang CT.T., Mischenko N.P., Sergey A.F., Truong H.B. Polyhydroxynaphthoquinone pigment from Vietnam sea urchins as a potential bioactive ingredient in cosmeceuticals. *Natural Product Communications* **2020**, 15, 1934578X2097252.
- Novikov V.L., Shestak O.P., Mishchenko N.P. Oxidation of 7-ethyl-2,3,5,6,8-pentahydroxy-1,4-naphthoquinone (echinochrome A) by atmospheric oxygen 1. Structure of dehydroechinochrome. *Russ. Chem. Bull.* **2018**, 67, 282-290.
- Oh S.J., Seo Y., Ahn J.S, Shin Y. Y, Yang J. W., Kim H. K., Han J., Mishchenko N. P., Fedoreyev S. A., Stonik V. A., Kim H.S. Echinochrome A reduces colitis in mice and induces in vitro generation of regulatory immune cells. *Marine Drugs* **2019**, 17, 622.
- Park G.T., Yoon J.W., Yoo S.B., Song Y.C., Song P., Kim H. K., Han J., Bae S., Ha K., Mishchenko N. P., Fedoreyev S. A., Stonik V. A, Kim M., Kim J. Echinochrome A treatment alleviates fibrosis

- and inflammation in bleomycin-induced scleroderma. *Marine Drugs* **2021**, *19*, 237.
- Phyllis T. J., AND Faylla A. C. Infection with diatoms and other microorganisms in sea urchin spines. *Journal of Invertebrate Pathology* **1970**, *16*, 268-276.
- Popov A.M., Krivoschapko O.N. Protective effects of polar lipids and redox-active compounds from marine organisms at modeling of hyperlipidemia and diabetes. *JBISE* **2013**, *06*, 543-550.
- Popov A.M., Osipov A.N., Korepanova E.A., Krivoschapko O.N., Artyukov A.A., Klimovich A. A. A study of the antioxidant and membranotropic activities of equinochrome a using different model systems. *Biophysics* **2017**, *62*, 407-414.
- Powell C., Hughes A.D., Kelly M.S., Conner S., McDougall G.J. Extraction and identification of antioxidant polyhydroxynaphthoquinone pigments from the sea urchin, *Psammechinus miliaris*. *Food Science and Technology* **2014**, *59*, 455-460.
- Rubilar T., Barbieri E. S., Gazquez A., Avaro M. Sea urchin pigments: Echinochrome A and its potential implication in the cytokine storm syndrome. *Mar. Drugs* **2021**, *19*, 267.
- Sayed D.A., Soliman A.M., Fahmy S.R. Echinochrome pigment as novel therapeutic agent against experimentally - induced gastric ulcer in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2018**, *107*, 90-95.
- Seo D.Y., McGregor R.A., Noh S.J., Choi S. J., Mishchenko N. P., Fedoreyev S. A., Stonik V. A., Han J. Echinochrome A improves exercise capacity during short-term endurance training in rats. *Marine Drugs* **2015**, *13*, 5722-5731.
- Seol J.E., Ahn S.W., Seol B., Yun H.R., Park N., Kim H. K., Vasileva E.A., Mishchenko N. P., Fedoreyev S.A., Stonik V. A., Han J. Echinochrome A protects against ultraviolet B-induced photoaging by lowering collagen degradation and inflammatory cell infiltration in hairless mice. *Marine Drugs* **2021**, *19*, 550.
- Service M., Wardlaw A.C. Echinochrome-A as a bactericidal substance in the coelomic fluid of *Echinus esculentus* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **1984**, *79*, 161-165.
- Shikov A.N., Pozharitskaya O.N., Krishtopina A.S., Makarov V.G. Naphthoquinone pigments from sea urchins: chemistry and pharmacology. *Phytochem Rev.* **2018**, *17*, 509-534.
- Soleimani S., Mashjoor S., Mitra S., Yousefzadi M., Rezadoost H. Coelomic fluid of *Echinometra mathaei*: The new prospects for medicinal antioxidants. *Fish & Shellfish Immunology* **2021**, *117*, 311-319.
- Soleimani S., Mashjoor S., Yousefzadi M., Kumar M. Multi-target bioactivity of summer quinones production in the Persian Gulf burrowing black-type sea urchin. *Heliyon* **2022**, *8*, e09044.
- Tanioka A. & Takashi M. High-performance and speciality fibers. **2016**. Springer, 273-283.
- Stonik V.A. Marine natural products: A way to new drugs. *Acta Naturae* **2009**, *1*, 15-25.
- Teo W.E., Ramakrishna S. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies.

Nanotechnology **2006**, 17, R89-R106.

Vasileva E.A., Mishchenko N.P., Fedoreyev S.A. Diversity of polyhydroxynaphthoquinone pigments in North Pacific sea urchins. *Chem Biodiversity* **2017**, 14, e1700182.

Vasileva E.A., Mishchenko N.P., Zadorozhny P.A., Fedoreyev S.A. New Aminonaphthoquinone from the sea urchins *Strongylocentrotus pallidus* and *Mesocentrotus nudus*. *Natural Product Communications* **2016**, 11, 1934578X1601100.

Yermak I., Gorbach V., Glazunov V., Kravchenko A. O., Mishchenko N. P., Pimenova E. A., Davydova V.N. Liposomal form of the echinochrome-carrageenan complex. *Marine Drugs* **2018**, 16, 324.

Yermak I.M., Gorbach V.I., Karnakov I.A., Davydova V. N., Pimenova E.A., Chistyulin D.A., Isakov V. V., Glazunov V. P. Carrageenan gel beads for echinochrome inclusion: Influence of structural features of carrageenan. *Carbohydrate Polymers* **2021**, 272, 118479.

Yermak I.M., Mishchenko N.P., Davydova V.N., Glazunov V.P., Tarbeeva D. V., Kravchenko A.O., Pimenova E. A., Sorokina I. V. Carrageenans-sulfated polysaccharides from red seaweeds as matrices for the inclusion of echinochrome. *Marine Drugs* **2017**, 15, 337.

Yun H.R., Ahn S.W., Seol B., Vasileva E. A., Mishchenko N. P., Fedoreyev S. A., Stonik V. A., Han J., Ko K. S., Rhee B. D., Seol J. E., Kim H.K. Echinochrome A treatment alleviates atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice via IL-4 and IL-13 suppression. *Marine Drugs* **2021**, 19, 622.

Zhong H., Huang J., Wu J., Du J. Electrospinning nanofibers to 1D, 2D, and 3D scaffolds and their biomedical applications. *Nano Res.* **2022**, 15, 787-804.

Zhou D., Qin L., Zhu B., Wang X., Tan H., Yang J., Li D., Dong X., Wu H., Sun L., Li X., Murata Y. Extraction and antioxidant property of polyhydroxylated naphthoquinone pigments from spines of purple sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Food Chemistry* **2011**, 129, 1591-1597.